

# Feinstaub-induzierte Signalkaskaden

In a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

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

vorgelegt von

Katrin Bierhals

aus Dortmund

November 2006

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

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

Referent: Prof. Dr. J. Abel

Koreferent: Prof. Dr. F. Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 03.04.2007

Für mich und den Prinzen von Dortmund !!!

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Partikuläre Luftverschmutzung und ihre Folgen	1
1.2 Toxizität inhalierbarer Partikel	3
1.3 Induktion von zellulären Signalwegen durch Partikel	7
1.4 Zielsetzung	14
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>15</b>
2.1 Material	15
2.1.1 Geräte und Labor-Materialien	15
2.1.2 Feinchemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien	16
2.1.3 Antikörper für immunbiochemische und proteinbiochemische Methoden	18
2.1.4 Partikel	19
2.1.5 Inhibitoren und Stimulatoren	19
2.1.6 Tiergewebe	21
2.1.7 Zelllinien	22
2.1.8 Bakterien-Stämme	22
2.1.9 Klonierungs- und Expressionsvektoren	22
2.1.10 Plasmide	23
2.1.11 Oligonukleotide	23
2.2 Methoden	25
2.2.1 Zellkultur	25
2.2.1.1 Zellkultur-Medien	25
2.2.1.2 Subkultivierung	25
2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl	26
2.2.1.4 Belastung von Zelllinien mit Partikeln und Inhibitoren/Stimulatoren	26
2.2.2 Bakterien-Anzucht	27
2.2.2.1 Bakterien-Medium	27
2.2.2.2 Bakterien-Anzucht	27
2.2.3 Zellbiologische Methoden	28
2.2.3.1 Adhäsions-Test	28
2.2.3.2 Transiente Transfektion von Zelllinien	28

2.2.4	Molekularbiologische Methoden	29
2.2.4.1	Transformation kompetenter Bakterien-Zellen	29
2.2.4.2	Präparation von Nukleinsäuren	29
2.2.4.3	RT-PCR	30
2.2.4.4	Klonierungstechniken und Agarose-Gelelektrophorese	31
2.2.4.5	TA-Klonierung	31
2.2.4.6	<i>In vitro</i> -Mutagenese	32
2.2.4.7	Sequenzierung von DNA	32
2.2.5	Proteinbiochemische Methoden	33
2.2.5.1	Proteinextraktion aus Tiergeweben	33
2.2.5.2	Proteinextraktion aus konfluenten Zelllinien	33
2.2.5.3	Bestimmung des Proteingehaltes	33
2.2.5.4	Bestimmung der Lactat-Dehydrogenase (LDH)-Aktivität	34
2.2.5.5	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) unter denaturierenden Bedingungen	35
2.2.6	Immunbiochemische Methoden	36
2.2.6.1	Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot)	36
2.2.6.2	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen	36
2.2.6.3	Immunpräzipitation	37
2.2.7	Enzymatische Analysen	37
2.2.7.1	Bestimmung der enzymatischen Aktivität von AKT	37
2.2.7.2	Bestimmung der enzymatischen Aktivität der ILK	38
2.2.8	Quantifizierung von Immunsignalen	39
2.2.9	Statistik	39
2.2.10	Abbildungen	39
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>40</b>
3.1	Bestimmung der Zytotoxizität von CB	40
3.2	Effekte von CB auf MAP-Kinasen und AKT	41
3.2.1	CB-induzierte Aktivierung von ERK1 und ERK2	43
3.2.2	CB-induzierte Aktivierung von JNK1 und JNK2	44
3.2.3	CB-induzierte Aktivierung der MAP-Kinase p38	46
3.2.4	CB-induzierte Aktivierung von AKT	47
3.2.5	Zeitgleiche Aktivierung von ERK1/2 und AKT durch CB	49
3.3	Beteiligung von Zelloberflächen-Rezeptoren an der CB-induzierten Signaltransduktion	51

---

3.3.1	EGF-R vermittelte Aktivierung von JNK1/2	52
3.3.2	EGF-R und Integrin-vermittelte Aktivierung von ERK1/2 und AKT	54
3.3.3	Integrin-Profil von Ratten-Lungenepithelzellen (RLE-6TN)	57
3.3.4	$\beta_1$ -Integrin vermittelte Aktivierung von ERK1/2 und AKT	59
3.4	Analyse der Effekte von CB auf Proteine der Fokalkontakte	61
3.4.1	FAK	61
3.4.2	ILK	63
3.4.2.1	Herstellung einer Kinase-inaktiven Mutante der ILK	65
3.4.2.2	Dominant-negative Überexpression der ILK	66
3.5	Beteiligung der PI3-Kinase an der CB-induzierten Signaltransduktion	67
3.6	AKT-vermittelte Aktivierung von ERK1/2	70
3.6.1	Dominant-negative Überexpression von AKT	72
3.7	Analyse der Effekte von CB auf die Raf/MEK/ERK-Kaskade	73
3.7.1	MEK1/2 vermittelte Aktivierung von ERK1/2	75
3.8	<i>In vivo</i> Effekte von CB	77
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>79</b>
4.1	Alveolare Typ II Epithelzellen als <i>in vitro</i> Modellsystem	80
4.2	Verbrennungsgenerierte ultrafeine Kohlenstoff-Partikel als Modellstaub	81
4.3	CB-induzierte Aktivierung von MAP-Kinasen und AKT	82
4.4	Beteiligung von EGF-R und Integrinen an der CB-induzierten Signaltransduktion	84
4.5	Weiterleitung der CB-induzierten Signaltransduktion durch intrazelluläre Proteine	88
4.6	Modell zur CB-induzierten Signaltransduktion	91
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>95</b>
<b>6.</b>	<b>Summary</b>	<b>97</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>99</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>122</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>123</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A. dest	destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
AKT	Proteinkinase B
AP-1	Aktivatorprotein-1
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
CB	Carbon Black(s)
cDNA	komplementäre DNA
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CRP	C-reaktives Protein
DEP	Diesel-Emissions-Partikel
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DOC	Desoxycholsäure-Natriumsalz
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGF-R	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
ERK	extrazellulär-regulierte Kinasen
<i>et al.</i>	und andere
FAK	Fokaladhäsions-Kinase
FCS	fötales Kälberserum
GSK-3	Glykogen-Synthase-Kinase 3
HB-EGF	Heparin-bindender EGF-ähnlicher Wachstumsfaktor
HCl	Salzsäure (Chlorwasserstoff)
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IFN- $\gamma$	Interferon gamma

IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL-8	Interleukin 8
ILK	„Integrin-linked kinase“
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid
JNK	Jun N-terminale Kinasen
kb	Kilobasenpaar(e)
LB	Luria-Bertani
LDH	Lactat-Dehydrogenase
M	arithmetischer Mittelwert
MAP-Kinasen	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MEK	MAP-Kinasen-Kinasen
MEKK	MAP-Kinasen-Kinasen-Kinasen
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mRNA	Boten-RNA („messenger RNA“)
n	Anzahl der durchgeführten Experimente
N/m <sup>3</sup>	Partikelanzahl (Partikel pro Kubikmeter)
NaCl	Kochsalz (Natriumchlorid)
$\beta$ -NADH	beta-Nicotinamidadenindinukleotid
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
NF- $\kappa$ B	nukleärer Transkriptionsfaktor kappa B
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalz-Lösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDK	Phosphatidylinositol-3 abhängige Kinase
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PM	Schwebstäube („particulate matter“)
PM <sub>0,1</sub>	ultrafeine Partikel (aerodynamischer Durchmesser < 0,1 $\mu$ m)
PM <sub>2,5</sub>	feine Partikel (aerodynamischer Durchmesser < 2,5 $\mu$ m)
PM <sub>10-2,5</sub>	grobe Partikel (aerodynamischer Durchmesser 2,5 – 10 $\mu$ m)
PM <sub>10</sub>	granuläre Partikel (aerodynamischer Durchmesser < 10 $\mu$ m)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies



---

rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinasen
SDS	Natriumdodecylsulfat
S.E.M.	mittlerer Fehler des Mittelwertes
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TGF- $\beta$	Transformierender Wachstumsfaktor beta
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween-20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
U	Unit (1 $\mu$ mol Stoffumsatz/min)
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenprozent (Volumen/Volumen)
w/v	Gewichtsprozent (Gewicht/Volumen)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid

Die Abkürzungen der Basen und Aminosäuren erfolgten nach der IUPAC-Nomenklatur.

# 1. Einleitung

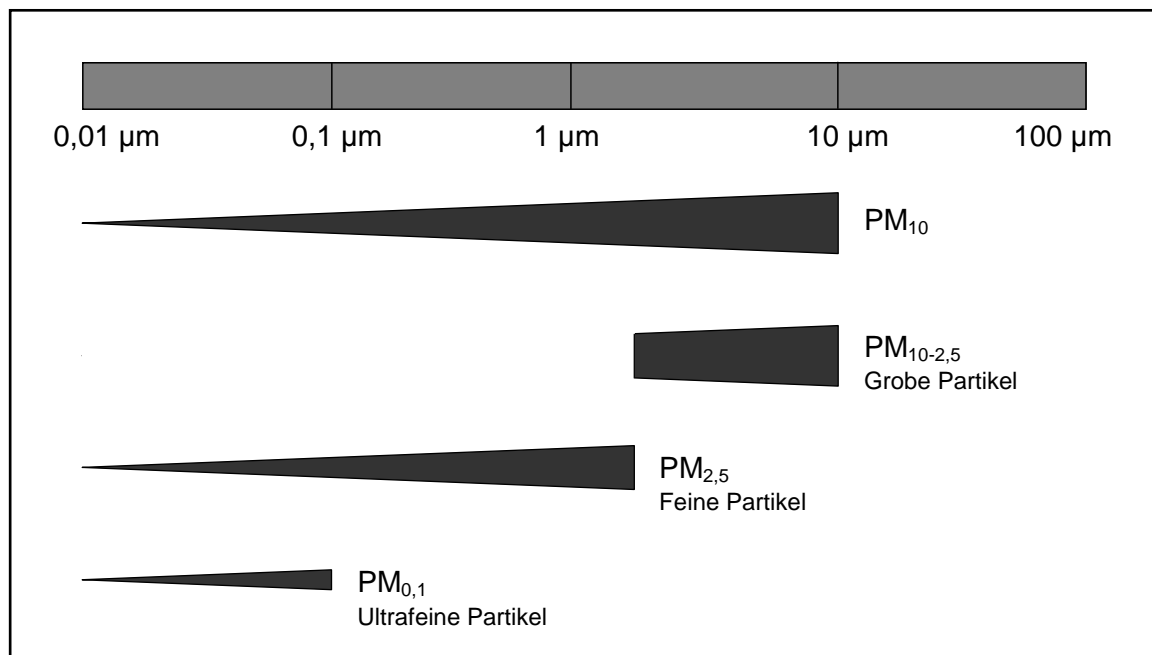
## 1.1 Partikuläre Luftverschmutzung und ihre Folgen

Die Luftverschmutzung wird durch eine Mischung aus Gasen, Flüssigkeiten und Schwebstäuben („particulate matter“, PM) erzeugt, in der u.a. Kohlenmonoxid, Stickstoffoxide, Schwefeldioxid, Ozon und Blei als Schadstoffe vorhanden sind [Brook *et al.*, 2004]. PM bestehen aus Partikeln, die in der Luft suspendiert sind und in der Größe sowie in der chemischen Zusammensetzung variieren können. Dabei stammen die Partikel sowohl aus natürlichen als auch aus anthropogenen Quellen. Zu den natürlichen Staubquellen werden z.B. Sandstürme, Vulkanemissionen, Bodenerosionen, Waldbrände sowie biologisch organische Materialien, d.h. Pollen, Sporen und Mikroorganismen (Viren, Bakterien, Pilze) gezählt. Zu den anthropogenen Staubquellen hingegen gehören Verbrennungsprozesse (Industrie, Heizungen, Kerzenbrand), Straßenverkehr (Motorenabgase, Dieselruß, Katalysatorausstoß, Abrieb von Reifen, Bremsen und Kupplungen), Küchentätigkeiten (Kochen, Braten, Grillen) und Zigarettenrauch [Vinzents *et al.*, 2005; Brook *et al.*, 2004]. Allgemein wird zwischen primären Partikeln, die direkt in die Atmosphäre abgegeben werden, und sekundären Partikeln, die erst in der Luft aus gasförmigen Vorläufersubstanzen gebildet werden, unterschieden [Krug *et al.*, 2004].

Um eine einheitliche Klassifizierung zu ermöglichen, werden die in der Luft vorhandenen Partikel anhand des aerodynamischen Durchmessers eingeteilt. Dieser ist definiert als der Durchmesser einer Kugel mit der normierten Dichte von  $1 \text{ g/cm}^3$ , welche die gleiche Sinkgeschwindigkeit wie der Partikel selber hat [Krug *et al.*, 2004]. Entsprechend werden unter der Bezeichnung  $\text{PM}_{10}$  alle granulären Partikel zusammengefasst, deren aerodynamischer Durchmesser  $< 10 \text{ }\mu\text{m}$  ist [vgl. Abb. 1.1]. Neben den groben Partikeln ( $\text{PM}_{10-2,5}$ ) sind darin auch feine Partikel mit einem aerodynamischen Durchmesser  $< 2,5 \text{ }\mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{2,5}$ ) sowie ultrafeine Partikel mit einem aerodynamischen Durchmesser  $< 0,1 \text{ }\mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{0,1}$ ) enthalten. Dabei kommen die ultrafeinen Partikel sowohl als einzelne Partikel als auch als Aggregate vor. Bei industrieller Herkunft werden ultrafeine Partikel auch als Nanopartikel bezeichnet, wobei in diesem Zusammenhang die Verbrennungsgenerierten Nanopartikel hervorzuheben sind [Donaldson *et al.*, 2005; Donaldson & Stone, 2003].

Allerdings unterscheiden sich Partikel nicht nur in Bezug auf die Größe, sondern auch hinsichtlich der Oberflächenladungen und möglicher Kontaminationen mit reaktiven Komponenten. So können Partikel Übergangsmetalle („transition metals“, u.a. Eisen) enthalten und organische chemische Verbindungen an ihrer Oberfläche binden. Zu letzteren gehören dabei polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK, z.B. Benz[a]pyren) und deren Stickstoff-Derivate, Sauerstoff-angereicherte PAK-Derivate (z.B. Ketone, Chinone),

heterozyklische organische Verbindungen, Aldehyde sowie aliphatische Kohlenwasserstoffe [Xia *et al.*, 2004].



**Abb. 1.1:** Bestandteile von PM<sub>10</sub> [verändert nach Brook *et al.*, 2004].

Insgesamt konnte die Gesamtbelastung der Luft durch Stäube in den letzten Jahren deutlich vermindert werden. Gleichzeitig ist allerdings die Partikelanzahl (N/m<sup>3</sup>) stark angestiegen, was auf einen erhöhten Anteil an ultrafeinen Partikeln zurückzuführen ist, der im Wesentlichen durch industrielle Verbrennungsprozesse und den Straßenverkehr verursacht wird [Donaldson *et al.*, 2005; Eickmann & Seitz, 2002]. Um eine weitere Verbesserung der Luftqualität zu erreichen, wurden in der Feinstaub-Richtlinie (99/30/EG) vom 22. April 1999 Grenzwertregelungen für PM<sub>10</sub> festgelegt, die von den Mitgliedsstaaten der Europäischen Union einzuhalten sind. So soll zum einen der Tagesmittelwert für PM<sub>10</sub> ab dem 01. Januar 2005 maximal 50 µg/m<sup>3</sup> betragen, wobei nur 35 Überschreitungen im Kalenderjahr zugelassen sind. Zum anderen soll der Jahresmittelwert für PM<sub>10</sub> ab dem Jahr 2005 nicht höher als 40 µg/m<sup>3</sup> sein.

Die Notwendigkeit solcher Maßnahmen zur Verbesserung der Luftqualität wird auch durch eine Vielzahl von epidemiologischen Studien angezeigt. So korreliert die Belastung der Bevölkerung mit einer erhöhten partikulären Luftverschmutzung mit erhöhten Morbiditäts- und Mortalitätsraten. Dabei führt ein Anstieg der PM<sub>10</sub>-Konzentration um 10 µg/m<sup>3</sup> zu einem ca. 1%-igen Anstieg der Mortalität [Krug *et al.*, 2004]. Zudem kommt es vermehrt zu Erkrankungen der Atemwege, wie z.B. Asthma, chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) und Fibrose, sowie zu Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Allergien und einem erhöhten Lungenkrebsrisiko [Brook *et al.*, 2004; Gilliland *et al.*, 2004; Harrison *et al.*, 2004; Pope *et al.*,

2004; de Hartog *et al.*, 2003; Penttinen *et al.*, 2001; Peters *et al.*, 2001; Peters *et al.*, 1997]. Eine Inhalationsstudie an Mäusen zeigte in diesem Zusammenhang ebenfalls, dass eine Zunahme der partikulären Luftverschmutzung zu vererbbaaren, genetischen Schäden in parentalen prämeiotischen Stammzellen führen kann [Somers *et al.*, 2004]. Akute Effekte, die durch ansteigende PM<sub>10</sub>-Konzentrationen hervorgerufen werden, treten jedoch, aufgrund einer erhöhten Infektionsanfälligkeit, hauptsächlich bei Kleinkindern, älteren Menschen und Personen mit bereits bestehenden Herzkreislauf- oder Atemwegs-Erkrankungen auf [Borm & Kreyling, 2004; Penttinen *et al.*, 2001].

Ob diese gesundheitsschädlichen Effekte der Luftverschmutzung auf einen erhöhten Anteil an feinen oder ultrafeinen Partikel zurückzuführen sind, wird momentan kontrovers diskutiert. So wurde in der epidemiologischen ULTRA-Studie eine erhöhte Assoziation zwischen feinen Partikeln und einer Verstärkung von Herzkreislauf- bzw. Atemwegs-Symptomen bei Patienten mit Herzkreislauf-Erkrankungen beobachtet [de Hartog *et al.*, 2003]. In einer anderen epidemiologischen Studie wurde hingegen auf eine erhöhte Assoziation zwischen ultrafeinen Partikeln und Atemwegs-Erkrankungen bei Asthmatikern aufmerksam gemacht [Penttinen *et al.*, 2001]. Zudem ist bekannt, dass die Exposition gegenüber höheren Konzentrationen ultrafeiner Partikel zu einer Verkürzung der Lebenserwartung um bis zu zwei Jahren führen kann [Eickmann & Seitz, 2002].

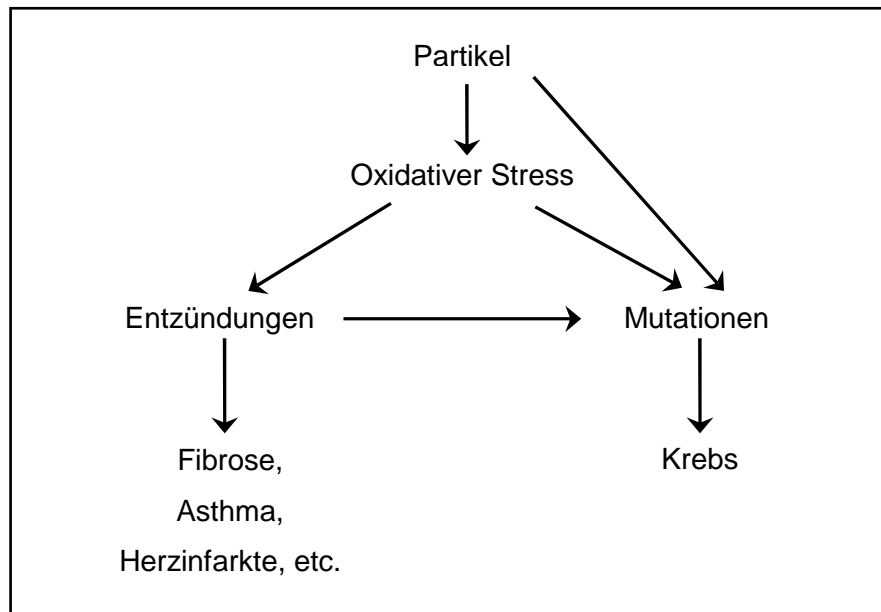
## 1.2 Toxizität inhalierbarer Partikel

Allgemein stellen inhalierbare Partikel ein hohes Risiko für die Lunge bzw. den gesamten Organismus dar, was sich durch ihre Fähigkeit, oxidativen Stress, Entzündungen und Krebs zu verursachen [vgl. Abb. 1.2], erklären lässt [Donaldson *et al.*, 2005]. Dabei entsteht der Partikel-induzierte, oxidative Stress zum einen durch Oberflächenladungen oder gebundene Übergangsmetalle, die zur Entstehung von primären Radikalen beitragen. Zum anderen werden sekundäre Radikale in Makrophagen, Granulozyten und anderen Zielzellen gebildet, die mit Partikeln in Berührung kommen [Brown *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2000; Wang & Bonner, 2000]. Partikel-induzierte Entzündungen wiederum werden entscheidend von der oxidativen Kapazität der Partikel beeinflusst. So führt erhöhter oxidativer Stress, aufgrund von gebundenen Übergangsmetallen oder einer reaktiven Partikeloberfläche, zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion. Allerdings können Entzündungen auch durch direkte Effekte von ultrafeinen Partikeln induziert werden, und zwar unabhängig von deren chemischer Zusammensetzung [Penttinen *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2000].

Die Partikel-induzierten Effekte und die Stärke der Symptome werden entscheidend von der Größe, den Oberflächenladungen sowie der chemischen Reaktivität der Partikel beeinflusst [Hoet *et al.*, 2004; Donaldson *et al.*, 2001]. Zudem hängt die Wirkung inhalierbarer Partikel von der Dosis, der Dimension, der Beständigkeit, den Abwehrreaktionen und dem Depositionsverhalten, d.h. der Ablagerung der Partikel im Organismus, ab. Die potentielle Toxizität der Partikel wird dabei vor allem durch die lokale Dosis bestimmt, die wiederum von der chemischen Zusammensetzung, der Konzentration und der Größe der Partikel abhängt [Borm & Kreyling, 2004]. Bei einer Abnahme der Partikelgröße steigen bei gleicher Masse die Oberfläche und die Anzahl der Partikel stark an. Entsprechend weist eine Probe, die aus Teilchen mit einem aerodynamischen Durchmesser von 10 nm besteht, eine 300mal größere Oberfläche und eine 1.000.000mal so große Teilchenzahl auf, wie eine Probe gleicher Gesamtmasse aus 1 µm großen Partikeln [Krug *et al.*, 2004]. Folglich haben ultrafeine Partikel, aufgrund des hohen Oberflächen-Massen-Verhältnisses, eine erhöhte biologische Toxizität [Donaldson & Stone, 2003]. Auch das Depositionsverhalten hängt von der Partikelgröße ab. So steigt die Wahrscheinlichkeit einer Ablagerung im Atemtrakt umso steiler an, je kleiner die Partikel sind. Entsprechend penetrieren grobe Partikel nur in den tracheobronchialen Raum und verbleiben dort. Feine Partikel hingegen gelangen in die kleinen Atemwege und die Alveolen, während ultrafeine Partikel in den Alveoli abgelagert werden [Hoet *et al.*, 2004]. Aggregate aus ultrafeinen Partikeln haben dabei, aufgrund des größeren aerodynamischen Durchmessers, ein anderes Depositionsverhalten als einzelne ultrafeine Partikel. Zudem können die aerodynamischen Charakteristika der Aggregate in Abhängigkeit von ihrer Kompaktheit voneinander abweichen. Dementsprechend wird die Lunge mit unterschiedlichen Situationen konfrontiert. So erhält die Lunge, bei einer Dispersion der Aggregate in der Flüssigkeit des Lungenepithels, eine Dosis einzelner ultrafeiner Partikel. Bleiben die Aggregate hingegen bestehen, wird die Lunge irregulären Strukturen aus ultrafeinen Partikeln ausgesetzt [Donaldson *et al.*, 2001].

Um Schädigungen durch inhalierte Partikel zu verhindern, verfügt die Lunge über umfangreiche Abwehrreaktionen, einschließlich mechanischer Ausschleusung (Husten, Niesen), unspezifischer und spezifischer Immunabwehrprozesse sowie Entgiftungsmechanismen [Borm & Kreyling, 2004]. Durch die dabei induzierte Auslösung lokaler Entzündungsreaktionen oder Aktivierung von Immunzellen, kommt es zur Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowie pro-inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Lipiden. Diese Substanzen führen wiederum zur Induktion von Entzündungsvorgängen in weiteren Zielorganen [Brook *et al.*, 2004; Heinrich *et al.*, 1995]. Aufgrund dessen müssen gesunde Gewebe bei diesen Abwehrreaktionen durch anti-inflammatorische Prozesse geschützt und repariert werden. Eine Fehlregulation dieser pro- und anti-inflammatorischen Prozesse kann zur Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion und damit zur Entwicklung

von Lungen-Erkrankungen, wie z.B. Asthma oder Fibrose [vgl. Abb. 1.2], führen [Borm & Kreyling, 2004].



**Abb. 1.2:** Schematische Darstellung zur Toxizität von inhalierbaren Partikeln [verändert nach Donaldson *et al.*, 2005].

Im Rahmen der mukoziliären Reinigung, die in der Luftröhre, den Bronchien und den Bronchiolen erfolgt, sowie der Makrophagen-vermittelten Reinigung in den respiratorischen Bronchiolen und Alveolen, werden abgelagerte Partikel zellulär gebunden und entfernt. Dabei hängt die Reinigung der Lunge nicht nur von der Gesamtmasse der Partikel ab, sondern auch von der Partikelgröße und der Partikeloberfläche. So haben ultrafeine Partikel, aufgrund der geringen Größe, teilweise eine hemmende Wirkung auf die Makrophagen-vermittelte Phagozytose [Donaldson *et al.*, 2001]. Zudem entfernt der Transport aus der Alveolarregion zum Kehlkopf, der selbst unter normalen Bedingungen sehr langsam ist, nur ein Drittel der in der Lungenperipherie abgelagerten Partikel. Die anderen zwei Drittel reichern sich, sofern sie nicht abbaubar sind, in der Lunge an und führen somit zu einer fortschreitenden Belastung und folglich zu einer Überladung des Lungengewebes [Hoet *et al.*, 2004]. Aufgrund der geringen Größe werden ultrafeine Partikel von einer Vielzahl an Zellen, wie z.B. Endothelzellen, Epithelzellen und Nervenzellen aufgenommen [Hoet *et al.*, 2004]. Zudem können ultrafeine Partikel in den Blutkreislauf eintreten, wodurch es auch zu einer Belastung anderer Organe, wie z.B. Leber, Herz, Gehirn und zentralem Nervensystem, kommen kann [Oberdörster *et al.*, 2004; Nemmar *et al.*, 2002; Oberdörster *et al.*, 2002; Nemmar *et al.*, 2001].

Der Eintritt der Partikel in den Blutkreislauf erklärt auch die nach einer erhöhten partikulären Luftverschmutzung auftretenden Herz-Kreislauf-Erkrankungen. So könnten ultrafeine Partikel mit dem vaskulären Endothelium oder mit arteriosklerotischen Plaques interagieren. Die dabei induzierte erhöhte Entzündung könnte, ebenso wie die Interaktion der Partikel mit Koagulationsfaktoren, zu einer Thrombose oder einem Herzinfarkt führen [Donaldson *et al.*, 2005; Routledge *et al.*, 2003]. Neben Entzündungen und einer Erhöhung des Herzinfarkt-Risikos, induziert die Langzeit-Exposition mit Partikeln auch eine Zunahme der Plasma-Viskosität und des Fibrinogen-Gehaltes. Zudem kommt es zu einem chronischen Fortschreiten von Arteriosklerose und einer Zunahme an C-reaktivem Protein (CRP), welches ein Marker für systemische Entzündungen ist [Pope *et al.*, 2004; Peters *et al.*, 2001; König *et al.*, 1999].

Zusätzlich zu den Entzündungsreaktionen verursachen in der Lunge angereicherte Partikel auch eine vermehrte Zellproliferation sowie genotoxische Effekte [Driscoll *et al.*, 2002]. Dabei deuten mikroskopische Untersuchungen auf lokale Zellproliferationen im Bereich von Partikelablagerungen hin [Albrecht *et al.*, 2002]. Durch die Freisetzung von ROS entsteht ein pro-mutagenes Milieu, welches die Bildung von fibrotischen Kernen und Mutationen fördert. Wenn die Schutzmechanismen, wie z.B. Apoptose (programmierter Zelltod) oder Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Reparaturmechanismen, nicht ausreichen, kann es zu einer Anhäufung von mutierten Zellen und schließlich zu malignen Lungenerkrankungen [vgl. Abb. 1.2] kommen [Knaapen *et al.*, 2004]. Die dabei induzierten Lungentumoren, wie z.B. Adenome, Adenokarzinome, squamöse Zellkarzinome und adenosquamöse Karzinome, werden sowohl aus alveolaren Typ II Epithelzellen als auch aus bronchialen Zilien-freien Epithelzellen (Clara-Zellen) gebildet [Albrecht *et al.*, 2004; Borm & Kreyling, 2004; Albrecht *et al.*, 2002]. Alveolare Typ II Epithelzellen sind die Vorläuferzellen des alveolaren Epithels und bilden zusammen mit Typ I Epithelzellen eine Permeabilitätsbarriere [Driscoll *et al.*, 1995]. Die Sensitivität dieser Zellen gegenüber Partikeln lässt sich dabei durch die hohe proliferative Kapazität der Epithelzellen erklären [Albrecht *et al.*, 2004].

Bei den genotoxischen Effekten von Partikeln, die in der Ausbildung von Lungentumoren enden können, wird zwischen primärer und sekundärer Genotoxizität differenziert [Knaapen *et al.*, 2004]. Die primäre Genotoxizität, die unabhängig von Entzündungsreaktionen allein durch Partikel induziert wird, ist auf PAKs, Übergangsmetalle auf der Partikeloberfläche oder reaktive Oberflächenladungen zurückzuführen. So verursachen PAKs die Bildung von DNA-Addukten, während Übergangsmetalle DNA-Strangbrüche induzieren [Harrison *et al.*, 2004; Somers *et al.*, 2004]. Die sekundäre Genotoxizität hingegen ist auf chronische Entzündungen zurückzuführen, die durch eine andauernde Exposition oder durch lokale Überladungen der Lunge verursacht werden. Dabei wird ein Überschuss an ROS freigesetzt, wodurch DNA-Schäden induziert werden [Donaldson *et al.*, 2005]. Dies stimmt mit den Ergebnissen

chronischer Inhalations- und Instillations-Studien an Ratten überein, die zeigten, dass ultrafeine Partikel auch unabhängig von der chemischen Zusammensetzung eine Zunahme der Zellproliferation sowie die Entstehung von Lungentumoren fördern [Maeng *et al.*, 2003; Godschalk *et al.*, 2000; Heinrich *et al.*, 1995]. Individuen mit bereits bestehenden Atemwegs-Erkrankungen, wie z.B. COPD oder Asthma, sind dabei, aufgrund des bestehenden erhöhten oxidativen Stresses, empfänglicher für die Partikel-Effekte [Harrison *et al.*, 2004].

### 1.3 Induktion von zellulären Signalwegen durch Partikel

Auf zellulärer Ebene induzieren inhalierbare Partikel, wie z.B. Kohlenstaub, Titandioxid, Diesel-Emissions-Partikel (DEP), Quarz aber auch faserige Asbest-Partikel, genotoxische Effekte sowie Veränderungen in der Apoptose und/oder Zellproliferation [vgl. Abb. 1.3]. Von besonderer Bedeutung in diesem Zusammenhang sind Verbrennungsgenerierte Kohlenstoff-Partikel, wie z.B. DEP oder Carbon Blacks (CB), wobei CB als Modellpartikel eingesetzt werden. Bei den CB handelt es sich um granuläre Kohlenstoff-Partikel mit unterschiedlichen aerodynamischen Durchmessern, die in der Industrie unter genau kontrollierten bzw. definierten Bedingungen aus Kohlenwasserstoffen hergestellt und für eine Vielzahl von technischen Anwendungen eingesetzt werden. Dabei können die CB-Partikel vernachlässigbare Mengen an Sauerstoff, Wasserstoff, PAKs (< 0,1 %), sowie Spuren von Metallen enthalten. Allerdings sind diese Mengen so gering, dass CB-Partikel als Kernpartikel für die Untersuchung reiner Partikeleffekte genutzt werden können [Donaldson *et al.*, 2001].

Untersuchungen mit unterschiedlichen Partikeln zeigten, dass bestimmte Parameter, wie z.B. Oberflächeneigenschaften und chemische Zusammensetzung der Partikel, für die Ausprägung der pathologischen Endpunkte relevant sein können. Partikel mit einer reaktiven Oberfläche oder gebundenen Übergangsmetallen bilden ROS und führen somit zu einer Induktion von Signalwegen, die in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und damit in der Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen oder Antioxidantien resultieren können [Brook *et al.*, 2004; Wang & Bonner, 2000; Fubini, 1997]. Allerdings haben auch Partikel mit einer geringen Oberflächen-Reaktivität bzw. geringen Mengen an gebundenen Übergangsmetallen einen Einfluss auf Apoptose oder Zellproliferation [Timblin *et al.*, 2002]. Zudem spielt die Größe der Partikel eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der zellulären Endpunkte. So werden bei groben Partikel nur geringe Effekte beobachtet, während feine und ultrafeine Partikel eine proliferative Aktivität zeigen [Timblin *et al.*, 2002].



Die Partikel-vermittelten Veränderungen von Apoptose oder Zellproliferation können möglicherweise durch eine direkte Aufnahme der Partikel in die Zelle induziert werden. Dabei liegen die Partikel in den Zellen nicht membrangebunden vor, sondern haben direkten Zugang zu intrazellulären Proteinen, Organellen und DNA, wodurch ihr toxisches Potential deutlich verstärkt wird [Geiser *et al.*, 2005]. Allerdings wird die *in vitro* Aufnahme von Partikeln in die Zellen kontrovers diskutiert, wobei auch hier die Partikelgröße scheinbar eine wichtige Rolle spielt. So wurde in einer Studie mit DEP beobachtet, dass der durch oxidativen Stress verursachte Zelltod in Gegenwart eines Endozytose-Inhibitors Dosis-abhängig vermindert wird [Matsuo *et al.*, 2003]. Eine andere Studie hingegen zeigte, dass die Aufnahme von ultrafeinen Titandioxid-Partikeln nicht über endozytotische Prozesse, sondern durch Diffusion oder adhäsive Interaktionen erfolgt [Geiser *et al.*, 2005].

Alternativ zu der Aufnahme von Partikeln in die Zellen wird die Interaktion der Partikel bzw. primären, Partikel-induzierten ROS mit Oberflächenstrukturen der betroffenen Zielzellen als Ansatzpunkt für die Ausbildung von Apoptose oder Zellproliferation diskutiert. Dabei könnte diese Interaktion über die extrazelluläre Matrix (ECM), über Zelloberflächen-Rezeptoren, wie z.B. Integrine oder den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGF-R), sowie direkt über die Zellmembran [vgl. Abb. 1.3] erfolgen [Albrecht *et al.*, 2004].

Die ECM ist ein Netzwerk aus Proteinen und Kohlenhydraten, welches aus unterschiedlichen Kombinationen von Kollagenen, Proteoglykanen, Elastin, Hyaluronsäure sowie Glykoproteinen, wie z.B. Fibronectin, Laminin, Vitronectin und Osteopontin, besteht [Ruoslahti & Pierschbacher, 1987]. Durch die Interaktion zwischen ECM und Zellen, an der Kollagene und Glykoproteine beteiligt sind, werden Signalwege reguliert, die u.a. Zellwachstum, Differenzierung, Zellüberleben und Genexpression kontrollieren [Yarwood & Woodgett, 2001; Lukashev & Werb, 1998].

Eine Vielzahl dieser ECM-Zell-Interaktionen werden durch die Integrine vermittelt [Juliano & Haskill, 1993]. Bei den Integrinen handelt es sich um eine Familie von heterodimeren, transmembranen Zelloberflächen-Rezeptoren, die aus jeweils einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Glykoprotein-Untereinheit aufgebaut sind. Dabei bestehen die einzelnen Untereinheiten aus einer großen extrazellulären Domäne, über die die Bindung der ECM-Proteine erfolgt, einer transmembranen Region und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne. Bislang wurden 18  $\alpha$ - und acht  $\beta$ -Untereinheiten identifiziert, die in unterschiedlichen Kombinationen assoziieren können [Gary *et al.*, 2003]. Dabei werden, in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Integrin-Rezeptoren, unterschiedliche Liganden erkannt und dementsprechend auch unterschiedliche Signalwege beeinflusst [Smith *et al.*, 1990]. Die Bindung von Integrinen an die ECM erfolgt mittels Protein-Protein-Interaktionen über die Tripeptid-Sequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD), die in einer Vielzahl von ECM-Proteinen, einschließlich Fibronectin, Vitronectin und Kollagen, vorliegt [Aplin *et al.*, 1998; Cheresch, 1987]. Nach der

Liganden-Bindung lagern sich die beteiligten Integrin-Rezeptoren in der Zellmembran zusammen und durchlaufen eine Konformationsänderung. Diese Neu-Anordnung, die auch als „Clustering“ bezeichnet wird, führt zur Bildung von Fokaladhäsions-Komplexen mit Zytoskelettproteinen (u.a. Vinculin, Talin,  $\alpha$ -Actinin) und Signalproteinen, wie z.B. Fokaladhäsions-Kinase pp125<sup>FAK</sup> (FAK) und „Integrin-linked kinase“ (ILK) [Lafrenie & Yamada, 1996]. Durch die Verbindung der ECM mit dem Aktin-Zytoskelett haben die Integrine eine Funktion als Adhäsions-Rezeptoren, wobei sie auch physikalisch oder chemisch induzierte Veränderungen der ECM, die z.B. die Struktur oder die Zusammensetzung betreffen, erkennen. Integrine sind aber auch Signal-Rezeptoren, die über die assoziierten Signalproteine sowohl eine Signaltransduktion vom Zelläußeren nach innen („outside-in-signaling“) als auch vom Zellinneren nach außen („inside-out-signaling“) induzieren können [Giancotti & Ruoslahti, 1999]. Dementsprechend sind Integrine in eine Vielzahl von Prozessen involviert, die u.a. Differenzierung, Zellproliferation, Zellüberleben, Wundheilung und Genexpression regulieren [Hynes, 1992].

Hinweise für eine Beteiligung von ECM und Integrinen an Partikel-induzierten Effekten stammen von Untersuchungen mit faserigen Asbest-Partikeln. So führt eine Beschichtung von Asbest-Fasern mit dem ECM-Protein Vitronektin *in vitro* zu einer erhöhten Phagozytose durch Mesothelzellen [Wu *et al.*, 2000]. Diese Phagozytose kann dabei durch die Inaktivierung von Integrinen vermindert werden [Liu *et al.*, 2000]. Auch die Asbest-induzierte Apoptose wird durch eine Inaktivierung der Integrin-vermittelten Signaltransduktion gehemmt [Sandhu *et al.*, 2000a]. *In vivo* wurde während der Asbest-induzierten Mesotheliom-Kanzerogenese zudem eine Hochregulation von Genen beobachtet, die in die Integrin-vermittelte Signaltransduktion involviert sind [Sandhu *et al.*, 2000b].

Neben den Integrinen wird auch eine Beteiligung des Zelloberflächen-Rezeptors EGF-R [vgl. Abb. 1.3] an der Partikel-Zell-Interaktion diskutiert [Albrecht *et al.*, 2004]. Beim EGF-R handelt es sich um ein Glykoprotein, welches durch die Bindung von Liganden, wie z.B. dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), dem Heparin-bindenden EGF-ähnlichen Wachstumsfaktor (HB-EGF), Amphiregulin oder Epiregulin aktiviert wird [Fickova, 2002]. Dabei induziert die Liganden-Bindung eine Dimerisierung des EGF-R, die wiederum eine Autophosphorylierung von Tyrosin-Resten in der Kinase-Domäne des Rezeptors und damit eine Aktivierung der intrinsischen Tyrosin-Kinase zur Folge hat. Die phosphorylierten Aminosäuren (AS) dienen als Bindungsstelle für Adapterproteine, die das Phosphorylierungssignal durch eine Kette von Signalproteinen vom Zytoplasma bis zum Zellkern weitergeben. Anschließend wird der Rezeptor in den Lysosomen abgebaut [Decker, 1993]. Die EGF-R vermittelte Signaltransduktion induziert dabei zelluläre Prozesse, die u.a. an der Regulation von Adhäsion, Zellwanderung, Differenzierung, Zellüberleben,

Zellwachstum, Zellproliferation und Genexpression beteiligt sind [Yamanaka *et al.*, 2003; Fickova, 2002].

Bislang gibt es mehrere Studien mit faserigen Asbest-Partikeln sowie granulären Partikeln, die auf eine Beteiligung des EGF-R an der Partikel-induzierten Signaltransduktion hindeuten. So führt ein direkter Kontakt von Mesothelzellen mit langen Asbest-Fasern *in vitro* zu einer erhöhten Expression des EGF-R, wobei dies eher auf die physikalische Partikel-Zell-Interaktion als auf eine Partikel-induzierte ROS-Produktion zurückzuführen ist. Die Asbest-Fasern induzieren aber, neben der Expression, auch eine erhöhte Phosphorylierung des EGF-R. Durch die Blockierung der EGF-R Kinase-Aktivität mit Hilfe eines spezifischen Inhibitors konnte in diesem Zusammenhang eine Beteiligung des EGF-R an der Asbest-induzierten Apoptose gezeigt werden [Faux *et al.*, 2001; Zanella *et al.*, 1999; Pache *et al.*, 1998]. Im Gegensatz dazu führt die Belastung von humanen bronchialen Epithelzellen mit ultrafeinen CB-Partikeln zu einer EGF-R vermittelten Zellproliferation, die durch einen spezifischen EGF-R Inhibitor vollständig gehemmt wird [Tamaoki *et al.*, 2004].

Somit wurde sowohl eine Beteiligung des EGF-R als auch der Integrine an der Partikel-induzierten Signaltransduktion nachgewiesen. Die Partikel-Effekte könnten daher möglicherweise auch durch Interaktionen zwischen diesen Zelloberflächen-Rezeptoren vermittelt werden. Dafür spricht auch, dass in zahlreichen Studien funktionelle Verbindungen zwischen der Integrin-induzierten Signaltransduktion und EGF-R vermittelten Signalwegen beschrieben werden [Lee & Juliano, 2004; Moro *et al.*, 2002; Kuwada & Li, 2000; Yu *et al.*, 2000; Moro *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998].

Aus der Literatur ist weiterhin bekannt, dass Partikel, durch die eingangs beschriebene Aufnahme in die Zielzellen oder durch die Interaktion mit Zelloberflächen-Rezeptoren, unterschiedliche Signaltransduktionskaskaden, z.B. mit Beteiligung von Proteinkinase C (PKC), Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) und Proteinkinase B (AKT) aktivieren können [vgl. Abb. 1.3], wodurch die unterschiedlichen Endpunkte induziert werden [Albrecht *et al.*, 2004].

Die PKC ist eine Serin/Threonin-Kinase, die durch eine Vielzahl von extrazellulären Stimuli aktiviert wird, und unterschiedliche Prozesse, wie z.B. Zellproliferation, Zellwachstum oder Mitochondrien-induzierte Apoptose reguliert [Brodie & Blumberg, 2003].

Eine Beteiligung der PKC an der Partikel-induzierten Pathogenese wurde bei Untersuchungen mit faserigen Asbest-Partikeln nachgewiesen [Shukla *et al.*, 2003; Perderiset *et al.*, 1991].

Neben der PKC können auch die MAP-Kinasen an der Partikel-induzierten Signaltransduktion beteiligt sein [Albrecht *et al.*, 2004]. MAP-Kinasen sind eine Gruppe von Serin/Threonin-Kinasen, die durch eine Vielzahl von extrazellulären Stimuli, wie z.B. Wachstumsfaktoren, Hormone, Zytokine, Entzündungen oder Stress, aktiviert werden und

Signaltransduktionen von der Zelloberfläche zum Zellkern vermitteln. In Säugerzellen gibt es mehrere Unterfamilien von MAP-Kinasen, zu denen die Extrazellulär-regulierten Kinasen (ERK1/2), die Jun N-terminalen Kinasen/Stress-aktivierten Proteinkinasen (JNK/SAPK1/2) sowie p38 und ERK5 gehören [Johnson & Lapadat, 2002]. Die Mitglieder der MAP-Kinasen werden durch MAP-Kinasen-Kinasen (MEK) an Threonin- und Tyrosin-Resten phosphoryliert und dadurch aktiviert. MEKs wiederum werden von MAP-Kinasen-Kinasen-Kinasen (MEKK), wie z.B. Raf, phosphoryliert und aktiviert [Cobb & Goldsmith, 1995]. Die Aktivierung dieser MEKK/MEK/MAP-Kinasen-Signalkaskade kann dabei in der Aktivierung einer Vielzahl von Signalproteinen und Transkriptionsfaktoren resultieren. Die Transkriptionsfaktoren interagieren daraufhin mit regulatorischen Domänen in der Promotor-Region von Genen, die an der Regulation von Differenzierung, Zellproliferation oder Apoptose beteiligt sind [Albrecht *et al.*, 2002]. Des Weiteren haben MAP-Kinasen einen Einfluss auf Entzündungsreaktionen, den Metabolismus sowie die Genexpression [Johnson & Lapadat, 2002].

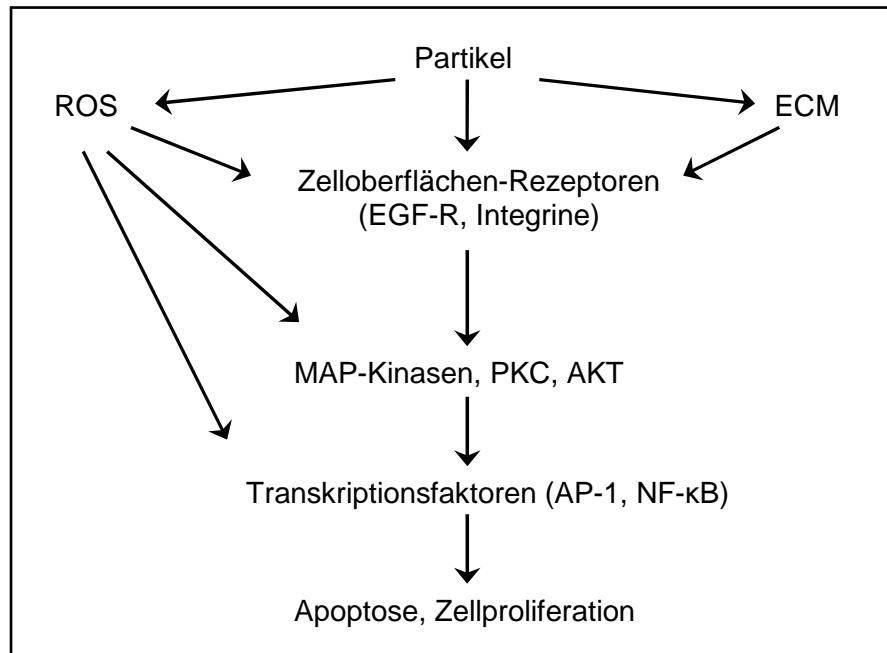
Bei Studien mit faserigen Asbest-Partikeln bzw. granulären Partikeln, wie z.B. DEP, PM, Quarz oder Kohlenstaub, wurde sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine Beteiligung von ERK1 und ERK2 an Partikel-induzierten Effekten beobachtet [Zhang *et al.*, 2004; Buder-Hoffmann *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2001]. So zeigten z.B. bronchiale und alveolare Epithelzellen nach der Instillation von Kohlenstaub eine erhöhte Phosphorylierung von ERK1/2 [Albrecht *et al.*, 2002]. In den meisten dieser Studien bezüglich der Partikel-induzierten Signalwege konnte dabei eine Beteiligung der Autophosphorylierung des EGF-R an der Aktivierung von ERK1/2 nachgewiesen werden. Neben ERK1/2 können aber auch JNK1 und JNK2 durch Partikel aktiviert werden. So führt die Belastung von Lungenepithelzellen mit DEP oder Quarz zu einer Induktion des JNK-Signalweges [Zhang *et al.*, 2004; Shukla *et al.*, 2001]. Bezüglich der Aktivierung von JNK1/2 durch faserige Asbest-Partikel gibt es jedoch, in Abhängigkeit vom Zellsystem, widersprüchliche Beobachtungen. So induzieren Asbest-Fasern in Lungenepithelzellen eine moderate Aktivierung von JNK1/2, während Mesothelzellen keine Asbest-vermittelte Aktivierung des JNK-Signalweges zeigen [Shukla *et al.*, 2001; Jimenez *et al.*, 1997]. Im Gegensatz dazu konnte in Mesothelzellen nach der Belastung mit Asbest-Fasern eine Dosis-abhängige Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase beobachtet werden [Swain *et al.*, 2004]. Die Belastung von Lungenepithelzellen mit DEP führt zudem zu einer gemeinsamen Aktivierung von ERK1/2, JNK1/2 sowie p38 Signalwegen [Zhang *et al.*, 2004]. Allerdings ist bislang noch nicht geklärt, welche dieser Signalwege letztendlich an der Partikel-vermittelten Induktion von Apoptose oder Zellproliferation beteiligt sind. Ebenso fehlen Informationen zu einer möglichen Interaktion dieser drei MAP-Kinasen-Signalwege miteinander oder mit anderen Signalwegen nach einer Belastung mit Partikeln [Albrecht *et al.*, 2004].

In diesem Zusammenhang wird u.a. auch eine Beteiligung des Signalweges der Proteinkinase AKT diskutiert. AKT ist, ebenso wie PKC oder MAP-Kinasen, eine Serin/Threonin-Kinase, von der bislang drei Isoformen bekannt sind. Die Aktivierung von AKT, die in Abhängigkeit von der Phosphatidylinositol-3 (PI3)-Kinase erfolgt, wird u.a. durch eine Integrin-vermittelte Zelladhäsion und eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren, wie z.B. Insulin oder EGF, induziert [Shah *et al.*, 2005; Fukuda *et al.*, 2003]. Für die vollständige Aktivität der AKT-Kinase ist eine Phosphorylierung an einem Threonin- und einem Serin-Rest essentiell [Kobayashi & Cohen, 1999; Delcommenne *et al.*, 1998]. Die Phosphorylierung des Threonins wird dabei durch die Phosphatidylinositol-3 abhängige Kinase-1 (PDK1) vermittelt. Für die Serin-Phosphorylierung hingegen gibt es widersprüchliche Aussagen. So wird zum einen eine Autophosphorylierung und zum anderen eine Beteiligung von Proteinkinasen wie z.B. PDK2 oder ILK, diskutiert [Troussard *et al.*, 2003; Toker & Newton, 2000; Alessi *et al.*, 1997]. Der PI3-Kinase/AKT-Signalweg ist an der Regulation von Signalwegen beteiligt, die u.a. Metabolismus, Genexpression, Angiogenese, Zellproliferation und Zellüberleben kontrollieren. Letzteres wird dabei entweder durch die Hemmung von pro-apoptotischen Signalen oder durch die Aktivierung von anti-apoptotischen Prozessen in der Zelle beeinflusst [Brazil & Hemmings, 2001; Datta *et al.*, 1999].

Bislang gibt es nur wenige Hinweise auf eine Beteiligung von AKT an Partikel-induzierten Effekten. So wurde zum einen in Mesothelzellen nach Behandlung mit faserigen Asbest-Partikeln eine gleichzeitige Aktivierung von ERK1/2 und AKT beobachtet, die durch  $\beta_1$ -Integrine vermittelt wird [Berken *et al.*, 2003]. Zum anderen induzieren DEP in Epidermis-Zellen eine PI3-Kinase abhängige Phosphorylierung von AKT, wohingegen ERK1/2 nur in geringem Maße aktiviert werden [Ma *et al.*, 2004].

Durch die Partikel-vermittelte Induktion der beschriebenen PKC-, AKT- bzw. MAP-Kinasen-Signalwege können unterschiedliche Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Aktivatorprotein-1 (AP-1) und nukleärer Transkriptionsfaktor Kappa B (NF- $\kappa$ B), aktiviert werden [vgl. Abb. 1.3]. Diese Aktivierung wiederum kann Veränderungen in der Apoptose- oder Zellproliferations-Rate verursachen. Zudem kann die Induktion der Transkriptionsfaktoren in der Aktivierung von Wachstumsfaktoren, einschließlich dem Transformierenden Wachstumsfaktor beta (TGF- $\beta$ ) oder Zytokinen, wie z.B. Interleukin 8 (IL-8), Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) und den Tumor-Nekrose-Faktoren alpha und beta (TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ ) resultieren [Albrecht *et al.*, 2004].

Sowohl Studien mit faserigen Asbest-Partikeln als auch mit granulären Partikeln konnten eine Beteiligung von AP-1 und NF- $\kappa$ B an Partikel-induzierten Effekten zeigen [Brown *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004; Ramos-Nino *et al.*, 2003; Albrecht *et al.*, 2002; Timblin *et al.*, 2002; Shukla *et al.*, 2001; Shukla *et al.*, 2000; Unfried *et al.*, 2000; Takizawa *et al.*, 1999; Janssen *et al.*, 1997].



**Abb. 1.3:** Mögliche Partikel-induzierte Signalwege [verändert nach Albrecht *et al.*, 2004].

In Abb. 1.3 sind die beschriebenen Signalwege, die möglicherweise an den Partikel-induzierten Effekten beteiligt sind, zusammengefasst. Demnach können Partikel über Interaktionen mit der Zellmembran, Zelloberflächen-Rezeptoren oder Proteinen der ECM unterschiedliche Signalwege induzieren, die in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren resultieren. Als Endpunkte für die Partikel-induzierten Signalwege werden Apoptose und Zellproliferation, aber auch die Expression bzw. Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen oder Chemokinen beeinflusst. Dabei haben Charakteristika, wie z.B. Partikelgröße, Oberflächen-Reaktivität und chemische Zusammensetzung der Partikel, einen entscheidenden Einfluss auf die beschriebenen Endpunkte. So können unterschiedliche Partikel scheinbar unterschiedliche Signalwege induzieren und damit auch unterschiedliche Effekte auf die Endpunkte ausüben.

## 1.4 Zielsetzung

Granuläre Partikel induzieren, in Abhängigkeit von ihrem aerodynamischen Durchmesser, über direkte und indirekte Effekte unterschiedliche Signalwege, die an der Entwicklung von malignen Lungenerkrankungen beteiligt sind. Eine Vielzahl an epidemiologischen Studien weist dabei auf eine erhöhte Assoziation zwischen Erkrankungen und ultrafeinen Partikeln hin. Zudem ist bekannt, dass ultrafeine Partikel pathogener sind als inhalierbare, aber nicht ultrafeine Partikel des gleichen Materials [Driscoll *et al.*, 1996]. Die dabei zugrunde liegenden molekularen Mechanismen, die durch ultrafeine Partikel vermittelt werden, sind bis dato jedoch noch weitestgehend unverstanden.

Daher sollten in der vorliegenden Arbeit Effekte untersucht werden, die Verbrennungsgenerierte ultrafeine Kohlenstoff-Partikel auf Zellen des Lungenepithels ausüben und möglicherweise in der Induktion von Apoptose und/oder Zellproliferation resultieren können. Als Modellstaub wurden ultrafeine CB-Partikel eingesetzt, die aufgrund der geringen Kontaminationen mit Übergangsmetallen oder PAKs auch als Kernpartikel für die Untersuchung reiner Partikeleffekte genutzt werden können. Als *in vitro* Versuchssystem diente eine alveolare Typ II Epithel-Zelllinie aus Ratten (RLE-6TN) [Driscoll *et al.*, 1995]. Durch einen, unabhängig von der vorliegenden Arbeit mit einer anderen Fragestellung durchgeführten, Tierversuch mit Ratten, die mittels intratrachealer Instillation mit CB behandelt wurden, stand das entsprechende *in vivo* System ebenfalls zur Verfügung.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit galt es dabei folgende Fragestellungen zu untersuchen:

- I) Sind Signalproteine, wie z.B. MAP-Kinasen und AKT, welche die zellulären Endpunkte Apoptose und/oder Zellproliferation induzieren können, an der CB-induzierten Signaltransduktion beteiligt?
- II) Sind Integrine oder der EGF-R in die Partikel-Zell-Interaktionen involviert?
- III) Welche intrazellulären Proteine, wie z.B. FAK, ILK oder PI3-Kinase, sind an der Weiterleitung der CB-induzierten Signale beteiligt?

Für die Charakterisierung der Feinstaub-induzierten Signaltransduktionen wurden Methoden der molekularen Biologie, der Proteinbiochemie und der Immunbiochemie eingesetzt. Die an der Signalweiterleitung beteiligten Komponenten, d.h. Zelloberflächen-Rezeptoren ebenso wie intrazelluläre Signalproteine, wurden mit Hilfe von spezifischen Inhibitoren und durch die Bestimmung der Aktivität untersucht. Zudem sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Kinase-inaktive Mutante der ILK hergestellt und für die transiente Transfektion der Lungenepithel-Zelllinie eingesetzt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Labor-Materialien

Autoklav, Tecnoclav	Integra Biosciences, Fernwald
Binokular, Leitz	Leica Microsystems, Wetzlar
Brutschrank für Bakterien	Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
Brutschrank für Zellkulturen (HERAcell 240)	Kendro, Hanau
Gelkammern	
Dual gel vertical unit	Sigma, Taufkirchen
Agarose-Gelelektrophoresekammer	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Glas-Teflon-Potter	B. Braun Biotech International, Melsungen
Heizblöcke	
Bioblock Scientific	Thermolyne Corp., Dubuque, USA
DNA Thermal Cycler	Perkin Elmer Cetus, Wellesley, USA
Trio-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Horizontal-Wasserbadschüttler	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Mikroskope	
Leitz	Leica Microsystems, Wetzlar
Olympus BX 60 Phasenkontrast	Olympus, Hamburg
pH-Meter, PHM 83 Autocal	Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Photometer	
Gene Quant II	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
MR 5000 Spektrophotometer	Dynatech, Embrach, Schweiz
Multiskan Ascent	Labsystems Inc., Waltham, USA
Schüttler, Polymax 1040	Heidolph Instruments, Kelheim
Spannungsgeber, EPS 500/400	Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, USA
Sterilbank	W.H. Mahl, Kaarst
Western Blot Transferkammer	
Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Ultraschallbad, Bransonic 220	Branson, Danbury, USA
Waagen	
Mettler PC 440, DeltaRange	Mettler-Toledo, Giessen
Sartorius 1602 MP	Sartorius, Göttingen



Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen
Zentrifugen	
Eppendorf-Zentrifuge 5414 C	Eppendorf, Hamburg
Rotanta/RP	Hettich Zentrifugen, Bäch, Schweiz
Sigma 3K30	B. Braun Biotech International, Melsungen
Sorvall RC-5, SS34 Rotor	Kendro Laboratory Products, Langenselbold

Alle weiteren Geräte werden an entsprechender Stelle im Methodenteil [vgl. 2.2] aufgeführt oder entsprachen dem üblichen Laborstandard. Die Labor-Materialien für Zellkultur und Bakterien-Anzucht wurden von den Firmen TPP (Trasadingen, Schweiz), Greiner Bio-One (Frickhausen) und Eppendorf (Hamburg) bezogen.

### 2.1.2 Feinchemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumacetat	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Ammoniumperoxiddisulfat (APS)	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bakto-Agar	Roth, Karlsruhe
Bakto-Trypton/Pepton	Roth, Karlsruhe
5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid (X-Gal)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brillant Blau G-250	Serva, Heidelberg
Desoxycholsäure-Natriumsalz (DOC)	Roth, Karlsruhe
Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP)-Mix	Promega, Mannheim
Dimethylformamid	Sigma, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen
2,4-Dinitrophenylhydrazin	Fluka, Buchs, Schweiz
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Größenstandard (Small Ladder)	Eurogentec, Seraing, Belgien
Ethidiumbromid	Roche Diagnostics, Mannheim
Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe

Ficoll	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Fotochemikalien (GBX Entwickler und Fixierer)	Sigma, Taufkirchen
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefe-Extrakt	Roth, Karlsruhe
IGEPAL CA-630 (Nonidet-40)	Sigma, Taufkirchen
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid (IPTG)	Stratagene, La Jolla, USA
Milchpulver	TSI, Zeven
$\beta$ -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	Serva, Heidelberg
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumpyruvat	Sigma, Taufkirchen
$\beta$ -Nicotinamidadenindinukleotid ( $\beta$ -NADH)	Sigma, Taufkirchen
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalz-Lösung (PBS)	Sigma, Taufkirchen
Phosphatase-Inhibitor Cocktail 2	Sigma, Taufkirchen
Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat (Tween-20)	Sigma, Taufkirchen
Ponceau S Färbelösung	Sigma, Taufkirchen
Protease-Inhibitor Cocktail	Sigma, Taufkirchen
Protein A Agarose	Upstate, Dundee, Großbritannien
Restriktionsenzyme	Roche Diagnostics, Mannheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Fluka, Buchs, Schweiz
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Taurin	Roth, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol FF	Serva, Heidelberg

Weitere an dieser Stelle nicht aufgeführte Chemikalien und Enzyme werden an entsprechender Stelle im Methodenteil [vgl. 2.2] beschrieben oder wurden von verschiedenen Herstellern in Analysequalität bezogen.

### 2.1.3 Antikörper für immunbiochemische und proteinbiochemische Methoden

#### *Primär-Antikörper:*

Kaninchen-Anti-AKT polyklonaler Antikörper	Cell Signaling, Danvers, USA
Kaninchen-Anti-Phospho-AKT (Ser <sup>473</sup> ) polyklonaler Antikörper	Cell Signaling, Danvers, USA
Kaninchen-Anti-Phospho-FAK (Tyr <sup>397</sup> ) polyklonaler Antikörper	Upstate, Dundee, Großbritannien
Kaninchen-Anti-Phospho-Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK-3) $\alpha/\beta$ (Ser <sup>21/9</sup> ) polyklonaler Antikörper	Cell Signaling, Danvers, USA
Kaninchen-Anti-ILK polyklonaler Antikörper	Upstate, Dundee, Großbritannien
Kaninchen-Anti-ILK1 polyklonaler Antikörper	Cell Signaling, Danvers, USA
Kaninchen-Anti-Integrin $\beta_3$ polyklonaler Antikörper	Chemicon, Temecula, USA
Kaninchen-Anti-Integrin $\beta_5$ polyklonaler Antikörper	Chemicon, Temecula, USA
Kaninchen-Anti-Integrin $\alpha_1$ polyklonaler Antikörper	Chemicon, Temecula, USA
Kaninchen-Anti-Integrin $\alpha_2$ polyklonaler Antikörper	Chemicon, Temecula, USA
Kaninchen-Anti-Integrin $\alpha_3$ polyklonaler Antikörper	Chemicon, Temecula, USA
Kaninchen-Anti-Integrin $\alpha_4$ polyklonaler Antikörper	Chemicon, Temecula, USA
Kaninchen-Anti-Integrin $\alpha_5$ polyklonaler Antikörper	Chemicon, Temecula, USA
Kaninchen-Anti-Integrin $\alpha_v$ polyklonaler Antikörper	Chemicon, Temecula, USA
Kaninchen-Anti-p38 MAP-Kinase polyklonaler Antikörper	Cell Signaling, Danvers, USA
Kaninchen-Anti-Phospho-p38 MAP-Kinase (Thr <sup>180</sup> /Tyr <sup>182</sup> ) polyklonaler Antikörper	Cell Signaling, Danvers, USA
Kaninchen-Anti-p44/42 MAP-Kinase polyklonaler Antikörper	Cell Signaling, Danvers, USA
Kaninchen-Anti-Phospho-p44/42 MAP-Kinase (Thr <sup>202</sup> /Tyr <sup>204</sup> ) polyklonaler Antikörper	Cell Signaling, Danvers, USA
Kaninchen-Anti-Phospho-MEK1/2 (Ser <sup>217/221</sup> ) (166F8) monoklonaler Antikörper	Cell Signaling, Danvers, USA
Kaninchen-Anti-Phospho-Raf (Ser <sup>259</sup> ) polyklonaler Antikörper	Cell Signaling, Danvers, USA
Kaninchen-Anti-SAPK/JNK polyklonaler Antikörper	Cell Signaling, Danvers, USA
Kaninchen-Anti-Phospho-SAPK/JNK (Thr <sup>183</sup> /Tyr <sup>185</sup> ) polyklonaler Antikörper	Cell Signaling, Danvers, USA
Maus-Anti-AKT (1G1) monoklonaler Antikörper, immobilisiert durch Kopplung an Agarose-Kugeln	Cell Signaling, Danvers, USA

Maus-Anti-FAK monoklonaler Antikörper (Klon 4.47)	Upstate, Dundee, Großbritannien
Maus-Anti-HA-tag monoklonaler Antikörper (Klon 12CA5)	Roche Diagnostics, Mannheim
Maus-Anti-Integrin $\beta_1$ monoklonaler Antikörper	BD Biosciences, San José, USA

*Sekundär-Antikörper:*

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

Die jeweils eingesetzten Antikörper-Verdünnungen werden im entsprechenden Ergebnisteil angegeben.

#### 2.1.4 Partikel

Ultrafeines CB (Printex 90) wurde von Degussa (Frankfurt) bezogen. Die Primär-Partikel haben einen aerodynamischen Durchmesser von 14 nm, eine Größe von 7,7 - 28,2 nm und eine spezifische Dichte von 1,82 - 1,89 g/cm<sup>3</sup>. Die Verunreinigungen mit PAKs liegen unter 0,1 % [Stone *et al.*, 1998].

Die CB-Partikel wurden in einer Konzentration von 1 mg/ml in PBS suspendiert und für 1 h im Ultraschallbad (220 – 240 V, 120 W, 50 – 60 Hz) behandelt, um eine vollständige Dispersion zu gewährleisten. Die für die jeweilige Belastung der RLE-6TN Zellen [vgl. 2.1.7 und 2.2.1.4] eingesetzten Konzentrationen werden im entsprechenden Ergebnisteil angegeben.

#### 2.1.5 Inhibitoren und Stimulatoren

*Inhibitoren:*

AKT-Inhibitor:

SH-5 (D-3-Desoxy-2-O-methyl-myoinositol-1-[(R)-2-methoxy-3(octadecyloxy)-propylhydrogenphosphat]) (Alexis Biochemicals, Lausen, Schweiz) hemmt die Phosphorylierung von AKT an Ser<sup>473</sup> und damit die Aktivierung der Kinase [Kozikowski *et al.*, 2003]. SH-5 wurde in einer Konzentration von 10 mM in A. dest gelöst. Vor der

Belastung mit CB [vgl. 2.1.4 und 2.2.1.4] wurden die RLE-6TN Zellen [vgl. 2.1.7] mit 0,01 – 1  $\mu$ M SH-5 für 1 h inkubiert.

#### EGF-R-Inhibitor:

Tyrphostin AG 1478 (Sigma, Taufkirchen) ist ein spezifischer Inhibitor der EGF-R Tyrosin-Kinase-Aktivität [Osherov & Levitzki, 1994]. Tyrphostin AG 1478 Lösungen (10 mM) wurden mit DMSO hergestellt. Die RLE-6TN Zellen wurden mit 10  $\mu$ M Tyrphostin AG 1478 bei einer DMSO-Endkonzentration von 0,1 % (v/v) für 1 h vorinkubiert und im Anschluss mit CB belastet.

#### Integrin inhibierende Substanzen:

Der monoklonale Antikörper Hamster-Anti-Ratte CD29 ( $\beta_1$ -Integrin (No Azide/Low Endotoxin), Isotyp Hamster Immunglobulin M (IgM), BD BioSciences Pharmingen, San José, USA) bindet an die extrazelluläre Domäne der  $\beta_1$ -Integrin Untereinheit, verhindert dadurch die Bindung von  $\beta_1$ -Integrin an die ECM und damit die  $\beta_1$ -Integrin gerichtete Signaltransduktion vom Zelläußeren nach innen („outside-in-signaling“) [Chen *et al.*, 2004]. Der Antikörper lag in einer Konzentration von 1 mg/ml vor. Weitere Verdünnungen erfolgten mit PBS. Vor der Belastung mit CB wurden die RLE-6TN Zellen mit 1  $\mu$ g/ml Anti-CD29 für 1 h inkubiert.

Der monoklonale Antikörper Maus-Anti-Hamster IgM (BC BioSciences Pharmingen, San José, USA), der nicht an Integrine bindet, diente als Negativkontrolle für den spezifischen  $\beta_1$ -Integrin Antikörper CD29 [Cruet-Hennequart *et al.*, 2003]. Der Antikörper, der in einer Konzentration von 1 mg/ml vorlag, wurde mit PBS verdünnt. Die RLE-6TN Zellen wurden mit 1  $\mu$ g/ml Anti-Hamster IgM für 1 h vorinkubiert und im Anschluss mit CB belastet.

Das Peptid RGDS (H-Arg-Gly-Asp-Ser-OH) (Calbiochem Merck Biosciences, Schwalbach) hemmt eine Vielzahl von Integrinen durch die Bindung an ihre RGD-Erkennungssequenz [Ruoslahti & Pierschbacher, 1987]. Das RGD-Peptid wurde in einer Konzentration von 100 mM in A. dest gelöst. Vor der Belastung mit CB wurden die RLE-6TN Zellen mit 10  $\mu$ M RGD für 1 h inkubiert.

Das Peptid GRADSP (H-Gly-Arg-Ala-Asp-Ser-Pro-OH) (Calbiochem Merck Biosciences, Schwalbach), welches sich in einer AS von der RGD-Sequenz unterscheidet, bindet nicht an Integrine und wurde daher als Negativkontrolle für das RGD-Peptid eingesetzt [Ruoslahti & Pierschbacher, 1987]. Das Kontrollpeptid wurde in einer Konzentration von 50 mM in 5 % (v/v) Essigsäure gelöst. Die RLE-6TN Zellen wurden mit 10  $\mu$ M Kontrollpeptid für 1 h vorinkubiert und im Anschluss mit CB belastet.

**MEK-Inhibitor:**

PD 98059 (2'-Amino-3'-methoxyflavon) (Calbiochem Merck Biosciences, Schwalbach) ist ein allosterischer, reversibler MEK-Inhibitor [Dudley *et al.*, 1995]. Der Hemmstoff wurde in einer Konzentration von 2,6 mM in Methanol gelöst. Vor der Belastung mit CB wurden die RLE-6TN Zellen mit 10 µM PD 98059 für 1 h inkubiert.

**PI3-Kinase Inhibitoren:**

LY 294002 (2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on) (Calbiochem Merck Biosciences, Schwalbach) bindet reversibel an die ATP-Bindungsstelle der katalytischen Untereinheit der PI3-Kinase [Srivastava, 1998]. Der Inhibitor wurde in einer Konzentration von 16 mM in Ethanol gelöst. Die RLE-6TN Zellen wurden mit 1 µM LY 294002 für 30 min vorinkubiert und im Anschluss mit CB belastet.

Wortmannin (Alexis Biochemicals, Lausen, Schweiz) hemmt die PI3-Kinase irreversibel durch die Bindung an die ATP-Bindungsstelle [Walker *et al.*, 2000]. Wortmannin-Lösungen (12 mM) erfolgten in Methanol. Vor der Belastung mit CB wurden die RLE-6TN Zellen mit 10 nM Wortmannin für 30 min inkubiert.

**Stimulatoren:**

Als Positivkontrolle für die Aktivierung der EGF-R Signaltransduktionskaskade diente eine EGF-Lösung (10 µg/ml in A. dest) (Biossource, Nivelles, Belgien) [Miyamoto *et al.*, 1996]. Die Behandlung der RLE-6TN Zellen erfolgte dabei für 5 min mit 100 ng/ml EGF.

**2.1.6 Tiergewebe**

Die in dieser Arbeit untersuchten Lungengewebe wurden freundlicherweise von Dr. Klaus Unfried und Dr. Roel Schins (Institut für Umweltmedizinische Forschung, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

Die Lungengewebe stammten aus acht Wochen alten, weiblichen Big Blue<sup>®</sup>-Ratten (Typ Fischer 344) (Stratagene, La Jolla, USA), die einmal wöchentlich mittels intratrachealer Instillation behandelt wurden. Dabei wurden jeweils sieben Tiere (CB-Gruppe) mit 25 mg CB/kg Körpergewicht, suspendiert in Kochsalz (NaCl)-Lösung, belastet. Sieben weitere Tiere (Kontrollgruppe) wurden nur mit NaCl-Lösung behandelt. Vier Wochen nach Beginn der Behandlung wurden die Tiere getötet. Nach einer Lungenlavage wurden die Lungengewebe präpariert, zerkleinert, durchmischt und schockgefroren. Im Anschluss wurden die Lungengewebe bis zur Proteinextraktion [vgl. 2.2.5.1] bei -80 °C gelagert.

### 2.1.7 Zelllinien

RLE-6TN: Immortalisierte alveolare Typ II Epithel-Zelllinie aus adulten Ratten (ATCC, Manassas, USA) [Driscoll *et al.*, 1995]. Um morphologische oder physiologische Veränderungen auszuschließen, wurden RLE-6TN Zellen nur von Passage 5 bis Passage 40 verwendet.

### 2.1.8 Bakterien-Stämme

Für die Transformation kompetenter Bakterien-Zellen [vgl. 2.2.4.1 und 2.2.4.6] wurden folgende *Escherichia coli* (*E. coli*) Stämme eingesetzt:

*E. coli* TOP10F': F'*{lacI<sup>q</sup>Tn10(Tet<sup>R</sup>)}* *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74 deoR recA1 araD139  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL endA1 nupG* (Invitrogen Life Technologies, Paisley, Großbritannien)*

*E. coli* XL1-Blue: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB lacI<sup>q</sup>  $\Delta$ M15 Tn10(Tet<sup>R</sup>)]* (Stratagene, La Jolla, USA)

### 2.1.9 Klonierungs- und Expressionsvektoren

pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup>: 4 kb großer Plasmidvektor mit 3'-Thymin-Überhängen und kovalent gebundener Topoisomerase I für die direkte Ligation von PCR-Produkten mit 3'-Adenin-Überhängen (Invitrogen Life Technologies, Paisley, Großbritannien).

pCMV-6 HA: 4,9 kb großer Vektor mit CMV-Promotor und N-terminalem HA-tag zur Expression von Proteinen in Säugerzellen. Der Vektor wurde freundlicherweise von Dr. Thomas Franke (Columbia University, New York, USA) zur Verfügung gestellt.

### 2.1.10 Plasmide

pCMV-6 HA AKT (K179M): pCMV-6 HA-Derivat, enthält ein 1.442 Bp großes *XbaI/BamHI* AKT-Fragment mit einer Punktmutation, die in der ATP-Bindungsstelle an Position 179 zum Austausch des Lysin-Restes zu Methionin führt. Dieser AS-Austausch hat eine Hemmung der Kinase-Aktivität zur Folge. Das AKT-Konstrukt wurde freundlicherweise von Dr. Thomas Franke (Columbia University, New York, USA) zur Verfügung gestellt [Franke *et al.*, 1995].

*In dieser Arbeit hergestellte Plasmide:*

pCRII ILK 25/8: pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup> Derivat, enthält ein 1.359 Bp großes Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Fragment für ILK (aus Ratten, NCBI Zugangsnummer: NM\_133409) mit beidseitigen 3'-Adenin-Überhängen.

pCRII ILK 25/8 E359K: 5,2 kb großes Derivat von pCRII ILK 25/8 mit einer Punktmutation in der ILK-Sequenz, die in der Subdomäne VIII an Position 359 zum Austausch des Glutaminsäure-Restes zu Lysin führt. Dieser AS-Austausch resultiert in einer Hemmung der Kinase-Aktivität [Persad *et al.*, 2001].

pCMV-6 HA ILK 25/8 E359K-5: pCMV-6 HA-Derivat mit einem 1.359 Bp großen *EcoRI* ILK-Fragment mit 3'-Adenin-Überhängen und einem AS-Austausch von Glutaminsäure zu Lysin an Position 359 in der Subdomäne VIII [Persad *et al.*, 2001].

### 2.1.11 Oligonukleotide

Für die Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR) [vgl. 2.2.4.3] und die *in vitro*-Mutagenese [vgl. 2.2.4.6] wurden verschiedene genspezifische Oligonukleotide durch die Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

Vektor-homologe Oligonukleotide für die Sequenzierung [vgl. 2.2.4.7] wurden von der Firma Scientific Research and Developmental GmbH (SRD, Oberursel) hergestellt.



Start- und Stop-Codons sind durch eckige Klammern markiert, wohingegen Basenfehlpaarungen unterstrichen sind.

*Oligonukleotide für RT-PCR und in vitro-Mutagenese:*

ILK-Start: 23-mer:  
5'-[ATG]GACGACATTTTCACTCAGTG-3'

ILK-Stop: 24-mer:  
5'-[CTA]CTTGTCTGCATCTTCTCCAA-3'

ILKE359Kfwd: 37-mer:  
5'-CCTGCCTGGGTGGCCCCTAAAGCCCTGCAAAAGAAGC-3'

ILKE359Krev: 37-mer:  
5'-GCTTCTTTTGCAGGGCTTIAGGGGCCACCCAGGCAGG-3'

*Oligonukleotide für Sequenzierungen:*

ILK-Mid: 17-mer:  
5'-CTTCGAGAGCTTCTCCG-3'

ILK-Ori: 25-mer:  
5'-GCTCCTCGAGGAACTGAAAAACCAG-3'

ILKrev: 19-mer:  
5'-GTCCTGCATCTTCTCCAAG-3'

M13fwd: 16-mer:  
5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'

M13rev: 17-mer:  
5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

pCMILKOri: 21-mer:  
5'-GATCTGGTACCACGCGTATCG-3'

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Zellkultur-Medien

RLE-6TN Nährmedium:

- Ham's F12 Medium
- 2 mM L-Glutamin
- 5 % (v/v) fötales Kälberserum (FCS)
- 50 U/ml Penicillin
- 50 µg/ml Streptomycin
- 2,5 µg/ml Amphotericin B

RLE-6TN Hungermedium:

- Ham's F12 Medium
- 2 mM L-Glutamin
- 0,5 % (v/v) FCS
- 50 U/ml Penicillin
- 50 µg/ml Streptomycin
- 2,5 µg/ml Amphotericin B

Die Bestandteile der Zellkultur-Medien wurden von der Firma Sigma (Taufkirchen) bezogen. FCS wurde vor Gebrauch für 30 min bei 56 °C inaktiviert und anschließend bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.1.2 Subkultivierung

RLE-6TN Zellen [vgl. 2.1.7] sind adhärent und wachsen in einer konfluenten Zellschicht (Monolayer). Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit in 75 – 175 cm<sup>2</sup> Zellkultur-Flaschen mit 10 – 30 ml Nährmedium [vgl. 2.2.1.1]. Einmal pro Woche wurden die Zellen passagiert und alle 2 – 3 Tage wurde das Nährmedium gewechselt. Verwendete Puffer und Medien wurden hierzu jeweils auf 37 °C temperiert.

Für die Subkultivierung der Zellen wurde das Nährmedium abgesaugt. Die Zellen wurden 1 x mit PBS gewaschen und anschließend für 20 s mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (Biochrom, Berlin) versetzt. Nach einer Inkubation für 2 – 5 min bei 37 °C wurden die Zellen in frischem

Nährmedium aufgenommen, mit Hilfe eines Zellschabers vom Flaschenboden abgelöst und in ein 50 ml Polypropylenröhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (760 Umdrehungen pro Minute (rpm), 6 min) und das Pellet wurde in 10 ml Nährmedium resuspendiert. Die Zellen wurden 1:10 verdünnt in neue Zellkultur-Flaschen mit 10 ml frischem Nährmedium gegeben.

Für die Herstellung von Gefrierkulturen wurden  $2 \times 10^6$  Zellen mit 1 ml Nährmedium und 1 ml 22 % (v/v) DMSO (in FCS) versetzt und in Einfrierröhrchen für 15 min bei 4 °C gelagert. Nach einer Inkubation für 48 h bei -80 °C wurden die Gefrierkulturen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Bei der Revitalisierung wurde die Gefrierkultur aus dem flüssigen Stickstoff direkt in ein Wasserbad gegeben und bei 37 °C vollständig aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen langsam in 50 ml Nährmedium aufgenommen und zentrifugiert (760 rpm, 6 min). Das Pellet wurde in 5 ml Nährmedium resuspendiert und in 25 cm<sup>2</sup> Zellkultur-Flaschen ausgesät. Nach 24 – 48 h wurde das Nährmedium gewechselt.

### **2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl**

Um die RLE-6TN Zellen [vgl. 2.1.7] in einer definierten Dichte auszusäen, wurde die Zellzahl bestimmt. Dazu wurden die Zellen wie bei der Subkultivierung [vgl. 2.2.1.2] vom Boden der Zellkultur-Flaschen abgelöst, zentrifugiert (760 rpm, 6 min) und in 5 ml Nährmedium [vgl. 2.2.1.1] resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden 10 µl auf eine Neubauer-Zählkammer (Brand, Ludwigshafen) gegeben. Unter dem Mikroskop wurden die Zellen von mindestens zwei Großquadraten ausgezählt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte anhand des Verdünnungsfaktors und der Kammerkonstante der Neubauer-Zählkammer.

### **2.2.1.4 Belastung von Zelllinien mit Partikeln und Inhibitoren/Stimulatoren**

Für die Belastung der RLE-6TN Zellen [vgl. 2.1.7] mit CB [vgl. 2.1.4] bzw. Inhibitoren oder Stimulatoren [vgl. 2.1.5], sowie den Adhäsions-Test [vgl. 2.2.3.1] wurden die Zellen, nach der Bestimmung der Zellzahl [vgl. 2.2.1.3], in einer definierten Dichte ausgesät.

Die Belastung der Zellen, die für die proteinbiochemischen Analysen [vgl. 2.2.5] eingesetzt wurden, erfolgte auf 6-Loch-Zellkultur-Platten, wobei pro Feld (9,6 cm<sup>2</sup>)  $3,84 \times 10^5$  Zellen in 3 ml Nährmedium [vgl. 2.2.1.1] zur Aussaat kamen. Für die transienten Transfektionen [vgl. 2.2.3.2] wurden  $2,88 \times 10^5$  Zellen pro Feld ausgesät. Für die enzymatischen Analysen [vgl. 2.2.7] sowie die Präparation von Gesamt-Ribonukleinsäure (RNA) [vgl. 2.2.4.2] kamen 3 x

10<sup>6</sup> Zellen in 10 ml Nährmedium pro 75 cm<sup>2</sup> Zellkultur-Flasche zur Aussaat, während für den Adhäsions-Test 3 x 10<sup>6</sup> Zellen in 20 ml Nährmedium pro 175 cm<sup>2</sup> Zellkultur-Flasche ausgesät wurden.

Nach einer Inkubation im Brutschrank für 24 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit lag eine zu 80 – 90 % konfluente Zellschicht vor. Das Nährmedium wurde abgenommen, die Zellen wurden 2 x mit PBS gewaschen und für 20 h in Hungermedium (0,5 % (v/v) FCS) [vgl. 2.2.1.1] inkubiert, um die Zellen in der Ruhephase zu arretieren.

Im Anschluss erfolgte die Belastung der Zellen mit CB bzw. Inhibitoren oder Stimulatoren, wobei alle Substanzen direkt zum Hungermedium zugegeben wurden. Die Dauer der Belastung sowie die jeweils eingesetzten Konzentrationen werden im entsprechenden Ergebnisteil angegeben.

## 2.2.2 Bakterien-Anzucht

### 2.2.2.1 Bakterien-Medium

Luria-Bertani (LB)-Medium [Sambrook *et al.*, 1989]:

- 10 g/l NaCl
- 10 g/l Bakto-Trypton/Pepton
- 5 g/l Hefe-Extrakt
- pH 7,5

Zur Herstellung von Kulturplatten wurde dem LB-Medium 1,5 % (w/v) Bakto-Agar zugesetzt. Die Medien wurden zur Sterilisation autoklaviert (20 min, 121 °C, 1 bar Überdruck). Zur Selektion der Ampicillin-Resistenz wurden dem Medium bei einer Temperatur von höchstens 60 °C nach dem Autoklavieren 100 mg/l Ampicillin (sterilfiltriert, 0,45 µm Porenweite, Einmalfilter, Pall Corporation, Ann Arbor, USA) zugesetzt.

### 2.2.2.2 Bakterien-Anzucht

Um Einzelkolonien zu erhalten, wurden die *E. coli* Bakterien [vgl. 2.1.8] mit einer Impföse auf LB-Agar [vgl. 2.2.2.1] mit Ampicillin ausgestrichen und für 16 – 18 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Die Anzucht der Bakterien in kleinen Kulturvolumina (ca. 2 ml) erfolgte in sterilen 12 ml Gefäßen in einem Horizontal-Wasserbadschüttler mit 200 – 250 rpm für 16 – 18 h bei 37 °C.

Die Kulturen wurden jeweils mit einer Einzelkolonie angeimpft. Zur Bakterien-Anzucht in größeren Kulturvolumina (50 - 100 ml) wurden sterile Schikanen-Erlenmeyerkolben verwendet, die mit einer über Nacht gewachsenen Vorkultur 2%-ig (v/v) angeimpft wurden. Zur langfristigen Lagerung von Bakterien-Zellen wurden 30%-ige (v/v) Glycerin-Kulturen angelegt und bei -80 °C gelagert.

## **2.2.3 Zellbiologische Methoden**

### **2.2.3.1 Adhäsions-Test**

Als Positivkontrolle für die Aktivierung der ILK wurde ein Adhäsions-Test mit dem ECM-Protein Fibronectin (10 µg/ml in PBS) (BD Biosciences, San José, USA) durchgeführt [Troussard *et al.*, 1999].

Hierzu wurden 75 cm<sup>2</sup> Zellkultur-Flasche mit 5 µg/cm<sup>2</sup> Fibronectin beschichtet und für 1 h bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden RLE-6TN Zellen [vgl. 2.1.7 und 2.2.1.4] 2 x mit PBS gewaschen und mit 20 ml einer 5 mM EDTA-Lösung in PBS versetzt. Nach einer Inkubation für 5 min bei 37 °C wurden die Zellen in serumfreiem Medium (Ham's F12 Medium, 2 mM L-Glutamin) aufgenommen, mit Hilfe eines Zellschabers vom Flaschenboden abgelöst und in ein 50 ml Polypropylenröhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (760 rpm, 6 min) und das Pellet wurde in 10 ml serumfreiem Medium resuspendiert. Für den Adhäsions-Test wurden die Fibronectin-beschichteten Zellkultur-Flaschen 2 x mit A. dest gewaschen und mit den resuspendierten Zellen für 30 – 90 min bei 37 °, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Im Anschluss erfolgte eine Immunpräzipitation der ILK [vgl. 2.2.6.3] und die Bestimmung der enzymatische Aktivität der Kinase [vgl. 2.2.7.2].

### **2.2.3.2 Transiente Transfektion von Zelllinien**

Für die transiente Transfektion der RLE-6TN Zellen [vgl. 2.1.7 und 2.2.1.4] mit den Plasmiden pCMV-6 HA-AKT (K179M) bzw. pCMV-6 HA ILK 25/8 E359K-5 [vgl. 2.1.10] wurde das Lipofectamin Plus<sup>TM</sup> Reagenz (Invitrogen Life Technologies, Paisley, Großbritannien) eingesetzt [Hao *et al.*, 2003].

Die Transfektion erfolgte bei einer Konfluenz der Zellen von ca. 40 - 50 %. 0,25 µg Plasmid-DNA wurden mit 125 µl Transfektionsmedium (Ham's F12 Medium, 2 mM L-Glutamin, 0,5 %

(v/v) FCS) und 6 µl Plus™ Reagenz für 15 min bei RT inkubiert. 4 µl Lipofectamin™ Reagenz wurden mit 125 µl Transfektionsmedium gemischt und zur DNA zugegeben. Während der Inkubation des Ansatzes für 15 min bei RT wurden die Zellen 1 x mit PBS gewaschen und mit 1 ml Transfektionsmedium bedeckt. Das DNA-Lipofectamin-Gemisch wurde tropfenweise zu den Zellen gegeben, die im Anschluss im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert wurden. Nach 3 h wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und durch 3 ml Nährmedium [vgl. 2.2.1.1] ersetzt.

## **2.2.4 Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.4.1 Transformation kompetenter Bakterien-Zellen**

Zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli* TOP10F' Bakterien-Zellen (One Shot®, Invitrogen Life Technologies, Paisley, Großbritannien) [vgl. 2.1.8] wurde der „TOPO TA Cloning Kit“ (Invitrogen Life Technologies, Paisley, Großbritannien) eingesetzt.

Die Bakterien-Zellen wurden bei 4 °C aufgetaut, mit der zu transformierenden DNA (0,5 µl Plasmid-DNA [vgl. 2.2.4.2] oder 4 µl Ligationsansatz [vgl. 2.2.4.5]) vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 s bei 42 °C inkubiert (Hitzeschock) und sofort wieder auf Eis gestellt. Nach der Zugabe von 250 µl S.O.C.-Medium (Invitrogen Life Technologies, Paisley, Großbritannien) folgte eine Inkubation in einem Horizontal-Wasserbadschüttler mit 200 rpm für 1 h bei 37 °C. 50 µl der transformierten Zellen wurden auf Ampicillin-enthaltenden LB-Kulturplatten [vgl. 2.2.2.1] ausplattiert und für 12 – 18 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Bei der Transformation von Ligationsansätzen mit dem Vektor pCR®II-TOPO® [vgl. 2.1.9 und 2.2.4.5] wurde zusätzlich eine Blau-Weiß-Selektion durchgeführt. Dazu wurden die transformierten Bakterien auf LB-Kulturplatten mit Ampicillin ausplattiert, die mit 80 µl X-Gal (40 mg/ml in Dimethylformamid) und 80 µl IPTG (50 mM) beschichtet waren.

### **2.2.4.2 Präparation von Nukleinsäuren**

*Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien:*

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien-Zellen wurden, je nach Größe der Bakterien-Kultur, das „QIAprep Spin Miniprep Kit“ oder das „HiSpeed Plasmid Midi Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

#### *Präparation von Gesamt-RNA aus Zellkultur-Material:*

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus RLE-6TN Zellen [vgl. 2.1.7 und 2.2.1.4] erfolgte mit dem „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

Um die RNA von eventuell vorhandenen DNA-Resten zu befreien, wurde ein DNA-Abbau mit Hilfe von RQ1 RNase-freier DNase (Promega, Mannheim) durchgeführt. Dazu wurden 10 µg Gesamt-RNA mit 10 µl 10 x Reaktions-Puffer (Promega, Mannheim) und 10 U RQ1 RNase-freier DNase versetzt, mit RNase-freiem A. dest auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Zugabe von 10 µl RQ1 DNase Stop Lösung (Promega, Mannheim) erfolgte eine Inkubation für 10 min bei 65 °C. Zur Entfernung der DNase wurde die RNA 2 x mit Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) und 1 x mit Chloroform : Isoamylalkohol (24 : 1) extrahiert. Anschließend wurde die RNA mit 1/10 Vol. 5 M Ammoniumacetat (RNase-frei) und 2 Vol. Ethanol versetzt und für 2 h bei -80 °C gefällt. Nach einer Zentrifugation (14.000 rpm, 30 min, 4 °C) und einem Waschschrift mit 70 % (v/v) Ethanol wurde die RNA in 20 µl RNase-freiem A. dest resuspendiert.

Die gereinigte RNA wurde bis zur RT-PCR [vgl. 2.2.4.3] bei -80 °C gelagert.

Die Konzentration und Qualität der Nukleinsäuren wurde durch die Messung der UV-Absorption bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm bestimmt.

#### **2.2.4.3 RT-PCR**

Zur Synthese der komplementären DNA (cDNA) für die ILK aus der Gesamt-RNA [vgl. 2.2.4.2] von RLE-6TN Zellen [vgl. 2.1.7] wurde die SuperScript™ II Reverse Transkriptase (Invitrogen Life Technologies, Paisley, Großbritannien) nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

Ein 20 µl Reaktionsansatz, bestehend aus 4 µg DNase behandelte Gesamt-RNA [vgl. 2.2.4.2], 1 µl Oligo(dT)-Primer (500 µg/ml) (Invitrogen Life Technologies, Paisley, Großbritannien), 1 µl 10 mM dNTP-Mix und A. dest, wurde für 5 min bei 65 °C inkubiert und sofort wieder auf Eis gestellt. Nach der Zugabe von 4 µl Erst-Strang-Puffer (Invitrogen Life Technologies, Paisley, Großbritannien), 2 µl 0,1 M DTT und 40 U RNaseOUT™ (Invitrogen Life Technologies, Paisley, Großbritannien) sowie einer Inkubation für 2 min bei 42 °C wurden 200 U SuperScript™ II Reverse Transkriptase zugegeben. Die Synthese der cDNA erfolgte für 50 min bei 42 °C. Im Anschluss wurde das Enzym durch eine Inkubation für 15 min bei 70 °C inaktiviert.

In der folgenden PCR wurden 2 µl der synthetisierten cDNA als Matrize eingesetzt. Zudem enthielt der 50 µl Reaktionsansatz 5 µl 10 x PCR-Puffer mit 15 mM MgCl<sub>2</sub> (Roche

Diagnostics, Mannheim), 1 µl 10 mM dNTP-Mix, jeweils 15 pmol der genspezifischen Amplifizierungsprimer ILK-Start und ILK-Stop [vgl. 2.1.11], A. dest und 2,8 U Expand High Fidelity PCR System DNA-Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim). Die PCR-Reaktion erfolgte im Trio-Thermoblock. Nach einer Anfangsdenaturierung für 3 min bei 94 °C folgten 25 Zyklen nach folgendem Programm:

Denaturierung:	30 s, 94 °C
Oligonukleotidanlagerung:	45 s, 58 °C
Elongation:	90 s, 72 °C

Im letzten Zyklus erfolgte eine Endelongation für 7 min bei 72 °C.

#### **2.2.4.4 Klonierungstechniken und Agarose-Gelelektrophorese**

Standardtechniken wie Restriktionen mit Endonukleasen, Ligationen und Modifizierungen von DNA-Enden sowie die Agarose-Gelelektrophorese von DNA wurden gemäß Sambrook *et al.* [1989] durchgeführt. Die Elution von DNA aus Agarose-Gelen erfolgte mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Zur Aufreinigung von PCR-Fragmenten wurde der „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

#### **2.2.4.5 TA-Klonierung**

Die Klonierung aufgereinigter PCR-Fragmente [vgl. 2.2.4.3 und 2.2.4.4] in den Vektor pCR®II-TOPO® [vgl. 2.1.9] erfolgte mit dem „TOPO TA Cloning Kit“ (Invitrogen Life Technologies, Paisley, Großbritannien) nach Angaben des Herstellers.

Zur Steigerung der Ligationseffizienz wurden zunächst mit Hilfe der Taq-DNA-Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim) 3'-Adenin-Überhänge an die Enden der PCR-Fragmente angefügt. Dazu wurden 43 µl des gereinigten PCR-Produktes mit 1 µl 10 mM dATP (Promega, Mannheim), 5 µl 10 x PCR-Puffer mit MgCl<sub>2</sub> (Roche Diagnostics, Mannheim) und 0,5 U Taq-DNA-Polymerase für 15 min bei 72 °C inkubiert. Für die TA-Klonierung wurden 4 µl dieses Reaktionsansatzes mit 1 µl pCR®II-TOPO® gemischt. Nach einer Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur (RT) erfolgte die Zugabe von 1 µl 6 x TOPO® Stop Lösung (Invitrogen Life Technologies, Paisley, Großbritannien). Der Ansatz wurde bis zur Transformation kompetenter Bakterien-Zellen [vgl. 2.2.4.1] bei 4 °C gelagert.



#### 2.2.4.6 *In vitro*-Mutagenese

Die Mutagenese der cDNA für die ILK in dem Plasmid pCRII ILK 25/8 [vgl. 2.1.10] erfolgte mit dem „QuickChange<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene, La Jolla, USA) nach Angaben des Herstellers.

Einem 50 µl Reaktionsansatz, bestehend aus 5 µl 10 x Reaktions-Puffer (Stratagene, La Jolla, USA), 35 ng Plasmid (pCRII ILK 25/8), 1 µl dNTP-Mix, jeweils 11 pmol der genspezifischen Amplifizierungsprimer ILKE359Kfwd und ILKE359Krev [vgl. 2.1.11] sowie A. dest, wurden 2,5 U *Pfu*Turbo DNA-Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) zugegeben. Die PCR-Reaktion erfolgte im Trio-Thermoblock. Nach einer Denaturierung für 1 min bei 95 °C folgten 15 Zyklen nach folgendem Programm:

Denaturierung:	30 s, 95 °C
Oligonukleotidanlagerung:	1 min, 55 °C
Elongation:	6 min, 68 °C

Im Anschluss wurde der Reaktionsansatz auf 25 °C abgekühlt.

Der Abbau der nicht-mutierten, parentalen Plasmid-DNA erfolgte durch die Zugabe von 10 U *Dpn* I (Stratagene, La Jolla, USA) und eine Inkubation für 1 h bei 37 °C. Der Ansatz wurde bis zur Transformation kompetenter *E. coli* XL1-Blue Bakterien-Zellen (Stratagene, La Jolla, USA) [vgl. 2.1.8.] bei 4 °C gelagert.

50 µl der bei 4 °C aufgetauten Bakterien-Zellen wurden in ein vorgekühltes Falcon<sup>®</sup> 2059 Polypropylenröhrchen gegeben, mit 2 µl *Dpn* I-behandelter DNA vorsichtig gemischt und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 45 s bei 42 °C inkubiert (Hitzeschock) und für 2 min auf Eis gestellt. Nach der Zugabe von 500 µl 42 °C warmen S.O.C.-Medium (Invitrogen Life Technologies, Paisley, Großbritannien) folgte eine Inkubation in einem Horizontal-Wasserbadschüttler mit 200 rpm für 1 h bei 37 °C. Die transformierten Zellen wurden zentrifugiert (4.000 rpm, 2 min) und im Restmedium resuspendiert. Die Bakterien-Suspension wurde auf LB-Kulturplatten [vgl. 2.2.2.1] mit Ampicillin ausplattiert und für 12 – 18 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

#### 2.2.4.7 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung doppelsträngiger Plasmide erfolgte nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger *et al.* [1977] mit Vektor-homologen Oligonukleotiden [vgl. 2.1.11] und wurde von der Firma SRD (Oberursel) durchgeführt.

## 2.2.5 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.5.1 Proteinextraktion aus Tiergeweben

Lungengewebe aus Ratten [vgl. 2.1.6] wurden bei 4 °C aufgetaut und mit 1 ml 1 x vRIPA (25 mM Tris HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1 % (v/v) Nonidet-40, 0,1 % (w/v) SDS, 1 % (w/v) DOC, 0,025 % (w/v) NaN<sub>3</sub>, 10 µl/ml Protease-Inhibitor Cocktail, 10 µl/ml Phosphatase-Inhibitor Cocktail 2) versetzt. Die Gewebe wurden mit einer Schere erneut mechanisch zerkleinert und für 30 min bei 4 °C lysiert. Im Anschluss erfolgte die Homogenisierung mit Hilfe eines Glas-Teflon-Potters mit 10 x 700 U/min bei 4 °C. Das Homogenat wurde mit einer Injektionskanüle (21 G 1/2, 0,8 x 40, Nr. 2, BD, Franklin Lakes, USA) und einer 1 ml Spritze (Plastipak™, BD, Franklin Lakes, USA) geschert, zentrifugiert (16.000 rpm, 5 min, 4 °C) und nochmals geschert (27 GA 3/4, 0,4 x 19, Nr. 20, BD, Franklin Lakes, USA). Nach einer Inkubation für 30 min bei 4 °C erfolgte eine weitere Zentrifugation (16.000 rpm, 20 min, 4 °C). Der Überstand wurde bis zur Bestimmung des Proteingehaltes [vgl. 2.2.5.3] bei 4 °C gelagert.

### 2.2.5.2 Proteinextraktion aus konfluenten Zelllinien

RLE-6TN Zellen [vgl. 2.1.7 und 2.2.1.4] wurden 2 x mit 4 °C kaltem PBS gewaschen und mit 70 – 100 µl 1 x vRIPA [vgl. 2.2.5.1] benetzt. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkultur-Platte abgelöst und 30 min bei 4 °C lysiert. Im Anschluss wurde die Suspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

Für die Proteinextraktion wurde die Zellsuspension bei 4 °C aufgetaut und mit Hilfe einer Injektionskanüle (27 GA 3/4, 0,4 x 19, Nr. 20, BD, Franklin Lakes, USA) und einer 1 ml Spritze (Plastipak™, BD, Franklin Lakes, USA) geschert. Nach einer Inkubation für 30 min bei 4 °C erfolgte eine Zentrifugation (16.000 rpm, 20 min, 4 °C). Der Überstand wurde bis zur Bestimmung des Proteingehaltes [vgl. 2.2.5.3] bei 4 °C gelagert.

### 2.2.5.3 Bestimmung des Proteingehaltes

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Extrakten [vgl. 2.2.5.1, 2.2.5.2, 2.2.6.3 und 2.2.7.1], nach der Methode von Lowry *et al.* [1951], wurde der „DC Protein Assay Kit“ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 630 nm, wobei BSA als Eichprotein eingesetzt wurde.

#### 2.2.5.4 Bestimmung der Lactat-Dehydrogenase (LDH)-Aktivität

Zur Bestimmung der Zytotoxizität der eingesetzten Konzentrationen an CB-Partikeln [vgl. 2.1.4] oder Inhibitoren [vgl. 2.1.5] wurde die Aktivität der zytosolischen LDH im Hungermedium [vgl. 2.2.1.1] der RLE-6TN Zellen [vgl. 2.1.7 und 2.2.1.4] mit Hilfe eines photometrischen Tests untersucht.

Die LDH katalysiert die Reduktion von Pyruvat zu Lactat, die mit der Oxidation von  $\text{NADH} + \text{H}^+$  zu  $\text{NAD}^+$  gekoppelt ist. Nicht umgesetztes Pyruvat bildet mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin einen Farbkomplex. Die Adsorption bei 540 nm, die auf das noch vorhandene Pyruvat zurückzuführen ist, ist dabei umgekehrt proportional zur Aktivität der LDH.

Für die Messung wurde das Hungermedium von den behandelten RLE-6TN Zellen abgenommen, 24 h bei 4 °C gelagert und anschließend zentrifugiert (16.000 rpm, 5 min, 4 °C). Vom Überstand wurden jeweils 20 µl in eine Mikrotiterplatte gegeben. Im Bereich der Eichgeraden wurden 20 µl ungebrauchten Hungermediums vorgelegt, und jeweils 50 µl der sechs Eichstandards hinzupipettiert. Zu den zu untersuchenden Proben wurden 50 µl 0,75 mM Natriumpyruvat mit 1 mg/ml  $\beta$ -NADH gegeben. Nach einer Inkubation im Dunkeln für 30 min bei 37 °C erfolgte die Zugabe von 50 µl 2,4-Dinitrophenylhydrazin. Die Platte wurde für weitere 20 min bei RT im Dunkeln gelagert. Danach wurde die Reaktion mit 50 µl NaOH abgestoppt und die Proben wurden für 5 min bei RT inkubiert. Die Adsorption wurde bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen. Die Aktivität der LDH wurde anhand der Eichgeraden bestimmt.

Eichgerade:

	Pyruvat/ $\beta$ -NADH (µl)	A. dest (µl)	LDH-Aktivität (U/ml)
1.	500	50	0
2.	400	150	280
3.	300	250	640
4.	200	350	1040
5.	100	450	1530
6.	50	500	2000

### 2.2.5.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) unter denaturierenden Bedingungen

Die SDS-PAGE wurde, wie bei Laemmli [1970] beschrieben, durchgeführt. Die 7,5 – 10%igen Minigele (1,5 x 50 x 90 mm) wurden mit Laufpuffer (0,05 M Tris, 0,384 M Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) in einer vertikalen Gelkammer mit einer konstanten Spannung von 60 – 120 V für 1 – 2 h betrieben. Pro Geltasche wurden 2,5 – 20 µg Protein in reduzierendem 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) und 20 mM DTT aufgetragen. Bei der Untersuchung des Integrin-Profiles der RLE-6TN Zellen [vgl. 2.1.7] mit Integrin-spezifischen Antikörpern [vgl. 2.1.3] wurde nicht-reduzierender Probenpuffer (ohne β-Mercaptoethanol) verwendet. Nach erfolgter Gelelektrophorese wurden die Proteine entweder auf Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen transferiert [vgl. 2.2.6.1] oder direkt mit Coomassie Blau (0,1 % (w/v) Coomassie Brillant Blau G-250, 50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure) für 1 – 2 h bei RT angefärbt. Die Entfärbung der Gele erfolgte für 2 – 10 min mit Entfärberlösung 1 (50 % (v/v) Methanol, 7,5 % (v/v) Essigsäure) sowie für 2 – 18 h mit Entfärberlösung 2 (5 % (v/v) Methanol, 7,5 % (v/v) Essigsäure). Als Größenstandards dienten der Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Dual Color Standard und der Kaleidoscope Prestained Standard (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA).

Sammelgel:            3 % (v/v) Rotiphorese Gel 30  
                              0,06 M Tris HCl pH 6,8  
                              0,1 % (w/v) SDS  
                              0,05 % (w/v) APS

Trenngel:                7,5 – 10 % (v/v) Rotiphorese Gel 30  
                              0,375 M Tris HCl pH 8,8  
                              0,1 % (w/v) SDS  
                              0,05 % (w/v) APS

Die Polymerisation der Gele wurde durch die Zugabe von jeweils 15 – 20 µl TEMED ausgelöst.

## 2.2.6 Immunbiochemische Methoden

### 2.2.6.1 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot)

Die in der SDS-PAGE [vgl. 2.2.5.5] elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden nach der Methode von Michov [1995] mittels einer „Semi-dry Elektrotransferkammer“ auf eine PVDF-Membran (Hybond-P, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Großbritannien) transferiert. Die PVDF-Membran wurde zunächst für 10 s in Methanol und für 5 min in A. dest inkubiert. Anschließend wurden sowohl die PVDF-Membran als auch das SDS-Gel für 5 – 10 min in Anodenpuffer (4,68 g/l Tris, 1,145 ml/l Ameisensäure, 0,29 g/l SDS, 0,05 g/l  $\text{NaN}_3$ , 20 % (v/v) Methanol) bei RT äquilibriert. Auf die Anodenplatte des Blotters wurden nacheinander zwei Lagen Filterpapier (Gel Blotting Papier, Schleicher & Schuell BioScience, Dassel), die PVDF-Membran, das SDS-Gel und eine Lage Filterpapier mit Anodenpuffer und darauf folgend zwei Lagen Filterpapier mit Kathodenpuffer (2,1 g/l Tris, 3,01 g/l Taurin, 0,29 g/l SDS, 0,05 g/l  $\text{NaN}_3$ , 20 % (v/v) Methanol) aufgelegt. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Spannung von 14 V für 45 – 90 min.

### 2.2.6.2 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen

Der Nachweis elektrophoretisch transferierter Proteine auf einer PVDF-Membran [vgl. 2.2.6.1] erfolgte mit Hilfe mono- oder polyklonaler Antikörper [vgl. 2.1.3].

Zunächst wurde die Membran für ca. 3 – 5 min mit Ponceau S Färbelösung angefärbt, um die Effizienz der Übertragung zu überprüfen. Nach Entfärbung mit A. dest wurden die freien Protein-Bindungsstellen für 1 – 2 h bei RT in Blocklösung (TBS (80,0 g/l NaCl, 24,2 g/l Tris pH 7,6), 0,1 % (v/v) Tween-20, 5 % (w/v) Milchpulver) abgesättigt.

Die Bindung der primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C in Blocklösung oder in TBST (TBS, 0,1 % (v/v) Tween-20) mit 5 % (w/v) BSA. Die jeweils eingesetzte Antikörper-Verdünnung wird im entsprechenden Ergebnisteil angegeben. Nach dem Waschen der PVDF-Membran (4 x 5 min bei RT) in TBST wurde der sekundäre Antikörper in Blocklösung für 2 h bei RT zugegeben. Im Anschluss wurde die PVDF-Membran erneut für 4 x 5 min in TBST gewaschen.

Die Detektion erfolgte mit dem „ECL Plus™ Western Blotting Detection System“ (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Großbritannien) nach Angaben des Herstellers. Die Expositionszeiten der Röntgenfilme (Super RX, Fuji Medical X-Ray Film, Kisker, Steinfurt) lagen in einem Bereich von 10 s bis 10 min.

### 2.2.6.3 Immunpräzipitation

Für die Untersuchung der enzymatischen Aktivität der ILK [vgl. 2.2.7.2] wurde die ILK mit Hilfe eines spezifischen ILK-Antikörpers (Upstate, Dundee, Großbritannien) [vgl. 2.1.3] immunpräzipitiert.

Hierzu wurden RLE-6TN Zellen [vgl. 2.1.7 und 2.2.1.4] 1 x mit 4 °C kaltem PBS gewaschen und mit 500 µl 1 x Lyse-Puffer (Cell Signaling, Danvers, USA) (supplementiert mit 10 µl/ml Protease-Inhibitor Cocktail und 10 µl/ml Phosphatase-Inhibitor Cocktail 2) benetzt. Die Zellen wurden für 5 min bei 4 °C lysiert, mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkultur-Flasche abgelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Behandlung im Ultraschallbad (220 – 240 V, 120 W, 50 – 60 Hz) für 4 x 5 s wurde die Zellsuspension mit Hilfe einer Injektionskanüle (27 GA  $\frac{3}{4}$ , 0,4 x 19, Nr. 20, BD, Franklin Lakes, USA) und einer 1 ml Spritze (Plastipak™, BD, Franklin Lakes, USA) geschert. Einer Inkubation für 30 min bei 4 °C folgte eine Zentrifugation (16.000 rpm, 10 min, 4 °C). Der Proteinüberstand wurde bis zur Bestimmung des Proteingehaltes [vgl. 2.2.5.3] bei -80 °C gelagert.

300 µg Protein wurden mit 4 µg Kaninchen-Anti-ILK polyklonalem Antikörper (Upstate, Dundee, Großbritannien) über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Nach der Zugabe von 30 µl gewaschener Protein A Agarose (Upstate, Dundee, Großbritannien) erfolgte eine Inkubation für 2 h bei 4 °C auf dem Schüttler. Die an die Agarose gebundenen Immunkomplexe mit ILK wurden abzentrifugiert (16.000 rpm, 1 min, 4 °C) und 3 x mit 4 °C kaltem PBS, sowie 1 x mit 200 µl Kinase-Puffer (Cell Signaling, Danvers, USA) gewaschen. Die immunpräzipitierte ILK wurde bis zur Bestimmung ihrer enzymatischen Aktivität bei 4 °C gelagert.

## 2.2.7 Enzymatische Analysen

### 2.2.7.1 Bestimmung der enzymatischen Aktivität von AKT

Die enzymatische Aktivität von AKT wurde mit dem nicht-radioaktiven „AKT Kinase Assay Kit“ (Cell Signaling, Danvers, USA), mit GSK-3 Fusionsprotein als Substrat, nach Angaben des Herstellers untersucht [Gary *et al.*, 2003].

Hierzu wurden RLE-6TN Zellen [vgl. 2.1.7 und 2.2.1.4] 1 x mit 4 °C kaltem PBS gewaschen und mit 500 µl 1 x Lyse-Puffer (Cell Signaling, Danvers, USA) (supplementiert mit 10 µl/ml Protease-Inhibitor Cocktail und 10 µl/ml Phosphatase-Inhibitor Cocktail 2) benetzt. Die Zellen wurden für 5 min bei 4 °C lysiert, mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkultur-Flasche

abgelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Behandlung im Ultraschallbad (220 – 240 V, 120 W, 50 – 60 Hz) für 4 x 5 s wurde die Zellsuspension mit Hilfe einer Injektionskanüle (27 GA  $\frac{3}{4}$ , 0,4 x 19, Nr. 20, BD, Franklin Lakes, USA) und einer 1 ml Spritze (Plastipak™, BD, Franklin Lakes, USA) geschert. Einer Inkubation für 30 min bei 4 °C folgte eine Zentrifugation (16.000 rpm, 10 min, 4 °C). Der Proteinüberstand wurde bis zur Bestimmung des Proteingehaltes [vgl. 2.2.5.3] bei -80 °C gelagert.

200-300 µg Protein wurden in 200 µl 1 x Lyse-Puffer mit 20 µl immobilisiertem, an Agarose-Kugeln gekoppeltem, AKT-Antikörper (1G1) [vgl. 2.1.3] über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Nach einer Zentrifugation (16.000 rpm, 1 min, 4 °C) wurde das Pellet 2 x mit 200 µl 1 x Lyse-Puffer sowie 2 x mit 200 µl 1 x Kinase-Puffer (Cell Signaling, Danvers, USA) gewaschen. Für den Kinase-Test wurde das Sediment in 40 µl 1 x Kinase-Puffer mit 200 µM ATP (Cell Signaling, Danvers, USA) und 1 µg GSK-3 Fusionsprotein (Cell Signaling, Danvers, USA) resuspendiert und für 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 20 µl 3 x SDS-Probenpuffer (187,5 mM Tris HCl pH 6,8, 6 % (w/v) SDS, 30 % (v/v) Glycerin, 150 mM DTT, 0,03 % (w/v) Bromphenolblau) beendet. Nach einer Zentrifugation (16.000 rpm, 30 s) wurden die Proben für 5 min bei 95 °C denaturiert und erneut zentrifugiert (16.000 rpm, 5 min).

Nach der SDS-PAGE [vgl. 2.2.5.5] und dem Western Blot [vgl. 2.2.6.1] wurde die Phosphorylierung des GSK-3 Fusionsproteins mit Hilfe des phospho-spezifischen GSK-3  $\alpha/\beta$  (Ser<sup>21/9</sup>) Antikörpers [vgl. 2.1.3], wie unter 2.2.6.2 beschrieben, nachgewiesen.

### **2.2.7.2 Bestimmung der enzymatischen Aktivität der ILK**

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der ILK wurde GSK-3 Fusionsprotein als Substrat eingesetzt [Cruet-Hennequart *et al.*, 2003].

Die immunpräzipitierte ILK [vgl. 2.2.6.3] wurde zu Beginn kurz abzentrifugiert (16.000 rpm, 1 min). Der darauf folgende Kinase-Test entsprach dem Protokoll zur Bestimmung der Aktivität von AKT [vgl. 2.2.7.1].

Nach der SDS-PAGE [vgl. 2.2.5.5] und dem Western Blot [vgl. 2.2.6.1] wurde die Phosphorylierung des GSK-3 Fusionsproteins mit Hilfe des phospho-spezifischen GSK-3  $\alpha/\beta$  (Ser<sup>21/9</sup>) Antikörpers [vgl. 2.1.3], wie unter 2.2.6.2 beschrieben, untersucht.

### **2.2.8 Quantifizierung von Immunsignalen**

Die beim immunologischen Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen [vgl. 2.2.6.2] entwickelten Röntgenfilme wurden eingescannt (Scan-Jet ADF, Hewlett Packard, Böblingen) und mit Hilfe des PC-Programmes „Quantity One“ anhand der Intensität der Banden densitometrisch ausgewertet.

### **2.2.9 Statistik**

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse wurden als arithmetische Mittelwerte (M) mit dem mittleren Fehler des Mittelwertes (S.E.M.) und der Anzahl der durchgeführten Experimente (n) in der Form  $M \pm S.E.M. (n)$  dargestellt. Für jede Versuchsreihe wurden Zellkulturen aus mindestens drei unterschiedlichen Passagen verwendet. Zum statistischen Vergleich der Versuchsergebnisse wurde der Student's *t*-Test nach Gosset durchgeführt. p-Werte von < 0,05 (\*), < 0,005 (\*\*), und < 0,0005 (\*\*\*) wurden zur Anzeige von signifikanten Unterschieden betrachtet.

### **2.2.10 Abbildungen**

Die Abbildungen der vorliegenden Arbeit wurden digital bearbeitet und sind in ihrem Inhalt identisch mit den Originaldaten.



### 3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden Effekte untersucht, die Verbrennungsgenerierte ultrafeine Kohlenstoff-Partikel auf zelluläre Signalwege des Lungenepithels ausüben. Da in diesem Zusammenhang bereits bekannt war, dass inhalierbare Partikel neben genotoxischen Effekten auch Veränderungen in der Apoptose und/oder Zellproliferation induzieren können, wurde der Schwerpunkt der Untersuchungen auf solche Signalwege gelegt, die an der Regulation dieser Endpunkte beteiligt sein können.

Als Modellstaub für Verbrennungsgenerierte ultrafeine Kohlenstoff-Partikel wurde ultrafeines CB eingesetzt, welches aufgrund der geringen Kontaminationen der Kernpartikel mit Übergangsmetallen oder PAKs besonders für die Untersuchung reiner Partikeleffekte genutzt werden kann [Donaldson *et al.*, 2001].

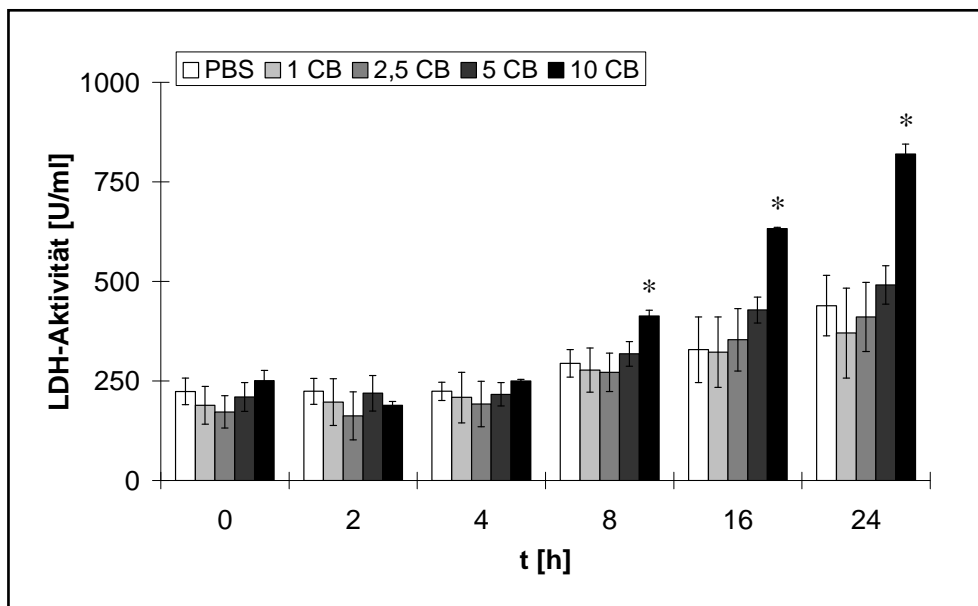
#### 3.1 Bestimmung der Zytotoxizität von CB

Als *in vitro* Versuchssystem diente eine alveolare Typ II Epithel-Zelllinie aus Ratten (RLE-6TN) [vgl. 2.1.7 und 2.2.1], die allgemein für die Untersuchung von Partikel-induzierten Effekten auf Lungenzellen eingesetzt wird [Driscoll *et al.*, 1995]. Für die Versuche wurden die RLE-6TN Zellen bei einer Konfluenz von ca. 80 % in Hungermedium (0,5 % (v/v) FCS) [vgl. 2.2.1.1] inkubiert, um die Zellen in der Ruhephase zu arretieren. Nach 20 h erfolgte die Belastung mit ultrafeinem CB, welches zuvor für 1 h mit Ultraschall behandelt wurde, um eine vollständige Dispersion der Partikel in der PBS-Lösung zu gewährleisten [vgl. 2.1.4].

Zu Beginn der Untersuchungen wurde, durch die Messung der Aktivität der zytosolischen LDH [vgl. 2.2.5.4] im Überstand der RLE-6TN Zellen, zunächst die Zytotoxizität der ultrafeinen CB-Partikel in Abhängigkeit von der Partikel-Konzentration (1 – 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) und der Belastungsdauer (2 – 24 h) bestimmt. Da Membranschädigungen infolge von zytotoxischen Mechanismen zu einer verstärkten Freisetzung zytoplasmatischer Bestandteile führen, ist eine Zunahme der LDH-Aktivität dementsprechend mit einer erhöhten Zytotoxizität gleichzusetzen.

Die frühen Zeitpunkte (2 – 4 h) zeigten, unabhängig von der Partikel-Konzentration, keine Veränderungen in der LDH-Aktivität [vgl. Abb. 3.1]. Bei den späteren Zeitpunkten (8 – 24 h) wurde hingegen sowohl in den PBS-behandelten Kontrollen als auch in den Proben, die mit 1 – 5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB belastet wurden, ein leichter, jedoch nicht signifikanter Anstieg in der LDH-Aktivität beobachtet. Im Gegensatz dazu führte die Belastung mit 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB im Vergleich zu den Kontrollen mit PBS bereits nach 8 h zu einer signifikanten, 1,4fachen Zunahme

( $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ) der LDH-Aktivität, die nach 24 h auf das 1,9fache ( $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ) weiter angestiegen war.



**Abb. 3.1:** Zeit- und Dosis-abhängige LDH-Aktivität [U/ml] nach Belastung von RLE-6TN Zellen mit 1 – 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB oder Inkubation mit PBS. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. aus  $n = 5$  Experimenten. \*:  $p < 0,05$ .

Die allgemeine Zunahme der LDH-Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit deutet dabei auf einen Effekt des Hungermediums hin, während der starke Anstieg der LDH-Aktivität nach der Belastung mit 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB wahrscheinlich durch zytotoxische Mechanismen, welche durch die Partikel induziert werden, verursacht wird.

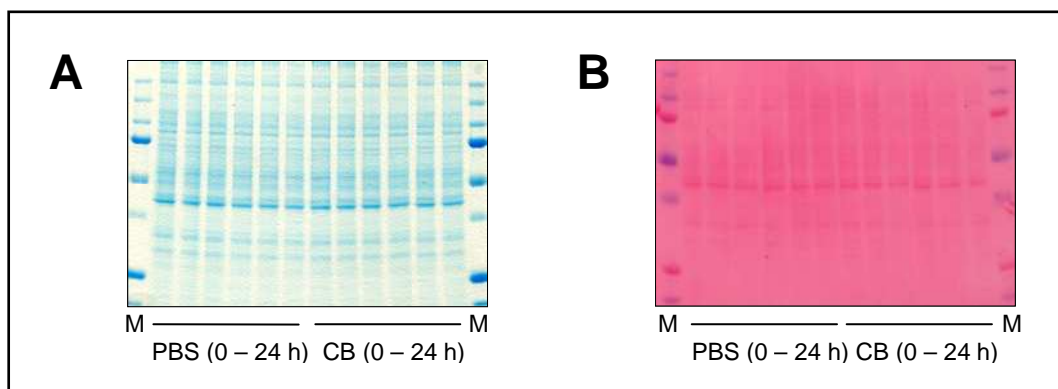
Aufgrund dieser Daten wurden die RLE-6TN Zellen in den anschließenden Untersuchungen mit der nicht-zytotoxischen Konzentration von 5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB belastet. Dadurch wurde gewährleistet, dass mögliche Einflüsse der CB-Partikel auf Signalwege der RLE-6TN Zellen nur auf die Partikel und nicht auf zytotoxische Mechanismen zurückzuführen sind.

### 3.2 Effekte von CB auf MAP-Kinasen und AKT

Im Folgenden wurde der Einfluss der ultrafeinen CB-Partikeln auf Signalproteine untersucht, welche die zellulären Endpunkte Apoptose und/oder Zellproliferation induzieren können. Dazu zählt zum einen die Familie der MAP-Kinasen, deren Mitglieder u.a. an der Regulation von Zellproliferation und Apoptose sowie der Induktion von Entzündungsreaktionen beteiligt sind, und zum anderen die Proteinkinase AKT, die u.a. die Regulation von Zellproliferation

und Zellüberleben kontrolliert [Albrecht *et al.*, 2002; Johnson & Lapadat, 2002; Brazil & Hemmings, 2001; Datta *et al.*, 1999]. In diesem Zusammenhang war bereits bekannt, dass DEP, die ebenso wie CB zu den Verbrennungsgenerierten Kohlenstoff-Partikeln gehören, einzelne MAP-Kinasen und AKT aktivieren können [Albrecht *et al.*, 2004]. Daher wurde zunächst untersucht, ob ultrafeine CB-Partikel ebenfalls eine Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2, JNK1/2 und p38 sowie der Proteinkinase AKT induzieren.

Hierzu wurden die RLE-6TN Zellen über einen Zeitraum von 2 – 24 h mit  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB [vgl. 3.1] belastet. Nach der Extraktion der Proteine aus den belasteten Zellen [vgl. 2.2.5.2] wurden diese in der SDS-PAGE [vgl. 2.2.5.5] nach dem Molekulargewicht aufgetrennt und beim Western Blot [vgl. 2.2.6.1] auf eine PVDF-Membran transferiert. Nach der Inkubation mit Antikörpern erfolgte die Detektion der Immunsignale durch Chemilumineszenz auf Röntgenfilmen [vgl. 2.2.6.2], die im Anschluss densitometrisch quantifiziert wurden [vgl. 2.2.8]. Die Phosphorylierung der Proteinkinasen wurde dabei mit Hilfe phospho-spezifischer Antikörper untersucht, während die Expression durch spezifische Antikörper gegen das Gesamtprotein nachgewiesen wurde. In Parallelversuchen wurde das SDS-Gel mit Coomassie-Blau [vgl. 2.2.5.5] und die PVDF-Membran mit Ponceau S [vgl. 2.2.6.2] angefärbt. Diese zusätzlichen Ladekontrollen wurden bei allen Versuchen durchgeführt, werden aber im Folgenden der Einfachheit halber nur einmal dargestellt [vgl. Abb. 3.2].

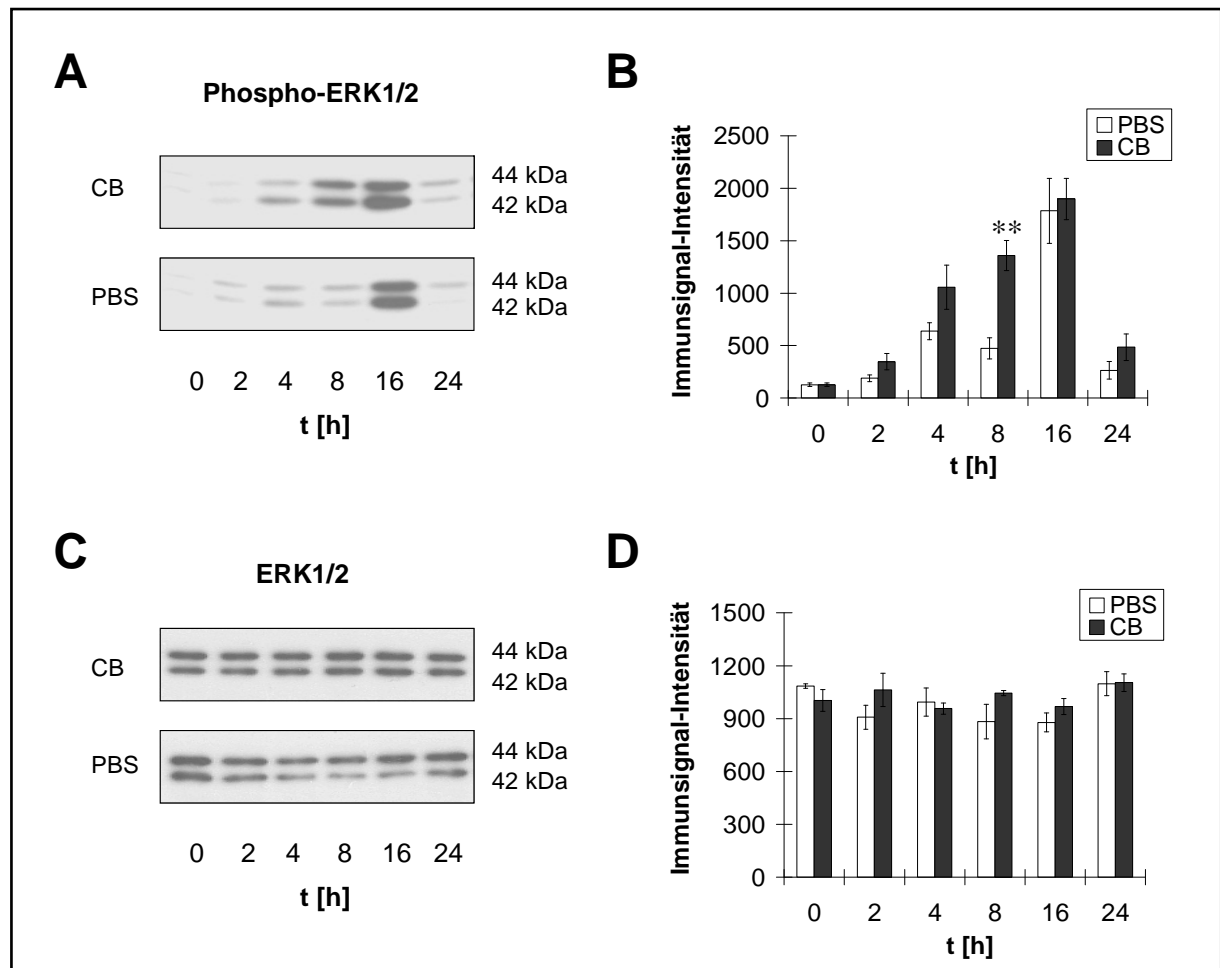


**Abb. 3.2:** Ladekontrollen für Proteinextrakte von RLE-6TN Zellen nach 2 – 24 h Belastung mit  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB oder Inkubation mit PBS. (A) SDS-PAGE (10 %, Coomassie Blau-Färbung). (B) PVDF-Membran (Ponceau S-Färbung). M = Größenstandard.

Bei den aufgetrennten Proteinen der RLE-6TN Zellen, die für 2 – 24 h mit  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB belastet wurden, sowie den dazugehörigen Kontrollen mit PBS, wurden sowohl im Coomassie Blau-gefärbten SDS-Gel [vgl. Abb. 3.2 A] als auch auf der Ponceau S-gefärbten PVDF-Membran [vgl. Abb. 3.2 B] keine Veränderungen in der Intensität einzelner Banden beobachtet. Demnach wurde bei allen Proben die gleiche Proteinmenge auf das Gel aufgetragen bzw. beim Western Blot auf die PVDF-Membran übertragen.

### 3.2.1 CB-induzierte Aktivierung von ERK1 und ERK2

Zur Bestimmung der an der Feinstaub-induzierten Signaltransduktion beteiligten Signalproteine wurde zunächst der Einfluss ultrafeiner CB-Partikel auf die Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 untersucht.



**Abb. 3.3:** Zeit-abhängige Phosphorylierung und Expression von ERK1 und ERK2 nach Belastung von RLE-6TN Zellen mit  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB oder Inkubation mit PBS. (A) und (C) Repräsentative Western Blots von Proteinextrakten ( $5 \mu\text{g}$ ) CB-behandelter Proben und den entsprechenden Kontrollen mit PBS (10 % SDS-PAGE, Phospho-p44/42 MAP-Kinase ( $\text{Thr}^{202}/\text{Tyr}^{204}$ ) polyklonaler Antikörper, p44/42 MAP-Kinase polyklonaler Antikörper 1 : 1000, HRP-gekoppelter Sekundär-Antikörper 1 : 2000). (B) und (D) Quantitative densitometrische Auswertung der Western Blots von drei unabhängigen Experimenten, wobei jedes Einzelexperiment als Doppelbestimmung durchgeführt wurde (Mittelwerte  $\pm$  S.E.M.,  $n = 3$ ). \*\*:  $p < 0,005$ .

Dazu wurden, ebenso wie bei der Untersuchung der anderen MAP-Kinasen, phospho-spezifische Antikörper eingesetzt, die nur dann an die jeweilige MAP-Kinase binden, wenn

eine duale Phosphorylierung an den spezifischen Threonin- und Tyrosin-Resten vorliegt. Diese Phosphorylierung ist essentiell für die Aktivierung der MAP-Kinasen, so dass eine Zunahme der Phosphorylierung mit der Aktivierung der jeweiligen MAP-Kinase gleichzusetzen ist [Cobb & Goldsmith, 1995].

Die Belastung der RLE-6TN Zellen mit  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB [vgl. 3.1] führte im Vergleich zu den Kontrollen mit PBS bereits nach 4 h zu einer geringen, jedoch nicht signifikanten Zunahme der Phosphorylierung von ERK1 und ERK2, die nach 8 h signifikant auf das 2,9fache ( $n = 3$ ,  $p < 0,005$ ) weiter anstieg [vgl. Abb. 3.3 A und B]. Nach 16 h wurde allerdings auch in den Kontrollen mit PBS ein starker Anstieg der Phosphorylierung beobachtet, der zu diesem Zeitpunkt jedoch möglicherweise auch auf zytotoxische Mechanismen des Hungermediums zurückzuführen ist [vgl. 3.1]. 24 h nach Beginn der Behandlung ging die Phosphorylierung sowohl in den CB-belasteten Proben als auch in den Kontrollen mit PBS wieder auf den Ausgangswert zurück.

Im Gegensatz zum Zeitverlauf dieser CB-induzierten Phosphorylierung blieb die Gesamtmenge an exprimierter ERK1 und ERK2 während des gesamten Belastungs-Zeitraums in allen Proben konstant [vgl. Abb. 3.3 C und D].

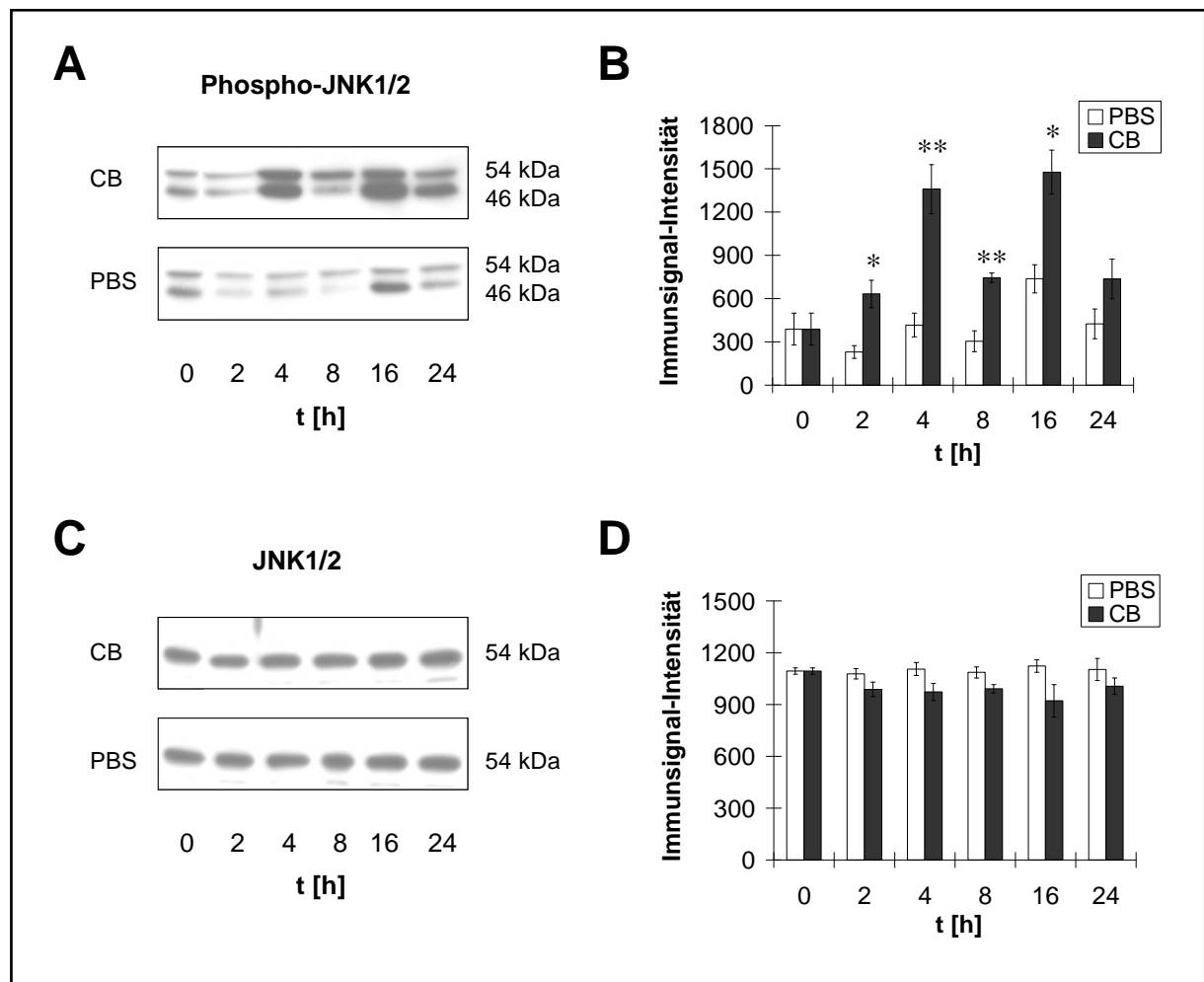
Demzufolge induzieren ultrafeine CB-Partikel in RLE-6TN Zellen eine Zeit-abhängige Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2, ohne dabei einen Einfluss auf deren Expression auszuüben.

### **3.2.2 CB-induzierte Aktivierung von JNK1 und JNK2**

Nachdem die CB-induzierte Aktivierung von ERK1/2 gezeigt werden konnte, wurde im nächsten Schritt der Einfluss ultrafeiner CB-Partikel auf die Phosphorylierung der MAP-Kinasen JNK1 und JNK2 untersucht.

Dabei zeigte sich, dass die Behandlung der RLE-6TN Zellen mit  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB [vgl. 3.1] bereits nach 2 h zu einer signifikanten, 2,7fachen Zunahme ( $n = 3$ ,  $p < 0,05$ ) der Phosphorylierung von JNK1 und JNK2 führte [vgl. Abb. 3.4 A und B]. Die Darstellung der absoluten Immunsignal-Intensitäten in Abb. 3.4 B ließ hierbei eine biphasische Phosphorylierung der Signalproteine vermuten, was beim quantitativen Vergleich der relativen Immunsignal-Intensitäten jedoch nicht bestätigt werden konnte. Demnach stieg die CB-induzierte Phosphorylierung von JNK1/2 nach 4 h signifikant auf das 3,3fache ( $n = 3$ ,  $p < 0,005$ ) weiter an. Nach diesem Maximum ging die Phosphorylierung im weiteren Zeitverlauf langsam wieder zurück. So war die Phosphorylierung in den CB-behandelten Proben im Vergleich zu den Kontrollen mit PBS nach 16 h noch signifikant um das 2fache

( $n = 3$ ,  $p < 0,05$ ) erhöht, während nach 24 h nur noch eine geringe, jedoch nicht signifikante, Zunahme beobachtet wurde.



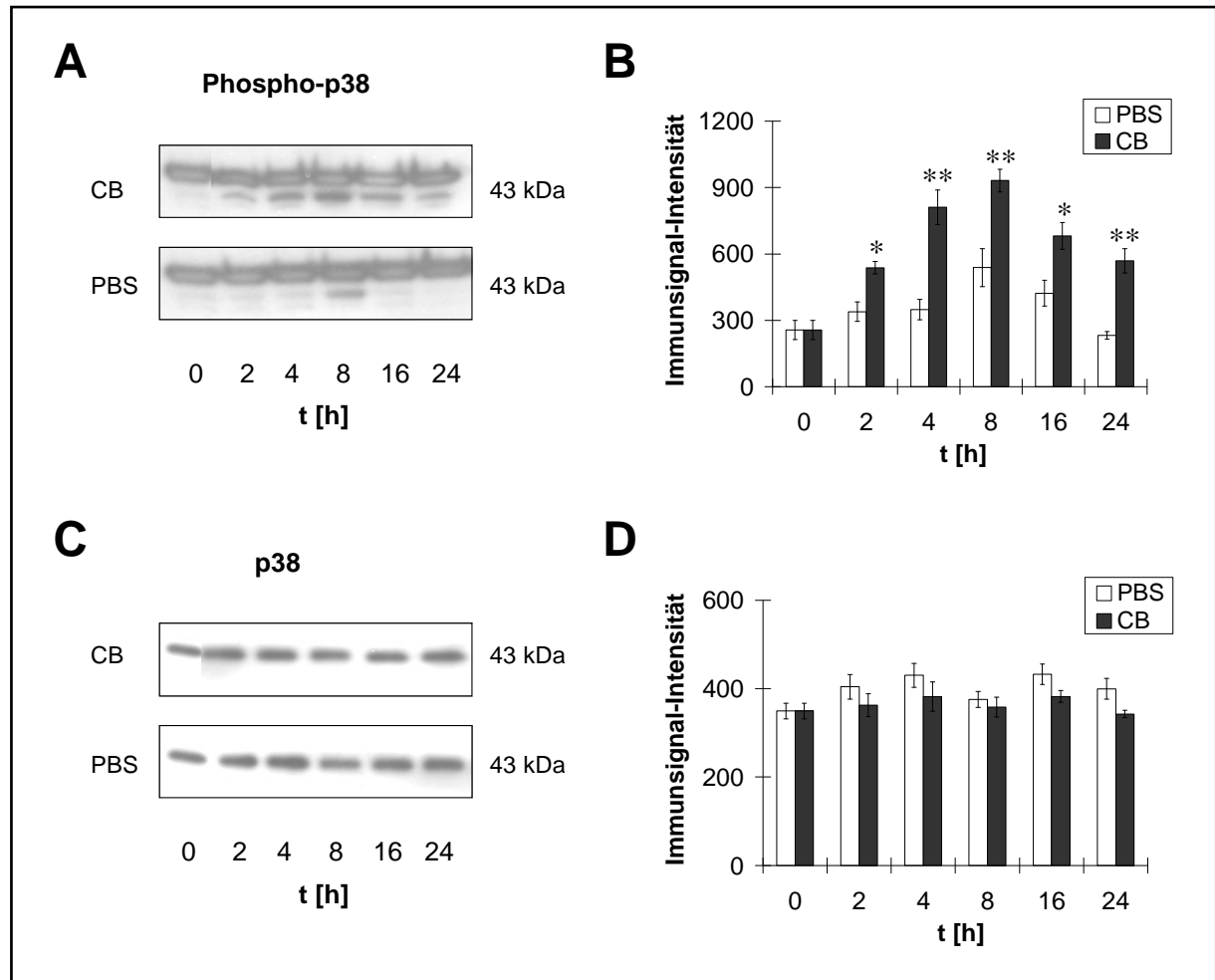
**Abb. 3.4:** Zeit-abhängige Phosphorylierung und Expression von JNK1 und JNK2 nach Belastung von RLE-6TN Zellen mit  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB oder Inkubation mit PBS. (A) und (C) Repräsentative Western Blots von Proteinextrakten ( $5 \mu\text{g}$ ) CB-behandelter Proben und den entsprechenden Kontrollen mit PBS (10 % SDS-PAGE, Phospho-SAPK/JNK ( $\text{Thr}^{183}/\text{Tyr}^{185}$ ) polyklonaler Antikörper, SAPK/JNK polyklonaler Antikörper 1 : 1000, HRP-gekoppelter Sekundär-Antikörper 1 : 2000). (B) und (D) Quantitative densitometrische Auswertung der Western Blots von drei unabhängigen Experimenten, wobei jedes Einzelexperiment als Doppelbestimmung durchgeführt wurde (Mittelwerte  $\pm$  S.E.M.,  $n = 3$ ). \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,005$ .

Im Gegensatz dazu blieb die Gesamtmenge an exprimierter JNK1 und JNK2 während des gesamten Belastungs-Zeitraums in allen Proben konstant [vgl. Abb. 3.4 C und D].

Demnach induzieren ultrafeine CB-Partikel in RLE-6TN Zellen eine bereits nach 2 h einsetzende Zeit-abhängige Aktivierung [vgl. 3.2.1] der MAP-Kinasen JNK1 und JNK2, wohingegen die Expression nicht beeinflusst wird.

### 3.2.3 CB-induzierte Aktivierung der MAP-Kinase p38

Somit konnte sowohl eine CB-induzierte Aktivierung von ERK1/2 als auch JNK1/2 gezeigt werden. Im Anschluss wurde daher der Einfluss ultrafeiner CB-Partikel auf die Phosphorylierung der MAP-Kinase p38 untersucht.



**Abb. 3.5:** Zeit-abhängige Phosphorylierung und Expression der MAP-Kinase p38 nach Belastung von RLE-6TN Zellen mit  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB oder Inkubation mit PBS. (A) und (C) Repräsentative Western Blots von Proteinextrakten ( $5 \mu\text{g}$ ) CB-behandelter Proben und den entsprechenden Kontrollen mit PBS (10 % SDS-PAGE, Phospho-p38 MAP-Kinase (Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup>) polyklonaler Antikörper, p38 MAP-Kinase polyklonaler Antikörper 1 : 1000, HRP-gekoppelter Sekundär-Antikörper 1 : 2000). (B) und (D) Quantitative densitometrische Auswertung der Western Blots von drei unabhängigen Experimenten, wobei jedes Einzelexperiment als Doppelbestimmung durchgeführt wurde (Mittelwerte  $\pm$  S.E.M.,  $n = 3$ ). \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,005$ .

Die Belastung der RLE-6TN Zellen mit  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB [vgl. 3.1] führte im Vergleich zu den Kontrollen mit PBS bereits nach 2 h zu einer signifikanten, 1,6fachen Zunahme ( $n = 3$ ,  $p < 0,05$ ) der Phosphorylierung von p38, die nach 4 h auf das 2,3fache ( $n = 3$ ,  $p < 0,005$ ) weiter anstieg [vgl. Abb. 3.5 A und B]. Nach diesem Maximum ging die Phosphorylierung in den CB-behandelten Proben langsam wieder zurück, blieb dabei aber über den gesamten Belastungs-Zeitraum von 24 h signifikant erhöht.

Im Gegensatz zum Zeitverlauf dieser CB-induzierten Phosphorylierung blieb die Gesamtmenge an exprimierter p38 MAP-Kinase während des gesamten Belastungs-Zeitraums in allen Proben konstant [vgl. Abb. 3.5 C und D].

Demzufolge induzieren ultrafeine CB-Partikel in RLE-6TN Zellen bereits nach 2 h eine Zeit-abhängige Aktivierung [vgl. 3.2.1] der MAP-Kinase p38, ohne dabei die Expression des Proteins zu beeinflussen.

### 3.2.4 CB-induzierte Aktivierung von AKT

Die bisherigen Daten der vorliegenden Arbeit zeigten, dass ERK1/2, JNK1/2 sowie p38 durch ultrafeines CB aktiviert werden, wobei die einzelnen MAP-Kinasen deutliche Unterschiede im Bezug auf den Zeitverlauf der Aktivierung aufweisen.

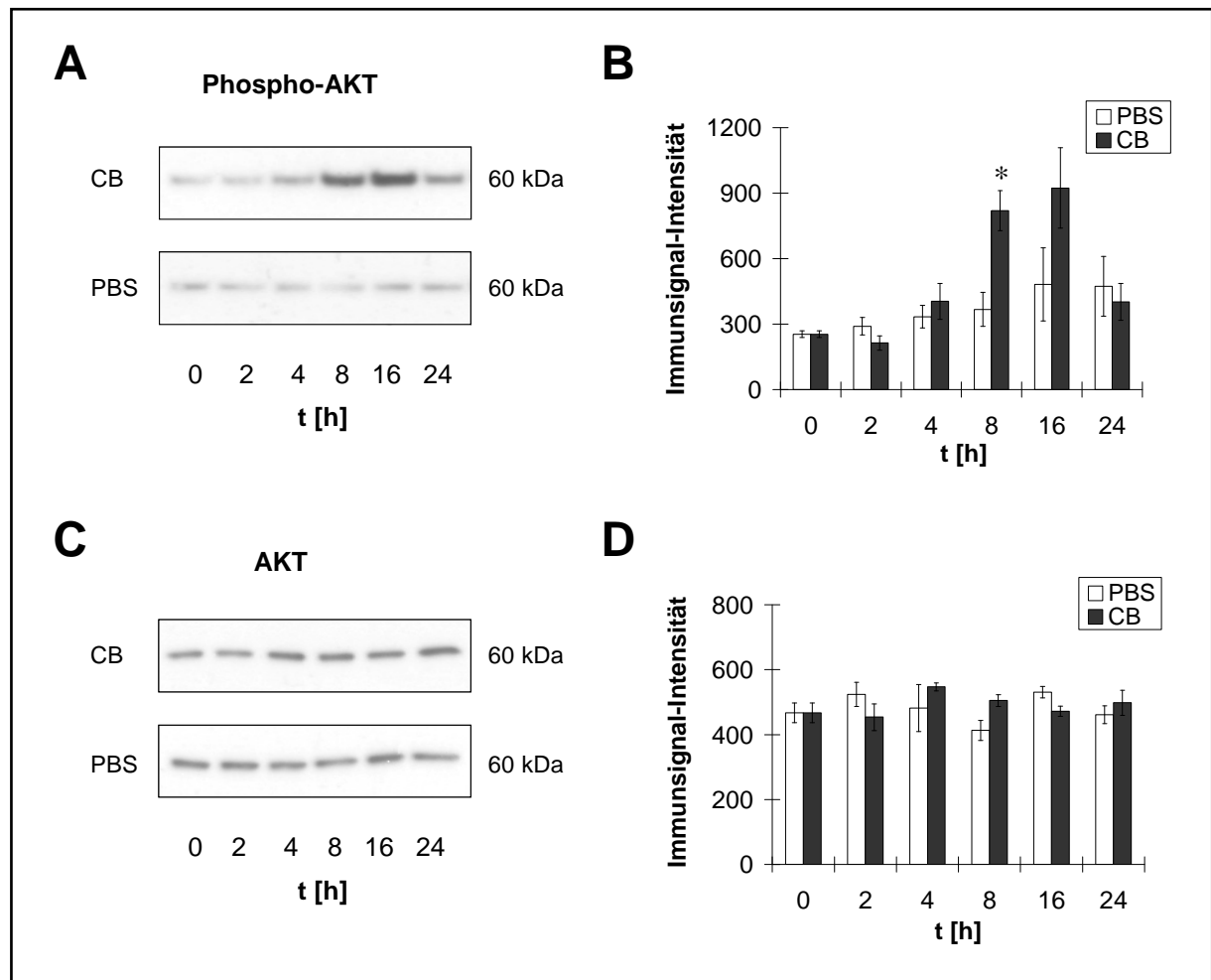
Im Folgenden wurde der Einfluss ultrafeiner CB-Partikel auf die Phosphorylierung der Proteinkinase AKT untersucht, die als Teil eines anti-apoptotischen Signalweges beschrieben wird [Fukuda *et al.*, 2003].

Die Phosphorylierung von AKT wurde mit Hilfe eines phospho-spezifischen Antikörpers detektiert, der nur an AKT bindet, wenn eine Phosphorylierung am Ser<sup>473</sup> in der hydrophoben Region des C-Terminus vorliegt. Dabei ist bekannt, dass diese Phosphorylierung essentiell für die Aktivierung von AKT ist [Kozikowski *et al.*, 2003].

Die Belastung der RLE-6TN Zellen mit  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB [vgl. 3.1] führte im Vergleich zu den Kontrollen mit PBS, die über den gesamten Belastungs-Zeitraum nur geringe Veränderungen in der Phosphorylierung zeigten, nach 8 h zu einer signifikanten, 2,2fachen Zunahme ( $n = 3$ ,  $p < 0,05$ ) der Phosphorylierung von AKT [vgl. Abb. 3.6 A und B]. Nach 16 h wurde ebenfalls noch eine geringe, allerdings nicht signifikante, Zunahme beobachtet, während 24 h nach Beginn der Behandlung die Phosphorylierung in den CB-belasteten Proben wieder auf den Ausgangswert zurückging.

Im Gegensatz zum Zeitverlauf der CB-induzierten Phosphorylierung blieb die Gesamtmenge an exprimierter AKT während des gesamten Belastungs-Zeitraums in allen Proben konstant [vgl. Abb. 3.6 C und D].



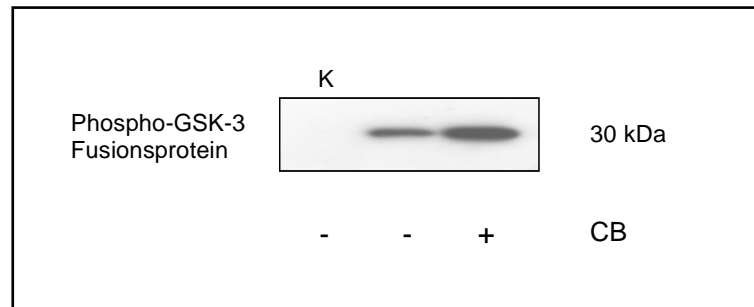


**Abb. 3.6:** Zeit-abhängige Phosphorylierung und Expression von AKT nach Belastung von RLE-6TN Zellen mit  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB oder Inkubation mit PBS. (A) und (C) Repräsentative Western Blots von Proteinextrakten ( $5 \mu\text{g}$ ) CB-behandelter Proben und den entsprechenden Kontrollen mit PBS (10 % SDS-PAGE, Phospho-AKT (Ser<sup>473</sup>) polyklonaler Antikörper, AKT polyklonaler Antikörper 1 : 1000, HRP-gekoppelter Sekundär-Antikörper 1 : 2000). (B) und (D) Quantitative densitometrische Auswertung der Western Blots von drei unabhängigen Experimenten, wobei jedes Einzelexperiment als Doppelbestimmung durchgeführt wurde (Mittelwerte  $\pm$  S.E.M.,  $n = 3$ ). \*:  $p < 0,05$ .

Für die vollständige Aktivierung von AKT ist jedoch nicht nur die Phosphorylierung am Ser<sup>473</sup> sondern auch am Thr<sup>308</sup> in der katalytischen Domäne notwendig [Coffer *et al.*, 1998]. Um zu überprüfen, ob die nach 8 h beobachtete CB-induzierte Phosphorylierung am Ser<sup>473</sup> tatsächlich mit einer Aktivierung der Proteinkinase einhergeht, wurde zusätzlich die enzymatische Aktivität von AKT bestimmt.

AKT reguliert beispielsweise die Glykogen-Synthese durch die Phosphorylierung und Inaktivierung von GSK-3  $\alpha$  und  $\beta$  [Cross *et al.*, 1995]. Daher wurde ein GSK-3 Fusionsprotein als Substrat für AKT zur Messung der enzymatischen AKT-Aktivität eingesetzt [vgl. 2.2.7.1].

Nach Belastung der RLE-6TN Zellen für 8 h mit  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB [vgl. 3.1] wurde die AKT-Kinase durch Immunpräzipitation mit einem monoklonalen Antikörper isoliert und für die Kinase-Reaktion mit dem GSK-3 Fusionsprotein als Substrat eingesetzt. Im Anschluss wurde die Phosphorylierung des GSK-3 Fusionsproteins nach SDS-PAGE [vgl. 2.2.5.5] und Western Blot [vgl. 2.2.6.1] mit Hilfe eines phospho-spezifischen Antikörpers detektiert. Als Kontrolle diente eine Probe, welcher bei der Immunpräzipitation kein Antikörper zugegeben wurde.



**Abb. 3.7:** Phosphorylierung des GSK-3 Fusionsproteins durch aktivierte AKT-Kinase aus Proteinextrakten von RLE-6TN Zellen nach 8 h Belastung mit  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB oder Inkubation mit PBS. Repräsentativer Western Blot von Proben der Kinase-Reaktion mit Immunpräzipitaten aus CB-behandelten Zellen und der entsprechenden Kontrolle mit PBS (10 % SDS-PAGE,  $0,125 \mu\text{g}$  GSK-3 Fusionsprotein, K: Kontrolle ohne immobilisierten AKT (1G1) monoklonalen Antikörper). Phospho-GSK-3  $\alpha/\beta$  (Ser<sup>21/9</sup>) polyklonaler Antikörper 1 : 1000, HRP-gekoppelter Sekundär-Antikörper 1 : 2000.

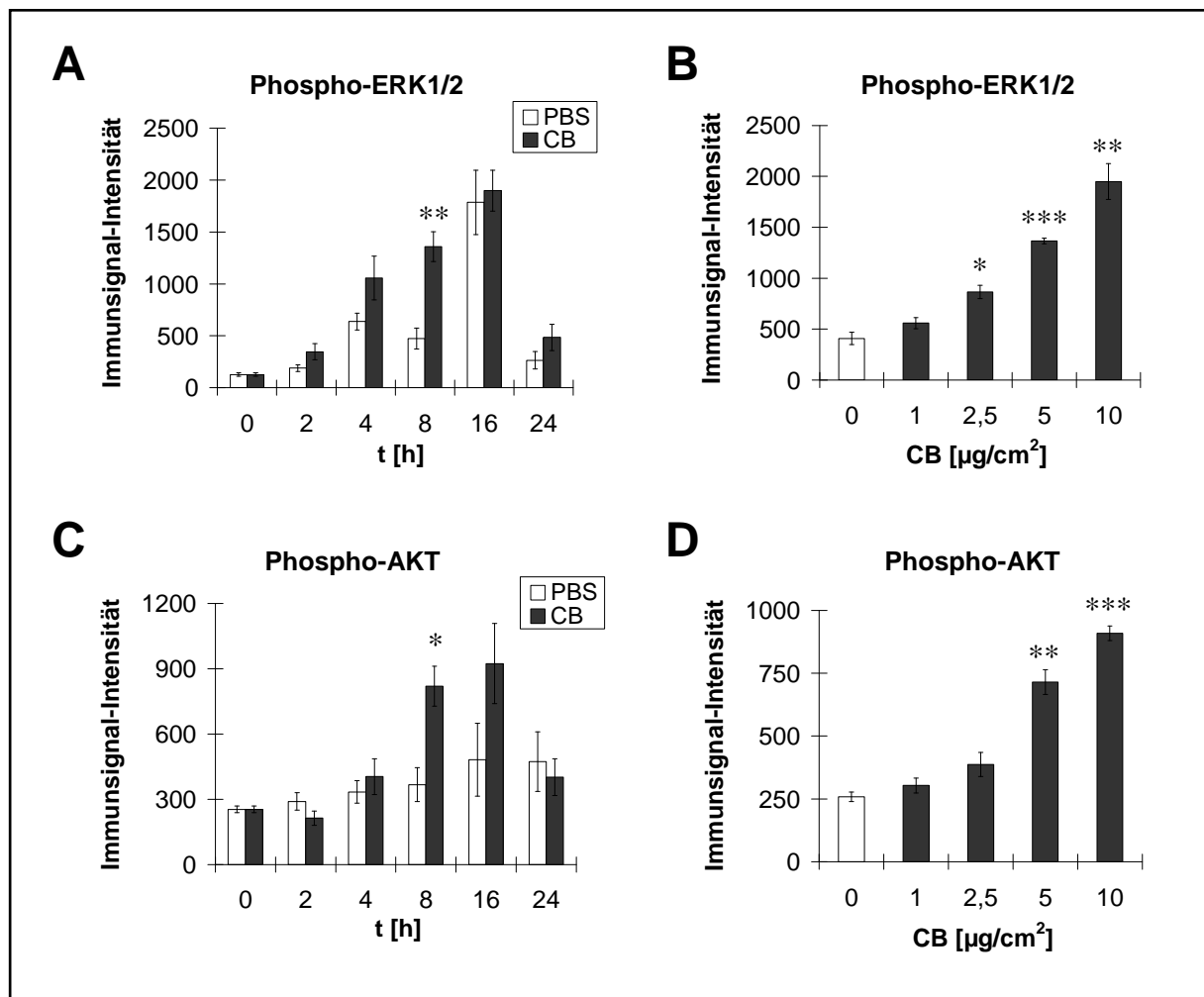
Die AKT-Kinase aus der CB-belasteten Probe zeigte im Vergleich zur Kontrolle mit PBS eine verstärkte Phosphorylierung des GSK-3 Fusionsproteins, was mit einer erhöhten Kinase-Aktivität von AKT korreliert [vgl. Abb. 3.7].

Demzufolge induzieren ultrafeine CB-Partikel in RLE-6TN Zellen nach 8 h eine Zeit-abhängige Phosphorylierung von AKT am Ser<sup>473</sup> sowie eine Aktivierung der Kinase, ohne dabei einen Einfluss auf die Expression auszuüben.

### 3.2.5 Zeitgleiche Aktivierung von ERK1/2 und AKT durch CB

Die Phosphorylierung bzw. Aktivierung von Signalproteinen, die die zellulären Endpunkte Apoptose und/oder Zellproliferation regulieren, lässt auf eine Beteiligung dieser Proteine an der Feinstaub-induzierten Signaltransduktion schließen. Allerdings lassen die einzelnen Mitglieder der Familie der MAP-Kinasen sowie die Proteinkinase AKT dabei teilweise deutliche Unterschiede im Bezug auf den Zeitverlauf der Aktivierung erkennen.

So führte die Behandlung von RLE-6TN Zellen mit ultrafeinen CB-Partikeln zu einer frühen Aktivierung von JNK1/2 sowie der p38 MAP-Kinase, wohingegen ERK1/2 und AKT erst zu einem späteren Zeitpunkt phosphoryliert wurden. Zudem dauerte die Aktivierung von p38 über den gesamten Behandlungszeitraum an, während die Phosphorylierung von JNK1/2, ERK1/2 und AKT ein Maximum aufwies und nach 24 h wieder auf den Ausgangswert zurückging.



**Abb. 3.8:** Zeit- und Dosis-abhängige Phosphorylierung von ERK1/2 und AKT nach Belastung von RLE-6TN Zellen mit CB. (A) und (C) Zeitverlauf der Phosphorylierung von ERK1/2 und AKT nach der Behandlung mit  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB für 2 – 24 h. (B) und (D) Dosisverlauf der Phosphorylierung von ERK1/2 und AKT nach der Behandlung mit 1 – 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB für 8 h. (A-D) Quantitative densitometrische Auswertung der Western Blots (10 % SDS-PAGE, 5  $\mu\text{g}$  Protein, Phospho-p44/42 MAP-Kinase (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>) polyklonaler Antikörper, Phospho-AKT (Ser<sup>473</sup>) polyklonaler Antikörper 1 : 1000, HRP-gekoppelter Sekundär-Antikörper 1 : 2000) von drei unabhängigen Experimenten, wobei jedes Einzelexperiment als Doppelbestimmung durchgeführt wurde (Mittelwerte  $\pm$  S.E.M., n = 3).. \*: p < 0,05; \*\*: p < 0,005 \*\*\*: p < 0,0005.

Interessanterweise wurden jedoch, wie in Abb. 3.8 A und C der Übersicht halber erneut dargestellt, bei diesem Vergleich auch Übereinstimmungen im Zeitverlauf der Aktivierung von ERK1/2 und AKT deutlich, da die ultrafeinen CB-Partikel nach 8 h eine signifikante Phosphorylierung dieser Proteinkinasen induzieren.

Zur genaueren Untersuchung dieser CB-induzierten Aktivierung wurde zusätzlich die Phosphorylierung von ERK1/2 und AKT in Abhängigkeit von der Partikel-Konzentration überprüft, indem die RLE-6TN Zellen über einen Zeitraum von 8 h mit 1 – 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB behandelt wurden [vgl. Abb. 3.8 B und D].

Dabei zeigte sich bei CB-Konzentrationen im Bereich von 2,5 – 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  eine signifikante Zunahme der Phosphorylierung von ERK1 und ERK2, die in Abhängigkeit von der Dosis vom 2,1fachen ( $n = 3$ ,  $p < 0,05$ ) bis auf das 4,7fache ( $n = 3$ ,  $p < 0,005$ ) weiter anstieg [vgl. Abb. 3.8 B]. Bei der Proteinkinase AKT wurde eine ähnliche Dosis-Abhängigkeit beobachtet. So führte die Behandlung mit 5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB zu einer signifikanten, 2,7fachen Zunahme ( $n = 3$ ,  $p < 0,005$ ) der Phosphorylierung am Ser<sup>473</sup>, die durch 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB auf das 3,5fache ( $n = 3$ ,  $p < 0,0005$ ) erhöht wurde [vgl. Abb. 3.8 D].

Aufgrund dieser klaren Dosis-Abhängigkeit kann hierbei vernachlässigt werden, dass bei der höchsten Konzentration von 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB möglicherweise bereits zytotoxische Mechanismen einsetzen [vgl. 3.1].

Somit induzieren ultrafeine CB-Partikel in RLE-6TN Zellen eine simultane Zeit- und Dosis-abhängige Aktivierung von ERK1/2 und AKT. Die Übereinstimmung in der Aktivierung dieser Signalproteine lässt dabei die Frage aufkommen, ob es sich hierbei um zwei voneinander unabhängige Signalwege handelt, die parallel induziert werden, oder ob AKT und ERK1/2 zu einem Signalweg mit dem gleichen Endpunkt gehören.

### **3.3 Beteiligung von Zelloberflächen-Rezeptoren an der CB-induzierten Signaltransduktion**

Nachdem gezeigt wurde, dass die Exposition mit ultrafeinem CB zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen sowie der Proteinkinase AKT führt, wurde im Folgenden die Induktion dieser Signalwege untersucht. Da diese Induktion möglicherweise durch Interaktionen der Partikel mit den Zellen vermittelt wird, lag das Hauptaugenmerk hierbei auf Zelloberflächen-Rezeptoren, wie z.B. dem EGF-R oder Integrinen [vgl. 1.3]. In diesem Zusammenhang war bereits bekannt, dass der EGF-R an Signaltransduktionen beteiligt sein kann, die sowohl durch Asbest-Fasern als auch durch granuläre Stäube induziert werden. Im Gegensatz dazu

wurde eine Beteiligung von Integrinen bislang nur bei der Asbest-vermittelten Signaltransduktion beobachtet [Albrecht *et al.*, 2004].

Im Folgenden wurde daher zunächst mit Hilfe Rezeptor-spezifischer Hemmstoffe untersucht, ob der EGF-R sowie Integrin-Rezeptoren auch an Signalwegen beteiligt sind, die durch ultrafeine CB-Partikel induziert werden. Die Tyrosin-Kinase-Aktivität des EGF-R wurde dabei durch Tyrphostin AG 1478 gehemmt, während die Integrine durch die Bindung eines Tripeptids aus Arg-Gly-Asp (RGD) blockiert wurden. Das Peptid korrespondiert dabei mit der AS-Sequenz in Proteinen der ECM, über die die Bindung der Integrine an die ECM erfolgt [vgl. 1.3 und 2.1.5].

Nach der Behandlung mit den jeweiligen Hemmstoffen wurde hier jedoch nur die Aktivierung von JNK1/2, ERK1/2 und AKT untersucht, da diese Signalproteine, im Gegensatz zur p38 MAP-Kinase, eine Partikel-induzierte Phosphorylierung mit einem Maximum zu bestimmten Zeitpunkten zeigten [vgl. 3.2.5].

### **3.3.1 EGF-R vermittelte Aktivierung von JNK1/2**

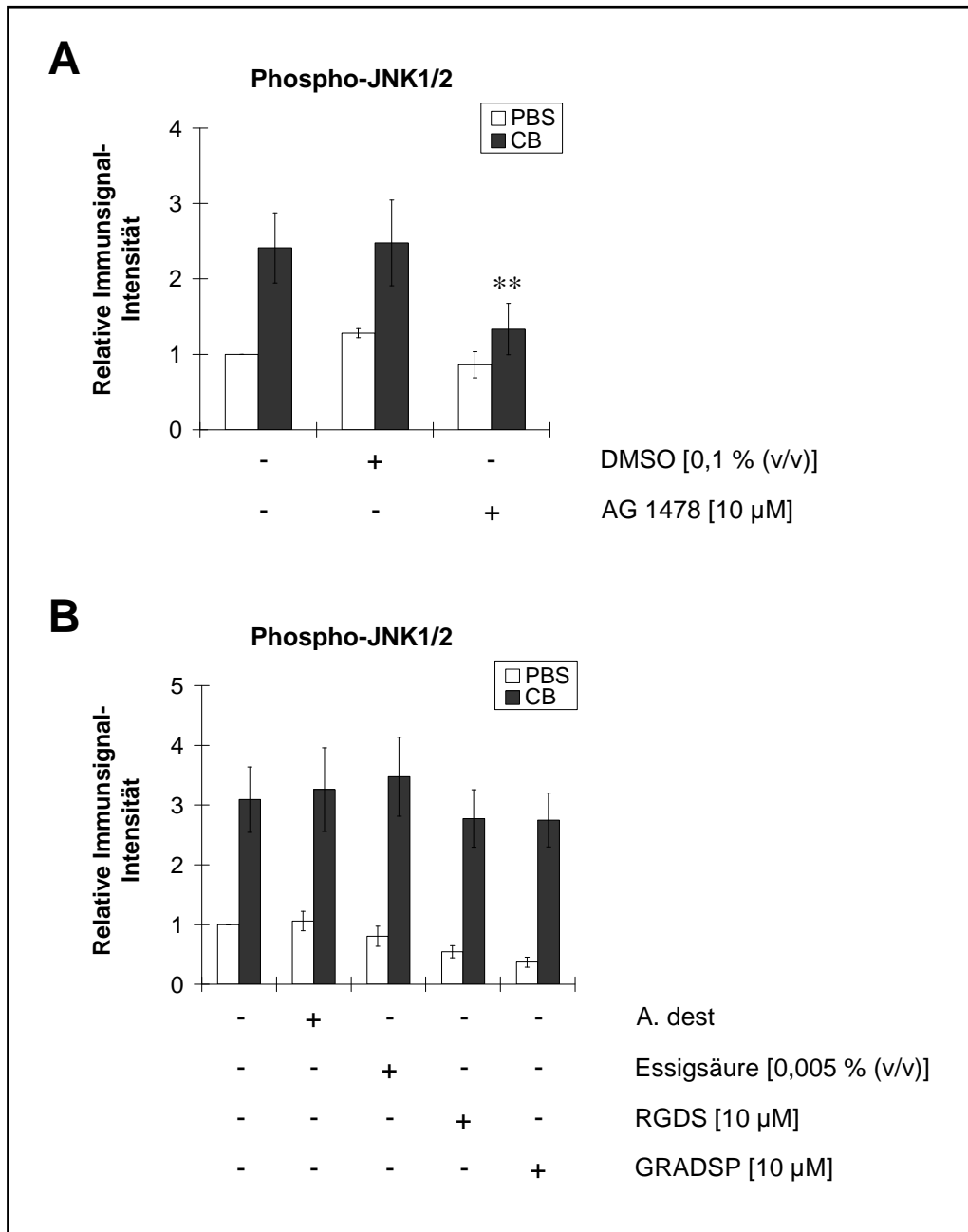
Um die Beteiligung der Zelloberflächen-Rezeptoren an der Feinstaub-induzierten Signaltransduktion zu untersuchen, wurde zunächst der Effekt spezifischer Inhibitoren für den EGF-R und Integrin-Rezeptoren auf die CB-induzierte Phosphorylierung der MAP-Kinasen JNK1 und JNK2 bestimmt.

Dazu wurden die RLE-6TN Zellen für 1 h mit dem jeweiligen Hemmstoff bzw. der dazugehörigen Lösungsmittelkontrolle inkubiert und anschließend für 4 h mit 5 µg/cm<sup>2</sup> CB [vgl. 3.1 und 3.2.2] belastet. Im Anschluss wurde die Phosphorylierung von JNK1/2 mit Hilfe phospho-spezifischer Antikörper im Western Blot untersucht.

Für die Inhibition des EGF-R wurde Tyrphostin AG 1478 in einer Konzentration von 10 µM eingesetzt, während die Lösungsmittelkontrollen mit DMSO in einer Endkonzentration von 0,1 % (v/v) vorinkubiert wurden [vgl. Abb. 3.9 A].

Die Behandlung mit DMSO bewirkte dabei keine Veränderungen in der CB-induzierten Phosphorylierung von JNK1/2. Im Gegensatz dazu führte die Vorbehandlung mit Tyrphostin AG 1478 zu einer signifikanten Abnahme der CB-induzierten Phosphorylierung von JNK1 und JNK2 um 47 % (n = 3, p < 0,005), während die Phosphorylierung in den Kontrollen mit PBS konstant blieb.

Demzufolge scheint der EGF-R an der frühen, CB-induzierten Aktivierung von JNK1 und JNK2 beteiligt zu sein.



**Abb. 3.9:** Einfluss von Inhibitoren für Zelloberflächen-Rezeptoren auf die CB-induzierte Phosphorylierung von JNK1/2: Belastung von RLE-6TN Zellen für 4 h mit  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB nach einstündiger Vorbehandlung mit (A) Tyrphostin AG 1478 [10  $\mu\text{M}$ ] bzw. DMSO [0,1 % (v/v) Endkonzentration] als Lösungsmittelkontrolle oder (B) dem RGD-Peptid [10  $\mu\text{M}$ ] und dem Kontrollpeptid [10  $\mu\text{M}$ ] bzw. A. dest und Essigsäure [0,005 % (v/v) Endkonzentration] als Lösungsmittelkontrollen. (A) und (B) Quantitative densitometrische Auswertung der Western Blots (10 % SDS-PAGE, 5  $\mu\text{g}$  Protein, Phospho-SAPK/JNK (Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup>) polyklonaler Antikörper 1 : 1000, HRP-gekoppelter Antikörper 1 : 2000) von drei unabhängigen Experimenten, wobei jedes Einzelexperiment als Doppelbestimmung durchgeführt wurde (Mittelwerte  $\pm$  S.E.M., n = 3). \*\*: p < 0,005, signifikanter Unterschied zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle.

Im Folgenden wurde untersucht, ob auch Integrin-Rezeptoren die CB-induzierte Aktivierung von JNK1/2 beeinflussen. Dazu wurden die RLE-6TN Zellen mit dem RGD-Peptid in einer Konzentration von 10  $\mu$ M vorinkubiert. Als Negativkontrolle diente ein Kontrollpeptid mit der AS-Sequenz Arg-Ala-Asp (RAD) [vgl. 2.1.5]. Als Lösungsmittelkontrollen für das RGD- sowie das Kontrollpeptid dienten A. dest bzw. 0,005 % (v/v) Essigsäure [vgl. Abb. 3.9 B].

Die jeweiligen Lösungsmittelkontrollen zeigten dabei keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von JNK1/2. Aber auch die Vorbehandlung mit dem RGD-Peptid sowie dem Kontrollpeptid hatte keinen signifikanten Effekt auf die CB-induzierte Phosphorylierung von JNK1 und JNK2, sowie die Phosphorylierung in den PBS-behandelten Proben.

Demnach wird die frühe, CB-induzierte Aktivierung von JNK1 und JNK2 offenbar durch den EGF-R, aber ohne Beteiligung von Integrin-Rezeptoren vermittelt.

### 3.3.2 EGF-R und Integrin-vermittelte Aktivierung von ERK1/2 und AKT

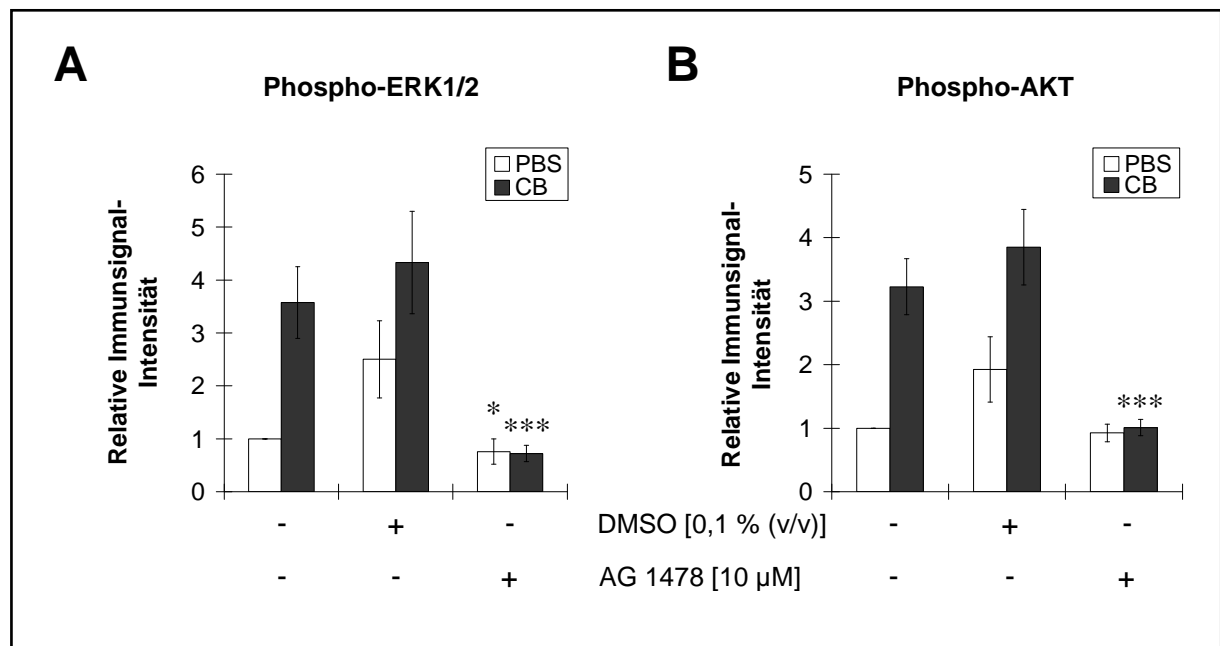
Nachdem gezeigt werden konnte, dass der EGF-R, jedoch nicht die Integrine, an der Feinstaub-induzierten Aktivierung von JNK1 und JNK2 beteiligt ist, wurde im nächsten Schritt der Einfluss der Rezeptor-Inhibitoren auf die CB-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 und AKT untersucht.

Dazu wurden die RLE-6TN Zellen nach der Inkubation mit dem jeweiligen Hemmstoff bzw. der dazugehörigen Lösungsmittelkontrolle für 8 h mit 5  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> CB belastet [vgl. 3.1 und 3.2.5]. Die Inhibitoren für den EGF-R und die Integrine sowie die entsprechenden Lösungsmittelkontrollen wurden dabei wie zuvor beschrieben [vgl. 3.3.1] eingesetzt. Ebenso wie bei der Untersuchung der JNK-Aktivierung wurde die Phosphorylierung von ERK1/2 und AKT im Anschluss mit Hilfe phospho-spezifischer Antikörper im Western Blot bestimmt [vgl. 3.3.1].

Bei der Analyse des Einflusses des EGF-R Inhibitors wurde zunächst in den Lösungsmittelkontrollen mit DMSO eine signifikante Zunahme der Phosphorylierung von ERK1/2 beobachtet, die in den Kontrollen mit PBS 150 % (n = 3, p < 0,05) betrug [vgl. Abb. 3.10 A]. Die Vorbehandlung mit Tyrphostin AG 1478 wiederum führte zu einer signifikanten Abnahme der CB-induzierten Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 um 84 % (n = 3, p < 0,0005). Ebenso wurde die Phosphorylierung in den Kontrollen mit PBS durch den Hemmstoff signifikant um 68 % (n = 3, p < 0,005) reduziert.

Auch bei der Proteinkinase AKT konnte in den Lösungsmittelkontrollen mit DMSO eine erhöhte, jedoch nicht signifikante, Phosphorylierung am Ser<sup>473</sup> nachgewiesen werden [vgl. Abb. 3.10 B]. Nach der Vorbehandlung mit Tyrphostin AG 1478 wurde eine signifikante Abnahme der CB-induzierten Phosphorylierung um 75 % (n = 3, p < 0,0005) beobachtet.

Zudem zeigten auch die Kontrollen mit PBS in Gegenwart des Hemmstoffs eine verminderte Phosphorylierung, wobei dieser Effekt jedoch nicht signifikant war.

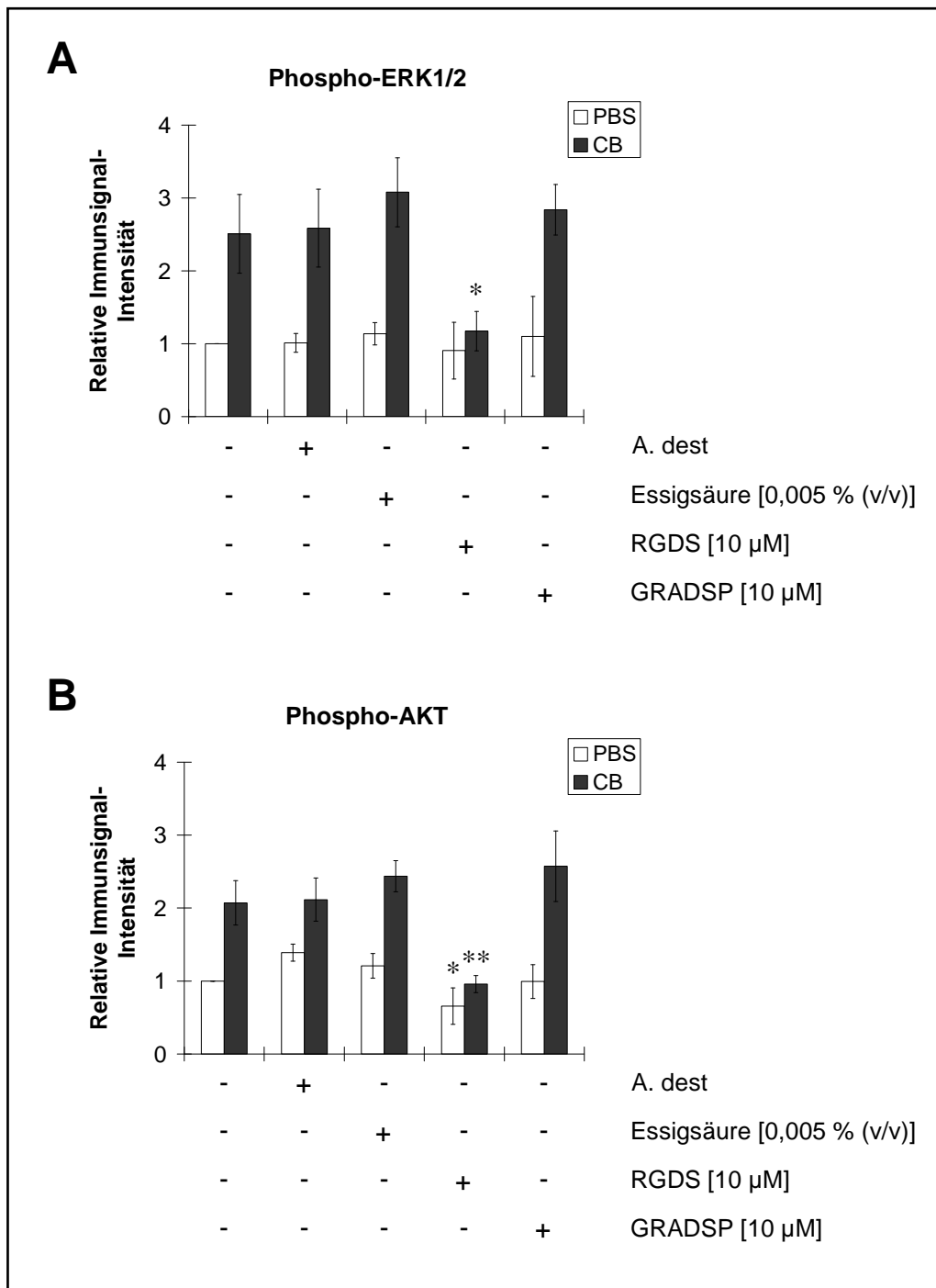


**Abb. 3.10:** Einfluss des EGF-R Inhibitors auf die CB-induzierte Phosphorylierung von (A) ERK1/2 und (B) AKT: Belastung von RLE-6TN Zellen für 8 h mit  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB nach einstündiger Vorbehandlung mit Tyrphostin AG 1478 [10  $\mu\text{M}$ ] bzw. DMSO [0,1 % (v/v) Endkonzentration] als Lösungsmittelkontrolle. (A) und (B) Quantitative densitometrische Auswertung der Western Blots (10 % SDS-PAGE, 5  $\mu\text{g}$  Protein, Phospho-p44/42 MAP-Kinase (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>) polyklonaler Antikörper, Phospho-AKT (Ser<sup>473</sup>) polyklonaler Antikörper 1 : 1000, HRP-gekoppelter Sekundär-Antikörper 1 : 2000) von drei unabhängigen Experimenten, wobei jedes Einzelexperiment als Doppelbestimmung durchgeführt wurde (Mittelwerte  $\pm$  S.E.M., n = 3). \*: p < 0,05, \*\*\*: p < 0,0005, signifikanter Unterschied zu den jeweiligen Lösungsmittelkontrollen.

Der DMSO-Effekt, der sich in der verstärkten Phosphorylierung der Signalproteine widerspiegelt, ist dabei aus der Literatur bereits bekannt [Dudley *et al.*, 1995]. Unabhängig davon lässt die Wirkung von Tyrphostin AG 1478 jedoch eine Beteiligung des EGF-R an der CB-induzierten Aktivierung von ERK1/2 und AKT vermuten.

Im Folgenden wurde mit Hilfe des Integrin-Inhibitors untersucht, ob auch die Integrin-Rezeptoren die CB-induzierte Aktivierung von ERK1/2 und AKT beeinflussen [vgl. Abb. 3.11].





**Abb. 3.11:** Einfluss des Integrin-Inhibitors auf die CB-induzierte Phosphorylierung von (A) ERK1/2 und (B) AKT: Belastung von RLE-6TN Zellen für 8 h mit  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB nach einstündiger Vorbehandlung mit dem RGD-Peptid [10  $\mu\text{M}$ ] und dem Kontrollpeptid [10  $\mu\text{M}$ ] bzw. A. dest und Essigsäure [0,005 % (v/v)] als Lösungsmittelkontrollen. (A) und (B) Quantitative densitometrische Auswertung der Western Blots (10 % SDS-PAGE, 5  $\mu\text{g}$  Protein, Antikörper vgl. Abb. 3.10) von drei unabhängigen Experimenten, wobei jedes Einzelexperiment als Doppelbestimmung durchgeführt wurde (Mittelwerte  $\pm$  S.E.M.,  $n = 3$ ). \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,005$ , signifikanter Unterschied zu den jeweiligen Lösungsmittelkontrollen.

Dabei wirkten sich die Lösungsmittelkontrollen nur geringfügig auf die Phosphorylierung von ERK1/2 in den CB- und PBS-behandelten Proben aus [vgl. Abb. 3.11 A]. Im Gegensatz dazu führte die Vorbehandlung mit dem RGD-Peptid zu einer signifikanten Abnahme der CB-induzierten Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 um 54 % ( $n = 3$ ,  $p < 0,05$ ), während beim Einsatz des Kontrollpeptids nur eine geringfügige, nicht signifikante Abnahme beobachtet wurde. Die Phosphorylierung in den Kontrollen mit PBS blieb hingegen sowohl beim RGD-Peptid als auch beim Kontrollpeptid konstant.

In ähnlicher Weise bewirkten die Lösungsmittelkontrollen nur geringfügige Veränderungen in der Phosphorylierung von AKT am Ser<sup>473</sup> [vgl. Abb. 3.11 B]. Nach der Vorbehandlung mit dem RGD-Peptid wurde dagegen eine signifikante Abnahme der CB-induzierten Phosphorylierung von AKT um 58 % ( $n = 3$ ,  $p < 0,005$ ), sowie eine signifikante Abnahme der Phosphorylierung in den PBS-behandelten Zellen um 50 % ( $n = 3$ ,  $p < 0,05$ ) nachgewiesen. Im Gegensatz dazu führte die Vorbehandlung mit dem Kontrollpeptid sowohl in den CB-behandelten Proben als auch den Kontrollen mit PBS nur zu geringfügigen Veränderungen in der Phosphorylierung von AKT.

Demzufolge sind, neben dem EGF-R, anscheinend auch Integrine an der CB-induzierten Aktivierung von ERK1/2 und AKT beteiligt. Damit unterscheidet sich die Induktion dieser Signalproteine von der CB-induzierten Aktivierung von JNK1 und JNK2, die unabhängig von Integrinen vermittelt wird.

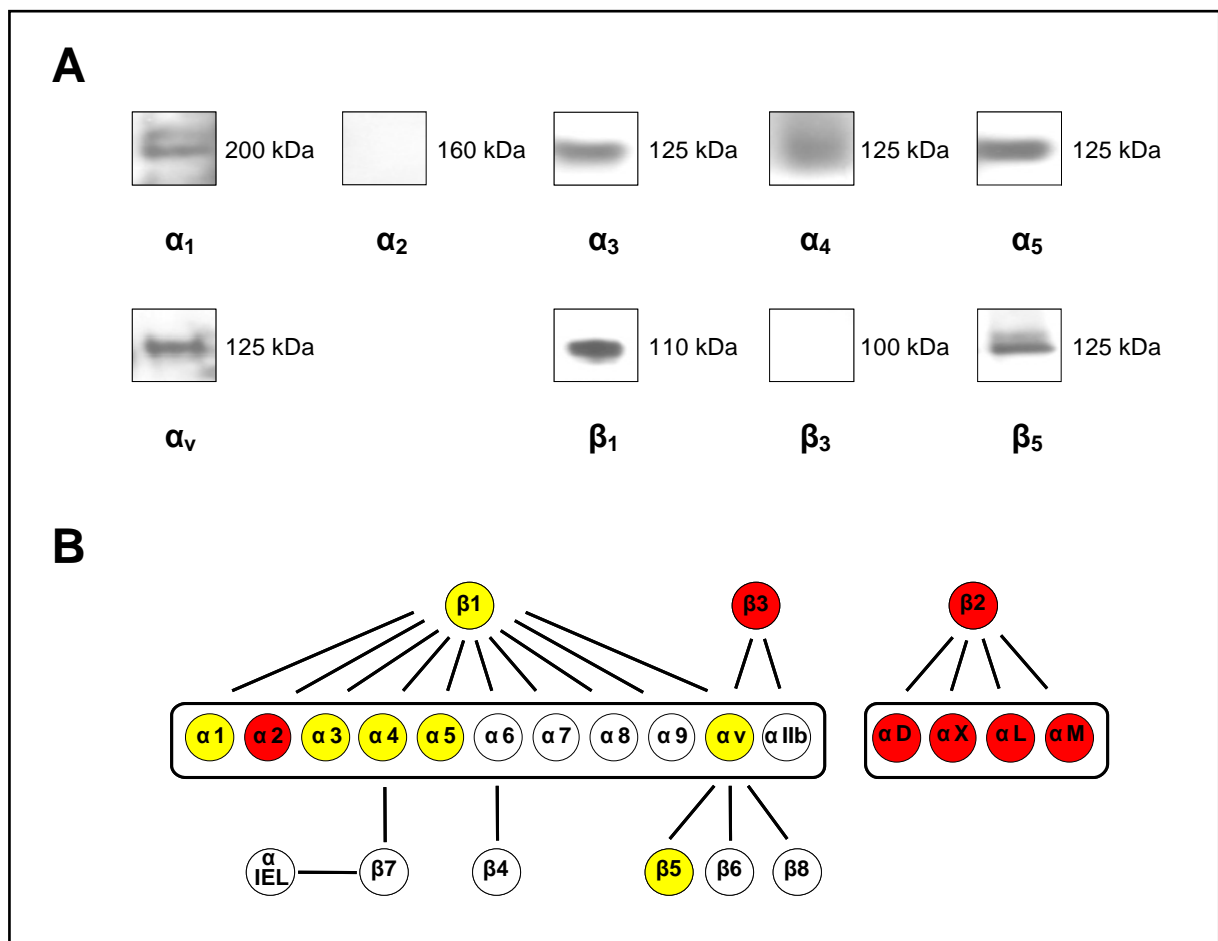
### 3.3.3 Integrin-Profil von Ratten-Lungenepithelzellen (RLE-6TN)

Da eine Beteiligung von Integrin-Rezeptoren an der Feinstaub-induzierten Aktivierung von ERK1/2 und AKT gezeigt werden konnte, sollte im Folgenden analysiert werden, welche Integrin-Untereinheiten diese Aktivierung vermitteln können. Dazu wurde zunächst das Integrin-Profil des Ratten-Lungenepithels untersucht.

Hierfür wurden RLE-6TN Zellen bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % im Nährmedium [vgl. 2.2.1.1] inkubiert. Die Proteine dieser Zellen wurden extrahiert [vgl. 2.2.5.2] und in der SDS-PAGE [vgl. 2.2.5.5] unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Da Integrin-Rezeptoren aufgrund von internen Disulfid-Bindungen eine kompakte Sekundär- bzw. Tertiärstruktur besitzen, konnte somit ein übereinstimmendes Laufverhalten der einzelnen Integrin-Untereinheiten gewährleistet werden [Smith *et al.*, 1990]. Im Anschluss wurde die Expression verschiedener Integrine mit Hilfe spezifischer Antikörper im Western Blot [vgl. 2.2.6.1] nachgewiesen.

Bei den Integrin-Rezeptoren handelt es sich um Heterodimere aus jeweils einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit, die in unterschiedlichen Kombinationen miteinander assoziieren können [vgl.

Abb. 3.12 B]. Dabei bestimmt die Zusammensetzung der Integrin-Heterodimere die Liganden-Bindung, wodurch wiederum eine Vielzahl unterschiedlicher Signalwege beeinflusst werden kann [vgl. 1.3]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden nur solche Integrin-Untereinheiten näher untersucht, für die bereits eine Beteiligung an der Induktion von Signaltransduktions-Kaskaden bekannt war.  $\beta_2$ -Integrine wurden allerdings nicht analysiert, da diese nur in Leukozyten exprimiert werden [Mayadas & Cullere, 2005; Lafrenie & Yamada, 1996].



**Abb. 3.12:** Integrin-Profil von RLE-6TN Zellen. (A) Repräsentative Western Blots von Proteinextrakten (5  $\mu$ g) unbehandelter Zellen (7,5 % SDS-PAGE,  $\alpha_1$ -Integrin polyklonaler Antikörper,  $\alpha_2$ -Integrin polyklonaler Antikörper,  $\alpha_3$ -Integrin polyklonaler Antikörper,  $\alpha_4$ -Integrin polyklonaler Antikörper,  $\beta_3$ -Integrin polyklonaler Antikörper,  $\beta_5$ -Integrin polyklonaler Antikörper 1 : 2000,  $\alpha_5$ -Integrin polyklonaler Antikörper,  $\alpha_v$ -Integrin polyklonaler Antikörper,  $\beta_1$ -Integrin monoklonaler Antikörper 1 : 1000, HRP-gekoppelter Sekundär-Antikörper 1 : 2000.). (B) Kombinationsmöglichkeiten bei der Heterodimer-Bildung von Integrin-Untereinheiten (gelb: exprimiert, rot: nicht exprimiert, weiß: nicht untersucht).

In RLE-6TN Zellen konnte die Expression der Integrin-Untereinheiten  $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_v$ ,  $\beta_1$  und  $\beta_5$  nachgewiesen werden, wohingegen  $\alpha_2$  und  $\beta_3$  nicht detektiert wurden [vgl. Abb. 3.12 A]. Das sich daraus ergebende Integrin-Profil der RLE-6TN Zellen ist in Abb. 3.12 B zusammengefasst. Dabei sind die im Western Blot detektierten Untereinheiten gelb markiert, während die Untereinheiten, deren Expression nicht nachgewiesen werden konnte, in rot dargestellt sind. Die weiß markierten Untereinheiten wurden nicht analysiert.

Die Analyse der Expression von Integrin-Untereinheiten lieferte einen Überblick über das Integrin-Profil der RLE-6TN Zellen. Auf Basis dieses Profils sollte die Beteiligung spezifischer Untereinheiten an der Feinstaub-induzierten Signaltransduktion im Folgenden näher untersucht werden.

### 3.3.4 $\beta_1$ -Integrin vermittelte Aktivierung von ERK1/2 und AKT

Mit Hilfe des erstellten Integrin-Profiles [vgl. 3.3.3] von RLE-6TN Zellen sollte die Integrin-Untereinheit bestimmt werden, die für die CB-induzierte Aktivierung von ERK1/2 und AKT verantwortlich ist.

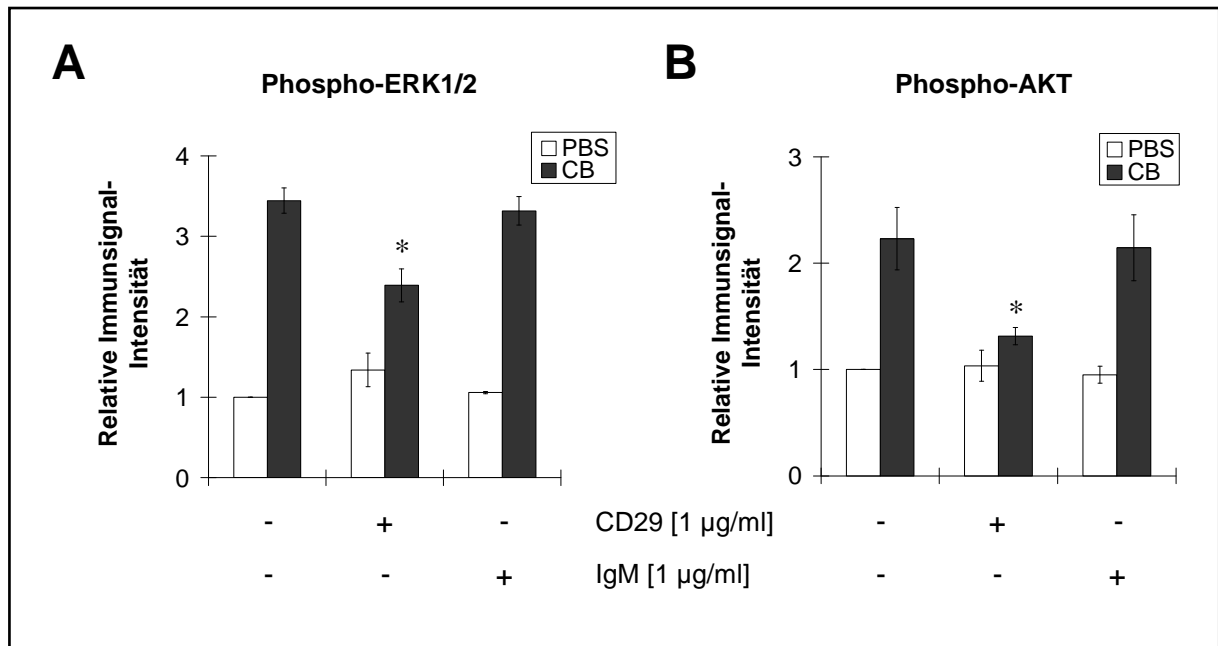
Frühere Untersuchungen mit Asbest-Fasern zeigten eine Beteiligung von  $\beta_1$ -Integrinen an der Faser-induzierten Signaltransduktion [Berken *et al.*, 2003]. Da diese Integrin-Untereinheit in RLE-6TN Zellen in hohem Maße exprimiert wird, wurde im Folgenden untersucht, ob die CB-induzierte Aktivierung von ERK1/2 und AKT ebenfalls durch  $\beta_1$ -Integrine vermittelt wird.

Hierzu wurden die  $\beta_1$ -Integrin-Untereinheiten durch die Bindung eines spezifischen Antikörpers gegen  $\beta_1$ -Integrin (Anti-CD29) blockiert, während ein unspezifischer Antikörper (Anti-Hamster IgM) als Negativkontrolle eingesetzt wurde [vgl. 2.1.5].

Für die Untersuchungen wurden die RLE-6TN Zellen für 1 h mit den jeweiligen Antikörpern in einer Konzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  inkubiert und anschließend für 8 h mit 5  $\mu\text{g/cm}^2$  CB [vgl. 3.1 und 3.2.5] belastet. Die Verdünnungen beider Antikörper erfolgten mit PBS, so dass die Notwendigkeit zusätzlicher Lösungsmittelkontrollen hierbei nicht gegeben war. Im Anschluss wurde die Phosphorylierung von ERK1/2 und AKT mit Hilfe phospho-spezifischer Antikörper im Western Blot bestimmt [vgl. 3.3.2].

Die Vorbehandlung mit dem  $\beta_1$ -Integrin Antikörper führte zu einer signifikanten Abnahme der CB-induzierten Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 um 30 % ( $n = 3$ ,  $p < 0,05$ ), während bei der Negativkontrolle nur eine geringfügige, jedoch nicht signifikante Veränderung beobachtet wurde [vgl. Abb. 3.13 A]. Die Phosphorylierung in den PBS-behandelten Kontrollen wurde hingegen weder durch Anti-CD29 noch durch den unspezifischen Antikörper beeinflusst.

Auch die CB-induzierte Phosphorylierung von AKT am Ser<sup>473</sup> wurde durch die Vorbehandlung mit dem  $\beta_1$ -Integrin Antikörper signifikant um 41 % ( $n = 3$ ,  $p < 0,05$ ) verringert, während die Phosphorylierung in den Kontrollen mit PBS nicht beeinflusst wurde [vgl. Abb. 3.13 B]. Im Gegensatz dazu hatte der unspezifische Antikörper keinen Einfluss auf die Phosphorylierung in den CB- und PBS-behandelten Zellen.



**Abb. 3.13:** Einfluss des Antikörpers gegen  $\beta_1$ -Integrin auf die CB-induzierte Phosphorylierung von (A) ERK1/2 und (B) AKT: Belastung von RLE-6TN Zellen für 8 h mit  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB nach einstündiger Vorbehandlung mit Anti-CD29 [1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] oder dem unspezifischen Antikörper Anti-Hamster IgM [1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]. (A) und (B) Quantitative densitometrische Auswertung der Western Blots (10 % SDS-PAGE, 5  $\mu\text{g}$  Protein, Phospho-p44/42 MAP-Kinase (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>) polyklonaler Antikörper, Phospho-AKT (Ser<sup>473</sup>) polyklonaler Antikörper 1 : 1000, HRP-gekoppelter Sekundär-Antikörper 1 : 2000) von drei unabhängigen Experimenten, wobei jedes Einzelexperiment als Doppelbestimmung durchgeführt wurde (Mittelwerte  $\pm$  S.E.M.,  $n = 3$ ). \*:  $p < 0,05$ , signifikanter Unterschied zur jeweiligen Kontrolle.

Demzufolge sind, neben dem EGF-R, offenbar auch  $\beta_1$ -Integrine an der CB-induzierten Aktivierung von ERK1/2 und AKT beteiligt. Dies stellt einen Unterschied zur CB-induzierten Aktivierung von JNK1/2 dar, da diese anscheinend zwar durch den EGF-R, aber nicht durch Integrine, vermittelt wird [vgl. 3.3.1]. Somit scheint die Aktivierung der Integrin-Rezeptoren das Schlüsselereignis bei der Induktion der simultanen Phosphorylierung von ERK1/2 und AKT nach der Exposition mit Feinstaub zu sein.

### 3.4 Analyse der Effekte von CB auf Proteine der Fokalkontakte

Nachdem gezeigt wurde, dass sowohl der EGF-R als auch  $\beta_1$ -Integrine offenbar an der Feinstaub-induzierten Signaltransduktion beteiligt sind, wurde im nächsten Schritt untersucht, welche zytoplasmatischen Signalproteine, die durch diese Zelloberflächen-Rezeptoren aktiviert werden können, die CB-induzierte Aktivierung von ERK1/2 und AKT vermitteln.

Da die Integrine bei der CB-induzierten Aktivierung dieser Signalproteine scheinbar eine wichtige Rolle spielen, lag das Hauptaugenmerk hierbei auf der Integrin-vermittelten Signaltransduktion [vgl. 3.3.4]. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass sich Integrine nach der Bindung von Liganden in der Zellmembran zusammenlagern und eine Konformationsänderung durchlaufen. Durch dieses „Clustering“ kommt es zur Bildung von Fokaladhäsions-Komplexen, auch Fokalkontakte genannt, in denen sowohl Zytoskelettproteine als auch Signalproteine gebunden werden [vgl. 1.3].

Zu den Signalproteinen der Fokalkontakte gehören dabei auch die Proteinkinasen FAK und ILK, die beide an die zytoplasmatische Domäne von  $\beta_1$ -Integrinen binden können [Hannigan *et al.*, 1996; Richardson & Parsons, 1995]. Aufgrund der Beteiligung dieser Integrin-Untereinheit an der Induktion der simultanen Aktivierung von ERK1/2 und AKT nach Exposition mit ultrafeinem CB wurde daher zunächst untersucht, ob die FAK und/oder die ILK ebenfalls an der CB-induzierten Signaltransduktion beteiligt sind.

#### 3.4.1 FAK

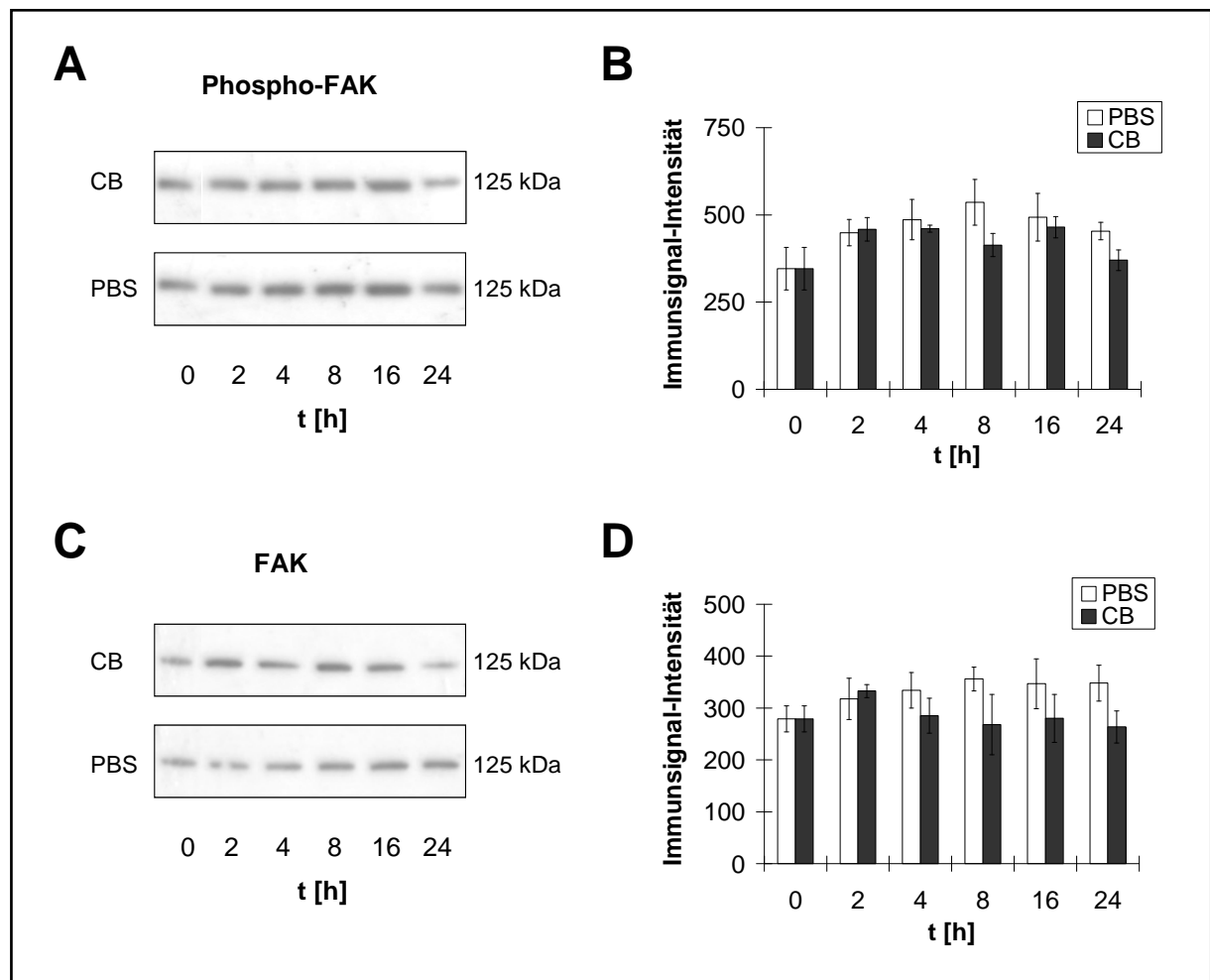
Um eine Beteiligung der in den Fokalkontakten gebundenen Signalproteine an der Feinstaub-induzierten Aktivierung von ERK1/2 und AKT zu untersuchen, wurde zunächst der Einfluss ultrafeiner CB-Partikel auf die Proteinkinase FAK bestimmt.

Nach der Bindung entsprechender Liganden an Integrine wird die FAK am Tyr<sup>397</sup> autophosphoryliert. Durch die direkte Interaktion der Proteinkinase mit  $\beta_1$ -Integrinen kann dieser Effekt dabei noch verstärkt werden. Als Folge der Autophosphorylierung wird die FAK aktiviert, und es kommt zur Induktion multipler Signalwege [Danen & Yamada, 2001; Lafreine & Yamada, 1996].

Die Autophosphorylierung und damit die Aktivierung der FAK wurde mit Hilfe eines phosphospezifischen Antikörpers detektiert, der nur an die Kinase bindet, wenn eine Phosphorylierung am Tyr<sup>397</sup> vorliegt.

Die Belastung von RLE-6TN Zellen mit 5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB [vgl. 3.1] führte im Vergleich zu den Kontrollen mit PBS zu keinen signifikanten Veränderungen in der Autophosphorylierung der

FAK [vgl. Abb. 3.14 A und B]. Auch die exprimierte Proteinmenge der FAK blieb während des gesamten Belastungs-Zeitraums in allen Proben konstant [vgl. Abb. 3.14 C und D].



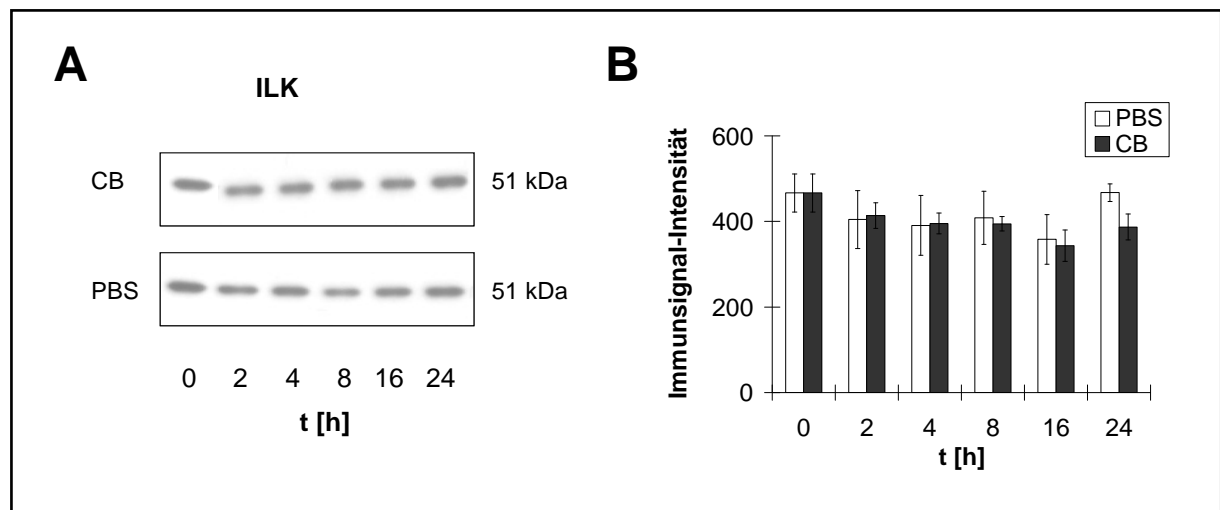
**Abb. 3.14:** Einfluss von CB [ $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ] auf die Autophosphorylierung und die Expression der FAK in RLE-6TN Zellen. (A) und (C) Repräsentative Western Blots von Proteinextrakten ( $5 \mu\text{g}$ ) CB-behandelter Proben und den entsprechenden Kontrollen mit PBS (7,5 % SDS-PAGE, Phospho-FAK (Tyr<sup>397</sup>) polyklonaler Antikörper 1 : 500, FAK monoklonaler Antikörper 1 : 1000, HRP-gekoppelter Sekundär-Antikörper 1 : 2000). (B) und (D) Quantitative densitometrische Auswertung der Western Blots von drei unabhängigen Experimenten, wobei jedes Einzelexperiment als Doppelbestimmung durchgeführt wurde (Mittelwerte  $\pm$  S.E.M.,  $n = 3$ ).

Somit induzieren ultrafeine CB-Partikel in RLE-6TN Zellen keine Aktivierung der FAK, die dementsprechend wahrscheinlich auch nicht an der CB-induzierten Phosphorylierung von ERK1/2 und AKT beteiligt ist.

### 3.4.2 ILK

Neben der FAK bindet auch die Proteinkinase ILK in Fokalkontakten an die zytoplasmatische Domäne der  $\beta_1$ -Integrine. Der ILK wird dabei eine Funktion bei der Aktivierung von AKT zugeschrieben und es ist ferner bekannt, dass Integrin-induzierte Signalwege, die unabhängig von der FAK ablaufen, vermutlich durch die ILK vermittelt werden [Gary *et al.*, 2003; Danen & Yamada, 2001]. Daher wurde im Folgenden der Einfluss ultrafeiner CB-Partikel auf die ILK untersucht, um Rückschlüsse auf eine mögliche Beteiligung dieser Kinase an der FAK-unabhängigen, Feinstaub-induzierten Signaltransduktion ziehen zu können.

Die Belastung von RLE-6TN Zellen mit  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB [vgl. 3.1] führte jedoch im Vergleich zu den Kontrollen mit PBS über den gesamten Behandlungs-Zeitraum zu keinen signifikanten Veränderungen in der Gesamtmenge der exprimierten ILK [vgl. Abb. 3.15 A und B].



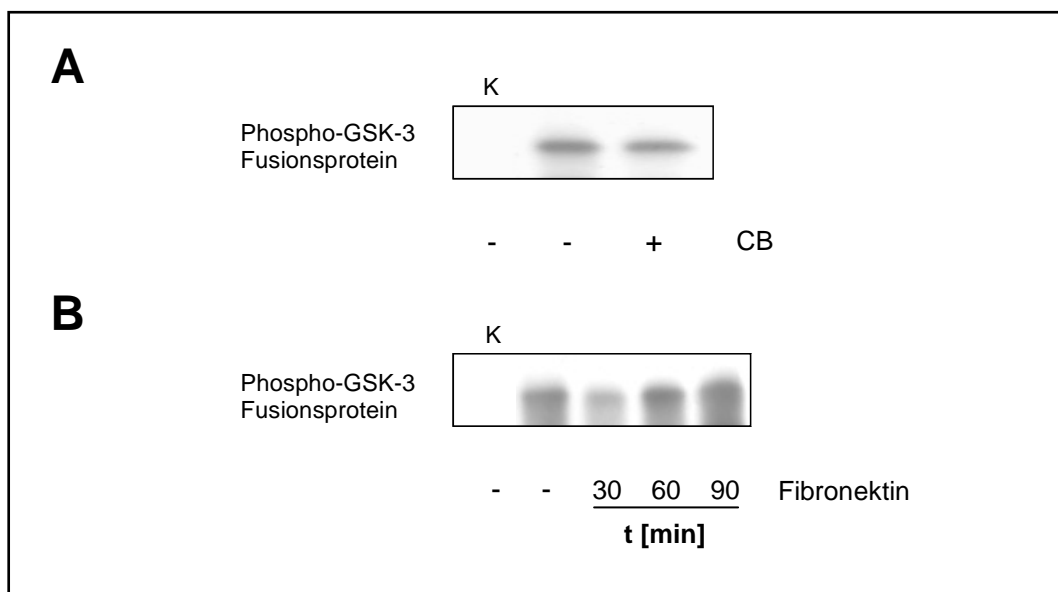
**Abb. 3.15:** Einfluss von CB [ $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ] auf die Expression der ILK in RLE-6TN Zellen. (A) Repräsentative Western Blots von Proteinextrakten ( $2,5 \mu\text{g}$ ) CB-behandelter Proben und den entsprechenden Kontrollen mit PBS (10 % SDS-PAGE, ILK1 polyklonaler Antikörper 1 : 1000, HRP-gekoppelter Sekundär-Antikörper 1 : 2000). (B) Quantitative densitometrische Auswertung der Western Blots von drei unabhängigen Experimenten, wobei jedes Einzelexperiment als Doppelbestimmung durchgeführt wurde (Mittelwerte  $\pm$  S.E.M.,  $n = 3$ ).

Um eine Aussage zur Aktivierung der ILK durch die CB-Behandlung von RLE-6TN Zellen treffen zu können, wurde die enzymatische Aktivität der ILK bestimmt. Dabei wurde, ebenso wie bei der Untersuchung der enzymatischen Aktivität von AKT [vgl. 3.2.4], ein GSK-3 Fusionsprotein als Substrat in einer Kinase-Reaktion eingesetzt [vgl. 2.2.7.2]. Als Positivkontrolle diente die Aktivierung der ILK durch die Bindung der RLE-6TN Zellen an eine Fibronectin-Matrix. Hierzu wurde ein Adhäsions-Test durchgeführt, bei dem die RLE-6TN



Zellen für 30 – 90 min in Zellkultur-Flaschen inkubiert wurden, die mit  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  Fibronectin beschichtet waren [vgl. 2.2.3.1].

Die Belastung der RLE-6TN Zellen erfolgte für 8 h mit  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB [vgl. 3.1], so dass die enzymatische Aktivität der ILK zu dem gleichen Zeitpunkt bestimmt wurde, bei dem die Signalproteine AKT und ERK1/2 signifikant phosphoryliert vorliegen [vgl. 3.2.5]. Nach der Belastung wurde die ILK mittels eines polyklonalen Antikörpers immunpräzipitiert [vgl. 2.2.6.3]. Im Anschluss an die Kinase-Reaktion und die SDS-PAGE wurde die Phosphorylierung des GSK-3 Fusionsproteins mit Hilfe eines phospho-spezifischen Antikörpers im Western Blot bestimmt [vgl. 3.2.4]. Ein Ansatz ohne ILK-Antikörper diente dabei als Hintergrund-Kontrolle.



**Abb. 3.16:** Phosphorylierung des GSK-3 Fusionsproteins durch aktivierte ILK-Kinase aus Proteinextrakten von RLE-6TN Zellen nach (A) Belastung für 8 h mit  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB oder Inkubation mit PBS und (B) der Adhäsion auf  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  Fibronectin für 30 – 90 min. (A) und (B) Repräsentative Western Blots von Proben der Kinase-Reaktion mit Immunpräzipitaten aus CB-behandelten Zellen, der entsprechenden Kontrolle mit PBS bzw. den Positivkontrollen (10 % SDS-PAGE,  $0,125 \mu\text{g}$  GSK-3 Fusionsprotein, K: Kontrolle ohne ILK polyklonalen Antikörper). Phospho-GSK-3  $\alpha/\beta$  (Ser<sup>21/9</sup>) polyklonaler Antikörper 1:1000, HRP-gekoppelter Sekundär-Antikörper 1 : 2000.

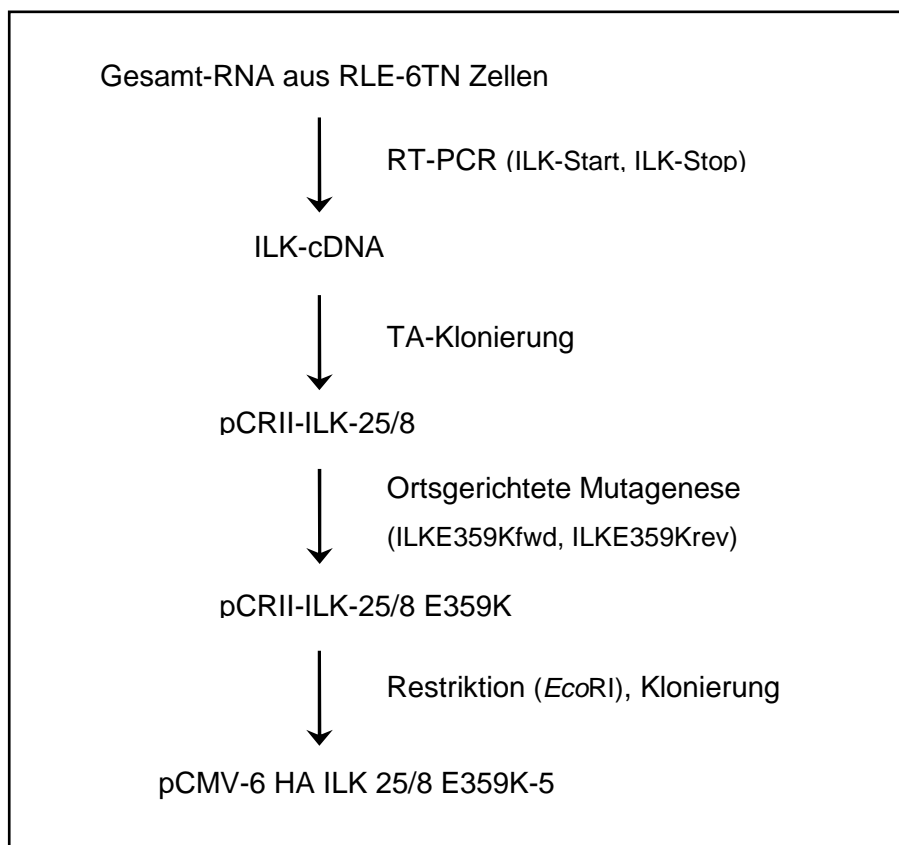
Die Behandlung mit CB hatte jedoch keinen Effekt auf die Phosphorylierung des GSK-3 Fusionsproteins [vgl. Abb. 3.16 A]. Im Gegensatz dazu führte die Adhäsion der Zellen an Fibronectin über die Aktivierung der ILK nach 60 – 90 min zu einer deutlichen Zunahme der Phosphorylierung des GSK-3 Fusionsproteins [vgl. Abb. 3.16 B].

Demnach beeinflussen ultrafeine CB-Partikel scheinbar weder die Expression noch, zum gewählten Zeitpunkt von 8 h, die enzymatische Aktivität der ILK in RLE-6TN Zellen. Um eine

Beteiligung der ILK an der CB-induzierten Aktivierung von AKT und ERK1/2 mit Hilfe zusätzlicher Daten ausschließen zu können, wurde im Anschluss eine dominant-negative Überexpression der ILK mit Hilfe einer Kinase-inaktiven ILK-Mutante angestrebt.

### 3.4.2.1 Herstellung einer Kinase-inaktiven Mutante der ILK

Um den Effekt einer dominant-negativen Überexpression der ILK in RLE-6TN Zellen näher zu analysieren, wurde eine Mutante hergestellt, bei der in der Subdomäne VIII der Kinase an Position 359 ein AS-Austausch von Glutaminsäure zu Lysin (E359K) vorliegt. Dabei führt diese Mutation zu einer Hemmung der enzymatischen Aktivität der ILK [Persad *et al.*, 2001].



**Abb. 3.17:** Schematische Darstellung der Konstruktion der Kinase-inaktiven ILK-Mutante.

Die Strategie zur Konstruktion der ILK-Mutante ist in Abb. 3.17 schematisch zusammengefasst. So wurde zunächst die cDNA für die native ILK durch RT-PCR [vgl. 2.2.4.3] aus der Gesamt-RNA [vgl. 2.2.4.2] von RLE-6TN Zellen isoliert. Die Amplifizierung der cDNA [vgl. 2.2.4.3] für die ILK erfolgte dabei mit den Oligonukleotiden ILK-Start und ILK-Stop [vgl. 2.1.11]. Das PCR-Produkt wurde durch eine TA-Klonierung [vgl. 2.2.4.5] in den Vektor pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup> [vgl. 2.1.9] eingebracht. Das resultierende Plasmid pCRII-ILK-25/8

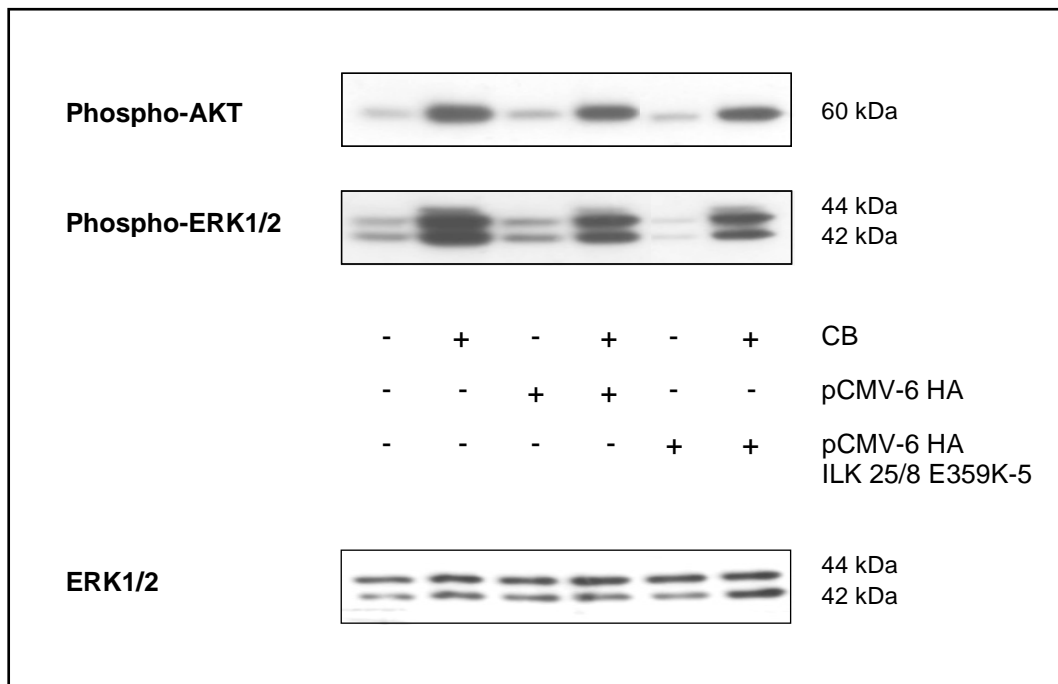
[vgl. 2.1.10] diene im nächsten Schritt als Matrize für eine ortsgerichtete Mutagenese [vgl. 2.2.4.6], bei der mittels der Primer ILKE359Kfwd und ILKE359Krev [vgl. 2.1.11] das kodierende Triplet für die Glutaminsäure gegen das Triplet für Lysin ausgetauscht wurde. Aus dem daraus resultierenden Plasmid pCRII-ILK-25/8 E359K [vgl. 2.1.10] wurde die mutierte cDNA für die ILK (E359K) durch Restriktion mit der Endonuklease *EcoRI* isoliert und in den Expressionsvektor pCMV-6 HA [vgl. 2.1.9] umkloniert. Das so konstruierte Plasmid pCMV-6 HA ILK 25/8 E359K-5 [vgl. 2.1.10] wurde durch Sequenzierung [vgl. 2.2.4.7] verifiziert und konnte somit für die dominant-negative Überexpression der ILK in RLE-6TN Zellen eingesetzt werden.

### 3.4.2.2 Dominant-negative Überexpression der ILK

Im Folgenden wurde durch die dominant-negative Überexpression der ILK in RLE-6TN Zellen eine Beteiligung dieser Kinase an der CB-induzierten Aktivierung von AKT und ERK1/2 untersucht.

Dazu wurden die RLE-6TN Zellen bei einer Konfluenz von 40 % mit dem Plasmid pCMV-6 HA ILK 25/8 E359K-5 [vgl. 2.1.10 und 3.4.2.1] für die Kinase-inaktive ILK-Mutante sowie mit dem Leervektor pCMV-6 HA [vgl. 2.1.9] transfiziert. Nach einer 20-stündigen Inkubation in Nährmedium [vgl. 2.2.1.1] wurden die Zellen in der Ruhephase arretiert [vgl. 3.1] und im Anschluss für 8 h mit  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB [vgl. 3.1 und 3.2.5] belastet. Die Phosphorylierung von AKT und ERK1/2 in Proteinextrakten transfizierter Zellen wurde wiederum mit Hilfe phosphospezifischer Antikörper im Western Blot untersucht [vgl. 3.3.2]. Zusätzlich wurde die Gesamtmenge an exprimierter ERK1 und ERK2 als Ladekontrolle detektiert. Um die Effizienz der dominant-negativen Überexpression der ILK-Mutante in den RLE-6TN Zellen zu überprüfen, wurde die enzymatische Aktivität der ILK nach der Transfektion überprüft. Dabei zeigten die mit der Kinase-inaktiven ILK-Mutante transfizierten Zellen eine deutliche Abnahme in der Gesamt-Aktivität der ILK [Inka Gallitz, Institut für Umweltmedizinische Forschung, unveröffentlichte Ergebnisse].

Die transiente Transfektion der Zellen mit dem Leervektor zeigte keinen Effekt auf die Phosphorylierung von AKT am Ser<sup>473</sup> in den CB- und PBS-behandelten Proben [vgl. 3.18]. Auch die dominant-negative Überexpression der ILK bewirkte keine Veränderungen in der CB-induzierten Phosphorylierung von AKT sowie der Phosphorylierung in den Kontrollen mit PBS. Gleichfalls waren nach der Transfektion keine Effekte auf die Phosphorylierung und Expression von ERK1 und ERK2 zu beobachten.



**Abb. 3.18:** Einfluss der Kinase-inaktiven ILK-Mutante auf die CB-induzierte Phosphorylierung von AKT und ERK1/2: Belastung von RLE-6TN Zellen für 8 h mit  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB nach der Transfektion der Zellen mit dem Plasmid pCMV-6 HA ILK 25/8 E359K-5 [0,25  $\mu\text{g}$ ] und der entsprechenden Leervektor-Kontrolle pCMV-6 HA [0,25  $\mu\text{g}$ ]. Repräsentative Western Blots von Proteinextrakten (5  $\mu\text{g}$ ) aus transfizierten Zellen und den entsprechenden Kontrollen (10 % SDS-PAGE, Phospho-AKT (Ser<sup>473</sup>) polyklonaler Antikörper, Phospho-p44/42 MAP-Kinase (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>) polyklonaler Antikörper, p44/42 MAP-Kinase polyklonaler Antikörper 1 : 1000, HRP-gekoppelter Sekundär-Antikörper 1 : 2000).

Auch die Daten der dominant-negativen Überexpression der ILK weisen darauf hin, dass die ILK nicht an der CB-induzierten Aktivierung von AKT und ERK1/2 beteiligt ist. Gemeinsam mit den unter 3.4.2 gewonnenen Erkenntnissen, dass weder die Expression noch die enzymatische Aktivität der ILK durch ultrafeine CB-Partikel beeinflusst werden, scheint eine Rolle der ILK bei der Feinstaub-induzierten Signaltransduktion somit eher unwahrscheinlich.

### 3.5 Beteiligung der PI3-Kinase an der CB-induzierten Signaltransduktion

Somit wurde durch verschiedene Versuchsansätze gezeigt, dass die in den Fokalkontakten lokalisierten Proteinkinasen FAK und ILK wahrscheinlich nicht an der Feinstaub-induzierten Signaltransduktion beteiligt sind. Im nächsten Schritt wurde daher untersucht, welches zytoplasmatische Signalprotein stattdessen durch ultrafeine CB-Partikel aktiviert werden kann. Dabei wurde das Hauptaugenmerk auf die PI3-Kinase gelegt, da diese Proteinkinase

für die Aktivierung von AKT essentiell ist [Velling *et al.*, 2004; Gary *et al.*, 2003]. Zudem wird der an der Zellmembran lokalisierten PI3-Kinase auch eine Funktion bei der Integrin-vermittelten Aktivierung von MAP-Kinasen zugeschrieben [Vanhaesebroeck *et al.*, 1997]. Daher wurde zunächst untersucht, ob die PI3-Kinase auch an der CB-induzierten Aktivierung von AKT und ERK1/2 beteiligt ist.

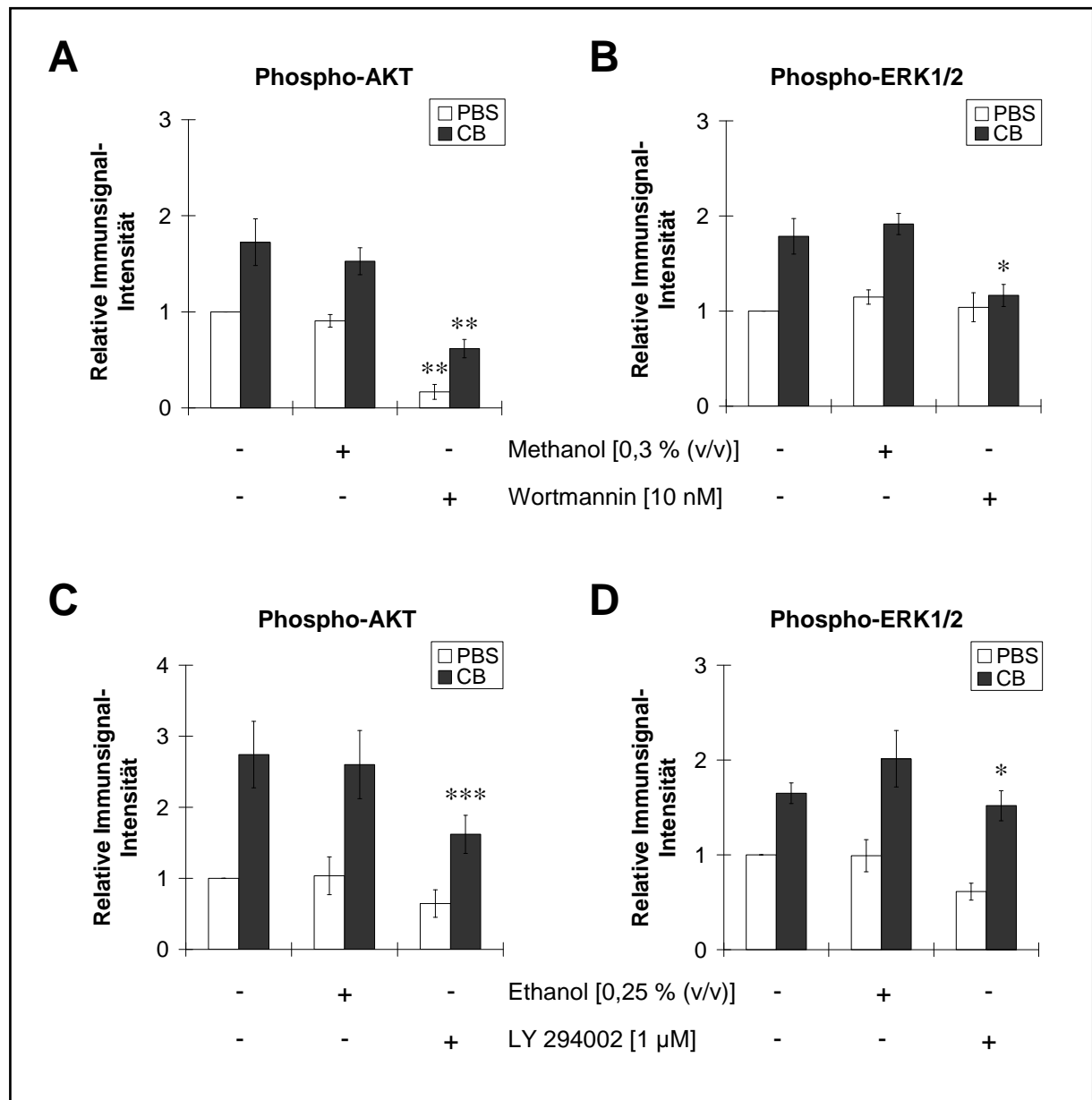
Hierzu wurde die PI3-Kinase durch die Bindung der spezifischen Inhibitoren Wortmannin und LY 294002 an die ATP-Bindungsstelle der katalytischen Untereinheit gehemmt [vgl. 2.1.5]. Der irreversible Inhibitor Wortmannin wurde in einer Konzentration von 10 nM eingesetzt, wobei Methanol in einer Endkonzentration von 0,3 % (v/v) als Lösungsmittelkontrolle diente. Bei dem reversiblen Inhibitor LY 294002 betrug die Konzentration 1  $\mu$ M, während die entsprechenden Lösungsmittelkontrollen mit 0,25 % (v/v) Ethanol belastet wurden.

Bei den Untersuchungen wurden die RLE-6TN Zellen für 30 min mit den Inhibitoren bzw. den entsprechenden Lösungsmittelkontrollen inkubiert und anschließend für 8 h mit 5  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> CB [vgl. 3.1 und 3.2.5] belastet. Im Anschluss wurde die Phosphorylierung von ERK1/2 und AKT mit Hilfe phospho-spezifischer Antikörper im Western Blot bestimmt [vgl. 3.3.2].

Während die Lösungsmittelkontrollen für beide Inhibitoren in den PBS- und CB-behandelten Proben keine Veränderungen in der Phosphorylierung von AKT am Ser<sup>473</sup> bewirkten, führte die Vorbehandlung mit Wortmannin zu einer signifikanten Abnahme der Phosphorylierung, wobei die CB-induzierte Phosphorylierung um 60 % (n = 3, p < 0,005) und die Phosphorylierung in den Kontrollen mit PBS um 78 % (n = 3, p < 0,005) reduziert wurde [vgl. Abb. 3.19 A]. Auch die Vorbehandlung mit LY 294002 resultierte in einer signifikanten Abnahme der CB-induzierten Phosphorylierung von AKT um 39 % (n = 3, p < 0,0005), sowie einer geringen, jedoch nicht signifikanten Abnahme der Phosphorylierung in den PBS-behandelten Kontrollen [vgl. Abb. 3.19 C].

Der deutlich schwächere Effekt dieses Inhibitors lässt sich dabei durch die Tatsache erklären, dass es sich hierbei um eine reversible Hemmung handelt, während Wortmannin die PI3-Kinase irreversibel blockiert.

Bei der Untersuchung von ERK1 und ERK2 wurden mit den Lösungsmittelkontrollen Methanol und Ethanol ebenfalls keine signifikanten Veränderungen in der Phosphorylierung der Signalproteine beobachtet [vgl. Abb. 3.19 B und D]. Die Vorbehandlung mit Wortmannin führte dagegen zu einer signifikanten Abnahme der CB-induzierten Phosphorylierung von ERK1/2 um 37 % (n = 3, p < 0,05), sowie einer geringen, jedoch nicht signifikanten Abnahme der Phosphorylierung in den PBS-behandelten Proben [vgl. Abb. 3.19 B]. Entsprechend wurde auch nach der Vorbehandlung mit LY 294002 eine signifikante Abnahme der CB-induzierten Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 um 25 % (n = 3, p < 0,05) beobachtet, während die Phosphorylierung in den Kontrollen mit PBS geringfügig, aber nicht signifikant reduziert wurde [vgl. Abb. 3.19 D].



**Abb. 3.19:** Einfluss von PI3-Kinase Inhibitoren auf die CB-induzierte Phosphorylierung von (A, C) AKT und (B, D) ERK1/2: Belastung von RLE-6TN Zellen für 8 h mit  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB nach 30-minütiger Vorbehandlung mit (A - B) Wortmannin [10 nM] bzw. Methanol [0,3 % (v/v) Endkonzentration] als Lösungsmittelkontrolle oder (C - D) LY 294002 [1  $\mu\text{M}$ ] bzw. Ethanol [0,25 % (v/v) Endkonzentration]. (A - D) Quantitative densitometrische Auswertung der Western Blots (10 % SDS-PAGE, 5  $\mu\text{g}$  Protein, Phospho-p44/42 MAP-Kinase (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>) polyklonaler Antikörper, Phospho-AKT (Ser<sup>473</sup>) polyklonaler Antikörper 1 : 1000, HRP-gekoppelter Sekundär-Antikörper 1 : 2000) von drei unabhängigen Experimenten, wobei jedes Einzelexperiment als Doppelbestimmung durchgeführt wurde (Mittelwerte  $\pm$  S.E.M., n = 3). \*: p < 0,05, \*\*: p < 0,005, \*\*\*: p < 0,0005, signifikanter Unterschied zu den jeweiligen Lösungsmittelkontrollen.

Somit werden scheinbar sowohl die CB-induzierte Aktivierung von AKT als auch die Aktivierung von ERK1/2 durch die PI3-Kinase vermittelt, die damit offenbar eine zentrale Rolle bei der Feinstaub-induzierten Signaltransduktion einnimmt.

### 3.6 AKT-vermittelte Aktivierung von ERK1/2

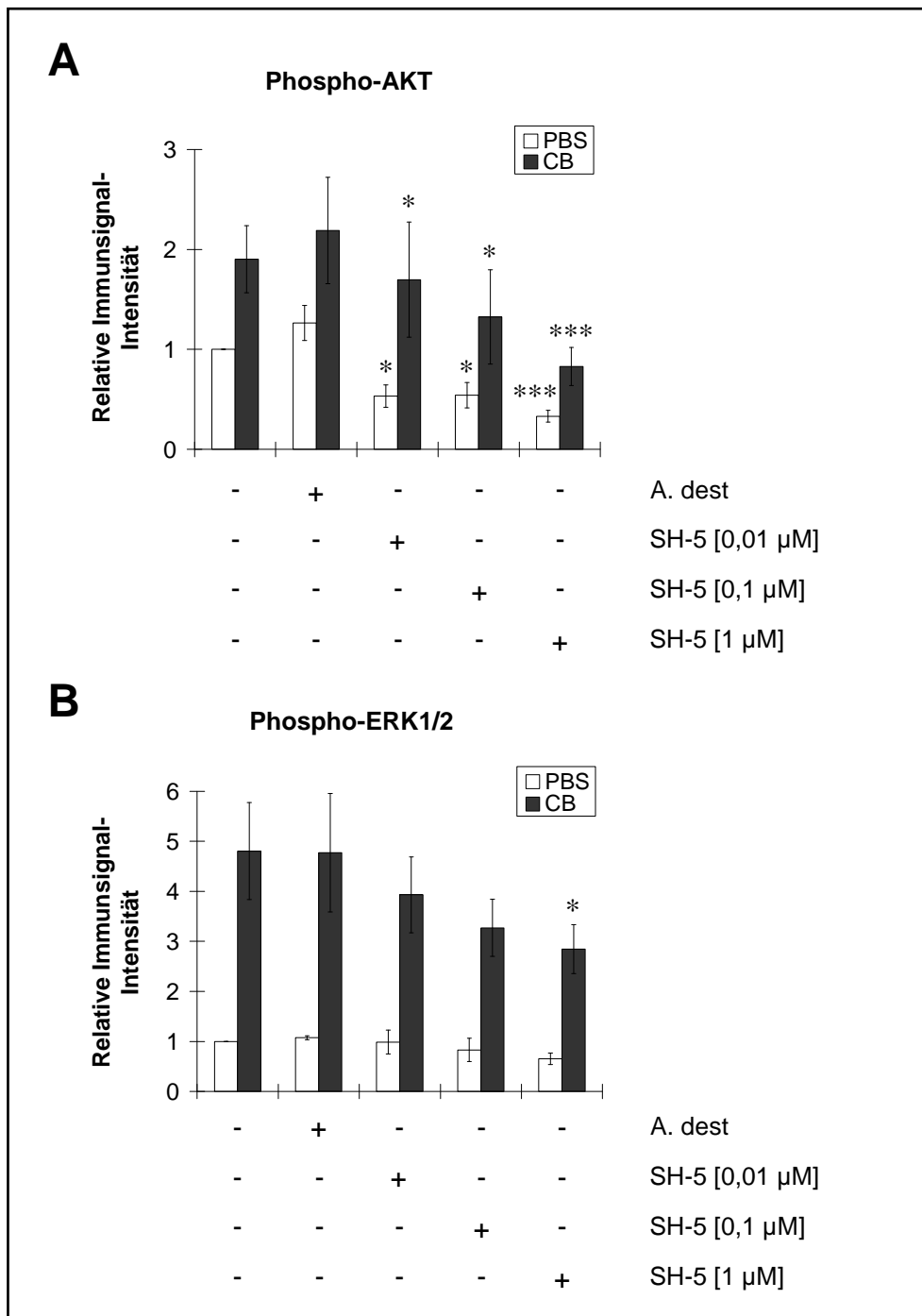
Gemäß den bisherigen Daten der vorliegenden Arbeit werden Effekte der Belastung von RLE-6TN Zellen mit ultrafeinem CB durch die Zelloberflächen-Rezeptoren EGF-R und  $\beta_1$ -Integrine vermittelt und resultieren über die Aktivierung der PI3-Kinase in der simultanen Phosphorylierung der Signalproteine AKT und ERK1/2. Bislang ist allerdings unklar, ob die PI3-Kinase dabei zwei voneinander unabhängige Signalwege induziert, oder ob AKT und ERK1/2 zu einem Signalweg mit dem gleichen Endpunkt gehören. Daher wurde im Folgenden untersucht, ob AKT an der CB-induzierten Aktivierung von ERK1 und ERK2 beteiligt ist.

Hierfür wurde der spezifische AKT-Inhibitor SH-5 eingesetzt, der die Phosphorylierung von AKT am Ser<sup>473</sup> blockiert, wodurch die Kinase-Aktivität gehemmt wird [vgl. 2.1.5].

Bei den Untersuchungen wurden die RLE-6TN Zellen für 1 h mit dem Hemmstoff in den Konzentrationen 0,01 – 1  $\mu$ M, bzw. A. dest als Lösungsmittelkontrolle inkubiert und anschließend für 8 h mit 5  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> CB [vgl. 3.1 und 3.2.5] belastet. Im Anschluss wurde die Phosphorylierung von ERK1/2 mit Hilfe phospho-spezifischer Antikörper im Western Blot bestimmt [vgl. 3.3.2]. Als Positivkontrolle für die Funktion des Inhibitors wurde zusätzlich die Phosphorylierung von AKT am Ser<sup>473</sup> untersucht.

Erwartungsgemäß zeigte die Positivkontrolle nach der Vorbehandlung mit SH-5 eine signifikante Abnahme der Phosphorylierung von AKT, wohingegen die Lösungsmittelkontrolle keinen Effekt zeigte [vgl. Abb. 3.20 A]. Die Phosphorylierung von AKT in den CB-behandelten Proben war dabei in Abhängigkeit von der Inhibitor-Dosis um 23 % (n = 3, p < 0,05) bis 64 % (n = 3, p < 0,0005) reduziert, während in den Kontrollen mit PBS eine Abnahme von 62 % (n = 3, p < 0,05) bis 77 % (n = 3, p < 0,0005) beobachtet wurde.

Bei der Untersuchung von ERK1 und ERK2 wurde in den Lösungsmittelkontrollen ebenfalls keine Veränderung in der Phosphorylierung der Signalproteine beobachtet [vgl. Abb. 3.20 B]. Allerdings bewirkte auch hier die Vorbehandlung mit dem AKT-Inhibitor eine Dosis-abhängige Abnahme der CB-induzierten Phosphorylierung von ERK1 und ERK2, die bei der höchsten Konzentration des Inhibitors [1  $\mu$ M] mit 42 % (n = 4, p < 0,05) als signifikant beschrieben werden konnte. Im Gegensatz dazu hatte der Hemmstoff keinen Einfluss auf die Phosphorylierung in den PBS-behandelten Kontrollen.



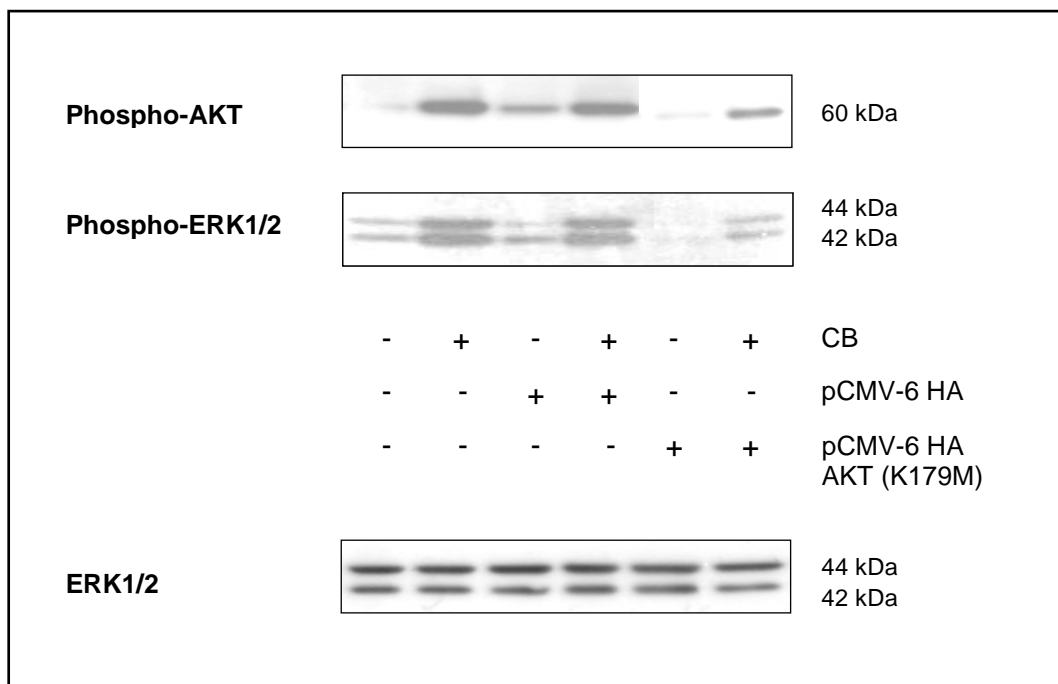
**Abb. 3.20:** Einfluss des AKT-Inhibitors auf die CB-induzierte Phosphorylierung von (A) AKT und (B) ERK1/2: Belastung von RLE-6TN Zellen für 8 h mit  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB nach einstündiger Vorbehandlung mit SH-5 [0,01 - 1  $\mu\text{M}$ ] bzw. A. dest. (A) und (B) Quantitative densitometrische Auswertung der Western Blots (10 % SDS-PAGE, 5  $\mu\text{g}$  Protein, Phospho-p44/42 MAP-Kinase (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>) polyklonaler Antikörper, Phospho-AKT (Ser<sup>473</sup>) polyklonaler Antikörper 1 : 1000, HRP-gekoppelter Sekundär-Antikörper 1 : 2000) von drei unabhängigen Experimenten, wobei jedes Einzelexperiment als Doppelbestimmung durchgeführt wurde (Mittelwerte  $\pm$  S.E.M., n = 3). \*: p < 0,05, \*\*\*: p < 0,0005, signifikanter Unterschied zur jeweiligen Lösungsmittelkontrollen.



Demnach scheint AKT an der CB-induzierten Aktivierung von ERK1 und ERK2 beteiligt zu sein. Um dieses Erkenntnis weiter zu untermauern, erfolgte im Folgenden eine dominant-negative Überexpression von AKT in RLE-6TN Zellen.

### 3.6.1 Dominant-negative Überexpression von AKT

Für die dominant-negative Überexpression wurde das, von Dr. Thomas Franke (Columbia University, New York, USA) freundlicherweise zur Verfügung gestellte, Plasmid pCMV-6 HA AKT (K179M) [vgl. 2.1.10] verwendet, welches für die mutierte AKT-Kinase mit dem AS-Austausch Lysin zu Methionin (K179M) kodiert. Durch die Mutation K179M in der ATP-Bindungsstelle von AKT gilt die Kinase-Aktivität des Proteins als gehemmt [Franke *et al.*, 1995].



**Abb. 3.21:** Einfluss der Kinase-inaktiven AKT-Mutante auf die CB-induzierte Phosphorylierung von AKT und ERK1/2: Belastung von RLE-6TN Zellen für 8 h mit  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB nach der Transfektion mit dem Plasmid pCMV-6 HA AKT (K179M) [0,25  $\mu\text{g}$ ] und der entsprechenden Leervektor-Kontrolle pCMV-6 HA [0,25  $\mu\text{g}$ ]. Repräsentative Western Blots von Proteinextrakten (5  $\mu\text{g}$ ) aus transfizierten Zellen und den entsprechenden Kontrollen (10 % SDS-PAGE, Phospho-AKT (Ser<sup>473</sup>) polyklonaler Antikörper, Phospho-p44/42 MAP-Kinase (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>) polyklonaler Antikörper, p44/42 MAP-Kinase polyklonaler Antikörper 1 : 1000, HRP-gekoppelter Sekundär-Antikörper 1 : 2000).

Die RLE-6TN Zellen wurden mit dem Plasmid pCMV-6 HA AKT (K179M) sowie dem Leervektor pCMV-6 HA [vgl. 2.1.9] transfiziert [vgl. 3.4.2.2] und anschließend für 8 h mit  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB [vgl. 3.1 und 3.2.5] belastet. Die Phosphorylierung von ERK1/2 wurde wiederum mit Hilfe phospho-spezifischer Antikörper im Western Blot bestimmt [vgl. 3.3.2]. Als Kontrolle wurde zusätzlich die Phosphorylierung von AKT untersucht, während das Gesamtprotein von ERK1/2 als Ladekontrolle diente.

Erwartungsgemäß zeigte die Positivkontrolle in den dominant-negativ transfizierten Zellen eine deutliche Abnahme der CB-induzierten Phosphorylierung von AKT am Ser<sup>473</sup>, während bei der Kontrolle mit PBS nur eine geringfügige Veränderung beobachtet wurde [vgl. Abb. 3.21]. Im Gegensatz dazu hatte die transiente Transfektion des Vektors pCMV-6 HA sowohl in den Kontrollen mit PBS als auch den CB-behandelten Proben keinen Effekt auf die Phosphorylierung von AKT.

Bei der Analyse von ERK1 und ERK2 zeigten die mit dem Leervektor transfizierten Zellen ebenfalls keine Veränderungen in der Phosphorylierung der Signalproteine. Allerdings führte auch hier die dominant-negative Überexpression von AKT zu einer Abnahme der CB-induzierten Phosphorylierung von ERK1/2, während die AKT-Mutante keinen Einfluss auf die Phosphorylierung in den Kontrollen mit PBS nahm.

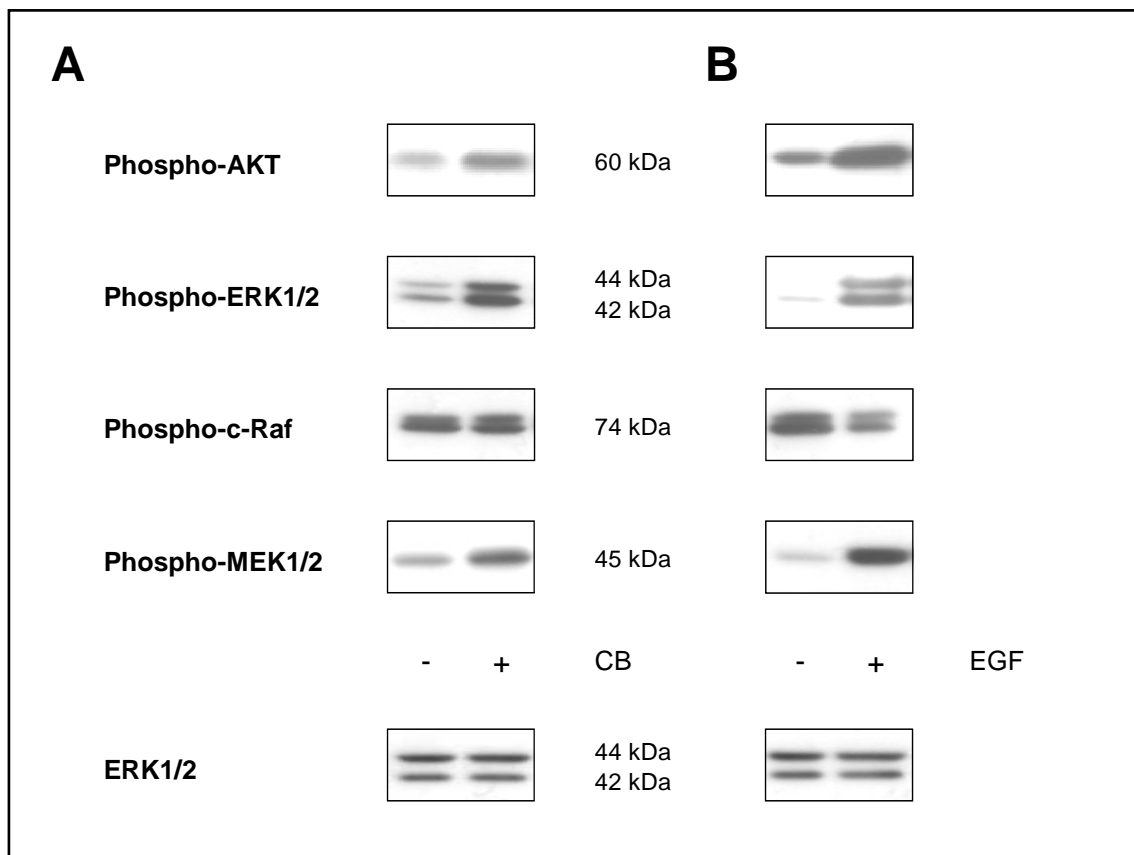
Demnach zeigen auch diese Daten zur dominant-negativen Überexpression von AKT, dass diese Proteinkinase die CB-induzierte Aktivierung von ERK1 und ERK2 vermittelt. Dabei ist an dieser Stelle jedoch noch unklar, ob diese Aktivierung direkt oder indirekt erfolgt.

### **3.7 Analyse der Effekte von CB auf die Raf/MEK/ERK-Kaskade**

Gemäß der gewonnenen Daten der vorliegenden Arbeit besitzt die Proteinkinase AKT offenbar eine zentrale Funktion bei der CB-induzierten Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 [vgl. 3.6 und 3.6.1]. Allerdings ist noch unklar, wie diese Aktivierung vermittelt wird. ERK1/2 werden vielfach durch MEK1 und MEK2 phosphoryliert, während die Aktivierung von MEK1/2 wiederum durch die MEK c-Raf erfolgt [vgl. 1.3]. Um zu überprüfen, ob diese Raf/MEK/ERK-Kaskade auch an der Feinstaub-induzierten Signaltransduktion beteiligt ist, wurde zunächst der Einfluss ultrafeiner CB-Partikel auf die Phosphorylierung der einzelnen Signalproteine dieser Kaskade untersucht.

Durch die Belastung von RLE-6TN Zellen für 8 h mit  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB [vgl. 3.1 und 3.2.5] konnte dabei die Phosphorylierung der Signalproteine zu dem Zeitpunkt bestimmt werden, bei dem auch AKT und ERK1/2 signifikant phosphoryliert vorliegen. Als Positivkontrolle für die Aktivierung der Raf/MEK/ERK-Kaskade wurden die Zellen für 5 min mit 100 ng/ml EGF

behandelt [vgl. 2.1.5]. Die Phosphorylierung der einzelnen Signalproteine wurde mit Hilfe phospho-spezifischer Antikörper im Western Blot untersucht. Für MEK1/2 wurde dabei, ähnlich wie bei den MAP-Kinasen, ein Antikörper eingesetzt, der nur bei einer dualen Phosphorylierung an den spezifischen Serin-Resten bindet [vgl. 3.2.1]. Da diese Phosphorylierung essentiell für die Aktivierung von MEK1/2 ist, spiegelt eine Zunahme der Phosphorylierung dementsprechend auch eine Aktivierung dieser Signalproteine wider. Die Phosphorylierung von c-Raf wurde hingegen mit einem Antikörper untersucht, der nur dann an das Signalprotein bindet, wenn eine Phosphorylierung an einer inhibitorischen Phosphorylierungsstelle vorliegt. Daher kann eine reduzierte Phosphorylierung mit der Aktivierung von c-Raf gleichgesetzt werden [Cobb, 1999; Mason *et al.*, 1999; Alessi *et al.*, 1995]. Als Ladekontrolle wurde zusätzlich die Gesamtmenge an exprimierter ERK1 und ERK2 detektiert.



**Abb. 3.22:** Einfluss von (A) CB [5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ] und (B) EGF [100 ng/ml] auf die Phosphorylierung von AKT, ERK1/2, c-Raf und MEK1/2. (A) und (B) Repräsentative Western Blots von Proteinextrakten (5  $\mu\text{g}$ ) behandelter Zellen und den entsprechenden Kontrollen (10 % SDS-PAGE, Phospho-AKT (Ser<sup>473</sup>) polyklonaler Antikörper, Phospho-p44/42 MAP-Kinase (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>) polyklonaler Antikörper, Phospho-Raf (Ser<sup>259</sup>) polyklonaler Antikörper, Phospho-MEK1/2 (Ser<sup>217/221</sup>) monoklonaler Antikörper, p44/42 MAP-Kinase polyklonaler Antikörper 1 : 1000; HRP-gekoppelter Sekundär-Antikörper 1 : 2000).

Die Behandlung der RLE-6TN Zellen mit CB zeigte dabei, neben der erwarteten Zunahme der Phosphorylierung von AKT und ERK1/2, auch eine erhöhte Phosphorylierung von MEK1/2 [vgl. Abb. 3.22 A]. Allerdings wurden keine Veränderungen in der Phosphorylierung von c-Raf beobachtet.

Bei der Positivkontrolle bewirkte die Behandlung mit EGF erwartungsgemäß eine Zunahme der Phosphorylierung von AKT, ERK1/2 und MEK1/2, sowie eine reduzierte Phosphorylierung und damit eine Aktivierung von c-Raf [vgl. Abb. 3.22 B].

Somit können ultrafeine CB-Partikel in RLE-6TN Zellen nach 8 h eine Phosphorylierung von MEK1 und MEK2 induzieren, ohne dabei einen Einfluss auf c-Raf auszuüben.

### 3.7.1 MEK1/2 vermittelte Aktivierung von ERK1/2

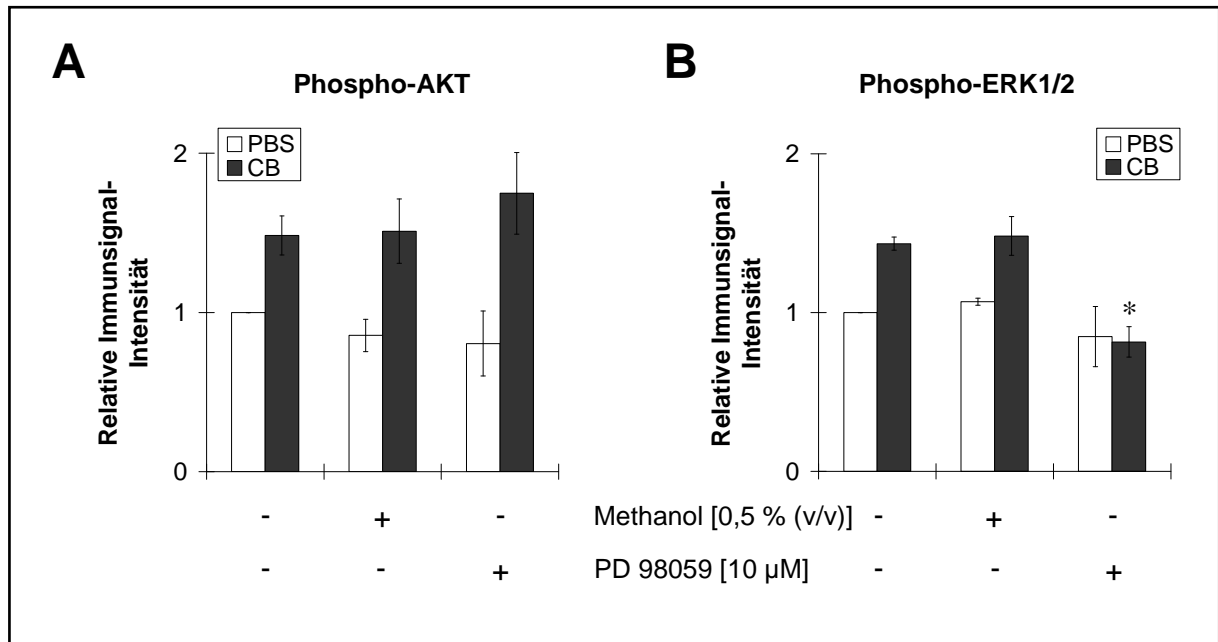
Nachdem gezeigt wurde, dass MEK1/2, im Gegensatz zu c-Raf, durch ultrafeine CB-Partikel aktiviert werden können, wurde im Folgenden untersucht, ob diese Signalproteine auch direkt an der CB-induzierten Aktivierung von AKT und/oder ERK1/2 beteiligt sind.

Hierzu wurde die Aktivität von MEK1/2 durch den allosterischen Inhibitor PD 98059 gehemmt, der in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eingesetzt wurde [vgl. 2.1.5]. Als Lösungsmittelkontrolle diente Methanol in einer Endkonzentration von 0,5 % (v/v).

Bei den Untersuchungen wurden die RLE-6TN Zellen für 1 h mit dem Inhibitor bzw. der Lösungsmittelkontrolle inkubiert und anschließend für 8 h mit 5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB [vgl. 3.1 und 3.2.5] belastet. Im Anschluss wurde die Phosphorylierung von ERK1/2 und AKT mit Hilfe phosphospezifischer Antikörper im Western Blot bestimmt [vgl. 3.3.2].

Bei der quantitativen Auswertung der Immunsignale zeigte sich, dass die Lösungsmittelkontrolle keine Veränderungen in der Phosphorylierung von AKT am Ser<sup>473</sup> bewirkte [vgl. Abb. 3.23 A]. Im Gegensatz dazu führte die Vorbehandlung mit PD 98059 zu einer geringfügigen, jedoch nicht signifikanten Zunahme der CB-induzierten Phosphorylierung, wohingegen die Phosphorylierung in den Kontrollen mit PBS konstant blieb.

Auch bei der Untersuchung von ERK1 und ERK2 hatte die Lösungsmittelkontrolle keinen Einfluss auf die Phosphorylierung der Signalproteine in den PBS- und CB-behandelten Proben [vgl. Abb. 3.23 B]. Allerdings wurde nach der Vorbehandlung mit PD 98059 eine signifikante Abnahme der CB-induzierten Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 um 47 % ( $n = 3$ ,  $p < 0,05$ ) beobachtet. Auch die Kontrollen mit PBS zeigten in Gegenwart des Hemmstoffs eine verminderte Phosphorylierung, die jedoch nicht als signifikant ermittelt wurde.



**Abb. 3.23:** Einfluss des MEK-Inhibitors auf die CB-induzierte Phosphorylierung von (A) AKT und (B) ERK1/2: Belastung von RLE-6TN Zellen für 8 h mit  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB nach einstündiger Vorbehandlung mit PD 98059 [10  $\mu\text{M}$ ] bzw. Methanol [0,5 % (v/v) Endkonzentration] als Lösungsmittelkontrolle. (A) und (B) Quantitative densitometrische Auswertung der Western Blots (10 % SDS-PAGE, 5  $\mu\text{g}$  Protein, Phospho-p44/42 MAP-Kinase (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>) polyklonaler Antikörper, Phospho-AKT (Ser<sup>473</sup>) polyklonaler Antikörper 1 : 1000, HRP-gekoppelter Sekundär-Antikörper 1 : 2000) von drei unabhängigen Experimenten, wobei jedes Einzelexperiment als Doppelbestimmung durchgeführt wurde (Mittelwerte  $\pm$  S.E.M., n = 3). \*: p < 0,05, signifikanter Unterschied zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle.

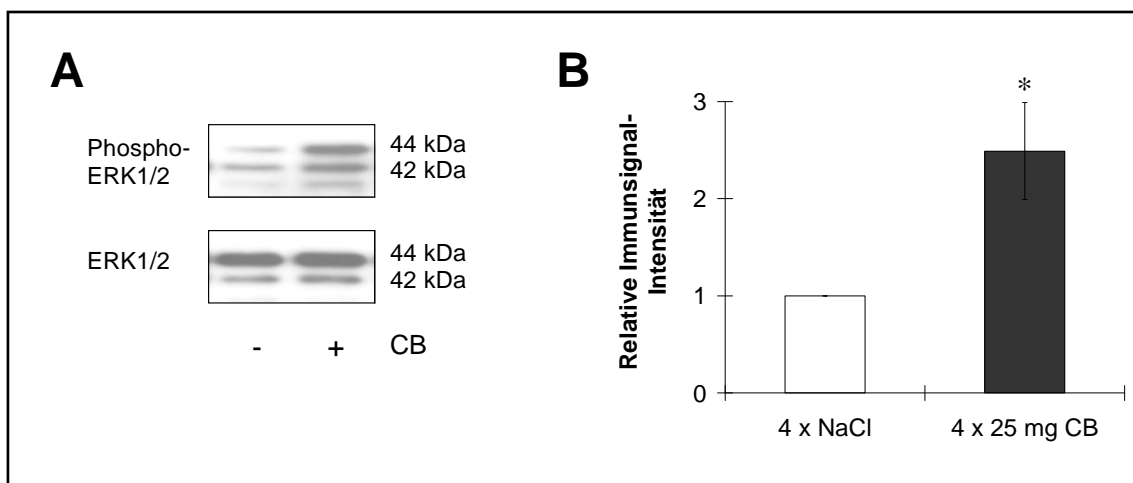
Demnach scheinen MEK1 und MEK2 an der CB-induzierten Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 beteiligt zu sein, ohne einen Einfluss auf die Proteinkinase AKT auszuüben. In der Feinstaub-induzierten Signaltransduktion sind MEK1/2 daher wahrscheinlich unterhalb von AKT aber oberhalb von ERK1/2 einzuordnen. Allerdings ist durch diese Daten nicht auszuschließen, dass AKT auch eine direkte Aktivierung von ERK1 und ERK2, ohne die Beteiligung von MEK1/2, bewirken kann.

### 3.8 *In vivo* Effekte von CB

Bis hierher liefern die Daten der vorliegenden Arbeit einen guten Überblick über die, an der Feinstaub-induzierten Signaltransduktion beteiligten, Komponenten. Demnach führen ultrafeine CB-Partikel zu einer EGF-R vermittelten Phosphorylierung von JNK1 und JNK2. Des Weiteren induzieren EGF-R und  $\beta_1$ -Integrine einen Signalweg, der unter der Beteiligung von PI3-Kinase und AKT in der Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 resultiert.

Die Untersuchungen wurden mit RLE-6TN Zellen, d.h. einem *in vitro* Versuchssystem durchgeführt. Im Folgenden wurde daher überprüft, ob der CB-induzierte PI3-Kinase/AKT/ERK-Signalweg auch *in vivo* von Bedeutung ist.

Dazu wurde der Einfluss ultrafeiner CB-Partikel auf die Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 in Lungengewebe [vgl. 2.1.6] von Big Blue<sup>®</sup>-Ratten (Typ Fischer 344) nach chronischer Feinstaub-Belastung mittels intratrachealer Instillation bestimmt.



**Abb. 3.24:** CB-induzierte Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 in Lungengewebe von Big Blue<sup>®</sup>-Ratten (Typ Fischer 344) nach intratrachealer Instillation [4 x 25 mg CB/kg Körpergewicht, suspendiert in NaCl]. (A) Repräsentative Western Blots von Proteinextrakten (2,5 µg) CB-behandelter Proben und den entsprechenden Kontrollen mit NaCl (10 % SDS-PAGE, Phospho-p44/42 MAP-Kinase (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>) polyklonaler Antikörper, p44/42 MAP-Kinase polyklonaler Antikörper 1 : 1000, HRP-gekoppelter Sekundär-Antikörper 1 : 2000). (B) Quantitative densitometrische Auswertung der Western Blots von sieben Tieren (Mittelwerte ± S.E.M., n = 7). \*: p < 0,05.

In dem Tierversuch, der unabhängig von der vorliegenden Arbeit mit einer anderen Fragestellung durchgeführt wurde, wurden sieben Tieren über einen Zeitraum von vier Wochen einmal wöchentlich mit 25 mg CB/kg Körpergewicht, suspendiert in NaCl-Lösung, belastet, während die Behandlung der Kontrollgruppe nur mit NaCl-Lösung erfolgte [Dr.

Klaus Unfried & Dr. Roel Schins, Institut für Umweltmedizinische Forschung, persönliche Mitteilung].

Nach der Tötung der Tiere erfolgte eine Lungenlavage und anschließend wurde das Lungengewebe präpariert. Die extrahierten Proteine aus dem Lungengewebe [vgl. 2.2.5.1] wurden mittels einer SDS-PAGE [vgl. 2.2.5.5] nach dem Molekulargewicht aufgetrennt und beim Western Blot [vgl. 2.2.6.1] auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 in diesen Proben wurde mit Hilfe phospho-spezifischer Antikörper untersucht, während die Expression dieser Signalproteine durch spezifische Antikörper gegen das Gesamtprotein nachgewiesen wurde. Abschließend wurden die Immunsignale densitometrisch quantifiziert [vgl. 2.2.8], wobei die Phosphorylierung direkt auf das exprimierte Gesamtprotein von ERK1 und ERK2 bezogen wurde, um mögliche Schwankungen zwischen den einzelnen Tieren sowie den einzelnen Lungengeweben auszuschließen.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe bewirkte die Behandlung der Ratten mit CB eine signifikante, 2,5fache Zunahme ( $n = 7$ ,  $p < 0,05$ ) der Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 [vgl. Abb. 3.24 A und B].

Somit induzieren ultrafeine CB-Partikel auch in Lungengeweben eine Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2. Dies ist ein erster Hinweis auf die *in vivo* Relevanz des beschriebenen CB-induzierten PI3-Kinase/AKT/ERK-Signalweges. Geplante Untersuchungen von ERK1/2 und weiteren Signalproteinen, wie z.B. PI3-Kinase und AKT, in Proteinextrakten aus Lungengeweben sowie Gewebeschnitten, werden in diesem Zusammenhang zukünftig eine genauere Aussage ermöglichen.

## 4. Diskussion

Inhalierbare granuläre Partikel induzieren eine Vielzahl an gesundheitsschädlichen Effekten, wie z.B. Erkrankungen der Atemwege, Herzkreislauf-Erkrankungen und ein erhöhtes Lungenkrebsrisiko. Die Induktion der einzelnen Krankheitsbilder hängt hauptsächlich von dem aerodynamischen Durchmesser der Partikel ab. Anhand von epidemiologischen Studien wurde dabei auf eine erhöhte Assoziation zwischen Erkrankungen und ultrafeinen Partikeln, d.h. Partikeln mit einem aerodynamischen Durchmesser  $< 0,1 \mu\text{m}$ , aufmerksam gemacht. In diesem Zusammenhang ist auch bekannt, dass ultrafeine Partikel, aufgrund der großen Oberfläche und der daraus resultierenden erhöhten biologischen Toxizität, pathogener sind als inhalierbare, aber nicht ultrafeine Partikel des gleichen Materials [Beck-Speier *et al.*, 2005; Donaldson *et al.*, 2005; Renwick *et al.*, 2004; Donaldson & Stone, 2003; Brown *et al.*, 2001; Stone *et al.*, 2000; Driscoll *et al.*, 1996]. Nach der Inhalation werden die ultrafeinen Partikel von einer Vielzahl an Zellen, wie z.B. Endothelzellen, Epithelzellen und Nervenzellen aufgenommen. Durch den Eintritt in den Blutkreislauf kommt es dabei nicht nur zu einer Exposition der Lunge, sondern auch zu einer Belastung anderer Organe, wie z.B. Herz, Gehirn, Milz und Leber [Donaldson *et al.*, 2005]. Unabhängig davon werden jedoch die Zellen des Lungenepithels als die klassischen Zielzellen inhalierter Partikel beschrieben [Hoet *et al.*, 2004]. Die Partikel induzieren dabei sowohl direkt als auch indirekt unterschiedliche Signalwege, die in der Ausbildung genotoxischer Effekte sowie Veränderungen in Apoptose und/oder Zellproliferation resultieren können [Albrecht *et al.*, 2004]. Die Art der Interaktionen zwischen Partikeln und Epithelzellen sowie die molekularen Mechanismen und die beteiligten Signalwege, die durch ultrafeine Partikel induziert werden, sind allerdings bis dato noch weitestgehend unverstanden.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit bestand daher in der näheren Charakterisierung dieser Partikel-induzierten Signaltransduktion, wobei Methoden der molekularen Biologie, der Proteinbiochemie und der Immunbiochemie zum Einsatz kamen. Das Hauptaugenmerk der Untersuchungen wurde hierbei auf Signalwege gelegt, die einen Einfluss auf Apoptose und/oder Zellproliferation nehmen können und demzufolge möglicherweise eine Rolle bei der Entwicklung maligner Lungenerkrankungen durch Feinstäube spielen.



#### 4.1 Alveolare Typ II Epithelzellen als *in vitro* Modellsystem

In der vorliegenden Arbeit wurde eine durch spontane Immortalisation entstandene alveolare Typ II Epithel-Zelllinie aus Ratten (RLE-6TN) als *in vitro* Versuchssystem verwendet [vgl. 2.1.7 und 3.1]. Bei diesem Zelltyp handelt es sich allgemein um die Haupt-Vorläuferzellen von Karzinomen, welche nach der Inhalation einer Überdosis schwer löslicher Partikel gebildet werden [Albrecht *et al.*, 2002]. Aufgrund dessen wird diese Zelllinie häufig für die Analyse von Partikel-induzierten Effekten auf Lungenzellen und die Rolle pulmonärer Epithelzellen bei der Entstehung von Lungenerkrankungen eingesetzt [Boulares *et al.*, 2002; Driscoll *et al.*, 1997; Driscoll *et al.*, 1995]. Die enorme Sensitivität gegenüber Partikeln lässt sich dabei durch die hohe proliferative Kapazität der Epithelzellen erklären, welche für die Reparatur des Lungengewebes und die Bewahrung der funktionalen Integrität der respiratorischen Region benötigt wird [Albrecht *et al.*, 2004]. Zusammen mit den alveolaren Typ I Epithelzellen dienen die Typ II Epithelzellen zudem als Permeabilitätsbarriere, um den Strom von Makromolekülen vom Interstitium in den alveolaren Raum zu limitieren.

Als eine Reaktion der RLE-6TN Zellen auf die Exposition mit Quarz-Partikeln wurde beispielsweise die Expression von Chemokinen beschrieben [Driscoll *et al.*, 1996; Driscoll *et al.*, 1995]. Dabei handelt es sich möglicherweise um eine adaptive Antwort der Epithelzellen, welche die Beseitigung der Partikel durch phagozytische Zellen fördern soll. In Bezug auf die *in vivo* Situation bedeutet dies, dass die Chemokine, aber auch Zytokine, in der Lunge eine wichtige Rolle bei der Bereitstellung von Makrophagen an lokale Entzündungs-Herde und Partikel-Depositionen spielen [Barlow *et al.*, 2005; Driscoll *et al.*, 1997].

Um die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse direkt mit den Beobachtungen anderer Studien vergleichen zu können, wurden die RLE-6TN Zellen gemäß den Literaturangaben kultiviert [Sydlik *et al.*, 2006; Becker *et al.*, 2002]. So wurde eine 20-stündige Inkubation in Hungermedium (0,5 % (v/v) FCS) durchgeführt [vgl. 2.2.1.4], wodurch die Zellen aufgrund der fehlenden Wachstumsfaktoren in der Ruhephase arretiert wurden. Da Partikel, ebenso wie Wachstumsfaktoren, möglicherweise Veränderungen im Zellzyklus verursachen können, wurde somit eine Überlagerung der jeweiligen Effekte verhindert und dementsprechend eine spezifische Detektion der Partikel-induzierten Endpunkte gewährleistet.

Der Einsatz einer Zelllinie sollte ferner sicherstellen, dass beobachtete Effekte nicht auf präparationsbedingte Schwankungen, wie sie von Primärzellen berichtet werden, zurückzuführen sind. Allerdings bleibt in diesem Zusammenhang zu berücksichtigen, dass geringfügige Unterschiede zwischen Zelllinien und Primärzellen auftreten können. So wurde beispielsweise bei Primärzellen, im Vergleich zu immortalisierten Zellen, eine höhere Sensitivität gegenüber Wasserstoffperoxid nachgewiesen [Carvalho *et al.*, 2004]. Um die mit

der RLE-6TN Zelllinie gewonnenen *in vitro* Daten zu validieren, wurde daher auch das entsprechende *in vivo* System überprüft. Dieses stand durch einen unabhängig von der vorliegenden Arbeit durchgeführten Tierversuch mit Ratten, die mittels intratrachealer Instillation mit Partikeln behandelt wurden, ebenfalls zur Verfügung [vgl. 2.1.6 und 3.8].

#### 4.2 Verbrennungsgenerierte ultrafeine Kohlenstoff-Partikel als Modellstaub

In der vorliegenden Arbeit wurden ultrafeine CB-Partikel (Printex 90), mit einem aerodynamischen Durchmesser von 14 nm, als Modellpartikel eingesetzt [vgl. 2.1.4 und 3.1]. Solche Partikel entstehen, wie die meisten ultrafeinen Partikel einschließlich DEP, bei Verbrennungsprozessen und repräsentieren somit eine natürliche Exposition, wie sie z.B. im Straßenverkehr vorkommt [Donaldson *et al.*, 2001]. Bei den CB-Partikeln handelt es sich um granuläre Kohlenstoff-Partikel, die in der Industrie unter genau kontrollierten aerodynamischen Bedingungen aus Kohlenwasserstoffen hergestellt und für eine Vielzahl an technischen Anwendungen verwendet werden. In der Toxikologie werden diese Partikel, aufgrund der geringen Kontaminationen mit Übergangsmetallen oder PAKs, als Kernpartikel für die Untersuchung reiner Partikeleffekte genutzt [Donaldson *et al.*, 2001].

Bislang wurden CB-Partikel nicht als gesundheitsgefährdende Materialien klassifiziert. Bei einer Inhalationsstudie an Ratten trat allerdings eine hohe Anzahl an bronchioalveolären Tumoren auf, die bei zunehmender Partikel-Konzentration weiter anstieg [Heinrich *et al.*, 1995]. Diese Pathologie kann jedoch auf das Phänomen der Überladung zurückgeführt werden, welches allgemein auftritt, wenn Ratten hohen Konzentrationen an Partikeln ausgesetzt werden. Dabei akkumulieren auch Partikel mit einer geringen Toxizität in der Lunge, blockieren letztendlich den natürlichen Reinigungsmechanismus und induzieren auf diese Weise Lungentumore [Donaldson *et al.*, 2001]. Über die Akkumulationseffekte hinaus wurden im Rahmen einer weiteren Inhalationsstudie mit CB-Partikeln in alveolären Epithelzellen von Ratten genotoxische Effekte sowie Entzündungen und epitheliale Hyperplasie nachgewiesen [Driscoll *et al.*, 2002]. Auf diesen Beobachtungen basiert die Hypothese, dass Oxidantien aus inflammatorischen Zellen sowie eine erhöhte Zellproliferation eine wichtige Rolle bei der CB-induzierten Pathogenese von Lungentumoren spielen.

*In vitro* induzieren ultrafeine CB-Partikel über eine Vielzahl an Signalwegen die Aktivierung von spezifischen Transkriptionsfaktoren, was wiederum in einer erhöhten Expression von Chemokinen und Zytokinen resultiert. Ein möglicher Signalweg wird dabei anscheinend über eine Zunahme der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration bewirkt. Dies ist vermutlich auf den

Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  über  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in der Plasmamembran zurückzuführen. Die Öffnung dieser Kanäle kann durch ROS vermittelt werden, deren Produktion eine Konsequenz der großen spezifischen Oberfläche der CB-Partikel ist [Brown *et al.*, 2004; Donaldson & Stone, 2003; Stone *et al.*, 2000].

Um die Interaktionen zwischen Partikeln und Zielzellen sowie die daraus resultierenden Signalwege genauer zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit die in PBS suspendierten ultrafeinen CB-Partikel vor der Belastung der RLE-6TN Zellen für 1 h mit Ultraschall behandelt [vgl. 2.1.4 und 3.1]. Dadurch sollte ein größtmöglicher Anteil an reinen Primär-Partikeln in der PBS-Lösung gewährleistet werden. Diese Primär-Partikel, welche aus konzentrisch arrangierten Graphit-ähnlichen Kristallen bestehen, bilden „unzerstörbare“ Aggregate. Darüber hinaus können auch sekundäre oder temporäre Strukturen aufgrund von Agglomerationen zwischen den primären Aggregaten entstehen, welche jedoch durch mechanische Einflüsse, wie eben Ultraschall, leicht zerstört werden können.

Weiterhin musste zu Beginn der Untersuchungen dieser Arbeit gewährleistet werden, dass mögliche Einflüsse der CB-Partikel auf die Signalwege der RLE-6TN Zellen nur auf den partikulären Charakter des Modellstaubs und nicht auf zytotoxische Mechanismen zurückzuführen sind. Die Zytotoxizität wurde dabei über die Messung der LDH-Aktivität im Überstand der RLE-6TN Zellen in Abhängigkeit von der Partikel-Konzentration und der Belastungsdauer bestimmt [vgl. 3.1]. Allgemein kam es dabei mit zunehmender Expositionsdauer zu einem Anstieg der LDH-Aktivität, was auf einen Effekt des Hungermediums hinweist. Im Gegensatz dazu ist die erhöhte LDH-Aktivität bei einer CB-Konzentration von  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  wahrscheinlich auf Partikel-induzierte zytotoxische Mechanismen zurückzuführen. In den anschließenden Untersuchungen zur CB-induzierten Signaltransduktion wurden die RLE-6TN Zellen daher mit der nicht-zytotoxischen Konzentration von  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB belastet.

### **4.3 CB-induzierte Aktivierung von MAP-Kinasen und AKT**

Im Mittelpunkt der Untersuchungen zur CB-induzierten Signaltransduktion stand die Frage nach der Beteiligung der Familie der MAP-Kinasen oder der Proteinkinase AKT [vgl. 3.2]. Diese Signalproteine sind relevant für die Induktion von Zellproliferation sowie die Prävention von Apoptose und spielen demzufolge möglicherweise eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung maligner Lungenerkrankungen durch Feinstäube [Fukuda *et al.*, 2003; Albrecht *et al.*, 2002; Johnson & Lapadat, 2002; Brazil & Hemmings, 2001; Datta *et al.*, 1999].

Hierzu durchgeführte Analysen zeigten, dass die Behandlung der RLE-6TN Zellen mit ultrafeinen CB-Partikeln in einer nicht-zytotoxischen Konzentration [vgl. 3.1 und 4.2] eine Zeit-abhängige Aktivierung von ERK1/2, JNK1/2, p38 und AKT zur Folge hatte [vgl. 3.2.1 – 3.2.4], während die Expression dieser Signalproteine nicht beeinflusst wurde. Bislang wurde bei vielen Studien mit granulären Partikeln, wie z.B. PM, Quarz oder Kohlenstaub sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Aktivierung von ERK1 und ERK2 beobachtet [Albrecht *et al.*, 2002; Buder-Hoffman *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2001]. Auch eine Partikel-induzierte Aktivierung von JNK1/2 und p38 konnte nach der Belastung von Lungenepithelzellen mit DEP bereits nachgewiesen werden [Zhang *et al.*, 2004; Shukla *et al.*, 2001]. Für eine Beteiligung des anti-apoptotischen AKT-Signalweges an Partikel-induzierten Signaltransduktionen gab es allerdings bis jetzt nur wenige Hinweise. So wurde eine Aktivierung von AKT lediglich in Mesothelzellen nach der Behandlung mit faserigen Asbest-Partikeln sowie in Epidermiszellen nach der Exposition mit granulären DEP beobachtet [Ma *et al.*, 2004; Berken *et al.*, 2003].

Bei einem genauen Vergleich der CB-induzierten Effekte auf die einzelnen untersuchten Signalproteine waren teilweise deutliche Unterschiede im Zeitverlauf der Aktivierung zu erkennen. So zeigten die MAP-Kinasen JNK1/2 und p38 bereits nach 2 h eine Phosphorylierung [vgl. 3.2.2 und 3.2.3], wohingegen ERK1/2 und AKT erst nach 8 h signifikant aktiviert wurden [vgl. 3.2.1 und 3.2.4]. Unterschiede in den Aktivierungsmustern dieser Signalproteine traten auch in Mäuse-Zelllinien nach der Exposition mit DEP auf. Dabei zeigten die MAP-Kinasen ERK1/2, JNK1/2 und p38 in Lungenepithelzellen während eines Behandlungszeitraums von 3 h deutliche Abweichungen im Zeitverlauf der Aktivierung [Zhang *et al.*, 2004]. Im Gegensatz dazu induzierten die DEP in Epidermiszellen zwar eine Aktivierung von AKT und JNK1/2, während die Phosphorylierung von ERK1/2 und p38 aber nur geringfügig beeinflusst wurde [Ma *et al.*, 2004]. Demnach induzieren ultrafeine Verbrennungsgenerierte Kohlenstoff-Partikel wie CB und DEP spezifische Signalwege, die sich jedoch, in Abhängigkeit von den jeweiligen Partikeln, voneinander unterscheiden können.

Die in den RLE-6TN Zellen auftretende CB-induzierte Aktivierung von p38 blieb über den gesamten Behandlungszeitraum von 24 h bestehen, wohingegen die Phosphorylierung von JNK1/2, ERK1/2 und AKT ein Maximum aufwies und nach 24 h wieder auf den Ausgangswert zurückging. Diese persistente Phosphorylierung der MAP-Kinase p38 deutet dabei weniger auf eine Partikel-spezifische Antwort hin, sondern eher auf eine allgemeine Stress-Reaktion, welche durch die Partikel-Behandlung ausgelöst wird. Dem entspricht, dass p38 allgemein durch eine Vielzahl an Stimuli, einschließlich bakteriellen Pathogenen, pro-inflammatorischen Zytokinen, Wachstumsfaktoren und anderen Formen von Umwelt-bedingtem Stress induziert wird. Die Aktivierung ist dabei sehr stark vom Zelltyp abhängig

[New & Han, 1998]. In diesem Zusammenhang wird auch häufig von einer gleichzeitig eintretenden Aktivierung von p38 und JNK1/2 berichtet, welche in der vorliegenden Arbeit ebenfalls beobachtet werden konnte [Raingeaud *et al.*, 1995]. Da die CB-induzierte Aktivierung der MAP-Kinase p38 aber kein Maximum im Zeitverlauf aufwies, wurde in der vorliegenden Arbeit nur die offenbar Partikel-spezifische Aktivierung von JNK1/2, ERK1/2 und AKT weiter untersucht [vgl. 3.2.5].

Besonders auffällig bei der CB-induzierten Aktivierung dieser Signalproteine war die nach 8 h auftretende, simultane Phosphorylierung von ERK1/2 und AKT, welche zudem auch eine deutliche Dosis-Abhängigkeit aufwies [vgl. 3.2.5]. Eine vergleichbare simultane Aktivierung von AKT und ERK1/2 wurde bislang nur im Zusammenhang mit der Faser-induzierten Signaltransduktion beschrieben [Berken *et al.*, 2003]. Dabei führte die Behandlung von Pleuramesothelzellen mit faserigen Asbest-Partikeln nach 48 h ebenfalls zu einer Zeit- und Dosis-abhängigen Phosphorylierung von AKT und ERK1/2. Allerdings wurde bei der bislang einzigen Studie, die auf eine Aktivierung von AKT durch granuläre Partikel aufmerksam machte, keine simultane Aktivierung dieser Signalproteine beobachtet [Ma *et al.*, 2004]. So induzierten DEP in einer Epidermis-Zelllinie aus Mäusen zwar eine Aktivierung von AKT, die Phosphorylierung von ERK1/2 wurde aber nicht beeinflusst. Bei der Bewertung dieser Unterschiede zwischen CB und DEP vermittelten Effekten muss jedoch berücksichtigt werden, dass die einzelnen Befunde in unterschiedlichen Zellsystemen gewonnen wurden. Zudem unterscheiden sich die verwendeten ultrafeinen Partikel aufgrund ihrer Oberflächenstrukturen deutlich voneinander, wodurch es auch zur Induktion spezifischer Zellantworten kommen kann [Donaldson *et al.*, 2005]. Im Rahmen der CB-induzierten Signaltransduktion ist die simultane Aktivierung von ERK1/2 und AKT, aufgrund der auffallenden Übereinstimmungen im Aktivierungsmuster, dabei vermutlich von besonderer Bedeutung.

#### **4.4 Beteiligung von EGF-R und Integrinen an der CB-induzierten Signaltransduktion**

Bei der Untersuchung der initialen Ereignisse der CB-induzierten Signalwege wurde die Beteiligung von Zelloberflächen-Rezeptoren überprüft, da Interaktionen der Partikel mit Oberflächenstrukturen der betroffenen Zielzellen als Ansatzpunkte für die Ausbildung von pathogenen Endpunkten diskutiert werden [Albrecht *et al.*, 2004]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Hauptaugenmerk dabei auf den EGF-R und Integrine gelegt, da diese Rezeptoren über die Aktivierung von MAP-Kinasen sowie der Proteinkinase AKT

einen Einfluss auf Zellproliferation und/oder Apoptose nehmen können [Lee & Juliano, 2004; Jorissen *et al.*, 2003; Faraldo *et al.*, 2001; Schwartz & Assoian, 2001].

Durch die Inhibition der Tyrosin-Kinase-Aktivität des EGF-R mit Tyrphostin AG 1478 kam es dabei in den RLE-6TN Zellen zu einer signifikanten Abnahme der CB-induzierten Aktivierung von JNK1/2 [vgl. 3.3.1] sowie der später auftretenden, simultanen Aktivierung von AKT und ERK1/2 [vgl. 3.3.2]. In diesem Zusammenhang konnte kürzlich gezeigt werden, dass der EGF-R in RLE-6TN Zellen durch ultrafeine CB-Partikel aktiviert wird [Sydlik *et al.*, 2006]. Ebenso wurde bei einer Studie an humanen bronchialen Epithelzellen eine Aktivierung des EGF-R durch CB nachgewiesen [Tamaoki *et al.*, 2004]. Somit spielt die Aktivierung des EGF-R offenbar eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der beobachteten CB-induzierten Phosphorylierung von Signalproteinen. Des Weiteren wurde auch im Zusammenhang mit anderen granulären Partikeln sowie faserigen Asbest-Partikeln auf eine Beteiligung des EGF-R an der Partikel-induzierten Signaltransduktion aufmerksam gemacht. So wurde in humanen bronchialen Epithelzellen, die mit PM<sub>2,5</sub>, DEP oder ultrafeinem CB behandelt wurden, die Produktion von EGF-R Liganden, wie z.B. HG-EGF oder Amphiregulin stimuliert [Blanchet *et al.*, 2004; Tamaoki *et al.*, 2004]. Ferner führte die Behandlung von Ratten-Mesothelzellen mit faserigen Asbest-Partikeln sowohl zu einer gesteigerten Autophosphorylierung als auch zu einer erhöhten Expression des EGF-R [Faux *et al.*, 2000; Zanella *et al.*, 1999; Zanella *et al.*, 1996]. Allgemein scheint der EGF-R somit eine initiale Rolle bei der Partikel-induzierten Signaltransduktion zu spielen, wobei allerdings der genaue Ablauf der Rezeptor-Aktivierung bislang noch unklar ist. Einerseits wird eine direkte Aktivierung des EGF-R durch Interaktionen der Partikel mit zellulären Strukturen diskutiert. Andererseits gibt es jedoch auch Hinweise auf eine indirekte Rezeptor-Aktivierung über Partikel-induzierte ROS [Brown *et al.*, 2004; Tamaoki *et al.*, 2004; Faux *et al.*, 2000; Pache *et al.*, 1998].

Neben dem EGF-R wurden in der vorliegenden Arbeit aber auch Integrin-Rezeptoren als ein möglicher Startpunkt für Partikel-induzierte Effekte untersucht. Bislang wurde eine Beteiligung von Integrinen nur im Rahmen der Faser-induzierten Signaltransduktion beschrieben [Albrecht *et al.*, 2004]. Dabei führte die Behandlung von Pleuramesothelzellen mit faserigen Asbest-Partikeln zu einer Integrin-abhängigen simultanen Aktivierung von AKT und ERK1/2 [Berken *et al.*, 2003]. Darüber hinaus resultierte die Inaktivierung von Integrinen in einer verminderten Phagozytose der Asbestfasern durch die Mesothelzellen [Liu *et al.*, 2000]. *In vivo* wurde zudem während der Asbest-induzierten Mesotheliom-Kanzerogenese eine Induktion von Genen beobachtet, die in die Integrin-vermittelte Signaltransduktion involviert sind [Sandhu *et al.*, 2000b]. In der vorliegenden Arbeit wurde in den RLE-6TN Zellen, im Gegensatz zu den beobachteten Effekten nach einer Blockierung des EGF-R,

keine Veränderung der CB-induzierten Phosphorylierung von JNK1 und JNK2 nach der Inhibition von Integrin-Rezeptoren mit einem RGD-Peptid beobachtet [vgl. 3.3.1]. Interessanterweise wurde jedoch, wie in Asbest-behandelten Mesothelzellen, die CB-induzierte Aktivierung von AKT und ERK1/2 signifikant reduziert [vgl. 3.3.2]. Dadurch konnte zum ersten Mal eine Beteiligung von Integrinen an der Feinstaub-induzierten Signaltransduktion durch AKT und ERK1/2 nachgewiesen werden.

Um eine Aussage darüber treffen zu können, welche der Integrin-Untereinheiten, die durch die Bindung des RGD-Peptids inhibiert werden können, letztendlich für die CB-induzierte Aktivierung von AKT und ERK1/2 verantwortlich sind, wurde das Integrin-Profil der RLE-6TN Zellen untersucht. Dabei konnte die Expression der Integrin-Untereinheiten  $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_v$ ,  $\beta_1$  und  $\beta_5$  nachgewiesen werden, wohingegen  $\alpha_2$  und  $\beta_3$  nicht detektiert wurden [vgl. 3.3.3]. Bei der Beurteilung dieses Integrin-Profiles muss beachtet werden, dass die Expression von Integrinen durch eine Vielzahl an Faktoren, wie z.B. der Konfluenz einer Zellkultur beeinflusst werden kann [Bates *et al.*, 1991]. Um diese Variable auszuschließen, wurden die RLE-6TN Zellen in der vorliegenden Arbeit unter gleich bleibenden Versuchsbedingungen kultiviert und bei allen Versuchen mit einer konstanten Konfluenz eingesetzt [vgl. 2.2.1.4 und 4.1]. Besonders auffällig beim Integrin-Profil der RLE-6TN Zellen war die hohe Expression der  $\beta_1$ -Integrine [vgl. 3.3.3]. In gesunden Zellen wird die Expression von  $\beta_1$ -haltigen Integrin-Rezeptoren nur durch die Produktion der assoziierten  $\alpha$ -Untereinheiten reguliert. Dabei ist die  $\beta_1$ -Untereinheit, wie auch im hier verwendeten Zellsystem, häufig konstitutiv im Überschuss exprimiert [Janat *et al.*, 1992; Sheppard *et al.*, 1992; Heino *et al.*, 1989; Roberts *et al.*, 1988]. Im Rahmen der Tumorgenese werden allerdings vielfach Veränderungen in der Expression von  $\beta_1$ -Untereinheiten beobachtet, wobei diesen Integrinen eine zentrale Bedeutung bei der Adhäsion und Invasion von Tumorzellen zugeschrieben wird [Seales *et al.*, 2005; Crowe & Ohannessian, 2004; van Golen *et al.*, 2003; Yamanaka *et al.*, 2003; Giuffrida *et al.*, 1999]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Inhibition dieser Integrine mit einem spezifischen  $\beta_1$ -Integrin Antikörper analysiert. Dabei zeigte sich eine signifikante Abnahme der CB-induzierten Aktivierung von AKT und ERK1/2 [vgl. 3.3.4], was auf eine Beteiligung von  $\beta_1$ -Integrinen an der Partikel-spezifischen Signaltransduktion hinweist. Auch im Rahmen der Asbest-induzierten simultanen Aktivierung von AKT und ERK1/2 wurde eine Beteiligung von  $\beta_1$ -Integrinen nachgewiesen [Berken *et al.*, 2003]. Diese Befunde sind besonders hervorzuheben, da es insgesamt nur wenige Studien gibt, die von einer Integrin-abhängigen Aktivierung von AKT nach xenobiotischem Stress berichten. So wurde bislang nur in Folge von Strahlungs-induziertem, gentoxischem Stress eine  $\beta_1$ -Integrin vermittelte AKT-Aktivierung beobachtet, welche in der Prävention von Apoptose resultierte [Seidler *et al.*, 2005]. Bei einem möglichen Bezug der in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Befunde zur Beteiligung von  $\beta_1$ -Integrinen an der CB-induzierten Aktivierung von AKT und ERK1/2 auf

die entsprechende *in vivo* Situation muss jedoch beachtet werden, dass Unterschiede im Integrin-Profil der beiden Systeme auftreten können. Beispielsweise wurde bei Gewebe aus dem Peritoneum und kultivierten Zellen sowie primären Pleuramesothelzellen und einer immortalisierten Pleuramesothel-Zelllinie eine differentielle Integrin-Expression beobachtet [Liaw *et al.*, 2001; Witz *et al.*, 2000; Witz *et al.*, 1998]. Zudem können auch bestimmte Krankheiten einen Einfluss auf die Expression der einzelnen Integrin-Untereinheiten ausüben. So verursachten Verletzungen oder Entzündungen im humanen Atemwegs-Epithel ein verändertes Integrin-Profil, wobei im Besonderen die Expression von  $\alpha_5\beta_1$ -Integrinen und  $\alpha_v\beta_6$ -Integrinen beeinflusst wurde [Wang *et al.*, 1996].

Anhand der in dieser Arbeit gewonnenen Daten konnte gezeigt werden, dass sowohl der EGF-R als auch Integrin-Rezeptoren an der CB-induzierten Signaltransduktion beteiligt sind. Möglicherweise sind diese Zelloberflächen-Rezeptoren selbst die Zielmoleküle für die Partikel-Zell-Interaktionen, welche entscheidend für die Induktion der Partikel-spezifischen Effekte sind. Allerdings könnte diese Induktion auch durch Veränderungen in der Zusammensetzung der ECM vermittelt werden, welche wiederum durch die Integrine erkannt werden können [Aplin *et al.*, 1998]. In diesem Zusammenhang wurde beispielsweise in Asbest-induzierten Mesotheliomen von Ratten eine erhöhte Transkription der Boten-RNA („messenger RNA“, mRNA) für das ECM-Protein Osteopontin nachgewiesen [Sandhu *et al.*, 2000a]. Da in einer Vielzahl an humanen Tumoren, einschließlich Lungenkarzinomen eine signifikant erhöhte Expression dieses Proteins detektiert wurde, wird Osteopontin allgemein eine Funktion bei der Tumorprogression zugeschrieben [Coppola *et al.*, 2004]. Darüber hinaus wurde in einem Atemwegs-Modell für Asthma-Erkrankungen, die vielfach auf eine erhöhte Partikelbelastung zurückzuführen sind, auch eine Anreicherung anderer ECM-Proteine, einschließlich Typ I Kollagen und Fibronektin beobachtet [Nguyen *et al.*, 2005; Penttinen *et al.*, 2001]. Aufgrund dessen könnte die Untersuchung möglicher Partikel-induzierter Veränderungen in der Zusammensetzung der ECM einen weiteren Aufschluss über die Natur der Partikel-Zell-Interaktionen im Modellsystem RLE-6TN liefern.

Bei der Induktion der Partikel-spezifischen Effekte ist auch eine direkte Interaktion der Zelloberflächen-Rezeptoren denkbar. Bislang wurden solche Interaktionen zwischen EGF-R und Integrin-Rezeptoren im Zusammenhang mit Zellwachstum und Zellwanderung sowie bei der Angiogenese in endothelialen Zellen beschrieben [Eliceiri, 2001]. Auch während der Zelladhäsion kommt es zu einem Zusammenspiel zwischen EGF-R und Integrinen [Aplin & Juliano, 1999; Moro *et al.*, 1998]. Allgemein wird dabei sowohl von einem Einfluss des EGF-R auf Integrine als auch von einer Integrin-vermittelten Aktivierung des EGF-R berichtet [Wang *et al.*, 2003; Yamanaka *et al.*, 2003; Lee & Juliano, 2002; Kuwada & Li, 2000; Yu *et*



*al.*, 2000; Adelman *et al.*, 1999; Moro *et al.*, 1998; Genersch *et al.*, 1996; Miyamoto *et al.*, 1996]. Zudem können Integrine auch als Co-Rezeptoren dienen, die bestimmte Signalereignisse, welche durch andere Rezeptoren induziert werden, noch weiter verstärken [Lee & Juliano, 2004; Richardson & Parsons, 1995]. Eine zukünftige Untersuchung möglicher Wechselwirkungen zwischen EGF-R und  $\beta_1$ -Integrinen nach der Exposition von RLE-6TN Zellen mit CB kann dabei weitere Aufschlüsse über die Mechanismen bei der Initiierung der Partikel-induzierten Signaltransduktion liefern.

#### **4.5 Weiterleitung der CB-induzierten Signaltransduktion durch intrazelluläre Proteine**

Als mögliche Verbindungspunkte zwischen EGF-R und Integrin-vermittelten Signalwegen bei der CB-induzierten Signaltransduktion wurden intrazelluläre Signalproteine untersucht, die allgemein durch diese Zelloberflächen-Rezeptoren aktiviert werden und an der Induktion von ERK- und AKT-Signalwegen beteiligt sein können. Einen Schwerpunkt der Analysen bildeten dabei die in den Fokalkontakten lokalisierten Proteinkinasen FAK und ILK [vgl. 3.4], da beide Signalproteine an die zytoplasmatische Domäne von  $\beta_1$ -Integrinen binden können [Brockbank *et al.*, 2005; Hannigan *et al.*, 1996; Richardson & Parsons, 1995].

Die Proteinkinase FAK wird üblicherweise durch die Adhäsion von Zellen an eine Vielzahl von ECM-Proteinen und ein daraufhin einsetzendes „Clustering“ von Integrin-Rezeptoren aktiviert. Auch eine Vielzahl an mitogenen Stimuli, einschließlich Wachstumsfaktoren und Peptid-Hormonen bewirken eine Autophosphorylierung der FAK am Tyr<sup>397</sup> [Mukhopadhyay *et al.*, 2005; Crowe & Ohannessian, 2004; Sanders & Basson, 2000; Li *et al.*, 1997; Richardson & Parsons, 1995; Romer *et al.*, 1994; Zachary *et al.*, 1993; Kornberg *et al.*, 1992]. Als Folge dieser Aktivierung kommt es zur Induktion multipler Signalwege [Danen & Yamada, 2001; Lafrenie & Yamada, 1996]. So können z.B. die MAP-Kinasen sowie die Proteinkinase AKT, welche auch im Rahmen der CB-induzierten Signaltransduktion aktiviert werden, in Abhängigkeit von der FAK phosphoryliert werden [Zhang *et al.*, 2002; Hauck *et al.*, 2001; Almeida *et al.*, 2000; Hauck *et al.*, 2000; Oktay *et al.*, 1999; Renshaw *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1997; Schlaepfer & Hunter, 1997]. In diesem Zusammenhang wird der FAK auch eine Rolle bei der Tumorgenese zugeschrieben, da eine erhöhte Expression dieser Proteinkinase in humanen Tumoren mit einer erhöhten Malignität korreliert [Hauck *et al.*, 2002]. In der vorliegenden Arbeit führte die Behandlung der RLE-6TN Zellen mit ultrafeinen CB-Partikeln allerdings über den gesamten Behandlungszeitraum von 24 h weder zu einer erhöhten Autophosphorylierung noch zu einer veränderten Expression der FAK [vgl. 3.4.1].

Demzufolge scheint die CB-induzierte Signaltransduktion, und damit auch die Aktivierung von AKT und ERK1/2, unabhängig von der FAK abzulaufen. Dieser Befund stimmt mit der bislang einzigen Studie überein, in der eine Beteiligung von FAK im Rahmen der Partikel-induzierten Signaltransduktion untersucht wurde. So wurden nach der Behandlung von Pleuramesothelzellen mit faserigen Asbest-Partikeln ebenfalls keine Veränderungen in der Autophosphorylierung von FAK beobachtet [Berken *et al.*, 2003]. Aus weiteren Studien ist jedoch bekannt, dass die Integrin-induzierte Aktivierung von MAP-Kinasen und AKT in Folge vermehrter Zelladhäsion auch unabhängig von der FAK abläuft [Velling *et al.*, 2004; Sieg *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 1997; Wary *et al.*, 1996].

Ein Signalprotein, welches möglicherweise an solchen FAK-unabhängigen, Integrin-vermittelten Signalwegen beteiligt ist, ist die Proteinkinase ILK, welche sowohl durch Integrine als auch durch Wachstumsfaktoren und Chemokine aktiviert werden kann [Persad & Dedhar, 2003; Danen & Yamada, 2001]. Als Folge dieser Aktivierung induziert die ILK die Phosphorylierung von unterschiedlichen Signalproteinen, einschließlich AKT und GSK-3 [Gary *et al.*, 2003; Delcommenne *et al.*, 1998]. Der genaue Mechanismus der ILK-vermittelten AKT-Aktivierung ist aber bislang noch nicht geklärt. So wird einerseits eine direkte Phosphorylierung von AKT am Ser<sup>473</sup> durch die ILK diskutiert. Andererseits gibt es jedoch auch Hinweise auf eine Beteiligung der ILK an einer indirekten Aktivierung von AKT [Troussard *et al.*, 2003; Persad *et al.*, 2001; Lynch *et al.*, 1999; Delcommenne *et al.*, 1998]. Aufgrund einer Vielzahl an Studien wird der ILK inzwischen eine wichtige Funktion bei der Tumorprogression zugeschrieben, da eine erhöhte Expression bzw. Aktivität dieser Proteinkinase mit einer Malignität in unterschiedlichen humanen Tumoren korreliert [Persad & Dedhar, 2003; Dedhar, 2000]. Nach der Behandlung der RLE-6TN Zellen mit ultrafeinen CB-Partikeln wurden allerdings keine Veränderungen in der Expression und der enzymatischen Aktivität der ILK beobachtet [vgl. 3.4.2]. Für weitere Untersuchungen wurde in der vorliegenden Arbeit eine Kinase-inaktive ILK-Mutante hergestellt [vgl. 3.4.2.1], bei der an Position 359 ein AS-Austausch von Glutaminsäure zu Lysin (E359K) vorlag. In früheren Studien wurde bereits nachgewiesen, dass es sich hierbei um eine potente dominant-negative Mutante handelt, bei der die Kinase-Aktivität um 80 % reduziert ist [Persad *et al.*, 2001]. Die dominant-negative Überexpression dieser ILK-Mutante in den RLE-6TN Zellen hatte allerdings keinen Einfluss auf die CB-induzierte Phosphorylierung von AKT und ERK1/2 [vgl. 3.4.2.2]. Demzufolge scheint die CB-induzierte Signaltransduktion unabhängig von der ILK abzulaufen. Im Gegensatz dazu wird der ILK jedoch eine Beteiligung bei der Ausbildung von Faser-induzierten Effekten zugeschrieben, da in Asbest-induzierten Mesotheliomen von Ratten eine erhöhte Transkription der ILK-mRNA beobachtet wurde [Sandhu *et al.*, 2000a]. Obwohl allgemein eine Funktion der ILK bei der Phosphorylierung

von AKT aufgezeigt wurde, sind mittlerweile auch Beispiele bekannt, die eine Integrin-induzierte Aktivierung von AKT nachweisen, welche unabhängig von der ILK abläuft [Feng *et al.*, 2004; Velling *et al.*; 2004; Grashoff *et al.*, 2003; Sakai *et al.*, 2003].

Diese ILK-unabhängigen, Integrin-vermittelten Signalwege bedürfen möglicherweise der PI3-Kinase, welche essentiell für die Phosphorylierung von AKT ist [Velling *et al.*, 2004; Gary *et al.*, 2003]. Diese Proteinkinase kann durch Integrine, Wachstumsfaktoren oder Zytokine aktiviert werden und ist an der Antwort auf extrazellulären Stress, wie z.B. mechanischer Stimuli und Veränderungen in der Zellform beteiligt [Chang *et al.*, 2003; Gary *et al.*, 2003; Alenghat & Ingber, 2002, King *et al.*, 1997]. Allgemein wird die Signalkaskade über die PI3-Kinase und AKT als anti-apoptotischer Signalweg beschrieben, welcher der Zelle hilft, zu überleben und eine Zellteilung zu induzieren [Abraham, 2005]. Aufgrund dieser zentralen Rolle bei der Regulation von Zellüberleben und Metabolismus, wird der PI3-Kinase auch eine Funktion bei der Tumorgenese zugeschrieben [Plas & Thompson, 2005]. So korreliert eine erhöhte Aktivität dieser Proteinkinase mit einer Malignität in einer Vielzahl an humanen Tumoren, wie z.B. Lungenkarzinomen [Chang *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2001]. Durch die Inhibition der PI3-Kinase mit Wortmannin oder LY 294002 wurde in den RLE-6TN Zellen sowohl die CB-induzierte Phosphorylierung von AKT als auch die Aktivierung von ERK1/2 signifikant reduziert [vgl. 3.5]. Dementsprechend besitzt die PI3-Kinase offenbar eine zentrale Funktion bei der CB-induzierten Signaltransduktion. Bislang wurde nur bei einer Studie mit Epidermiszellen, welche mit granulären DEP behandelt wurden, eine Beteiligung dieses Signalproteins an Partikel-induzierten Effekten beobachtet. Dabei konnte allerdings, im Gegensatz zu den Befunden der vorliegenden Arbeit, nur ein Einfluss auf die Aktivierung von AKT nachgewiesen werden [Ma *et al.*, 2004]. Unabhängig von Partikel-induzierten Effekten wird der PI3-Kinase jedoch auch eine Funktion bei der Integrin-vermittelten Aktivierung des ERK-Signalweges zugeschrieben [Chang *et al.*, 2003; King *et al.*, 1997; Vanhaesebroeck *et al.*, 1997].

Bei einem genauen Vergleich der CB-induzierten, simultanen Aktivierung von AKT und ERK1/2 zeigten sich auffällige Übereinstimmungen hinsichtlich des Aktivierungsmusters sowie der beteiligten Rezeptoren und intrazellulären Signalproteine. So werden AKT und ERK1/2 scheinbar sowohl durch den EGF-R und  $\beta_1$ -Integrine als auch durch die PI3-Kinase aktiviert. Unklar ist allerdings, ob es sich hierbei um zwei voneinander unabhängige Signalwege handelt, die parallel induziert werden, oder ob AKT und ERK1/2 zu einem Signalweg mit dem gleichen Endpunkt gehören. So wurde eine gleichzeitige, aber parallel ablaufende Aktivierung des PI3-Kinase/AKT-Signalweges und des Ras/ERK-Signalweges bereits im Zusammenhang mit der Transformation von Onkogenen nachgewiesen [Agazie *et*

*al.*, 2002]. Durch die Inhibition von AKT mit SH-5 [vgl. 3.6] sowie die dominant-negative Überexpression von AKT mit Hilfe einer Kinase-inaktiven AKT-Mutante [vgl. 3.6.1] kam es in den RLE-6TN Zellen zu einer signifikanten Abnahme der CB-induzierten Aktivierung von ERK1 und ERK2. Demzufolge gehören AKT und ERK1/2 scheinbar zu einem Signalweg mit dem gleichen Endpunkt, wobei AKT offenbar die Partikel-induzierte Aktivierung von ERK1/2 vermittelt. Unklar bleibt allerdings, durch welchen molekularen Mechanismus die ERK-Aktivierung erfolgt. Einerseits wird eine direkte Aktivierung von ERK1 und ERK2 durch AKT diskutiert, da einige Proteine dieser Signalkaskade strukturelle Ähnlichkeiten mit der GSK-3 aufweisen, die durch AKT phosphoryliert werden kann. Andererseits könnte AKT die Proteine des ERK-Signalweges aber auch indirekt über die GSK-3 aktivieren [Abraham, 2005; Doble & Woodgett, 2003; Frame & Cohen, 2001]. Des Weiteren wurde im Zusammenhang mit Anoikis in Maus-Fibroblasten auch von einem indirekten Einfluss von AKT auf ERK1/2 durch die Regulation der Raf/MEK/ERK-Kaskade berichtet. Dabei wurde eine physikalische Interaktion zwischen AKT und c-Raf gezeigt, die in Abhängigkeit vom Zelltyp und dem Differenzierungs-Status in einer Inhibition der Raf/MEK/ERK-Kaskade resultierte [Rul *et al.*, 2002; Zugasti *et al.*, 2001; Rommel *et al.*, 1999; Zimmermann & Moelling, 1999]. Nach einer 8-stündigen Behandlung der RLE-6TN Zellen mit ultrafeinen CB-Partikeln wurde eine Phosphorylierung von MEK1/2 beobachtet, während c-Raf nicht aktiviert wurde [vgl. 3.7]. Durch die Blockierung von MEK1/2 mit PD 98059 kam es des Weiteren zu einer signifikanten Abnahme der CB-induzierten Aktivierung von ERK1/2. Die Phosphorylierung von AKT wurde hingegen nicht beeinflusst [vgl. 3.7.1]. Demzufolge sind MEK1/2, im Gegensatz zu c-Raf, an der CB-induzierten Signaltransduktion beteiligt. Allerdings scheinen MEK1 und MEK2 in diesem Modellsystem unterhalb von AKT angeordnet zu sein, da nur ein Einfluss auf ERK1/2 nachgewiesen werden konnte. Zusammen mit den Ergebnissen der AKT-Inhibition konnte damit zum ersten Mal ein Einfluss von AKT auf die Raf/MEK/ERK-Kaskade unterhalb von c-Raf belegt werden. Allerdings ist es auch noch möglich, dass AKT eine direkte Aktivierung von ERK1 und ERK2, ohne die Beteiligung von MEK1/2, induzieren kann.

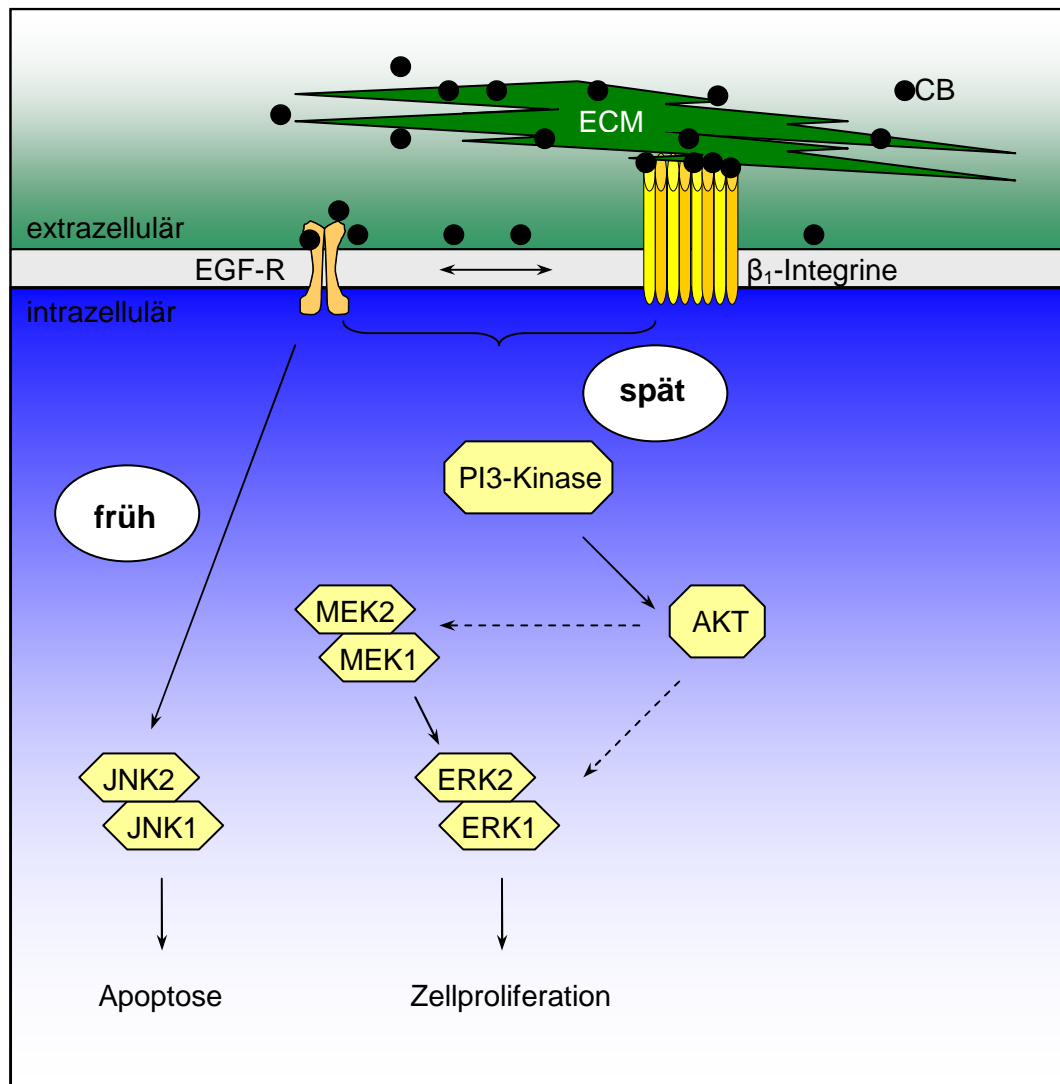
#### **4.6 Modell zur CB-induzierten Signaltransduktion**

Die Befunde der vorliegenden Arbeit liefern einen Überblick über die zellulären Komponenten, die an der CB-induzierten Signaltransduktion *in vitro* beteiligt sind. Aufgrund der beobachteten Interaktionen und Abhängigkeiten dieser Komponenten kann ein Modell postuliert werden, dass die Signalwege und deren Wechselwirkungen beschreibt [vgl. Abb.

4.1]. Demnach führen ultrafeine CB-Partikel in Ratten-Lungenepithelzellen zu einer frühen, EGF-R vermittelten Phosphorylierung der MAP-Kinasen JNK1 und JNK2. Des Weiteren wird durch eine mögliche Interaktion zwischen dem EGF-R und  $\beta_1$ -Integrinen ein später einsetzender Signalweg induziert, der unter der Beteiligung von PI3-Kinase, AKT und MEK1/2 in der Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 resultiert. Die Beteiligung von EGF-R und Integrin-Rezeptoren lässt dabei durch eine direkte Interaktion der Partikel mit diesen Zelloberflächen-Rezeptoren oder mit Proteinen der ECM auf eine Induktion der beschriebenen Signalwege durch extrazelluläre Signale schließen. Allerdings können ultrafeine Partikel auch durch Diffusion oder adhäsive Interaktionen in Zellen gelangen, weswegen eine Induktion durch intrazelluläre Prozesse, wie z.B. die Phosphorylierung des EGF-R durch intrazellulär gebildete ROS, ebenfalls in Betracht gezogen werden muss [Geiser *et al.*, 2005; Thannickal & Fanburg, 2000].

Als Endpunkte der CB-induzierten Signaltransduktion kommen sowohl Apoptose als auch Zellproliferation in Frage. Eine kürzlich durchgeführte Studie zu CB-vermittelten Effekten in RLE-6TN Zellen zeigte, dass die Aktivierung des EGF-R durch ultrafeine CB-Partikel sowohl zu einer frühen Apoptose als auch zu einer später einsetzenden Zellproliferation führt [Sydlik *et al.*, 2006]. In der Literatur wird die Zellproliferation dabei teilweise als Kompensation für Partikel-induzierte Apoptose diskutiert [Albrecht *et al.*, 2004]. Allerdings wurden nach der spezifischen Blockierung der Apoptose keine Veränderungen in der CB-induzierten Zellproliferation der RLE-6TN Zellen beobachtet. Dementsprechend scheinen die Endpunkte Apoptose und Zellproliferation in dem vorliegenden Modellsystem unabhängig voneinander induziert zu werden [Sydlik *et al.*, 2006]. Auch faserige Asbest-Partikel induzieren, offenbar unter der Beteiligung des EGF-R, eine Zunahme der Apoptose. So führte die Blockierung der Kinase-Aktivität des EGF-R in Asbest-behandelten Mesothelzellen zu einer verminderten Apoptose [Faux *et al.*, 2000; Zanella *et al.*, 1999; Pache *et al.*, 1998]. Studien mit ultrafeinen CB-Partikeln zeigten bislang lediglich eine EGF-R vermittelte Zellproliferation in humanen bronchialen Epithelzellen [Tamaoki *et al.*, 2004].

Neben dem EGF-R spielen in den RLE-6TN Zellen jedoch auch  $\beta_1$ -Integrine offenbar eine wichtige Rolle bei der CB-induzierten Zellproliferation [Sydlik *et al.*, 2006]. Da der EGF-R sowohl die Ausbildung von Apoptose als auch Zellproliferation vermittelt, sind die  $\beta_1$ -Integrine dementsprechend möglicherweise ausschlaggebend für die Induktion der Zellproliferation. Bezogen auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit scheint die EGF-R und  $\beta_1$ -Integrin vermittelte simultane Aktivierung von AKT und ERK1/2 somit in einer gesteigerten Zellproliferation zu resultieren. Der früher eintretenden, EGF-R vermittelten Phosphorylierung von JNK1/2 kann hingegen eine Funktion bei der CB-induzierten Apoptose zugeschrieben werden.



**Abb. 4.1:** *In vitro* Modell zur CB-induzierten Signaltransduktion im Ratten-Lungenepithel. Ultrafeine CB-Partikel bewirken eine frühe, EGF-R vermittelte Phosphorylierung von JNK1/2, welche an der Ausbildung von Apoptose beteiligt ist. Durch eine mögliche Interaktion zwischen EGF-R und  $\beta_1$ -Integrinen wird zudem ein später einsetzender Signalweg induziert, der unter der Beteiligung von PI3-Kinase, AKT und MEK1/2 in der Aktivierung von ERK1/2 resultiert und eine erhöhte Zellproliferation zur Folge hat.

Die Funktion der MAP-Kinasen JNK1 und JNK2 bei der Induktion des programmierten Zelltods wurde bereits mehrfach belegt [Tibbles & Woodgett, 1999; Xia *et al.*, 1995]. Beispielsweise induzierte Natrium-4-Phenylbutyrat über die Aktivierung des JNK-Signalweges in humanen Lungenkarzinom-Zellen eine gesteigerte Apoptose [Zhang *et al.*, 2004]. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in alveolaren Typ II Epithelzellen nach der Behandlung mit Wasserstoffperoxid gemacht [Carvalho *et al.*, 2004]. Zudem resultierte die Behandlung von alveolaren Epithelzellen mit Bleomycin durch die Aktivierung von JNK1/2 in einer Mitochondrien-vermittelten Apoptose [Lee *et al.*, 2005]. Im Rahmen von Studien mit

granulären Partikeln, einschließlich DEP, konnte eine Beteiligung von JNK1 und JNK2 an der Partikel-induzierten Signaltransduktion gezeigt werden [Zhang *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2002; Silbajoris *et al.*, 2000]. Allerdings wurde bislang nur in einer einzigen Studie nachgewiesen, dass auch reine Kohlenstoff-haltige Kernpartikel, wie CB, in der Lage sind, über eine EGF-R vermittelte Aktivierung des JNK-Signalweges eine gesteigerte Apoptose zu induzieren [Sydlik *et al.*, 2006].

Im Gegensatz zum pro-apoptotischen JNK-Signalweg wird den MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 eher eine proliferative Funktion zugeschrieben, obwohl es auch Hinweise auf eine Beteiligung an der Ausbildung von Apoptose gibt [Cobb, 1999; Zanella *et al.*, 1999; Su & Karin, 1996]. Wie in RLE-6TN Zellen konnte eine Aktivierung von ERK1/2 auch bei der EGF-R vermittelten Induktion der Zellproliferation in humanen bronchialen Epithelzellen nach der Behandlung mit ultrafeinen CB-Partikeln gezeigt werden [Tamaoki *et al.*, 2004]. Zudem führte die Exposition von Epithelzellen mit Kohlenstaub *in vivo* zu einer chronischen Aktivierung von ERK1/2. Diese Aktivierung spielt dabei anscheinend eine entscheidende Rolle bei der gesteigerten Proliferation dieser Zellen [Albrecht *et al.*, 2002]. An der in den RLE-6TN Zellen auftretenden CB-induzierten Zellproliferation ist offenbar jedoch nicht nur der proliferative ERK-Signalweg beteiligt. Vielmehr konnte erstmalig eine spezifische Funktion der Proteinkinase AKT bei der Aktivierung des ERK-Signalweges nachgewiesen werden. Dementsprechend scheint der pro-apoptotische AKT-Signalweg in diesem Modellsystem nicht nur für die Prävention von Apoptose verantwortlich zu sein, sondern auch eine essentielle Rolle bei der direkten Induktion der Zellproliferation zu spielen.

Um die Bedeutung dieser *in vitro* gewonnenen Befunde in Bezug auf die Feinstaub-induzierte Signaltransduktion genauer einordnen zu können, wurde zusätzlich das entsprechende *in vivo* System untersucht. Dabei wurde in Lungengewebe von Ratten, die mittels intratrachealer Instillation mit ultrafeinen CB-Partikeln behandelt wurden, ebenfalls eine signifikante Aktivierung von ERK1 und ERK2 beobachtet [vgl. 3.8]. Dementsprechend ist der in der vorliegenden Arbeit erstmals beschriebene CB-induzierte PI3-Kinase/AKT/ERK-Signalweg möglicherweise auch *in vivo* für krankhafte Effekte relevant, die von ultrafeinen Staubpartikeln auf die Atemwege ausgeübt werden. Diese neuen Erkenntnisse über die an der Feinstaub-induzierten Signaltransduktion beteiligten Komponenten liefern wichtige Hinweise für die zukünftige Risikoabschätzung von ultrafeinen Partikeln sowie für präventive Maßnahmen für anfällige Personengruppen. So könnte beispielsweise durch die Blockierung des PI3-Kinase/AKT/ERK-Signalweges die Induktion der Zellproliferation und damit die Entwicklung maligner Lungenerkrankungen, einschließlich Fibrose und Lungenkrebs möglicherweise verhindert werden.

## 5. Zusammenfassung

Die Inhalation granulärer Partikel kann eine Vielzahl von gesundheitsschädlichen Effekten, einschließlich Fibrose oder Lungenkrebs zur Folge haben. Ultrafeinen Partikeln kommt in diesem Zusammenhang eine besondere Bedeutung zu, da sie aufgrund ihrer großen Oberfläche eine erhöhte biologische Toxizität besitzen. Die Partikel induzieren durch direkte und indirekte Effekte unterschiedliche Signalwege, die in der Ausbildung pathogener Endpunkte resultieren können. Aufgrund seiner hohen proliferativen Kapazität gilt das Lungenepithel dabei als Zielgewebe für die Bildung von Lungentumoren. Bislang sind allerdings die Art der Interaktionen zwischen Partikeln und Epithelzellen sowie die durch ultrafeine Partikel ausgelösten Signalwege noch weitestgehend unverstanden.

Zur näheren Charakterisierung der Feinstaub-induzierten Signaltransduktion wurden daher in der vorliegenden Arbeit *in vitro* Effekte untersucht, die Verbrennungsgenerierte ultrafeine Kohlenstoff-Partikel (CB, Printex 90) auf eine alveolare Typ II Ratten Epithel-Zelllinie (RLE-6TN) ausüben. Dazu wurden molekularbiologische, proteinbiochemische und immunbiochemische Methoden eingesetzt. Durch die Untersuchung von Lungengeweben aus Ratten, die mittels intratrachealer Instillation mit CB behandelt wurden, stand das entsprechende *in vivo* System ebenfalls zur Verfügung.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit standen Analysen zur CB-induzierten Aktivierung von MAP-Kinasen und der Proteinkinase AKT. Diese Signalproteine sind relevant für die Induktion von Zellproliferation sowie für die Prävention von Apoptose. Daher spielen sie möglicherweise eine Rolle bei der Entwicklung maligner Lungenerkrankungen durch Feinstäube.

Nach der Behandlung von RLE-6TN Zellen mit ultrafeinen CB-Partikeln in einer nicht-zytotoxischen Konzentration von  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  wurde im Western Blot eine Zeit-abhängige Aktivierung von ERK1/2, JNK1/2, p38 und AKT beobachtet. Dabei ließen die einzelnen Signalproteine teilweise deutliche Unterschiede im Bezug auf den Zeitverlauf der Aktivierung erkennen. So zeigten die MAP-Kinasen JNK1/2 und p38 bereits nach 2 h eine Phosphorylierung. ERK1/2 und AKT hingegen wurden erst nach 8 h signifikant aktiviert.

Da Interaktionen der Partikel mit Oberflächenstrukturen der betroffenen Zielzellen als Auslöser für pathogene Endpunkte diskutiert werden, wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Beteiligung von Zelloberflächen-Rezeptoren untersucht. Durch die Blockierung des EGF-R mit Tyrphostin AG 1478 kam es sowohl zu einer signifikanten Abnahme der CB-induzierten frühen Aktivierung von JNK1/2 als auch der später auftretenden, simultanen Aktivierung von AKT und ERK1/2. Im Gegensatz dazu führte die Inhibition von Integrin-Rezeptoren mit dem RGD-Peptid oder einem spezifischen  $\beta_1$ -Integrin Antikörper lediglich zu einer reduzierten Phosphorylierung von AKT und ERK1/2. Die Aktivierung von JNK1/2 wurde



aber nicht beeinflusst. Damit konnte zum ersten Mal eine Beteiligung von Integrinen an der Feinstaub-induzierten Signaltransduktion nachgewiesen werden, die bislang nur im Rahmen der Asbest-vermittelten Signaltransduktion beschrieben wurde.

Als mögliche Verbindungspunkte zwischen EGF-R und Integrin-vermittelten Signalwegen wurden Signalproteine untersucht, die in den Fokalkontakten lokalisiert sind und direkt an die zytoplasmatische Domäne der  $\beta_1$ -Integrine binden können. Allerdings führte die Behandlung mit CB weder zu einer Autophosphorylierung der Fokaladhäsions-Kinase (FAK) noch zu Änderungen in der Expression sowie der enzymatischen Aktivität der „Integrin-linked kinase“ (ILK). Nach der dominant-negativen Überexpression der ILK mit Hilfe einer Kinase-inaktiven ILK-Mutante wurden zudem keine Veränderungen in der CB-induzierten Phosphorylierung von AKT und ERK1/2 beobachtet. Somit konnte eine Beteiligung der FAK und der ILK an der Feinstaub-induzierten Signaltransduktion nahezu ausgeschlossen werden.

Als weiteres potentiell Signalprotein bei der Vermittlung CB-induzierter Effekte wurde die PI3-Kinase untersucht, welche für die Aktivierung von AKT essentiell ist. Nach der Blockierung der PI3-Kinase mit Wortmannin oder LY 294002 wurde erwartungsgemäß eine reduzierte Phosphorylierung von AKT beobachtet. Darüber hinaus kam es aber auch zu einer signifikanten Abnahme der CB-induzierten Aktivierung von ERK1/2. Interessanterweise führte auch die Inhibition von AKT mit SH-5 sowie die dominant-negative Überexpression von AKT mit Hilfe einer Kinase-inaktiven AKT-Mutante zu einer reduzierten Phosphorylierung von ERK1 und ERK2.

Die weitere Untersuchung der Raf/MEK/ERK-Kaskade zeigte, dass die Behandlung mit CB nach 8 h zwar in einer Phosphorylierung von MEK1/2 resultierte, c-Raf aber nicht aktiviert wurde. Durch die Blockierung von MEK1/2 mit PD 98059 kam es zu einer signifikanten Reduktion der CB-induzierten Aktivierung von ERK1/2. Die Phosphorylierung von AKT wurde hingegen nicht beeinflusst. Diese Befunde und die Ergebnisse der AKT-Inhibition konnten damit erstmals den Einfluss von AKT auf die Raf/MEK/ERK-Kaskade unterhalb von c-Raf belegen.

In der Feinstaub-induzierten Signaltransduktion nimmt der AKT-Signalweg, der eine Prävention von Apoptose bewirkt, somit offenbar eine zentrale Funktion ein. Durch die Aktivierung von ERK1/2, die gemäß Literaturangaben zu einer erhöhten Zellproliferation führt, scheint AKT in dem untersuchten Zellsystem darüber hinaus essentiell für die Induktion von Zellproliferation zu sein.

In der vorliegenden Arbeit konnte in CB-behandelten Lungengewebe von Ratten ebenfalls eine Aktivierung von ERK1 und ERK2 beobachtet werden. Daher ist der hier erstmals beschriebene CB-induzierte PI3-Kinase/AKT/ERK-Signalweg möglicherweise auch für krankhafte Effekte von Staubpartikeln *in vivo* relevant.

## 6. Summary

Inhalation of granulous particles induces adverse health effects such as fibrosis or lung cancer. Due to their specific surface properties, ultrafine particles in particular are of high biological toxicity and induce different signal transduction pathways in both a direct and indirect manner. These pathways can result in the development of pathogenic endpoints. The lung epithelium is the target tissue for the formation of lung tumors, due to the high proliferative capacity of the epithelial cells. However, the nature of interactions between particles and epithelial cells as well as the molecular mechanisms and the involved signaling pathways, which are induced by ultrafine particles, are so far largely unknown.

To characterize the particle induced signal transduction *in vitro*, an alveolar type II epithelial cell line from rats (RLE-6TN) was treated with combustion-derived ultrafine carbon particles (CB, Printex 90), and the resulting effects were investigated by means of molecular biological, protein biochemical and immunological methods. In addition, tissue from an animal experiment, which was carried out independently from the present study, was available to represent the respective *in vivo* system.

The main focus of this study was the family of MAP-kinases and the protein kinase AKT, because these signaling proteins are relevant for the induction of cell proliferation as well as the prevention of apoptosis and thus are likely involved in the development of malignant lung diseases induced by ultrafine particles.

After treatment of RLE-6TN cells with ultrafine CB particles in a non-cytotoxic concentration ( $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) a time-dependent activation of ERK1/2, JNK1/2, p38 and AKT was observed by western blotting. In this process, the distinct signaling proteins revealed clear differences in the time course of phosphorylation, with JNK1/2 and p38 being already phosphorylated after 2 h while ERK1/2 and AKT displayed a significant activation only after 8 h treatment.

As interactions of particles with cell surface structures of the affected target cells have been discussed to be the starting point for the development of pathogenic endpoints, the involvement of cell surface receptors was further investigated. Inhibition of the EGF-R by Tyrphostin AG 1478 led to a significant decrease of the CB induced early activation of JNK1/2 as well as the later occurring, simultaneous activation of AKT and ERK1/2. On the other hand, blocking of integrin receptors with an RGD-peptide or a specific  $\beta_1$ -integrin antibody resulted in a reduced phosphorylation of AKT and ERK1/2 while the activation of JNK1/2 was unaltered. This finding is the first report that integrins are involved in signal transduction induced by granulous particles. So far, an involvement of integrins had only been described for fibrous asbestos induced signal transduction pathways.

As a possible link between EGF-R and integrin induced pathways, signaling molecules were investigated which are located at the focal adhesions and are known to bind to the cytoplasmic domain of  $\beta_1$ -integrins. However, treatment with CB resulted neither in an autophosphorylation of FAK nor in changes in the expression or the enzymatic activity of the ILK. Moreover, the dominant-negative overexpression of a kinase-dead ILK-mutant showed no changes in the CB induced phosphorylation of AKT and ERK1/2. Thus, an involvement of FAK and ILK on the particle induced signal transduction can likely be excluded.

As a further signaling protein the PI3-kinase was investigated, which is essential for the activation of AKT. Blocking of PI3-kinase by wortmannin or LY 294002 not only led to the expected reduction of AKT phosphorylation, but also resulted in a significant decrease of the CB induced activation of ERK1/2. Interestingly, inhibition of AKT by SH-5 as well as the dominant-negative overexpression of AKT by means of a kinase-dead AKT-mutant also caused a reduced phosphorylation of ERK1 and ERK2.

A closer look at the Raf/MEK/ERK-cascade revealed that treatment with ultrafine CB particles led to a phosphorylation of MEK1/2 after 8 h. However, c-Raf was not activated. Blocking of MEK1/2 by PD 98059 also resulted in a significant reduction of the CB induced activation of ERK1/2 while phosphorylation of AKT was not affected. Thus, these data together with the results from the AKT-inhibition assays, suggest for the first time an influence of AKT on the Raf/MEK/ERK-cascade downstream of c-Raf.

Accordingly, the anti-apoptotic AKT signaling pathway plays a central role in the signal transduction induced by ultrafine particles in a way that AKT seems to be essential for the induction of cell proliferation via activation of ERK1 and ERK2, at least in the investigated cell system.

In addition, an activation of ERK1/2 was also observed in CB treated lung tissues from rats. Consequently, the new CB-induced PI3-kinase/AKT/ERK-signaling pathway may be also relevant for adverse health effects induced by ultrafine particles *in vivo*.

## 7. Literaturverzeichnis

Abraham, E. (2005). AKT/protein kinase B. *Critical Care Medicine* **33** (12), S420-S422.

Adelsman, M.A., McCarthy, J.B., Shimizu, Y. (1999). Stimulation of beta1-integrin function by epidermal growth factor and heregulin-beta has distinct requirements for erbB2 but a similar dependence on phosphoinositide 3-OH kinase. *Molecular Biology of the Cell* **10** (9), 2861-2878.

Agazie, Y., Ischenko, I., Hayman, M. (2002). Concomitant activation of the PI3K-Akt and the Ras-ERK signaling pathways is essential for transformation by the V-SEA tyrosine kinase oncogene. *Oncogene* **21** (5), 697-707.

Albrecht, C., Borm, P.J., Adolf, B., Timblin, C.R., Mossman, B.T. (2002). *In vitro* and *in vivo* activation of extracellular signal-regulated kinases by coal dusts and quartz silica. *Toxicology and Applied Pharmacology* **184** (1), 37-45.

Albrecht, C., Borm, P.J., Unfried, K. (2004). Signal transduction pathways relevant for neoplastic effects of fibrous and non-fibrous particles. *Mutation Research* **553** (1-2), 23-35.

Alenghat, F.J., Ingber, D.E. (2002). Mechanotransduction: All signals point to cytoskeleton, matrix, and integrins. *Science's STKE: Signal transduction knowledge environment* **2002** (119), PE6.

Alessi, D.R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D.T., Saltiel, A.R. (1995). PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Biological Chemistry* **270** (46), 27489-27494.

Alessi, D.R., James, S.R., Downes, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B., Cohen, P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B alpha. *Current Biology* **7** (4), 261-269.

Almeida, E.A., Ilic, D., Han, Q., Hauck, C.R., Jin, F., Kawakatsu, H., Schlaepfer, D.D., Damsky, C.H. (2000). Matrix survival signaling: From fibronectin via focal adhesion kinase to c-Jun NH(2)-terminal kinase. *Journal of Cell Biology* **149** (3), 741-754.

Aplin, A.E., Howe, A., Alahari, S.K., Juliano, R.L. (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: The role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacological Reviews* **50** (2), 197-263.

Aplin, A.E., Juliano, R.L. (1999). Integrin and cytoskeletal regulation of growth factor signaling to the MAP kinase pathway. *Journal of Cell Science* **112** (5), 695-706.

Barlow, P.G., Clouter-Baker, A., Donaldson, K., MacCallum, J., Stone, V. (2005). Carbon black nanoparticles induce type II epithelial cells to release chemotaxins for alveolar macrophages. *Particle and Fibre Toxicology* **2** (11), 1-14.

Bates, R.C., Rankin, L.M., Lucas, C.M., Scott, J.L., Krissansen, G.W., Burns, G.F. (1991). Individual embryonic fibroblasts express multiple beta chains in association with the alpha v integrin subunit. Loss of beta 3 expression with cell confluence. *Journal of Biological Chemistry* **266** (28), 18593-18599.

Beck-Speier, I., Dayal, N., Karg, E., Maier, K.L., Schumann, G., Schulz, H., Semmler, M., Takenaka, S., Stettmaier, K., Bors, W., Ghio, A., Samet, J.M., Heyder, J. (2005). Oxidative stress and lipid mediators induced in alveolar macrophages by ultrafine particles. *Free Radical Biology and Medicine* **38** (8), 1080-1092.

Becker, A., Albrecht, C., Schins, R., Knaapen, A., Höhr, D., Unfried, K., Borm, P.J.A. (2002). *In vivo* and *in vitro* expression of CYP1A1 in rat epithelial cells after instillation of quartz. *Annals of Occupational Hygiene* **46** (1), 31-34.

Berken, A., Abel, J., Unfried, K. (2003). Beta1-integrin mediates asbestos-induced phosphorylation of AKT and ERK1/2 in a rat pleural mesothelial cell line. *Oncogene* **22** (52), 8524-8528.

Blanchet, S., Ramgolam, K., Marano, F., Bgeza-Squiban, A. (2004). Fine particulate matter induces amphiregulin secretion by bronchial epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **30** (4), 421-427.

Borm, P.J., Kreyling, W. (2004). Toxicological hazards of inhaled nanoparticles. Potential implications for drug delivery. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **4** (5), 521-531.

Boulares, A.H., Contreras, F.J., Espinoza, L.A., Smulson, M.E. (2002). Roles of oxidative stress and glutathione depletion in JP-8 jet fuel-induced apoptosis in rat lung epithelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* **180 (2)**, 92-99.

Brazil, D.P., Hemmings, B.A. (2001). Ten years of protein kinase B signalling: A hard Akt to follow. *Trends in Biochemical Sciences* **26 (11)**, 657-664.

Brockbank, E.C., Bridges, J., Marshall, C.J., Sahai, E. (2005). Integrin beta1 is required for the invasive behaviour but not proliferation of squamous cell carcinoma cells *in vivo*. *British Journal of Cancer* **92 (1)**, 102-112.

Brodie, C., Blumberg, P.M. (2003). Regulation of cell apoptosis by protein kinase C delta. *Apoptosis* **8 (1)**, 19-27.

Brook, R.D., Franklin, B., Cascio, W., Hong, Y., Howard, G., Lipsett, M., Luepker, R., Mittleman, M., Samet, J., Smith, S.C. Jr., Tager, I. (2004). Air pollution and cardiovascular disease: A statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. *Circulation* **109 (21)**, 2655-2671.

Brown, D.M., Stone, V., Findlay, P., MacNee, W., Donaldson, K. (2000). Increased inflammation and intracellular calcium caused by ultrafine carbon black is independent of transition metals or other soluble components. *Occupational and Environmental Medicine* **57 (10)**, 685-691.

Brown, D.M., Wilson, M.R., MacNee, W., Stone, V., Donaldson, K. (2001). Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: A role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicology and Applied Pharmacology* **175 (3)**, 191-199.

Brown, D.M., Donaldson, K., Borm, P.J., Schins, R.P., Dehnhardt, M., Gilmour, P., Jimenez, L.A., Stone, V. (2004). Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF-alpha cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles. *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology* **286 (2)**, L344-L353.

Buder-Hoffmann, S., Palmer, C., Vacek, P., Taatjes, D., Mossman, B. (2001). Different accumulation of activated extracellular signal-regulated kinases (ERK 1/2) and role in cell-cycle alterations by epidermal growth factor, hydrogen peroxide, or asbestos in pulmonary epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **24 (4)**, 405-413.

Carvalho, H., Evelson, P., Sigaud, S., Gonzalez-Flecha, B. (2004). Mitogen-activated protein kinases modulate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in primary rat alveolar epithelial cells. *Journal of Cellular Biochemistry* **92 (3)**, 502-513.

Chang, F., Lee, J.T., Navolanic, P.M., Steelmann, L.S., Shelton, J.G., Blalock, W.L., Franklin, R.A., McCubrey, J.A. (2003). Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia* **17 (3)**, 590-603.

Chen, H., Huang, X.N., Stewart, A.F., Sepulveda, J.L. (2004). Gene expression changes associated with fibronectin-induced cardiac myocyte hypertrophy. *Physiological Genomics* **18 (3)**, 273-283.

Cheresh, D.A. (1987). Human endothelial cells synthesize and express an Arg-Gly-Asp-directed adhesion receptor involved in attachment to fibrinogen and von Willebrand factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84 (18)**, 6471-6475.

Cobb, M.H. (1999). MAP kinase pathways. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **71 (3-4)**, 479-500.

Cobb, M.H., Goldsmith, E.J. (1995). How MAP kinases are regulated. *Journal of Biological Chemistry* **270 (25)**, 14843-14846.

Coffer, P.J., Jin, J., Woodgett, J.R. (1998). Protein kinase B (c-Akt): A multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochemical Journal* **335 (1)**, 1-13.

Coppola, D., Szabo, M., Boulware, D., Muraca, P., Alsarraj, M., Chambers, A.F., Yeatman, T.J. (2004). Correlation of osteopontin protein expression and pathological stage across a wide variety of tumor histologies. *Clinical Cancer Research* **10 (1)**, 184-190.

Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., Hemmings, B.A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378 (6559)**, 785-789.

Crowe, D.L., Ohannessian, A. (2004). Recruitment of focal adhesion kinase and paxillin to beta1 integrin promotes cancer cell migration via mitogen activated protein kinase activation. *BMC Cancer* **4**, 18.

Cruet-Hennequart, S., Maubant, S., Luis, J., Gauduchon, P., Staedel, C., Dedhar, S. (2003). Alpha(v) integrins regulate cell proliferation through integrin-linked kinase (ILK) in ovarian cancer cells. *Oncogene* **22 (11)**, 1688-1702.

Danen, E.H., Yamada, K.M. (2001). Fibronectin, integrins, and growth control. *Journal of Cellular Physiology* **189 (1)**, 1-13.

Datta, S.R., Brunet, A., Greenberg, M.E. (1999). Cellular survival: A play in three Akts. *Genes & Development* **13 (22)**, 2905-2927.

Decker, S.J. (1993). Transmembrane signaling by epidermal growth factor receptors lacking autophosphorylation sites. *Journal of Biological Chemistry* **268 (13)**, 9176-9179.

Dedhar, S. (2000). Cell-substrate interactions and signaling through ILK. *Current Opinion in Cell Biology* **12 (2)**, 250-256.

de Hartog, J.J., Hoek, G., Peters, A., Timonen, K.L., Ibaldo-Mulli, A., Brunekreef, B., Heinrich, J., Tiittanen, P., van Wijnen, J.H., Kreyling, W., Kulmala, M., Pekkanen, J. (2003). Effects of fine and ultrafine particles on cardiorespiratory symptoms in elderly subjects with coronary heart disease: The ULTRA study. *American Journal of Epidemiology* **157 (7)**, 613-623.

Delcommenne, M., Tan, C., Gray, V., Rue, L., Woodgett, J., Dedhar, S. (1998). Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95 (19)**, 11211-11216.

Doble, B.W., Woodgett, J.R. (2003). GSK-3: Tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *Journal of Cell Science* **116 (7)**, 1175-1186.



Donaldson, K., Stone, V., Clouter, A., Renwick, L., MacNee, W. (2001). Ultrafine particles. *Occupational and Environmental Medicine* **58 (3)**, 211-216.

Donaldson, K., Stone, V. (2003). Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* **39 (3)**, 405-410.

Donaldson, K., Tran, L., Jimenez, L.A., Duffin, R., Newby, D.E., Mills, N., MacNee, W., Stone, V. (2005). Combustion-derived nanoparticles: A review of their toxicology following inhalation exposure. *Particle and Fibre Toxicology* **2 (10)**, 1-14.

Driscoll, K.E., Carter, J.M., Iype, P.T., Kumari, H.L., Crosby, L.L., Aardema, M.J., Isfort, R.J., Cody, D., Chestnut, M.H., Burns, J.L., LeBoeuf, R.A. (1995). Establishment of immortalized alveolar type II epithelial cell lines from adult rats. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Animal* **31 (7)**, 516-527.

Driscoll, K.E., Carter, J.M., Howard, B.W., Hassenbein, D.G., Pepelko, W., Baggs, R.B., Oberdörster, G. (1996). Pulmonary inflammatory, chemokine, and mutagenic responses in rats after subchronic inhalation of carbon black. *Toxicology and Applied Pharmacology* **136 (2)**, 372-380.

Driscoll, K.E., Deyo, L.C., Carter, J.M., Howard, B.W., Hassenbein, D.G., Bertram, T.A. (1997). Effects of particle exposure and particle-elicited inflammatory cells on mutation in rat alveolar epithelial cells. *Carcinogenesis* **18 (2)**, 423-430.

Driscoll, K.E., Carter, J.M., Borm, P.J. (2002). Antioxidant defense mechanisms and the toxicity of fibrous and nonfibrous particles. *Inhalation Toxicology* **14 (1)**, 101-118.

Dudley, D.T., Pang, L., Decker, S.J., Bridges, A.J., Saltiel, A.R. (1995). A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92 (17)**, 7686-7689.

Eickmann, T., Seitz, H. (2002). Klein, aber oho! Von der zunehmenden Bedeutung der Feinstäube. *Umweltmedizin in Forschung und Praxis* **7 (2)**, 63-65.

Eliceiri, B.P. (2001). Integrin and growth factor receptor crosstalk. *Circulation Research* **89 (12)**, 1104-1110.

- Faraldo, M.M., Deugnier, M.A., Thiery, J.P., Glukhova, M.A. (2001). Growth defects induced by perturbation of beta1-integrin function in the mammary gland epithelium results from a lack of MAPK activation via the Shc and Akt pathways. *EMBO Reports* **2** (5), 431-437.
- Faux, S.P., Houghton, C.E., Hubbard, A., Patrick, G. (2000). Increased expression of epidermal growth factor receptor in rat pleural mesothelial cells correlates with carcinogenicity of mineral fibres. *Carcinogenesis* **21** (12), 2275-2280.
- Feng J., Park, J., Cron, P., Hess, D., Hemmings, B.A. (2004). Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* **279** (39), 41189-41196.
- Fickova, M. (2002). Structure and activation of EGF receptor: Minireview. *Endocrine Regulations* **36** (2), 87-93.
- Frame, S., Cohen, P. (2001), GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochemical Journal* **359** (1), 1-16.
- Franke, T.F., Yang, S.I., Chan, T.O., Datta, K., Kazlauskas, A., Morrison, D.K., Kaplan, D.R., Tsichlis, P.N. (1995). The protein kinase encoded by the *Akt* proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* **81** (5), 727-736.
- Fubini, B. (1997). Surface reactivity in the pathogenic response to particulates. *Environmental Health Perspectives* **105** (5), 1013-1020.
- Fukuda, T., Guo, L., Shi, X., Wu, C. (2003). CH-ILKBP regulates cell survival by facilitating the membrane translocation of protein kinase B/Akt. *Journal of Cell Biology* **160** (7), 1001-1008.
- Gary, D.S., Milhavel, O., Camandola, S., Mattson, M.P. (2003). Essential role for integrin linked kinase in Akt-mediated integrin survival signaling in hippocampal neurons. *Journal of Neurochemistry* **84** (4), 878-890.
- Geiser, M., Rothen-Rutishauser, B., Kapp, N., Schurch, S., Kreyling, W., Schulz, H., Semmler, M., Im Hof, V., Heyder, J., Gehr, P. (2005). Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environmental Health Perspectives* **113** (11), 1555-1560.

- Genersch, E., Schuppan, D., Lichtner, R.B. (1996). Signaling by epidermal growth factor differentially affects integrin-mediated adhesion of tumor cells to extracellular matrix proteins. *Journal of Molecular Medicine* **74 (10)**, 609-616.
- Giancotti, F.G., Ruoslahti, E. (1999). Integrin signaling. *Science* **285 (5430)**, 1028-1032.
- Gilliland, F.D., Li, Y.F., Saxon, A., Diaz-Sanchez, D. (2004). Effect of glutathione-S-transferase M1 and P1 genotypes on xenobiotic enhancement of allergic responses: Randomised, placebo-controlled crossover study. *The Lancet* **363 (9403)**, 119-125.
- Giuffrida, A., Vianale, G., Di Muzio, M., Pass, H.I., Coletti, A., Birarelli, P., Procopio, A., Modesti, A. (1999). Modulation of integrin expression on mesotheliomas: The role of different histotypes in invasiveness. *International Journal of Oncology* **15 (3)**, 437-442.
- Godschalk, R.W., Moonen, E.J., Schilderman, P.A., Broekmans, W.M., Kleinjans, J.C., van Schooten, F.J. (2000). Exposure-route-dependent DNA adduct formation by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis* **21 (1)**, 87-92.
- Grashoff, C., Aszodi, A., Sakai, T., Hunziker, E.B., Fassler, R. (2003). Integrin-linked kinase regulates chondrocyte shape and proliferation. *EMBO Reports* **4 (4)**, 432-438.
- Hannigan, G.E., Leung-Hagesteijn, C., Fitz-Gibbon, L., Coppolino, M.G., Radeva, G., Filmus, J., Bell, J.C., Dedhar, S. (1996). Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* **379 (6560)**, 91-96.
- Hao, H., Wendt, C.H., Sandhu, G., Ingbar, D.H. (2003). Dexamethasone stimulates transcription of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase  $\beta_1$  gene in adult rat lung epithelial cells. *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology* **285 (3)**, L593-L601.
- Harrison, R.M., Smith, D.J., Kibble, A.J. (2004). What is responsible for the carcinogenicity of PM<sub>2.5</sub>? *Occupational and Environmental Medicine* **61 (10)**, 799-805.
- Hauck, C.R., Klingbeil, C.K., Schlaepfer, D.D. (2000). Focal adhesion kinase functions as a receptor-proximal signaling component required for directed cell migration. *Immunological Research* **21 (2-3)**, 293-303.

Hauck, C.R., Hunter, T., Schlaepfer, D.D. (2001). The v-Src SH3 domain facilitates a cell adhesion-independent association with focal adhesion kinase. *Journal of Biological Chemistry* **276** (21), 17653-17662.

Hauck, C.R., Hsia, D.A., Schlaepfer, D.D. (2002). The focal adhesion kinase – A regulator of cell migration and invasion. *IUBMB Life* **53** (2), 115-119.

Heino, J., Ignatz, R.A., Hemler, M.E., Crouse, C., Massague, J. (1989). Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor-beta. Concomitant regulation of integrins that share a common beta 1 subunit. *Journal of Biological Chemistry* **264** (1), 380-388.

Heinrich, U., Fuhst, R., Rittinghausen, S., Creutzenberg, O., Bellmann, B., Koch, W., Levens, K. (1995). Chronic inhalation exposure of Wistar rats and two different strains of mice to diesel engine exhaust, carbon black, and titanium dioxide. *Inhalation Toxicology* **7**, 533-556.

Hoet, P.H., Brüske-Hohlfeld, I., Salata, O.V. (2004). Nanoparticles – known and unknown health risks. *Journal of Nanobiotechnology* **2** (12), 1-15.

Hynes, R.O. (1992). Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69** (1), 11-25.

Janat, M.F., Argraves, W.S., Liao, G. (1992). Regulation of vascular smooth muscle cell integrin expression by transforming growth factor beta1 and by platelet-derived growth factor-BB. *Journal of Cellular Physiology* **151** (3), 588-595.

Janssen, Y.M., Driscoll, K.E., Howard, B., Quinlan, T.R., Treadwell, M., Barchowsky, A., Mossman, B.T. (1997). Asbestos causes translocation of p65 protein and increases NF-kappa B DNA binding activity in rat lung epithelial and pleural mesothelial cells. *American Journal of Pathology* **151** (2), 389-401.

Jimenez, L.A., Zanella, C., Fung, H., Janssen, Y.M., Vacek, P., Charland, C., Goldberg, J., Mossman, B.T. (1997). Role of extracellular signal-regulated protein kinases by asbestos and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology* **273** (5), L1029-L1035.

Johnson, G.L., Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **298** (5600), 1911-1912.

Jorissen, R.N., Walker, F., Pouliot, N., Garret, T.P., Ward, C.W., Burgess, A.W. (2003). Epidermal growth factor receptor: Mechanisms of activation and signalling. *Experimental Cell Research* **284** (1), 31-53.

Juliano, R.L., Haskill, S. (1993). Signal transduction from the extracellular matrix. *Journal of Cell Biology* **120** (3), 577-585.

King, W.G., Mattaliano, M.D., Chan, T.O., Tsichlis, P.N., Brugge, J.S. (1997). Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation. *Molecular and Cellular Biology* **17** (8), 4406-4418.

Knaapen, A.M., Borm, P.J., Albrecht, C., Schins, R.P. (2004). Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms. *International Journal of Cancer* **109** (6), 799-809.

Kobayashi, T., Cohen, P. (1999). Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositide 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2. *Biochemical Journal* **339** (Pt 2), 319-328.

König, W., Sund, M., Fröhlich, M., Fischer, H.G., Lowel, H., Doring, A., Hutchinson, W.L., Pepys, M.B. (1999). C-Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: Results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation* **99** (2), 237-242.

Kornberg, L., Earp, H.S., Parsons, J.T., Schaller, M., Juliano, R.L. (1992). Cell adhesion or integrin clustering increases phosphorylation of a focal adhesion-associated tyrosine kinase. *Journal of Biological Chemistry* **267** (33), 23439-23442.

Kozikowski, A.P., Sun, H., Brognard, J., Dennis, P.A. (2003). Novel PI analogues selectively block activation of the pro-survival serine/threonine kinase Akt. *Journal of the American Chemical Society* **125** (5), 1144-1145.

Krug, H.F., Kern, K., Diabaté, S. (2004). Toxikologische Aspekte der Nanotechnologie. Versuch einer Abwägung. *Technikfolgenabschätzung – Theorie und Praxis* **2**, 58-64.

- Kuwada, S.K., Li, X. (2000). Integrin alpha5/beta1 mediates fibronectin-dependent epithelial cell proliferation through epidermal growth factor receptor activation. *Molecular Biology of the Cell* **11** (7), 2485-2496.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (5259), 680-685.
- Lafrenie, R.M., Yamada, K.M. (1996). Integrin-dependent signal transduction. *Journal of Cellular Biochemistry* **61** (4), 543-553.
- Lee, J.W., Juliano, R.L. (2002). The alpha5beta1 integrin selectively enhances epidermal growth factor signalling to the phosphatidylinositol-3-kinase/Akt pathway in intestinal epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1542** (1-3), 23-31.
- Lee, J.W., Juliano, R. (2004). Mitogenic signal transduction by integrin- and growth factor receptor-mediated pathways. *Molecules and Cells* **17** (2), 188-202.
- Lee, V.Y., Schroedl, C., Brunelle, J.K., Buccellato, L.J., Akinci, O.I., Kaneto, H., Snyder, C., Eisenbart, J., Budinger, G.R., Chandel, N.S. (2005). Bleomycin induces alveolar epithelial cell death through JNK-dependent activation of the mitochondrial death pathway. *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology* **289** (4), L521-L528.
- Li, S., Kim, M., Hu, Y.L., Jalali, S., Schlaepfer, D.D., Hunter, T., Chien, S., Shyy, J.Y. (1997). Fluid shear stress activation of focal adhesion kinase. Linking to mitogen-activated protein kinases. *Journal of Biological Chemistry* **272** (48), 30455-30462.
- 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. *Journal of Immunology* **169** (8), 4531-4541.
- Liaw, Y.S., Yu, C.J., Shun, C.T., Lee, Y.C., Kuo, S.H., Luh, K.T., Yang, P.C. (2001). Expression of integrins in human cultured mesothelial cells: The roles in cell-to-extracellular matrix adhesion and inhibition by RGD-containing peptide. *Respiratory Medicine* **95** (3), 221-226.

- Lin, T.H., Aplin, A.E., Shen, Y., Chen, Q., Schaller, M., Romer, L., Aukhil, I., Juliano, R.L. (1997). Integrin-mediated activation of MAP kinase is independent of FAK: Evidence for dual integrin signaling pathways in fibroblasts. *Journal of Cell Biology* **136** (6), 1385-1395.
- Lin, X., Bohle, A.S., Dohrmann, P., Leuschner, I., Schulz, A., Kremer, B., Fandrich, F. (2001). Overexpression of phosphatidylinositol 3-kinase in human lung cancer. *Langenbeck's Archives of Surgery* **386** (4), 293-301.
- Liu, W., Ernst, J.D., Broaddus, V.C. (2000). Phagocytosis of crocidolite asbestos induces oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in mesothelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **23** (3), 371-378.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193** (1), 265-275.
- Lukashev, M.E., Werb, Z. (1998). ECM signalling: Orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends in Cell Biology* **8** (11), 437-441.
- Lynch, D.K., Ellis, C.A., Edwards, P.A., Hiles, I.D. (1999). Integrin-linked kinase regulates phosphorylation of serine 473 of protein kinase B by an indirect mechanism. *Oncogene* **18** (56), 8024-8032.
- Ma, C., Wang, J., Luo, J. (2004). Activation of nuclear factor kappa B by diesel exhaust particles in mouse epidermal cells through phosphatidylinositol 3-kinases/Akt signaling pathway. *Biochemical Pharmacology* **67** (10), 1975-1983.
- Maeng, S.H., Chung, H.W., Yu, I.J., Kim, H.Y., Lim, C.H., Kim, K.J., Kim, S.J., Ootsuyama, Y., Kasai, H. (2003). Changes of 8-OH-dG levels in DNA and its base excision repair activity in rat lungs after inhalation exposure to hexavalent chromium. *Mutation Research* **539** (1-2), 109-116.
- Mason, C.S., Springer, C.J., Cooper, R.G., Superti-Furga, G., Marshall, C.J., Marais, R. (1999). Serine and tyrosine phosphorylation cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *The EMBO Journal* **18** (8), 2137-2148.

Matsuo, M., Shimada, T., Uenishi, R., Sasaki, N., Sagai, M. (2003). Diesel exhaust particle-induced cell death of cultured normal human bronchial epithelial cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **26 (4)**, 438-447.

Mayadas, T.N., Cullere, X. (2005). Neutrophil beta2 integrins: Moderators of life or death decisions. *Trends in Immunology* **26 (7)**, 388-395.

Michov, B. (1995). Blotting der Proteine. In: Elektrophorese: Theorie und Praxis. Gruyter, W. (ed.), Berlin, New York, 270-281.

Miyamoto, S., Teramoto, H., Gutkind, J.S., Yamada, K.M. (1996). Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: Roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *Journal of Cell Biology* **135 (6)**, 1633-1642.

Moro, L., Venturino, M., Bozzo, C., Silengo, L., Altruda, F., Bequinot, L., Tarone, G., 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.

Moro, L., Dolce, L., Cabodi, S., Bergatto, E., Erba, E.B., Smeriglio, M., Turco, E., Retta, S.F., Giuffrida, M.G., Venturino, M., Godovac-Zimmermann, J., Conti, A., Schäfer, E., Bequinot, L., Tacchetti, C., Gaggini, P., Silengo, L., Tarone, G., Defilippi, P. (2002). Integrin-induced epidermal growth factor (EGF) receptor activation requires c-Src and p130Cas and leads to phosphorylation of specific EGF receptor tyrosines. *Journal of Biological Chemistry* **277 (11)**, 9405-9414.

Mukhopadhyay, N.K., Gordon, G.J., Chen, C.J., Bueno, R., Sugarbaker, D.J., Jaklitsch, M.T. (2005). Activation of focal adhesion kinase in human lung cancer cells involves multiple and potentially parallel signaling events. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **9 (2)**, 387-397.

Nemmar, A., Vanbilloen, H., Hoylaerts, M.F., Hoet, P.H., Verbruggen, A., Nemery, B. (2001). Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **164 (9)**, 1665-1668.



- Nemmar, A., Hoet, P.H., Vanquickenborne, B., Dinsdale, D., Thomeer, M., Hoylaerts, M.F., Vanbilloen, H., Mortelmans, L., Nemery, B. (2002). Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* **105** (4), 411-414.
- New, L., Han, J. (1998). The p38 MAP kinase pathway and its biological function. *Trends in Cardiovascular Medicine* **8** (5), 220-228.
- Nguyen, T.T., Ward, J.P., Hirst, S.J. (2005). Beta1-integrins mediate enhancement of airway smooth muscle proliferation by collagen and fibronectin. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **171** (3), 217-223.
- Oberdörster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Lunts, A., Kreyling, W., Cox, C. (2002). Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A* **65** (20), 1531-1543.
- 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.
- Oktay, M., Wary, K.K., Dans, M., Birge, R.B., Giancotti, F.G. (1999). Integrin-mediated activation of focal adhesion kinase is required for signaling to Jun NH2-terminal kinase and progression through the G1 phase of the cell cycle. *Journal of Cell Biology* **145** (7), 1461-1469.
- Oshero, N., Levitzki, A. (1994). Epidermal-growth-factor-dependent activation of the src-family kinases. *European Journal of Biochemistry* **225** (3), 1047-1053.
- Pache, J.C., Janssen, Y.M., Walsh, E.S., Quinlan, T.R., Zanella, C.L., Low, R.B., Taatjes, D.J., Mossman, B.T. (1998). Increased epidermal growth factor-receptor protein in a human mesothelial cell line in response to long asbestos fibers. *American Journal of Pathology* **152** (2), 333-340.
- Penttinen, P., Timonen, K.L., Tiittanen, P., Mirme, A., Ruuskanen, J., Pekkanen, J. (2001). Ultrafine particles in urban air and respiratory health among adult asthmatics. *European Respiratory Journal* **17** (3), 428-435.

- Perderiset, M., Marsh, J.P., Mossman, B.T. (1991). Activation of protein kinase C by crocidolite asbestos in hamster tracheal epithelial cells. *Carcinogenesis* **12 (8)**, 1499-1502.
- Persad, S., Attwell, S., Gray, V., Mawji, N., Deng, J.T., Leung, D., Yan, J., Sanghera, J., Walsh, M.P., Dedhar, S. (2001). Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: Critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343. *Journal of Biological Chemistry* **276 (29)**, 27462-27469.
- Persad, S., Dedhar, S. (2003). The role of integrin-linked kinase (ILK) in cancer progression. *Cancer Metastasis Reviews* **22 (4)**, 375-384.
- Peters, A., Wichmann, H.E., Tuch, T., Heinrich, J., Heyder, J. (1997). Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **155 (4)**, 1376-1383.
- Peters, A., Dockery, D.W., Muller, J.E., Mittleman, M.A. (2001). Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction. *Circulation* **103 (23)**, 2810-2815.
- Plas, D.R., Thompson, C.B. (2005). Akt-dependent transformation: There is more to growth than just surviving. *Oncogene* **24 (50)**, 7435-7442.
- Pope, C.A., Burnett, R.T., Thurston, G.D., Thun, M.J., Calle, E.E., Krewski, D., Godleski, J.J. (2004). Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: Epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation* **109 (1)**, 71-77.
- Raingaud, J., Gupta, S., Rogers, J.S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R.J., Davis, R.J. (1995). Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *Journal of Biological Chemistry* **270 (13)**, 7420-7426.
- Ramos-Nino, M.E., Scapoli, L., Martinelli, M., Land, S., Mossman, B.T. (2003). Microarray analysis and RNA silencing link fra-1 to cd44 and c-met expression in mesothelioma. *Cancer Research* **63 (13)**, 3539-3545.

Renshaw, M.W., Price, L.S., Schwartz, M.A. (1999). Focal adhesion kinase mediates the integrin signaling requirement for growth factor activation of MAP kinase. *Journal of Cell Biology* **147** (3), 611-618.

Renwick, L.C., Brown, D., Clouter, A., Donaldson, K. (2004). Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types. *Occupational and Environmental Medicine* **61** (5), 442-447.

Richardson, A., Parsons, J.T. (1995). Signal transduction through integrins: A central role for focal adhesion kinase? *Bioessays* **17** (3), 229-236.

Roberts, C.J., Birkenmeier, T.M., McQuillan, J.J., Akiyama, S.K., Yamada, S.S., Chen, W.T., Yamada, K.M., McDonald, J.A. (1988). Transforming growth factor beta stimulates the expression of fibronectin and of both subunits of the human fibronectin receptor by cultured human lung fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* **263** (10), 4586-4592.

Romer, L.H., McLean, N., Turner, C.E., Burrige, K. (1994). Tyrosine kinase activity, cytoskeletal organization, and motility in human vascular endothelial cells. *Molecular Biology of the Cell* **5** (3), 349-361.

Rommel, C., Clarke, B.A., Zimmermann, S., Nunez, L., Rossmann, R., Reid, K., Moelling, K., Yancopoulos, G.D., Glass, D.J. (1999). Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science* **286** (5445), 1738-1741.

Routledge, H.C., Ayres, J.G., Townend, J.N. (2003). Why cardiologists should be interested in air pollution. *Heart* **89** (12), 1383-1388.

Rul, W., Zugasti, O, Roux, P., Peyssonnaud, C., Eychene, A., Franke, T.F., Lenormand, P., Fort, P., Hibner, U. (2002). Activation of ERK, controlled by Rac1 and Cdc42 via Akt, is required for anoikis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **973**, 145-148.

Ruoslahti, E., Pierschbacher, M.D. (1987). New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* **238** (4826), 491-497.

- Sakai, T., Li, S., Docheva, D., Grashoff, C., Sakai, K., Kostka, G., Braun, A., Pfeifer, A., Yurchenco, P.D., Fassler, R. (2003). Integrin-linked kinase (ILK) is required for polarizing the epiblast, cell adhesion and controlling actin accumulation. *Genes & Development* **17 (7)**, 926-940.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual 1-3. 2<sup>nd</sup> Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanders, M.A., Basson, M.D. (2000). Collagen IV-dependent ERK activation in human Caco-2 intestinal epithelial cells requires focal adhesion kinase. *Journal of Biological Chemistry* **275 (48)**, 38040-38047.
- Sandhu, H., Olbrück, H., Abel, J., Unfried, K. (2000a). Differential display analysis of fiber-induced carcinogenesis in rat: Clue for involvement of integrin-mediated signal transduction. *Inhalation Toxicology* **12**, 337-343.
- Sandhu, H., Dehnen, W., Roller, M., Abel, J., Unfried, K. (2000b). mRNA expression patterns in different stages of asbestos-induced carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* **21 (5)**, 1023-1029.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74 (12)**, 5463-5467.
- Schlaepfer, D.D., Hunter, T. (1997). Focal adhesion kinase overexpression enhances ras-dependent integrin signaling to ERK2/mitogen-activated protein kinase through interactions with and activation of c-Src. *Journal of Biological Chemistry* **272 (20)**, 13189-13195.
- Schwartz, M.A., Assoian, R.K. (2001). Integrins and cell proliferation: Regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. *Journal of Cell Science* **114 (Pt 14)**, 2553-2560.
- Seales, E.C., Jurado, G.A., Brunson, B.A., Wakefield, J.K., Frost, A.R., Bellis, S.L. (2005). Hypersialylation of beta1 integrins, observed in colon adenocarcinoma, may contribute to cancer progression by up-regulating cell motility. *Cancer Research* **65 (11)**, 4645-4652.

Seidler, J., Durzok, R., Brakebusch, C., Cordes, N. (2005). Interactions of the integrin subunit beta1A with protein kinase B/Akt, p130Cas and paxillin contribute to regulation of radiation survival. *Radiotherapy and Oncology* **76** (2), 129-134.

Shah, A., Swain, W.A., Richardson, D., Edwards, J., Stewart, D.J., Richardson, C.M., Swinson, D.E., Patel, D., Jones, J.L., O'Byrne, K.J. (2005). Phospho-akt expression is associated with a favourable outcome in non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research* **11** (8), 2930-2936.

Sheppard, D., Cohen, D.S., Wang, A., Busk, M. (1992). Transforming growth factor beta differentially regulates expression of integrin subunits in guinea pig airway epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* **267** (24), 17409-17414.

Shukla, A., Timblin, C., Berube, K., Gordon, T., McKinney, W., Driscoll, K., Vacek, P., Mossman, B.T. (2000). Inhaled particulate matter causes expression of nuclear factor (NF)-kappaB-related genes and oxidant-dependent NF-kappaB activation *in vitro*. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **23** (2), 182-187.

Shukla, A., Timblin, C.R., Hubbard, A.K., Bravman, J., Mossman, B.T. (2001). Silica-induced activation of c-Jun-NH2-terminal amino kinases, protracted expression of the activator protein-1 proto-oncogene, fra-1, and S-phase alterations are mediated via oxidative stress. *Cancer Research* **61** (5), 1791-1795.

Shukla, A., Stern, M., Lounsbury, K.M., Flanders, T., Mossman, B.T. (2003). Asbestos-induced apoptosis is protein kinase C delta-dependent. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **29** (2), 198-205.

Sieg, D.J., Ilic, D., Jones, K.C., Damsky, C.H., Hunter, T., Schlaepfer, D.D. (1998). Pyk2 and Src-family protein-tyrosine kinases compensate for the loss of FAK in fibronectin-stimulated signaling events but Pyk2 does not fully function to enhance FAK-cell migration. *EMBO Journal* **17** (20), 5933-5947.

Silbajoris, R., Ghio A.J., Samet, J.M., Jaskot, R., Dreher, K.L., Brighton, L.E. (2000). *In vivo* and *in vitro* correlation of pulmonary MAP kinase activation following metallic exposure. *Inhalation Toxicology* **12** (6), 453-458.

Smith, J.W., Vestal, D.J., Irwin, S.V., Burke, T.A., Cheresch, D.A. (1990). Purification and functional characterization of integrin alpha v beta 5. An adhesion receptor for vitronectin. *Journal of Biological Chemistry* **265 (19)**, 11008-11013.

Somers, C.M., McCarry, B.E., Malek, F., Quinn, J.S. (2004). Reduction of particulate air pollution lowers the risk of heritable mutations in mice. *Science* **304 (5673)**, 1008-1010.

Srivastava, A.K. (1998). Use of pharmacological agents in elucidating the mechanism of insulin action. *Trends in Pharmacological Sciences* **19 (6)**, 205-209.

Stone, V., Shaw, J., Brown, D.M., MacNee, W., Faux, S.P., Donaldson, K. (1998). The role of oxidative stress in the prolonged inhibitory effect of ultrafine carbon black on epithelial cell function. *Toxicology In vitro* **12**, 649-659.

Stone, V., Tuinman, M., Vamvakopoulos, J.E., Shaw, J., Brown, D., Petterson, S., Faux, S.P., Borm, P., MacNee, W., Michaelangeli, F., Donaldson, K. (2000). Increased calcium influx in a monocytic cell line on exposure to ultrafine carbon black. *European Respiratory Journal* **15 (2)**, 297-303.

Su, B., Karin, M. (1996). Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Current Opinion in Immunology* **8 (3)**, 402-411.

Swain, W.A., O'Byrne, K.J., Faux, S.P. (2004). Activation of p38 MAP kinase by asbestos in rat mesothelial cells is mediated by oxidative stress. *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology* **286 (4)**, L859-L865.

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.

Takizawa, H., Ohtoshi, T., Kawasaki, S., Kohyama, T., Desaki, M., Kasama, T., Kobayashi, K., Nakahara, K., Yamamoto, K., Matsushima, K., Kudoh, S. (1999). Diesel exhaust particles induce NF-kappa B activation in human bronchial epithelial cells *in vitro*: Importance in cytokine transcription. *Journal of Immunology* **162 (8)**, 4705-4711.

- Tamaoki, J., Isono, K., Takeyama, K., Tagaya, E., Nakata, J., Nagai, A. (2004). Ultrafine carbon black particles stimulate proliferation of human airway epithelium via EGF receptor-mediated signaling pathway. *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology* **287** (6), L1127-L1133.
- Thannickal, V.J., Fanburg, B.L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology* **279** (6), L1005-L1028.
- Tibbles, L.A., Woodgett, J.R. (1999). The stress-activated protein kinase pathways. *Cellular and Molecular Life Sciences* **55** (10), 1230-1254.
- Timblin, C.R., Shukla, A., Berlinger, I., BeruBe, K.A., Churg, A., Mossman, B.T. (2002). Ultrafine airborne particles cause increases in protooncogene expression and proliferation in alveolar epithelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* **179** (2), 98-104.
- Toker, A., Newton, A.C. (2000). Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *Journal of Biological Chemistry* **275** (12), 8271-2874.
- Troussard, A.A., Tan, C., Yoganathan, T.N., Dedhar, S. (1999). Cell-extracellular matrix interactions stimulate the AP-1 transcription factor in an integrin-linked kinase- and glycogen synthase kinase 3-dependent manner. *Molecular and Cellular Biology* **19** (11), 7420-7427.
- Troussard, A.A., Mawji, N.M., Ong, C., Mui, A., St. Arnaud, R., Dedhar, S. (2003). Conditional knock-out of integrin-linked kinase demonstrates an essential role in protein kinase B/Akt activation. *Journal of Biological Chemistry* **278** (25), 22374-22378.
- Unfried, K., Sandhu, H., Schürkes, C., Albrecht, C., Abel, J. (2000). Effects of crocidolite fibres on the peritoneal mesothelium of rats. *Inhalation Toxicology* **12**, 149-155.
- van Golen, C.M., Soules, M.E., Grauman, A.R., Feldman, E.L. (2003). N-Myc overexpression leads to decreased beta1 integrin expression and increased apoptosis in human neuroblastoma cells. *Oncogene* **22** (17), 2664-2673.
- Vanhaesebroeck, B., Leever, S.J., Panayotou, G., Waterfield, M.D. (1997). Phosphoinositide 3-kinases: A conserved family of signal transducers. *Trends in Biochemical Sciences* **22** (7), 267-272.

- Velling, T., Nilsson, S., Stefansson, A., Johansson, S. (2004). Beta1-Integrins induce phosphorylation of Akt on serine 473 independently of focal adhesion kinase and Src family kinases. *EMBO Reports* **5 (9)**, 901-905.
- Vinzents, P.S., Moller, P., Sorensen, M., Knudsen, L.E., Hertel, O., Jensen, F.P., Schibye, B., Loft, S. (2005). Personal exposure to ultrafine particles and oxidative DNA damage. *Environmental Health Perspectives* **113 (11)**, 1485-1490.
- Walker, E.H., Pacold, M.E., Perisic, O., Stephens, L., Hawkins, P.T. Wymann, M.P., Williams, R.L. (2000). Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Molecular Cell* **6 (4)**, 909-919.
- Wang, A., Yokosaki, Y., Ferrando, R., Balmes, J., Sheppard, D. (1996). Differential regulation of airway epithelial integrins by growth factors. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **15 (5)**, 664-672.
- Wang, F., Weaver, V.M., Petersen, O.W., Larabell, C.A., Dedhar, S., Briand, P., Lupu, R., Bissell, M.J. (1998). Reciprocal interactions between beta-integrin and epidermal growth factor receptor in three-dimensional basement membrane breast cultures: A different perspective in epithelial biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95 (25)**, 14821-14826.
- Wang, Y.Z., Bonner, J.C. (2000). Mechanism of extracellular signal-regulated kinase (ERK)-1 and ERK-2 activation by vanadium pentoxide in rat pulmonary myofibroblasts. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **22 (5)**, 590-596.
- Wang, X.Q., Sun, P., Paller, A.S. (2003). Ganglioside GM3 blocks the activation of epidermal growth factor receptor induced by integrin at specific tyrosine sites. *Journal of Biological Chemistry* **278 (49)**, 48770-48778.
- Wary, K.K., Mainiero, F., Isakoff, S.J., Marcantonio, E.E., Giancotti, F.G. (1996). The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell* **87 (4)**, 733-743.



- Witz, C.A., Montoya-Rodriguez, I.A., Miller, D.M., Schneider, B.G., Schenken, R.S. (1998). Mesothelium expression of integrins *in vivo* and *in vitro*. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* **5 (2)**, 87-93.
- Witz, C.A., Takahashi, A., Montoya-Rodriguez, I.A., Cho, S., Schenken, R.S. (2000). Expression of the alpha2beta1 and alpha3beta1 integrins at the surface of mesothelial cells: A potential attachment site of endometrial cells. *Fertility and Sterility* **74 (3)**, 579-584.
- Wu, J., Liu, W., König, K., Idell, S., Broaddus, V.C. (2000). Vitronectin adsorption to chrysotile asbestos increases fiber phagocytosis and toxicity for mesothelial cells. *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology* **279 (5)**, L916-L923.
- Wu, W., Samet, J.M., Ghio, A.J., Devlin, R.B. (2001). Activation of the EGF receptor signaling pathway in airway epithelial cells exposed to Utah Valley PM. *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology* **281 (2)**, L483-L489.
- Xia, Z., Dickens, M.; Raingeaud, J., Davis, R.J., Greenberg, M.E. (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* **270 (5240)**, 1326-1331.
- Xia, T., Korge, P., Weiss, J.N., Li, N., Venkatesen, M.I., Sioutas, C., Nel, A. (2004). Quinones and aromatic chemical compounds in particulate matter induce mitochondrial dysfunction: Implications for ultrafine particle toxicity. *Environmental Health Perspectives* **112 (14)**, 1347-1358.
- Yamanaka, I., Koizumi, M., Baba, T., Yamashita, S., Suzuki, T., Kudo, R. (2003). Epidermal growth factor increased the expression of alpha2beta1-integrin and modulated integrin-mediated signaling in human cervical adenocarcinoma cells. *Experimental Cell Research* **286 (2)**, 165-174.
- Yarwood, S.J., Woodgett, J.R. (2001). Extracellular matrix composition determines the transcriptional response to epidermal growth factor receptor activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98 (8)**, 4472-4477.
- Yu, X., Miyamoto, S., Mekada, E. (2000). Integrin alpha 2 beta 1-dependent EGF receptor activation at cell-cell contact sites. *Journal of Cell Science* **113 (Pt 12)**, 2139-2147.

- Zachary, I., Sinnott-Smith, J., Turner, C.E., Rozengurt, E. (1993). Bombesin, vasopressin, and endothelin rapidly stimulate tyrosine phosphorylation of the focal adhesion-associated protein paxillin in Swiss 3T3 cells. *Journal of Biological Chemistry* **268 (29)**, 22060-22065.
- Zanella, C.L., Posada, J., Tritton, T.R., Mossman, B.T. (1996). Asbestos causes stimulation of the extracellular signal-regulated kinase 1 mitogen-activated protein kinase cascade after phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Research* **56 (23)**, 5334-5338.
- Zanella, C.L., Timblin, C.R., Cummins, A., Jung, M., Goldberg, J., Raabe, R., Tritton, T.R., Mossman, B.T. (1999). Asbestos-induced phosphorylation of epidermal growth factor receptor is linked to c-fos and apoptosis. *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology* **277 (4)**, L684-L693.
- Zhang, L., Bewick, M., Lafrenie, R.M. (2002). Role of Raf-1 and FAK in cell density-dependent regulation of integrin-dependent activation of MAP kinase. *Carcinogenesis* **23 (7)**, 1251-1258.
- Zhang, Q., Kleeberger, S.R., Reddy, S.P. (2004). DEP-induced fra-1 expression correlates with a distinct activation of AP-1-dependent gene transcription in the lung. *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology* **286 (2)**, L427-L436.
- Zhang, X., Wei, L., Yang, Y, Yu, Q. (2004). Sodium 4-phenylbutyrate induces apoptosis of human lung carcinoma cells through activating JNK pathway. *Journal of Cellular Biochemistry* **93 (4)**, 819-829.
- Zimmermann, S., Moelling, K. (1999). Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science* **286 (5445)**, 1741-1744.
- Zugasti, O., Rul, W., Roux, P., Peyssonnaud, C., Eychene, A., Franke, T.F., Fort, P., Hibner, U. (2001). Raf-MEK-Erk cascade in anoikis is controlled by Rac1 and Cdc42 via Akt. *Molecular and Cellular Biology* **21 (19)**, 6706-6717.

## 8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Josef Abel für die interessante Themenstellung dieser Arbeit und seine ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bedanken.

Für die freundliche Übernahme des Korrrferates bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Frank Wunderlich.

Herrn Dr. Klaus Unfried danke ich für die Betreuung dieser Arbeit und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei allen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe für die angenehme Arbeitsatmosphäre, ihre Freundlichkeit und ihre Hilfe bedanken.

Danken möchte ich auch allen Institutsmitarbeitern, besonders den Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe vom Hennekamp, allen voran Frau Dr. Sandra Wolff, für das nette Arbeitsklima sowie die ständige Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Zudem gilt mein Dank Frau Dr. Antje Berken für die Betreuung in den ersten Jahren, die ständige Unterstützung, das Korrekturlesen und natürlich den Dissertations-Notfalldienst.

Der größte Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mir stets vertrauten und mich ermunterten, meinen eigenen Weg zu gehen. Dies gilt auch für meine Freunde, die mich während der gesamten Zeit motivierten und somit zum Gelingen dieser Arbeit einen nicht unwesentlichen Beitrag geleistet haben. Dabei danke ich sowohl denen, die mich bei dem Gedanken ans Aufhören unterstützten, als auch denen, die mich ständig zum Weitermachen angetrieben haben.

Schließlich danke ich Kai, der mir die Kraft gegeben hat, die letzten Monate durchzustehen.

Diese Arbeit wurde vom Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit finanziert.

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Katrin Bierhals  
Geburtsdatum: 31.07.1977  
Geburtsort: Dortmund

### Schulbildung

1983 - 1987 Lichtendorfer Grundschule, Dortmund  
1987 - 1996 Mallinckrodt-Gymnasium, Dortmund  
Abschluss: allgemeine Hochschulreife

### Studium

10/1996 - 11/2001 Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum  
Abschluss: Diplom, Note „gut“  
Thema der Diplomarbeit: „Welche Isoformen der Proteinkinase C werden in Ratten-Hepatozyten durch hypertonen Stress aktiviert?“. Anfertigt in der Abteilung Epithelphysiologie des Max-Planck-Institutes für Molekulare Physiologie, Dortmund  
Betreuer der Arbeit: PD Dr. F. Wehner

03/2002 – 10/2006 Anfertigung der Dissertation mit dem Thema: „Feinstaub induzierte Signalkaskaden“ in der Abteilung Toxikologie am Institut für Umweltmedizinische Forschung, Düsseldorf  
Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. J. Abel

### Berufliche Tätigkeit

03/2002 – 05/2006 Im Rahmen der Dissertation Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Umweltmedizinische Forschung, Düsseldorf

Dortmund, den 03.04.2007

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

Düsseldorf, den 28.11.2006

Katrin Bierhals