

**Partikelexpositionen von Zellkulturen:  
Untersuchungen zur Rolle von Lipidmediatoren bei  
der inflammatorischen Antwort**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der  
Universität Karlsruhe (TH)

vorgelegte

DISSERTATION

von

**Susanne Fritsch-Decker**

aus Speyer

2008

Dekan: Prof. Dr. S. Bräse

Referent: Prof. Dr. H. F. Krug

Korreferent: Prof. Dr. D. Marko

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2008



## Zusammenfassung

Zahlreiche epidemiologische Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen der akuten Belastung mit Feinstaub (PM) und dem Auftreten von Lungen- und Herz-Kreislauf-Erkrankungen sowie ansteigenden Sterblichkeitsraten. Die dabei zugrunde liegenden biologischen Wirkungen und die molekularen Mechanismen sind bis heute aber noch weitestgehend ungeklärt.

Das Ziel dieser *in vitro* Studien war es daher sowohl die Mechanismen inflammatorischer und oxidativer Prozesse nach Partikelexposition zu untersuchen als auch deren Verbindung zueinander aufzuklären. Dabei wurden Flugstaubpartikel aus einer Hausmüllverbrennungsanlage (MAF02) als Modell für verbrennungsgenerierte Umweltpartikel eingesetzt. Da Makrophagen, neben Epithelzellen, wichtige Zielzellen der Lunge repräsentieren, wurden zur Untersuchung partikel-induzierter Effekte die murine Makrophagen-Zelllinie RAW264.7, primäre humane Makrophagen aber auch ein aus Makrophagen und Epithelzellen bestehendes Kokultursystem verwendet.

Flugaschepartikel induzierten in Makrophagen oxidativen Stress, welcher durch die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies, die Bildung und Freisetzung von 8-Isoprostan, durch eine Erhöhung des intrazellulären Glutathion-Gehaltes, durch eine Akkumulation des Transkriptionsfaktors Nrf2, aber auch durch die Induktion des antioxidativen Hämoxigenase-1 Proteins charakterisiert war.

Des Weiteren wurde, als wichtiger Teil der inflammatorischen Antwort, die Freisetzung der Arachidonsäure und deren Metabolisierung zu Prostaglandin E<sub>2</sub>, ein Vertreter inflammatorischer Mediatoren, nach Partikelbehandlung gezeigt. In Korrelation erfolgte dabei ein Anstieg des Cyclooxygenase-2 Proteins. Interessanterweise konnte in einem realistischeren Kokultursystem mit Makrophagen und Epithelzellen eine synergistisch erhöhte Arachidonsäurefreisetzung im Vergleich zur jeweiligen Monokultur beobachtet werden. In Makrophagen zeigte die Mobilisation der Arachidonsäure eine Calcium-Abhängigkeit, was durch den Einsatz der Calciumchelatoren BAPTA/AM und EGTA belegt wurde. Ferner wurde anhand von Inhibitor-Versuchen demonstriert, dass die Flugasche-induzierte Freisetzung der Arachidonsäure vom ERK1/2 und JNK1/2, aber nicht vom p38 MAPK (mitogen-aktivierte Proteinkinase) Signalweg abhängig ist. Ausgehend von dieser Beobachtung konnte auf Proteinebene die mit der Aktivierung verbundene Phosphorylierung der ERK1/2 und der JNK1/2 nachgewiesen werden. Des Weiteren bewiesen Studien mit

spezifischen Inhibitoren eine Beteiligung der zytosolischen Phospholipase A<sub>2</sub>, jedoch nicht der sekretorischen und calcium-unabhängigen Phospholipase A<sub>2</sub>, an der Flugstaube-induzierten Arachidonsäuremobilisation. Die Fähigkeit von MAF02 Partikeln oxidativen Stress zu induzieren und Signalwege, die den Arachidonsäuremetabolismus betreffen, zu aktivieren korrelierte mit der gesteigerten Aufnahme von Partikeln in das Zytosol von Makrophagen. Dabei lagen die Partikel sowohl einzeln als auch in Membraneinschlüssen im Zytosol der Makrophagen vor.

Interessanterweise ließ sich die Phosphorylierung von ERK1/2 und JNK1/2 durch den Einsatz des Antioxidanzes, N-Acetylcystein, deutlich reduzieren. Darüber hinaus erfolgte eine N-Acetylcystein-abhängige Inhibierung der Arachidonsäurefreisetzung, woraus erneut geschlossen wird, dass die Aktivierung von ERK1/2 und möglicherweise JNK1/2 an der Arachidonsäurefreisetzung beteiligt sind. Die MAF02-induzierte Induktion der Cyclooxygenase, der Hämoxygenase-1 und die Akkumulation von Nrf2 in der Zelle ließen sich ebenfalls durch NAc hemmen.

Zusammenfassend betrachtet belegen diese Studien, dass Flugstaub nach intrazellulärer Aufnahme inflammatorische Prozesse durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies initiiert, was zu einer Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden und zu einer verstärkten Expression antioxidativer und inflammatorischer Gene führt. Dabei bewirkten zelluläre Interaktionen von Makrophagen und Epithelzellen eine verstärkte Reaktion in Bezug auf die Arachidonsäuremobilisierung nach Flugstaubbelastung. Somit scheint zelluläre Kommunikation entscheidend zur Entwicklung von partikel-induzierten Erkrankungen beizutragen.

# Particle exposure of cell cultures to study the role of lipid mediators during the inflammatory response

## Abstract

Acute exposure to elevated levels of environmental particulate matter (PM) is associated with increasing morbidity and mortality rates. These adverse health effects, e.g. culminating in respiratory and cardiovascular diseases, have been demonstrated by a multitude of epidemiological studies. However, the underlying cellular and molecular mechanisms are not yet completely understood.

The main focus of the present *in vitro* study was to understand the interaction of the generation of reactive oxygen species (ROS) with the induction of antioxidant and inflammatory responses. Incinerator fly ash, also called MAF02, was used as a model for combustion derived particulate matter. As macrophages, besides epithelial cells, are the major targets of particle actions in the lung murine RAW264.7, primary human macrophages as well as a coculture system with RAW264.7 macrophages and LA-4 epithelial cells were investigated.

The interaction of fly ash particles with macrophages induced oxidative stress, indicated by ROS-generated H<sub>2</sub>DCF oxidation, formation and release of 8-Isoprostane, increased intracellular glutathione contents, elevated amounts of the transcription factor Nrf-2 and the antioxidative protein heme oxygenase-1.

As part of cellular inflammatory responses I could observe an increasing amount of free arachidonic acid, cyclooxygenase-2 protein and prostaglandin E<sub>2</sub>. Interestingly in a co-culture system consisting of macrophages and epithelial cells the mobilisation of arachidonic acid was enhanced due to a synergism of these two cell types. The arachidonic acid liberation depends on an elevated intracellular calcium concentration since the pre-treatment of macrophages with calcium chelators (BAPTA/AM and EGTA) prevented the MAF02-mediated enhancement of free arachidonic acid. Additionally, arachidonic acid mobilisation was blocked significantly by an ERK1/2 pathway-specific inhibitor, while inhibition of p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) had no effect. In correlation the ERK1/2, but not p38 MAPK phosphorylation/activation was observed. Using the specific inhibitor for phospholipases A<sub>2</sub> arachidonic acid liberation was shown to be dependent on the cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>, but not on the secretory and calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub>. The ability to induce oxidative stress and several signalling

pathways was related to the uptake of MAF02 in macrophages as demonstrated by the transmission electron microscopy.

Interestingly pre-treatment of macrophages with N-Acetyl-cysteine (NAC) blocked the MAF02-induced ERK1/2 and JNK1/2 activation. Furthermore, the increase of free arachidonic acid was reduced in a NAC-dependent manner, indicating an involvement of ERK1/2 and JNK1/2 MAPK signalling pathways in arachidonic acid liberation. NAC had also a reducing effect on the MAF02-generated up-regulation of Cyclooxygenase-2 and heme oxygenase-1 protein as well as the accumulation of Nrf2 in the cytosol of macrophages.

In conclusion, after particle uptake one of the primary mechanism initiating inflammatory processes by incinerator fly ash particles seems to be the generation of ROS, which trigger the activation of downstream signalling and gene expression. Focusing of arachidonic acid mobilisation, the co-culture system with macrophages and epithelial cells was more sensitive in comparison to mono-cultures of the cell lines. These results confirm that intercellular communications play an important role in the pathogenesis of particles-induced diseases.



2.3.6	Verwendete Partikel.....	39
2.3.7	Partikelaufbereitung, Partikelbehandlung der Zellen .....	42
2.3.8	Inhibitionsstudien .....	42
2.4	<i>Isolierung von mononukleären Zellen aus humanem peripheren Blut</i> .....	43
2.4.1	Separation peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC) über Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation .....	43
2.4.2	Anreicherung von Monozyten aus PBMC durch immuno-magnetische Partikel. ....	45
2.4.3	Kultivierung und Ausdifferenzierung humaner Monozyten/Makrophagen .....	47
2.5	<i>WST-1 Zellvitalitätstest</i> .....	48
2.6	<i>Methoden zur Proteinanalyse</i> .....	49
2.6.1	Herstellung von Ganzzellextrakten .....	49
2.6.2	Proteinbestimmung.....	50
2.6.3	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese.....	51
2.6.4	Western Blotting durch Elektrotransfer .....	52
2.6.5	Detektion von Proteinen .....	53
2.6.5.1	Detektion mittels Enhanced Chemiluminescence (ECL) .....	53
2.6.5.2	Detektion mittels Odyssey-Verfahren .....	54
2.6.5.3	Stripping und erneute Antikörperfärbung von Membranen .....	55
2.7	<i>Untersuchung des Arachidonsäurestoffwechsels</i> .....	56
2.7.1	Markierung mit <sup>14</sup> C-Arachidonsäure und Inkubation .....	56
2.7.2	Aufnahmekinetik der radioaktiv-markierten Arachidonsäure .....	57
2.7.3	Extraktion zellulärer Lipide.....	57
2.7.4	Dünnschichtchromatographie .....	58
2.7.5	Autoradiographie .....	58
2.7.6	Auswertung.....	59
2.8	<i>Bestimmung von Eicosanoidkonzentrationen</i> .....	59
2.8.1	Prinzip des Enzym-Immunoassays.....	59
2.8.2	Verwendete Materialien und Puffer .....	61
2.8.3	Vorbereitung der Proben .....	62
2.8.4	Messung der Proben .....	62
2.9	<i>Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies</i> .....	63
2.10	<i>Bestimmung der zellulären Glutathion Konzentration</i> .....	63
2.11	<i>Elektronenmikroskopie</i> .....	65
2.11.1	Verwendete Materialien und Puffer .....	65
2.11.2	Probenvorbereitung, Fixierung und Entwässerung.....	67
2.11.3	Einbettung in Epoxidharz (EPON 812) .....	68



2.11.4	Ultramikrotomie und Transmissionselektronenmikroskopie .....	68
2.12	<i>Durchflusszytometrie</i> .....	69
2.12.1	Prinzip der Durchflusszytometrie .....	69
2.12.2	Durchflusszytometrische Phänotypisierung von Zellen .....	70
2.12.3	Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellviabilität.....	72
2.12.4	Bestimmung der Granularität von Makrophagen .....	72
2.13	<i>Statistik</i> .....	73
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>75</b>
3.1	<i>Akute Zytotoxizität</i> .....	76
3.2	<i>Oxidativer Stress</i> .....	77
3.2.1	MAF02 bewirkt die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies .....	78
3.3	<i>Antioxidative Zellantwort</i> .....	80
3.3.1	Flugaschepartikel erhöhen den intrazellulären Glutathiongehalt.....	80
3.3.2	MAF02 Behandlung bewirkt eine Akkumulation des Transkriptionsfaktors Nrf2 .....	81
3.3.3	MAF02 induziert die Expression der Hämoxxygenase-1.....	82
3.4	<i>Arachidonsäurefreisetzung</i> .....	87
3.4.1	Flugstaubpartikel bewirken die Freisetzung von Arachidonsäure aus Membranphospholipiden .....	87
3.4.2	Regulation der Arachidonsäurefreisetzung.....	91
3.4.2.1	Untersuchungen zur Beteiligung von Phospholipasen A <sub>2</sub> an der partikel- induzierten Mobilisation der Arachidonsäure .....	91
3.4.2.2	Einfluss von Calciumchelatoren auf die Flugasche-induzierte Arachidonsäurefreisetzung .....	94
3.4.2.3	Effekt der Inhibition von Proteinkinasen auf die MAF02-induzierte Arachidonsäurefreisetzung .....	97
3.4.2.4	N-Acetylcystein verhindert die durch Flugaschepartikel verursachte Arachidonsäurefreisetzung .....	99
3.5	<i>Aktivierung von Proteinkinasen</i> .....	102
3.5.1	MAF02 induziert die Aktivierung der MEK1/2 und ERK1/2 MAP Kinasen ...	102
3.5.2	Aktivierung der p38 Kinase.....	104
3.5.3	Aktivierung der c-Jun NH <sub>2</sub> -terminalen Kinase (JNK) und c-Jun durch MAF02 Partikel.....	105
3.6	<i>Aktivierung der zytosolischen Phospholipase A<sub>2</sub> durch MAF02 Exposition</i> .....	107
3.7	<i>Induktion und Aktivität der Cyclooxygenase-2</i> .....	109
3.8	<i>Bildung von 8-Isoprostan</i> .....	111
3.9	<i>Zusammenhang zwischen der MAP Kinase Aktivierung und der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies</i> .....	113
3.10	<i>N-Acetylcystein reduziert die MAF02-bedingte Cyclooxygenase-2 Induktion</i> .....	117

3.11	<i>Aufnahme der Flugaschepartikel in Maus-Makrophagen</i> .....	120
3.12	<i>Etablierung eines Kokulturmodells - Freisetzung der Arachidonsäure nach Flugascheexposition</i> .....	125
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>131</b>
4.1	<i>Induktion von oxidativem Stress durch Flugstaubpartikel</i> .....	135
4.2	<i>Flugaschepartikel – Wechselwirkungen mit inflammatorischen Signalwegen – der Arachidonsäuremetabolismus</i> .....	141
4.3	<i>Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies – ein entscheidender Faktor der MAF02-induzierten inflammatorischen Prozesse</i> .....	147
4.4	<i>Primäre humane Makrophagen und die murine Makrophagen Zelllinie RAW264.7 im Vergleich</i> .....	150
4.5	<i>Aufnahme von Flugstaubpartikeln in Makrophagen</i> .....	152
4.6	<i>Kokultursystem von Lungenzellen – Interzellulärer Crosstalk</i> .....	155
4.7	<i>Zeitlicher Ablauf der durch Flugaschepartikel induzierten zellulären Prozesse</i> .....	157
4.8	<i>Möglicher Verlauf der partikel-bedingten Induktion des Arachidonsäurestoffwechsels – eine Arbeitshypothese</i> .....	158
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>163</b>
<b>6</b>	<b>ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>183</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure ( <i>Arachidonic Acid</i> )
AACOCF <sub>3</sub>	Arachidonyltrifluoromethylketon
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BAPTA	Bis(o-aminophenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
BCA	Bicinchoninsäure ( <i>Bicinchonic Acid</i> )
BSA	Rinderserum Albumin ( <i>Bovine Serum Albumine</i> )
Ci, $\mu$ Ci	Curie, micro-Curie
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung ( <i>Chronic Obstructive Pulmonary Disease</i> )
COX	Cyclooxygenase
cpm	<i>counts per minute</i>
DCF	2', 7'-Dichlorofluorescein
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>Desoxyribonucleic Acid</i> )
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Zellkulturmedium ( <i>Dulbeccos Modified Eagles Medium</i> )
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EIA	Enzym-Immunoassay
ERK	extrazellulär regulierte Kinase ( <i>Extracellular Regulated Kinase</i> )
FACS	Durchflusszytometrie ( <i>Fluorescence Cytometry</i> )
FBS	Fötales Rinderserum ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )
FITC	Fluoreszein Isothiozyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht ( <i>Forward Scatter</i> )
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen kolonie-stimulierender Faktor
h	Stunde(n)
HBSS	<i>Hank's Buffered Salt Solution</i>
HCl	Salzsäure
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>Horse Radish Peroxidase</i> )
IL	Interleukin

JNK	c-jun NH <sub>2</sub> -terminale Kinase
kDa	Kilodalton
LTB <sub>4</sub>	Leukotrien B <sub>4</sub>
M, mM	Mol pro Liter, Millimol pro Liter
MAPK	mitogen-aktivierte Protein Kinase ( <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> )
MDM	Monozyten abstammende Makrophagen ( <i>Monocyte-Derived Macrophages</i> )
MEK	MAPK/ERK-Kinase
min	Minuten
ml, µl	Milliliter, Mikroliter
NAc	N-Acetylcystein
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat
NP-40	Nonylphenyl-polyethylen glycol
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PBS <sup>-/-</sup>	Phosphat-gepufferte Salzlösung ohne Calcium und Magnesium
PD98059	MAP Kinase Kinase Inhibitor
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
cPLA <sub>2</sub>	zytosolische Phospholipase A <sub>2</sub> ( <i>Cytosolic Phospholipase A<sub>2</sub></i> )
iPLA <sub>2</sub>	calcium-unabhängige Phospholipase A <sub>2</sub>
sPLA <sub>2</sub>	sekretorische Phospholipase A <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PM	<i>Particulate Matter</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SB203580	p38 Kinase Inhibitor
sec	Sekunden
SEM	Standardfehler ( <i>Standard Error of the Mean</i> )
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSC	Seitwärtsstreulicht ( <i>Side Scatter</i> )
Tab.	Tabelle

TBS	Tris-gepufferte Salzlösung ( <i>Tris Buffered Saline</i> )
TEA	Thioetheramid
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethen-sorbitan-monolaurat
TXB <sub>4</sub>	Thromboxan B <sub>4</sub>
U	Einheit ( <i>Unit</i> )
ÜN	Über Nacht
v/v	Volumenanteil pro Volumen
w/v	Gewichtsanteil pro Volumenteil
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

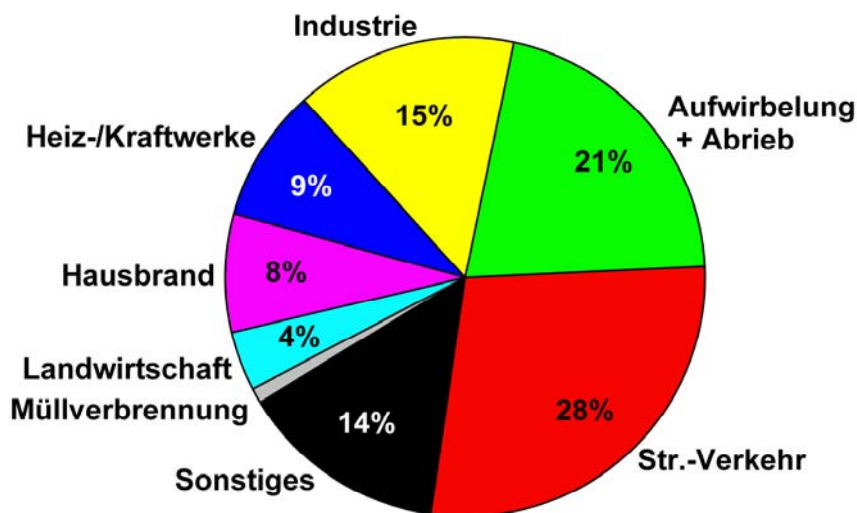


## 1 EINLEITUNG

Europaweit gelten seit dem 1. Januar 2005 die Feinstaubgrenzwerte der Luftqualitätsrahmenrichtlinie. Demnach dürfen die Feinstaub-Immissionen den Tagesgrenzwert von  $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$  nur an maximal 35 Tagen im Jahr überschreiten. Der Jahresmittelwert darf einen Wert von  $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$  nicht übersteigen. Eine weitere drastische Verschärfung soll ab dem 1. Januar 2010 gelten. Es ist dann nur noch an 7 Tagen im Jahr eine Überschreitung des Tagesmittelwertes von  $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$  erlaubt. Mit dem Inkrafttreten dieser EU-Richtlinie (Europäische Union), und spätestens nach dem häufigen Überschreiten der zugelassenen Höchstgrenze des Tagesgrenzwertes an einigen innerstädtischen Messstationen, ist in Deutschland ein starkes öffentliches Interesse an der Problematik der Feinstaubbelastung erwacht. Außerdem belegt eine Vielzahl von epidemiologischen Untersuchungen seit Ende der 80er Jahre einen deutlichen Zusammenhang zwischen Erkrankungen des respiratorischen Trakts, des kardiovaskulären Systems, einer ansteigenden Sterblichkeitsrate und einer erhöhten Exposition gegenüber partikulärer Luftverunreinigungen. Zwar konnte die Massenbelastung durch Stäube in den letzten Jahren erheblich reduziert werden, allerdings stieg gleichzeitig die Partikelanzahlkonzentration enorm an (Wichmann *et al.* 2000). Die verminderte Massenkonzentration von Partikeln kann offenbar auf den verstärkten Einsatz modernisierter Filtertechniken zurückgeführt werden. Die Filter fangen vorwiegend die großen Partikel, die für die Massenbelastung verantwortlich sind, weg. Die feinen ( $\text{PM}_{2,5} < 2,5 \mu\text{m}$ ) und ultrafeinen ( $\text{PM}_{0,1} < 0,1 \mu\text{m}$ ) Partikel, die in neueren epidemiologischen und toxikologischen Studien für die gesundheitsschädliche Wirkung des Schwebstaubs im Mittelpunkt stehen, tragen zur Massenbelastung nur wenig bei, dafür ist ihre Anzahlkonzentration umso größer. Die stetig ansteigende Zahl von Partikeln kann damit erklärt werden, dass ultrafeine Partikel in Anwesenheit von feinen Partikeln mit eben diesen koagulieren. Nun ist dieser „Einfang-Effekt“ durch die verminderte Konzentration von größeren Partikeln kaum noch zu beobachten, wodurch sich die Anzahl der feinen und ultrafeinen Partikel bei gleich bleibender Emission erhöht (Wichmann *et al.* 2000).

Luftgetragene Stäube, welche auch als Schwebstäube (*Total Suspended Particulates*, TSP) bezeichnet werden, haben eine Durchmesser zwischen 1 nm und  $100 \mu\text{m}$  und zählen neben Rauchen und Nebeln zu den Aerosolen. Es sind somit feste oder flüssige Schwebstoffe, die in der Luft suspendiert sind. Allerdings können

die Partikel in Bezug auf ihre Größe, Oberfläche, ihre chemische Zusammensetzung aber auch hinsichtlich möglicher Kontaminationen mit reaktiven Komponenten stark variieren. So können die Partikel beispielsweise Übergangsmetalle enthalten, sowie organische chemische Verbindungen wie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) an ihrer Oberfläche binden. Man unterscheidet grundsätzlich zwischen Staubquellen natürlichen und anthropogenen Ursprungs. Natürliche Emissionsquellen entstehen beispielsweise bei Vulkanausbrüchen oder durch Bodenerosionen, Sandstürme und Waldbrände. Bioorganische Stäube, die ebenfalls den natürlichen Staubquellen zugeordnet werden, sind Bakterien, Viren, Pollen, Milben und Pilze. Zu den anthropogenen Staubquellen zählen hingegen Kraftwerke und Fernheizwerke, Industrieprozesse, Abfallverbrennungsanlagen, Hausfeuerungen, Küchentätigkeiten (Kochen, Grillen, Braten) sowie der Straßenverkehr (Motorenabgase, mechanischer Abrieb von Reifen, Bremsen und Kupplungsbelägen). Bei einer globalen Betrachtung überwiegen die Partikel, die aus natürlichen Quellen stammen. Jedoch gelten in den Industriestaaten neben Verkehr auch Verbrennungsprozesse, verursacht u.a. durch Industrie und Heizungen, zu den dominierenden Hauptverursachern dieser partikulären Umweltstäube (PM, *Particulate Matter*). Abb. 1 gibt eine Übersicht der anthropogenen Quellen von Umweltpartikeln.



**Abb. 1: Übersicht über anthropogene Quellgruppen der Schwebstaub-Belastung**

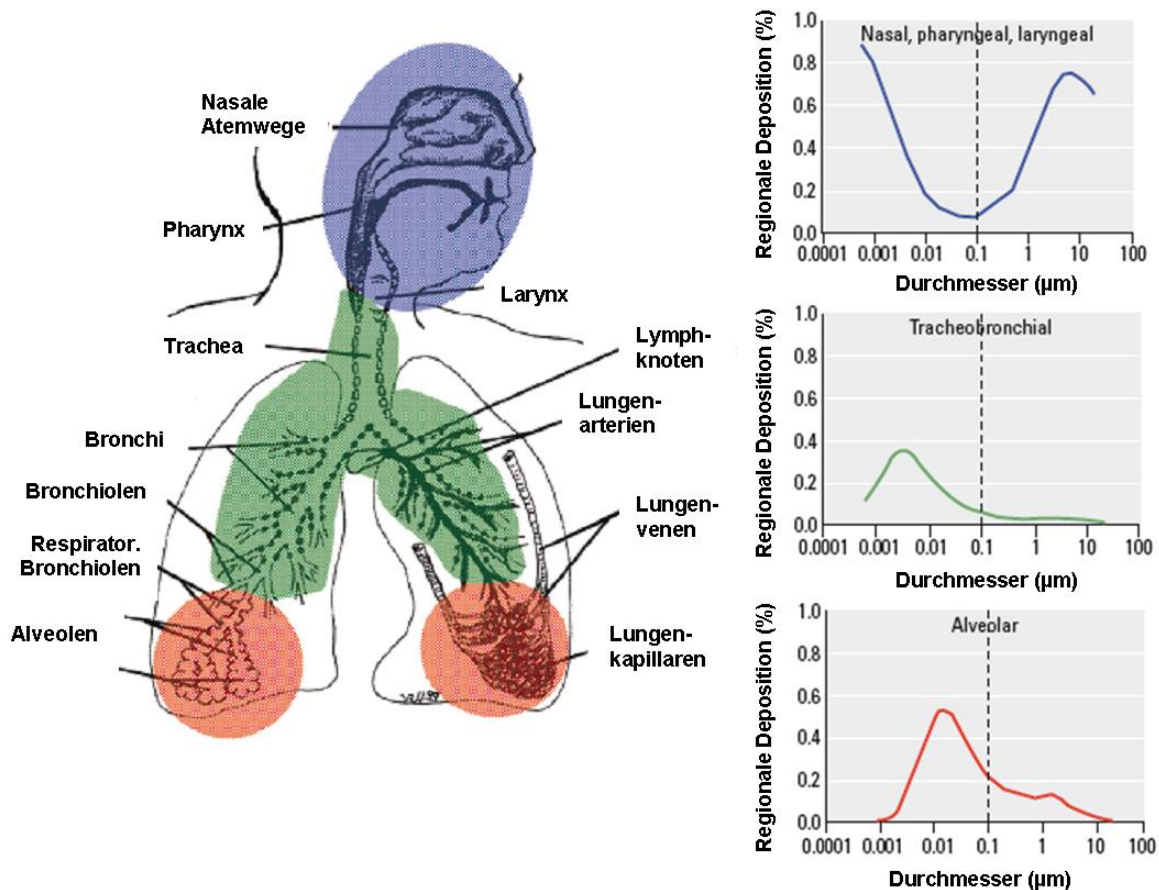
Diese Abbildung zeigt beispielhaft den prozentualen Anteil der Emissionsquellen der in Berlin erzeugten verkehrsnahen Schwebstaub-Belastung (Mess-Station Frankfurter Allee) (John *et al.* 2004) an. Zu den primären anthropogenen Quellen zählen Verbrennungsanlagen zur Energieversorgung (Heiz-/Kraftwerke), Verbrennungsprozesse der Industrie, Hausbrände, Landwirtschaft, Abfallverbrennungsanlagen sowie Straßenverkehr (Aufwirbelung, Abrieb von Reifen, Bremsen und Kupplungsbelägen inbegriffen).



## **1.1 Deposition von Partikeln im Organismus**

Die mit der Atemluft aufgenommenen Umweltpartikel (PM, *particulate matter*) werden in unterschiedlichen Kompartimenten der Atemwege deponiert. Dies hängt von ihrem aerodynamischen Durchmesser und von der Anatomie des Atemtraktes ab, welche sich durch Alterungsprozesse, Wachstum sowie bei Erkrankungen der Lunge verändert. Nach ihrer Größe unterteilt man die Partikel in die inhalierbare Fraktion (PM<sub>10</sub>) mit einem aerodynamischen Durchmesser von weniger als 10 µm. Daneben bezeichnet man thoraxgängige Partikel mit einem aerodynamischen Durchmesser kleiner als 2,5 µm als feine Partikel (PM<sub>2,5</sub>). Partikel mit einem aerodynamischen Durchmesser kleiner als 100 nm (PM<sub>0,1</sub>) werden in die ultrafeine Fraktion eingeteilt. Prinzipiell geht man davon aus, dass bei der physiologischen Ruheatmung eines gesunden Erwachsenen durch die Nase vor allem die größeren Partikel mit einem Durchmesser größer als 2,5 µm in dem Bereich des oberen Respirationstrakts (Nasen- und Rachenraum) gefiltert werden (Heyder *et al.* 1986). Von dort können sie durch Ausatmen, Niesen, Aushusten oder Verschlucken eliminiert werden. Kleinere Partikel, mit einem Durchmesser von < 2,5 µm gelangen in die mittleren und tieferen Lungenabschnitte, wo sie sowohl in den Bronchien als auch in den respiratorischen Bronchiolen und Alveolen abgeschieden werden. Die Depositionswahrscheinlichkeit der kleineren Partikel steigt mit abnehmendem Durchmesser stark an. Dies resultiert in einer zunehmenden Depositionsgeschwindigkeit von Partikeln bis zu einem Durchmesser von 20 nm in den Alveolen der Lunge. Dagegen werden noch kleinere Partikel aufgrund ihres Diffusionsverhaltens vermehrt in den mittleren und oberen Atemwegen deponiert (Abb. 2) (Heyder *et al.* 1986).

Die in der Trachea und den Bronchien deponierten Partikel können durch den mukociliaren Transport relativ rasch, innerhalb weniger Tage, zum Kehlkopf befördert und durch Verschlucken bzw. Aushusten zusammen mit dem Sputum (Bronchialsekret) beseitigt werden. Partikel, die bis in den alveolaren Abschnitt der Lunge vordringen, können dort je nach Löslichkeit Monate bis Jahre akkumulieren oder von frei auf dem Alveolarepithel wandernden Alveolarmakrophagen (AM) phagozytiert werden. Anschließend kann solch ein AM entweder zu den Bronchien wandern und durch den mukociliaren Transport zum Kehlkopf gelangen und durch Verschlucken oder Aushusten eliminiert oder in das Lymphsystem retiniert werden. Weiter können die Partikel von den alveolaren Epithelzellen aufgenommen werden.



**Abb. 2: Depositionswahrscheinlichkeiten von Partikeln mit unterschiedlichen aerodynamischen Durchmessern in den verschiedenen Regionen des menschlichen Atemtrakts (Oberdörster *et al.* 2005)**

Der blau markierte Bereich entspricht dem Nasen-Rachenraum (nasale, pharyngeale, laryngeale Deposition). Der grüne Abschnitt kennzeichnet die mittleren Atemwege, bestehend aus der Luftröhre (Trachea), den Bronchien und den Bronchiolen (tracheobronchiale Deposition). Die Peripherie der Lunge mit den respiratorischen Bronchiolen und Alveolen ist rot markiert (alveolare Deposition).

Aber erst die ultrafeinen Partikel mit einem aerodynamischen Durchmesser von weniger als 100 nm können das Epithel oder die alveolaren Blutkapillaren permeieren, in das Interstitium und von dort in den Blutkreislauf gelangen (Nemmar *et al.* 2001; Oberdörster *et al.* 2000). Somit können diese Partikel durch die Blutzirkulation im gesamten Organismus verteilt werden und sekundäre Zielorgane wie Herz, Leber oder das zentrale Nervensystem erreichen. So demonstrierte eine Studie von Oberdörster (Oberdörster *et al.* 2002) beispielsweise eine Translokation von über 50 % der inhalierten, ultrafeinen <sup>13</sup>C-Partikel (20-29 nm) innerhalb von 24 Stunden in die Leber, jedoch nicht in andere sekundäre Organe der Ratte. Die Arbeit von Kreyling (Kreyling *et al.* 2002) hingegen zeigte eine geringe Verlagerung von weniger als 1 % der über eine Stunde inhalierten Iridiumpartikel (15 und 80 nm) in Blut, Herz, Leber, Milz und Gehirn von Ratten. Zudem fand man in einer weiteren

Studie mit Ratten, die radioaktiv-markierte Iridiumpartikel (15-20 nm) inhalierten, nur einen sehr kleinen Anteil der Partikel in sekundären Organen. Dieser nahm über einen Zeitraum von sechs Monaten weiter ab, wobei der größte Teil der Partikel über den Gastrointestinaltrakt ausgeschieden wurde (Semmler *et al.* 2004). Weiter führte die Forschergruppe von Nemmar kontrollierte, humane Inhalationsstudien durch (Nemmar *et al.* 2002). Dabei inhalierten gesunde Probanden radioaktiv-markierte, kohlenstoffhaltige Partikel (<sup>99m</sup>Techneium-markierte Partikel mit einem Durchmesser < 100 nm). In den Untersuchungen erfolgte innerhalb einer Minute eine rasche Aufnahme der Partikel in die Blutbahn, sowie eine nachfolgende Translokation in die Leber. Die maximale Aufnahme der Partikel wurde nach 20 min detektiert und persistierte über einen Zeitraum von einer Stunde. Neueste Untersuchungen mit Ratten berichten darüber hinaus, dass sowohl ultrafeine Manganoxidpartikel mit einem Durchmesser von 30 nm als auch ultrafeine <sup>13</sup>C-Partikel mit einem Durchmesser von 36 nm über den olfaktorischen Nerv in den Bulbus olfactorius des zentralen Nervensystems translozieren (Elder *et al.* 2006; Oberdörster *et al.* 2004).

## **1.2 Partikuläre Luftverschmutzung und ihre Folgen – Epidemiologische und toxikologische Studien zur Gesundheitsgefährdung inhalierbarer Partikel**

Zahlreiche epidemiologische Studien fanden einen Zusammenhang zwischen der Exposition von partikulären, inhalierbaren Fein-, aber auch Ultrafeinstäuben, (PM<sub>10</sub>, PM<sub>2,5</sub> und PM<sub>0,1</sub>) und einer erhöhten Mortalitäts- bzw. Morbiditätsrate. Ein Anstieg der Sterblichkeitsrate stellt hierbei den schlimmsten Fall möglicher Folgeschäden dar. Wesentlich häufiger zeigen sich Auswirkungen auf die Morbidität, die sich durch eine erhöhte Anzahl von ärztlichen Konsultationen, höhere Medikamenteneinnahmen, Krankenhauseinweisungen sowie durch eine Verschlechterung bestehender Herz- und Atemwegserkrankungen kennzeichnet. Besonders deutlich werden diese Effekte bei suszeptiblen Personen, d.h. bei Kindern, Senioren oder bei Personen mit einer Vorschädigung des respiratorischen oder kardiovaskulären Systems (Liao *et al.* 1999; Woodruff *et al.* 2006; Zanobetti und Schwartz 2001; Zanobetti *et al.* 2004).

### 1.2.1 Mortalität

Eine Korrelation der Mortalität mit der partikulären Luftbelastung konnte durch eine Reihe von epidemiologischen Langzeitstudien belegt werden (Dockery *et al.* 1993; Krewski *et al.* 2003; Krewski *et al.* 2005; Samet *et al.* 2000). So demonstrierte eine Analyse (NMAPS, *National Mortality Air Pollution Study*) aus verschiedenen städtischen Regionen der USA, dass eine Erhöhung der Partikelmasse um  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$   $\text{PM}_{10}$  zu einem Anstieg der Mortalität um 0,2% bis 0,3% führt (Dominici *et al.* 2003; Dominici *et al.* 2004). Eine Studie aus Europa (APHEA2, *Air Pollution and Health: a European Approach 2*) konnte vergleichbare Resultate liefern (Atkinson *et al.* 2001; Katsouyanni *et al.* 2001), die Sterblichkeit stieg pro  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  um 0,6% bis 1% an. Des Weiteren belegte eine Erfurter Studie, die über einen Zeitraum von August 1995 bis Dezember 1998 geführt wurde, einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Anzahlkonzentration von feinen bzw. ultrafeinen Partikeln und einem Anstieg der Sterblichkeitsrate (Wichmann *et al.* 2000). Bei bereits bestehenden Atemwegserkrankungen wie COPD (*Chronic Obstructive Pulmonary Disease*) und Asthma erhöhte sich das Mortalitätsrisiko bei zunehmender Partikelbelastung der Außenluft (Pope, III *et al.* 2004; Sunyer *et al.* 2000). Da die Inhalation einen wichtigen Aufnahmeweg für partikuläre Luftverunreinigungen darstellt, wird das Risiko an einer Erkrankung des respiratorischen Trakts zu sterben, relativ hoch eingestuft. Betrachtet man im Gegensatz dazu die durch Partikel induzierte kardiovaskuläre Sterblichkeitsrate, so sind diese Todesfälle wegen ihrer größeren Häufigkeit bedeutsamer (Pope, III *et al.* 2004). Im Hinblick auf die erhöhte Herz-Kreislauf Mortalität haben sich Patienten mit bereits bestehenden ischämischen Herzerkrankungen, wie Angina pectoris, sowie Patienten mit Herzrhythmusstörungen als besonders gefährdet erwiesen (Pope, III *et al.* 2006). Außerdem demonstrierte die Arbeitsgruppe von Hoek eine in Abhängigkeit zur Entfernung zu Hauptverkehrsstraßen erhöhte kardiopulmonale Sterblichkeit (Hoek *et al.* 2002). Des Weiteren konnte in einer amerikanischen Studie eine statistisch signifikante Assoziation zwischen der Zunahme der Lungenkrebsmortalität und einer erhöhten partikulären Luftverschmutzung gezeigt werden (Krewski *et al.* 2005; Pope III *et al.* 2002).

### **1.2.2 Partikel-induzierte kardiovaskuläre und pulmonale Erkrankungen**

Eine große Anzahl von amerikanischen und europäischen epidemiologischen Studien beobachtete einen signifikanten Zusammenhang zwischen pulmonalen sowie kardiovaskulären Erkrankungen und einem Anstieg von partikelförmigen Luftverunreinigungen. Weitere Arbeiten zeigen eine Korrelation zwischen einem Anstieg der Herzfrequenz (Peters *et al.* 1999), einer eingeschränkten Herzfrequenzvariabilität (Pope III *et al.* 1999) und partikulärer Luftschadstoffbelastung. Steigende Konzentrationen von inhalierbaren Partikeln in der Außenluft erhöhen das Risiko für einen myokardialen Infarkt (D'Ippoliti *et al.* 2003; Peters *et al.* 2001b; Peters *et al.* 2004; Tonne *et al.* 2007). Des Weiteren belegen Studien der Arbeitsgruppe von Dockery Auswirkungen partikulärer Luftverschmutzung auf eine erhöhte Inzidenz von ventrikulärer Tachyarrhythmie (Dockery *et al.* 2005). Sowohl die Arbeiten von Pope (Pope, III *et al.* 2006) als auch von Pekkanen (Pekkanen *et al.* 2002) demonstrieren eine Assoziation zwischen ischämischen Herzerkrankungen und verstärkter Partikelbelastung. Weiter wurde die Feinstaubbelastung mit einem Anstieg des Blutdrucks (Ibald-Mulli *et al.* 2001), sowie einer erhöhten Plasmaviskosität in Verbindung gebracht (Peters *et al.* 1997).

Durch die Deposition der Partikel in der Lunge können zahlreiche akute und chronische Atemwegserkrankungen hervorgerufen werden. So konnte eine Korrelation zwischen Husten, Bronchitis, erniedrigten *peak-flow*-Werten (maximale Atemstromstärke bei forcierter Ausatmung) sowie eine höhere Medikamenteneinnahme bei Asthmatikern aufgrund partikelförmiger Luftverunreinigungen festgestellt werden (Dockery *et al.* 1996; Klot *et al.* 2002; Wichmann *et al.* 2000). Weiterhin wurde ein Zusammenhang zwischen einem erhöhten Risiko für Patienten mit COPD bzw. Pneumonie und einem Anstieg der Luftschadstoffe deutlich (Pope, III *et al.* 2004; Zanobetti und Schwartz 2005).

### **1.2.3 Wirkung von Partikeln auf zellulärer und molekularer Ebene**

Zusammenfassend demonstrieren die oben aufgeführten epidemiologischen Studien einen eindeutigen Zusammenhang zwischen gesteigerten pulmonalen oder kardiovaskulären Mortalitäts- bzw. Morbiditätsraten und einer erhöhten partikulären Luftbelastung. Anhand epidemiologischer Untersuchungen können aber keine Erkenntnisse hinsichtlich der Wirkungsmechanismen der partikelförmigen

Luftschadstoffe erlangt werden, sie beschreiben lediglich eine Assoziation zwischen einer erhöhten Schwebstaubbelastung und einem verstärkten Gesundheitsrisiko. Die Wirkungsmechanismen müssen durch zusätzliche Studien auf zellulärer und molekularer Ebene mit Hilfe von kontrollierten *in vivo* Versuchen an Mensch und Tier, wie auch durch *in vitro* Untersuchungen mit Zellkulturen ermittelt werden. Dabei sollte berücksichtigt werden, dass sich *in vivo* Studien, welche die Auswirkungen von Partikeln auf die Lunge nach kontrollierter Exposition untersuchen, nur auf akute, nicht aber auf chronische Partikelexpositionen beziehen.

Eine *in vivo* Inhalationsstudie, bei der gesunde Probanden über zwei Stunden  $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$  Dieselrußpartikel inhalierten, zeigte eine Induktion von Entzündungsreaktionen (Behndig *et al.* 2006). 18 Stunden nach der Exposition lag die Konzentration des inflammatorischen Zytokins Interleukin-8 (IL-8) und der Myeloperoxidase der Probanden, die Dieselruß inhalierten, über den Werten der kontroll-exponierten Probanden. Es wurde außerdem ein vermehrtes Auftreten von Entzündungszellen in den Atemwegen detektiert. Zudem wurde in einer weiteren Inhalationsstudie nachgewiesen, dass eine zweistündige Exposition mit  $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$  Partikeln ( $\text{PM}_{10}$ ) eine erhöhte Konzentration von Kohlenmonoxid (CO) im Atem, ein vermehrtes Vorkommen von Neutrophilen als auch der Myeloperoxidase von gesunden Probanden bewirkte (Nightingale *et al.* 2000). Eine erhöhte Konzentration von abgeatmetem CO wird *in vivo* mit vorherrschendem oxidativem Stress assoziiert. Des Weiteren konnte in einer Studie, infolge einer Instillation von städtischen Umweltstäuben ( $\text{PM}_{2,5}$ ,  $100 \mu\text{g}$ ) in die Lungen von gesunden Probanden, 24 Stunden nach Exposition eine deutliche Entzündung in den Atemwegen festgestellt werden (Schaumann *et al.* 2004). Ebenfalls demonstrierten Untersuchungen von Ghio und Devlin (2001) nach bronchialer Instillation von wässrigen Extrakten aus metallhaltigem Umweltstaub nach 24 Stunden einen verstärkten Einstrom von Entzündungszellen. Weiter führte eine Forschergruppe aus Schweden (Stenfors *et al.* 2004) kontrollierte Inhalationsstudien mit Dieselrußpartikeln ( $\text{PM}_{10}$ ) durch. Hierbei inhalierten sowohl gesunde Probanden als auch Patienten mit leichtem Asthma über zwei Stunden Dieselrußpartikel mit einer Dosis von  $108 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . Diese *in vivo* Exposition verursachte bei den gesunden Probanden sechs Stunden nach der Inhalation von Dieselruß eine Entzündung der Atemwege. Die Entzündungsreaktion charakterisierte sich durch ein vermehrtes Auftreten von neutrophilen Granulozyten (Neutrophilie), eine erhöhte Anzahl von Lymphozyten (Lymphozytose) im peripheren Blut und eine verstärkte IL-6 (Interleukin-6) und IL-8 Expression. Interleukine sind

von Leukozyten und Epithelzellen sezernierte Proteine (Zytokine), die an lokalen Entzündungsprozessen im Atemtrakt und auch an systemischen Effekten beteiligt sind. Im Gegensatz dazu zeigten die Untersuchungen an Probanden mit leichtem Asthma keine vergleichbaren Entzündungsreaktionen. Die unterschiedliche Wirkung könnte darauf zurückzuführen sein, dass Asthmatiker eine grundlegende Aktivität antiinflammatorischer Mechanismen, wie beispielsweise eine erhöhte Expression des Zytokinsyntheseinhibitors Interleukin-10 (IL-10), aufweisen und es damit zur verzögerten inflammatorischen Antwort kommt (Stenfors *et al.* 2004). Um diese Hypothese zu bestätigen, müssten Untersuchungen zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt werden. Eine weitere Inhalationsstudie, bei der Asthmatiker mit einer Partikeldosis von  $300 \mu\text{g}/\text{m}^3$  exponiert wurden, konnte jedoch einen direkten Zusammenhang zwischen einer erhöhten Atemwegshyperreaktivität sowie einer verstärkten IL-6 Sekretion und der Partikelexposition darstellen (Nordenhall *et al.* 2001).

*In vitro* Untersuchungen zur Wirkungsweise von partikulären Stäuben auf den Respirationstrakt wurden überwiegend an Zielzellen der Lunge durchgeführt. Lungenepithelzellen und Makrophagen treten hierbei direkt mit den Partikeln in Kontakt. Als erste Abwehrlinie gehören Makrophagen, aber auch Epithelien, zur angeborenen Immunabwehr. Die Makrophagen sind in der Lage Partikel (Bakterien, Mikroorganismen, Fremdkörper, Zelltrümmer) zu phagozytieren und deren Elimination mit Hilfe des oxidativen Metabolismus und lysosomaler Enzyme zu bewerkstelligen. Außerdem synthetisieren und sezernieren sie im aktivierten Zustand inflammatorische Mediatoren (Prostaglandine, Interleukine, koloniestimulierender Faktor, Tumor-Nekrose-Faktor), die die Funktion anderer Zellen bzw. Zellsysteme modulieren. Durch den Weitertransport von Mediatoren ins Gefäßsystem kommt es zu systemischen Wirkungen. Hierzu zählt man u.a. eine Änderung der Gefäßpermeabilität, Immunmodulation, aber auch die Entstehung von Fieber und Schmerz. Lokal wird durch die Freisetzung der inflammatorischen Substanzen, aber auch die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), eine akute Entzündungsreaktion initiiert. Hierbei werden durch Zell-Zell-Interaktionen einerseits umgebende Epithelzellen stimuliert und andererseits zusätzliche Entzündungszellen wie Neutrophile, Lymphozyten und Makrophagen in das Gewebe rekrutiert. Eine persistierende Bildung der Entzündungsmediatoren und ROS spielt eine wesentliche Rolle in der Entwicklung von chronischen Entzündungen, welche zur Schädigung des

Gewebes (Ödembildung, Fibrose) führen, aber auch das Risiko der Krebsentstehung erhöhen (Ardies 2003).

Untersuchungen an humanen, bronchialen Epithelzellen (BEAS-2B) zeigten, dass Flugaschepartikel die Freisetzung von IL-8 erhöhen (Diabate *et al.* 2002). Auch mit Alveolarmakrophagen aus der Ratte (NR8383) konnte eine erhöhte Freisetzung von IL-8 und TNF- $\alpha$  nach Partikelexposition nachgewiesen werden (Diabate *et al.* 2002; Haberzettl *et al.* 2007; Monn *et al.* 2003). Expositionen von primären, alveolaren Makrophagen von Ratten und primären Monozyten aus dem Mensch mit ultrafeinen *Carbon Black* Partikeln (UfCB, Printex 90) hatten eine erhöhte Expression von TNF- $\alpha$  zur Folge (Brown *et al.* 2004). Dieser Effekt ließ sich sowohl mit einem intrazellulären Calciumchelator als auch mit einem Radikalfänger (Nacystelin) hemmen, was auf einen direkten Zusammenhang zwischen inflammatorischen Effekten und oxidativem Stress hindeutet. Des Weiteren führte die Kokultivierung einer menschlichen Lungenepithel-Zelllinie (A549) mit Makrophagen-Zelllinien (THP-1, Mono Mac 6) nach Belastung mit SiO<sub>2</sub> und Hämatit Nanopartikeln zu einer verstärkten Sekretion der Interleukine IL-6 und IL-8 im Vergleich zur Monokultur der jeweiligen Zelllinie (Wottrich *et al.* 2004). Die Interaktion zwischen Makrophagen und Epithelzellen bewirkte eine Verstärkung der Entzündungsprozesse nach Partikelexposition. Das Zytokin TNF- $\alpha$  ist ein Signalstoff des Immunsystems und übernimmt eine zentrale Rolle in lokalen sowie systemischen Entzündungsreaktionen. Es induziert beispielsweise in autokriner und parakriner Weise die Expression weiterer proinflammatorischer Zytokine, wie IL-6 und IL-8. Hierbei wirkt IL-8 als chemotaktischer Faktor für Entzündungszellen, insbesondere für neutrophile Granulozyten. IL-6 bewirkt die Bildung von Akut-Phase-Proteinen wie Fibrinogen und C-reaktivem Protein (CRP) aus der Leber. Ein erhöhter Fibrinogengehalt aber auch eine erhöhte Konzentration des CRP im Blut gilt als Risikofaktor für die Entwicklung von Herz-Kreislaufkrankheiten. In diesem Zusammenhang zeigten verschiedene epidemiologische Studien in Abhängigkeit vom Partikelgehalt der Luft eine Erhöhung der Fibrinogen- (Pekkanen *et al.* 2000; Rückerl *et al.* 2007) und CRP-Konzentration (Peters *et al.* 2001a; Rückerl *et al.* 2006), was mit einer steigenden Plasmaviskosität einherging (Peters *et al.* 1997). Weitere *in vitro* Untersuchungen an Makrophagen zeigten, dass auch andere Mediatoren an der partikel-induzierten Entzündungsreaktion beteiligt sind. So wurde in einigen Arbeiten eine Freisetzung der Arachidonsäure, bzw. eine Freisetzung des Arachidonsäurederivats Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) nach Stimulation mit verschiedenen Partikeln beschrieben.



Es konnte die Synthese von PGE<sub>2</sub> in primären, mit Lipopolysaccharid-(LPS) vorbehandelten Makrophagen aus dem Menschen innerhalb einer vierstündigen Exposition mit Dieselrußpartikeln beobachtet werden (Hofer *et al.* 2004). In diesem Kontext wurde außerdem in LPS-vorbehandelten Zellen infolge der Partikelexposition eine Induktion der Cyclooxygenase-2 (COX-2), als Schlüsselenzym von Entzündungsreaktionen, detektiert. Die Arbeitsgruppe um Beck-Speier fand eine zweifache Erhöhung der PGE<sub>2</sub>-Synthese in primären alveolaren Makrophagen aus dem Hund nach einer einstündigen Behandlung mit ultrafeinen *Carbon Black* Partikeln sowie Dieselrußpartikeln (Beck-Speier *et al.* 2005). Studien belegen, dass die COX-2 bei einer chronischen Entzündung permanent exprimiert wird, wodurch eine andauernde Synthese von PGE<sub>2</sub> erfolgt (Langenbach *et al.* 1999; Wang *et al.* 2005c). Dies führt zur Unterdrückung der Apoptose und damit zu einem erhöhten Risiko der Karzinogenese.

Verschiedene Studien demonstrierten, dass die Generation von ROS an der partikel-induzierten Entstehung von inflammatorischen Prozessen eine entscheidende Rolle spielt. Partikel mit einer reaktiven Oberfläche oder gebundenen Übergangsmetallen sind in der Lage eine direkte ROS Bildung zu induzieren. Es ist aber auch möglich, dass sekundäre Radikale von alveolaren Makrophagen nach Kontakt mit Partikeln als Abwehrreaktion gebildet werden (Beck-Speier *et al.* 2005). ROS können zu Konformationsänderungen von Proteinen, Lipidperoxidation, aber auch die Oxidation von DNA bewirken. Zum anderen sind sie an der Aktivierung von Signalwegen beteiligt (Wang *et al.* 2005b). Dies bedingt u.a. eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, was letztendlich zu einer verstärkten oder reprimierten Expression von inflammatorischen Proteinen führt (Brown *et al.* 2004; Li *et al.* 2004). Zusammenfassend unterstreichen die epidemiologischen und toxikologischen Daten durchaus die Verbindung zwischen Partikel-induzierten Entzündungsprozessen und dem Auftreten von Lungen- und Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Jedoch gibt es auf diesem Gebiet noch vieles zu untersuchen. Insbesondere die partikel-induzierten, molekularen Mechanismen, welche zu lokalen und systemischen Entzündungen führen, gilt es aufzuklären. Deshalb sollten innerhalb dieses Forschungsprojektes mit realistischen Umweltpartikeln die zellulären Mechanismen, die zur Auslösung von Entzündungsprozessen führen, untersucht werden. Da oxidativer Stress dabei eine zentrale Rolle übernimmt, wird dieser in folgendem Kapitel genauer erläutert.

### 1.3 Oxidativer Stress

#### Bildung reaktiver Sauerstoffspezies

Unter oxidativem Stress versteht man eine Stoffwechsellage, die durch das Ungleichgewicht zwischen der Generierung und dem Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zugunsten der Oxidation charakterisiert ist (Sies 1986). ROS sind eine Gruppe von Molekülen, die sich durch ihre hohe chemische Reaktivität charakterisieren. Eine Vielzahl von ROS besitzen ungepaarte Elektronen und sind daher freie Radikale. Hierzu gehören Moleküle wie das Superoxid-Anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), Stickstoffmonoxid ( $NO^{\cdot}$ ), das Hydroxylradikal ( $\cdot OH$ ), aber auch Lipid-Radikale. Andere ROS wie Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) oder Hypochlorsäure ( $HOCl$ ) sind reaktive nicht-radikale Komponenten, die dennoch oxidierende Effekte haben, welche ebenfalls zum oxidativen Stress beitragen.

Die Verschiebung des Fließgleichgewichts zugunsten der Prooxidantien kann zum einen durch eine erhöhte Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), entweder durch äußere Einflüsse oder durch intrazelluläre Störungen, entstehen. Die endogenen Quellen reaktiver Sauerstoffspezies im Organismus können Enzymsysteme der Zelle wie beispielsweise Cyclooxygenasen, NADPH-Oxidasen sowie Enzyme der mitochondrialen Atmungskette sein. Die zelluläre ROS Produktion wird sowohl durch UV-Strahlung und Umweltfaktoren als auch durch Metallionen stimuliert (Aruoma *et al.* 1989; Klotz *et al.* 2001; Voelkel *et al.* 2003). Neben einem zeitweiligen Anstieg von ROS durch eine übermäßige Generierung kann oxidativer Stress aber auch durch eine reduzierte antioxidative Abwehr hervorgerufen werden.

#### Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies

Seit dem 20. Jahrhundert ist die Bedeutung von oxidativem Stress, sowie die Produktion von ROS als wichtige Faktoren in der Pathogenese vieler kardiovaskulärer Erkrankungen weltweit von wissenschaftlichem Interesse. Hierzu zählen Arteriosklerose, Bluthochdruck, Herzinsuffizienz und Diabetes (Cai und Harrison 2000; Shin *et al.* 2001). Außerdem besteht ein enger Zusammenhang zwischen der Generierung von ROS und Entzündungsreaktionen (Kamata *et al.* 2005; Rahman *et al.* 2002), Tumorigenese (Xia *et al.* 2007) und verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen wie beispielsweise Alzheimer-Demenz (Lovell und Markesbery 2007; Wang *et al.* 2005a).

ROS können zu vielseitigen Schädigungen des Zellmaterials bis hin zum Zelltod durch Apoptose oder Nekrose führen. Dabei können ROS als Signalmoleküle fungieren und die Aktivierung redox-sensitiver Signaltransduktionskaskaden initiieren, die die Zellen in den programmierten Zelltod, die Apoptose, führen (Mayer *et al.* 2005). Zum anderen fungieren ROS als direkte Effektoren bei der Oxidation von DNA, Proteinen und Lipiden. In der DNA kommt es u.a. zur Oxidation einzelner Basen (z. B. 8-Hydroxy-desoxyguanosin) und es entstehen Einzel- und Doppelstrangbrüche (Ames 1989; Sies und Menck 1992). Dabei entstandene Mutationen können zu Verschiebungen im Leseraster bzw. zum Austausch von Aminosäuren während der Translation führen. Außerdem können Proteine durch ROS geschädigt werden, was eine generelle Fehlfunktion oder sogar das Absterben der Zelle bedeuten könnte (Neuzil *et al.* 1993).

## Membranlipide als Target von ROS

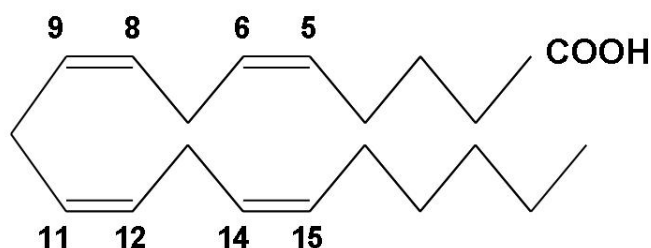
Eines der am häufigsten untersuchten Reaktionen von Radikalen ist die Lipidperoxidation an Zellmembranen und Lipidproteinen. Diese kann durch Superoxidradikale, Hydroxylradikale, Wasserstoffperoxid oder Singulett-Sauerstoff ausgelöst werden. Besonders anfällig für die Lipidperoxidation sind mehrfach ungesättigte Fettsäuren, die entweder frei oder in veresterter Form als Phospholipide in Membranen vorliegen. Die Endprodukte dieser Lipidperoxidation können beispielsweise zytotoxische und mutagene Eigenschaften besitzen (Herbst *et al.* 1999). Es besteht z.B. ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten bestimmter Krankheiten und einem deutlich erhöhten Gehalt an freien bzw. veresterten Isoprostanen (Shahid *et al.* 2005). Isoprostane entstehen über die nicht-enzymatische Umsetzung der Arachidonsäure durch freie Radikale und gelten als verlässlicher Parameter des *in vivo* vorherrschenden oxidativen Stresses (Montuschi *et al.* 2000).

## **1.4 Regulation von Signalwegen durch Redoxprozesse**

### **1.4.1 Mehrfach ungesättigte Fettsäuren - Eicosanoide und Arachidonsäurekaskade**

Aus einer mehrfach ungesättigten Fettsäure und Sauerstoff können Organismen mit Hilfe zahlreicher Enzyme eine große Zahl von kurzlebigen, aber biologisch hochaktiven Fettsäurederivaten bilden. Diese sind an der Kontrolle nahezu

sämtlicher Lebensvorgänge beteiligt. In tierischen und menschlichen Organismen wird hierbei am häufigsten die mehrfach ungesättigte Arachidonsäure (AA) verwendet. Allerdings geht speziell die Biosynthese der Arachidonsäuremetabolite nicht ohne Risiko einher, denn nach heutigem Wissen scheinen Fehlsteuerungen der kontrollierten Oxidation der Arachidonsäure entscheidend zur Entstehung von Lungenerkrankungen, aber auch von Krankheiten wie Krebs und Alzheimer-Demenz beizutragen (Charbeneau und Peters-Golden 2005; Nakanishi und Rosenberg 2006). Die Arachidonsäure (5, 8, 11, 14 Eicosatetraencarbonsäure), der wichtigste Vorläufer für eine große Anzahl von biologisch hoch wirksamen Mediatoren, welche auch Eicosanoide [eicosa (griechisch): zwanzig] genannt werden, ist eine mehrfach ungesättigte Fettsäure mit 20 Kohlenstoffatomen und vier cis-Doppelbindungen (20:4, zwanzig Kohlenstoffatome und vier Doppelbindungen), durch welche sie mit molekularem Sauerstoff reagieren kann (Abb. 3).

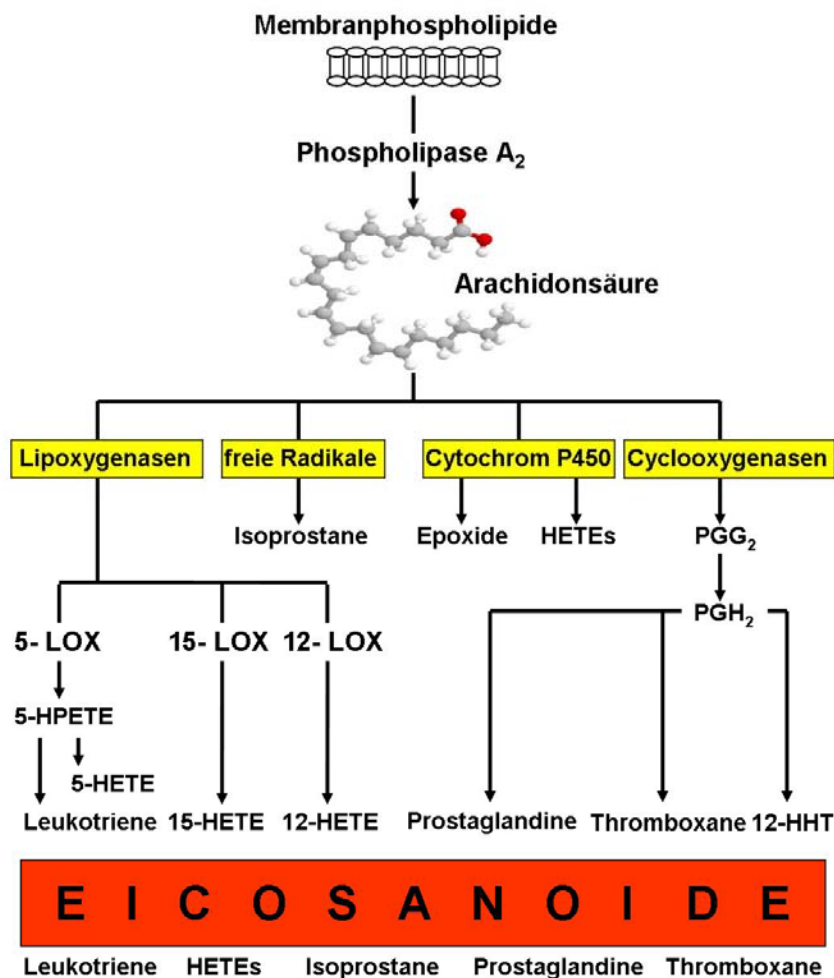


**Abb. 3: Strukturformel der Arachidonsäure**

Dargestellt ist die Strukturformel der Arachidonsäure (5, 8, 11, 14 Eicosatetraencarbonsäure), mit ihren zwanzig Kohlenstoffatomen und vier isolierten cis- Doppelbindungen.

Die Arachidonsäure wird entweder mit der Nahrung aufgenommen oder in Zellen aus der essentiellen Fettsäure Linolsäure aufgebaut. Wie andere Fettsäuren auch wird die Arachidonsäure in Membranphospholipide eingebaut. Dort befindet sie sich wie die meisten ungesättigten Fettsäuren an der sn-2 Position (sn, stereospezifische Nummerierung) des Glycerins. Von Phospholipiden freigesetzt wird die Arachidonsäure durch die Aktivierung der Phospholipase A<sub>2</sub>. Dieser Schritt initiiert die Bildung von Arachidonsäuremetaboliten und übernimmt somit eine Schlüsselfunktion bei der Biosynthese unterschiedlichster inflammatorischer Metabolite. Die freie Arachidonsäure ist zum einen selbst ein wichtiges Signalmolekül, dient aber andererseits auch als Substrat für die Synthese weiterer Verbindungen durch nachgeschaltete metabolische Enzyme, wie Cyclooxygenasen (COX), Lipoxygenasen (LOX) und Cytochrom-P450-Epoxygenasen. Infolge dieser Umwandlung entstehen unter anderem Prostaglandine und Leukotriene, die vor allem als Entzündungsmediatoren (Eicosanoide) eine sehr wichtige Rolle spielen.

Des Weiteren sind freie Radikale in der Lage, die Arachidonsäure nicht-enzymatisch zu Isoprostanen zu oxidieren (Montuschi *et al.* 1999; Morrow und Roberts 1997). Eicosanoide werden bei Säugern von jedem Gewebe als Antwort auf hormonelle, immunologische sowie Umweltreize gebildet (Pawliczak *et al.* 2002). Sie sind kurzlebige Metabolite und somit im Unterschied zu systemisch agierenden Hormonen in auto- und parakriner Art wirksam. Nach wie vor ist die Bedeutung der Eicosanoide nicht bis ins Detail geklärt. Aber eine ihrer Funktionen ist, die Reaktionen einzelner Zellen auf die eintreffenden Signale zu einer übergeordneten Gewebsreaktion zu integrieren und zu koordinieren. Eicosanoide bilden hiermit ein für komplexe, mehrzellige Organismen wichtiges Signalsystem. In Abb. 4 ist die Entstehung von Eicosanoiden durch die Arachidonsäurekaskade zusammengefasst.



**Abb. 4: Schematische Darstellung wichtiger Arachidonsäure-Stoffwechselwege**

Die AA wird durch die Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) aus Membranlipiden freigesetzt. Die Cyclooxygenasen (COX) setzen die AA in Prostaglandine und Thromboxane um, die Lipoxygenasen (LOX) metabolisieren die AA zu Leukotrienen. Zusätzlich findet eine Metabolisierung der AA über Cytochrom-P450-abhängige Enzyme statt. Hierbei entstehen durch Hydroxylaseaktivität Hydroxyeicosatetraensäuren (HETEs) oder durch Epoxygenaseaktivität Epoxyeicosatriensäuren (EETs). Außerdem kann die AA durch eine nicht-enzymatische Lipidperoxidation zu Isoprostanen oxidiert werden.

#### 1.4.1.1 Die Superfamilie der Phospholipasen

Phospholipasen stellen eine sehr große und vielfältige Enzymfamilie dar. Angefangen bei der generellen Membranumbildung und der damit verbundenen Regulation der zellulären Lipidhomöostase bis hin zur Bildung wichtiger Signalmoleküle übernehmen sie vielfältigste biologische Aufgaben. Diese beruhen allesamt auf der hydrolytischen Spaltung von Glycerophospholipiden, die vor allem wichtige Bestandteile von zellulären Membranen sind. Hinsichtlich ihres Angriffsorts am Glycerophospholipid unterteilt man die Phospholipasen in vier Gruppen: die Phospholipasen A (PLA<sub>1</sub> und PLA<sub>2</sub>) sowie die Phospholipase B spalten spezifisch die Fettsäurereste im Phospholipid ab, womit sie den Acylhydrolasen zugehören. Im Gegensatz dazu gehören die Phospholipase C und Phospholipase D zur Gruppe der Phosphodiesterasen.

PLA<sub>2</sub> bilden aufgrund ihrer hohen Diversität eine Superfamilie (Six und Dennis 2000). Sie katalysieren spezifisch die Hydrolyse der sn-2 Esterbindung in Phospholipiden. Diese Spaltung führt zur Mobilisation von Fettsäuren, vorwiegend der Arachidonsäure als Vorläufer von Entzündungsmediatoren, und zur Bildung von Lysophospholipiden. Diese Lysophospholipide agieren in Membranen als Detergenz, übernehmen aber auch als Vorläufer für Signalmoleküle wie z. B. des PAF (*platelet-activating-factor*) und bei dem *Phospholipid-remodeling* eine entscheidende Rolle. Somit können PLA<sub>2</sub> eine wichtige Aufgabe in der Weiterleitung und Regulation vieler Signale übernehmen.

Bis heute wurden 15 verschiedene Gruppen der PLA<sub>2</sub> Superfamilie identifiziert (Schaloske und Dennis 2006). Weiter wird die PLA<sub>2</sub>-Familie, abhängig von Größe, Calcium-(Ca<sup>2+</sup>) Abhängigkeit, sowie biochemischen Eigenschaften und Funktionen in fünf unterschiedliche Enzym-Typen unterteilt: die sekretorische PLA<sub>2</sub>, die zytosolische PLA<sub>2</sub>, die Ca<sup>2+</sup>-unabhängige PLA<sub>2</sub>, die lysosomale PLA<sub>2</sub> und die *platelet-activating-factor* Acetylhydrolase (PAF-AH). Die PAF-AH nimmt eine Außenseiterstellung ein, da ihr nicht Phospholipide, sondern der PAF (*platelet-activating-factor*) und oxidierte Phospholipide als Substrat dienen.

## Die sekretorische Phospholipase A<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>)

Insgesamt wurden 10 katalytisch aktive sPLA<sub>2</sub> Enzyme in Säugetieren identifiziert. Sie besitzen ein Molekulargewicht von 14-18 kDa. Die Hydrolyse von Glycerophospholipiden durch sPLA<sub>2</sub> erfolgt ohne stringente Selektivität bestimmter Fettsäuren, zeigt aber eine Präferenz für anionische Phospholipide, wie beispielsweise Phosphoserin (PS), Phosphoethanolamin (PE) oder aber für das neutrale Phosphatidylcholin (PC). Außerdem kennzeichnen sich sPLA<sub>2</sub> durch mehrere Disulfidbrücken, welche ihnen eine hohe Stabilität gegen die Degradation in extrazellulären Flüssigkeiten verleihen (Kudo und Murakami 2002). Weiter beinhalten die meisten der sPLA<sub>2</sub> eine einheitliche Ca<sup>2+</sup>-Bindungsstelle und benötigen zur Aktivierung als Kofaktor Calcium im millimolaren Konzentrationsbereich. Millimolare Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen liegen vor allem in extrazellulären Flüssigkeiten vor, wo auch die von diesen hohen Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen abhängigen sPLA<sub>2</sub> vorkommen.

Prinzipiell geht man davon aus, dass die meisten sPLA<sub>2</sub> vor ihrer eigentlichen hydrolytischen Aktivität an zellulären Membranen zunächst in intrazellulären Vesikeln deponiert oder nach Stimulation von Zellen exprimiert und anschließend über Exozytose sezerniert werden. Nach Aktivierung der Zelle werden die sPLA<sub>2</sub> beladenen Membrandomänen endozytotisch nach innen abgeschnürt und in den perinukleären Raum transportiert. Hier lokalisieren sie dicht neben nachgeordneten Enzymen wie der Cyclooxygenase und der Lipoxigenase, denen sie unmittelbar freigesetzte Arachidonsäure zur Metabolisierung zur Verfügung stellen können (Shirai *et al.* 2005).

## Die zytosolische Phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>)

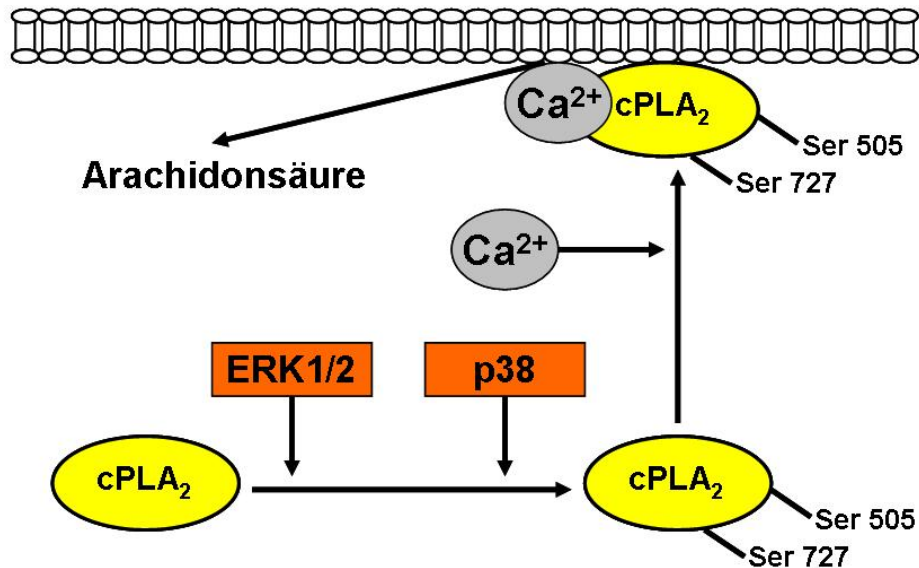
1986 wurde eine PLA<sub>2</sub> identifiziert, die sich von den sPLA<sub>2</sub> strukturell stark unterschied (Alonso *et al.* 1986; Channon und Leslie 1990; Kramer *et al.* 1986). Da diese PLA<sub>2</sub> zuerst im Zytosol von Blutplättchen und Makrophagen identifiziert wurde, kennzeichnete man sie als zytosolische PLA<sub>2</sub>. Weiter werden die cPLA<sub>2</sub> aufgrund ihres im Vergleich zu sPLA<sub>2</sub> hohen Molekulargewichts von ca. 61-114 kDa auch als *high molecular weight* PLA<sub>2</sub> bezeichnet. Sie werden durch Stimuli wie beispielsweise Zytokine, Endotoxine, Trypsin, reaktive Sauerstoffspezies, aber auch durch ultrafeine Partikel aktiviert (Beck-Speier *et al.* 2005; Sapirstein und Bonventre 2000; Shirai *et al.* 2005). Bisher sind in Säugern vier strukturelle Isoformen der cPLA<sub>2</sub> ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ )

bekannt, die sich hinsichtlich der zwei katalytisch wichtigen Domänen gleichen. Die cPLA<sub>2</sub>  $\gamma$  wird im Herz- und Skelettmuskel exprimiert. Eine Beteiligung des Enzyms am Membranumbau und an der Arachidonsäurefreisetzung während oxidativem Stress wurde gezeigt (Asai *et al.* 2003). Die cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  sowie die cPLA<sub>2</sub> $\beta$  verfügen über eine N-terminale Domäne, welche für die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Bindung des Enzyms mit seinem Substrat verantwortlich ist. Die cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  zeichnet sich durch eine stringente Fettsäurepräferenz für Glycerophospholipide aus, die an der sn-2 Position Arachidonsäure enthalten (Diez *et al.* 1994). Somit spalten cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  spezifisch Arachidonsäure aus Membranphospholipiden und katalysieren damit sowohl die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion der Freisetzung von Arachidonsäure als auch die anschließende Synthese der Eicosanoide. Aus diesem Grund beziehen sich die nachstehenden cPLA<sub>2</sub>-Beschreibungen stets auf die cPLA<sub>2</sub> $\alpha$ .

Die Regulation der cPLA<sub>2</sub> erfolgt auf verschiedenen Ebenen, die sowohl stimulus- als auch zelltypabhängig sind (Abb. 5). Zum einen wird die enzymatische Aktivität der cPLA<sub>2</sub> durch Phosphorylierungen an definierten Serinen (Serin 505, Serin 727) in der katalytischen Domäne reguliert (Borsch-Haubold *et al.* 1998; Lin *et al.* 1993). Je nach Stimulus kann die cPLA<sub>2</sub> sowohl durch die p38 Kinase als auch durch die extrazellulär regulierte Kinase (ERK1/2) phosphoryliert und aktiviert werden (Gijon *et al.* 2000; Lin *et al.* 1993). Eine maximale Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> wird außerdem durch eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration erreicht (Hirabayashi *et al.* 1999). Der Calciumanstieg erfolgt entweder über einen Calciumeinstrom durch Calciumkanäle an der Plasmamembran oder durch Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern, beispielsweise des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Calcium bindet an die Calciumbindungsdomäne (C2) des Enzyms und bewirkt eine Translokation der im Zytoplasma vorliegenden cPLA<sub>2</sub> zu Membrankompartimenten des ER, des Golgi-Apparates und der Kernmembran, wo sie mit ihrem Substrat zusammen trifft (Evans und Leslie 2004; Schievella *et al.* 1995; Stahelin *et al.* 2003). Die primäre Funktion der cPLA<sub>2</sub> ist die Freisetzung der Arachidonsäure aus Glycerophospholipiden und somit ist sie in Entzündungsprozessen involviert. Zur Charakterisierung physiologischer cPLA<sub>2</sub> Funktionen *in vivo*, war die Etablierung einer cPLA<sub>2</sub> *knock-out* Maus von wesentlicher Bedeutung. Adulte, cPLA<sub>2</sub>-defiziente Mäuse zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen geringe morphologische Veränderungen (Bonventre *et al.* 1997). Allerdings zeigten cPLA<sub>2</sub>-defiziente Tiere eine weitaus größere Resistenz gegenüber schweren entzündlichen Erkrankungen im Gehirn, den Gelenken und den Atmungsorganen (Bonventre *et al.* 1997; Nagase



T *et al.* 2002; Nagase T. *et al.* 2000; Tabuchi S *et al.* 2003). Diese Ergebnisse deuten auf eine direkte Verbindung zwischen der cPLA<sub>2</sub>, der Freisetzung der Arachidonsäure, der Biosynthese von Eicosanoiden und inflammatorischen Vorgängen hin.



**Abb. 5: Schematische, vereinfachte Darstellung der Aktivierung der zytosolischen Phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>)**

Die Aktivierung der zytosolischen Phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) und die daraus resultierende Freisetzung der Arachidonsäure erfolgt zum einen durch die Phosphorylierung des Enzyms durch die extrazellulär regulierte Kinase (ERK1/2) und p38 Kinase an Serin 505 und Serin 727. Zum anderen bewirkt eine gleichzeitige Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration eine vollständige Aktivierung und Translokation der cPLA<sub>2</sub> vom Zytosol zu perinukleären Membranen des Endoplasmatischen Retikulums (ER), des Golgi-Apparates oder des Zellkerns.

### Die Ca<sup>2+</sup>-unabhängige Phospholipase A<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>)

Weiterhin wurde neben den bereits aufgeführten calciumabhängigen Enzymen Phospholipasen A<sub>2</sub> im Zytosol isoliert, die in ihrer Struktur von den sPLA<sub>2</sub> und cPLA<sub>2</sub> differieren und keine Calcium-Ionen als Kofaktoren benötigen. Diese werden als Ca<sup>2+</sup>-unabhängige PLA<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>) bezeichnet. Vertreter der Ca<sup>2+</sup>-unabhängigen iPLA<sub>2</sub>-Gruppe wurden in unterschiedlichen Spezies und verschiedenen Zelltypen identifiziert (Winstead *et al.* 2000). Die iPLA<sub>2</sub> spielt eine Schlüsselrolle beim *Phospholipid-remodeling* (Lands-Zyklus) und somit bei der Phospholipidhomöostase von ruhenden Zellen (Balsinde *et al.* 1995). Hierbei werden Phospholipide zu Lysophospholipiden umgewandelt, damit anschließend wieder gezielt Fettsäuren eingebaut werden können. Dies betrifft vorwiegend die Veresterung der

Arachidonsäure an der sn-2 Position des Glycerins. Weiterhin besitzt dieses Enzym eine wichtige Funktion bei der Kontrolle der Eicosanoidsynthese, da diese zum einen an den Gehalt von Arachidonsäure in den Zellen gekoppelt ist (Balboa und Balsinde 2002; Perez *et al.* 2004) und zum anderen eine langfristige Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> zu einer Aktivierung der iPLA<sub>2</sub> führt (Shirai *et al.* 2005).

#### 1.4.1.2 Die Cyclooxygenasen

Die Cyclooxygenasen (COX), auch Prostaglandin-Endoperoxid-Synthasen genannt, sind die Schlüsselenzyme für die Biosynthese der Prostaglandine, Prostacycline und Thromboxane, welche als Prostanoiden bezeichnet werden (Herschman 1996). Nach heutigem Wissen existieren zwei COX Isoformen: COX-1 und COX-2. Es handelt sich bei diesen Enzymen um Dioxygenasen, die in einem ersten Schritt zwei Sauerstoffmoleküle an freie, im Zytosol vorliegende Arachidonsäure übertragen. Dabei entsteht das enzymgebundene Endoperoxid Prostaglandin G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>). In der Folgereaktion wird durch die Peroxidaseaktivität der Cyclooxygenasen Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) produziert. Dieses ist frei löslich und stellt das Substrat weiterer PGH<sub>2</sub> metabolisierender Enzyme dar. Beispielsweise wird PGH<sub>2</sub> enzymatisch durch die Endoperoxidisomerase in die Prostaglandine (PG) PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> umgewandelt. Die Entdeckung, dass die COX-Aktivität und damit ihre Produkte, die Prostanoiden, eine Schlüsselfunktion in der Entzündungsreaktion ausüben, geht in das Jahr 1969 zurück, in dem veröffentlicht wurde, dass die Wirkung der anti-inflammatorischen Medikamente, wie beispielsweise Aspirin, auf die Inhibierung der Prostaglandinsynthese zurückzuführen sei (Piper und Vane 1969). Tatsächlich ist der zugrunde liegende Wirkmechanismus der therapeutisch eingesetzten nicht-steroidalen Antiphlogistika (*nonsteroidal anti-inflammatory drugs*, NSAID) identisch, indem diese durch die Inhibierung der COX-Aktivität eine Hemmung der Prostanoid-Synthese erzielen.

Die COX-1 und COX-2 sind membrangebundene Glykoproteine und zeigen eine 60%ige Aminosäuresequenzhomologie. Die zwei 70 kDa großen COX-Isoformen sind Produkte von single-copy Genen, die auf zwei verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind. COX-1 ist auf Chromosom 9, COX-2 auf Chromosom 1 lokalisiert (Funk *et al.* 1991; Jones *et al.* 1993). Die Cyclooxygenase-1 findet sich offensichtlich in den meisten Geweben des menschlichen Organismus und wird dort konstitutiv exprimiert. Sie spielt eine wichtige Rolle in der Vermittlung von physiologischen Funktionen wie beispielsweise bei der Blutgerinnung und beim Schutz des Magens

vor Selbstverdauung. Die Cyclooxygenase-2 ist unter normalen physiologischen Bedingungen in den meisten Geweben nicht detektierbar, nur in bestimmten Organen z.B. in der Niere, dem Gehirn und Rückenmark erfolgt eine konstitutive COX-2 Expression. Die Tatsache, dass COX-2 knock-out Mäuse schwere Nephropathien entwickeln und nicht lebensfähig sind, deutet auf die physiologische Bedeutung dieses Enzyms hin (Langenbach *et al.* 1999). Die pathophysiologische und physiologische Bedeutung der Produkte der COX-2 erstreckt sich auf akute und proliferative Entzündungen, Arthritis und Kolonkrebs. Im Zuge der Entzündungsreaktion wird vom Organismus eine transiente Induktion der COX-2 ausgelöst. Induktoren sind z. B. Onkogene, inflammatorische Zytokine, Wachstums- und Umweltfaktoren (Fritsch *et al.* 2006; Liu *et al.* 2007) sowie UV-Bestrahlung (Buckman *et al.* 1998). Auf der anderen Seite führen antiinflammatorische Zytokine sowie Kortikosteroide zur Reduktion der COX-2 Expression, was die Bedeutung der COX-2 vermittelten Prostanoid-Synthese in entzündlichen Prozessen unterstützt. Neben der pathophysiologischen Bedeutung der COX-2 vermittelten Prostanoidsynthese im Bereich der Entzündungsreaktionen zeigen weitere Untersuchungen einen starken Zusammenhang zwischen einer dauerhaften COX-2 Aktivierung und der Entstehung und Entwicklung von Tumoren (Liu *et al.* 2001). Dabei ist zum einen in malignen Tumoren die COX-2 stark überexprimiert (Soumaoro *et al.* 2004) und zum anderen führt die selektive Inhibition der COX-2 Expression und der COX-2 Aktivität zu einer starken Reduktion des Wachstums von epidermalen Tumorzellen (Higashi *et al.* 2000). Dies wird durch epidemiologische Studien unterstützt, die zeigen, dass Personen, die chronisch Aspirin einnahmen, wesentlich seltener an Colorectal-Krebs erkrankten (Smalley und DuBois 1997).

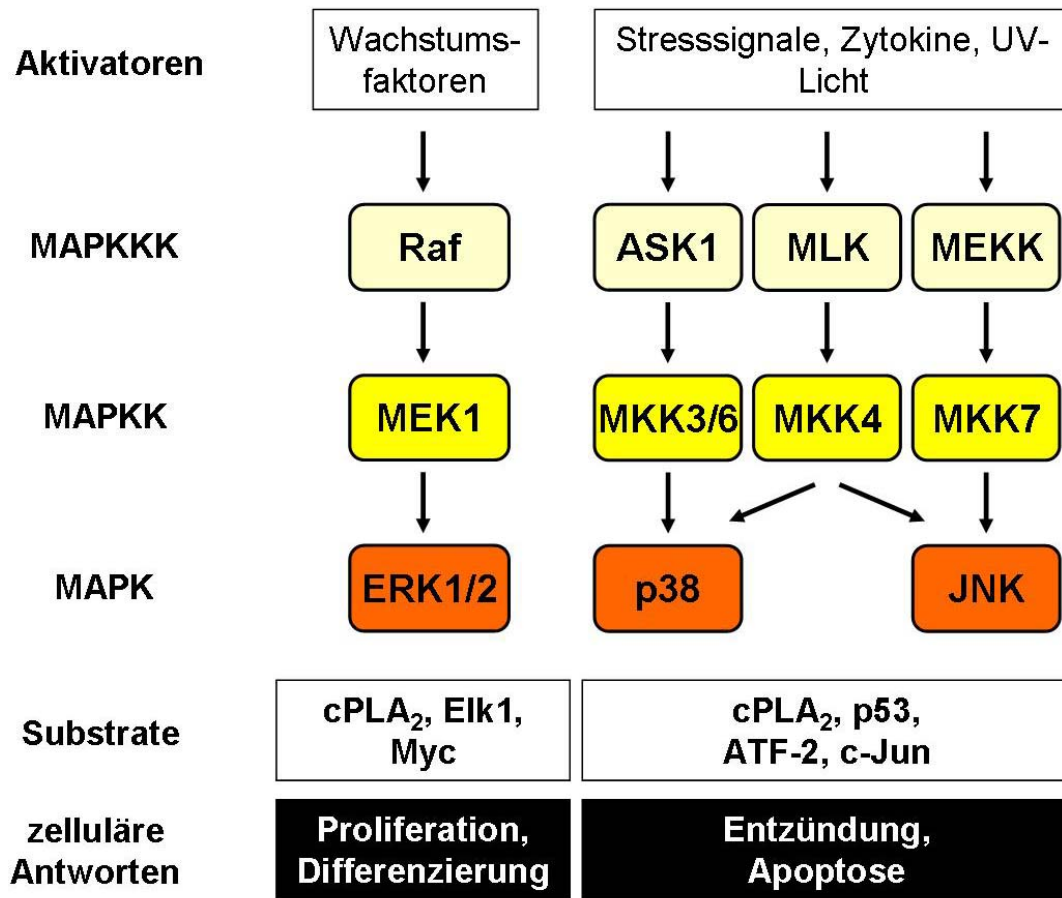
#### **1.4.2 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen**

Die Übertragung extrazellulärer Signale über eine Zellmembran hinweg ins Zellinnere wird als Signaltransduktion bezeichnet. Sie ermöglicht dem vielzelligen Organismus neben der intrazellulären Steuerung von physiologischen Vorgängen auch die interzelluläre Kommunikation und ist somit ein wichtiger Mechanismus, veränderte Umweltbedingungen wahrzunehmen und zweckgerichtet auf diese zu reagieren. Die Signaltransduktion dient also der Wahrnehmung, Verarbeitung und Reaktion von Umweltreizen und umfasst die Regulation einer großen Anzahl von Proteinen, die sich in ihrer enzymatischen Aktivität netzwerkartig stark beeinflussen. Am Ende der Reaktion steht eine modulierte Genexpression.

Zu dem ausgefeilten System zählen neben Rezeptoren der Zellmembran, intrazellulären Rezeptorproteinen auch Proteinkinasen und -phosphatasen und eine Vielzahl weiterer Proteine, die mit anderen Signalproteinen in Wechselwirkung treten. Die Gruppe von Proteinkinasen, die als MAP Kinasen (mitogen-aktivierte Proteinkinasen) bezeichnet werden, hat an der Vermittlung von zellulären Effekten eine besondere Bedeutung. Zu ihnen zählen die MAP Kinase ERK1/2 (extrazellulär regulierte Kinasen 1/2), die nach ihrer Molekülmasse bezeichnete p38 Kinase sowie die nach ihrem Hauptsubstrat c-jun benannte JNK (c-jun NH<sub>2</sub>-terminale Kinase) MAP Kinase, wobei jede Familie aus einer unterschiedlichen Anzahl von Subtypen besteht. Die Aktivierbarkeit von JNK und p38 MAPK durch Stressoren, wie UV-Licht und proinflammatorische Zytokine, führte zu ihrer Bezeichnung als Stress-aktivierte Proteinkinasen (SAPK).

Bei den MAP Kinasen handelt es sich um Serin/Threonin-Kinasen, die ihrerseits durch eine Vielzahl von extrazellulären Stimuli über Phosphorylierung an Threonin (Thr) und Tyrosin (Tyr) aktiviert werden. Dabei ist ihnen ein Thr-X-Tyr Motiv in der Aktivierungsregion gemeinsam. Aktivierte MAPK sind in der Lage weitere Signalwege, wie die Arachidonsäurekaskade, zu initiieren aber auch eine Reihe unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren zu phosphorylieren und damit die Signalübertragung von der Zelloberfläche zum Zellkern zu gewährleisten. Hierbei translozieren MAPK nach ihrer Aktivierung in den Zellkern, wo sie durch Serin/Threoninphosphorylierung bestimmter Transkriptionsfaktoren entscheidend zur Regulation der Genexpression beitragen. Die Stärke und Dauer der MAPK Aktivierung kann durch unterschiedliche Wege beeinflusst werden. Ein wichtiger Mechanismus zur Inaktivierung der Proteinaktivität stellt die Abspaltung von Phosphatgruppen durch Phosphatasen dar (Dephosphorylierung). Des Weiteren hängt die Proteinaktivität der MAPK von stromaufwärts gelegenen Proteinkinasen ab. Die Signalwege der verschiedenen MAP Kinasen sind in der gleichen Art hierarchisch gegliedert und umfassen zwei weitere Arten von Kinasen, die ihnen bezüglich der Regulation vorangestellt sind und als MAP Kinase Kinase (MKK) und MAP Kinase Kinase Kinase (MKKK) bezeichnet werden. Die Fähigkeit der unterschiedlichen MAP Kinasen gleiche Ziele zu aktivieren und das Vorhandensein von Brückenproteinen zeigt außerdem, dass eine große Vernetzung zwischen den verschiedenen Wegen der MAPK besteht. Zu den MAPK-induzierten Zellantworten zählen die Steuerung von Enzymaktivitäten, etwa durch die Hemmung oder Förderung der Enzymsynthese, die Steuerung der Zellproliferation, der

Zelldifferenzierung, der Regulation von Entzündungsprozessen oder des programmierten Zelltodes (Apoptose).



**Abb. 6: Schematische Darstellung der wichtigsten MAP Kinase Signalwege in Eukaryoten**

Der ERK1/2 Aktivator ist die sog. Raf-1 Kinase, die ihrerseits durch eine Ras Kinase stimuliert wird. Zu den hauptsächlichen Zielproteinen von ERK1/2 zählt u. a. die zytosolische Phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>). Außerdem transloziert ERK1/2 nach Aktivierung in den Zellkern und phosphoryliert dort Transkriptionsfaktoren wie Elk1 und Myc. Es kommt zur Transkription von Genen, die für Wachstum und Differenzierung verantwortlich sind. Weitere Mitglieder der MAPK Kaskade sind die JNK (c-jun NH<sub>2</sub>-terminale Kinase) und p38 Kinase. Diese Signalkaskaden werden durch UV-Bestrahlung, inflammatorische Zytokine oder zellulären Stress aktiviert. Aktivierte JNK bindet an die N-terminale Region von c-Jun und phosphoryliert dieses an Serin 63 und 73. Die Aktivierung von p38 erfolgt durch die Phosphorylierung dieses Proteins über eine MAP Kinase Kinase (MKK). Nach erfolgter Aktivierung ist die p38 Kinase an der Regulation der cPLA<sub>2</sub> beteiligt, transloziert aber auch in den Nukleus und phosphoryliert dort beispielsweise den Transkriptionsfaktor ATF-2 (aktivierender Transkriptionsfaktor 2).

### 1.5 Die antioxidative Abwehr

Um der schädigenden Wirkung von ROS zu entgegenzuwirken, besitzt die Zelle antioxidative Schutzmechanismen. Neben unspezifischen, niedermolekularen, nicht-enzymatischen Antioxidantien wie Vitaminen liegen in der Zelle spezifische ROS-abbauende Enzyme vor.

Außerdem gibt es synthetisch hergestellte Antioxidantien, wie beispielsweise N-Acetylcystein, welche in der Medizin als Therapeutika eingesetzt werden.

### 1.5.1 Niedermolekulare, nicht-enzymatische Antioxidantien

Es gibt eine wichtige Gruppe niedermolekularer, nicht-enzymatischer Antioxidantien, die Zellen schützen, indem sie selbst mit den ROS reagieren, um deren schädigende Wirkung einzudämmen. Diese Antioxidantien werden durch ihre Reaktion mit ROS selbst zum Radikal, wobei sie durch zelluläre Recycling-Systeme wieder reduziert und damit hinsichtlich ihrer Wirkung regeneriert werden. Innerhalb dieser Gruppe differenziert man zwischen wasserlöslichen und fettlöslichen Antioxidantien. Die wasserlöslichen Antioxidantien (z. B. Glutathion und N-Acetylcystein) fangen die zytosolischen ROS, wohingegen die fettlöslichen Antioxidantien (wie z. B. Vitamin E,  $\beta$ -Carotin) schon allein wegen ihrer Lokalisation in zellulären Membranen vorwiegend der Lipidperoxidation entgegenwirken.

#### Glutathion

Glutathion (GSH) ist ein Tripeptid - L- $\gamma$ -Glutamyl-L-Cysteinyl-Glycin ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) -, das in zahlreichen zellulären Mechanismen eine Rolle spielt. Seine Hauptaufgabe besteht jedoch im Abfangen von Radikalen und als Reduktionsmittel, sowie als Reservoir für Cystein. Die Fähigkeit von Glutathion als Elektronendonator Wasserstoffatome von seiner Thiol-Gruppe zu spenden, um damit Radikale zu binden, macht seine Wirksamkeit als Antioxidanz aus.

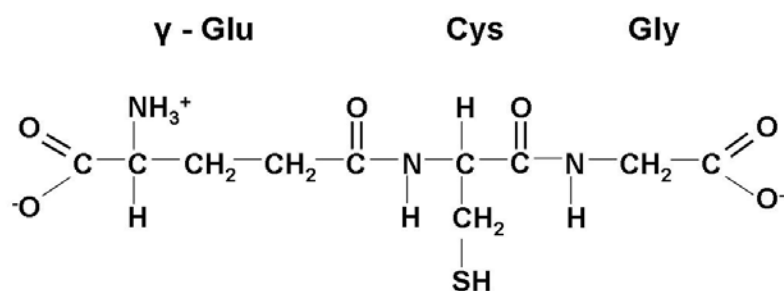


Abb. 7: Strukturformel des reduzierten Glutathion

#### Vitamin E

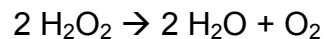
Vitamin E ist der Oberbegriff für eine Gruppe biologisch aktiver, lipidlöslicher Komponenten, zu denen Tocopherole zählen.  $\alpha$ -Tocopherol ist die vorherrschende Substanz im Plasma und spielt eine bedeutende Rolle als Antioxidanz. Es kann sich in Membranen einlagern und dort die Lipidperoxidation hemmen.

## 1.5.2 Enzymatische Antioxidantien

Neben den niedermolekularen, nicht-enzymatischen Antioxidantien gibt es auch antioxidativ wirkende Enzyme. Zu diesen gehören solche Enzyme, die ROS katalytisch eliminieren, die niedermolekulare Antioxidantien produzieren oder die oxidative Schäden an Proteinen, Membranlipiden oder DNA erkennen und zu deren Entfernung bzw. Reparatur beitragen. Hierzu zählen Enzyme wie die Hämoxygenase-1 (HO-1), Katalase, Superoxiddismutase (SOD) und Glutathion-Peroxidase (GPx).

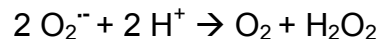
### Die Katalase

Die Katalase ist vorwiegend in den Peroxisomen lokalisiert und dient dort der enzymatischen Detoxifikation von  $\text{H}_2\text{O}_2$ , wobei Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ) und molekularer Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ) entsteht:



### Die Superoxiddismutase

Die Superoxiddismutase (SOD) katalysiert die Dismutation der zellulären Superoxidanionradikale ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ) zu Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und molekularem Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ):



### Die Glutathionperoxidase

Die Glutathionperoxidase (Gpx) übernimmt eine wichtige Rolle beim zellulären Schutz gegen Oxidantien und bei der Entgiftung. Sie ist ein selenhaltiges Enzym, welches für den Peroxid-Abbau sorgt und dabei Glutathion (GSH) als Reduktionsmittel benutzt, insbesondere in  $\text{H}_2\text{O}_2$ -sensitiven Bereichen wie den Mitochondrien.

### Die Hämoxygenase

Die Hämoxygenase gehört zur Familie der Monooxygenasen. Sie katalysiert unter Verwendung von NADPH (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat) und Sauerstoff die oxidative Spaltung des Protoporphyrins Häm. Dieses ist der nach Abtrennung des Proteinanteils (Globin) verbleibende toxische Anteil des roten Blutfarbstoffs Hämoglobin. Bei diesem von der Hämoxygenase katalysierten Reaktionsschritt

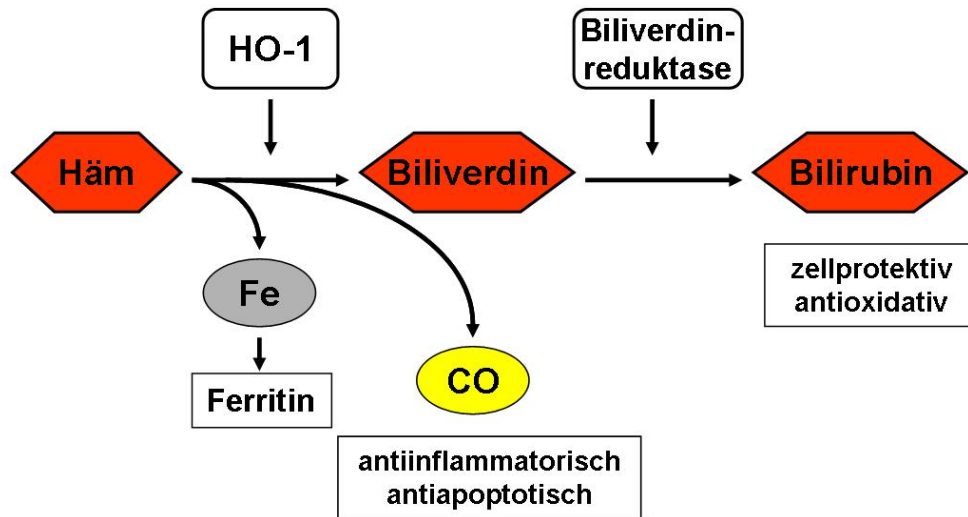
entstehen Biliverdin sowie äquimolare Mengen an Kohlenmonoxid (CO) und freiem, zweiwertigem Eisen. Während Biliverdin umgehend durch die Biliverdin-Reduktase und mit Hilfe von NADPH zu Bilirubin reduziert wird, wird das Eisen sofort an Ferritin gebunden. Bilirubin ist ein gut wirksames Antioxidanz.

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden drei Isoformen der Hämoxxygenase identifiziert: die Hämoxxygenase-1, Hämoxxygenase -2 und Hämoxxygenase -3 (HO-1, -2, -3). Alle drei Enzyme sind membrangebundene Produkte verschiedener Gene und differieren sowohl in der Verteilung in unterschiedlichen Geweben als auch in der Regulation ihrer Expression. Die HO-2 und HO-3 stellen die konstitutiv exprimierten Isoformen der Hämoxxygenase dar. Wohingegen die HO-1 in den meisten Zellen und Geweben unter physiologischen Bedingungen nur gering oder in nicht detektierbaren Mengen exprimiert wird. Jedoch kann die HO-1 nicht nur durch das natürliche Substrat Häm, sondern auch durch eine Vielzahl von Agenzien stark induziert werden. Neben oxidativem Stress zählen UV-Licht, Schwermetalle, Endotoxine und Prostaglandine zu den wichtigsten Induktoren (Chen *et al.* 2002; Keyse und Tyrell 1989; Rushworth *et al.* 2005; Taketani *et al.* 1990). Die induzierbare HO-1 zählt aufgrund ihrer antiinflammatorischen und antioxidativen Eigenschaften zu den wichtigsten protektiven Proteinen des Organismus. Der Schutz vor pro-oxidativen Stimuli durch Induktion oder Überexpression konnte in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden (Minamino *et al.* 2001; Yet *et al.* 2001). Eine Überexpression der HO-1 führt zu einer verminderten Lipidperoxidation in Lungenepithelzellen (Reiter *et al.* 2006). Darüber hinaus zeigen die Befunde eines klinischen Falls humaner HO-1 Defizienz Störungen des Wachstums sowie eine hohe Anfälligkeit gegenüber oxidativem Stress (Kawashima *et al.* 2002).

Zusätzlich zum Abbau des pro-oxidativen und cytotoxischen Häms werden die protektiven Effekte der HO-1 hauptsächlich durch ihre Metabolite vermittelt (Abb. 8). Kohlenmonoxid ist ein potenter Vasodilatator und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Gefäßmuskeltonus und der Plättchenaggregation. Darüber hinaus zeigt CO antiinflammatorische und antiapoptotische Eigenschaften (Brouard *et al.* 2000; Otterbein *et al.* 2000). Bilirubin, wie auch Biliverdin, wirken in physiologischen Konzentrationen cytoprotektiv (Barañano *et al.* 2002; Sarady-Andrews *et al.* 2005). Sie stellen ein starkes endogenes Antioxidanz dar. Die antioxidative Wirkung des Bilirubins manifestiert sich in einer direkten Neutralisierung von Sauerstoffradikalen sowie der Hemmung von Lipidperoxidation. Die beim Häm-Abbau freigesetzten Eisenionen können als Katalysator für die Haber-Weiss-Reaktion fungieren und



somit die Bildung von Sauerstoffradikalen begünstigen. Die freien Eisenionen werden jedoch sofort von einem zweiten anti-oxidativ wirkenden Stressprotein, dem Ferritin, gebunden, dessen Expression an die der HO-1 gekoppelt ist. Ferritin besitzt eine Ferroxidaseaktivität, so dass intrazelluläres  $\text{Fe}^{2+}$  zu  $\text{Fe}^{3+}$  oxidiert, wodurch dem Prozess der Sauerstoffradikalbildung ein essentieller Katalysator entzogen und die Entstehung der Hydroxylradikale unterdrückt wird (Berberat *et al.* 2003).



**Abb. 8: Katalysemechanismus der Hämoxigenase-1 (HO-1)**

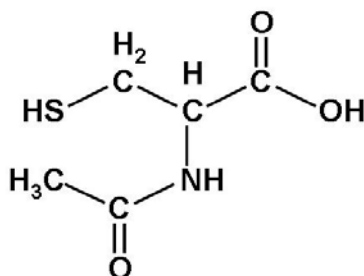
Die Hämoxigenase-1 (HO-1) katalysiert unter Verbrauch von NADPH (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat) die Oxidation des Häms zu Biliverdin. Dabei verbraucht sie drei Moleküle  $\text{O}_2$  und fünf Elektronen. Bei diesem Reaktionsschritt entstehen außerdem äquimolare Mengen an Kohlenmonoxid (CO) und freiem, zweiwertigen Eisen. CO spielt eine bedeutende Rolle in der neuronalen Signaltransduktion und in der Modulation des Gefäßtonus. Biliverdin wird durch die Biliverdin-Reduktase weiter zu Bilirubin, einem weiteren potenten Antioxidanz abgebaut.

### 1.5.3 Therapeutische Antioxidantien

#### N-Acetylcystein

N-Acetylcystein (NAC, s. Abb. 9) ist ein Derivat der natürlich vorkommenden Aminosäure L-Cystein. Da NAC Disulfidbrücken der Mukoproteine spaltet, wurde es schon seit den 60er Jahren als Mukolytikum auf dem Markt der Atemwegstherapeutika eingeführt. Des Weiteren ist NAC das am weitesten verbreitete Antidot (Pharmka bei Vergiftungen) bei einer akuten Paracetamolvergiftung. Die Wirkungen des NAC gehen aber über die mukolytischen Effekte hinaus. Es werden einige andere Wirkmechanismen des NAC diskutiert (De Flora *et al.* 2001). So übernimmt NAC im Organismus als Radikalfänger eine wichtige

Rolle. Zum einen kann die freie SH-Gruppe direkt mit Oxidantien, wie Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Hydroxyradikal (·OH) sowie hypochlorige Säure (HOCl) interagieren (Gillissen *et al.* 1997). Dabei werden zwei freie Sulfhydrylgruppen zu einer Disulfidverbindung oxidiert. Des Weiteren dient NAc durch die Bereitstellung von Cystein der Glutathion-Synthese, einem weiteren zentralen, zelleigenen Antioxidanz. Die antioxidative Wirkung von NAc wurde in verschiedenen klinischen Studien bei Patienten mit ARDS (*adult respiratory distress syndrome*) gezeigt. Dabei wurde den Patienten NAc oral 50 mg/kg Körpergewicht/Tag bzw. intravenös bis zu 210 mg/kg Körpergewicht/Tag appliziert (Bernard *et al.* 1997; Laurent *et al.* 1996; Ortolani *et al.* 2000). Diese NAc-Behandlung führte nicht nur zu einem Anstieg der krankheitsbedingten, niedrigen Konzentration weiterer Antioxidantien wie Glutathion und Cystein, sondern verminderte auch die Konzentration von ausgeatmetem Ethan und Malondialdehyd, als Endprodukte der Lipidperoxidation. Da oxidativer Stress eine wichtige Rolle in der Kanzerogenese übernimmt, wird in den letzten Jahren ein positiver Effekt von NAc in Bezug auf die Entstehung von Krebs diskutiert. In einer Studie von van Schooten *et al.* (2002) konnte in diesem Zusammenhang demonstriert werden, dass nach einer oralen Gabe von NAc (1200 mg/Tag) bei gesunden Rauchern eine verminderte Generation von lipophilen DNA-Addukten und 8-Hydroxy-desoxyguanosin Addukten in Lungenzellen nachzuweisen war. Im Tiermodell führte die Applikation von NAc nicht nur zu einer geringeren Inzidenz und Vielfalt von UV-induzierten Hauttumoren bei haarlosen Mäusen, sondern reduzierte außerdem die Tumorgröße (D'Agostini *et al.* 2005). Zusätzlich zu den antioxidativen Wirkmechanismen werden NAc antiinflammatorische Effekte zugeschrieben. So reduzierte die NAc-Applikation den Gehalt an Entzündungszellen und IL-8 im Sputum von COPD-Patienten (van Overveld *et al.* 2005).



**Abb. 9: Strukturformel des N-Acetylcysteins (NAC)**

### 1.5.4 Regulation der Genaktivierung durch redox-sensitive Transkriptionsfaktoren

#### Der Transkriptionsfaktor Nrf2

Promotoren verschiedener Gene von DNA-Reparatur- oder Stress-Proteinen enthalten ein so genanntes *antioxidant response element* (ARE). Der Transkriptionsfaktor Nrf2 (*NF-E2-related factor*) beispielsweise bindet an dieses *Enhancer* Element und bewerkstelligt die transkriptionelle Regulation dieser Gene. Nrf2 ist Mitglied der *cap'n'coller* (CNC) Transkriptionsfaktoren, welche sich durch basische Leucin-Zipper-Elemente (bZIP) charakterisieren. Im inaktiven Zustand ist Nrf2 im Zytosol lokalisiert und bindet an das Zytoskelett-assoziierte Protein Keap1 (*Kelch-like erythroid CNC homologue ECH-associated protein 1*) (Itoh *et al.* 1999). Die Bindung von Nrf2 an Keap1 bewirkt, dass Nrf2 der Ubiquitin-abhängigen Degradation durch das Proteasom zugeführt wird (Kobayashi *et al.* 2004; Nguyen *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2004). Der Abbau erfolgt innerhalb weniger Minuten (Nguyen *et al.* 2003). Bei oxidativem Stress werden Cystein-Reste des Keap1 Proteins modifiziert (Wakabayashi *et al.* 2004; Zhang und Hannink 2003), was zur Freisetzung und Stabilisierung des Nrf2 führt. Dies bedeutet, dass der Nrf2-Keap1-Proteinkomplex als zellulärer Sensor für oxidativen Stress agiert. Freies Nrf2 transloziert nun in den Zellkern, bildet dort mit anderen Transkriptionsfaktoren Proteinkomplexe, um die Expression ARE-abhängiger Gene zu aktivieren (Hozumi *et al.* 2004). Zu diesen zählen die  $\gamma$ -Glutamyl-Cystein Synthase (GCS) (Moinova und Mulcahy 1998), die Glutathion S-Transferase (GST) (Ikeda *et al.* 2004), die Superoxid Dismutase, die Katalase (Zhu *et al.* 2005), die Hämoxxygenase-1 (Alam *et al.* 1999) sowie Ferritin (Pietsch *et al.* 2003; Wasserman und Fahl 1997). So übernimmt Nrf2 eine wesentliche Rolle bei der Regulation antioxidativer Gene und ist so indirekt an zellprotektiven Wirkungen beteiligt. Nrf2 depletierte Makrophagen beispielsweise waren nach Stimulation mit ROS-induzierenden Substanzen nicht mehr in der Lage ARE-abhängige Antioxidanzien in ausreichend hohen Konzentrationen zu exprimieren und dadurch wesentlich empfindlicher gegenüber oxidativer Zellschädigung (Ishii *et al.* 2000).

## Der Transkriptionsfaktor AP-1

AP-1 (aktivierendes Protein-1) ist ein redox-sensitiver Transkriptionsfaktor, der an die Nukleotidsequenz in Promotoren und Verstärkerelementen zahlreicher Gene bindet. AP-1 aktiviert dadurch die Transkription von Genen, deren Proteine in Zellwachstum, Differenzierung, Tumorentstehung und Entwicklung involviert sind. Beispielsweise gehören die HO-1 (Gong *et al.* 2002), die  $\gamma$ -GCS (Jeyapaul und Jaiswal 2000), IL-8 (Kim *et al.* 2006) aber auch die COX-2 (Kang *et al.* 2006) den AP-1 regulierten Genen an.

AP-1 ist jedoch kein einzelner Transkriptionsfaktor, sondern vielmehr ein Protein-Komplex aus den Mitgliedern der Jun-, der Fos- und der CREB/ATF-Familie (*cAMP response element-binding protein/activating transcription factor*), die sich unter Bildung eines Homo- oder Heterodimers zusammenlagern. Drei Proteine werden der Jun-Familie zugeordnet: c-Jun, JunB und JunD. Zur Fos-Familie zählen c-Fos, FosB, Fra-1 und Fra-2. Die Jun-Proteine können im Unterschied zu Fos-Proteinen Homo- und Heterodimere bilden. Dagegen bilden Fos-Proteine ausschließlich Heterodimere. Des Weiteren wurde berichtet, dass sowohl Jun als auch Fos-Proteine in der Lage sind Heterodimere mit der Maf-Familie oder Nrf-Proteinen zu bilden (Gong *et al.* 2002; Jeyapaul und Jaiswal 2000; Novotny *et al.* 1998).

Die Regulation der Jun-, Fos-, sowie ATF-vermittelten Transkription erfolgt zum einen über deren Phosphorylierung durch mitogen-aktivierte Protein Kinasen (MAPK, vgl. Abb. 6). Zum anderen ist die Zusammensetzung der AP-1-Komplexe an der Transkriptionsregulation beteiligt, da die verschiedenen AP-1 Komplexe mit unterschiedlicher Affinität an Promotorsequenzen binden.

## **1.6 Zielsetzung der Arbeit**

Zahlreiche epidemiologische Studien zeigen, dass inhalierbare, lungengängige Umweltstäube negative Auswirkungen auf die Gesundheit haben. Die dabei zugrunde liegenden direkten und indirekten Effekte auf unterschiedliche, zelluläre Signalwege sind jedoch bis heute weitestgehend unverstanden. Daher war das Ziel dieser vorliegenden Arbeit, mit Umweltpartikeln in Submerskultur, die zellulären und molekularen Wirkmechanismen, die zur Auslösung von inflammatorischen Gesundheitseffekten führen, zu untersuchen. Als Modellpartikel wurde gut charakterisierter Flugstaub aus einer industriellen Hausmüllverbrennungsanlage eingesetzt. Im Mittelpunkt der experimentellen Arbeiten stand dabei die Signaltransduktion, die zur Freisetzung der Arachidonsäure und damit zur Synthese von Lipidmediatoren führt und einen wichtigen Teil der inflammatorischen Antwort übernimmt. Lipidmediatoren, die auch als Entzündungsmediatoren bezeichnet werden, sind Stoffwechselprodukte der Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). Eine Aktivierung der PLA<sub>2</sub> bewirkt die Freisetzung des Ausgangssubstrates, der Arachidonsäure (AA), aus Membranlipiden. Mit Hilfe von spezifischen Inhibitoren und durch die Bestimmung der Aktivität beteiligter intrazellulärer Signalproteine sollte der entscheidende initiale Schritt zur Arachidonsäurefreisetzung nach Partikelexposition aufgeklärt werden. Dabei spielen vor allem die Signalwege der mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK) eine große Rolle. Des Weiteren sollte in dieser Arbeit gezeigt werden, ob nach Belastung der Zellen mit Flugstaubpartikeln intrazellulär oxidativer Stress entsteht. In diesem Kontext galt es mit Hilfe des Radikalfängers N-Acetylcystein (NAC) zu untersuchen, inwiefern sich die analysierten, zellulären Reaktionen durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies beeinflussen lassen. Darüber hinaus sollte durch elektronenmikroskopische Aufnahmen die Lokalisation der Partikel während der Partikelbelastung dokumentiert werden. Eine durchflusszytometrische Untersuchung der Zellen erfolgte, um Aufschluss über die Partikelaufnahme zu erlangen.

Als *in vitro* Zellmodell wurde zunächst eine Maus-Makrophagen-Zelllinie (RAW264.7) eingesetzt. Außerdem wurden parallel primäre von Monozyten-abstammende, humane Makrophagen analysiert. Dadurch sollte geklärt werden, ob sich die immortalisierte Maus-Makrophagen-Zelllinie im Vergleich zu den primären, humanen Zellen als günstiges Zellkulturmodell zur Untersuchung von partikel-induzierten zellulären Prozessen eignet. Im Anschluss erfolgte die Etablierung eines

Kokulturmodells mit einer Epithel- (LA-4) und Makrophagen-Zelllinie (RAW264.7), um die interzelluläre Kommunikation der verschiedenen Zielzellen der Lunge zu analysieren. Schließlich war die Frage zu beantworten, ob die Bestimmung der Arachidonsäurefreisetzung als möglicher biologischer Endpunkt nach einer realitätsnahen Exposition von Zellen mit Aerosol vom technischen Gesichtspunkt geeignet ist. Dabei sollten die Zellen unter Verwendung eines kommerziellen Expositionssystems nicht submers über das Medium, sondern direkt an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht mit Aerosol exponiert werden. Auch hier wurde die Untersuchung der Arachidonsäurefreisetzung in den Vordergrund gestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten nun zusammenfassend folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wie reagieren Zellen auf die Belastung mit Flugstaubpartikeln in Bezug auf den Arachidonsäuremetabolismus? Welche der exprimierten Phospholipasen ist an der partikel-induzierten Arachidonsäure Mobilisierung beteiligt? Kommt es hierbei zur Aktivierung/Phosphorylierung von vorangeschalteten Signaltransduktionskaskaden?
2. Induzieren Flugstaubpartikel oxidativen Stress? Lassen sich die zellulären Reaktionen der Makrophagen auf die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies zurückführen? Ist die intrazelluläre Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies Teil des Wirkmechanismus von Flugstaubpartikeln?
3. Lässt sich die partikel-induzierte Freisetzung der Arachidonsäure von Monokulturen im geeigneten Kokultursystem, bestehend aus Zielzellen der Lunge, vergleichen?

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
[1- <sup>14</sup> C]Arachidonsäure	GE <i>Healthcare</i> , Freiburg Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat (H <sub>2</sub> DCF-DA)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
2'-Amino-3'-methoxyflavon (PD98059)	Merck KGaA, Darmstadt
4-(4-Fluorophenyl-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazol (SB203580)	Merck KGaA, Darmstadt
anthra-(1,9-cd)pyrazol-6(2H)-one (SP600125)	Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Arachidonyltrifluoromethylketon (AACOCF <sub>3</sub> )	Cayman Chemical Company, USA
BAPTA-Acetomethylester (BAPTA/AM)	Merck KGaA, Darmstadt
Bromo-enol Lacton (BEL)	Cayman Chemical Company, USA
Casyton <sup>®</sup>	Schärfe Systems, Reutlingen
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt Reinheit 99,0 – 99,4%
DMSO	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
ECL PLUS <sup>™</sup> Western Blotting Detection Reagent	GE <i>Healthcare</i> , Freiburg
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt Reinheit 99,8%
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ethylacetat	Merck KGaA, Darmstadt Reinheit 99,7%
Ethylenglycol-bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

Isooctan	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe Reinheit Reinheit 99,9%
Leupeptin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Granulozyten-Makrophagen kolonie- stimulierender Faktor (GM-CSF)	VWR International, Bruchsal
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt Reinheit 99,9%
N-Acetylcystein (NAc)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumvanadat	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Phosphatase-Inhibitor Cocktail 1 + 2	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Polyoxyethen-sorbitan-monolaurat (Tween <sup>®</sup> 20)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Thioetheramid (TEA)	Cayman Chemical Company, USA
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Die Herstellung der Natriumvanadatlösung erfolgte nach Kypta et al. (1988). Hierbei wurde die entsprechende Menge Natriumvanadat in destilliertem Wasser gelöst und im Anschluss mit HCl auf pH 10 eingestellt. Hierbei war ein Farbumschlag zu erkennen. Die Lösung wurde dann so lange in kochendem Wasser erhitzt, bis diese farblos wurde. Nur die Vorgehensweise nach diesem Protokoll garantierte die entsprechende Oxidationsstufe des Vanadats und damit dessen Hemmeffekt.



## 2.2 Laborgeräte und Programmsoftware

Gerät	Vertrieb
Absorptionsmessgerät	VersaMax, Molecular Devicea, Ismaning
Automatic TLC Sampler III	CAMAG, Schweiz
Brutschrank CO <sub>2</sub> -Auto-Zero	WTB Binder Labortechnik, Tuttlingen
Casy <sup>®</sup> 1	Schärfe Systems, Reutlingen
Cyclone Plus Phosphorimager	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Durchflusszytometer <i>Flow Cytometer</i> BD LRS	Becton Dickinson, Heidelberg
Electrophoresis Power Supply EPS 500/400	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
ELISA-Waschautomat	Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, USA
Fluoreszenzmessgerät	Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, USA
Guardian 1414 <i>Liquid Scintillation Counter</i>	Wallac, Uppsala, Schweden
Kühlzentrifuge <i>Centrifuge 5415 C</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Multiwellzentrifuge	Hettrich GmbH, Tuttlingen
Odyssey <sup>®</sup> <i>Infrared Imaging System</i>	LI-COR Biosciences, Nebraska, USA
Odyssey <sup>®</sup> <i>Software</i>	LI-COR Biosciences, Nebraska, USA
OptiQuant <i>Aquisition and Analysis Software</i>	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
SOFTmax Pro 3.0	VersaMax, Molecular Devices, Ismaning
Sterilbank Herosafe	Heraeus Instruments GmbH, Fellbach
Tischzentrifuge 5417R	Labor Technik Barkey, Bielefeld
Ultraschall Multporator, Sonifier <sup>®</sup>	Branson, Danbury, USA
Vapotherm	Eppendorf AG, Hamburg
Win Cats <i>Software</i>	CAMAG, Muttenz, Schweiz
Win Spectral V1.1 <i>Software</i>	Wallac, Uppsala, Schweden

## 2.3 Zellkultur

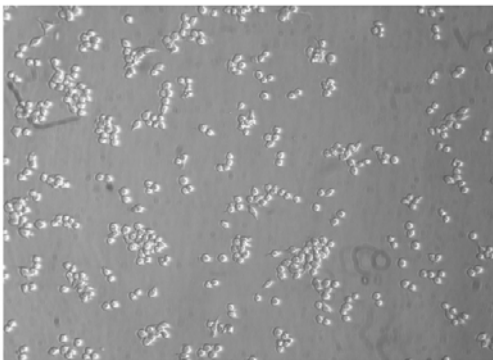
Sofern nicht anders erwähnt, stammten alle Zellkulturgefäße von den Firmen Greiner oder Sarstedt. Die Kulturmedien und Medienzusätze wurden von Gibco, Karlsruhe bezogen. Alle verwendeten Zelllinien sowie primäre Zellkulturen wurden in entsprechendem Medium bei 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und 37°C im Brutschrank kultiviert. Die Abwesenheit von Mykoplasmen wurde in sämtlichen Zellkulturen geprüft.

### 2.3.1 Murine Makrophagen-Zelllinie RAW264.7

Bei der RAW264.7 Zelllinie handelt es sich um eine adhärent wachsende Makrophagen-Zelllinie aus einer männlichen Balb/c Maus. Die Zelllinie wurde nach Induktion eines Tumors, mittels intraperitoneal-Injektion des Abelson Leukämie Virus, isoliert. Die Makrophagen produzieren keine Retroviren und zeigen eine Verdopplungszeit von ungefähr 24 Stunden.

Zur Passage von RAW264.7 Zellen wurde das Kulturmedium vollständig abgesaugt und durch 10 ml vorgewärmtes, frisches Medium ersetzt. Die Zellen wurden nun im Medium mit Hilfe eines Zellschabers von der Kulturschale gelöst. Nach einer Zellzahlbestimmung wurde die Makrophagen-Zelllinie mit einer Zellzahl von  $3-5 \times 10^6$  Zellen in 20 ml Kulturmedium in einer 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche ausgesät. Die Weiterpassage erfolgte alle 3-4 Tage.

**RAW264.7**



**Abb. 10: RAW264.7 Maus-Makrophagen-Zelllinie**  
Lichtmikroskopische Aufnahme (Vergrößerung: 20 x)

**Tab. 1: Zusammensetzung des Kulturmediums der RAW264.7 Makrophagen (500 ml)**

**DMEM**

10% FBS (fötales Rinderserum)

25.000 U Penicillin G Sodium

25 mg Streptomycin Sulfat

2.250 mg Glucose

4 mM Glutamin

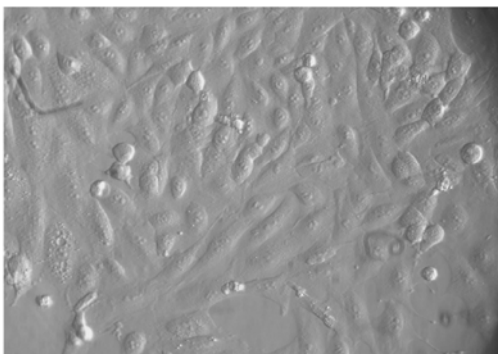
55 mg Natriumpyruvat

### 2.3.2 Murine Epithel-Zelllinie LA-4

Die LA-4 Zellen, freundlicherweise von Prof. Tuthill (Universität Leeds, Institut für Biochemie, England) zur Verfügung gestellt, repräsentieren eine alveolare Epithel-Zelllinie murinen Ursprungs. Die Zelllinie wurde aus einem Urethan-induzierten Adenom einer 28 Wochen alten A/He-Maus isoliert. Es sind flache, adhärent wachsende Zellen mit Epithel-ähnlicher Morphologie.

Um konfluent gewachsene Zellen zu passagieren, wurde das Kulturmedium vollständig entfernt, der Zellrasen mit PBS<sup>-/-</sup> gewaschen und daraufhin mit Trypsin-EDTA-Lösung bedeckt. Nach fünfminütiger Inkubation im Brutschrank wurde der Ablösevorgang durch Zugabe einer definierten Menge frischem, FBS-haltigem Medium beendet. Das Ablösen der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Anschließend wurden die Zellen gezählt und mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^5$  Zellen in einer 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche in 20 ml Medium für 7 Tage kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte vier Tage nach der Aussaat.

#### LA-4



**Abb. 11: LA-4 Epithel-Zelllinie**  
Lichtmikroskopische Aufnahme (Vergrößerung 40 x)

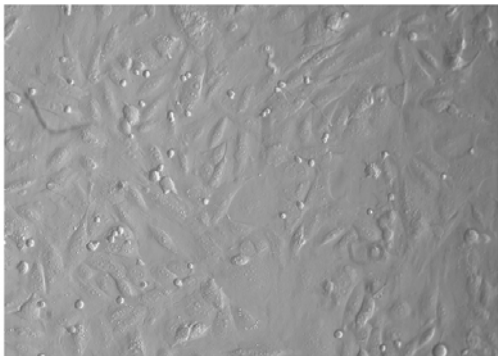
**Tab. 2: Zusammensetzung des Kulturmediums der LA-4 Zelllinie (500 ml)**

<b>DMEM</b>
10% FBS (fötales Rinderserum)
25.000 U Penicillin G Natrium
25 mg Streptomycin Sulfat
2.250 mg Glucose
4 mM Glutamin
55 mg Natriumpyruvat

### 2.3.3 Kokultur aus RAW264.7 Zellen und LA-4 Zellen

Für die Kokultur-Versuche wurden die Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 und die Zelllinie LA-4 in DMEM-Medium (s. Tab. 1 und Tab. 2) zusammen in einer Kulturschale kultiviert. Dafür wurden zunächst  $3 \times 10^5$  Epithelzellen pro Vertiefung einer 12-Lochplatte ausgesät und nach 24 Stunden pro Kavität  $5 \times 10^5$  Makrophagen dazugegeben. Nach einer 24-stündigen Inkubationszeit bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre im Brutschrank konnten die Zellen zu Partikelexpositionen eingesetzt werden.

#### Kokultur



**Abb. 12: Kokultur von RAW264.7 Makrophagen und LA-4 Epithelzellen**  
Lichtmikroskopische Aufnahme (Vergrößerung: 20x)

### 2.3.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 200 µl Zellsuspension aus der Kulturschale entnommen und mit Casyton® (Schärfe Systems, Reutlingen) 1:100 (LA-4 Zellen) oder 1:1.000 (RAW264.7 Zellen) verdünnt. Die lebenden Zellen wurden mit Hilfe des Casy®1 Cell Counters in der verdünnten Lösung gezählt.

### 2.3.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen wurden zur längerfristigen Lagerung in flüssigem Stickstoff bei -196°C konserviert. Um eine definierte Zahl von Zellen einzufrieren, wurde die Zellzahl von kultivierten Zellen mit Hilfe des Casy®1 Cell Counters bestimmt. Die benötigte Zellzahl wurde bei 350xg für 5 min sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer Dichte von  $3-5 \times 10^6$  Zellen/ml in eiskaltem Standardkulturmedium mit 10% DMSO aufgenommen und in Kryogefäße überführt. Zum zellschonenden Einfrieren wurden die Einfriergefäße ÜN in Isopropanol bei -80°C gelagert und danach in einem Flüssigstickstofftank zur Langzeitkonservierung deponiert.

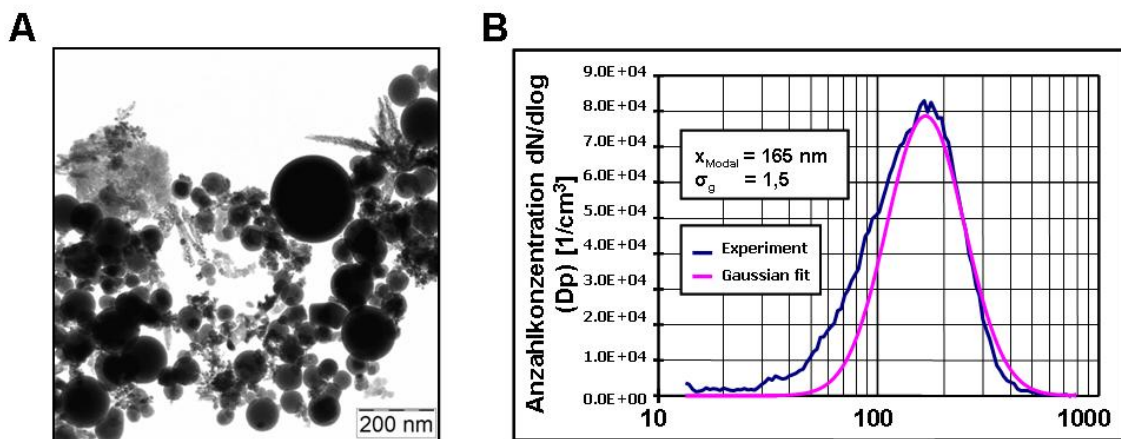
Um Zellen nach der Lagerung im flüssigen Stickstoff in Kultur zu bringen, wurden Einfriergefäße aus dem Flüssigstickstoff in ein 37°C warmes Wasserbad transferiert, dort schnell aufgetaut und die Zellsuspension zu 10 ml frischem bereits auf 37°C vorgewärmten Kulturmedium gegeben. Um das zellschädigende DMSO aus der Zellsuspension zu entfernen, wurden die Zellen für 5 min bei 350xg zentrifugiert, das Einfriermedium verworfen, die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert und in einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche (SARSTEDT AG & Co, Nürnberg) ausplattiert.

### 2.3.6 Verwendete Partikel

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Flugaschepartikel, die im Folgenden als MAF02 bezeichnet werden, wurden von Frau Mülhopt (ITC-TAB, Institut für Technische Chemie, Abteilung Thermische Abfallbehandlung, Forschungszentrum Karlsruhe) zur Verfügung gestellt. Die Partikel wurden in einem Elektro-Staubfilter einer Hausmüllverbrennungsanlage gesammelt und anschließend gesichtet, d.h. Partikel mit einem Durchmesser > 20 µm wurden entfernt. Sowohl die Partikelgrößenverteilung der Flugaschepartikel als auch die Analyse der enthaltenen Elemente wurden am ITC-TAB durchgeführt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Abb. 13, Tab. 3). Die Größe von in Luft resuspendierten Partikeln wurde mit Hilfe des SMPS (*scanning mobility particle sizer*) mit einem mittleren Durchmesser

von 165 nm bestimmt. Ferner weist die Flugasche einen 30%igen Anteil an unlöslichem Material auf.

Um elektronenmikroskopische Aufnahmen der Flugaschepartikel zu fertigen, wurden 100 µl der unlöslichen Fraktion der Flugaschepartikel (s. Kapitel 2.3.7) mit einer Konzentration von 1 mg/ml auf ein Objektträgersnetz (*Grid*) aus Gold transferiert und ÜN eingetrocknet. Das präparierte *Grid* wurde anschließend in einen Objektträgerhalter eingespannt und über eine Schleuse in das Mikroskop eingebracht. Die fotografischen Aufnahmen der unlöslichen Fraktion der Partikel erfolgten am Transmissionselektronenmikroskop der Carl Zeiss AG (EM 109T, Oberkochen) bei einer Spannung von 80 kV.



**Abb. 13: Charakteristika von Flugaschepartikeln**

A) Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahme der unlöslichen Fraktion der Flugaschepartikel (MAF02). B) Partikelgrößenverteilung der Flugaschepartikel, bestimmt durch SMPS (*Scanning Mobility Particle Sizer*), mit einem mittleren aerodynamischen Durchmesser von 165 nm (freundlicherweise vom Institut für Technische Chemie, Abteilung Thermische Abfallbehandlung, zur Verfügung gestellt).

Neben den Flugaschepartikeln wurden folgende Referenzpartikel eingesetzt: Quarz-, Titandioxid- sowie Kohlenstoffpartikel. Bei den kristallinen Quarzpartikel (DQ12), die einen Durchmesser von  $< 5 \mu\text{m}$  aufweisen, handelte es sich um Dörentruper Quarzkristallmehl der Mahlung 12. Sie wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Seemayer (Medizinisches Institut für Umwelthygiene an der Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Die Titandioxidpartikel zeigten einen Durchmesser von 21 nm, die *Carbon Black* Partikel, auch Printex 90 genannt, einen Durchmesser von 14 nm. Beide Partikeltypen wurden von der Firma Degussa, Frankfurt bezogen.

Tab. 3: Analyse der in der Flugasche enthaltenen Elemente

Elemente	Symbol	Konzentration [mg/g]
Arsen	As	0,13
Barium	Ba	1,86
Kohlenstoff (Carboneum)	C	7,02
Cadmium	Cd	1,51
Calcium	Ca	72,3
Chlor	Cl	48,3
Cobalt	Co	0,17
Chrom	Cr	1,26
Kupfer (Cuprum)	Cu	4,80
Fluor	F	2,31
Eisen (Ferrum)	Fe	17,1
Kalium	K	223,9
Mangan	Mn	1,14
Nickel	Ni	0,37
Blei (Plumbum)	Pb	51,2
Rubidium	Rb	0,76
Strontium	Sr	0,28
Schwefel	S	60,3
Titan	Ti	7,44
Vanadium	V	< 0,161
Zink	Zn	151,7

### **2.3.7 Partikelaufbereitung, Partikelbehandlung der Zellen**

Die Behandlung der Zellen mit Partikeln erfolgte submers, d.h. durch Inkubation der Zellen über das Kulturmedium. Unmittelbar vor der Behandlung wurden die Partikel-Stammlösungen frisch angesetzt. Hierfür wurden die Partikel in kleinen Mengen von 5-10 mg eingewogen und anschließend in Medium ohne Serum bzw. zur Bestimmung von reaktiven Sauerstoffspezies in HBSS mit einer Dosis von 10 mg/ml suspendiert. Nach mehrmaligem Vortexen der Partikellösung wurde diese ca. 50 Sekunden mit einem Ultraschallgerät (Branson sonifier, USA) behandelt. Dazu wurde die Mikrospritze aus Titan in die Partikellösung eingetaucht und mit 35 Pulsen von einer Sekunde Dauer beschallt (*output control 40%, duty cycle 4*). Ein Aufschäumen der Suspension wurde vermieden. Im Anschluss wurde die Partikelsuspension mit vorbereitetem, vorgewärmtem Inkubationsmedium ohne Serum auf die gewünschte Konzentration verdünnt und direkt für die Exposition der Zellen eingesetzt, wobei durch zwischenzeitliches Vortexen ein Absetzen der Partikel verhindert wurde.

Zur Auftrennung der Partikel in wasserlösliche und unlösliche Komponenten wurde die Partikel-Stammsuspension 10 min bei 1.000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und als „lösliche Fraktion“ gekennzeichnet. Das Sediment wurde im gleichen Volumen Medium wie die Stammsuspension resuspendiert und im weiteren Verlauf als „unlösliche Fraktion“ bezeichnet.

Die Partikelbehandlung der Zellen erfolgte daraufhin über entsprechende Inkubationszeiten im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre).

### **2.3.8 Inhibitionsstudien**

Zur Inhibition zellulärer Antworten auf Partikelinkubation wurden die Zellen mit spezifischen Inhibitoren bzw. Chelatoren vorinkubiert (Tab. 4). Dafür wurde die entsprechende Menge an Inhibitor/Chelator in das Kulturmedium pipettiert und die Zellen daraufhin bei 37°C für 20-30 Minuten präinkubiert.



**Tab. 4: Auflistung der in dieser Arbeit eingesetzten Inhibitoren**

<b>Inhibitor</b>	<b>Funktion</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Präinkubation</b>
AACOCF <sub>3</sub>	Inhibitor der cPLA <sub>2</sub>	50 µM	30 min
BAPTA/AM	Intrazellulärer Calcium-Chelator	5, 10, 25 µM	20 min
BEL	Inhibitor der iPLA <sub>2</sub>	5 µM	30 min
EGTA	Calcium-Chelator	5 mM	30 min
NAc	Antioxidanz	1 mM 5 mM	30 min
PD98059	Inhibition der MAP Kinase Kinase	10 µM	30 min
SB203580	p38 Kinase Inhibitor	10 µM	30 min
SP600125	Inhibition der c-Jun NH <sub>2</sub> -terminalen Kinase (JNK)	10 µM	30 min
TEA	Inhibition der sPLA <sub>2</sub>	10 µM	30 min

## **2.4 Isolierung von mononukleären Zellen aus humanem peripheren Blut**

### **2.4.1 Separation peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC) über Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation**

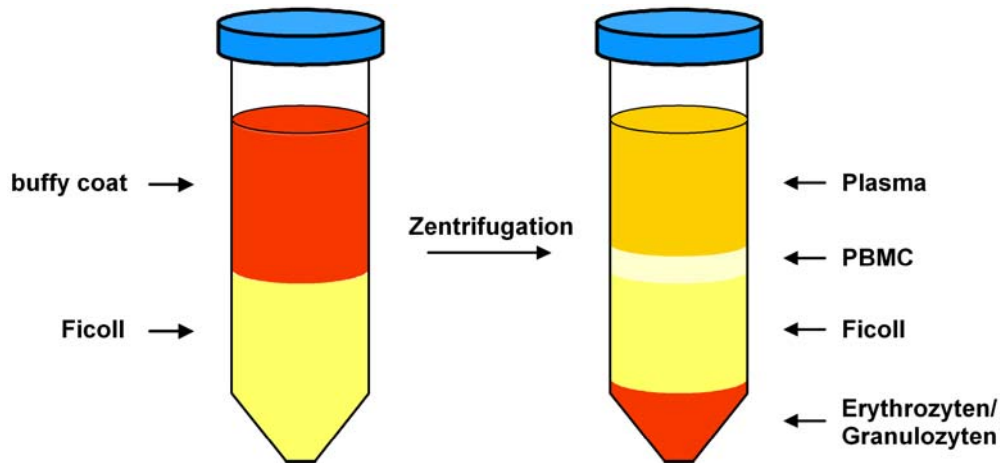
Periphere, mononukleäre Blutzellen (PBMC) aus humanem Blut wurden mit Hilfe einer Dichtezentrifugation (Böyum 1968) isoliert. Als Ausgangsmaterial zur Gewinnung der mononukleären Zellen dienten hierbei Leukozytenpräparationen (*buffy coat*) von jeweils einem Spender (Blutspendezentrale Städtisches Klinikum, Karlsruhe). Die *buffy coats* wurden folgendermaßen hergestellt: Nach Zentrifugation von CPD (Citrat-Phosphat-Dextrose, bestehend aus Natriumhydrogenphosphat Dihydrat, Zitronensäure Monohydrat, Glukose Monohydrat, Natriumcitrat Dihydrat) stabilisiertem Vollblut bei 3.000xg für 10 min erhielt man drei verschiedene Fraktionen: eine obere klare Fraktion bestehend aus Plasma, eine mittlere bräunliche

leukozytenreiche Schicht, die als *buffy coat* bezeichnet wird, und die sich am Boden befindliche konzentrierte Erythrozyten-Fraktion. Die Leukozytenschicht wurde abgenommen und in einen separaten Satellitenbeutel überführt.

Die *buffy coats* freiwilliger, gesunder Spender wurden direkt nach der Produktion bereitgestellt und noch am selben Tag verarbeitet. Die gesamte Aufbereitung der Blutzellen, einschließlich Zellkultur, erfolgte unter sterilen Bedingungen in der Sterilbank.

Mit einer Spritze wurde der gesamte Inhalt des vorsichtig geöffneten Satellitenbeutels aufgezogen und in zwei 50 ml Falconröhrchen zu ungefähr gleichen Teilen transferiert. Die Volumina variierten zwischen 60 und 70 ml. Der *buffy coat* wurde 1:1 (v/v) mit PBS<sup>-/-</sup> verdünnt. Von dieser Leukozytenlösung wurden je 25 ml vorsichtig in vier vorbereitete sterile, mit 25 ml Ficoll (Ficoll-Paque<sup>TM</sup> Premium, GE Healthcare, Freiburg) gefüllte Falconröhrchen überführt. Ficoll, ein Copolymer aus Saccharose und Epichlorhydrin mit einer Dichte von 1,077 g/ml, wird dabei mit der Leukozytenlösung geringerer Dichte überschichtet. Der Ficoll-Gradient wurde nun bei 800xg, 30 min in einem Ausschwingrotor ohne Bremse zentrifugiert. Nach erfolgter Dichtegradientenzentrifugation waren vier Phasen sichtbar (Abb. 14): die oberste Phase stellte die Plasma- und Thrombozytenfraktion dar, gefolgt von einer weißlichen, schmalen Bande mit mononukleären Zellen, bestehend aus Monozyten und Lymphozyten. Im unteren Bereich befand sich eine farblose, visköse Schicht aus Ficoll-Trennmedium. Granulozyten und Erythrozyten sedimentierten während der Zentrifugation als schwere Aggregate auf den Gefäßboden.

Die PBMC-Zellpopulationen der Interphase wurden vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgezogen und in einem 50 ml Falconröhrchen vereinigt. Um das Ficoll-Trennmedium vollständig zu entfernen wurden die isolierten Zellen daraufhin auf ein Volumen von 50 ml mit PBS<sup>-/-</sup> verdünnt und bei 380xg, 10 min mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 50 ml PBS<sup>-/-</sup> aufgenommen und nochmals abzentrifugiert. Zur Bestimmung der Zellzahl, beschrieben in Kapitel 2.3.4, wurde das gewaschene Pellet nochmals in 50 ml PBS<sup>-/-</sup> resuspendiert und 200 µl Zellsuspension entnommen. Die Zellzahl lag variierend von Spender zu Spender zwischen  $4,5 \times 10^8$  und  $1,1 \times 10^9$  PBMC. Außerdem wurden zur durchflusszytometrischen Bestimmung (Kapitel 2.12.2) der PBMC Fraktion  $5 \times 10^6$  Zellen entnommen.



#### Abb. 14: PBMC-Isolierung mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

Im Ficoll-Dichtegradienten lassen sich nach der Zentrifugation verschiedene Zellschichten unterscheiden: Erythrozyten sammeln sich mit Granulozyten am Boden des Zentrifugenröhrchens. Darüber befindet sich die Ficoll-Schicht, auf der die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) aufliegen. In der obersten Schicht sind Plasma sowie Thrombozyten lokalisiert.

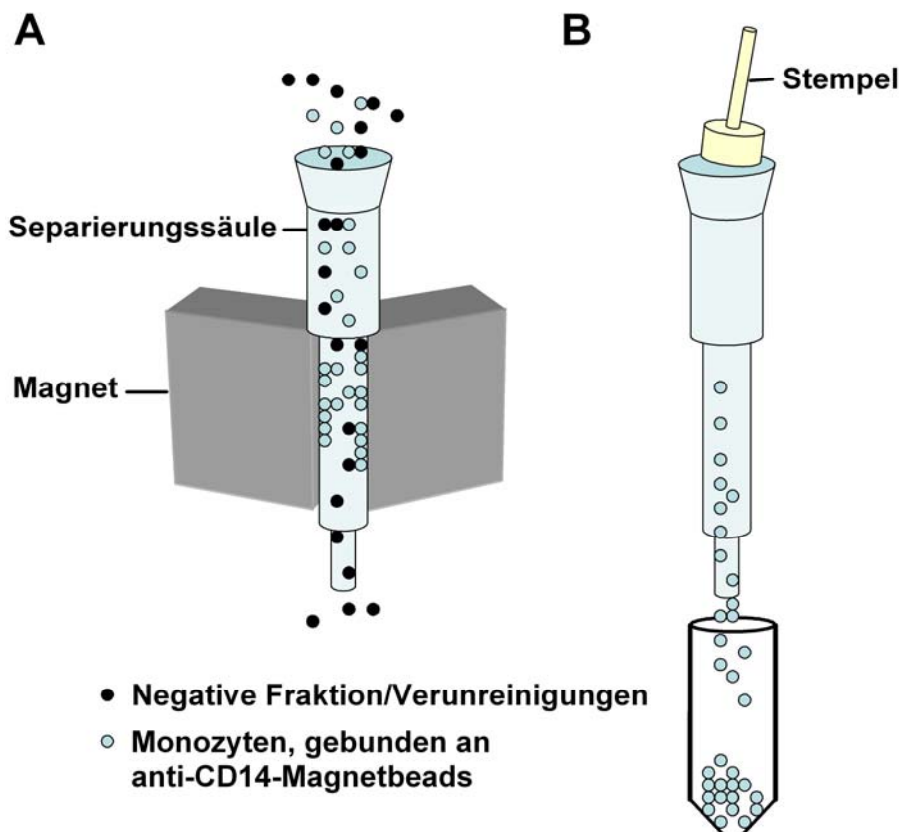
### 2.4.2 Anreicherung von Monozyten aus PBMC durch immunomagnetische Partikel

Für die Isolierung der Monozyten aus PBMC wurde eine Positivselektion CD14-positiver Zellen über magnetische Zellsortierung (MACS, *magnetic cell separation*) nach einem Protokoll von Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) genutzt.

Die magnetische Zellsortierung basiert auf der Markierung von Zellen durch spezifische Antikörper, die an superpara-magnetische Mikropartikel (*Microbeads*), gebunden sind. Die sehr kleinen (Durchmesser ca. 50 nm) *Microbeads* bestehen aus Eisenoxid und Polysacchariden, die sich in der Kultur zersetzen und weder Funktion noch die Vitalität der Zellen beeinflussen. Weiterhin besteht das magnetische Zellsortierungssystem aus einer mit ferromagnetischer Stahlwolle gefüllten Separierungssäule, die im magnetischen Feld eines Dauermagneten inseriert wird. Dieses erzeugte magnetische Feld ermöglicht eine Fixierung von markierten Zellen an der Matrix, während unmarkierte Zellen ausgewaschen werden. Nachdem die Säule aus dem Magnetfeld entfernt wird, können die in ihr immobilisierten Zellen zügig eluiert werden.

Zur immuno-magnetischen Isolation von Monozyten wurde das PBMC-Zellpellet mit MACS-Puffer auf ein Volumen von 80  $\mu\text{l}$  pro  $1 \times 10^7$  Zellen resuspendiert und mit 20  $\mu\text{l}$  CD14-gekoppelten Magnetbeads bei 4°C für 15 min nach vorsichtigem

Aufschütteln inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension dreimal mit 1 ml MACS-Puffer pro  $1 \times 10^7$  Zellen gewaschen (300xg, 5 min), erneut mit 500  $\mu$ l MACS-Puffer pro  $1 \times 10^8$  Zellen resuspendiert und auf die mit 500  $\mu$ l MACS-Puffer äquilibrierte Separierungssäule in der MACS-Apparatur aufgetragen. Durch zweimaliges Spülen der Säule mit 3 ml MACS-Puffer wurde die CD14-negative Zellfraktion aus der Säule gewaschen, der Durchfluss aufgefangen und für die anschließende durchflusszytometrische Analyse, wie unter 2.12.2 beschrieben, eingesetzt. Nach dem Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld wurde diese mit 5 ml MACS-Puffer gefüllt und die Monozyten mit einem Stempel eluiert. Anschließend wurde die Monozytensuspension mit MACS-Puffer auf 10 ml verdünnt und die Zellzahl ermittelt. Die Monozyten-Zellzahl variierte zwischen  $5,5 \times 10^7$  und  $1,48 \times 10^8$  pro Selektion CD14-positiver Zellen. Weiterhin wurde die Reinheit der isolierten Monozyten mit Hilfe von Antikörpermarkierung des Monozyten/Makrophagen Markers CD14 mit anschließender Messung im Durchflusszytometer (FACS, s. 2.12.2) analysiert.



**Abb. 15: Separation von Monozyten durch anti-CD14 Magnetpartikel**

(A) Monozyten binden an die *Microbeads* über das CD14-Molekül auf ihrer Oberfläche, während die übrigen mononukleären Zellen sowie Verunreinigungen ausgewaschen werden. (B) Nach Entfernung des Magneten werden die immobilisierten Monozyten mit Hilfe eines Stempels eluiert.

Tab. 5: Zusammensetzung des MACS-Puffers

**MACS-Puffer**1 x PBS<sup>-/-</sup>

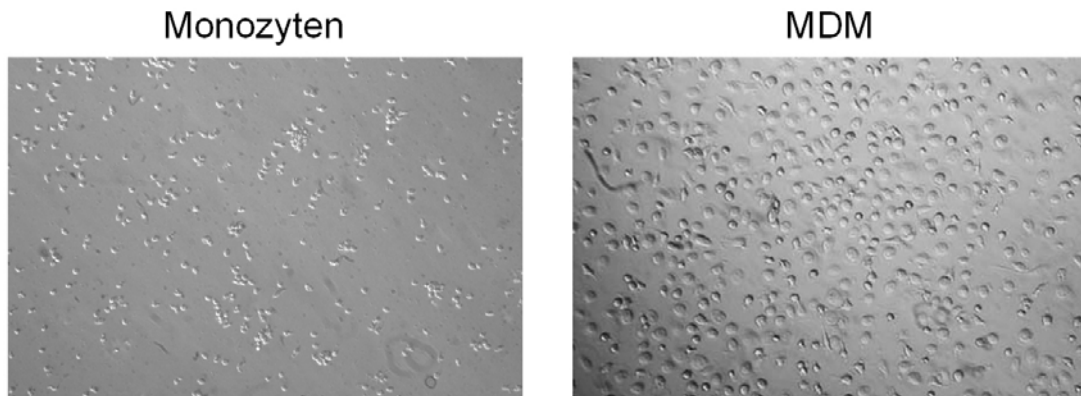
0,5% BSA

2 mM EDTA

pH 7,2

**2.4.3 Kultivierung und Ausdifferenzierung humaner Monozyten/Makrophagen**

Nach der Isolierung der Monozyten wurden diese auf eine Konzentration von circa  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in RPMI-Kulturmedium zusammen mit 2 ng/ml Granulozyten-Makrophagen kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) kultiviert. Die Kulturschalen kamen zur Ausreifung der Monozyten zu Makrophagen für 10 Tage in einen Inkubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre). Innerhalb von 12 Stunden adhärten die Monozyten an der Polystyrenoberfläche der Kulturschale. Nach 3-4 Tagen erfolgte ein Mediumwechsel.

**Abb. 16: Primäre Monozyten und Monozyten-abstammende Makrophagen (MDM)**

Primäre, humane Monozyten und über 10 Tage differenzierte Monozyten-abstammende Makrophagen wurden im Lichtmikroskop mit Hilfe einer Digitalkamera direkt in der Zellkulturschale fotografiert (Vergrößerung: 20 x).

**Tab. 6: Zusammensetzung des Kulturmediums der primären Monozyten/Makrophagen (500 ml)**

**RPMI 1640**

1% MEM nicht essentielle Aminosäuren  
1% Natrium-Pyruvat  
4% FBS (fötales Rinderserum)  
50.000 U Penicillin G Natrium  
50 mg Streptomycin Sulfat  
2 mM L-Glutamin

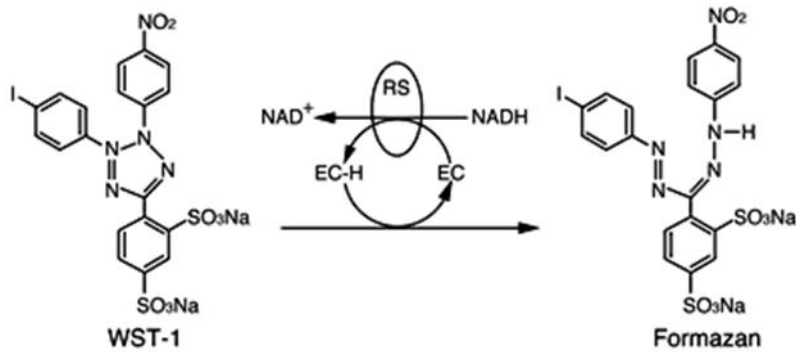
## **2.5 WST-1 Zellvitalitätstest**

Die mitochondriale Aktivität der Zellen wurde mit dem WST-1 Test erfasst. Zur Anwendung kam das Proliferations-Reagenz WST-1 ([4-(3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benzene disulphonat]] der Firma Roche (Mannheim, Deutschland).

Der WST-1 Test beruht auf der Umsetzung des Tetrazoliumsalzes WST-1 durch mitochondriale Succinatdehydrogenasen stoffwechselaktiver, lebender Zellen. Es entsteht hierbei wasserlösliches, rotes Formazansalz (s. Abb. 17).

Dieser Farbumsatz kann im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden. Je mehr vitale Zellen vorhanden sind, desto intensiver ist der Farbumschlag beziehungsweise desto höher ist die Absorption. Diese ist proportional der Stoffwechselaktivität der Zellen.

Der WST-1 Test wurde in einer 96-Multiloch-Platte in dreifacher Bestimmung durchgeführt. Dafür wurde am Vortag der Messung pro Vertiefung  $2 \times 10^4$  der zu untersuchenden Zellen in einem Volumen von 200  $\mu$ l Zellkulturmedium ausgesät und ÜN bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Nach erfolgter Behandlung der Zellen wurde der Kulturmediumüberstand aus jeder Vertiefung der 96-Loch-Mikrotiterplatte abgezogen und durch 200  $\mu$ l WST-1 Reagenz, welches zuvor 1:20 in HBSS verdünnt wurde, ersetzt. Es folgte eine ein- bis zweistündige Inkubation im Brutschrank bevor die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm im ELISA-Reader ermittelt wurde.



### Abb. 17: Umwandlung von WST-1 zu Formazan

Die Abbildung zeigt die chemische Struktur des WST-1 Tetrazoliumsalses [4-(3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benzene disulphonat] und die Umwandlung zu Formazan in Anwesenheit von NADH durch succinat-abhängige Dehydrogenasen (EC = Elektronen gekoppelte Reaktion; RS = mitochondriales succinat-abhängiges Reductase-System).

## 2.6 Methoden zur Proteinanalyse

### 2.6.1 Herstellung von Ganzzellextrakten

Für die Proteinanalytik wurden pro Vertiefung  $2,5 \times 10^6$  der zu untersuchenden Zellen in einem Volumen von 2 ml Zellkulturmedium ausgesät und ÜN inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde der Mediumüberstand entfernt und durch 2 ml FCS freies Zellkulturmedium ersetzt und erneut ÜN inkubiert. Daraufhin erfolgte die Partikelbehandlung der Zellen in einem Endvolumen von 3 ml. Nach Behandlung der Zellen wurde für die Herstellung von Ganzzellextrakten der Mediumüberstand vollständig abgenommen, der Zellrasen in PBS<sup>-/-</sup> abgeschabt und in ein 15 ml Falconröhrchen transferiert. Nach kurzer Zentrifugation (350xg, 4°C) wurde der komplette Überstand entfernt, die Zellpellets in 1 ml PBS<sup>-/-</sup> resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 350xg, 4°C wurde der Überstand verworfen, die sedimentierten Zellen in 50-75 µl denaturierenden RIPA-Lysepuffer aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Da bei diesem Zellaufschluss die in den Zellen vorhandenen Proteasen und Phosphatasen freigesetzt werden, wurden dem Lysepuffer Protease- und Phosphatase-Inhibitoren zugesetzt und alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Nach der Zelllyse wurden die Zelltrümmer durch hochtouriges Zentrifugieren bei 20.000xg, 4°C für 10 min sedimentiert und das klare, proteinhaltige Lysat in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Für die nachfolgende Proteinbestimmung wurden 1-5 µl des Lysats entnommen und der restliche Überstand bei -80°C gelagert.

**Tab. 7: Zusammensetzung des RIPA-Lysepuffers**

**RIPA-Lysepuffer**

150 mM NaCl

50 mM Tris

5 mM EDTA

1% NP-40

gelöst in dest. H<sub>2</sub>O, pH 8,0

Zugabe von Protease-Inhibitoren:

0,1 mM Natriumvanadat, 2 µg/ml Aprotinin, 2 µg/ml Leupeptin,

1 mM PMSF, Phosphatase Inhibitor-Cocktail 1 + 2 (Sigma-Aldrich Chemie, Taufenkirchen)

### 2.6.2 Proteinbestimmung

Die Bestimmung absoluter Proteinmengen wurde mit der Biuret-Reaktion (BCA Protein Assay, Pierce, Rockford, USA) ermittelt. Das hier zugrunde liegende Prinzip dieser Reaktion ist die Reduktion von Cu<sup>+</sup>-Ionen, die mit Bicinchoninsäure (BCA) einen wasserlöslichen Komplex bilden, der eine starke Lichtabsorption bei 562 nm zeigt. Für die Proteingehaltsbestimmung wurden sowohl Proteinlösungen mit bekannten, steigenden Konzentrationen an Rinderserum-Albumin (BSA) als auch 1-5 µl von Proteinlösungen unbekannter Konzentrationen in eine Mikrotiter-Platte pipettiert, mit 200 µl BCA-Reagenz versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nachdem die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt waren, erfolgte die Messung der Absorption bei 562 nm in einem Spektralphotometer (Molecular Device, USA). Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden dann mit Hilfe des Auswerteprogramms SOFTmax Pro 3.0 und der Standard-Eichgeraden ermittelt.

**Tab. 8: Zusammensetzung der BCA-Reagenz-Lösung**

**BCA-Reagenz**

51 : 1 (v/v) BCA Grundlösung : 4% Kupfersulfatlösung (CuSO<sub>4</sub>)



### 2.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Die unter denaturierenden Bedingungen durchgeführte elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte in diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelen. Das Gel setzte sich aus zwei Komponenten zusammen: das engporige Trenngel, mit einer Polyacrylamidkonzentration von 10%, und das 5%ige weitporige Sammelgel. Die zu analysierenden Proteinlysate wurden im Verhältnis 1:1 mit 2xSDS-Gel-Probenpuffer vermischt und 5 min bei 95°C erhitzt. Nach kurzer Zentrifugation wurden die Proteinproben zusammen mit einem Molekulargewichtsmarker (*PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus*, Fermentas, St. Leon-Rot) aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung der Proteine im SDS-PAA-Gel (Sodiumdodecylsulfat- Polyacrylamid-Gel) erfolgte bei einer Spannung von 170 V.

**Tab. 9: Zusammensetzung eines 5%igen Sammel- und 10%igen Trenngels**

	<b>Sammelgel 5%</b>	<b>Trenngel 10%</b>
Rotiphorese® Gel 30	1,70 ml	3,3 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	-	2,50 ml
2 M Tris-HCl (pH 6,8)	0,62 ml	-
20% SDS	0,05 ml	0,05 ml
ddH <sub>2</sub> O	7,47 ml	4,00 ml
10% APS	0,10 ml	0,10 ml
TEMED	0,01 ml	0,01 ml

**Tab. 10: Zusammensetzung des Laufpuffers**

<p><b>Laufpuffer</b>                  25 mM Tris-BASE                  1,2 mM Glycin                  1% SDS (w/v)                  gelöst in dest. H<sub>2</sub>O</p>
--

**Tab. 11: Zusammensetzung des SDS-Gel-Probenpuffers**

<p><b>2 x SDS-Gel-Probenpuffer</b>                  2 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8                  2,5 ml 20% SDS                  2,85 ml Glycerol                  0,01 g Bromphenolblau                  0,5 ml <math>\beta</math>-Mercaptoethanol                  4,65 ml dest. H<sub>2</sub>O</p>
--

### 2.6.4 Western Blotting durch Elektrotransfer

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden aus dem SDS-PAA-Gel auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF, 0,45 $\mu$ m Porengröße, Millipore, GmbH, Schwalbach) im Tank Blot Verfahren transferiert. Hierfür wurde zunächst die Membran kurz in Methanol gespült, um Verunreinigungen zu beseitigen und die Proteinbindungsstellen zu aktivieren. Anschließend wurde die Membran in Wasser getränkt und mit WHATMAN-Papieren in folgender Reihenfolge luftblasenfrei auf der Anode aufeinander gelegt:

2 Lagen WHATMAN 3MM	getränkt in Transferpuffer
PVDF Membran	getränkt in Transferpuffer
SDS-PAA-Gel	
2 Lagen WHATMAN 3MM	getränkt in Transferpuffer

Anschließend wurde die Blot-Kassette in einer mit kaltem Transferpuffer (Blotpuffer) gefüllten Blot-Kammer befestigt. Der einstündige Transfer erfolgte bei einer Spannung von 100 V und 400 mA. Durch die Zugabe eines Kühlakkus sowie durch ständiges Rühren wurde eine Erwärmung der Apparatur vermieden.

Nach dem Blotvorgang wurde die Membran für 5 min in TBS-T (1 x TBS mit 0,1% Tween 20, v/v) äquilibriert, um das Methanol vollständig zu entfernen.

**Tab. 12: Zusammensetzung des Blotpuffers**

<b>Blotpuffer</b> 25 mM Tris-BASE 192 mM Glycin 10% Methanol (v/v) gelöst in dest. H <sub>2</sub> O
---

**Tab. 13: Zusammensetzung von TBS (Tris-gepufferte Salzlösung)**

<b>TBS</b> 20 mM Tris-HCl 120 mM NaCl gelöst in dest. H <sub>2</sub> O, pH 7,4
--

## 2.6.5 Detektion von Proteinen

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Verfahren durchgeführt, um zelluläre Proteine nachzuweisen. Es wurde sowohl das *Enhanced Chemiluminescence* (ECL) Detektierungssystem, welches dem Nachweis von phosphorylierten Proteinen diene, als auch das Odyssey<sup>®</sup> *Infrared Imaging* System eingesetzt.

### 2.6.5.1 Detektion mittels *Enhanced Chemiluminescence* (ECL)

Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran nach vollendetem Blotvorgang 1 Stunde bei RT in einer 5% (w/v) Milchpulverlösung in TBS-T auf einer Wippe inkubiert. Im Anschluss wurde diese zur Bindung der IgGs auf einem Schüttler bei 4°C ÜN mit spezifischen Antikörpern (Tab. 14), die in 5%iger Milchpulverlösung verdünnt wurden, inkubiert. Am nächsten Tag wurden die überschüssigen Antikörpermoleküle durch dreimaliges Waschen für jeweils 10 min in 1 x TBS-T entfernt. Daraufhin wurde die Membran mit dem gegen die Spezies des

Erst-Antikörpers gerichteten sekundären, mit Meerrettichperoxidase-gekoppelten Antikörper, ebenfalls in 5%iger Milch verdünnt, auf der Wippe für eine Stunde bei RT inkubiert und im Anschluss erneut dreimal für jeweils 10 min in TBS-T gewaschen. Die Detektion der immobilisierten Protein-Antikörper-Komplexe erfolgte mittels ECL-System (*Enhanced Chemiluminescence*, ECL Plus<sup>TM</sup> Western Blotting *Detection Reagent*, GE Healthcare). Dazu wurden die beiden Komponenten des ECL Plus Detektions-Kits 40:1 (v/v) gemischt. Die Membran wurde mit den ECL-Detektionsreagenzien gleichmäßig benetzt, und nach einer fünfminütigen Inkubation in Frischhaltefolie verpackt. Im Dunkeln, in einer Filmkassette erfolgte die Exposition der Membran mit einem speziellen Film (Hyperfilm<sup>TM</sup>-ECL, GE Healthcare). Dieser Prozedur liegt folgendes Prinzip zugrunde: Die an den Zweitantikörper gekoppelte Peroxidase katalysiert die Oxidation des Luminols, dabei wird eine lichtemittierende Reaktion ausgelöst, was zur Belichtung des Films führt und nach Entwicklung des Films als Schwärzung sichtbar wird. Zur Auswertung der auf den Filmen erhaltenen Signale wurden diese mit Hilfe eines Flachbettscanners digitalisiert und anschließend mit dem Odyssey<sup>®</sup> Software-Programm (LI-COR Biosciences, USA) quantitativ ausgewertet.

#### 2.6.5.2 Detektion mittels Odyssey-Verfahren

Das in dieser Arbeit verwendete Odyssey<sup>®</sup> *Infrared Imaging* System kann für zwei unterschiedliche Farbstofftypen verwendet werden, die verschiedene Anregungs- und Emissionsmaxima im langwelligen (Infrarot-) Bereich besitzen. Optimal geeignet für dieses System sind z.B. die Fluoreszenzfarbstoffe IRDye 700 (Biomol, Anregungsmaximum: 685 nm, Emissionsmaximum: 710 nm; Detektion im 700 nm Kanal) und IRDye 800 (Biomol, Anregungsmaximum: 778 nm, Emissionsmaximum: 806 nm; Detektion im 800 nm Kanal). Die Farbstoffe können getrennt oder auch gleichzeitig nachgewiesen werden, was eine Detektion unterschiedlicher Protein-Spezies auf einem Blot ermöglicht.

Nach dem Blotvorgang wurde die PVDF-Membran zunächst kurz in eine mit TBS gefüllte Wanne gelegt und danach zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h bei RT mit Odyssey<sup>®</sup> Blockierungspuffer (LI-COR Biosciences, USA) inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine ÜN-Inkubation mit dem primären, gegen das Zielprotein gerichteten Antikörper, der zuvor in Blockierungspuffer verdünnt wurde (Tab. 14.) Am darauf folgenden Tag wurde die Membran dreimal mit TBS für jeweils 10 min

gewaschen und mit dem entsprechenden sekundären Antikörper bei RT für 1 h lichtgeschützt inkubiert. Je nach Tierspezies des primären Antikörpers wurde für die Odyssey<sup>®</sup> Detektion ein sekundärer Antikörper verwendet, der entweder an IRDye 700 oder IRDye 800 gekoppelt war (Tab. 14). Nachdem die Membran 4 x 5 min in TBS-T und zweimal in TBS gewaschen wurde, erfolgte die Detektion der sekundären Antikörper unter Verwendung des Odyssey<sup>®</sup> *Infrared Imager*. Die Signalintensitäten der Banden wurden mit der entsprechenden Odyssey<sup>®</sup> *Software* (LI-COR Biosciences, USA) analysiert.

### 2.6.5.3 Stripping und erneute Antikörperfärbung von Membranen

Das Entfernen (*stripping*) bzw. Denaturieren gebundener Antikörper von einer PVDF Membran ermöglicht ein mehrmaliges Detektieren von Antigenen (*reprobe*). Hierzu wurden die Membranen für 20-30 min bei RT mit *Stripping Puffer* (*Restore<sup>TM</sup> Western Blot Stripping Buffer*, Pierce, Rockford) unter ständigem Schütteln inkubiert. Im Anschluss wurden die Membranen dreimal mit TBS-T auf dem Wipptisch gewaschen. Die nachfolgenden Schritte erfolgten wie unter Kapitel 2.6.5.1 und 2.6.5.2 beschrieben.

**Tab. 14: Auflistung der im Western Blot verwendeten primären und sekundären Antikörper**

<b>Antikörper -primär-</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Anti-phospho ERK1/2 (#9106)	1:1.000	Cell Signaling Technology <sup>®</sup> , USA
Anti-phospho JNK1/2 (#9251)	1:1.000	Cell Signaling Technology <sup>®</sup> , USA
Anti-phospho p38 (#9211)	1:1.000	Cell Signaling Technology <sup>®</sup> , USA
Anti-phospho c-Jun (#9261)	1:1.000	Cell Signaling Technology <sup>®</sup> , USA
Phospho-MEK1/2 (#9121)	1:1.000	Cell Signaling Technology <sup>®</sup> , USA
Phospho-cPLA <sub>2</sub> (#2831)	1:1.000	Cell Signaling Technology <sup>®</sup> , USA
Anti-HO-1 (sc-10789)	1:1.000	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA
Anti-COX-1 (#1601100)	1:1.000	Biozol Diagnostica GmbH, Eching
Anti-p38 (sc-7149)	1:1.000	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA

Anti-JNK1 (sc-7345)	1:1.000	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA
Anti-c-Jun (sc-1694)	1:1.000	Cell Signaling Technology®, USA
Anti-ERK 1 (sc-94)	1:1.000	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA
Anti-MEK1/2 (#47E6)	1:1.000	Cell Signaling Technology®, USA
Anti-PCNA (sc-56)	1:5.000	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA
Anti-COX-2 (#160126)	1:1.000	Cayman Chemical Company, USA
Anti-Lamin B (sc-6217)	1:3000	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA
Anti-Nrf-2 Antiserum	1:5000	freundlicherweise von J. Hayes, Dundee, zur Verfügung gestellt
Anti-cPLA <sub>2</sub> (sc-438)	1:1.000	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA

<b>Antikörper -sekundär-</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Anti-Ziege-HRP	1:2.000	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA
Anti-Kaninchen-HRP	1:2.000	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Anti-Maus-HRP	1:2.000	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Anti-Kaninchen IRDye-700	1:5.000	Biomol, Hamburg
Anti-Kaninchen IRDye-800	1:20.000	Biomol, Hamburg
Anti-Maus IRDye-800	1:10.000	Biomol, Hamburg

## 2.7 Untersuchung des Arachidonsäurestoffwechsels

### 2.7.1 Markierung mit <sup>14</sup>C-Arachidonsäure und Inkubation

Für die Monokultur-Versuche zur Arachidonsäurefreisetzung wurden  $3 \times 10^5$  RAW264.7 und LA-4 Zellen, für die Kokultur-Versuche  $5 \times 10^5$  RAW264.7 und  $3 \times 10^5$  LA-4 Zellen in Kulturmedium pro Vertiefung einer 12-well-Platte ( $3,6 \text{ cm}^2$ ) ausgesät und zur Adhäsion ÜN bei  $37^\circ\text{C}$  kultiviert. Danach wurde der Mediumüberstand vollständig abgenommen und der Zellrasen mit 1 ml Markierungsmedium bedeckt. Zur Herstellung des Markierungsmediums wurden pro Ansatz 4 kBq [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]Arachidonsäure (gelöst in Ethanol) unter Stickstoff eingedampft,

in DMSO aufgenommen und in 1 ml Kulturmedium pipettiert (spezifische Aktivität der [1-<sup>14</sup>C]Arachidonsäure 2,07 GBq/mmol). Die Endkonzentration von DMSO betrug im Kulturmedium 0,2%. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei 37°C wurde der Mediumüberstand abgenommen und durch Kulturmedium ersetzt. Um eine vollständige Aufnahme und eine gleichmäßige Verteilung der Arachidonsäure in den verschiedenen Lipidklassen der Membran zu gewährleisten, wurden die Zellen ÜN im Brutschrank inkubiert und am darauf folgenden Tag mit den verschiedenen Substanzen behandelt.

### **2.7.2 Aufnahmekinetik der radioaktiv-markierten Arachidonsäure**

Zur Überprüfung der Aufnahmeeffizienz der [1-<sup>14</sup>C]Arachidonsäure wurden bei jedem Versuch  $3 \times 10^5$  Zellen ausplattiert und wie unter 2.7.1 beschrieben behandelt. Nach Beendigung der Markierung wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers geerntet und anschließend 5 min bei 350xg sedimentiert. Sowohl der Mediumüberstand als auch das Zellpellet, aufgenommen in 1 ml PBS, wurden getrennt in Szintillationsgefäße (Polyvials20, Zinsser Analytic, Frankfurt) überführt, mit 9 ml Szintillationsflüssigkeit (Liquid Scintillator Quicksafe A, Zinsser Analytic, Frankfurt) überschichtet und durch Schütteln gut miteinander vermischt. Die Proben wurden schließlich im Flüssigkeitsszintillationszähler (Wallac Guardian 1414 Liquid Scintillation Counter, Perkin Elmer, Rodgau-Jüdesheim) gemessen. Die ermittelte Radioaktivität wurde zur Berechnung der Aufnahmeeffizienz, bezogen auf die eingesetzte Gesamtaktivität pro Ansatz, verwendet. Die Aufnahmeeffizienz der Zellen lag bei  $87,82\% \pm 1,63$  (n=9).

### **2.7.3 Extraktion zellulärer Lipide**

Die Lipide wurden nach der Methode von Bligh und Dyer in modifizierter Form extrahiert. Hierbei erfolgte die Lipidextraktion auf Eis, die verwendeten Lösungen wurden ebenfalls auf Eis vorgekühlt. Nach der Behandlung wurden die Zellen durch Abschaben geerntet und die Zellsuspension mit Hilfe einer Transferpipette in ein zentrifugierbares Duranglas-Röhrchen, in das 1,25 ml kaltes Chloroform vorgelegt wurde, überführt. Die Kulturschalen wurden zweimal mit 1,25 ml Methanol gewaschen. Diese Waschlösung wurde ebenfalls in die Zentrifugenröhrchen transferiert. Nach einer kurzen Ruhepause wurden zu diesem Ein-Phasen-Gemisch 1,25 ml Chloroform und 1,25 ml 0,2%ige Ameisensäure zugegeben und anschließend gut gemischt. Es bildete sich ein Zwei-Phasen-Gemisch, wobei sich

Chloroform mit den gelösten Lipiden in der unteren, organischen Phase befand. Zur besseren Phasentrennung wurden die Zentrifugenröhrchen schließlich 5 Minuten bei 1.050xg zentrifugiert. Die organische Phase wurde in ein Glasröhrchen transferiert und in einem Vapotherm Heizblock (Labor Technik Barkey, Bielefeld) bei 40°C unter ständigem Stickstoffstrom eingedampft. Die Lipidfraktionen wurden anschließend in 100 µl Chloroform aufgenommen und für die folgende dünnschichtchromatographische Analyse eingesetzt.

#### **2.7.4 Dünnschichtchromatographie**

Zur Auftrennung radioaktiver Lipidfraktionen wurde ein dünnschichtchromatographisches Verfahren angewandt. Die dabei verwendeten *High Performance Thin Layer Chromatographie* (HPTLC)-Platten (20x20 cm, Kieselgel, Macherey und Nagel, Düren) wurden nach dem Vorlauf in einem Chloroform/Methanol Gemisch (1/3 v/v) für mindestens 30 min bei 100°C aktiviert. Die Laufkammern wurden am Tag vor dem Auftragen der Extrakte mit dem entsprechenden Laufmittel gesättigt.

Die extrahierten Lipide wurden mit Hilfe eines TLC-Auftragegerätes (Automatic TLC-Sampler III, CAMAG, Schweiz) in 6 mm breiten Spuren im Luftstrom auf die Dünnschichtplatten aufgetragen. Der Abstand zwischen den Spuren betrug 6 mm, zum äußeren Rand der HPTLC-Platte 2 cm. Die Auftrennung der Neutrallipide, der Fettsäuren und deren Metabolite erfolgte in geschlossenen, abgesättigten Glastanks (22 x 22 x 10 cm, Desaga, Heidelberg) mit einem Gemisch aus Ethylacetat/Isooctan/Wasser/Essigsäure (10/5/10/2 v/v/v/v) (Krug and Berndt 1985). Nach etwa 25 min und einer Laufstrecke von 9 cm wurde die Chromatographie beendet. Die HPTLC-Platte wurde herausgenommen und an der Luft getrocknet.

#### **2.7.5 Autoradiographie**

Zur Detektion der lokalen Verteilung der Radioaktivität wurden die in Klarsichtfolie gepackten Dünnschichtchromatographieplatten auf einem Phosphorimager-Screen (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) ÜN oder für mehrere Tage bei -20°C exponiert. Der Screen besteht aus radiosensitiven Speicherleuchtstoffen auf Polyesterplatten, die mit einer Schutzschicht aus Celluloseacetat bedeckt sind. Durch die radioaktive Strahlung der Probe werden die radio-sensitiven Speicherleuchtstoffe in einen angeregten Zustand überführt. Die Detektion erfolgt mit Hilfe eines Phosphorimagers (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim), wobei durch Laserstimulation die Rückkehr in



den Grundzustand ausgelöst wird. Dabei wird Licht emittiert, dessen Intensität proportional der Strahlungsenergie in der Probe ist. Man erhält ein digitales zweidimensionales Bild des Trägers, bei dem wie auf einem Röntgenfilm die Position der radioaktiven Substanzen durch schwarze Flecken sichtbar gemacht und quantitativ ausgewertet werden kann. Nach dem Auslesen wird der Screen mit Licht bestrahlt, um alle verbliebenen angeregten Zustände wieder in den Grundzustand überzuführen.

Alternativ hierzu wurde ein Röntgenfilm (Hyperfilm<sup>TM</sup>-MP, GE *Healthcare*, Freiburg) auf die Dünnschichtplatten aufgelegt, für 10-21 Tage bei -20°C exponiert und anschließend entwickelt.

## 2.7.6 Auswertung

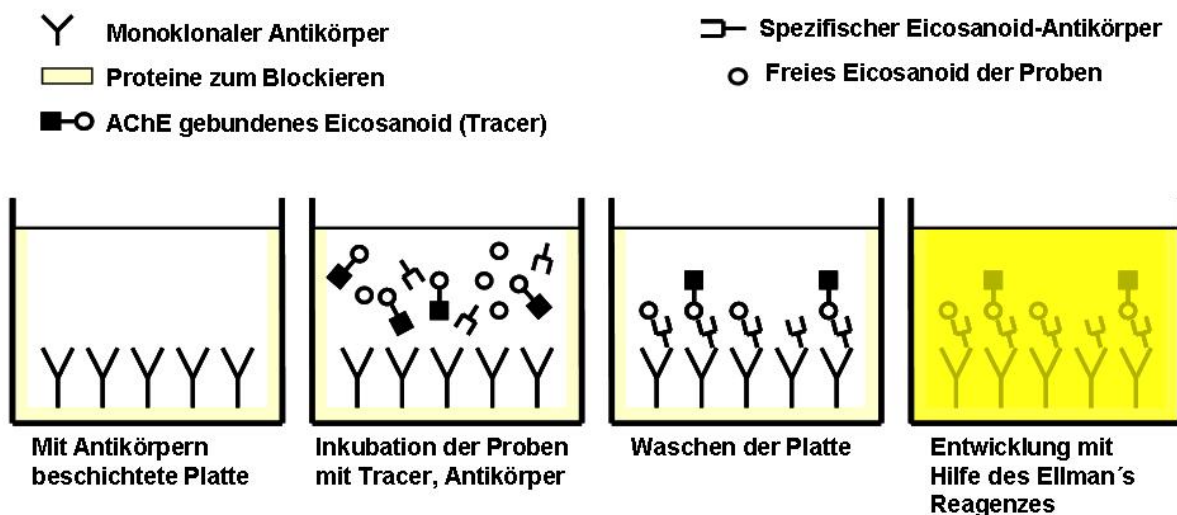
Nach der Entwicklung der Autoradiographie konnten die Signale der untersuchten Proben anhand des  $R_f$ -Wertes ( $R_f$  = Wanderungsstrecke der Substanz/Wanderungsstrecke des Laufmittels) entsprechender Standards den freien Fettsäuren und deren Metaboliten zugeordnet werden. Die nicht radioaktiv markierten Standards wurden mit Phosphomolybdänsäure auf der DC-Platte sichtbar gemacht. Über die Schwärzungsintensität wurden die relativen Radioaktivitätsmengen der jeweiligen Banden unter Verwendung der *Software OpitQuant Acquisition and Analysis* (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) bzw. *Odyssey*<sup>®</sup> (LI-COR Biosciences, USA) semi-quantitativ bestimmt.

## 2.8 Bestimmung von Eicosanoidkonzentrationen

### 2.8.1 Prinzip des Enzym-Immunoassays

Im Zellüberstand der Partikel-behandelten Zellen wurden folgende Eicosanoide mittels Enzym-Immunoassay (EIA; Cayman Chemical Company, USA) analysiert: 8-Isoprostan und Prostaglandin E<sub>2</sub>. Der Test basiert auf einer Konkurrenzreaktion von freiem, zu bestimmenden Eicosanoid und Acetylcholinesterase-gebundenem Eicosanoid (Tracer) bekannter Konzentration um eine limitierte Anzahl an Bindungsstellen des spezifischen Eicosanoid-Antikörpers (s. Abb. 18). Die Konzentration des an die Acetylcholinesterase (AChE) gebundenen Eicosanoids wird konstant gehalten, während die Konzentration des zu analysierenden Eicosanoids variiert. Der an den Antikörper gebundene Anteil des Eicosanoids mit konjugierter AChE verhält sich umgekehrt proportional zur unbekanntem Menge an freiem

Eicosanoid. Der Eicosanoid-spezifische Antikörper bindet an einen sekundären Antikörper, der auf einer Multiloch-Platte immobilisiert ist. Durch die Zugabe des Ellmans Reagenzes als entsprechendes Substrat der Acetylcholinesterase wird letztendlich die Aktivität der AChE, die das Substrat Acetylcholin in Thiocholin spaltet, gemessen. Thiocholin reagiert in einer weiteren Reaktion mit 5,5'-Dithio-bis-2-Nitrobenzoesäure zu 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure. Die daraus resultierende Gelbfärbung kann spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 412 nm mit einem Absorptionmessgerät bestimmt werden. Die Intensität der Farbe verhält sich proportional zu der gebundenen Menge an enzymmarkiertem Eicosanoid, folglich umgekehrt proportional zur Konzentration des unbekanntes, freien Eicosanoids. Anhand der Standardkurve kann die Konzentration des zu analysierenden Eicosanoids quantifiziert werden.



**Abb. 18: Prinzip des ACE<sup>TM</sup> (Acetylcholinesterase) Enzym-Immunoassays von Cayman Chemicals (USA)**

Der Enzym-Immunoassay (EIA) von Cayman Chemicals basiert auf einer kompetitiven Bindungstechnik, bei der das zu bestimmende Eicosanoid mit einer bekannten Menge an Eicosanoid (Tracer), das an Acetylcholinesterase gekoppelt ist, um eine limitierte Anzahl von Bindungsstellen des spezifischen Eicosanoid-Antikörpers konkurriert. Nach Zugabe des Ellmans Reagenzes wird die Aktivität der Acetylcholinesterase durch den Farbumschlag des Reaktionsansatzes gemessen. Die Farbintensität ist proportional zur Menge an gebundenem enzymmarkiertem Eicosanoid und indirekt proportional zur Menge an freiem, zu bestimmenden Eicosanoid.

## 2.8.2 Verwendete Materialien und Puffer (Kit von Cayman Chemicals)

### 96-Multiloch-Platte (96-well-Platte)

Um die Eicosanoidkonzentrationen zu bestimmen, wurden im Kit enthaltene, mit Antikörpern beschichtete 96-Multiloch-Platten verwendet.

### Waschpuffer

Der Waschpuffer wurde auf RT eingestellt. Vor dem Gebrauch sollte der Waschpuffer vollständig gemischt werden. Demnach wurden 5 ml Waschpufferkonzentrat mit 1.995 ml Wasser (*UltraPure water*, Cayman Chemical Company, USA) verdünnt und gemischt. Im Anschluss wurde der Waschpuffer durch die Zugabe von 2,5 ml Tween 20 komplettiert. Der Puffer wurde im Kühlschrank aufbewahrt und musste innerhalb von zwei Wochen verbraucht werden.

### EIA-Puffer

Der EIA-Puffer war zehnfach konzentriert. Deshalb wurden 10 ml des im Kit enthaltenen EIA-Pufferkonzentrats mit 90 ml ultrapurem Wasser verdünnt und gut gemischt. Der Puffer wurde im Kühlschrank für maximal zwei Monate aufbewahrt.

### Antikörperlösung (Antiserum)

Die konzentrierte Antikörperlösung wurde mit 6 ml EIA-Puffer verdünnt. Dieser Schritt erfolgte kurz vor der Anwendung des Antikörpers. Weiter konnten zur besseren Unterscheidung 60 µl eines Antiserum-Farbstoffs hinzugeben werden.

### AchE Tracer (Acetylcholinesterase gebundenes Eicosanoid)

Der Tracer wurde mit 6 ml EIA-Puffer verdünnt. Außerdem konnte 60 µl Tracer-Farbstoff hinzugefügt werden.

### Standardreihe

Der gelieferte, konzentrierte Standard wurde in 900 µl ultrapurem Wasser gelöst. Für die Verdünnung der Standardreihe wurden acht Eppendorf-Reaktionsgefäße vorbereitet. In Eppendorf-Reaktionsgefäß # 1 wurden 900 µl und in #2 bis #8 500 µl Zellkulturmedium vorgelegt. Anschließend wurden 100 µl Standardlösung in Eppendorf-Reaktionsgefäß #1 überführt und die Lösung gut gemischt. Danach wurden 500 µl aus der Verdünnung #1 in das zweite

Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert und ebenfalls kurz gemischt. Die folgenden Verdünnungen wurden in der gleichen Art und Weise durchgeführt.

#### Ellmans Reagenz

Vor jedem Versuchsansatz wurde lyophilisiertes Ellmans Reagenz in 20 ml ultrapurem Wasser gelöst.

### **2.8.3 Vorbereitung der Proben**

Nach erfolgter Inkubation der Zellen wurde der Mediumüberstand bei RT gesammelt und in ein frisches 2,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur Entfernung von Zelltrümmern wurden die Proben im Anschluss 5 min bei 4°C bei 13.000xg zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### **2.8.4 Messung der Proben**

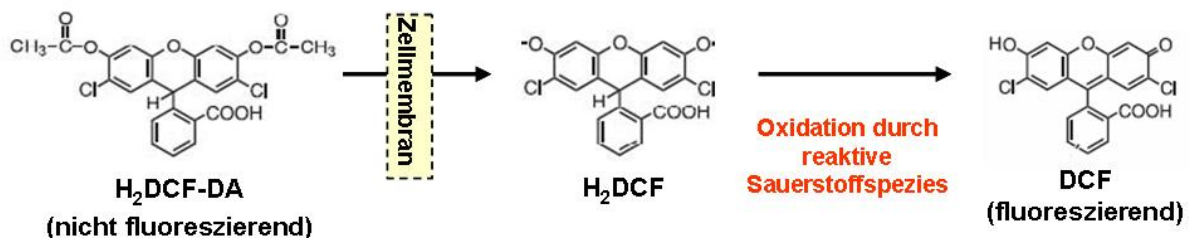
Die Bestimmung der Eicosanoid-Konzentrationen erfolgte in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte. Ungefähr 30 min vor der Weiterverarbeitung wurden alle Reagenzien auf RT gebracht.

Zuerst wurden 50 µl der Standard-Verdünnungsreihe in Duplikaten und 50 µl der zu untersuchenden Proben in die dafür vorgesehenen Kavitäten transferiert. Weiter wurden zur Kontrolle der geringsten Bindung des AChE-Tracers (AChE-gebundenes Eicosanoid) 100 µl EIA-Puffer in zwei Kavitäten pipettiert, die als „nicht-spezifische Bindungsstellen“ (NSB) bezeichnet wurden. Zur Bestimmung der maximalen Bindung des Tracers wurden 50 µl EIA-Puffer in zwei Kavitäten überführt, die als „Maximale Bindungsstellen“ (B0) bezeichnet wurden. Nach Zugabe von 50 µl AChE-Tracer und 50 µl des monoklonalen Antikörpers in jede Vertiefung, mit Ausnahme der NSB, wurde die Platte mit einem Plastikfilm verschlossen und für 18 Stunden bei 4°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde die Multiloch-Platte fünfmal mit Waschpuffer unter Verwendung eines EIA-Waschautomaten (Bio-Tek Instruments Inc., USA) gewaschen. Im Anschluss wurden pro Vertiefung 200 µl Ellmans Reagenz zugegeben und die Platte bei RT für 60-90 min im Dunkeln unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Bestimmung der Absorption erfolgte bei einer Wellenlänge von 412 nm in einem Absorptionmessgerät.

## 2.9 Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies

Der Nachweis intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) erfolgte mit Hilfe des nicht-fluoreszierenden 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetats (H<sub>2</sub>DCF-DA). Das ungeladene H<sub>2</sub>DCF-DA diffundiert durch die Zytoplasmamembran in die Zelle. Dort wird die Substanz durch unspezifische Esterasen deacetyliert, es entsteht Dichlorodihydrofluorescein (H<sub>2</sub>DCF), welches geladen ist und deshalb nicht in der Lage ist, die Zelle wieder zu verlassen. In Gegenwart von Peroxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, <sup>•</sup>O<sub>2</sub>R, <sup>•</sup>OR, <sup>•</sup>OH, HOCl sowie ONOO<sup>-</sup> wird der Farbstoff zu fluoreszierendem Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert. Die entstehende Fluoreszenz ist zellgebunden und kann im Fluoreszenzmessgerät nach Anregung bei 488 nm bei 530 nm erfasst werden (Abb. 19).

Für die Untersuchung wurden 2 x 10<sup>5</sup> Zellen in 200 µl Kulturmedium pro Vertiefung einer 96-Multiloch-Platte ausgesät und ÜN im Brutschrank inkubiert. Nach dem Waschen des Zellrasens mit HBSS, erfolgte eine 40-minütige Beladung der Zellen in HBSS mit 50 µM H<sub>2</sub>DCF-DA in HBSS. Daraufhin wurden die Zellen, um überschüssiges H<sub>2</sub>DCF vollständig zu entfernen, mit HBSS gewaschen und mit den in HBSS resuspendierten Partikeln behandelt. Nach der Inkubation erfolgte die Bestimmung der Fluoreszenz in einem Fluoreszenzmessgerät.



### Abb. 19: Messung von reaktiven Sauerstoffspezies mittels DCF-Test

H<sub>2</sub>DCF-DA gelangt durch die Membran in die Zelle, wo eine Deacetylierung durch Esterasen stattfindet. Durch die Einwirkung von ROS wird H<sub>2</sub>DCF in fluoreszierendes DCF umgewandelt.

## 2.10 Bestimmung der zellulären Glutathion Konzentration

Zur Bestimmung des intrazellulären Glutathion Gehaltes wurde als Detektionsreagenz 5,5'-Dithio-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, Ellmans Reagenz) verwendet, welches mit Thiolgruppen des reduzierten Glutathions (GSH) unter Bildung von 5'-Thio-(2-nitrobenzoesäure) (TNB) reduziert wird. Dabei entsteht oxidiertes Glutathion (GSSG), welches durch die NADPH-abhängige Glutathionreduktase (GR) wieder zu GSH regeneriert wird. Bei der Bestimmung des

Glutathion Gehaltes sind nun die Konzentrationen von DTNB, NADPH (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat) und Glutathionreduktase so eingesetzt, dass die Geschwindigkeit der gesamten Reaktion proportional zur Konzentration des Glutathions verläuft. Die Bildung bzw. die Zunahme von TNB lässt sich im Photometer bei 412 nm verfolgen.

Für die Durchführung wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 1 ml Kulturmedium pro Vertiefung einer 24-Multiloch-Platte ausgesät und ÜN im Brutschrank inkubiert. Nach der Exposition der Zellen am darauffolgenden Tag, wurde der Mediumüberstand abgenommen und die Zellen mit warmen PBS auf Eis gewaschen. Daraufhin wurden pro Vertiefung der Multiloch-Platte 150 µl einer 10 mM HCl-Lösung pipettiert und die Platte bei  $-80^\circ\text{C}$  ÜN inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Platte auf Eis aufgetaut und die Zelllysate resuspendiert. 10 µl des Zelllysats wurden zur Proteinbestimmung eingesetzt. 120 µl des Zelllysats wurden zur Bestimmung der Glutathionkonzentration verwendet. Dafür erfolgte zuerst eine 10-minütige Behandlung mit 30 µl einer 6,5%igen (w/v) Sulfosalizylsäure, um die Proteine zu präzipitieren. Die Präzipitate wurden durch eine anschließende 10-minütige Zentrifugation bei 14.000xg und  $4^\circ\text{C}$  sedimentiert. Der Überstand wurde zur Glutathion-Bestimmung eingesetzt und bis zur Messung bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Für die GSH-Bestimmung wurden pro Reaktionsansatz 10 µl der Probe bzw. des GSH-Standards (0-50 µM) in eine 96-Multiloch-Platte gegeben, mit 40 µl des GSH-Reaktions-Puffers auf ein Volumen von 50 µl gebracht und anschließend mit 100 µl der Enzym-Reaktionslösung versetzt. Die Messung der Absorption erfolgte in einem Absorptionmessgerät über drei Minuten bei einer Wellenlänge von 412 nm. Die Glutathionkonzentrationen der Proben lassen sich durch die Eichgerade ermitteln. Sie werden auf die Proteinkonzentration der jeweiligen Probe bezogen.

#### GSH-Puffer

- 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 5 mM EDTA (pH 7,4)

#### Enzym-Reaktionslösung

- 0,3 mM NADPH
- 0,225 mM DTNB
- 1,5 U/ml GR in GSH-Puffer

## 2.11 Elektronenmikroskopie

Bei der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) werden diejenigen Elektronen zur Abbildung genutzt, die das Präparat durchstrahlen, vergleichbar wie Licht im Lichtmikroskop. So ähnelt der Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskops vom Prinzip den Lichtmikroskopen. Anstatt einer Glühbirne zur Beleuchtung des Objektträgers im Lichtmikroskop nutzt man beim TEM eine Elektronenquelle. Weiter treten an Stelle einer Glaslinse elektromagnetische Linsen. Dies sind eisenummantelte Magnetspulen, welche als Sammellinsen die Elektronenstrahlen ähnlich bündeln, wie das die Glaslinsen mit Lichtstrahlen tun. Das stark vergrößerte Bild erscheint auf einem Leuchtschirm und wird durch eine empfindliche CCD-Kamera (*charged coupled device*) in digitaler Form an einen Computer übermittelt.

### 2.11.1 Verwendete Materialien und Puffer

Die für die Elektronenmikroskopie verwendeten Substanzen wurden von der Firma Serva (Heidelberg) bezogen.

#### PBS Puffer

Stammlösungen:

A:	350,63 g NaCl	B:	146,31 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O
	ad 2 l H <sub>2</sub> O		24,56 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
			ad 2 l H <sub>2</sub> O

Die Gebrauchslösung wurde immer frisch angesetzt:

50 ml Stammlösung A  
40 ml Stammlösung B  
ad 1.000 ml ddH<sub>2</sub>O  
pH Wert 7,4

#### 20% Paraformaldehyd

8 g Paraformaldehyd wurden unter Rühren und Erwärmen in 40 ml H<sub>2</sub>O gelöst. Anschließend wurde tropfenweise 1 M NaOH zugeben bis die Lösung klar wurde. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung filtriert und zur längerfristigen Lagerung im Kühlschrank aufbewahrt.

Karnovsky's Fixants (wurde immer frisch angesetzt)

- 0,5 ml Paraformaldehyd (20%)
- 2,5 ml Glutaraldehydlösung (25%)
- 40 ml Natriumcacodylat Puffer (0,2 M)
- 7 ml ddH<sub>2</sub>O

0,2 M Natriumcacodylat-Puffer

- 42,8 g Natriumcacodylat in 1.000 ml H<sub>2</sub>O lösen
- mit 0,1 M HCl auf pH 7,3 einstellen

Osmiumtetroxid OsO<sub>4</sub> 1%

- Zur Herstellung der Osmiumtetroxid-Lösung wurden 10 ml einer 4%igen OsO<sub>4</sub> Lösung mit 30 ml eines 0,1 M Natriumcacodylat Puffers vermischt

Ethanol und Propylenoxid getrocknet

- Ethanol und Propylenoxid wurden durch den Einsatz eines Molekularsiebs mit einer Porenweite von 0,3 nm (3 Å) getrocknet.

EPON 812

- Lsg. A: 29,4 g EPON 812 (= Glycidether 100)
- 21,8 g DDSA (Dodecenybernsteinsäureanhydrid)
- Lsg. B: 27,4 g EPON 812
- 24,4 g MNA (Methylnadicanhydrat)

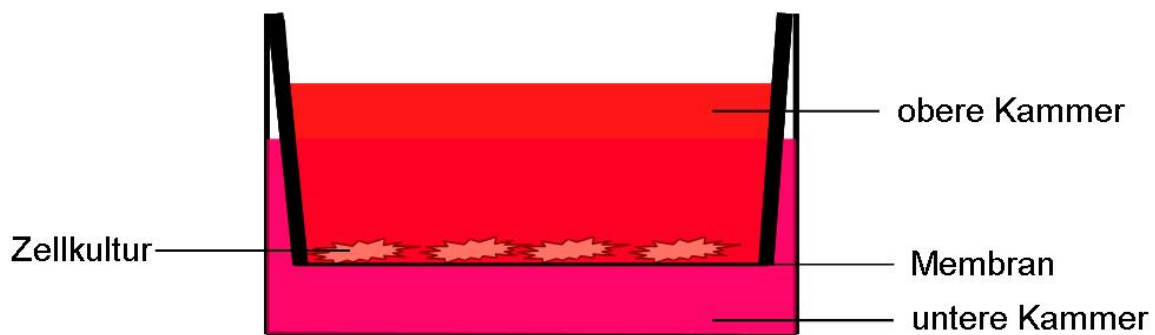
Beide Ansätze wurden in einem Becherglas jeweils ca. 30 min auf dem Magnetrührer gemischt. Anschließend wurden die beiden Lösungen zusammengegeben und nochmals 30 min gerührt. Daraufhin wurde die Lösung mit 1,8 g DMP30 (Dimethylaminomethyl-phenol, Beschleuniger des Polymerisationsprozesses) versetzt und 30 min gelöst. Das fertige EPON wurde in 10 ml Spritzen aufgezogen und bis zur Verwendung bei -20°C maximal für 6 Monate gelagert.



### 2.11.2 Probenvorbereitung, Fixierung und Entwässerung

Die Präparation der Zellen für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) erfolgte nach folgendem Protokoll. Für die Mikroskopie wurde ein spezielles Transwell®-System (Corning Life Sciences, USA) benutzt. Hierbei trennt ein Transwell®-Einsatz mit einer aus Polycarbonat bestehenden Membran die Kulturschale in eine obere und eine untere Kammer. Die Membran hat einen Durchmesser von 24 mm und eine Wachstumsfläche von 4,67 cm<sup>2</sup>. Die Membran weist außerdem Poren mit einer Porengröße von 0,4 µm auf.

Um die Zellen auf die Transmissionselektronenmikroskopie vorzubereiten, wurde zunächst die untere Kammer mit 2,5 ml Kulturmedium versehen, während in das obere Kompartiment 2,5 x 10<sup>6</sup> RAW264.7 Makrophagen in 1,5 ml Kulturmedium ausgesät wurden.



**Abb. 20: Schematische Darstellung des Transwell®-Systems (Corning, USA) für die Transmissionselektronenmikroskopie**

Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen nach entsprechender Partikel-Behandlung für die Transmissionselektronenmikroskopie präpariert. Das Zellmedium über der Membran wurde vorsichtig abgesaugt, der Membraneinsatz in eine mit PBS gefüllte Petrischale überführt. Um das Austrocknen der Membran zu vermeiden, wurde der Zellrasen vorsichtig mit PBS benetzt. Anschließend wurden mit einem *Biopsy Punch* (Stiefel Laboratorium, Offenbach) runde Membranstücke aus der Membran gestanzt, zur Fixierung der Zellen in ein mit Karnovsky's Fixants vorgelegtes Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert und 15 min auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Nach einem 10 min Waschschriff mit PBS wurden die Membranen mit 1% Osmiumtetroxid für 7 min inkubiert. Osmiumtetroxid diente einerseits der Kontrastierung der Präparate, andererseits der Fixierung von Zellmembranen durch Aufhebung derer osmotischen Wirkung. Um überschüssiges

Osmiumtetroxid zu entfernen, wurden die Präparate daraufhin mit PBS 10 min gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Entwässerung der Proben mit einer aufsteigenden Ethanolreihe:

- 50% Alkohol: 1 x 2 min
- 70% Alkohol: 1 x 2 min
- 95% Alkohol: 1 x 2 min
- 100% Alkohol: 2 x 5 min

Da Ethanol mit dem Einbettungsharz nicht mischbar ist, wurde nach der Dehydratation als Intermedium Propylenoxid eingesetzt.

### **2.11.3 Einbettung in Epoxidharz (EPON 812)**

Nach einer fünfminütigen Inkubation mit Propylenoxid erfolgte eine erste 20-minütige Einbettungsstufe der Präparate mit einer Mischung von 30% Einbettungsharz und 70% Propylenoxid. Als Einbettungsharz wurde EPON 812 eingesetzt. Daraufhin schloss sich die zweite Einbettungsstufe mit einer Mischung aus 70% EPON 812 und 30% Propylenoxid an. Hierbei wurden die Proben für 20 min geschüttelt. Bei der dritten Einbettungsstufe wurden die Proben vorsichtig mit einer Pinzette in 100%iges EPON 812 überführt und zur Polymerisation für drei Tage bei 60°C im Wärmeschrank inkubiert.

### **2.11.4 Ultramikrotomie und Transmissionselektronenmikroskopie**

Von den gehärteten Blöckchen wurden im Ultramikrotom (Leica EM UC6k, Solms) mit Hilfe eines Diamantmessers Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 70 nm angefertigt und auf einen Objektträger positioniert. Als Objektträger dienten runde Netze (*Grids*) aus Gold (Kisker, Steinfurt) mit hexagonalen Maschen (300 *Mesh/Grid*). Die Objektträgernetze wurden in einen Objektträgerhalter eingespannt und über eine Schleuse in das Mikroskop eingebracht. Die fotografischen Aufnahmen der präparierten Zellen erfolgten am Transmissionselektronenmikroskop der Carl Zeiss AG (EM 109T, Oberkochen) bei einer Spannung von 80 kV.

## 2.12 Durchflusszytometrie

### 2.12.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit mit Hilfe von Fluorochrom-konjugierten Antikörpern intra- oder Oberflächenproteine einer Zelle zu untersuchen. Darüber hinaus lässt sich im Durchflusszytometer (FACS, *Fluorescence Cytometry*) neben Zellgröße und Granularität auch die Viabilität der Zellen bestimmen.

Die Zellen liegen bei der durchflusszytometrischen Analyse als Zellsuspension vor und werden mit Überdruck durch eine Stahlkapillare in eine Quarzglas-Messküvette überführt. Die Zellen werden dabei mit einer Trägerflüssigkeit (*sheath fluid*) umgeben und so verengt, dass die Zellen vereinzelt und nacheinander über eine Düse (*flow-in-air*) am Analysepunkt vorbeigeleitet werden (hydrodynamische Fokussierung). In der Messküvette trifft der Flüssigkeitsstrahl auf das monochromatische, von einer Linse (*focusing lens*) gebündelte Licht eines Argonlasers. Der Argonlaser ist gekühlt und gibt Licht einer definierten Wellenlänge ( $\lambda = 488 \text{ nm}$ ) ab. Das Licht des Argonlasers wird beim Auftreffen des Strahls auf Zellen im laminaren Probenstrom abgelenkt. Das Streulicht, das geradeaus aus der Messzelle tritt, wird durch einen Bandpassfilter verstärkt und anschließend von einer Photodiode detektiert. Die Intensität dieses Vorwärtsstreulichts (*forward scatter*, *FSC*) gilt als Maß für die Größe der Zellen. Der Teil des Laserlichts, der an den Zellstrukturen gebeugt wird, und somit von der Anzahl und Größe von Organellen abhängt, wird ebenfalls verstärkt und über einen weiteren Bandpassfilter zu einem Detektor geleitet. Die Intensität des Seitwärtsstreulichts (*side scatter*, *SSC*) charakterisiert die Granularität der zu analysierenden Zellen.

Weiter lassen sich im FACS Fluoreszenzsignale unterschiedlicher Wellenlängen untersuchen. Dafür werden die Zellen vor der FACS-Analyse mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder mit einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper gefärbt. Das anregende Laserlicht wird von dem Farbstoff/Fluorochrom absorbiert. Durch die Laserenergie werden die Schalenelektronen der fluoreszierenden Verbindungen auf ein höheres Energieniveau gehoben. Beim Rücksprung der Elektronen zum Ausgangsniveau emittiert das Molekül Energie in Form von Licht einer höheren Wellenlänge. Das emittierte Licht wird durch *Photomultiplier tubes* (PMT), die auf einen bestimmten Wellenlängenbereich eingestellt sind, registriert. Danach werden die Signale in elektrische Pulse umgewandelt, linear oder logarithmisch verstärkt und

auf einem Computer mit Hilfe der Software CELLQuest™ (Becton Dickinson, Heidelberg) graphisch dargestellt und quantifiziert.

### **2.12.2 Durchflusszytometrische Phänotypisierung von Zellen**

Um sowohl periphere mononukleäre Blutzellen, isolierte Monozyten als auch Monozyten-abstammende Makrophagen (MDM) mittels FACS-Analyse zu phänotypisieren, wurden diese in parallelen Ansätzen entweder mit monoklonalem, FITC-(Fluoreszein Isothiozyanat)konjugiertem anti-CD14-Antikörper oder zur Spezifitätskontrolle mit dem entsprechenden FITC-konjugierten Isotyp markiert. Da Zellen eine Eigenfluoreszenz aufweisen, wurde außerdem zu jeder vollständigen Messreihe eine nicht gefärbte Negativkontrolle mitgeführt. Zur Anregung von FITC wurde ein Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm verwendet, die Emission wurde bei einer Wellenlänge von 525 nm gemessen. Die Stärke der Lichtemission nach Anregung war ein Maß für die Anzahl der gebundenen Antikörpermoleküle.

Zur FACS-Analyse wurden pro Ansatz mindestens  $1 \times 10^5$  Zellen benötigt. Diese wurden zuerst in 1 ml PBS aufgenommen, in ein FACS-Röhrchen transferiert und anschließend bei 4°C sedimentiert (300xg, 5 min). Die Zellpellets wurden nun mit 100 µl Färbepuffer (PBS<sup>-/-</sup>, 0,1% Natriumazid, 2% FCS) als Kontrolle oder mit 100 µl Färbepufferlösung supplementiert mit 0,125 µg FITC-konjugiertem CD14-Antikörper oder 0,125 µg Isotypantikörper (Tab. 15) resuspendiert und danach 10 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach der Färbereaktion wurde der Zellsuspension 1 ml Waschpuffer (PBS<sup>-/-</sup>, 0,1% Natriumazid) zugegeben, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 500 µl Waschpuffer aufgenommen und direkt am FACS vermessen. Abb. 21 zeigt beispielhaft die Dot-Blots sowie die Histogramme, welche die Anreicherung von Monozyten aus PBMCs eines Probanden (Kapitel 2.4.2.) durch magnetische Zellsortierung zeigen. Vor der Aufreinigung betrug der Anteil an CD14-positiven Monozyten  $17,22\% \pm 1,02$  (n=5) (Abb. 21B) und nach der Aufreinigung  $89,43\% \pm 1,19$  (Abb. 21D) (n=4).

Tab. 15: Auflistung der in der FACS-Analyse verwendeten Antikörper

Antikörper	Konzentration	Bezugsquelle
Isotypkontrolle IgG2a, FITC-konjugiert	0,05 µg/µl	Coulter Immunotech (Krefeld)
Anti-human CD14, FITC-konjugiert	0,05 µg/µl	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)

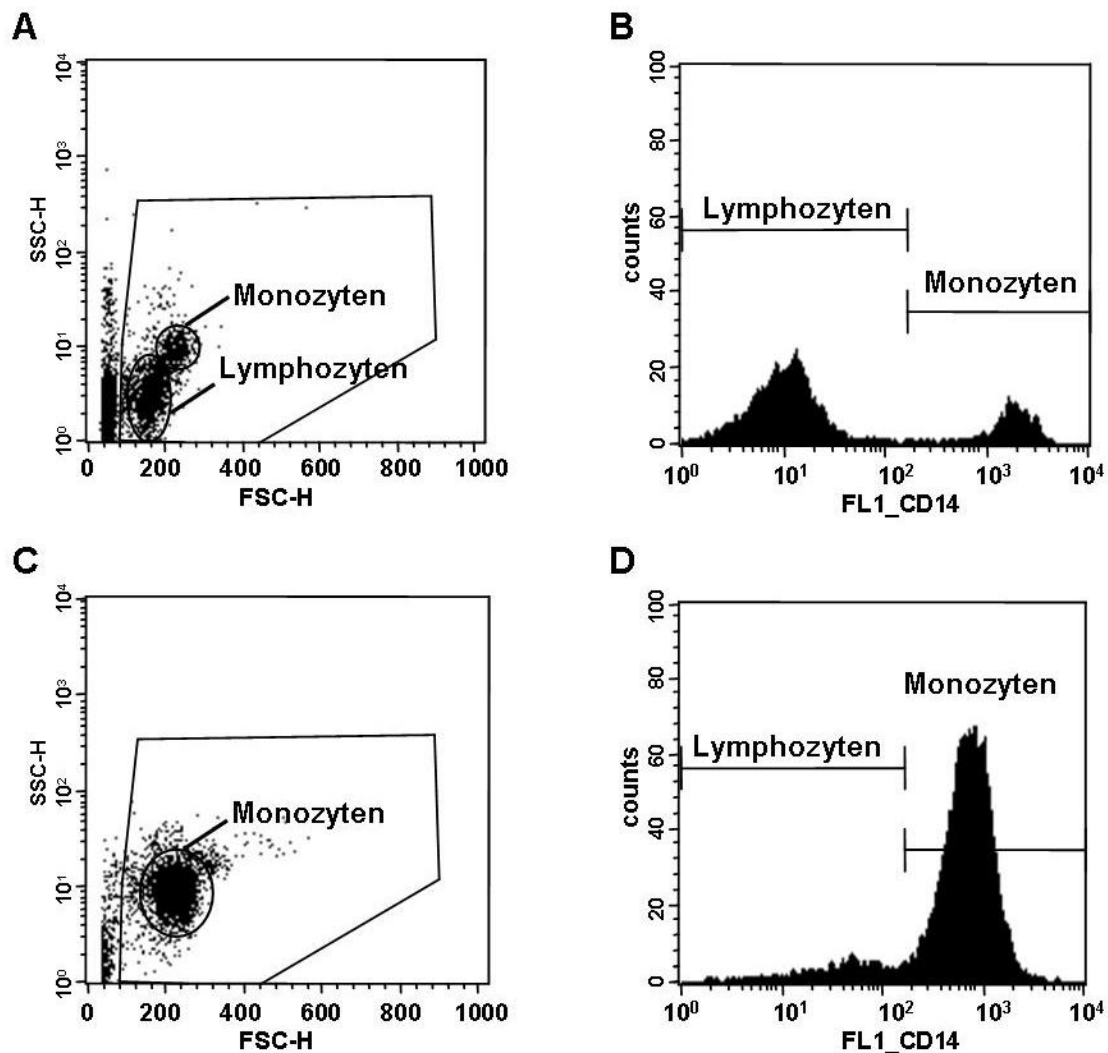


Abb. 21: Durchflusszytometrische Analyse von PBMCs und isolierten Monozyten eines Probanden zur Bestimmung der Verteilung von CD14-positiven Zellen

A+B zeigen PBMCs, C+D aufgereinigte Monozyten eines Probanden. Die Dot-Blots A und C zeigen die Relation der Signale zwischen FSC (*forward scatter*) und SSC (*side scatter*). Die Histogramme B und D zeigen die Verteilung der Zellen in Abhängigkeit von der Fluoreszenzintensität, d.h. der Anzahl von gebundenen FITC-CD14-Antikörpermolekülen. Anhand der eindimensionalen Darstellung wurden die CD14 positiven Monozyten-Anteile als 17,22% ± 1,02 (B) und 89,43% ± 1,19 (D) bestimmt.

### **2.12.3 Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellviabilität**

Die Viabilität von Zellen ließ sich durchflusszytometrisch mit Hilfe des Fluorochroms Propidiumjodid (PI) bestimmen. PI besitzt die Fähigkeit mit DNA-Doppelsträngen zu interkalieren und danach bei Anregung zu fluoreszieren. Nekrotische oder beschädigte Zellen nehmen diesen Stoff auf, während die Membranen vitaler Zellen hierfür nicht durchlässig sind. Durch FACS-Messung kann zwischen toten (PI-positiv) und lebenden Zellen (PI-negativ) unterschieden werden.

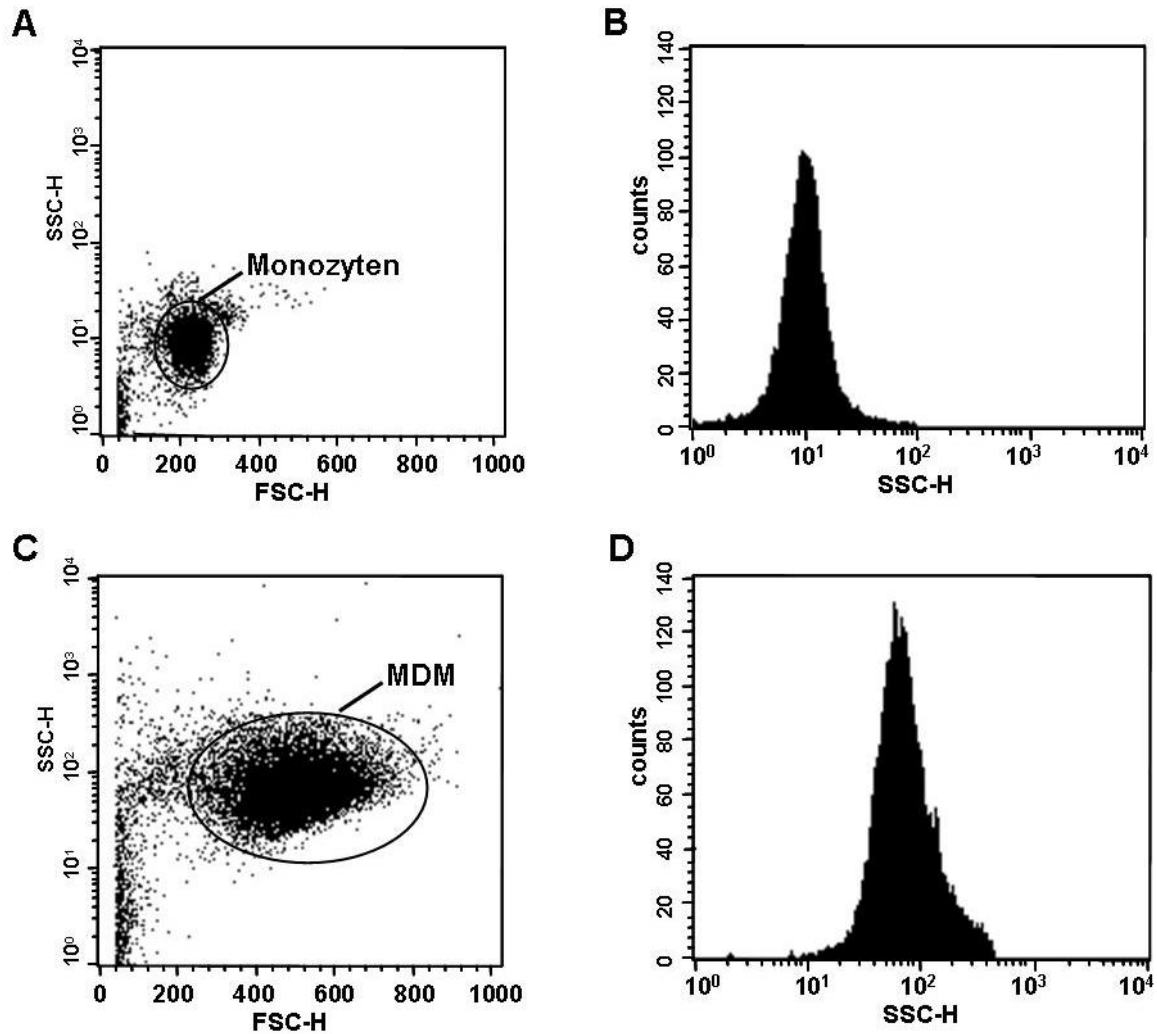
Für jeden FACS-Ansatz wurden mindestens  $1 \times 10^5$  Zellen verwendet. Die Zellen wurden in 1 ml kaltem PBS gewaschen und für 5 min bei 4°C, 300xg sedimentiert. Nach Abnahme des Zellüberstands erfolgte die Aufnahme der Zellen in 500 µl Waschpuffer, der zuvor mit 1 µg/ml PI (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen) versetzt wurde. Nach einer zweiminütigen, lichtgeschützten Färbezeit auf Eis wurden die Proben durchflusszytometrisch bestimmt.

### **2.12.4 Bestimmung der Granularität von Makrophagen**

Der SSC detektiert das Licht, welches von der Zelle seitlich gestreut wird und gilt als Maß für die Granularität von Zellen, d.h. je granulärer eine Zelle desto höher ist die Intensität des gestreuten Lichts.

Zur durchflusszytometrischen Untersuchung der Granularität der Zellen wurden diese durch den Einsatz von Accutase (PAA Laboratories, Pasching) von den Kulturschalen gelöst und in FACS-Röhrchen überführt. Nach einem anschließenden Zentrifugationsschritt (300xg, 4°C, 5 min) wurden die Zellen in 500 µl Waschpuffer resuspendiert und direkt zur Messung am FACS eingesetzt.

Abb. 22 zeigt beispielhaft sowohl die Vergrößerung als auch die Verstärkung der Granularität von Monozyten differenzierten Makrophagen im Vergleich zu frisch isolierten Monozyten eines Probanden (Kapitel 2.4). Während die mittlere Fluoreszenzintensität der Monozyten im SSC 10 Fluoreszenzeinheiten betrug, steigerten die MDM ihre mittlere Fluoreszenzintensität im SSC auf 70 Fluoreszenzeinheiten nach 7 Tagen Kultivierung.



**Abb. 22: Durchflusszytometrische Analyse der Granularität von Monozyten und Monozyten-abstammenden Makrophagen (MDM) eines Probanden**

A+B zeigen aufgereinigte Monozyten, C+D über 7 Tage differenzierte Monozyten-abstammende Makrophagen (MDM) eines Probanden. Die Graphik A und C zeigen die Relation der Signale zwischen FSC (*forward scatter*) und SSC (*side scatter*). Anhand der eindimensionalen Darstellung (Histogramme B und D) wird eine Verschiebung im SSC aufgrund erhöhter Granularität gezeigt.

### 2.13 Statistik

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse wurden als arithmetische Mittelwerte (M) mit dem Standardfehler (SEM, *standard error of the mean*) und der Anzahl der durchgeführten Experimente (n) in der Form  $M \pm SEM$  dargestellt. Für jede Versuchsreihe wurden Zellkulturen aus mindestens drei unterschiedlichen Passagen verwendet. Zur statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse wurde der Student's t-Test angewandt. Die p-Werte von  $< 0,05$  (\*),  $< 0,01$  (\*\*) und  $< 0,001$  (\*\*\*) wurden zur Anzeige von signifikanten Unterschieden verwendet.





### 3 ERGEBNISSE

Ziel dieser Arbeit war es, mit gut charakterisierten Stäuben in Submerskultur (Partikel werden als Suspension in Medium appliziert), die zellulären und molekularen Wirkmechanismen, die zur Auslösung inflammatorischer Prozesse führen, aufzuklären. Der Arachidonsäuremetabolismus, welchem eine zentrale Rolle im Entzündungsgeschehen zukommt, stand hierbei im Mittelpunkt der experimentellen Arbeiten. Es wurden *in vitro* sowohl mögliche Effekte auf die Regulierung der Freisetzung von Lipidmediatoren als auch Partikeleigenschaften, die dafür verantwortlich sind, analysiert. Schließlich wurden Experimente hinsichtlich des Arachidonsäuremetabolismus in einem Kokulturmodell, bestehend aus einer Makrophagen- und Epithelzelllinie, durchgeführt. Dieses Modell sollte die Möglichkeit bieten die untersuchten Effekte in einem realitätsnahen System zu verifizieren.

Als Modellstaub für potentielle Umweltstäube wurden Flugaschepartikel aus einer industriellen Hausmüllverbrennungsanlage verwendet, da diese Partikel als umweltrelevant einzustufen sind und deren genaue chemische Zusammensetzung am Institut für Technische Chemie, Abteilung Thermische Abfallbehandlung (ITC-TAB) des Forschungszentrums Karlsruhe eingehend untersucht worden ist.

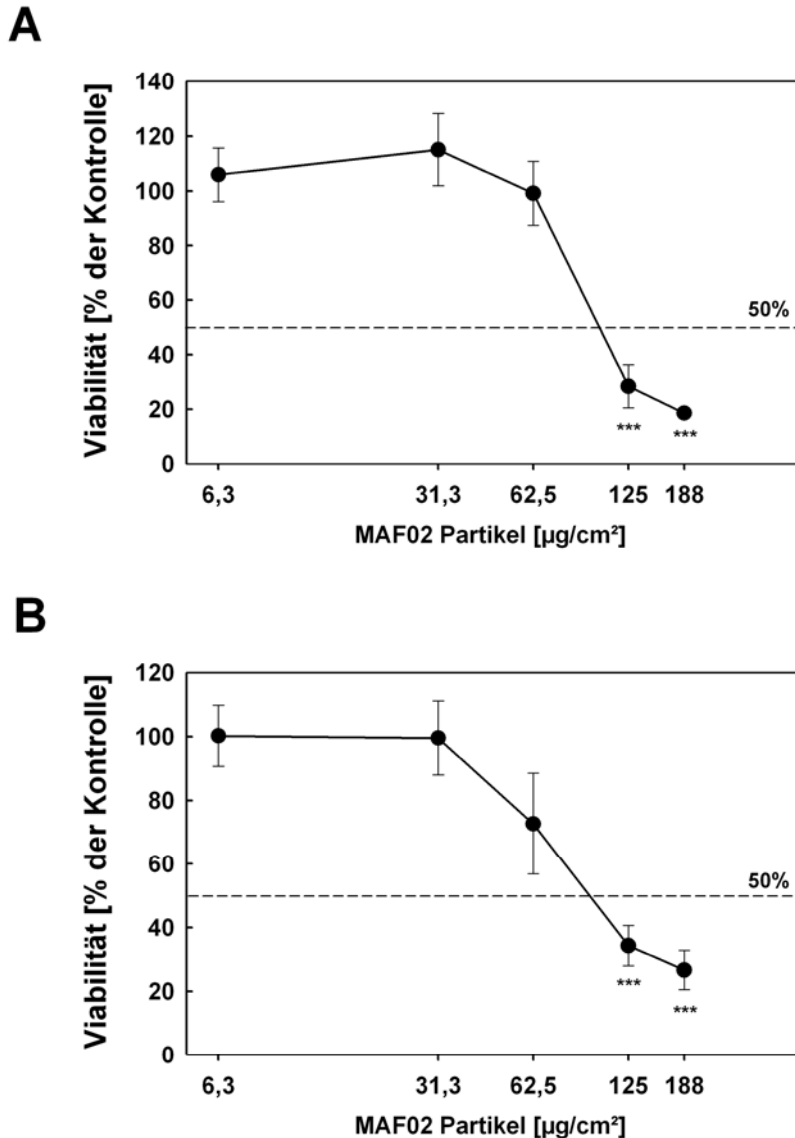
Im Rahmen der *in vitro* Experimente wurden Zellen eingesetzt, die Zielzellen der Lunge repräsentieren: Makrophagen und Epithelzellen. Als Modellsystem für Makrophagen wurde die etablierte, murine Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 ausgewählt, da diese zum einen charakteristische Merkmale von primären Makrophagen wie Migration sowie Phagozytose zeigt und zum anderen keine Substanzen zu deren Differenzierung verwendet werden müssen. Dies wäre für eine humane Makrophagen-Zelllinie nötig gewesen, die man zum Beispiel durch TPA-vermittelte Induktion der Differenzierung der myeloischen Zelllinie THP-1 erhalten könnte. Zelllinien bieten generell den Vorteil, dass sie im Gegensatz zu primären Zellen immortalisiert sind, in unbegrenzter Zahl zur Verfügung stehen und keine spenderabhängigen Varianzen aufweisen. Allerdings muss bei der Verwendung von Zelllinien stets beachtet werden, dass sie einen instabilen, aneuploiden Chromosomengehalt enthalten. In dieser Arbeit sollte die Eignung der RAW264.7 Makrophagen-Zelllinie als *in vitro* Modell zur Untersuchung von inflammatorischen Prozessen nach Partikelinkubation überprüft werden. Die biologischen Antworten der RAW264.7 Makrophagen auf Partikelexposition wurden im Vergleich zu humanen,

primären von Monozyten abstammenden Makrophagen (MDM) charakterisiert. Des Weiteren wurde für die Etablierung des Kokulturmodells die Lungenepithelzelllinie LA-4 eingesetzt und hinsichtlich der Freisetzung von Entzündungsmediatoren im Mono- und Kokultursystem getestet. Zu Beginn der Arbeit wurden aber allgemeine toxikologische Endpunkte, wie akute Zytotoxizität, betrachtet.

### **3.1 Akute Zytotoxizität**

Zur Untersuchung der akut zytotoxischen Wirkung von MAF02 Flugasche wurde der WST-Assay, der auf der Analyse der Funktionalität der mitochondrialen Dehydrogenase-Aktivität der Zellen basiert, angewandt. Hierfür wurden RAW264.7 Zellen, aber auch primäre, von humanen Monozyten abstammende Makrophagen (MDM) für 24 Stunden mit unterschiedlichen Dosen der Flugaschepartikel behandelt (Abb. 23). Das Ergebnis zeigt, dass die mitochondriale Aktivität der RAW264.7 Zellen mit steigenden Partikelkonzentrationen dosisabhängig beeinträchtigt wurde. Nach einer 24-stündigen Inkubation mit MAF02 in Konzentrationen von 6,3 bis 62,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (10-100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) war keine akute Toxizität nachzuweisen, während die Vitalität bei höheren Dosen der Flugasche (125-188  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 200-300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) dramatisch von 99% auf 18% sank. Beim Vergleich der hier gewonnenen Daten zeigten die humanen Makrophagen eine ähnliche Empfindlichkeit für Flugaschepartikel. Die Behandlung mit MAF02 Partikeln demonstrierte ebenfalls eine deutliche Dosis-Wirkungsbeziehung, die in ihrer Intensität mit der der getesteten Makrophagen-Zelllinie vergleichbar war. Die niedrigsten, eingesetzten Konzentrationen von 6,3 und 31,3  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  MAF02 (10 und 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) bewirkten im Behandlungszeitraum von 24 Stunden keinen Vitalitätsverlust, während der Einsatz höherer Konzentrationen von 62,5 bis 188  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (100-300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) zu einer starken Abnahme der Vitalität auf 26% bei der höchsten getesteten Konzentration führte.

Da akute toxische Effekte bei Partikelkonzentrationen ab 62,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  induziert werden, wurden zur weiteren Untersuchung der inflammatorischen Prozesse und deren Regulation niedrigere, nicht-zytotoxische Partikelkonzentrationen eingesetzt.



**Abb. 23: Effekt von MAF02 Flugasche auf die Viabilität von Makrophagen**

Bestimmung der Viabilität von RAW264.7 Zellen (A) sowie von primären Monozyten abstammenden Makrophagen (B) mit Hilfe des WST-1 Tests nach einer 24-stündigen Inkubation mit MAF02 Partikeln (6,3, 31,3, 62,5, 125, 188  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  bzw. 10, 50, 100, 200, 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Die angegebenen Werte sind auf die Vitalität der unbehandelten Kontrollzellen bezogen und stellen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SEM dar. (\*\*\*)  $p < 0,001$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle)

### 3.2 Oxidativer Stress

Im Organismus kommt es fortlaufend zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), beispielsweise bei der Elektronentransportkette in den Mitochondrien, aber auch während der zellulären Immunantwort. Normalerweise wird die Bildung der ROS durch anti-oxidative Prozesse, zu welchen u. a. die Änderung des zellulären Glutathiongehalts sowie die induzierte Expression der Hämoxigenase-1 (HO-1)

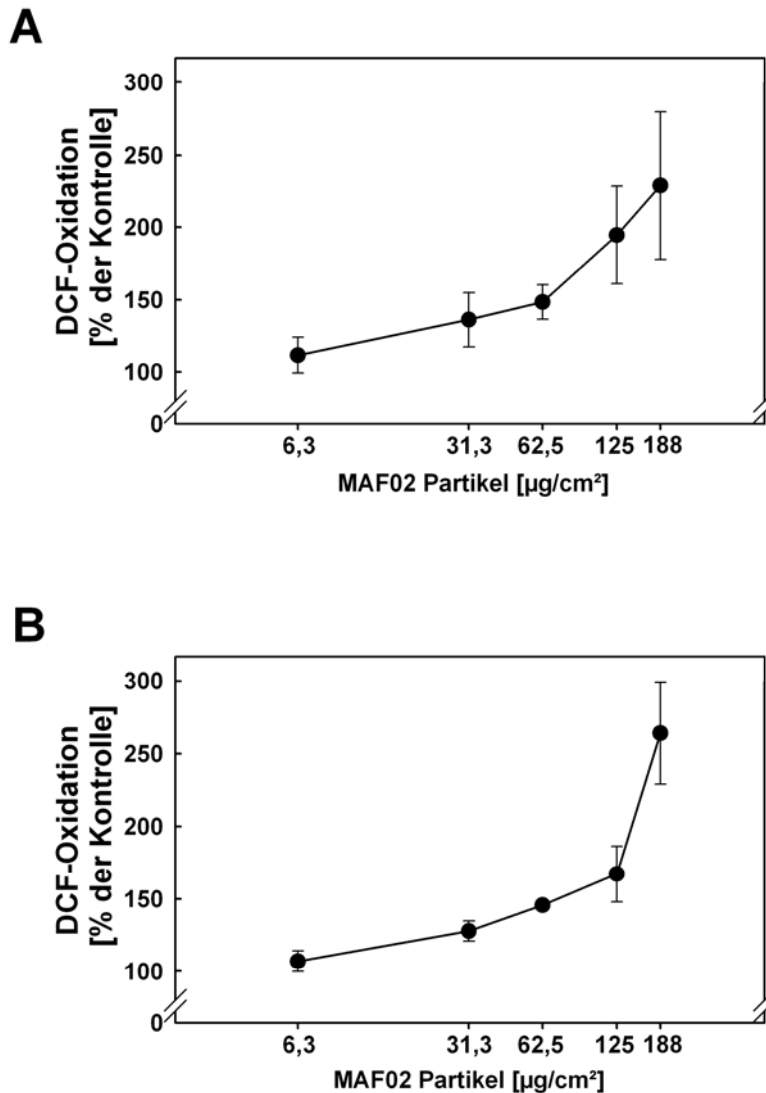
zählt, im Gleichgewicht gehalten. Kommt es zu einer Imbalanz zwischen der Generation von ROS und der Fähigkeit diese zu neutralisieren und zu eliminieren entsteht oxidativer Stress, welcher zellschädigende Effekte wie Entzündungsreaktionen, DNA-Schädigungen und Zelltod auslöst. In diesem Kontext demonstriert eine stetig wachsende Anzahl von Daten, dass eine erhöhte Freisetzung von ROS für die partikelabhängige Induktion von inflammatorischen Prozessen verantwortlich sein kann. Es wird hierbei gezeigt, dass ROS an der verstärkten Freisetzung von Calcium beteiligt, oder auch direkt an Aktivitätsänderungen von Signalproteinen involviert sind.

### **3.2.1 MAF02 bewirkt die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies**

Zum Nachweis von intrazellulärem oxidativen Stress im Anschluss an eine MAF02 Behandlung von Makrophagen wurde der DCF-Assay durchgeführt. Hierfür wurden zuvor die Makrophagen 40 min mit H<sub>2</sub>DCF-DA (2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat) beladen. Dieser unpolare Fluoreszenz-Indikator passiert die Zellmembranen. Im Zytoplasma wird daraufhin die Acetatgruppe durch intrazelluläre Esterasen hydrolysiert, wodurch das geladene H<sub>2</sub>DCF (Dichlorodihydrofluorescein) nicht mehr aus der Zelle austreten kann. Kommt es nun intrazellulär zur Bildung von ROS, wird das H<sub>2</sub>DCF zum DCF-Fluorochrom (Dichlorofluorescein) oxidiert, welches nach Anregung mit 480 nm Fluoreszenzlicht bei 530 nm emittiert, das am Fluoreszenzmessgerät analysiert werden kann. Die Reaktion von DCF ist nicht spezifisch für bestimmte ROS und liefert Fluoreszenzantworten auf die Reaktion z.B. mit Peroxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, <sup>•</sup>OH, <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup> oder ONOO<sup>-</sup>.

Die Ergebnisse der Bestimmung von intrazellulären ROS in RAW264.7 Zellen sowie in primären MDM sind in Abb. 24 aufgeführt. Die Fluoreszenzmessung der unbehandelten Kontrollen wurden auf 100% gesetzt und die Ergebnisse der behandelten Proben als Vielfaches der Kontrolle dargestellt. Nach der dreistündigen MAF02 Behandlung der RAW264.7 Makrophagen konnte eine dosisabhängige Fluoreszenzerhöhung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen detektiert werden. Während geringere Dosen von MAF02 Partikeln von 6,3 bis 31,3 µg/cm<sup>2</sup> zu einer leichten Freisetzung von ROS führten, kam es ab einer Dosis von 62,5 µg/cm<sup>2</sup> zu einer deutlichen partikel-bedingten Generation der ROS bis zum 2,3-fachem der Kontrolle bei der höchsten getesteten Konzentration. Die primären MDM wiesen eine

vergleichbare, dosisabhängige Zunahme der ROS auf. Die dreistündige Behandlung der Zellen mit MAF02 Partikeln ( $6,3 - 62,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) bewirkte ebenfalls einen leichten Anstieg der Fluoreszenzintensität, welche nach der Behandlung mit MAF02 mit  $188 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  MAF02 um das zweieinhalbfache der Kontrolle anstieg.



**Abb. 24: Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in RAW264.7 und primären Makrophagen nach MAF02 Inkubation**

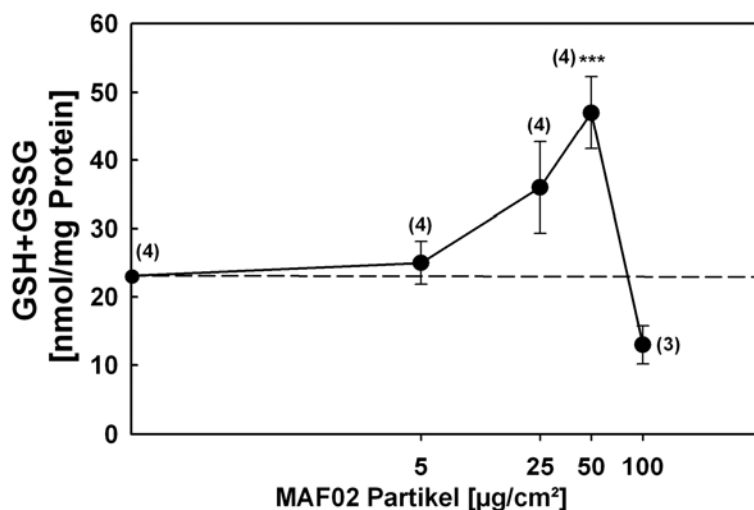
Zur Messung der Freisetzung von ROS wurden die Zellen mit  $50 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  beladen. Nach einer anschließenden dreistündigen Inkubation der RAW264.7 Zellen (A) sowie der primären MDM (B) mit Flugaschepartikeln ( $6,3, 31,3, 62,5, 125, 188 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  bzw.  $10, 50, 100, 200, 300 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) wurde die Umwandlung des  $\text{H}_2\text{DCF}$  zum fluoreszierenden DCF bei  $530 \text{ nm}$  am Fluoreszenzmessgerät ermittelt. Die Werte sind relativ zur unbehandelten Kontrolle dargestellt und sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SEM.

### 3.3 Antioxidative Zellantwort

#### 3.3.1 Flugaschepartikel erhöhen den intrazellulären Glutathiongehalt

ROS sind in der Lage mit einer Vielzahl von Zellbestandteilen zu reagieren, was zu schweren Zellschädigungen bis hin zum Zelltod führt. Um der schädigenden Wirkung von ROS entgegenzuwirken, besitzt die Zelle antioxidative Schutzmechanismen. Glutathion, ein Tripeptid aus L- $\gamma$ -Glutamyl-L-Cysteinyl-Glycin, spielt eine zentrale Rolle in der zellulären Abwehr gegen ROS. Glutathion liegt in einer reduzierten (GSH) und oxidierten Form (GSSG) vor, wobei nur GSH antioxidativ wirkt. Bei oxidativer Belastung oxidiert GSH zum Glutathiondisulfid (GSSG), welches NADPH-abhängig durch die Glutathionreduktase regeneriert wird.

Nachdem zuvor gezeigt wurde, dass MAF02 Partikel intrazellulär ROS generieren, wurde im nächsten Schritt überprüft, ob antioxidative Prozesse nach Flugaschebehandlung beobachtet werden können. Hierfür wurde der Gehalt an zellulärem GSH/GSSG in RAW264.7 Makrophagen nach MAF02 Exposition gemessen (Abb. 25).



**Abb. 25: Erhöhung des intrazellulären Glutathiongehalts nach MAF02 Inkubation**

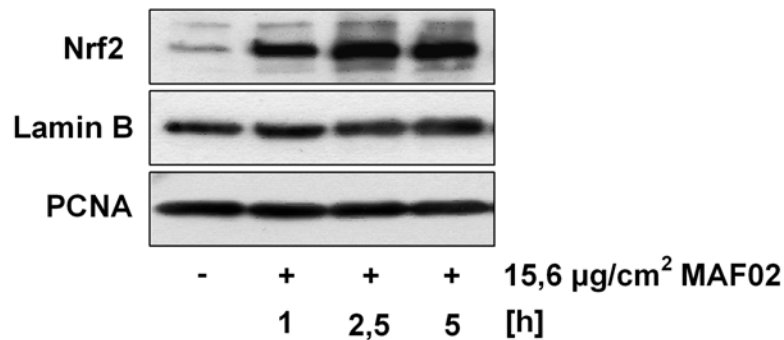
Die RAW264.7 Maus-Makrophagen-Zelllinie wurde unbehandelt belassen (-) oder mit 5, 25, 50 oder 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Flugaschepartikel (10, 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) für 20 Stunden behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen lysiert, die Proteine präzipitiert und der Überstand für die Bestimmung der intrazellulären Konzentration von GSH + GSSG eingesetzt. Die Ergebnisse wurden auf die Proteinmenge normiert und werden als Mittelwerte aus drei bzw. vier voneinander unabhängigen Versuchen  $\pm$  SEM dargestellt (\*\*\*)  $p < 0,001$  im Vergleich zur Kontrolle).

Nach der Behandlung der Makrophagen konnte mit subtoxischen Konzentrationen der Flugasche eine dosisabhängige Zunahme des zellulären Glutathion-Gehalts beobachtet werden. Im Kontrast dazu führten Flugasche Konzentrationen im akut-toxischen Bereich ( $> 62,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) zu einer drastischen Reduktion der zellulären GSH-GSSG-Konzentration.

### **3.3.2 MAF02 Behandlung bewirkt eine Akkumulation des Transkriptionsfaktors Nrf2**

Der Transkriptionsfaktor Nrf2 reguliert die Transkription von *antioxidant response element-* (ARE-) regulierten antioxidativen Enzymen und wirkt auf diesem Wege indirekt zellprotektiv. Unter normalen physiologischen Bedingungen wird Nrf2 über Keap1 der ubiquitinabhängigen Degradation zugeführt. Bei Zellen, die unter oxidativem Stress stehen, wird Nrf2 von Keap1 befreit und stabilisiert. Anschließend transloziert Nrf2 in den Kern und induziert die Expression ARE-abhängiger Gene, wie beispielsweise die *ho-1*. So ist zellulärer oxidativer Stress durch eine Stabilisierung und Akkumulation von Nrf2 gekennzeichnet. Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob die Behandlung mit MAF02 Partikeln zu einer Akkumulation von Nrf2 in RAW264.7 Makrophagen führt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit  $15,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  MAF02 Partikeln für eine, zweieinhalb und fünf Stunden exponiert und im Anschluss zur Präparation von Gesamtzelllysaten geerntet. Die Analyse von Nrf2 erfolgte daraufhin im Western Blot.

Das Ergebnis ist in Abb. 26 dargestellt. Diese Versuchsreihe zeigte, dass die Proteinmenge von Nrf2 in RAW264.7 Makrophagen in einer zeitabhängigen Art und Weise während der Partikelexposition zunimmt. In Zelllysaten unbehandelter Kontrollzellen konnten nur Spuren von Nrf2 detektiert werden, was auf dessen schnelle Degradation zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu war nach einer Stunde Exposition mit MAF02 Nrf2 deutlich nachweisbar. Der Transkriptionsfaktor wurde nicht abgebaut und konnte in den Zellen akkumulieren. Nach einer zweieinhalbstündigen Behandlung stieg die Menge an Nrf2 weiterhin an und erreichte nach fünf Stunden eine Plateauphase. Das Immunsignal von Lamin B demonstrierte, dass in jedem Probenansatz identische Mengen an Kernprotein vorhanden waren.



**Abb. 26: Zeitabhängige Akkumulation des Transkriptionsfaktors Nrf2 in Makrophagen nach Behandlung mit MAF02 Partikeln**

RAW264.7 Zellen wurden unbehandelt belassen (-) oder mit  $15,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  Flugaschepartikel ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) für 1, 2,5 oder 5 Stunden inkubiert, daraufhin geerntet und lysiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung des Gesamtlisats durch SDS-PAGE erfolgte die Detektion von Nrf2 mit Hilfe von Nrf2 Antiserum im Western Blot. Zur Kontrolle, ob in jeder Spur identische Mengen an Kernprotein aufgetragen worden sind, wurde die Western Blot Membran des Weiteren mit Antikörpern gegen Lamin B analysiert. Die Detektion von PCNA fungierte als weitere Ladekontrolle.

### 3.3.3 MAF02 induziert die Expression der Hämoxxygenase-1

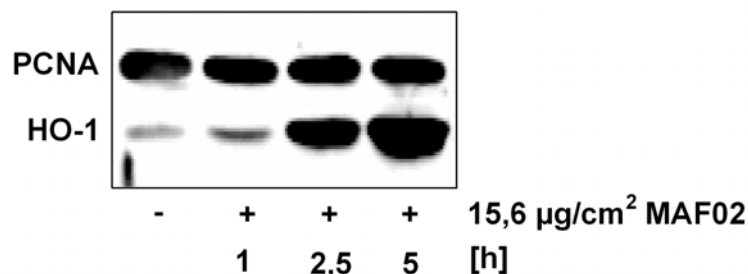
Wie bereits in Kapitel 1.5.2 erwähnt ist die induzierbare Hämoxxygenase-1 (HO-1) in zelluläre, antioxidative Prozesse involviert und entfaltet sowohl *in vitro* als auch *in vivo* protektive Wirkungen. Eine Reihe von Studien in verschiedenen Zelltypen belegte eine Abhängigkeit der HO-1 Induktion von der Aktivierung des Nrf2 (Alam *et al.* 1999; Li *et al.* 2004). So stellte sich beispielsweise in embryonalen Mausfibroblasten (MEF) sowie in Maus-Hepatoma Zellen die durch Cadmium-induzierte Transkription des HO-1 Gens als Nrf2-abhängig heraus (He *et al.* 2008; Stewart *et al.* 2003).

Da in vorangegangenen Experimenten gezeigt werden konnte, dass während der Partikelbehandlung einerseits ROS generiert werden und andererseits Nrf2 in den Zellen akkumuliert, sollte der Frage nachgegangen werden, ob Flugaschepartikel eine vermehrte Proteinsynthese der HO-1 in RAW264.7 Zellen bewirken. Dazu wurden die Makrophagen mit  $15,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  Flugasche im angegebenen Zeitraum inkubiert und anschließend einer Western-Blot-Analyse unterzogen (Abb. 27).

In der unbehandelten Kontrolle waren nur Spuren von HO-1 nachweisbar. Nach der einstündigen Inkubation mit MAF02 Partikeln wurde eine schwache Induktion der HO-1 Proteinexpression detektiert. Eine signifikante Stimulation durch MAF02 konnte aber erst nach zweieinhalb Stunden beobachtet werden. Im betrachteten Zeitraum



erreichte die HO-1-Induktion ihr Maximum nach 5 Stunden. In Anbetracht dessen, dass Nrf2 schon nach einer Stunde detektierbar war und die Akkumulation von Nrf2 zeitlich vor der Induktion der HO-1 Expression einzuordnen ist, könnte der Transkriptionsfaktor Nrf2 bei der partikel-induzierten HO-1 Induktion involviert sein.

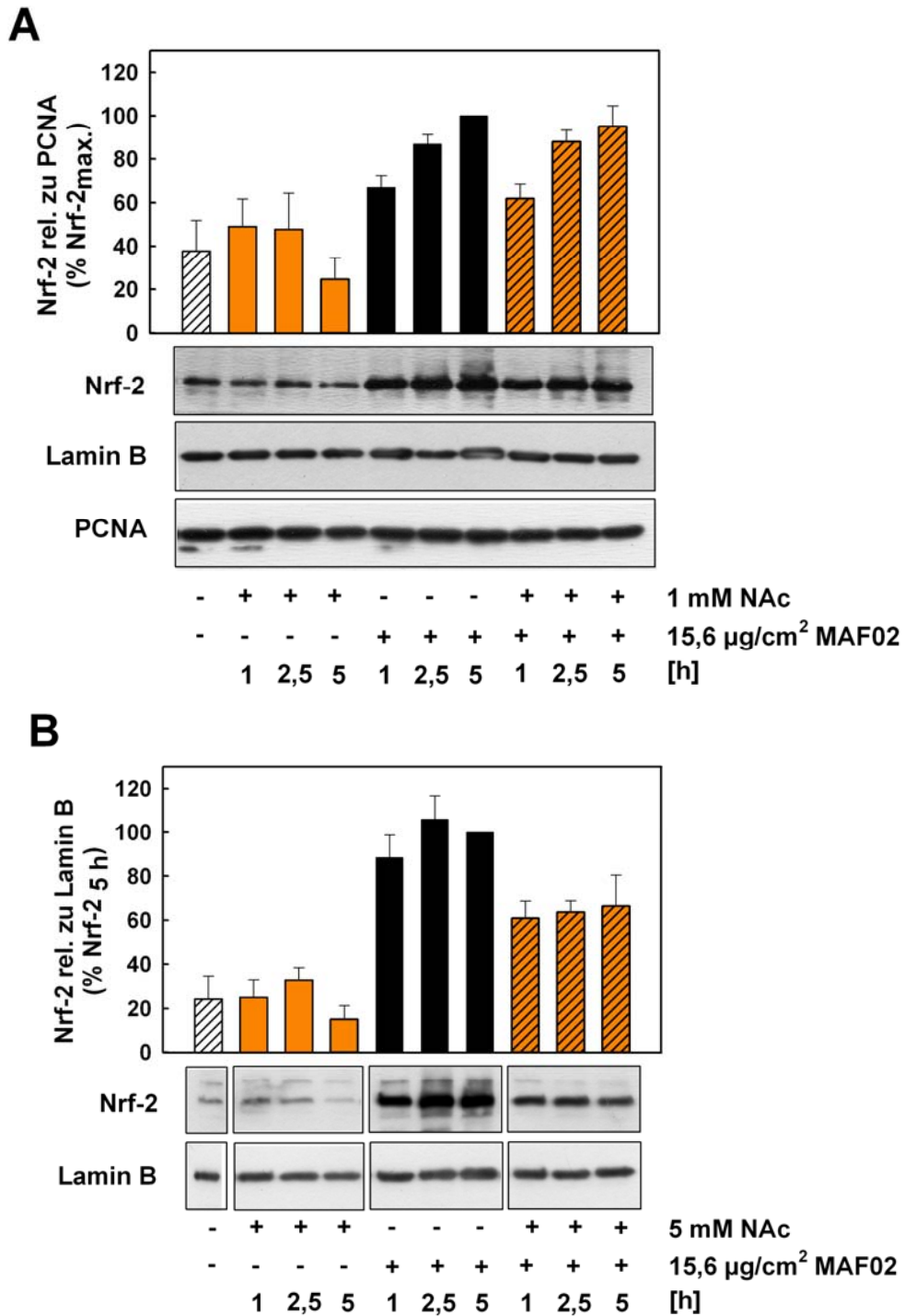


**Abb. 27: Effekt von MAF02 Partikeln auf die Expression des HO-1 Proteins in RAW264.7 Makrophagen**

Die RAW264.7 Maus-Makrophagen-Zelllinie wurde unbehandelt belassen (-) oder mit  $15,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  Flugaschepartikel ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) für 1, 2,5 oder 5 Stunden behandelt, daraufhin geerntet und lysiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung im SDS-PAGE wurden die Ganzzelllysate im Western Blot auf die Induktion des HO-1 Proteins hin untersucht. Als Ladekontrolle erfolgte die Detektion von PCNA.

### 3.3.4 Zusammenhang zwischen der Induktion der Hämooxygenase-1 und der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies

Nachdem gezeigt werden konnte, dass MAF02 die Akkumulation von Nrf2 induziert, lag es nahe zu untersuchen, ob die Akkumulation von Nrf2 in RAW264.7 Zellen durch die Vorbehandlung mit dem Antioxidanz N-Acetylcystein (NAC) verhindert werden kann. Hierzu wurden die Gesamtzelllysate von MAF02 behandelten Zellen abermals mit Hilfe von Nrf2 Antiserum im Western Blot Verfahren getestet (Abb. 28). Die Diagramme zeigen jeweils die densitometrische Auswertung der Western Blots sowie die Variation der verschiedenen Versuche. In Experimenten mit 1 mM NAC war keine verminderte Anreicherung von Nrf2 nach MAF02 Exposition nachweisbar. Dagegen konnte bei einer Konzentration von 5 mM NAC eine teilweise Hemmung des akkumulierten Nrf2 im Vergleich zu Zellen, die ausschließlich mit  $15,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  Partikel behandelt wurden, detektiert werden. Die Inkubation der Zellen mit 1 mM bzw. 5 mM NAC allein führte weder zu einem Anstieg noch zu einer Verminderung der Menge an stabilisiertem Nrf2.

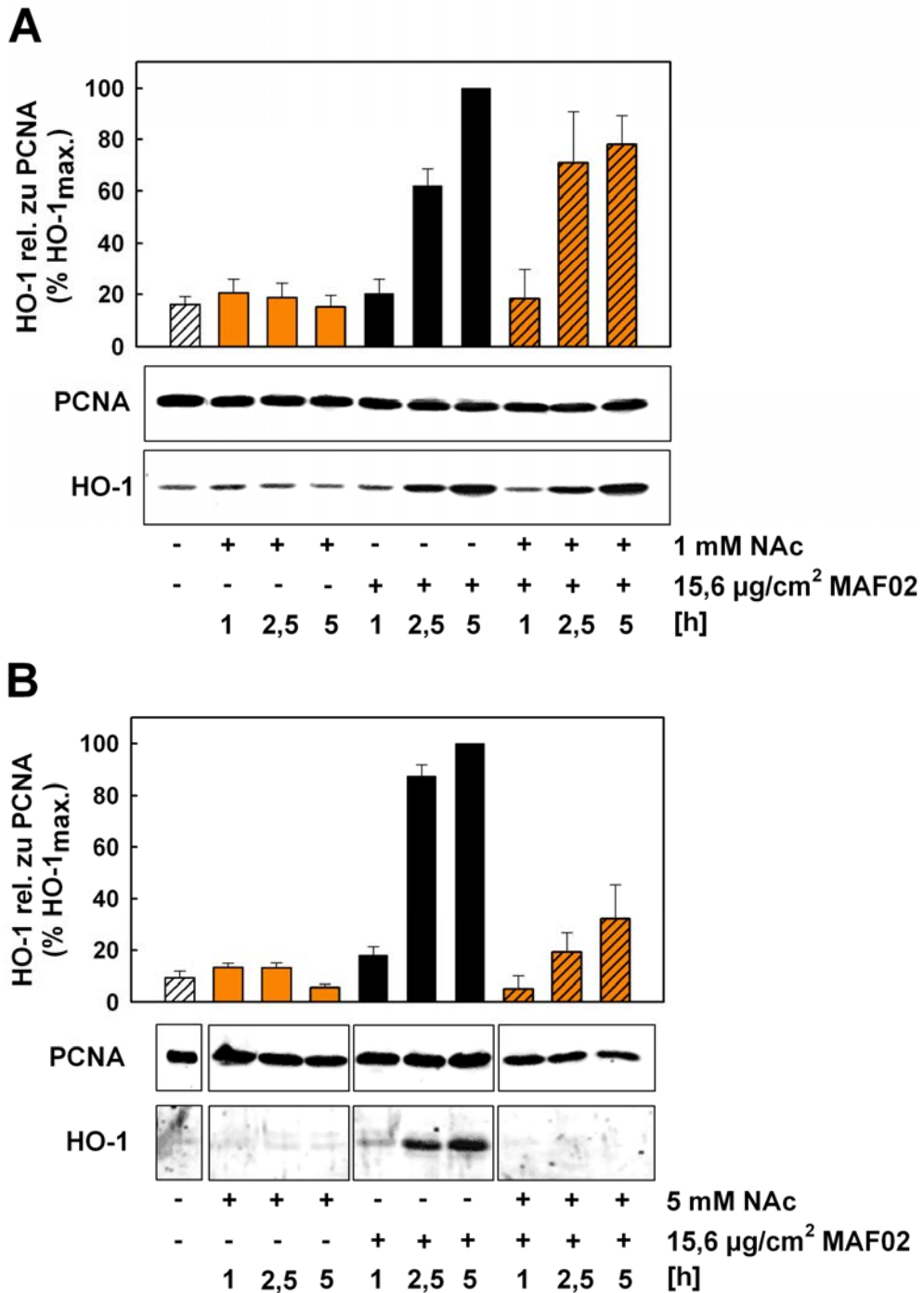


**Abb. 28: Das Antioxidanz N-Acetylcystein (NAc) reduziert die MAF02-bedingte Akkumulation des Transkriptionsfaktors Nrf2**

RAW264.7 Zellen wurden für 30 min entweder in normalem Kulturmedium (-) oder in 1 mM NAc-haltigem Medium (A) sowie in 5 mM NAc-haltigem Medium (B) vorinkubiert. Daraufhin wurden die Zellen unbehandelt belassen oder für 1, 2,5 oder 5 Stunden mit 15,6 µg/cm<sup>2</sup> MAF02 Partikeln (50 µg/ml) behandelt. Nach erfolgter Ernte und Lyse der Zellen wurden die Zelllysate im SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe von Nrf2 Antiserum im Western Blot untersucht. Als Ladekontrolle diente die Detektion des Kernproteins Lamin B. Die Detektion von PCNA diente als weitere Ladekontrolle. Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot dreier, unabhängiger Versuche. Das Diagramm zeigt die optischen Dichten der Nrf2-Banden in Relation zu den zugehörigen PCNA- (A) oder Lamin B-Banden (B) als Mittelwerte ± SEM normiert auf die maximale Nrf2-Akkumulation (A) oder auf die Nrf2-Akkumulation nach einer 5-stündigen MAF02 Behandlung (B).

In der Literatur haben mehrere Arbeitsgruppen eine Nrf2-abhängige Induktion der HO-1 beschrieben. Wie zuvor beschrieben, konnte in dieser Arbeit sowohl eine Stabilisierung des Nrf2 Transkriptionsfaktors als auch eine Induktion der HO-1 durch MAF02 Behandlung bewiesen werden. Die Akkumulation von Nrf2 wurde durch den Einsatz von NAc nur geringfügig vermindert. In diesem Kontext wäre nun zu erwarten, dass die MAF02-bedingte HO-1 Induktion durch die Verwendung von NAc in gleicher Weise reduziert wird.

Die Ergebnisse zum Einfluss von 1 mM und 5 mM NAc sind in Abb. 29 dargestellt. In der ersten Spur wurden Lysate unbehandelter Zellen aufgetragen. Daher wurde hier, erwartungsgemäß, kein bzw. nur Spuren von HO-1 Protein detektiert. Im Gegensatz dazu konnte in Lysaten aus Zellen, die mit MAF02 Partikeln behandelt wurden, eine zeitabhängige Induktion der HO-1 nachgewiesen werden. Die MAF02-induzierte Expression blieb durch die Vorbehandlung der Zellen mit 1 mM NAC unbeeinflusst. Der Einsatz von 5 mM NAc führte hingegen zu einer fast vollständigen Inhibierung der HO-1 Induktion. In Zellen, die nur mit NAc behandelt wurden, war die Induktion der HO-1 unverändert gegenüber derjenigen der Kontrollzellen. Durch dieses Resultat ist nicht direkt ersichtlich ist, ob Nrf2 an der Regulation der HO-1 Transkription beteiligt.



**Abb. 29: Das Antioxidanz N-Acetylcystein (NAc) reduziert die MAF02-bedingte Induktion der Hämoxygenase-1 (HO-1)**

RAW264.7 Zellen wurden für 30 min entweder in normalem Kulturmedium (-) oder in 1 mM NAc-haltigem (A) sowie in 5 mM NAc-haltigem Kulturmedium (B) vorinkubiert. Daraufhin wurden die Zellen unbehandelt belassen oder für 1, 2,5 oder 5 Stunden mit 15,6 µg/cm<sup>2</sup> MAF02 Partikeln (50 µg/ml) behandelt. Nach erfolgter Ernte und Lyse der Zellen wurden die Zelllysate im SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe von HO-1 Antikörpern im Western Blot untersucht. Als Ladekontrolle diente die Detektion von PCNA. Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot dreier, voneinander unabhängiger Versuche. Das Diagramm zeigt die optischen Dichten der HO-1-Banden in Relation zu den zugehörigen PCNA-Banden als Mittelwerte ± SEM und normiert auf die maximale HO-1 Induktion.

### **3.4 Arachidonsäurefreisetzung**

#### **3.4.1 Flugstaubpartikel bewirken die Freisetzung von Arachidonsäure aus Membranphospholipiden**

Die Arachidonsäure (5,8,11,14-Eicosatetraencarbonsäure) stellt den wichtigsten Vorläufer der Eicosanoide, welche wichtige Funktionen bei inflammatorischen Prozessen übernehmen, dar. Sie wird, wie andere Fettsäuren, in Phospholipide von Membranen eingebaut. Die Freisetzung der Arachidonsäure (AA) erfolgt über die Aktivierung der Phospholipase A<sub>2</sub>, die spezifisch die mittlere Esterbindung der Membranphospholipide spaltet. Der Gehalt an freier, im Zytosol vorliegender AA ist sehr gering und unterliegt einer strengen Regulation, wobei der Deacylierungs-Reacylierungszyklus, der sog. Lands-Zyklus, bei der Regulierung der Menge an freier Fettsäure eine wichtige Rolle übernimmt. Denn schon geringste Dysregulationen können pathophysiologische Wirkungen initiieren. Es ist bekannt, dass Fehlsteuerungen entscheidend zur Entstehung von chronischen Entzündungen, Lungenerkrankungen und Krebs beitragen. Ziel dieser Arbeit war es, mit gut charakterisierten Flugstaubpartikeln in Zellkulturen, die zellulären Wirkmechanismen, die zur Auslösung von Entzündungsprozessen führen, zu untersuchen. Die Regulation des Arachidonsäuremetabolismus, als wichtiger Bestandteil der inflammatorischen Antwort, stand dabei im Fokus der experimentellen Arbeiten. Aus diesem Grund stellte sich zunächst die Frage, ob MAF02 Partikel sowie Referenzpartikel die Freisetzung der Arachidonsäure in Makrophagen beeinflussen. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden zwei verschiedene Zellsysteme herangezogen. Neben der bereits gut charakterisierten RAW264.7 Maus-Makrophagen-Zelllinie wurden primäre, menschliche, aus Monozyten abstammende Makrophagen eingesetzt. Nach Aussaat der Makrophagen in Kulturschalen wurden die Makrophagen über 24 Stunden mit <sup>14</sup>C-Arachidonsäure inkubiert. Die Zellen nahmen in diesem Zeitraum die radioaktiv-markierte Fettsäure auf und inkorporierten diese in Membranphospholipide. Um einen kompletten Einbau der AA zu gewährleisten, wurde danach das Markierungsmedium entfernt, durch frisches Medium ersetzt und die Zellen erneut für 24 Stunden inkubiert. Daraufhin wurden die Makrophagen mit verschiedenen Dosen der Partikel unterschiedlich lange im Brutschrank behandelt. Durch die anschließende Extraktion der zellulären Lipide (Lands 1979), ihrer dünnschichtchromatographischen Auftrennung und der darauf

folgenden Autoradiographie, konnte anhand vorhandener Standards die freie, nicht acylierte AA bestimmt werden (Abb. 30). Anschließend wurde die Intensität der jeweiligen Banden der Autoradiographie mit der entsprechenden *Software* bestimmt und in Bezug auf die unbehandelten Kontrollzellen dargestellt. Im linken Teil der folgenden Abbildungen wird jeweils die semi-quantitative Auswertung aller durchgeführten Versuche dargestellt, rechts daneben wird die Autoradiographie einer dünnenschichtchromatographischen Auftrennung der zellulären Lipide nach entsprechender Behandlung exemplarisch abgebildet.

Die Behandlung mit MAF02 führte in RAW264.7 Zellen zu einer zeit- und dosisabhängigen Freisetzung der Arachidonsäure. Im Zeitraum von einer Stunde konnte keine Mobilisierung der AA beobachtet werden. Wurden die Zellen mit einer Dosis von  $6,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  für zweieinhalb Stunden behandelt, so war eine zweifache Anreicherung freier Arachidonsäure detektierbar. Die nächsthöhere Dosis von  $13,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  bewirkte nach zweieinhalb Stunden MAF02 Behandlung eine sechsfach erhöhte, signifikante Arachidonsäurefreisetzung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen. Dieser Effekt ging bis zur fünf Stunden Exposition in ein Plateau über. Im Gegensatz dazu war in primären, humanen Makrophagen weder nach einer einstündigen noch nach einer zweieinhalbstündigen MAF02 Behandlung mit einer Dosis von  $13,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  freie Arachidonsäure nachweisbar. Erst nach fünf Stunden Inkubation der Zellen mit einer Dosis von  $13,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  MAF02 Partikeln konnte eine Verdopplung der freien Arachidonsäure in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle nachgewiesen werden.

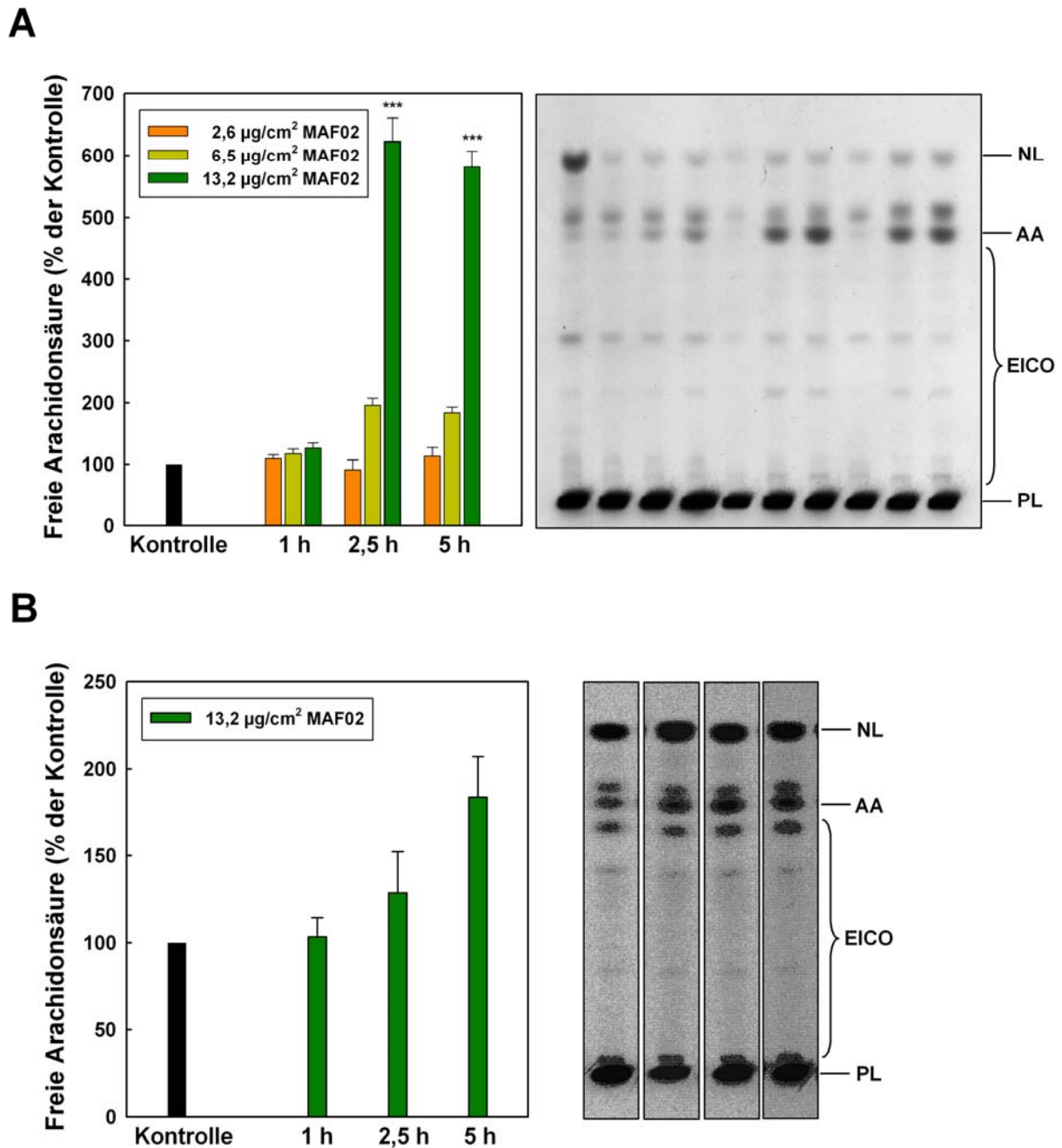


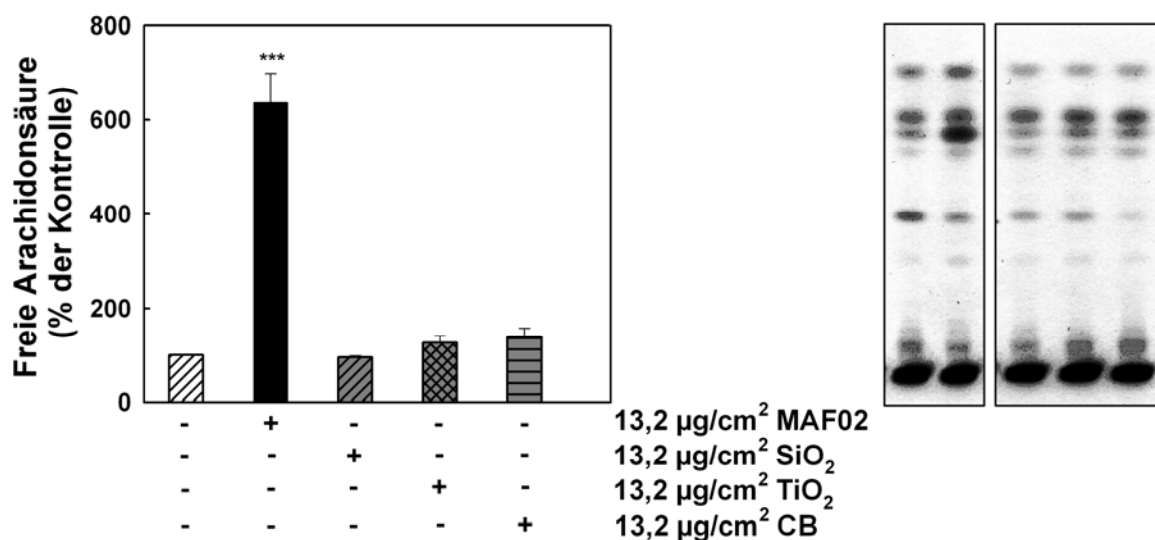
Abb.

### 30: Dosis- und zeitabhängige Freisetzung von Arachidonsäure aus zellulären Lipiden nach Behandlung von Makrophagen mit MAF02 Partikeln

<sup>14</sup>C-Arachidonsäure markierte RAW264.7 Makrophagen wurden für 1, 2,5 und 5 Stunden mit 2,6, 6,5 und 13,2 µg/cm<sup>2</sup> Flugaschepartikeln (10, 25 und 50 µg/ml) behandelt (A). Außerdem wurden radioaktiv-markierte, primäre von Monozyten abstammende Makrophagen (MDM) für 1, 2,5, und 5 Stunden mit 13,2 µg/cm<sup>2</sup> Flugaschepartikel (50 µg/ml) inkubiert. Nach der Extraktion der zellulären Lipide wurden diese dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und mittels Autoradiographie visualisiert. Dargestellt sind Autoradiographien der zellulären Lipide (rechts). Die Intensitäten der Banden der freien Arachidonsäure wurden mit Hilfe der *Odyssey*<sup>®</sup> bzw. *OptiQuant Acquisition and Analysis Software* ermittelt und in Relation zur unbehandelten Kontrolle als Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten dargestellt (links) (\*\*\*) p < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle). Die Anordnung der DC-Proben entspricht der im Diagramm. Abkürzungen: NL, Neutrallipide; AA, freie Arachidonsäure; EICO, Eicosanoide; PL, Phospholipide.

Neben Flugstaub wurden im nächsten Schritt verschiedene Partikelsorten, die von einer Vielzahl von Arbeitsgruppen auf ihre pathogene Wirkungsweise hin untersucht wurden, als Vergleich eingesetzt. Zum einen wurde kristallines Quarz (DQ12, aerodynamischer Durchmesser  $< 5 \mu\text{m}$ ), welches in Mineralien und Steinen enthalten ist und als Auslöser von fibrotischen Lungenerkrankungen wie Silikose gilt, verwendet. Desweiteren kam Titandioxid ( $\text{TiO}_2$ , aerodynamischer Durchmesser 21 nm), das als synthetischer Nanopartikel in Sonnencremes zur UV-Absorption zu finden ist, und ultrafeines *Carbon Black* (CB, aerodynamischer Durchmesser 14 nm), ein industriell synthetisiertes, schwarzes Farbpigment im nanoskaligen Bereich, welches in Lacken sowie Druckerfarben verwendet wird, zum Einsatz.

Die Ergebnisse der Behandlung von RAW264.7 Zellen mit Modellpartikeln überraschten, denn eine zweieinhalbstündige Inkubation mit  $13,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  Quarz, Titandioxid sowie *Carbon Black* konnte in keinem Fall eine Mobilisation der Arachidonsäure induzieren (Abb. 31). Da die Makrophagen dagegen eine Mobilisation der Arachidonsäure nach der Inkubation mit MAF02 Partikeln zeigten, wurden die Referenzpartikel zur Untersuchung der Regulation des Arachidonsäuremetabolismus im weiteren Verlauf der Arbeit nicht eingesetzt, die Untersuchungen erfolgten mit den umweltrelevanten MAF02 Partikeln.



**Abb. 31: Quarz, Titandioxid und *Carbon Black* induzieren keine Änderung der Arachidonsäurefreisetzung in RAW264.7 Makrophagen**

$^{14}\text{C}$ -AA markierte Makrophagen wurden für 2,5 Stunden mit  $13,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  Quarz ( $\text{SiO}_2$ ), Titandioxid ( $\text{TiO}_2$ ) und *Carbon Black* (CB) Partikeln ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) exponiert. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet, die Lipide extrahiert und chromatographisch aufgetrennt. Die Visualisierung erfolgte mit Hilfe der Autoradiographie. Dargestellt wird eine repräsentative Dünnschichtchromatographie von vier bis sechs, unabhängigen Versuche (rechts) sowie die Mittelwerte  $\pm$  SEM der Bandenintensitäten der AA in Relation zur unbehandelten Kontrolle (links). Die Anordnung der DC-Proben entspricht der im Diagramm.



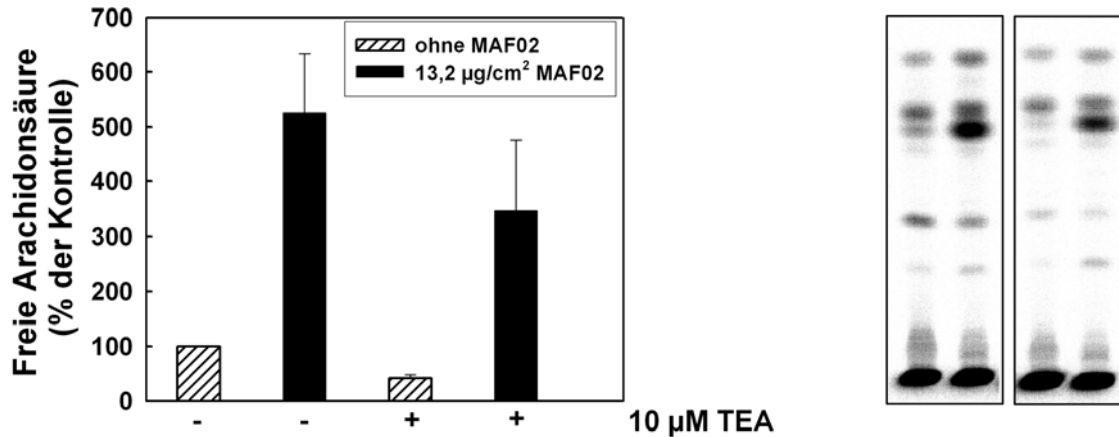
### 3.4.2 Regulation der Arachidonsäurefreisetzung

Um die Regulation der Arachidonsäurefreisetzung nach Partikelinkubation zu untersuchen, wurden zunächst Versuche mit verschiedenen Inhibitoren und Substanzen durchgeführt, die bestimmte Prozesse der Signaltransduktion der Arachidonsäurekaskade beeinflussen.

#### 3.4.2.1 Untersuchungen zur Beteiligung von Phospholipasen A<sub>2</sub> an der partikel-induzierten Mobilisation der Arachidonsäure

Da bereits in den vorangegangenen Experimenten eine partikel-induzierte Freisetzung der Arachidonsäure demonstriert werden konnte, galt es nun herauszufinden, welche der Phospholipasen (PLA<sub>2</sub>) in diesem Zusammenhang von Bedeutung sind (s. Kapitel 1.4.1.1). Die Superfamilie der Phospholipasen A<sub>2</sub> wird in die Gruppen der sekretorischen, zytosolischen und Ca<sup>2+</sup>-unabhängigen PLA<sub>2</sub> unterteilt. Um den Einfluss dieser PLA<sub>2</sub> auf die MAF02-induzierte AA-Freisetzung zu analysieren, wurden spezifische Inhibitoren der unterschiedlichen PLA<sub>2</sub> eingesetzt. Hierzu wurden die RAW264.7 Makrophagen mit bestimmten Konzentrationen an Inhibitoren für 30 min vorinkubiert und anschließend mit 13,2 µg/cm<sup>2</sup> MAF02 Partikeln über einen Zeitraum von zweieinhalb Stunden exponiert (Abb. 32 bis Abb. 34).

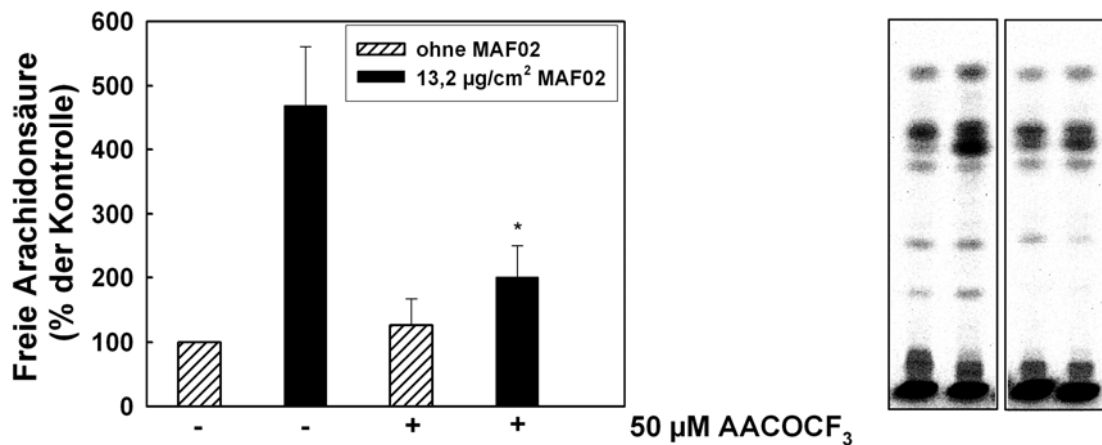
Zunächst wurde Thioetheramid-Phosphatidylcholin (TEA-PC), ein spezifischer Inhibitor der sekretorischen Phospholipase A<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>), verwendet (Yu *et al.* 1990). Bei TEA-PC handelt es sich um ein Phosphatidylcholin-Analogon, welches ein Thioether an der sn-1 Position und ein Amid an der sn-2 Position des Phospholipids aufweist. Es bindet sowohl an die aktive als auch an die katalytische Domäne der sPLA<sub>2</sub> und bewirkt auf diese Weise deren Hemmung. In dem hier vorgestellten Experiment führte die Vorinkubation mit 10 µM TEA lediglich zu einer nicht signifikanten, geringfügigen Hemmung der partikel-induzierten Arachidonsäurefreisetzung, etwa 60% des MAF02-induzierten Effekts blieb erhalten (Abb. 32).



**Abb. 32: Effekt von Thioetheramid-Phosphatidylcholin (TEA) auf die MAF02-induzierte Mobilisation der Arachidonsäure in RAW264.7 Zellen**

<sup>14</sup>C-Arachidonsäure markierte Makrophagen wurden für 30 min entweder in Kulturmedium (Kontrolle) oder in 10 µM TEA-haltigem Kulturmedium vorinkubiert. Nach einer 2,5-stündigen Exposition mit 13,2 µg/cm<sup>2</sup> MAF02 Partikeln (50 µg/ml) wurden die Zellen geerntet, die Lipide extrahiert und chromatographisch aufgetrennt. Die Visualisierung erfolgte mit Hilfe der Autoradiographie. Dargestellt wird eine repräsentative Dünnschichtchromatographie dreier, voneinander unabhängiger Versuche (rechts) sowie die Mittelwerte ± SEM der Bandenintensitäten der AA in Relation zur unbehandelten Kontrolle (links). Die Anordnung der DC-Proben entspricht der im Diagramm.

Im Gegensatz dazu war unter Verwendung von 50 µM Arachidonyltrifluoromethylketon (AACOCF<sub>3</sub>) die Freisetzung der Arachidonsäure am effektivsten hemmbar (Abb. 33). Es konnte eine Verringerung der Menge an freier Arachidonsäure um 80% gezeigt werden. AACOCF<sub>3</sub> ist ein plasmamembrangängiges Substratanalogon der Arachidonsäure (Street *et al.* 1993), welches das katalytische Zentrum der cPLA<sub>2</sub> über die Bindung an Serin reversibel besetzt und zum einen die zytosolische Phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) als auch in höheren Konzentrationen die calcium-unabhängige PLA<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>) inhibiert (Ackermann *et al.* 1995). Die sPLA<sub>2</sub> hingegen wird nicht beeinflusst.

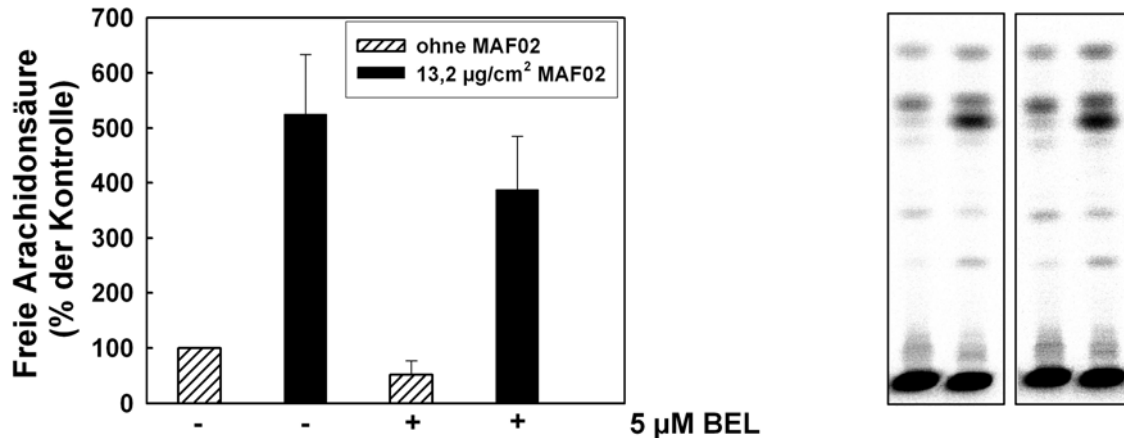


**Abb. 33: Der Inhibitor Arachidonyltrifluoromethylketon (AACOCF<sub>3</sub>) reduziert die MAF02-induzierte Freisetzung der Arachidonsäure in RAW264.7 Zellen**

<sup>14</sup>C-Arachidonsäure markierte Makrophagen wurden für 30 min entweder in Kulturmedium (Kontrolle) oder mit 50  $\mu\text{M}$  AACOCF<sub>3</sub> supplementiertem Kulturmedium vorinkubiert und daraufhin für 2,5 Stunden mit 13,2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  MAF02 Partikeln (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) behandelt. Nach einer Lipidextraktion erfolgte eine dünnschichtchromatographische Auftrennung mit anschließender Autoradiographie. Gezeigt wird eine repräsentative Dünnschichtchromatographie (rechts) dreier, voneinander unabhängiger Versuche sowie die Mittelwerte  $\pm$  SEM der Bandenintensitäten der AA in Relation zur unbehandelten Kontrolle (links) (\*  $p < 0,05$  im Vergleich zu Zellen, die mit 13,2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  MAF02 behandelt wurden). Die Anordnung der DC-Proben entspricht der im Diagramm.

Um nun zu untersuchen, ob die calcium-unabhängige Phospholipase A<sub>2</sub> für die Freisetzung von Arachidonsäure in RAW264.7 Makrophagen eine wesentliche Rolle spielt, wurde mit Bromoenollacton (BEL) ein streng selektiver Inhibitor dieses Enzyms eingesetzt. Wie in Abb. 34 deutlich wird, hatte die Vorinkubation der Zellen mit 5  $\mu\text{M}$  BEL keinen signifikanten Einfluss auf die partikel-induzierte Freisetzung der Arachidonsäure im Vergleich zu Makrophagen, die nur mit Flugaschepartikeln behandelt wurden. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die calcium-unabhängige PLA<sub>2</sub> an der MAF02-ausgelösten Mobilisation der Arachidonsäure involviert ist und der mit AACOCF<sub>3</sub> beobachtete Effekt auf der Hemmung der iPLA<sub>2</sub> beruhte.

Es kann somit zusammengefasst werden, dass die zytosolischen Phospholipasen A<sub>2</sub>, aber nicht die sekretorischen und calcium-unabhängigen Phospholipasen A<sub>2</sub>, am Prozess der MAF02-induzierten Freisetzung der Arachidonsäure beteiligt sind.



**Abb. 34: Bromoenol Lacton (BEL) bewirkt keine Reduktion der MAF02-induzierten Freisetzung der Arachidonsäure in RAW264.7 Zellen**

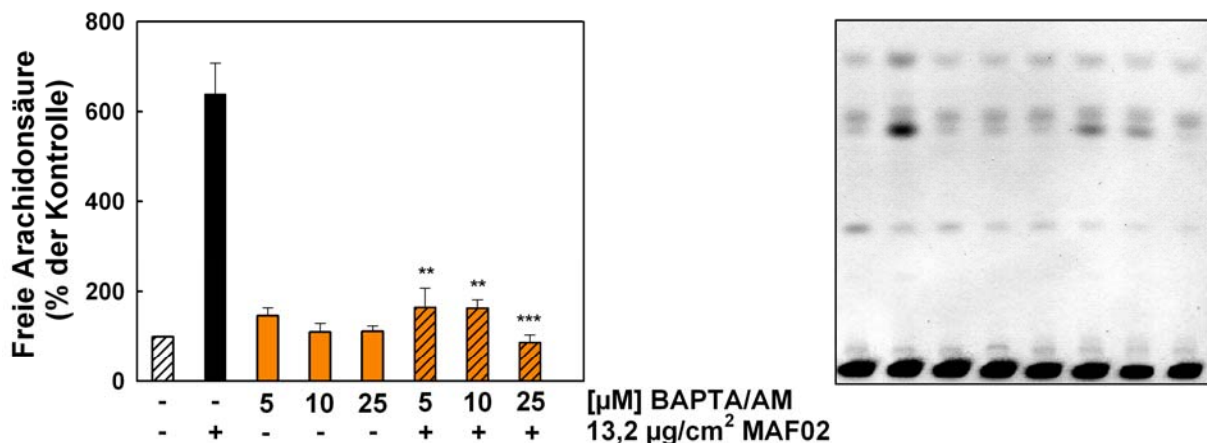
$^{14}\text{C}$ -Arachidonsäure markierte RAW264.7 Makrophagen wurden für 30 min entweder in Kulturmedium (Kontrolle) oder in 5  $\mu\text{M}$  Bromoenol Lacton-haltigem Kulturmedium vorinkubiert. Nach einer 2,5-stündigen Inkubation mit 13,2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  MAF02 Partikeln (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) wurden die Zellen geerntet, die Lipide extrahiert, chromatographisch aufgetrennt und mit Hilfe der Autoradiographie visualisiert. Dargestellt sind zum einen eine repräsentative Dünnschichtchromatographie (rechts) und zum anderen die Mittelwerte  $\pm$  SEM der densitometrischen Auswertung dreier, voneinander unabhängiger Versuche in Relation zur unbehandelten Kontrolle (links). Die Anordnung der DC-Proben entspricht der im Diagramm.

### 3.4.2.2 Einfluss von Calciumchelatoren auf die Flugasche-induzierte Arachidonsäurefreisetzung

Die cPLA<sub>2</sub> liegt in inaktiver Form löslich im Zytoplasma der Zellen vor. Ihre Aktivierung kann über verschiedene Ebenen der Signaltransduktion reguliert werden. So wird zum einen die cPLA<sub>2</sub> durch MAPK (mitogen-aktivierte Protein Kinasen) an verschiedenen Serinresten phosphoryliert und damit aktiviert. Zum anderen muss zur vollständigen Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> eine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels vorangehen. Calcium bindet an die N-terminale Calciumbindungsstelle der cPLA<sub>2</sub> und bewirkt deren Translokation vom zytosolischen Raum zu perinukleären Membrankompartimenten der Zellen. Im Folgenden sollte daher mit Calciumchelatoren die mögliche Beteiligung von Calcium an der MAF02- ausgelösten Arachidonsäurefreisetzung erfasst werden. Dazu wurden  $^{14}\text{C}$ -markierte RAW264.7 Zellen mit Calciumchelatoren vorinkubiert und anschließend mit MAF02 Partikeln behandelt. Zweieinhalb Stunden nach der Belastung wurden die Lipide extrahiert und die Menge an freigesetzter AA bestimmt. Geht man von einer Involvierung der cPLA<sub>2</sub> an der partikel-induzierten Mobilisation der AA aus, so wäre zu erwarten, dass der Einsatz von BAPTA/AM die Arachidonsäurefreisetzung direkt

beeinflusst. BAPTA wird als Acetylmethylester den Zellen zugegeben. Diese Substanz kann Zellmembranen schnell permeieren und im Zytoplasma wird die Estergruppe von intrazellulären Esterasen abgespalten. In hydrolysierte Form ist BAPTA in der Lage eventuell einströmendes oder aus intrazellulären Speichern freigesetztes Calcium sofort zu binden.

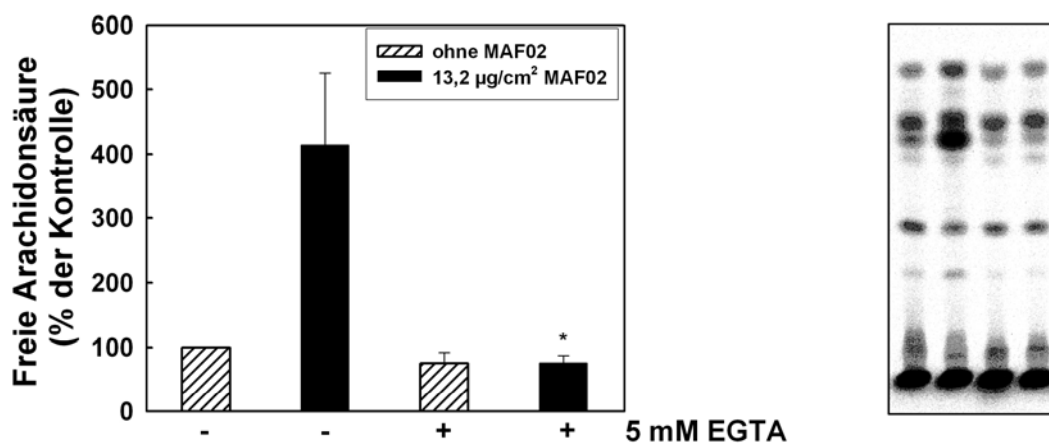
Die Ergebnisse einer Konzentrationsreihe mit BAPTA im Wirkungsbereich von 5 bis 25  $\mu\text{M}$  sind in Abb. 35 graphisch zusammengefasst. Die Supplementierung des Standardkulturmediums mit dem intrazellulären Komplexbildner führte konzentrationsabhängig zu einer Reduktion der Menge an MAF02-induzierter freier Arachidonsäure. Der Einsatz von 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  BAPTA zeigte eine deutliche Reduktion der Arachidonsäurefreisetzung, die Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  BAPTA führte zu einer vollständigen Hemmung. Die Menge an freier Arachidonsäure in BAPTA und MAF02-behandelten Zellen war vergleichbar zu derjenigen der unbehandelten Kontrolle. BAPTA selbst hatte keinen Einfluss auf die Menge freigesetzter Arachidonsäure.



**Abb. 35: Konzentrationsabhängige Reduktion der MAF02-induzierten Mobilisation von Arachidonsäure in RAW264.7 Zellen durch den intrazellulären Calciumchelator BAPTA/AM**

$^{14}\text{C}$ -Arachidonsäure markierte Makrophagen wurden für 20 min entweder in Kulturmedium (Kontrolle) oder mit den angegebenen Konzentrationen BAPTA/AM vorinkubiert und anschließend für 2,5 Stunden mit 13,2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Flugaschepartikeln (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) belastet. Nach erfolgter Lipidextraktion wurden die Proben dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt. Dargestellt sind zum einen eine repräsentative Dünnschichtchromatographie (rechts) und zum anderen die Mittelwerte  $\pm$  SEM der densitometrischen Auswertung der AA aus vier unabhängigen Versuchen in Relation zur unbehandelten Kontrolle (links) (\*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zu Zellen, die mit 13,2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  MAF02 behandelt wurden). Die Anordnung der DC-Proben entspricht der im Diagramm.

Unklar war jedoch, ob der Anstieg an MAF02-induzierter freier Arachidonsäure durch einen Einstrom aus dem Interstitium oder durch Freisetzung aus intrazellulären Speichern, wie beispielsweise aus dem endoplasmatischen Retikulum, bedingt ist. Deshalb sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob eine Reduktion des Calcium-Einstroms aus dem extrazellulären Raum in die Zelle die MAF02-ausgelöste Mobilisation der Arachidonsäure verändert. Hierfür wurden  $^{14}\text{C}$ -markierte Makrophagen für 30 min in EGTA-supplementiertem Kulturmedium vorinkubiert und anschließend mit  $13,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  MAF02 für zweieinhalb Stunden belastet. EGTA kann die Zellmembran nicht permeieren und kann durch Chelatieren von extrazellulärem Calcium einen Einstrom aus dem extrazellulären Raum in das Zytosol verhindern. Wie in Abb. 36 gezeigt, wurde bei einer Konzentration von 5 mM EGTA die Wirksamkeit von MAF02 in Bezug auf die Arachidonsäurefreisetzung vollständig supprimiert. Im Gegensatz dazu rief die Behandlung der Zellen, die nur mit EGTA inkubiert wurden, keine Veränderung der Menge an freier Arachidonsäure im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen hervor.



**Abb. 36: Der Calciumchelator EGTA reduziert die MAF02-induzierte Arachidonsäurefreisetzung**

$^{14}\text{C}$ -AA markierte RAW264.7 Zellen wurden entweder in Kulturmedium (Kontrollzellen) oder in 5 mM EGTA-haltigem Kulturmedium für 30 min vorinkubiert und anschließend mit Flugaschepartikeln ( $13,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) für 2,5 Stunden behandelt. Nach der Extraktion der zellulären Lipide wurden diese dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und mittels Autoradiographie visualisiert. Gezeigt wird eine repräsentative Dünnschichtchromatographie (rechts) dreier, voneinander unabhängiger Versuche sowie die Mittelwerte  $\pm$  SEM, wie sie sich aus der densitometrischen Auswertung der AA ergaben in Relation zur unbehandelten Kontrolle (links) (\*  $p < 0,05$  im Vergleich zu Zellen, die nur mit  $13,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  MAF02 behandelt wurden). Die Anordnung der DC-Proben entspricht der im Diagramm.

Zusammengefasst beweisen die Ergebnisse der zuvor dargestellten Experimente, dass die MAF02-induzierte Mobilisation der Arachidonsäure, zumindest im

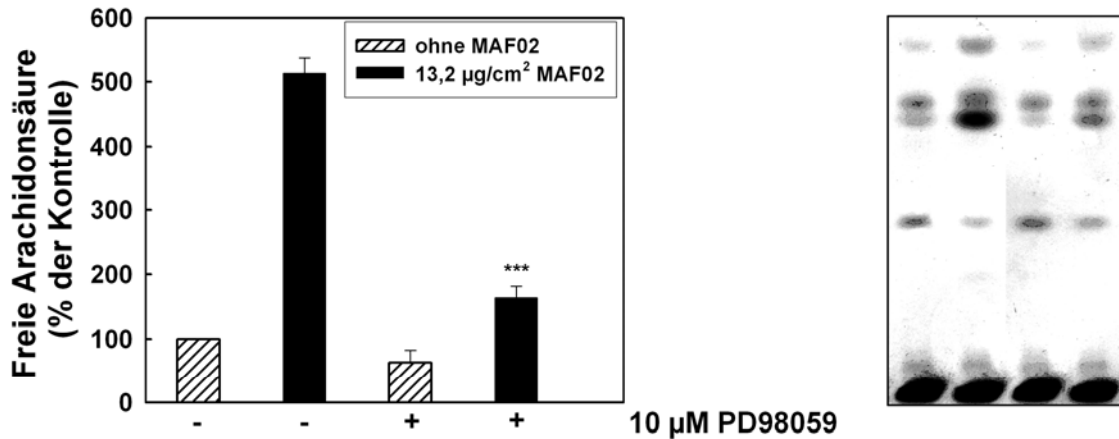
untersuchten Zellsystem, von der intrazellulären Calcium-Konzentration abhängt und dabei die Verfügbarkeit extrazellulären Calciums eine entscheidende Rolle einnimmt.

### 3.4.2.3 Effekt der Inhibition von Proteinkinasen auf die MAF02-induzierte Arachidonsäurefreisetzung

Es konnte in den vorangegangenen Experimenten gezeigt werden, dass die Freisetzung der vierfach ungesättigten Fettsäure sowohl von der zytosolischen Phospholipase A<sub>2</sub> als auch von einem Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels abhängt. Wie bereits erwähnt, stellt die Aktivierung von Kinasen der MAPK-Familie ebenfalls eine wichtige Voraussetzung für die Phosphorylierung und somit die katalytische Aktivität der cPLA<sub>2</sub> dar (s. Kapitel 1.4.1.1). Im Folgenden sollten daher mit spezifischen Inhibitoren der mitogen-aktivierten Protein-Kinasen mögliche Signalwege identifiziert werden, die an der Partikel-induzierten Arachidonsäuremobilisation beteiligt sind. Die verwendeten Konzentrationen der Inhibitoren wurden entweder aus der Literatur entnommen (SB203580, SP600125) oder zuvor auf die inhibierende Fähigkeit überprüft (PD98059, Daten nicht gezeigt). Abb. 37 bis Abb. 39 illustrieren die Ergebnisse unter Einfluss der verschiedenen MAPK-Inhibitoren.

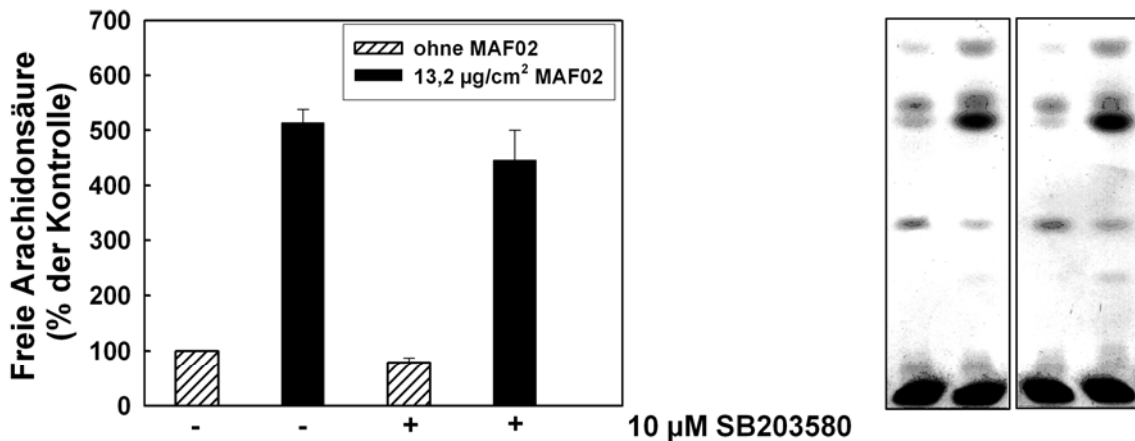
Wie Abb. 37 zeigt, führte die Vorinkubation der RAW264.7 Makrophagen mit 10 µM PD98059, einem potenten und selektivem Inhibitor der MAPK/ERK-Kinase 1 (MEK1) (Alessi *et al.* 1995), zu einer 85%igen Reduktion der MAF02-induzierten Arachidonsäurefreisetzung.

Im Gegensatz dazu hatte ein Inhibitor des p38 Signalweges, SB203580 (10 µM), keinen inhibitorischen Effekt auf die Flugasche-induzierte Freisetzung der Fettsäure (Abb. 38). SB203580 stellt einen selektiven Inhibitor der p38 MAPKinase dar und setzt, im Vergleich zu PD98059, direkt an der terminalen Effektor kinase des MAPK-Signalsystems an (Cuenda *et al.* 1995).



**Abb. 37: Der ERK1/2 Inhibitor PD98059 inhibiert die MAF02-induzierte Arachidonsäurefreisetzung in RAW264.7 Makrophagen**

<sup>14</sup>C-AA markierte Makrophagen wurden für 30 min entweder in Kulturmedium (Kontrollzellen) oder mit 10 µM PD98059 vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen unbehandelt belassen oder über einen Zeitraum von 2,5 Stunden mit 13,2 µg/cm<sup>2</sup> MAF02 (50 µg/ml) belastet und im Anschluss einer Lipidextraktion unterzogen. Die Lipide wurden nach einer dünnschichtchromatographischen Auftrennung über Autoradiographie detektiert. Dargestellt sind eine repräsentative Dünnschichtchromatographie (rechts) und die Mittelwerte ± SEM der densitometrischen Auswertung der AA dreier, unabhängiger Versuche in Relation zur unbehandelten Kontrolle (links) (\*\*\*) p < 0,001 im Vergleich zu Zellen, die nur mit MAF02 Partikeln exponiert wurden). Die Anordnung der DC-Proben entspricht der im Diagramm.

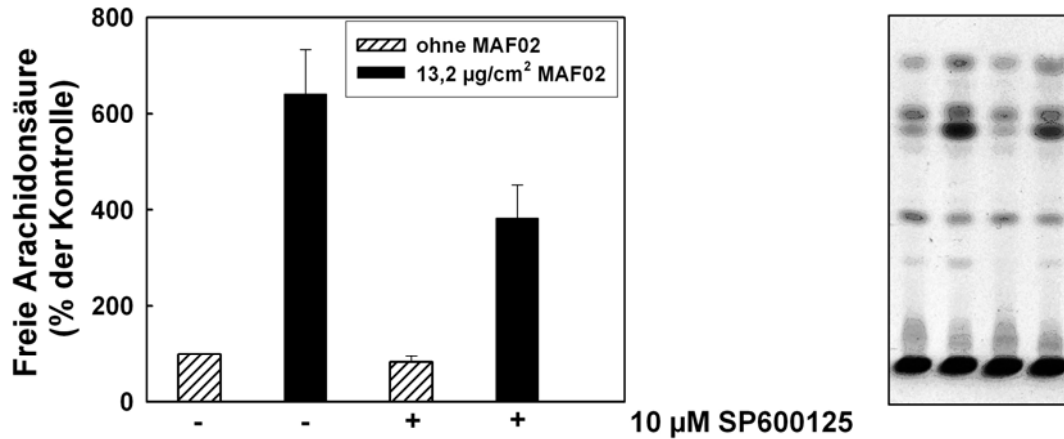


**Abb. 38: Der p38 Inhibitor SB203580 bewirkt keine Reduktion der MAF02-bedingten Mobilisation der Arachidonsäure in RAW264.7 Makrophagen**

<sup>14</sup>C-Arachidonsäure markierte RAW264.7 Zellen wurden für 30 min entweder in Kulturmedium (Kontrollzellen) oder mit 10 µM SB203580 vorinkubiert. Nach einer 2,5-stündigen Inkubation mit 13,2 µg/cm<sup>2</sup> MAF02 Partikeln (50 µg/ml) wurden die Zellen geerntet, die Lipide extrahiert und chromatographisch aufgetrennt. Die Detektion der radioaktiven Signale erfolgte mittels Autoradiographie. Dargestellt wird eine repräsentative Dünnschichtchromatographie (rechts) dreier, voneinander unabhängiger Versuche sowie die Mittelwerte ± SEM, wie sie sich aus der densitometrischen Auswertung der AA ergaben, in Relation zur unbehandelten Kontrolle. Die Anordnung der DC-Proben entspricht der im Diagramm.



Die Vorbehandlung der RAW264.7 Makrophagen mit 10  $\mu\text{M}$  eines spezifischen Inhibitors der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK), SP600125, zeigte lediglich einen geringen Hemmeffekt (Abb. 39). Es fand eine Reduktion der partikel-induzierten, freien Arachidonsäuremenge um 45% statt.



**Abb. 39: Wirkung des JNK Inhibitors SP600125 auf die MAF02-induzierte Arachidonsäurefreisetzung in RAW264.7 Zellen**

$^{14}\text{C}$ -Arachidonsäure markierte Makrophagen wurden für 30 min entweder in Kulturmedium (Kontrollzellen) oder mit 10  $\mu\text{M}$  SP600125 vorinkubiert. Daraufhin wurden die Zellen unbehandelt belassen oder für 2,5 Stunden mit 13,2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  MAF02 Partikeln (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) behandelt. Im Anschluss erfolgte eine Lipidextraktion. Die Extrakte wurden dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und mit Hilfe der Autoradiographie sichtbar gemacht. Gezeigt wird eine repräsentative Dünnschichtchromatographie (rechts) dreier, voneinander unabhängiger Versuche sowie die Mittelwerte  $\pm$  SEM, wie sie sich aus der densitometrischen Auswertung der AA ergaben, in Relation zur unbehandelten Kontrolle. Die Anordnung der DC-Proben entspricht der im Diagramm.

Zusammenfassend belegen diese Inhibitor-Studien eine Beteiligung des ERK1/2 Signalweges an der Arachidonsäurefreisetzung. Der JNK1/2 Signalweg könnte ebenfalls daran beteiligt sein. Im Gegensatz dazu scheint der p38 Signalweg nicht an der MAF02-induzierten Mobilisation der Arachidonsäure involviert zu sein.

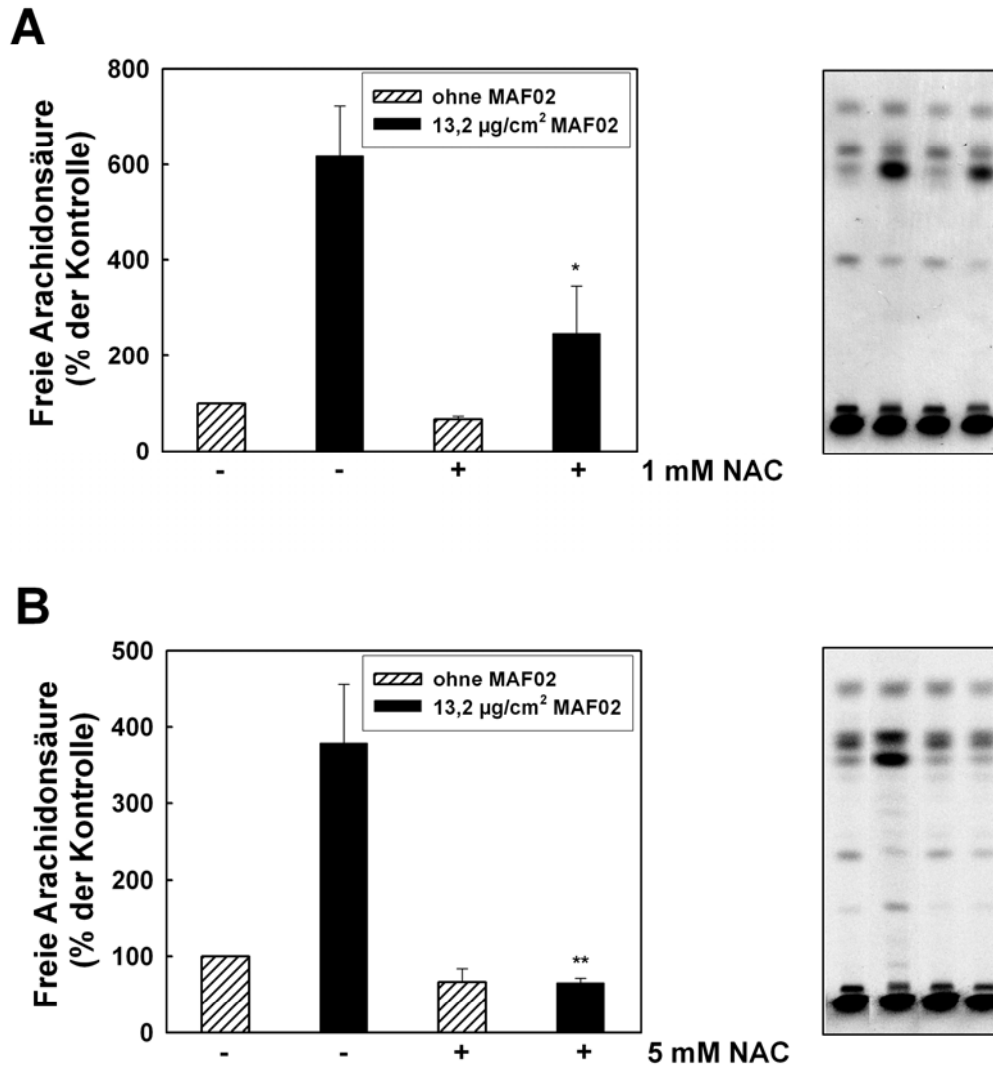
#### 3.4.2.4 N-Acetylcystein verhindert die durch Flugaschepartikel verursachte Arachidonsäurefreisetzung

Eine Reihe von *in vitro* Studien hat gezeigt, dass die Generierung von ROS eine entscheidende Rolle bei der Wirkung verschiedener Partikel übernehmen. Es wurde beispielsweise veröffentlicht, dass Dieselrußpartikel sowohl die Freisetzung von Arachidonsäure als auch die Synthese von Prostaglandin  $\text{E}_2$  und Leuktorien  $\text{B}_4$  bewirken (Beck-Speier *et al.* 2005). Hierbei geht man davon aus, dass Partikel mit

steigendem Potential oxidativen Stress zu generieren auch eine erhöhte Fähigkeit innehaben, inflammatorische Prozesse zu induzieren.

Um die Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies bei der durch MAF02-induzierten Arachidonsäuremobilisation zu erfassen, sollte im folgenden Versuchsansatz das zellprotektive Antioxidanz, N-Acetylcystein (NAC), eingesetzt werden. Hierzu wurden <sup>14</sup>C-markierte RAW264.7 Zellen über einen Zeitraum von dreißig Minuten mit 1 mM bzw. 5 mM NAC vorinkubiert und daraufhin zweieinhalb Stunden mit 13,2 µg/cm<sup>2</sup> Flugaschepartikeln belastet. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet, einer Lipidextraktion unterzogen und die frei im Zytosol vorliegende Arachidonsäure bestimmt.

Die Analyse ist in Abb. 40 illustriert. Die Vorbehandlung der RAW264.7 Makrophagen mit 1 mM NAC und einer anschließenden Belastung der Zellen mit 13,2 µg/cm<sup>2</sup> MAF02 führte zu einer 70%igen Reduktion der Menge an freier Arachidonsäure. Des Weiteren bewirkte eine Erhöhung der NAC-Konzentration auf 5 mM eine vollständige Inhibition der MAF02-induzierten Arachidonsäurefreisetzung. Die Vorbehandlung der Zellen mit NAC allein zeigte hinsichtlich der Arachidonsäuremobilisation keinen Unterschied zu den unbehandelten Kontrollen. Diese Resultate zeigen, dass an der Partikel-bedingten Arachidonsäurefreisetzung reaktive Sauerstoffspezies beteiligt sind.



**Abb. 40: Reduktion der MAF02-induzierten Freisetzung der Arachidonsäure in RAW264.7 Makrophagen durch N-Acetylcystein (NAC)**

<sup>14</sup>C-Arachidonsäure markierte RAW264.7 Zellen wurden für 30 min entweder in normalem Kulturmedium (Kontrollzellen) oder in 1 mM NAC-haltigem (A) sowie in 5 mM NAC-haltigem Kulturmedium (B) vorinkubiert und daraufhin für 2,5 Stunden mit 13,2 µg/cm<sup>2</sup> MAF02 Partikeln (50 µg/ml) behandelt. Nach der anschließenden Lipidextraktion wurden die Extrakte dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt und durch Autoradiographie visualisiert. Dargestellt sind zum einen eine repräsentative Dünnschichtchromatographie (rechts) und zum anderen die Mittelwerte ± SEM der densitometrischen Auswertung der AA dreier, voneinander unabhängiger Versuche in Relation zur unbehandelten Kontrolle (links) (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01 im Vergleich zu Zellen, die nur mit 13,2 µg/cm<sup>2</sup> MAF02 Partikeln exponiert wurden). Die Anordnung der DC-Proben entspricht der im Diagramm.

### **3.5 Aktivierung von Proteinkinasen**

Nachdem die MAF02-induzierte Freisetzung der Arachidonsäure durch Inhibition der MAP Kinasen teilweise gehemmt werden konnte, wurde im Folgenden der Einfluss von MAF02 Partikeln auf den Phosphorylierungsstatus dieser MAP Kinasen untersucht.

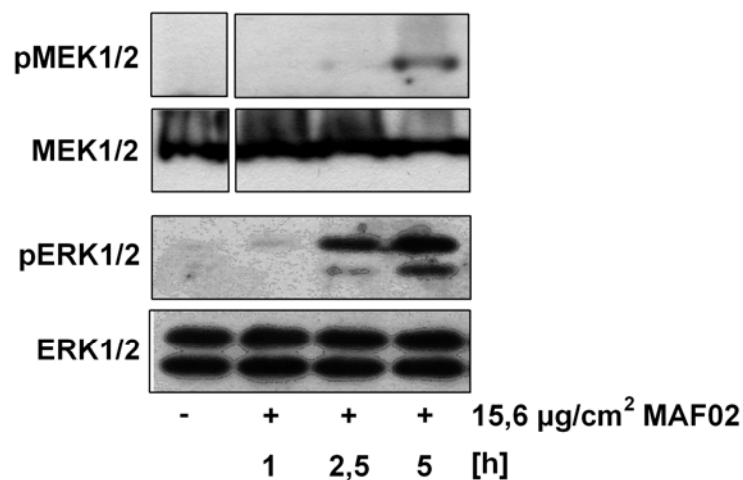
Hierzu wurden die Makrophagen über einen Zeitraum von fünf Stunden mit 15,6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Flugaschepartikeln behandelt. Nach der Zellyse wurden die Zellextrakte im SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran transferiert. Nach der Inkubation mit Antikörpern erfolgte die Detektion der Immunsignale. Die Phosphorylierung der Proteinkinasen wurde hierbei mit Hilfe phosphospezifischer Antikörper, die nur dann an die jeweilige MAP Kinase binden, wenn diese an Threonin- und Tyrosin-Resten phosphoryliert ist, analysiert. Die Phosphorylierung ist essentiell für die Aktivierung der MAP Kinasen, wodurch eine Zunahme der Phosphorylierung mit der Aktivierung der jeweiligen MAP Kinase einhergeht.

#### **3.5.1 MAF02 induziert die Aktivierung der MEK1/2 und ERK1/2 MAP Kinasen**

Die Ergebnisse aus den Hemmversuchen mit PD98059 (Abb. 37) sprechen für eine Beteiligung des ERK1/2 Signalweges an der Induktion der Arachidonsäurefreisetzung. Daher wurde der Einfluss der Flugaschepartikel auf die Aktivierung des ERK1/2 Signalweges genauer untersucht. Die ERK-Familie besteht aus zwei Isoformen, ERK1 und ERK2, die sich hinsichtlich ihrer Größe unterscheiden. Bei der ERK1 handelt es sich um ein 44 kDa großes, bei der ERK2 um ein 42 kDa großes Protein. Deren Phosphorylierung und die daraus resultierende Aktivierung der ERK1/2 erfolgt über mehrere Phosphorylierungsschritte der Enzymkaskade (s. Abb. 6), wobei letztendlich die Übertragung des Phosphatrestes auf die ERK1/2 über die MEK1/2 (MAPK/ERK-Kinase) verläuft.

Die Phosphorylierung der MEK1/2 Kinase verlief nach Behandlung der RAW264.7 Makrophagen mit 15,6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  MAF02 Partikeln (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) zeitabhängig (Abb. 41). Nach einer Stunde war die phosphorylierte Form nicht nachweisbar. Nach einer Behandlungszeit von zweieinhalb Stunden konnte ein sehr schwaches Immunsignal der MEK1/2 detektiert werden. Nach einer fünfstündigen Partikelexposition nahm die Phosphorylierung der ERK1/2 weiter deutlich zu. Wie zu erwarten zeigte die Western

Blot Analyse außerdem einen übereinstimmenden Zeitverlauf der ERK1/2-Phosphorylierung nach Exposition der Zellen mit  $15,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  MAF02. Innerhalb einer Stunde konnte im Vergleich zu Kontrollzellen keine Zunahme der Menge an phosphorylierter ERK1/2 festgestellt werden. Im Gegensatz dazu war nach einer zweieinhalbstündigen Inkubation eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung der 44 kDa ERK1 Isoform zu erkennen. Nach einer fünf Stunden Belastung lag sowohl die 44 kDa als auch die 42 kDa große Isoform der ERK phosphoryliert vor. Die Ergebnisse dieser Proteinanalyse korrelieren somit mit den Inhibitor-Studien des ERK1/2 Signalweges (Abb. 37).

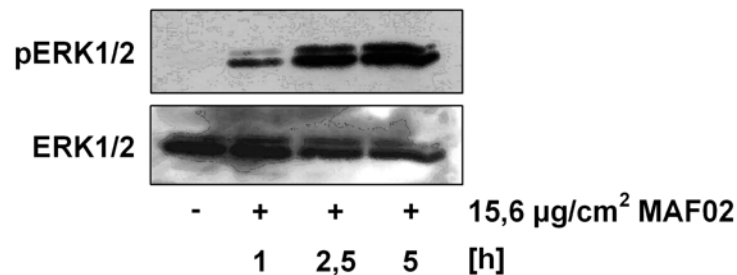


**Abb. 41: MAF02 Partikel bewirken eine zeitabhängige Aktivierung der MEK1/2 und ERK1/2 MAP Kinase in RAW264.7 Makrophagen**

RAW264.7 Zellen wurden unbehandelt belassen (-) oder mit  $15,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  Flugaschepartikeln ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) für 1, 2,5 oder 5 Stunden inkubiert, daraufhin geerntet, lysiert und durch Western Blot mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen die phosphorylierten Formen von MEK1/2 bzw. ERK1/2 analysiert. Um zu überprüfen, ob in jeder Spur identische Mengen der Zelllysate aufgetragen worden sind, wurde die Western Blot Membran gestrippt und daraufhin mit MEK1/2 oder ERK1/2 Antikörpern untersucht. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen.

Die Behandlung der primären, humanen MDM mit Flugaschepartikeln führte zu einem ähnlichen Verlauf der zeitabhängigen Aktivierung der ERK1/2 (Abb. 42), was auf eine vom Zelltyp und von der Spezies unabhängige Wirkungsweise zurückzuführen ist. Es konnte bereits nach einer Stunde eine geringe Zunahme der Phosphorylierung der ERK1/2 nachgewiesen werden, welche im Zeitraum von fünf Stunden stark anstieg. Im Gegensatz zu den RAW264.7 Maus-Makrophagen wies die 42 kDa schwere ERK2 im Vergleich zur ERK1 in den humanen MDM Zellen

sowohl in der unphosphorylierten als auch in der phosphorylierten Form ein stärkeres Immunsignal auf.



**Abb. 42: Flugaschepartikel induzieren eine zeitabhängige Aktivierung der ERK1/2 MAP Kinase von primären, humanen Monozyten abstammenden Makrophagen (MDM)**

MDM Zellen wurden unbehandelt belassen (-) oder mit 15,6 µg/cm<sup>2</sup> Flugaschepartikel (50 µg/ml) für 1, 2,5 oder 5 Stunden inkubiert, daraufhin geerntet und lysiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung im SDS-PAGE erfolgte die Detektion von phosphorylierter ERK1/2 MAP Kinase mittels phosphospezifischen ERK1/2 Antikörpern im Western Blot. Zur Kontrolle, ob in jeder Spur identische Mengen der Zelllysate aufgetragen worden sind, wurde die Western Blot Membran gestrippt und anschließend mit ERK1/2 Antikörpern analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen.

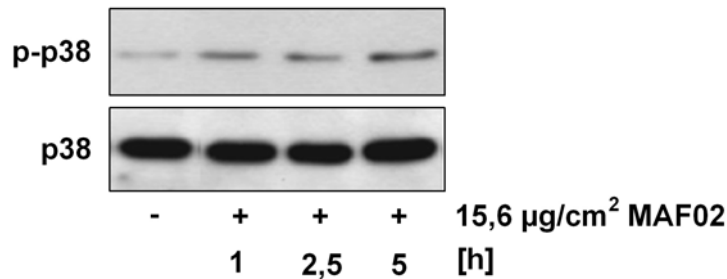
### 3.5.2 Aktivierung der p38 Kinase

Obwohl die Ergebnisse der Hemmversuche mit SB203580 aus Abb. 38 demonstrierten, dass eine Beteiligung der p38 Kinase an der Regulation der MAF02-induzierten Arachidonsäuremobilisation auszuschließen ist, wurde mit Hilfe der Western Blot Analyse untersucht, ob eine Aktivierung dieser Kinase nach Flugasche Behandlung stattfand. Die Untersuchung der Phosphorylierung von p38 erfolgte sowohl in der RAW264.7 Maus-Makrophagen-Zelllinie als auch in primären Makrophagen aus dem Mensch.

Wie in Abb. 43 zu erkennen ist, führte die Behandlung der RAW264.7 Zellen mit MAF02 Partikeln im Zeitraum von fünf Stunden zu keiner deutlichen Phosphorylierung bzw. Aktivierung der p38 MAPK im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Diese Proteinanalysen untermauern die Ergebnisse der Inhibitor-Studien in Bezug auf die Regulation der Arachidonsäure durch MAP Kinasen.

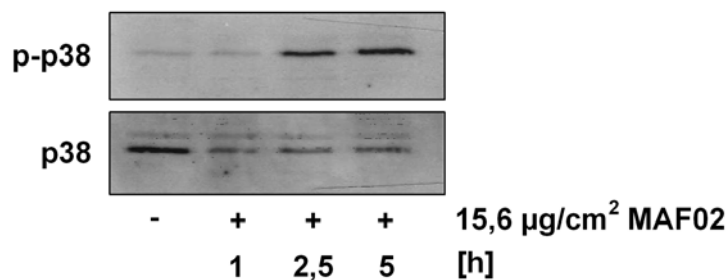
Die primären Makrophagen hingegen wiesen eine zeitabhängige Zunahme der Phosphorylierung von p38 auf (Abb. 44). Nach einer einstündigen Inkubation zeigte sich im Vergleich zu unbehandelten Zellen keine Änderung des Phosphorylierungsstatus, während nach einer zweieinhalbständigen Belastung der MDM mit 15,6 µg/cm<sup>2</sup> MAF02 einen Anstieg der phosphorylierten Form der p38

Kinase festgestellt werden konnte. Allerdings war nach einer fünf Stunden Inkubation keine weitere Verstärkung des p38 Signals nachweisbar.



**Abb. 43: MAF02 bewirkt keine Phosphorylierung der p38 Kinase in RAW264.7 Makrophagen**

RAW264.7 Zellen wurden unbehandelt belassen (-) oder mit 15,6 µg/cm<sup>2</sup> Flugaschepartikel (50 µg/ml) über einen Zeitraum von 1, 2,5 oder 5 Stunden inkubiert, geerntet und lysiert. Die Proben wurden nach der elektrophoretischen Auftrennung im SDS-PAGE mit Hilfe von phosphospezifischen p38 Antikörpern im Western Blot untersucht. Als Ladekontrolle diente die Detektion der p38 Kinase. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen.



**Abb. 44: MAF02 Partikel induzieren die Aktivierung der p38 Kinase von primären, humanen Monozyten abstammenden Makrophagen (MDM)**

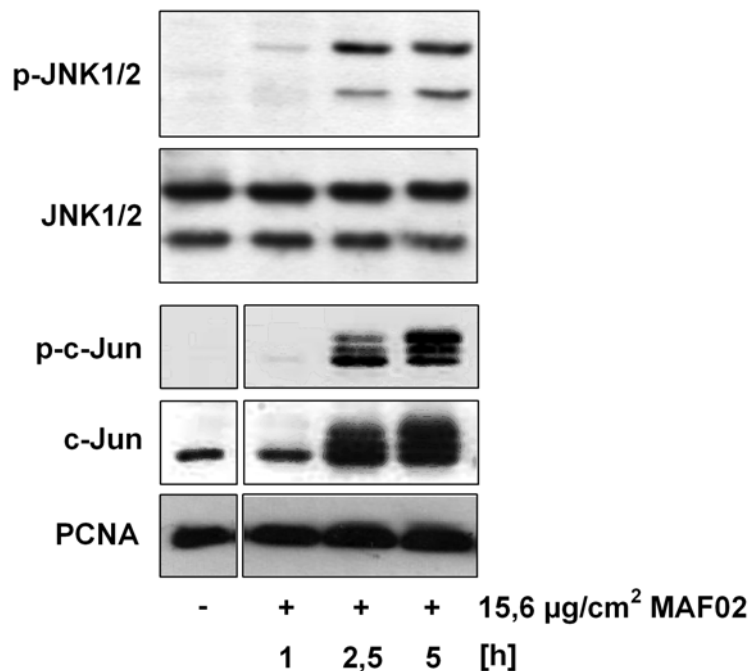
MDM Zellen wurden unbehandelt belassen (-) oder mit 15,6 µg/cm<sup>2</sup> Flugaschepartikel (50 µg/ml) für 1, 2,5 oder 5 Stunden inkubiert, daraufhin geerntet und lysiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung im SDS-PAGE erfolgte die Detektion von phosphorylierter p38 MAP Kinase mittels phosphospezifischen p38 Antikörpern im Western Blot. Zur Kontrolle, ob in jeder Spur identische Mengen der Zelllysate aufgetragen worden sind, wurde die Western Blot Membran gestriipt und anschließend mit p38 Antikörpern analysiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot aus drei unabhängigen Versuchen.

### 3.5.3 Aktivierung der c-Jun NH<sub>2</sub>-terminalen Kinase (JNK) und c-Jun durch MAF02 Partikel

In Anbetracht dessen, dass es sehr unwahrscheinlich ist, dass Flugaschepartikel ausschließlich den ERK1/2 Signalweg aktivieren, wurde der JNK Signalweg ebenfalls untersucht. Die c-Jun NH<sub>2</sub>-terminale Kinasen (JNK) können beispielsweise durch UV-Strahlung, Hitzeschock, proinflammatorische Zytokine sowie bei hypoxischem Stress

aktiviert werden. Daraus resultiert die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors c-Jun, welcher die Expression verschiedener Gene beeinflusst und dadurch eine wichtige regulatorische Rolle während zellulärem Stress übernimmt.

Die Proteinanalyse (Abb. 45) zeigte, dass nach einer einstündigen Behandlung der RAW264.7 Zellen mit  $15,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  MAF02 bereits eine geringe Menge der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) phosphoryliert vorlag. Die Phosphorylierung stieg über den Behandlungszeitraum von fünf Stunden weiter an. Erwartungsgemäß führte die Partikelbehandlung zu einem vergleichbaren Zeitverlauf der Aktivierung von c-Jun. Innerhalb einer Stunde war noch kein phosphoryliertes c-Jun detektierbar, während ab einer zweieinhalbstündigen Exposition der Zellen eine verstärkte Phosphorylierung von c-Jun nachgewiesen werden konnte. Da der c-Jun Antikörper nicht nur die unphosphorylierte Form, sondern zum Teil auch die phosphorylierte Form von c-Jun detektiert, wurde als zusätzliche Ladekontrolle der eingesetzten Proteinmenge PCNA eingesetzt. Damit konnte eindeutig gezeigt werden, dass in jeder Spur der Western Blot Analyse identische Mengen an Protein vorlagen.



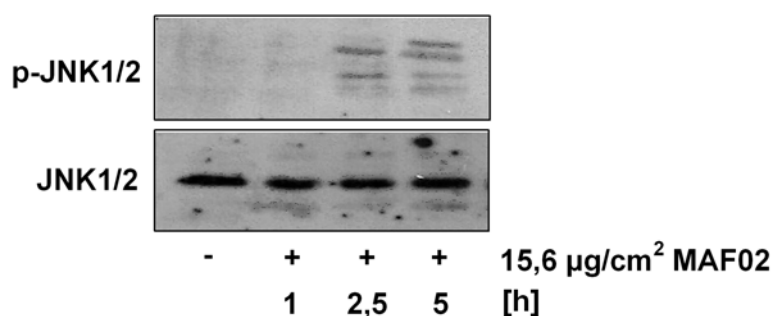
**Abb. 45: Kinetik der Aktivierung der c-Jun NH<sub>2</sub>-terminalen Kinase (JNK) und c-Jun nach Inkubation mit MAF02 Partikeln in RAW264.7 Makrophagen**

RAW264.7 Zellen wurden unbehandelt belassen (-) oder mit  $15,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  Flugaschepartikeln ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) für 1, 2,5 oder 5 Stunden behandelt, daraufhin geerntet und lysiert. Die Gesamt-Proteinlysate wurden im SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot sowohl mit einem phospho-JNK1/2 als auch mit einem phospho-c-Jun Antikörper untersucht. Des Weiteren erfolgte nach dem Strippen der Membran eine Kontrolle der eingesetzten Proteinmenge mit Hilfe des JNK1/2, c-Jun und PCNA Antikörpers. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen.



Beim Vergleich der Proteinanalyse zeigten die humanen Makrophagen in Bezug auf die Phosphorylierung der JNK1/2 eine ähnliche Zeitkinetik nach Partikelexposition (Abb. 46). Innerhalb einer Stunde wurde noch kein Anstieg der Menge an phosphorylierter JNK nachgewiesen, während die zweieinhalb- sowie die fünfstündige Behandlung der Zellen mit MAF02 Partikeln ( $15,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ;  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) eine verstärkte Phosphorylierung der JNK bewirkte. Die Detektion von unphosphorylierter JNK bewies, dass in jedem Probenauftrag identische Proteinmengen vorhanden waren.

Die Phosphorylierung von c-Jun konnte in den primären, humanen Makrophagen nicht nachgewiesen werden. Das Protokoll des verwendeten Antikörpers zur Detektion dieses Proteins konnte für diese Zellen nicht optimiert werden, da nur eine begrenzte Menge an Zellmaterial zur Verfügung stand.



**Abb. 46: Flugstaub induziert eine zeitabhängige Aktivierung der c-Jun NH<sub>2</sub>-terminalen Kinase (JNK) von primären, humanen Monozyten abstammenden Makrophagen (MDM)** MDM Zellen wurden unbehandelt belassen (-) oder mit  $15,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  Flugaschepartikel ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) für 1, 2,5 oder 5 Stunden exponiert, im Anschluss geerntet und lysiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung im SDS-PAGE erfolgte die Detektion von phosphorylierter JNK MAP Kinase unter Verwendung von phosphospezifischen JNK1/2 Antikörpern im Western Blot. Zur Kontrolle, ob in jeder Spur identische Mengen der Zelllysate aufgetragen worden sind, wurde die Western Blot Membran gestrippt und anschließend mit JNK1/2 Antikörpern analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

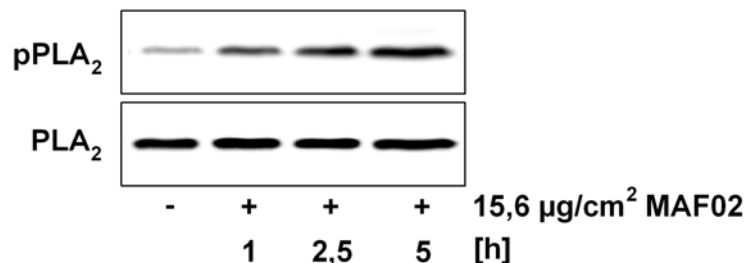
### 3.6 Aktivierung der zytosolischen Phospholipase A<sub>2</sub> durch MAF02 Exposition

Durch die bisher gezeigten Versuche konnte nachgewiesen werden, dass die Exposition von Makrophagen mit MAF02 die Freisetzung von Arachidonsäure bewirkt und dass diese offenbar durch einen Anstieg von intrazellulärem Calcium und durch die Aktivierung des ERK1/2 MAPK Signalweges vermittelt wird. Außerdem konnte mit Hilfe von Inhibitor-Studien eine Beteiligung der zytosolischen PLA<sub>2</sub> demonstriert

werden. Deshalb stellt sich die Frage nach dem Phosphorylierungsstatus der cPLA<sub>2</sub> nach MAF02 Behandlung. Zu diesem Zweck wurden die RAW264.7 Zellen für eine, zweieinhalb und fünf Stunden mit 15,6 µg/cm<sup>2</sup> MAF02 Partikeln (50 µg/ml) exponiert, anschließend geerntet und lysiert. Die Gesamtzelllysate wurden daraufhin im Western Blot analysiert. Dabei wurden einerseits die phosphorylierte und andererseits die unphosphorylierte Form der cPLA<sub>2</sub> mit spezifischen Antikörpern detektiert.

Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Abb. 47 veranschaulicht. Es konnte gezeigt werden, dass die Menge an phosphorylierter cPLA<sub>2</sub> zeitabhängig zunahm. Eine Stunde nach Partikelbehandlung war ein schwaches Immunsignal der phosphorylierten cPLA<sub>2</sub> detektierbar. Die Proteinbande intensivierte sich weiter nach zweieinhalb und fünf Stunden im Vergleich zu Zelllysaten der unbehandelten Kontrolle. Diese zeitlich bedingte Zunahme der cPLA<sub>2</sub> Phosphorylierung ließ eine starke Ähnlichkeit zu den zeitlichen Verläufen der MAF02-bedingten ERK1/2 Phosphorylierung und der Freisetzung der Arachidonsäure erkennen.

Zusammengefasst haben diese Daten bewiesen, dass eine Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> eine wesentliche Rolle bei der partikel-bedingten Freisetzung der Arachidonsäure und damit bei der Induktion von inflammatorischen Prozessen spielt.



**Abb. 47: Zeitabhängige Aktivierung der zytosolischen Phospholipase A<sub>2</sub> nach Behandlung von RAW264.7 Zellen mit MAF02 Partikeln**

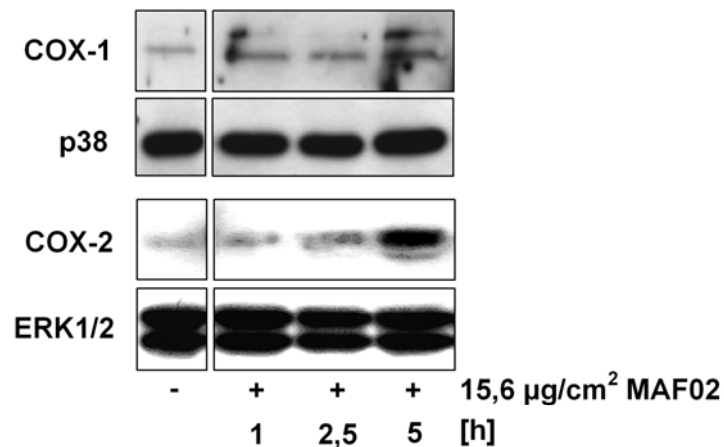
RAW264.7 Zellen wurden unbehandelt belassen (-) oder mit 15,6 µg/cm<sup>2</sup> Flugaschepartikel (50 µg/ml) über 5 Stunden behandelt, daraufhin geerntet und lysiert. Nachdem die Zelllysate im SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt wurden, erfolgte die Detektion der phosphorylierten zytosolischen Phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) mit Hilfe phosphospezifischer cPLA<sub>2</sub> Antikörper im Western Blot. Als Ladekontrolle diente die unphosphorylierte cPLA<sub>2</sub>-Form. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Versuchen.

### **3.7 Induktion und Aktivität der Cyclooxygenase-2**

Frei im Zytosol vorliegende Arachidonsäure kann durch die Cyclooxygenase zu wichtigen Entzündungsmediatoren metabolisiert werden. Bislang wurden zwei Isoformen der Cyclooxygenase charakterisiert, die COX-1 und COX-2. Die COX-1 ist in fast allen Geweben ein konstitutiv exprimiertes Enzym, während die Transkription der COX-2 nur in einigen Zelltypen erfolgt und dort durch mitogene sowie inflammatorische Stimuli, wie beispielsweise durch Zytokine und oxidativen Stress, schnell induziert wird. Die COX-2 übernimmt vorwiegend bei pathophysiologischen Prozessen eine bedeutende Rolle. So konnte in malignen Tumoren der Lunge eine verstärkte Expression der COX-2, aber auch eine erhöhte Prostaglandin Konzentration, festgestellt werden (Soslow *et al.* 2000). Prostaglandine werden mit Hilfe der COX und spezifischen Prostaglandinsynthasen aus der Arachidonsäure synthetisiert. Ihre Halbwertszeit ist sehr kurz, weshalb sich ihre Wirkung vorwiegend auf autokrine oder parakrine Weise äußert. Eine wichtige Rolle der Prostaglandine wird in der Entstehung von Entzündungsreaktionen postuliert. Ein wichtiger Vertreter stellt dabei Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) dar. Da sowohl die Induzierbarkeit der COX-2, als auch die Synthese von PGE<sub>2</sub>, als Marker einer Entzündungsreaktion gelten, wurde in der vorliegenden Arbeit dieser Weg der Arachidonsäuremetabolisierung näher analysiert. Die Untersuchung zur Expression der COX-2 in RAW264.7 Makrophagen wurde auf Proteinebene mittels Western Blot durchgeführt (Abb. 48). Hierfür wurden die Makrophagen mit 15,6 µg/cm<sup>2</sup> MAF02 über einen Zeitraum von fünf Stunden behandelt, danach geerntet und lysiert. Die anschließende Western Blot Analyse wurde mit spezifischen Antikörpern gegen die COX-1 und COX-2 durchgeführt. Ergänzend zur Proteinexpression erfolgte die Analyse der PGE<sub>2</sub>-Synthese mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Enzym-Immunoassays. Der Gehalt an PGE<sub>2</sub> wurde im Überstand des Zellkulturmediums der RAW264.7 Zellen nach MAF02 Belastung bestimmt (Abb. 49).

Wie in der Literatur beschrieben wurde die COX-1 in RAW264.7 Zellen konstitutiv exprimiert, die Menge an COX-1 war in jedem Ansatz nahezu identisch, es konnte keine Induktion nachgewiesen werden. Die Western Blot Analyse der COX-2 zeigte hingegen eine zeitabhängige Zunahme der Menge der COX-2 Proteine. Innerhalb der ersten Stunde nach Partikelbelastung konnte kein Anstieg der COX-2 Expression beobachtet werden, während nach zweieinhalb Stunden eine schwache Steigerung der Expression zu erkennen war. Des Weiteren war im Vergleich zur unbehandelten

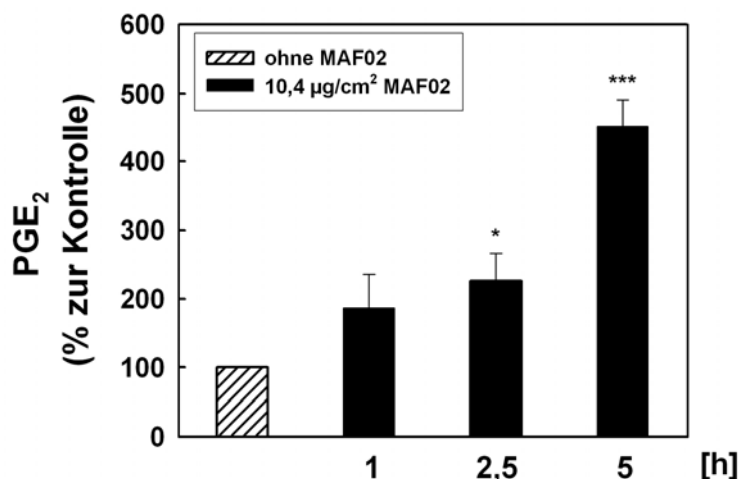
Kontrolle ein deutlicher Anstieg der Expression nach einer fünfstündigen Behandlung mit  $15,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) MAF02 detektierbar.



**Abb. 48: MAF02 Partikel induzieren eine zeitabhängige Expression der Cyclooxygenase-2 in RAW264.7 Makrophagen**

RAW264.7 Makrophagen waren unbehandelt (-) oder wurden mit  $15,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  MAF02 Partikeln ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) behandelt. In einem Zeitraum von 1, 2,5 und 5 Stunden nach der Behandlung wurden die Zellen geerntet und lysiert. Im Anschluss wurden die Lysate im Western Blot auf die Induktion der Cyclooxygenase-1 (COX-1) und Cyclooxygenase-2 (COX-2) hin untersucht. Als Ladekontrolle erfolgte die Detektion von p38 bzw. ERK1/2. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei voneinander unabhängigen Versuchen.

Die COX-2 vermittelte Synthese von  $\text{PGE}_2$  nach Partikelbehandlung folgte einem ähnlichen Zeitverlauf. Es konnte nach einer einstündigen Partikelbelastung mit einer Dosis von  $10,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) eine schwache  $\text{PGE}_2$  Synthese gemessen werden. Der  $\text{PGE}_2$  Gehalt stieg nach zweieinhalb Stunden MAF02 Exposition weiter an und erreichte sein Maximum nach fünf Stunden, was einer Steigerung um das viereinhalbfache, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, entspricht. Somit konnte gezeigt werden, dass die gesteigerte Proteinbildung der COX-2 nach MAF02 Exposition mit einer erhöhten Enzymaktivität einhergeht.



**Abb. 49: Prostaglandin E<sub>2</sub>-Titer im Zellkulturmedium nach MAF02 Behandlung in RAW264.7 Makrophagen**

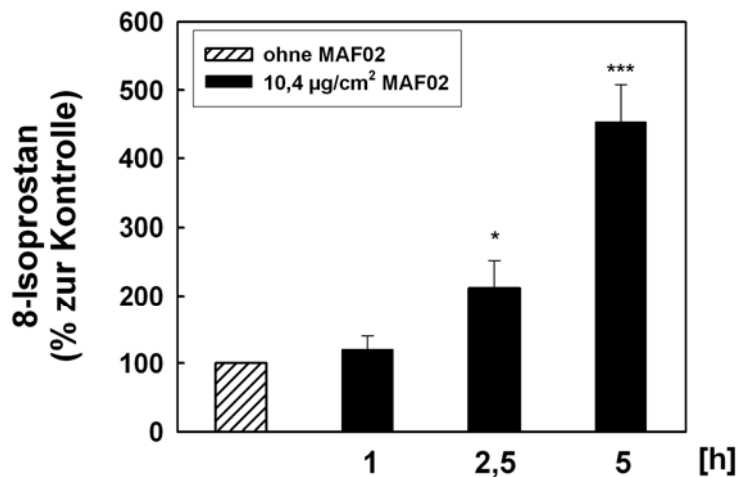
RAW264.7 Zellen wurden mit 10,4 µg/cm<sup>2</sup> MAF02 Partikeln (50 µg/ml) für 1, 2,5 oder 5 h behandelt. Zur Bestimmung der PGE<sub>2</sub> Konzentration, wurde der zellfreie Mediumüberstand anschließend gesammelt und mittels eines Enzym-Immunoassays (EIA; Cayman Chemical Company) analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM der PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen im Medium relativ zur unbehandelten Kontrolle aus drei unabhängigen Versuchen (\* p < 0,05, \*\*\* p < 0,001 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle).

### 3.8 Bildung von 8-Isoprostan

Wie bereits in Kapitel 3.2.1 demonstriert, kommt es während der Belastung der RAW264.7 Zelllinie mit MAF02 Partikeln zur Generierung von ROS. Aus diesem Grund war damit zu rechnen, dass eine ROS-vermittelte Lipidperoxidation stattfindet. Im Zuge der Lipidperoxidation entstehen nicht-enzymatisch sowohl *in vitro* als auch *in vivo* aus der Arachidonsäure Isoprostane (Beck-Speier *et al.* 2006; Montuschi *et al.* 2000). Isoprostane sind chemisch stabile Substanzen prostaglandin-ähnlicher Struktur. Unter normalen physiologischen Bedingungen liegt der überwiegende Teil der Arachidonsäure in Zellmembranen in Phospholipiden verankert vor. Bei der Aktivierung der PLA<sub>2</sub> kommt es zur Freisetzung der Arachidonsäure, anschließend wird die freie Arachidonsäure enzymatisch metabolisiert. Im Gegensatz dazu bewirken ROS die nicht-enzymatische Bildung von Isoprostanen aus Arachidonsäure, die verestert mit Phospholipiden in der Membran vorliegt. Ebenso wie die Arachidonsäure werden Isoprostane durch Phospholipasen A<sub>2</sub> freigesetzt (Morrow *et al.* 1992). Ein wichtiger Vertreter der Isoprostane ist das 8-Isoprostan, welches ein ausgezeichneter Marker von *in vivo* vorherrschendem oxidativem Stress darstellt.

In dieser Arbeit sollte nun mit Hilfe eines Enzym-Immunoassays der Frage nachgegangen werden, ob Flugaschepartikel zu einer Entstehung von 8-Isoprostanen in der Maus-Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 führt.

Abb. 50 zeigt die Ergebnisse hinsichtlich der 8-Isoprostan Synthese im Zellüberstand der RAW264.7 Zellen, nachdem diese über einen Zeitraum von fünf Stunden mit  $10,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  MAF02 behandelt wurden. Erwartungsgemäß verlief die Bildung von 8-Isoprostan zeitabhängig. Während nach einer Stunde keine Änderung des Gehalts an 8-Isoprostan im Vergleich zum unbehandelten Kontrollansatz messbar war, konnte nach zweieinhalb Stunden eine zweifach gesteigerte und nach fünf Stunden eine viereinhalbfach gesteigerte 8-Isoprostan Konzentration gemessen werden.



**Abb. 50: 8-Isoprostan Gehalt im Zellkulturmedium nach MAF02 Behandlung in RAW264.7 Makrophagen**

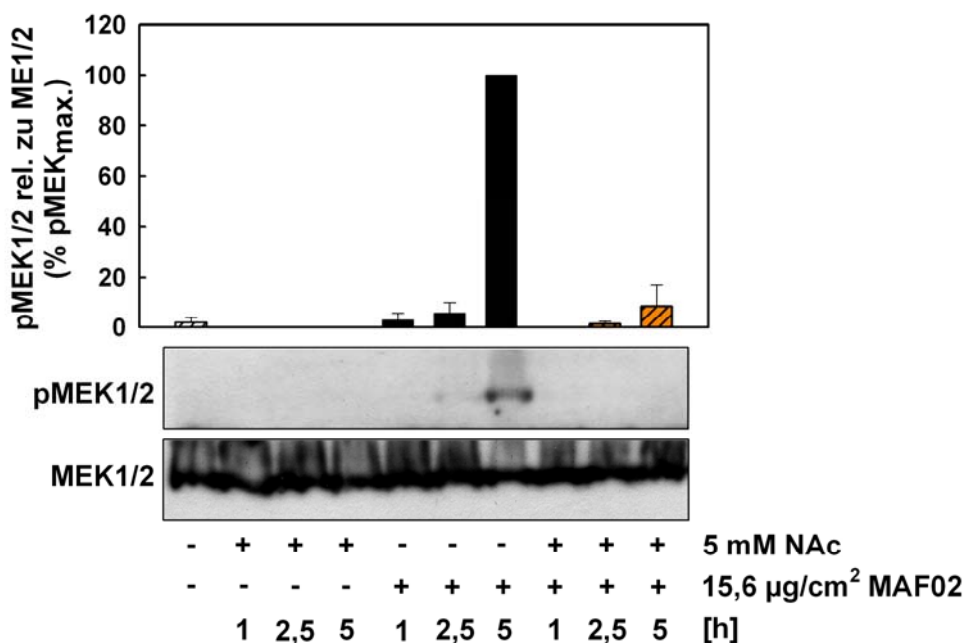
RAW264.7 Zellen wurden mit  $10,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  MAF02 Partikeln ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) über einen Zeitraum von 5 h behandelt. Zur Bestimmung des 8-Isoprostan Gehalts, wurde der zellfreie Mediumüberstand mit Hilfe eines Enzym-Immunoassays (EIA; Cayman Chemical Company) analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM der 8-Isoprostan-Konzentrationen im Medium relativ zur unbehandelten Kontrolle aus drei unabhängigen Versuchen (\*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle).

### **3.9 Zusammenhang zwischen der MAP Kinase Aktivierung und der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies**

Auf der einen Seite konnte bereits gezeigt werden, dass bei Belastung der RAW264.7 Makrophagen mit Flugaschepartikeln reaktive Sauerstoffspezies gebildet werden. Auf der anderen Seite bewirkten die Partikel eine von der ERK1/2 Aktivierung abhängige Arachidonsäurefreisetzung. Durch den Einsatz von NAc konnte des Weiteren demonstriert werden, dass eine ROS-induzierte Mobilisation der Arachidonsäure vorliegt. Folglich stellte sich die Frage, ob ROS die stromaufwärts gelegenen Proteine, nämlich die MAPK, als initialen Schritt der Arachidonsäurekaskade aktivieren.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Generierung von ROS und der Aktivierung von MAPK nach Partikelbehandlung zu untersuchen, sollten RAW264.7 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von NAc 30 Minuten vorinkubiert werden. Nach einer Behandlung der Zellen mit  $15,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  MAF02 ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) über einen Zeitraum von fünf Stunden, wurden die Zellen geerntet und der Western Blot Analyse unterzogen. Die Aktivierung der MAP Kinasen wurde unter Verwendung phosphospezifischer Antikörper bestimmt. Die Bande mit der maximalen Intensität, welche der maximalen Aktivierung entspricht, wurde gleich 100% gesetzt und die Intensität der Immunsignale der übrigen Banden auf die maximale Phosphorylierung normiert.

Die quantitativen Analysen der MEK1/2- sowie ERK1/2-Aktivierung sind in den Abb. 51 und Abb. 52 dargestellt. Die Vorbehandlung der Zellen mit 5 mM NAc führte zu einer vollständigen Hemmung der MEK1/2-Phosphorylierung innerhalb des gesamten Behandlungszeitraums (Abb. 51).

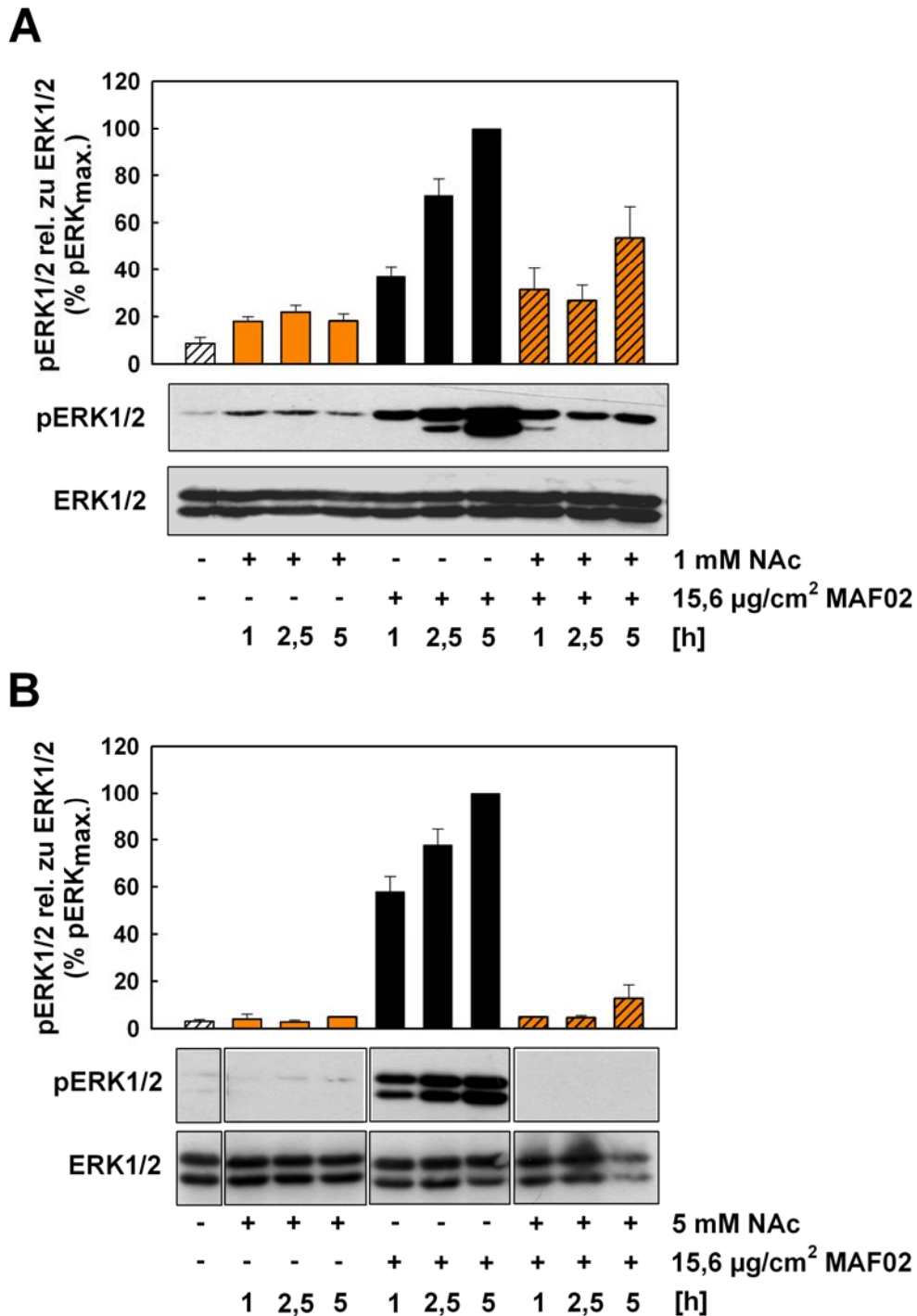


**Abb. 51: Effekt des Antioxidanz N-Acetylcystein (NAC) auf die MAF02-induzierte Aktivierung der MAP Kinase MEK1/2**

RAW264.7 Makrophagen wurden für 30 min entweder in normalem Kulturmedium (-) oder in 5 mM NAc-haltigem Kulturmedium vorinkubiert. Daraufhin wurden die Zellen unbehandelt belassen oder über einen Zeitraum von 5 Stunden mit 15,6 µg/cm<sup>2</sup> MAF02 Partikeln (50 µg/ml) behandelt. Nach der Ernte und Lyse der Zellen wurden die Zelllysate im SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe von phosphospezifischen MEK1/2 Antikörpern im Western Blot untersucht. Als Ladekontrolle diente die Detektion von MEK1/2. Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot dreier, voneinander unabhängiger Versuche sowie die Mittelwerte ± SEM der optischen Dichte der pMEK1/2-Banden in Relation zu den zugehörigen MEK1/2-Banden und normiert auf die maximale MEK1/2 Aktivierung.

Die zeitabhängige MAF02-induzierte Aktivierung der ERK1/2 konnte in einer konzentrationsabhängigen Art und Weise mit NAc inhibiert werden (Abb. 52). Wurden die Zellen mit 1mM NAc vorbehandelt, reduzierte sich die Menge an phosphoryliertem ERK1/2 auf die Menge, die nach einer Stunde MAF02 Belastung ohne NAc-Behandlung vorlag. Durch den Einsatz von 5 mM wurde die Partikelbedingte ERK1/2 Aktivierung vollständig unterdrückt. Dies war zu erwarten, da die MEK1/2 durch Phosphorylierung die Aktivierung der ERK1/2 induziert. Zellen, die nur mit NAc inkubiert wurden, zeigten keinen wesentlichen Unterschied zu unbehandelten Kontrollzellen.

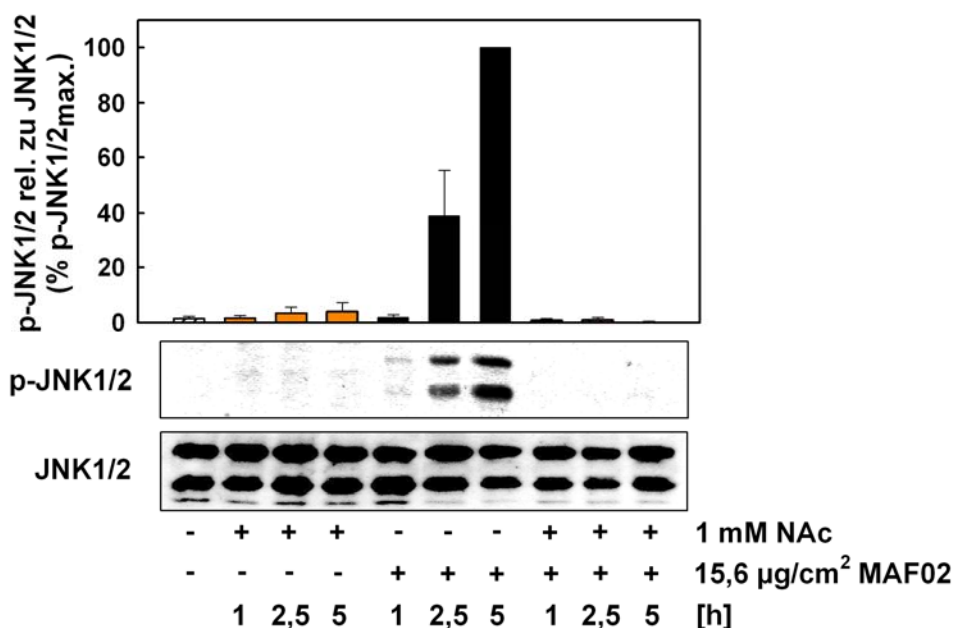




**Abb. 52: Das Antioxidanz N-Acetylcystein (NAc) reduziert konzentrationsabhängig die MAF02-induzierte Aktivierung der MAP Kinase ERK1/2**

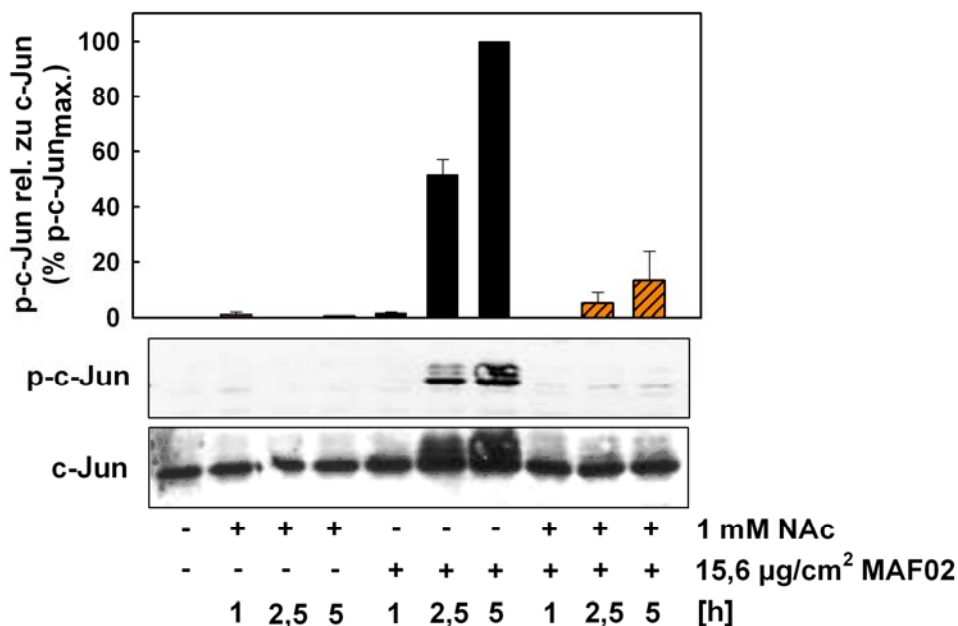
RAW264.7 Zellen wurden für 30 min entweder in normalem Kulturmedium (-) oder in 1 mM NAc-haltigem (A) sowie in 5 mM NAc-haltigem Kulturmedium (B) vorinkubiert und daraufhin für 1, 2,5 und 5 Stunden mit 15,6 µg/cm<sup>2</sup> MAF02 (50 µg/ml) behandelt, geerntet und lysiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung im SDS-PAGE erfolgte die Detektion von phosphorylierter ERK1/2 Kinase mittels phosphospezifischer Antikörper im Western Blot. Zur Kontrolle, ob in jeder Spur identische Mengen der Zelllysate aufgetragen worden sind, wurde die Membran gestrippt und anschließend mit ERK1/2 Antikörpern untersucht. Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot dreier, unabhängiger Versuche sowie im Diagramm die Mittelwerte ± SEM der relativen optischen Dichte der Banden. Bei der Auswertung wurde der Anteil an phosphorylierter ERK1/2 quantifiziert, in Relation zur nicht-phosphorylierten Form gesetzt und auf die maximale Aktivierung der phosphorylierten ERK1/2 normiert.

Interessanterweise bewirkte die Vorinkubation der Zellen mit 1 mM NAc eine vollständige Inhibierung der Phosphorylierung bzw. der damit verbundenen Aktivierung der JNK1/2 (Abb. 53). Die Vorbehandlung mit 1 mM NAc reduzierte ebenfalls die MAF02-induzierte c-Jun Phosphorylierung, wobei das Immunsignal dem Hintergrundsignal entsprach (Abb. 54). Eine Konzentration von 5 mM NAc erbrachte keine weitere Steigerung des Effekts bei p-JNK1/2 als auch bei p-c-Jun (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 53: Das Antioxidanz N-Acetylcystein (NAc) inhibiert die MAF02-induzierte Aktivierung der c-Jun NH<sub>2</sub>-terminalen Kinase (JNK)**

RAW264.7 Zellen wurden für 30 min entweder in normalem Kulturmedium (-) oder in 1 mM NAc-haltigem Medium kultiviert. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit 15,6 µg/cm<sup>2</sup> MAF02 Partikeln (50 µg/ml) über einen Zeitraum von 5 Stunden. Die Zellen wurden nach Behandlungsende lysiert und mit phosphospezifischen Antikörpern im Western Blot auf die JNK hin analysiert. Des Weiteren erfolgte nach dem Strippen der Membran eine Kontrolle der eingesetzten Proteinmenge mit Hilfe des JNK1/2 Antikörpers. Dargestellt ist sowohl eine repräsentative Western Blot Analyse als auch eine densitometrische Auswertung dreier voneinander unabhängiger Versuche. Hierfür wurden die Proteinbanden der phosphorylierten JNK densitometrisch ausgewertet und ihre optischen Dichten auf die der JNK Ladekontrolle in Relation gesetzt. Die jeweiligen Quotienten wurden auf die maximale Phosphorylierungsänderung normiert.



**Abb. 54: Das Antioxidanz N-Acetylcystein (NAC) inhibiert die MAF02-induzierte Aktivierung von c-Jun**

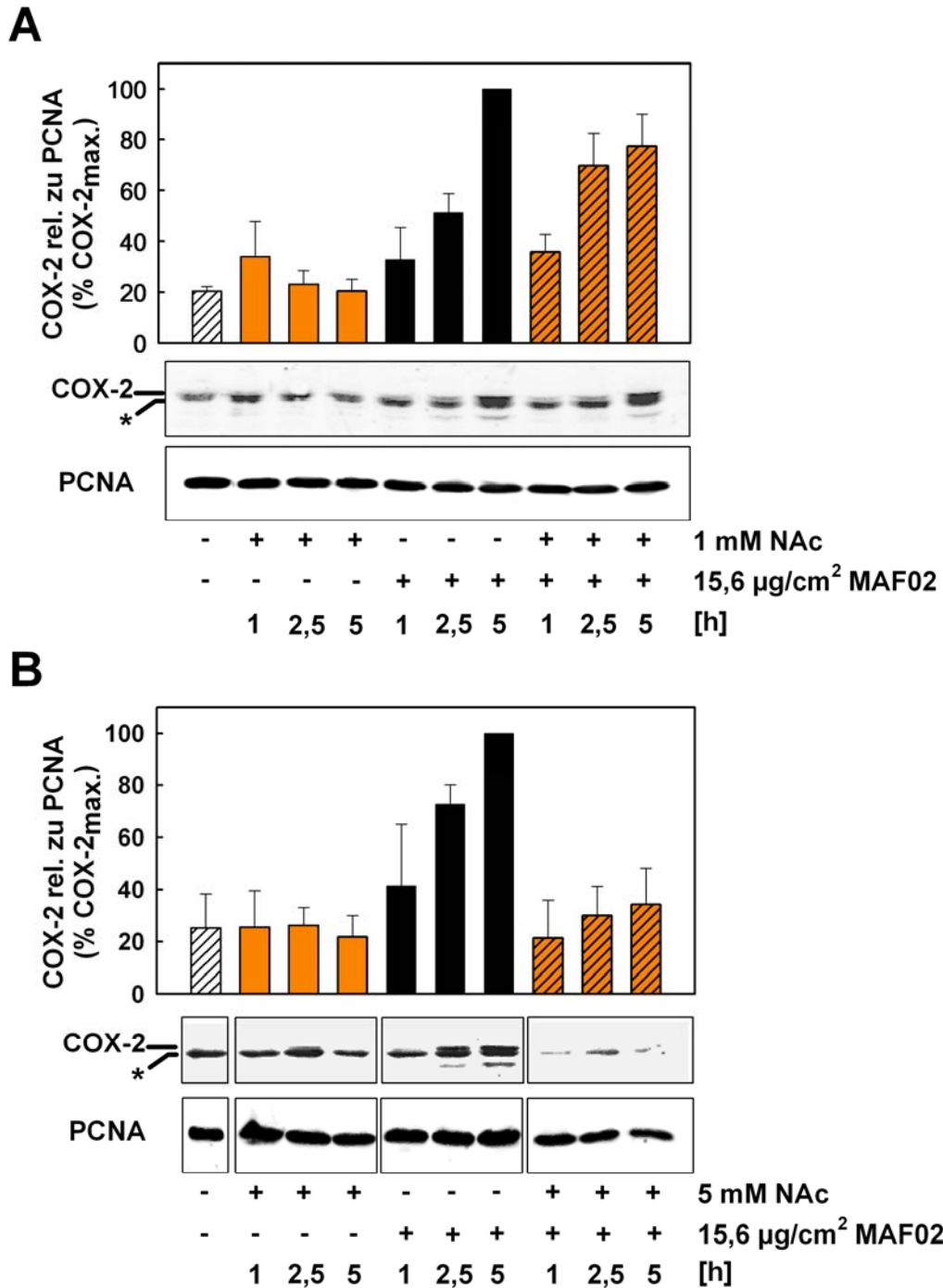
RAW264.7 Zellen wurden für 30 min entweder in normalem Kulturmedium (-) oder in 1 mM NAc-haltigem Medium kultiviert. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit 15,6 µg/cm<sup>2</sup> MAF02 Partikeln (50 µg/ml) über einen Zeitraum von 5 Stunden. Die Zellen wurden nach Behandlungsende lysiert und mit phosphospezifischen Antikörpern im Western Blot sowohl auf die JNK als auch auf die c-Jun Kinase hin analysiert. Des Weiteren erfolgte nach dem Strippen der Membran eine Kontrolle der eingesetzten Proteinmenge mit Hilfe des c-Jun Antikörpers. Dargestellt ist sowohl eine repräsentative Western Blot Analyse als auch eine densitometrische Auswertung dreier voneinander unabhängiger Versuche. Hierfür wurden die Proteinbanden der phosphorylierten c-Jun densitometrisch ausgewertet und ihre optischen Dichten auf die der c-Jun Ladekontrolle in Relation gesetzt. Die jeweiligen Quotienten wurden auf die maximale Phosphorylierungsänderung normiert.

### 3.10 N-Acetylcystein reduziert die MAF02-bedingte Cyclooxygenase-2 Induktion

In der Literatur wird beschrieben, dass die Dysregulation der COX-2 aus einer verstärkten Bildung von ROS resultiert (Lu and Wahl 2005). Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit der Frage nachgegangen werden, inwieweit oxidativer Stress bei der MAF02-induzierten COX Expression eine Rolle spielt. Auch hier wurde das Antioxidanz N-Acetylcystein eingesetzt, um dieses auf seinen protektiven Effekt hin zu untersuchen. NAc wurde 30 min vor der Partikelbehandlung in verschiedenen Konzentrationen dem Medium zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer, zweieinhalb und fünf Stunden wurden die Zellen schließlich geerntet, lysiert und die Induktion der COX-2 im Western Blot Verfahren bestimmt (Abb. 55). Dafür wurde

erneut der in den vorangegangenen Experimenten eingesetzte COX-2 Antikörper, der spezifisch die COX-2 detektierte, von der Firma *Cayman Chemical Company* (USA) bezogen (vgl. Abb. 48). Dieser COX-2 Antikörper zeigte im Vergleich zum ersten keine Spezifität gegenüber der COX-2. Im Western Blot wurde eine weitere Proteinbande unterhalb des COX-2 Immunsignals detektiert. Hier erfolgte mit hoher Wahrscheinlichkeit die Detektion der Cyclooxygenase-1.

Betrachtet man die Wirkung von 1 mM NAc, so erkennt man keine Reduktion der COX-2 Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Wurden dagegen die Zellen mit einer NAc-Konzentration von 5 mM behandelt, so war eine vollständige Inhibierung der COX-Induktion detektierbar. Dieses Ergebnis belegt, dass MAF02-induzierte ROS zur Induktion der COX-2 beitragen.



**Abb. 55: Das Antioxidanz N-Acetylcystein (NAc) reduziert die MAF02-bedingte Induktion der Cyclooxygenase-2 (COX-2)**

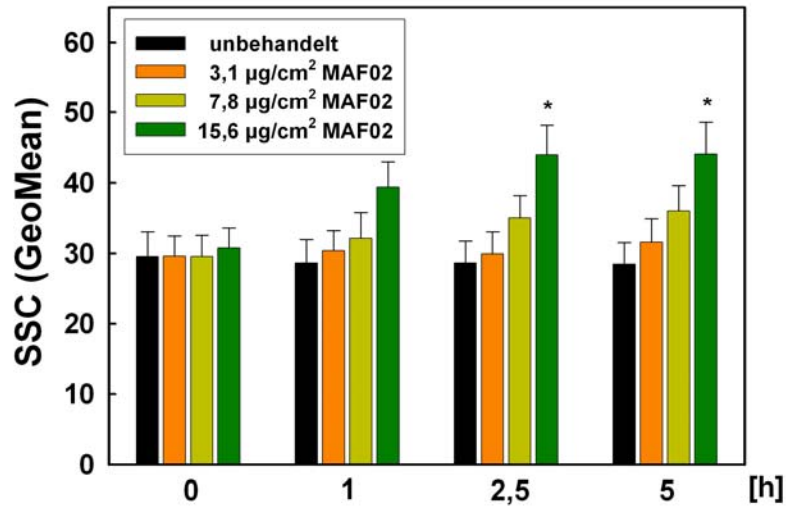
RAW264.7 Zellen wurden für 30 min entweder in normalem Kulturmedium (-) oder in 1 mM NAc-haltigem (A) sowie in 5 mM NAc-haltigem Kulturmedium (B) präinkubiert. Daraufhin wurden die Zellen unbehandelt belassen oder für 1, 2,5 und 5 Stunden mit 15,6 µg/cm<sup>2</sup> MAF02 Partikeln (50 µg/ml) behandelt. Nach der sich anschließenden Ernte und Lyse der Makrophagen wurden die Zelllysate im SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe des COX-2 Antikörpers im Western Blot analysiert. Der Stern (\*) kennzeichnet das unspezifische COX-1 Immunsignal. Als Ladekontrolle erfolgte die Detektion von PCNA. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot dreier, voneinander unabhängiger Versuche sowie im Diagramm die Mittelwerte ± SEM der relativen optischen Dichten der Banden. Bei der densitometrischen Auswertung wurde der Anteil an COX-2 Protein quantifiziert, zur jeweiligen PCNA Ladekontrolle in Relation gesetzt, und auf die maximale COX-2 Induktion normiert.

### **3.11 Aufnahme der Flugaschepartikel in Maus-Makrophagen**

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob die zuvor gezeigten zellulären Effekte lediglich mit dem Anheften der Partikel auf der Zelloberfläche assoziiert sind oder mit der Aufnahme von MAF02 Partikeln in RAW264.7 Zellen einhergehen.

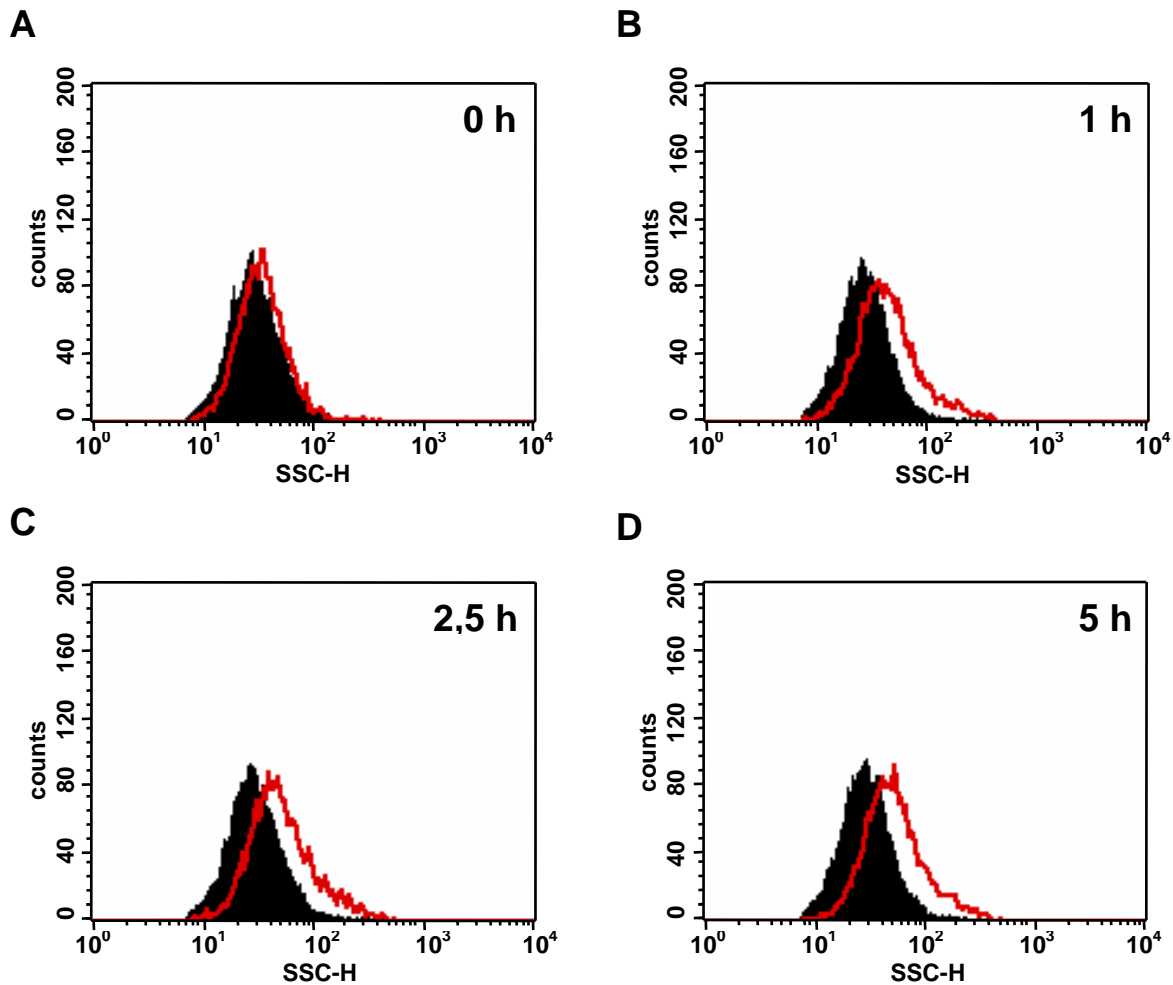
Zur Klärung dieser Fragestellung wurde die FACS-Analyse (*Fluorescence Cytometry*) angewandt. Diese stellt ein schnelles und einfaches Verfahren dar, um die Aufnahme der MAF02 Partikel zu untersuchen. Dabei wird mit dem SSC (*sidescatter*) die Granularität der Zellen erfasst. Nehmen Zellen Partikel auf, so erhöht sich deren intrazelluläre Komplexität und damit ihre Granularität. Um zu überprüfen, ob eine Granularitätsänderung infolge von Partikelbehandlung stattfindet, wurden RAW264.7 Zellen für null Stunden, d.h. die Zellen wurden mit der Partikellösung inkubiert und der Mediumüberstand sofort wieder entfernt, für eine, zweieinhalb und fünf Stunden mit verschiedenen Dosen von MAF02 Partikeln behandelt. Die Zellen wurden im Anschluss geerntet und direkt für die FACS-Analyse vorbereitet.

Abb. 56 demonstriert die zeit- und dosisabhängige Veränderung der SSC-Fluoreszenz, wobei der geometrische Mittelwert des SSC der verschiedenen Versuchsätze dargestellt ist. Abb. 57 zeigt beispielhaft die Histogramme für verschiedene Zeitpunkte, wobei die SSC-Werte von unbehandelten und von  $15,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  MAF02 behandelten Zellen übereinandergelegt wurden. Die geometrischen Mittelwerte der SSC-Fluoreszenzen zeigten eindeutig eine dosis- und zeitabhängige Zunahme der Granularität der Makrophagen nach MAF02 Exposition. In den SSC-Overlays kann man ebenfalls deutlich erkennen, dass sich die Granularität der Zellen aufgrund der Inkubation der Zellen mit MAF02 Partikeln zeitabhängig erhöht. Es zeigte sich nur eine geringe Änderung der Granularität von Zellen, die für null Stunden mit MAF02 Partikeln behandelt wurden. Aber bereits infolge einer Behandlungszeit von einer Stunde war ein Anstieg der Granularität messbar, der bis zur zweieinhalb Stunden Inkubation weiter anstieg, um dann nach fünf Stunden ein Plateau zu erreichen.



**Abb. 56: Zunahme der Granularität von RAW264.7 Makrophagen nach Behandlung mit MAF02 Partikeln**

RAW264.7 Zellen wurden mit 3,1 µg/cm<sup>2</sup>, 7,8 µg/cm<sup>2</sup>, 15,6 µg/cm<sup>2</sup> MAF02 Partikeln (10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml) für null, eine, zweieinhalb und fünf Stunden behandelt. Bei der 0 h Inkubation wurde die Partikelsuspension sofort wieder abgenommen. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet und direkt zur FACS-Analyse eingesetzt. Der Parameter SSC (*sidescatter*) beschreibt den Granularitätsgehalt der RAW264.7 Zellen. Dargestellt sind die gemittelten geometrischen Mittelwerte ± SEM der Fluoreszenzintensität im SSC-Kanal aus fünf unabhängigen Experimenten (\* p < 0,05 im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen).



**Abb. 57: RAW264.7 Makrophagen nehmen MAF02 Partikel auf**

RAW264.7 Zellen wurde mit  $15,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  MAF02 Partikel ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) für null, eine, zweieinhalb und fünf Stunden inkubiert. Bei der 0 h Inkubation wurde die Partikelsuspension sofort wieder abgenommen. Außerdem erfolgte eine ein-, zweieinhalb- und fünfstündige Behandlung mit MAF02 Partikeln. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet und direkt zur FACS-Analyse eingesetzt. Der Parameter SSC (*sidescatter*) beschreibt die Granularität der RAW264.7 Zellen. Dargestellt sind repräsentative Histogramme von unbehandelten und behandelten Zellen, die übereinander gelegt wurden. Die schwarzen Kurven entsprechen den unbehandelten Zellen, während die roten Kurven die Partikel-behandelten Zellen darstellen.

Durch die FACS-Analyse wurde die Aufnahme der MAF02 Partikel bewiesen. Wo die Partikel in den Zellen lokalisiert sind, konnte aber mit dieser Methode nicht überprüft werden. Mittels Lichtmikroskopie konnte demonstriert werden, dass sich Partikel innerhalb der untersuchten Expositionszeiten auf den Makrophagen absetzten (Daten nicht gezeigt). Diese Untersuchungen sagten aber nichts darüber aus, ob die Partikel in die Zellen aufgenommen wurden oder nur auf deren Oberfläche lokalisiert waren. Deshalb wurde zur eindeutigen Lokalisation der Partikel die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen



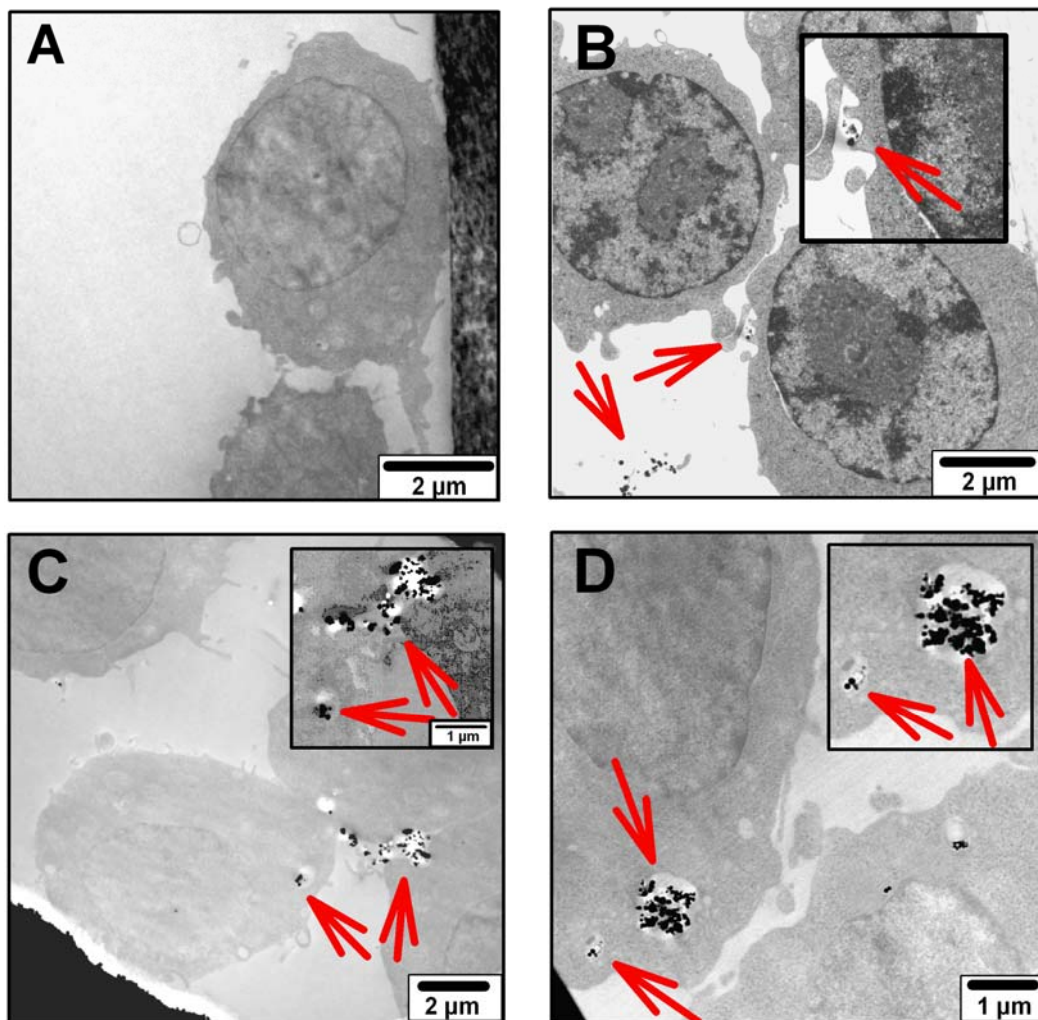
eine, zweieinhalb und fünf Stunden mit  $10,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) MAF02 Partikeln behandelt und daraufhin für die TEM-Analyse vorbereitet und präpariert.

In Abb. 58 sind exemplarisch Aufnahmen der TEM-Analyse abgebildet. Innerhalb der gesamten Belastungszeit zeigten die RAW264.7 Zellen typische morphologische Merkmale der Makrophagen. Deutlich ausgeprägt waren die Mikrovilli (zytoplasmatische Ausstülpungen), mit Hilfe derer die Makrophagen befähigt sind Phago- und Pinocytose zu betreiben. Weiter konnte man eindeutig die für Makrophagen charakteristischen großen Zellkerne erkennen. Im Zytoplasma konnten das Endoplasmatische Retikulum, Mitochondrien und Endosomen detektiert werden. Die unbehandelten Kontrollzellen (Abb. 58 A) wiesen weder Partikel noch Partikelaggregate auf der Zelloberfläche oder im Zytoplasma auf. Bei Zellen, die eine Stunde mit  $10,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) MAF02 behandelt waren, konnten im Zytoplasma nur wenige Partikel gefunden werden. Auf der Zelloberfläche hingegen waren vereinzelt elektronendichte MAF02 Partikel lokalisiert, die häufig von charakteristischen Ausstülpungen der Makrophagen umgeben waren (Abb. 58 B). Im Unterschied dazu waren nach einer zweieinhalbstündigen Behandlung Partikelaggregate, aber auch Primär-Partikel, frei oder membranumhüllt im Zytosol zu erkennen (Abb. 58 C). Auch nach einer Behandlungszeit von fünf Stunden wurden Partikel im Zytosol detektiert (Abb. 58 D). Hierbei lagen diese als Partikelaggregate oder als einzelne Partikel im Zytosol vor. Um die Partikel waren Membranstrukturen zu erkennen, was auf eine Phagozytierung der Partikel, bei der über die Einschnürung der äußeren Zellmembran feste Stoffe ins Zellinnere aufgenommen werden, hindeutet. Während der gesamten Behandlungszeit wurden Partikel weder im Endoplasmatischen Retikulum noch in Mitochondrien gefunden (Daten nicht gezeigt). Außerdem waren konträr zu anderen Arbeitsgruppen, die Partikel im nanoskaligen Bereich im Zellkern von Lungenzellen detektiert haben (Chen and von Mikecz 2005; Geiser *et al.* 2005) keine MAF02 Partikel im Nukleus zu erkennen.

Im Anschluss wurde nun unter Einsatz der Transmissionselektronenmikroskopie die Aufnahme der MAF02 Partikel in RAW264.7 Zellen quantifiziert, um diese statistisch bewerten zu können (Abb. 59). Dafür wurden auf jeweils zwei verschiedenen Membranabschnitten der präparierten *Grids* (s. Kapitel 2.11) die Anzahl der Zellen, die keine bzw. MAF02 Partikel inkorporiert hatten, ermittelt. Zur statistischen Auswertung wurden die MAF02 positiven Zellen in Bezug auf die Gesamtzellzahl

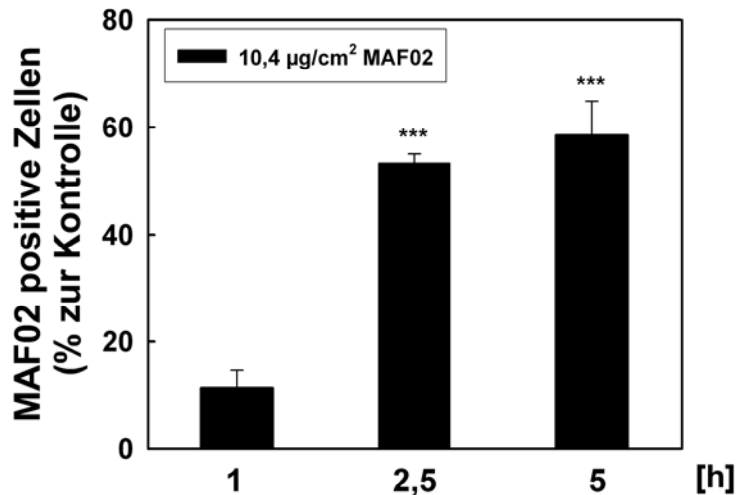
gesetzt. Das Ergebnis der Auszählung korreliert mit den Daten der FACS-Analyse. Nach einer Stunde war die Aufnahme der Partikel nicht signifikant erhöht, während ein starker Anstieg der Anzahl der Zellen, die MAF02 aufgenommen hatten, nach zweieinhalb Stunden stattfand. Die Aufnahme schien hier ihre Sättigung zu erreichen, da nach einer fünfstündigen Behandlung keine weitere, signifikante Änderung zu verzeichnen war.

Zusammenfassend unterstützen diese Ergebnisse die Hypothese, dass die Aufnahme der Partikel in die Zellen mit einer Induktion der zellulären Effekte einhergeht. Welcher Aufnahmemechanismus für den Transport der Partikel verantwortlich ist, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden.



**Abb. 58: Transmissionselektronenmikroskopie von MAF02 behandelten RAW264.7 Makrophagen**

RAW264.7 Zellen wurden entweder unbehandelt belassen (A) oder mit  $10,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  MAF02 Partikeln ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) über einen Zeitraum von einer (B), zweieinhalb (C) oder fünf (D) Stunden behandelt und anschließend für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) vorbereitet. Dargestellt sind repräsentative TEM-Aufnahmen der jeweiligen Versuchsansätze. Die roten Pfeile markieren die mikroskopisch detektierten MAF02 Partikel.



**Abb. 59: Quantifizierung der zeitabhängigen Aufnahme von MAF02 Partikeln in RAW264.7 Zellen**

RAW264.7 Zellen wurden unbehandelt belassen oder mit  $10,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  MAF02 Partikeln für eine, zweieinhalb und fünf Stunden behandelt. Anschließend wurden die Zellen für die TEM-Analyse präpariert. Die Quantifizierung der MAF02 positiven Zellen erfolgte durch die Transmissionselektronenmikroskopie. Hierbei wurde pro Versuchsansatz ein Membranabschnitt nach Zellen, die MAF02 inkorporiert hatten, und solchen, die keine Partikel aufwiesen, ausgezählt und in Relation zur unbehandelten Kontrolle gesetzt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen (\*\*\*)  $p < 0,001$  im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen).

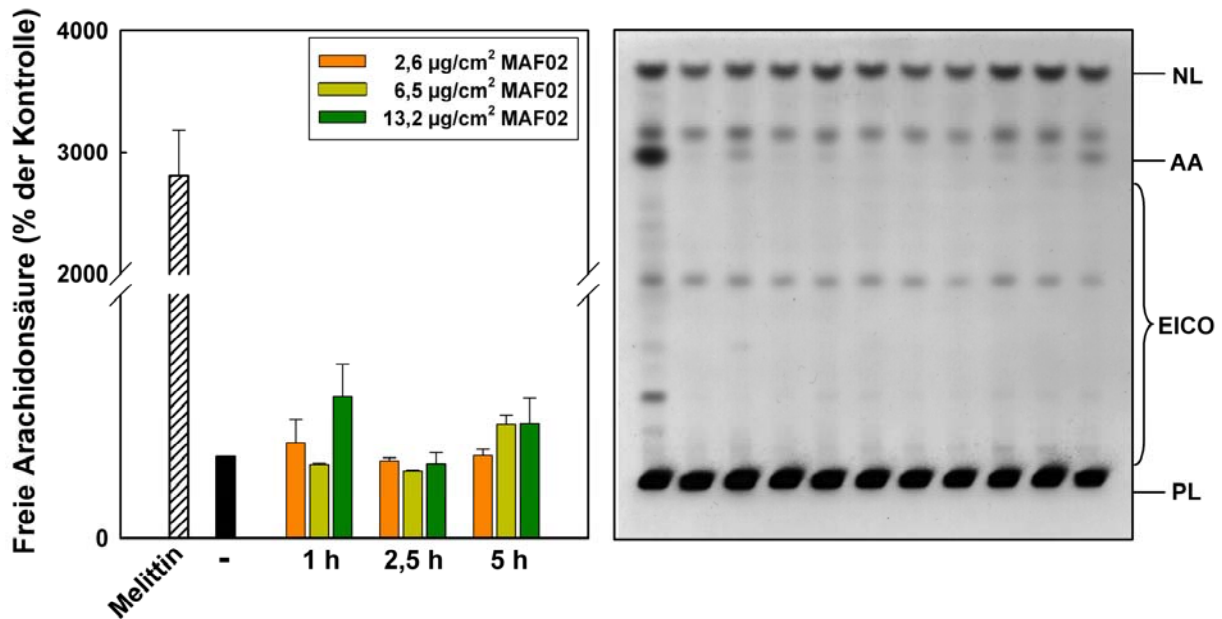
### **3.12 Etablierung eines Kokulturmodells - Freisetzung der Arachidonsäure nach Flugascheexposition**

Die Verwendung von Zelllinien bietet im Vergleich zu Tiermodellen ein standardisiertes, einfach zu handhabendes und kostengünstiges System unter kontrollierten Versuchsbedingungen. Die charakteristischen Merkmale der Zellen können über mehrere Passagen aufrechterhalten werden, was eine gute Reproduzierbarkeit der Versuche ermöglicht. Außerdem besteht durch den geringen Zeitaufwand die Möglichkeit, umfangreiche *in vitro* Untersuchungen an Zellkulturen durchzuführen, was die Aufklärung physiologischer Prozesse auf zellulärer und molekularer Ebene deutlich vereinfacht. Hierbei richten die meisten Studien ihren Fokus auf die Verwendung eines Zelltyps. Vernachlässigt wird dabei aber die komplexere *in vivo* Situation, die vorherrschende interzelluläre Kommunikation zwischen den verschiedenen Zelltypen und Geweben. Die Ausschüttung von Mediatoren wie beispielsweise von Prostaglandinen spielt eine wichtige Rolle in der interzellulären Kommunikation. Und gerade bei inhalationstoxikologischen

Fragestellungen ist die Interaktion der verschiedenen Lungenzelltypen von besonderem Interesse.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Aufklärung dieser Zell-Zell-Interaktionen der Einfluss von Flugaschepartikeln auf die Arachidonsäurefreisetzung in einem Kokultursystem untersucht. Nach der Deposition von Partikeln in der Lunge sind vorwiegend zwei Zelltypen betroffen: Makrophagen und Epithelzellen, weshalb zur Etablierung des Kokultursystems zunächst nach einer geeigneten Epithelzelllinie, die mit den untersuchten RAW264.7 kompatibel ist, gesucht wurde. Für die Kokultivierung schien die murine Lungenepithelzelllinie LA-4 geeignet zu sein, da sie aus den Alveolen einer Tumor-induzierten Maus stammen und charakteristische Merkmale von Epithelzellen aufweisen. Zudem konnten sowohl LA-4 Zellen als auch RAW264.7 Zellen im identischen Zellkulturmedium kultiviert werden, was die Handhabung des Zellkulturmodells stark vereinfachte.

Vor dem Einsatz im Kokultursystem wurde die LA-4 Zelllinie zuerst in Bezug auf die Arachidonsäurefreisetzung nach Partikelbehandlung überprüft. Die zeitabhängige Freisetzung der Fettsäure ist in der folgenden Abbildung dargestellt (Abb. 60). Es ist deutlich zu erkennen, dass sich der Anteil an freier Arachidonsäure während der Partikelexposition im Zeitraum von fünf Stunden im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen keinesfalls erhöhte. Allein die Inkubation der Epithelzellen mit Melittin, welches Hauptbestandteil des Bienengiftes ist und einerseits ein potenter Aktivator der cPLA<sub>2</sub> darstellt und andererseits die Cytolyse auslöst, bewirkte eine 30-fach erhöhte Mobilisation der Arachidonsäure.



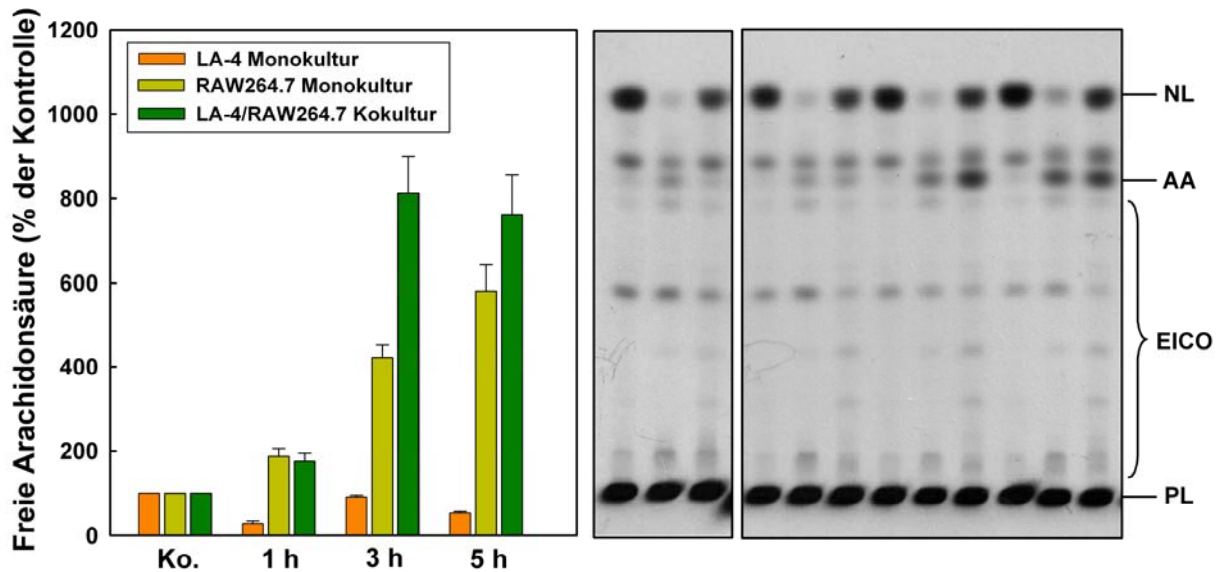
**Abb. 60: Dosis- und zeitabhängige Freisetzung von Arachidonsäure aus zellulären Lipiden nach Behandlung der Lungenepithelzelllinie LA-4 mit MAF02 Partikeln**

$^{14}\text{C}$ -Arachidonsäure markierte LA-4 Epithelzellen wurden für 1, 2,5 und 5 Stunden mit 2,6, 6,5 und 13,2 µg/cm<sup>2</sup> Flugaschepartikeln (10, 25 und 50 µg/ml) oder mit 5 µg/ml Melittin behandelt. Daraufhin wurden die Zellen geerntet und einer Lipidextraktion unterzogen. Die Extrakte wurden anschließend dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt und die Lipide mittels Autoradiographie visualisiert. Die Intensitäten der Banden der freien Arachidonsäure wurden mit Hilfe der *Odyssey*<sup>®</sup> bzw. *OptiQuant Acquisition and Analysis Software* ermittelt. Gezeigt wird eine repräsentative Dünnschichtchromatographie (rechts) dreier, voneinander unabhängiger Versuche sowie die Mittelwerte ± SEM, wie sie sich aus der densitometrischen Auswertung der AA ergaben, in Relation zur unbehandelten Kontrolle (links). Die Anordnung der DC-Proben entspricht der im Diagramm. Abkürzungen: NL, Neutrallipide; AA, freie Arachidonsäure; EICO, Eicosanoide; PL, Phospholipide.

Für das Kokulturmodell wurden zuerst  $3 \times 10^5$  Epithelzellen pro Well in 12-Well-Platten ausgesät, und damit sich die Zellen am Zellkulturgefäß anheften konnten, wurde diese ÜN bei 37°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag erfolgte die Vorbereitung der RAW264.7 Makrophagen. Pro Versuchsansatz wurden  $5 \times 10^5$  Makrophagen ausgesät und zur Adhäsion für 6 Stunden im Brutschrank inkubiert. Inzwischen waren die Epithelzellen zu einer konfluenten Zellschicht gewachsen und die Makrophagen setzten sich auf diesen ab (Abb. 12). Zu diesem Zeitpunkt entsprach die Zellzahl der Makrophagen derjenigen, die in den Versuchen zur Arachidonsäureregulation eingesetzt wurden. Nun wurde der Mediumüberstand vollständig abgenommen, der Zellrasen mit Markierungsmedium bedeckt und ÜN im Brutschrank inkubiert. Pro Ansatz wurden 4 kBq  $^{14}\text{C}$ -Arachidonsäure eingesetzt. Nachdem die Inkubation beendet war, wurde das Markierungsmedium entfernt und

durch Kulturmedium ohne FCS ersetzt. Um eine vollständige Aufnahme und den Einbau der Arachidonsäure in die Phospholipide zu gewährleisten, wurden die kokultivierten Zellen erneut ÜN im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Partikelexposition der Zellen mit den angegebenen Dosen über einen Zeitraum von fünf Stunden. Die Freisetzung der Arachidonsäure aus LA-4 und RAW264.7 Zellen in Mono- und Kokultur ist in Abb. 61 illustriert. Hier konnte erneut demonstriert werden, dass Flugasche in LA-4 Epithelzellen keine nachweisbare Mobilisation der Arachidonsäure verursacht, bei den RAW264.7 Makrophagen jedoch erfolgte eine zeitabhängige Erhöhung der Menge an freier Arachidonsäure. Nach einer zweieinhalbstündigen Partikelexposition war eine vierfach erhöhte, nach einer fünfstündigen Behandlung eine sechsfach erhöhte Arachidonsäurefreisetzung nachweisbar. Interessanterweise stieg der Anteil mobilisierter Arachidonsäure in den Kokulturrexperimenten synergistisch nach an. Es konnte nach einer zweieinhalb und fünf Stunden Inkubation eine achtfache Zunahme der freien Arachidonsäure nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich beim Vergleich der hier gewonnenen Daten postulieren, dass das etablierte Kokultursystem mit einer Maus Epithelzelllinie und einer Makrophagen-Zelllinie in Bezug auf die Arachidonsäurefreisetzung eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Flugaschepartikel zeigt als die jeweiligen Monokulturen.



**Abb. 61: Zeitabhängige Arachidonsäurefreisetzung von LA-4 Epithelzellen und RAW264.7 Makrophagen in Mono- und Kokulturen nach Exposition mit MAF02 Flugaschepartikeln**

Für die Kokulturen wurden  $5 \times 10^5$   $^{14}\text{C}$ -Arachidonsäure markierte RAW264.7 Zellen auf die konfluenten  $^{14}\text{C}$ -Arachidonsäure markierten LA-4 Zellen ausgesät. Nach einer 24-stündigen Inkubation erfolgte die Exposition der Zellen über eine, zweieinhalb und fünf Stunden mit  $13,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  Flugaschepartikeln ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ). Im Anschluss wurden die Zellen geerntet und einer Lipidextraktion unterzogen. Die Extrakte wurden anschließend dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt und die Lipide mittels Autoradiographie visualisiert. Die Intensitäten der Banden der freien Arachidonsäure wurden unter Verwendung der *Odyssey*<sup>®</sup> bzw. *OptiQuant Acquisition and Analysis Software* ermittelt. Dargestellt sind zum einen eine repräsentative Dünnschichtchromatographie (rechts) und zum anderen die Mittelwerte  $\pm$  SEM der densitometrischen Auswertung der AA dreier, voneinander unabhängiger Versuche in Relation zur unbehandelten Kontrolle (links). Die Anordnung der DC-Proben entspricht der im Diagramm. Abkürzungen: NL, Neutrallipide; AA, freie Arachidonsäure; EICO, Eicosanoide; PL, Phospholipide.





## 4 Diskussion

In unserer Atemluft befinden sich Umweltpartikel, die die menschliche Gesundheit beeinträchtigen. Die anthropogenen Komponenten dieser partikelförmigen Verunreinigungen entstammen vorwiegend aus Verbrennungsprozessen in Verkehr und Industrie. In zahlreichen epidemiologischen Studien zeigte sich eine deutliche Assoziation zwischen einer gesteigerten Exposition gegenüber partikulären Luftverunreinigungen und einer verstärkten Inzidenz von Erkrankungen des Respirationstrakts, des kardiovaskulären Systems sowie einer erhöhten Mortalität in der Bevölkerung (Dockery *et al.* 2005; Pope, III *et al.* 2004; Pope, III *et al.* 2006; Samet *et al.* 2000). Besonders deutlich werden diese Effekte bei suszeptiblen Personen, d.h. bei Kindern, Senioren oder bei Personen mit einer Vorschädigung des respiratorischen oder kardiovaskulären Systems (Woodruff *et al.* 2006; Zanobetti *et al.* 2004).

Der Anstieg der partikulären Luftverschmutzung ist nicht nur ein Problem des letzten Jahrzehnts, sondern zeigte sich schon mit Beginn der Industrialisierung. So wurde bereits vor mehr als 70 Jahren eine Erhöhung der Gesamtsterblichkeit der Bevölkerung während Smogepisoden im Maas-Tal beschrieben (Friket 1936). In London wurden im Jahre 1952 während einer fünftägigen Inversionswetterlage Partikelkonzentrationen bis zu  $4500 \mu\text{g}/\text{m}^3$  gemessen (London County Council 1953). Während dieser katastrophalen Smogepisode stieg die Sterblichkeitsrate von ca. 1700 Todesfällen pro Woche auf ca. 4700 Todesfälle in der Woche nach Beginn der Smogperiode an (Ministry of Health 1954). Seit den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts konnte aber eine drastische Abnahme der Massenkonzentration der anthropogenen Partikelemissionen in den Industriestaaten verzeichnet werden (Europäische Gemeinschaft 1997; Wichmann *et al.* 2000), welche vor allem auf den Einsatz von effizienteren Filtertechniken zurückzuführen ist. Die modernen Filtertechniken fangen allerdings vorwiegend die gröberen Partikel weg, der zahlenmäßig weitaus größere Anteil der feinen und ultrafeinen Partikel wird weiterhin ausgestoßen. Folglich kommt es zur Reduktion der Gesamtmasse, aber nicht zur Verringerung der Anzahl der emittierten Partikel. Es wurde sogar von einem Anstieg der Partikelanzahlkonzentration der ultrafeinen Partikel (Wichmann *et al.* 2000), an deren besonders großen Oberfläche Schadstoffe wie Metalle, Kohlenwasserstoffe oder Dioxine besonders gut anlagern können (Linak *et al.* 2007; Tao *et al.* 2003; Xia

*et al.* 2004) und welche auf Grund ihrer Größe bis in den alveolaren Bereich der Lunge eingeatmet werden können (Oberdörster *et al.* 2005), berichtet. In diesem Zusammenhang wurde auch gezeigt, dass bei erwachsenen Asthmatikern eine Einschränkung der Lungenfunktion mit einer erhöhten Anzahl der ultrafeinen, aber nicht mit der Masse der feinen Partikel, einhergeht (Ebelt *et al.* 2001; Wichmann *et al.* 2000).

Die epidemiologischen Analysen können Hinweise auf den Zusammenhang von Erkrankungen und dem Auftreten von Umweltnoxen geben, aber die zugrunde liegenden pathophysiologischen Wirkmechanismen, welche die gesundheitlichen Beeinträchtigungen durch Partikel unserer Atemluft verursachen, müssen jedoch durch experimentelle Arbeiten analysiert werden. In diesem Zusammenhang konnte in einer *in vivo* Studie mit Titandioxid und *Carbon Black* Nanopartikeln gezeigt werden, dass bei gleicher Massenkonzentration die ultrafeinen Partikel stärker wirken als die feinen Partikel, nachdem diese in die Lunge von Ratten und Mäusen instilliert wurden (Oberdörster *et al.* 2000). Eine weitere Arbeit demonstrierte, dass die Anzahl neutrophiler Granulozyten (PMN) in der bronchoalveolaren Lavage (BAL), in Beziehung zur Oberfläche der inhalierten Partikel steht (Renwick *et al.* 2004). Weiter führte eine Forschergruppe Inhalationsstudien durch, bei denen suszeptible, Apolipoprotein-defiziente Mäuse entweder ultrafeine oder feine Partikel inhalierten (Araujo *et al.* 2008). Diese *in vivo* Exposition verursachte bei Mäusen, die ultrafeine Partikel inhalierten, eine stärkere oxidative Antwort als bei Mäusen, die feine Partikel inhalierten. Zudem wurde in verschiedenen *in vitro* Untersuchungen nachgewiesen, dass ultrafeine Partikel, mit ihrer großen Oberfläche und der daraus resultierenden erhöhten biologischen Reaktionsfähigkeit, pathophysiologische Prozesse stärker induzieren als die inhalierbaren, feinen Partikel des gleichen Materials (Beck-Speier *et al.* 2005; Brown *et al.* 2004; Donaldson *et al.* 2005). So konnten beispielsweise Finkelstein *et al.* (1997) in einer *in vitro* Exposition von Epithelzellen aus der Ratte mit TiO<sub>2</sub> Nanopartikeln eine vermehrte Freisetzung des TNF- $\alpha$  und IL-1 nachweisen, während die feine Fraktion dieser Partikel, mit einem mittleren Durchmesser von 200 nm keinen Effekt auslöste. Neuere Studien mit ultrafeinem und feinem TiO<sub>2</sub> bestätigen dieses Ergebnis. In A549 Epithelzellen lösten ultrafeine TiO<sub>2</sub> Partikel bei gleicher Masse eine stärkere IL-8 Produktion sowie ROS Generierung aus als feine TiO<sub>2</sub> Partikel (Singh *et al.* 2007).

Umweltpartikel werden hauptsächlich über die Atmung in die Lunge aufgenommen. Exponiert werden dabei vorwiegend Epithelzellen und Makrophagen. Makrophagen gehören zur ersten Verteidigungslinie der körpereigenen Immunabwehr. Sie haben zum einen die Aufgabe die Lunge von Fremdpartikeln zu befreien, zum anderen regulieren sie die Immunantwort, indem sie sowohl entzündungsfördernde Mediatoren (IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ ) als auch reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) freisetzen. Dies bedeutet, dass Makrophagen durch die von ihnen synthetisierten und sezernierten Mediatoren maßgeblich an der Entstehung von akuten Entzündungen beteiligt sind. Eine persistierende Produktion von Entzündungsmediatoren führt des Weiteren zur Entstehung von chronischen Entzündungen, welche zu fibrotischen Veränderungen, zur Krebsentstehung oder zu das irreparablen Gewebeschädigungen führen kann.

Die Forschergruppe um Behndig führte humane Inhalationsstudien durch (Behndig *et al.* 2006). Dabei inhalierten gesunde Probanden über zwei Stunden 100  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  Dieselrußpartikel, was zu deutlichen Entzündungsreaktionen führte. Diese waren durch eine erhöhte IL-8 und Myeloperoxidase Expression sowie durch den verstärkten Einstrom von Entzündungszellen charakterisiert. Die Studie von Riediker *et al.* demonstrierte eine Assoziation zwischen der verstärkten Partikelbelastung und Entzündungsprozessen wie einem Anstieg der Neutrophilen, des C-reaktiven Proteins (CRP) sowie des Willebrand Faktors (Riediker *et al.* 2004).

Die bei der Partikelwirkung zugrunde liegenden direkten und indirekten Effekte von Partikeln auf unterschiedliche, zelluläre Signalwege sind jedoch bis heute im Detail nicht aufgeklärt.

Daher war das Ziel dieser vorliegenden Arbeit, mit Umweltpartikeln in Submerskultur, die zellulären und molekularen Wirkmechanismen, die zur Auslösung von inflammatorischen Gesundheitseffekten führen, zu untersuchen. Im Fokus der Untersuchungen stand hierbei die Signaltransduktionskaskade, die zur Mobilisation der Arachidonsäure und somit zur Synthese von Lipidmediatoren führt und einen wichtigen Teil der inflammatorischen Antwort darstellt. Für die *in vitro* Studien wurde als Zellmodell die etablierte murine Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 eingesetzt, welche Zielzellen der Lunge repräsentieren und zelltypspezifische Charakteristika aufweisen (Olsson und Sundler 2007; Suram *et al.* 2006). Der Einsatz der Zelllinie sollte sicherstellten, dass die beobachteten Effekte nicht auf individuelle Spender-

abhängige Varianzen, wie es bei primären Zellen der Fall wäre, zurückzuführen sind. Dennoch wurden parallel primäre von Monozyten-abstammende, humane Makrophagen analysiert, um zu überprüfen, ob die immortalisierte Maus-Makrophagen-Zelllinie im Vergleich zu primären, humanen Zellen ein geeignetes *in vitro* Zellkulturmodell zur Untersuchung von partikel-induzierten Entzündungsprozessen darstellt.

Die anthropogenen Umweltstäube stammen wie bereits erwähnt vorwiegend aus Verbrennungsprozessen. In dieser Arbeit wurden als realistische Modellpartikel Flugstaubpartikel aus einer industriellen Hausmüllverbrennungsanlage verwendet. Flugstaub ist die generelle Bezeichnung für alle Feinstäube, die in Rückhalteeinrichtungen von Verbrennungsanlagen nach der Brennkammer und vor der Zugabe von Sorptionsmaterial gesammelt werden (Chandler *et al.* 1997). Bei Flugstaubpartikeln handelt es sich um eine komplexe Mischung aus vielen verschiedenen löslichen und unlöslichen Komponenten. Dabei weisen die Partikel unterschiedliche Größen auf. Die Zusammensetzung hängt stark von Brenngut, Brennertyp und Betriebsbedingungen ab. Die am häufigsten vorkommenden Elemente, die in dieser Arbeit verwendeten Flugasche, sind laut chemischer Analyse Natrium, Calcium und Kalium die als Chloride, Sulfate und Oxide vorliegen. Außerdem weisen sie in geringeren Mengen Blei, Eisen und Zink sowie Spuren von Barium, Vanadium und Cadmium auf (Diabaté *et al.* 2008). Im Gegensatz zu Dieselrußpartikeln (DEP), mit einem hohen Anteil an Kohlenstoff, liegt der Kohlenstoffgehalt von MAF02 mit 1% sehr niedrig.

Für die Untersuchungen von Entzündungsprozessen nach Partikelbehandlung sollten subtoxische Dosen der Flugasche eingesetzt werden, damit die zytotoxische Wirkung der Partikel nicht zu falschen Interpretationen der Ergebnisse führte. Daher wurde zu Beginn der Arbeit zur Bestimmung des subtoxischen Konzentrationsbereichs die allgemeine zytotoxische Wirkung der Flugaschepartikel auf die RAW64.7 Makrophagen ermittelt. Die Bestimmung der Toxizität erfolgte mit Hilfe des WST-1 Tests in Abhängigkeit der Partikelkonzentration. Der kalorimetrische WST-1 Test beruht auf der Umsetzung des Tetrazoliumsalzes WST-1 durch mitochondriale Dehydrogenasen stoffwechselaktiver, lebender Zellen, wobei wasserlösliches, rotes Formazansalz entsteht.

Im Allgemeinen führte die Inkubation der RAW264.7 Zellen nach 24 Stunden mit zunehmender Partikelkonzentration bis zu einem 80%igen Vitalitätsverlust (Abb. 23, A). Die höchste Konzentration, bei der kein Effekt auf die Vitalität beobachtet wurde, betrug 50 µg/ml (31 µg/cm<sup>2</sup>). Deshalb wurden in den anschließenden Untersuchungen inflammatorischer Prozesse nach MAF02 Inkubation RAW264.7 Makrophagen mit der nicht-zytotoxischen Konzentration von 50 µg/ml MAF02 Partikeln behandelt.

#### **4.1 Induktion von oxidativem Stress durch Flugstaubpartikel**

Makrophagen sind charakterisiert durch die Fähigkeit der Phagozytose. Über Rezeptoren erkennen sie Fremdpartikel, phagozytieren diese und bauen sie ab. Wenn diese Partikel als Gefahr erkannt werden, können sie Zytokine, Lipidmediatoren und reaktive Sauerstoffspezies produzieren, die in ihrer Gesamtheit eine Entzündungsreaktion initiieren. Akute Entzündungsreaktionen dienen dazu die Fremdpartikel zu eliminieren und beschädigtes Gewebe zu reparieren. Im Gegensatz dazu führt eine anhaltende Produktion bzw. Überproduktion von Mediatoren zu einer Schädigung von gesundem Gewebe.

In aeroben Organismen kommt es fortlaufend zur Bildung von geringen Mengen an Superoxidanionradikalen ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) oder hoch reaktiven Hydroxylradikalen ( $\cdot\text{OH}$ ), insbesondere bei der Elektronentransportkette der Mitochondrien, durch die Aktivierung der NADPH-Oxidase (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat) oder durch die chemische Katalyse mit Übergangsmetallen. Unter normalen physiologischen Bedingungen wird der ROS-Bildung durch antioxidative Schutzmechanismen, zu welchen u. a. die Glutathionsynthese sowie die Expression antioxidativer Enzyme wie die der Superoxiddismutase oder der Katalase zählen, entgegen gewirkt. Kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen der Bildung von ROS und der Fähigkeit diese zu neutralisieren und zu eliminieren entsteht oxidativer Stress (Halliwell 2007b; Sies 1986). Dieser kann sowohl exogen z. B. durch UV-Strahlen, Hitzeschock oder chemische Noxen als auch endogen durch Entzündungsreaktionen verursacht werden.

ROS können in niedrigen Konzentrationen zur Aktivierung von intrazellulärer Signaltransduktion beitragen. So hat man erkannt, dass Sauerstoffradikale die

MAPK-Signaltransduktionskaskaden beeinflussen und damit proliferative oder apoptotische Effekte auslösen, womit sie möglicherweise zur Entwicklung maligner Lungenerkrankungen beitragen können (Albrecht *et al.* 2002; Albrecht *et al.* 2004; Halliwell 2007a; Johnson und Lapadat 2002; Mayer und Grummt 2005; Unfried *et al.* 2007). Hohe Konzentrationen von ROS wirken dagegen schädigend auf Lipide, Proteine sowie Nukleinsäuren der produzierenden Zelle und des umliegenden Gewebes, wodurch die Zellen bzw. das Gewebe irreversibel geschädigt oder in deren Funktion beeinträchtigt werden. Es kommt zur Überproduktion verschiedener inflammatorischer Mediatoren und Enzyme, wie beispielsweise TNF- $\alpha$ , und Cyclooxygenase-2 (COX-2), von denen bekannt ist, dass sie oxidativen Stress verstärken. Diese Effekte unterstreichen die Notwendigkeit einer exakten Steuerung des intrazellulären Redoxgleichgewichts.

In der Literatur gibt es zahlreiche Studien, die belegen, dass Partikel eine intrazelluläre ROS-Bildung in Lungenzellen auslösen (Beck-Speier *et al.* 2005; Li *et al.* 2003; Singh *et al.* 2007). Zur Elimination von biogenen Partikeln wie z. B. Bakterien bilden Makrophagen ROS. Dagegen sind schwer lösliche Umweltpartikel wie die in dieser Arbeit untersuchten Flugaschepartikel mit einem 30%-igem Anteil an unlöslichem Material, kaum durch ROS degradierbar. Sie können im Lungengewebe akkumulieren, Membranen des Epithels oder der alveolaren Blutkapillaren permeieren, in das Interstitium gelangen und von dort in den Kreislauf des Organismus übergehen (Nemmar *et al.* 2001; Nemmar *et al.* 2002; Oberdörster *et al.* 2000). Dies bedeutet, dass die Partikel über den Blutkreislauf im gesamten Organismus verteilt werden können und sekundäre Zielorgane wie Herz, Leber oder das zentrale Nervensystem erreichen. So demonstrierte eine Studie von Oberdörster beispielsweise eine Translokation von über 50 % der inhalierten, ultrafeinen  $^{13}\text{C}$ -Partikel (20-29 nm) innerhalb von 24 Stunden in die Leber der Ratte (Oberdörster *et al.* 2002). Die Arbeit von Semmler *et al.* demonstrierte eine effektive Translokation von inhalierten Iridium-Nanopartikeln in das Lungenepithel und Interstitium von Ratten (Semmler *et al.* 2004; Semmler-Behnke *et al.* 2007). In sekundären Organen konnte jedoch nur ein geringer Anteil der Partikel nachgewiesen werden. Dieser nahm über einen Zeitraum von sechs Monaten weiter ab, wobei der größte Anteil der Nanopartikel über den mukociliaren Transport zum Kehlkopf befördert und über den Gastrointestinaltrakt ausgeschieden wurde. Dies bedeutet, dass die vom Epithel und Interstitium aufgenommenen Nanopartikel auf dem Lungenepithel relokalisieren und

von dort abtransportiert wurden (Semmler-Behnke *et al.* 2007). Nemmar *et al.* (2002) demonstrierten dagegen eine schnelle Aufnahme von Nanopartikeln in die Blutbahn, sowie eine Translokation in die Leber, nachdem gesunde Probanden Technetium-markierte Partikel inhalierten. Studien von Elder *et al.* (2006) und Oberdörster *et al.* (2004) zeigten sogar in diesem Zusammenhang, dass ultrafeine Partikel über den olfaktorischen Nerv in den Bulbus olfactorius des zentralen Nervensystems translozieren.

Partikel können über die Generierung von ROS zur Entstehung von Erkrankungen beitragen. Dabei besteht ein enger Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und Entzündungsreaktionen, welche durch die Aktivierung redox-sensitiver Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise Nrf2, Mitogen-aktivierten Protein Kinasen sowie durch die Aktivierung des Arachidonsäuremetabolismus gekennzeichnet sind (Araujo *et al.* 2008; Castranova 2004; Fritsch *et al.* 2006; Lu und Wahl 2005; Mroz *et al.* 2007; Pawliczak *et al.* 2002; Rahman *et al.* 2002).

Der Partikel-induzierte oxidative Stress wird zum einen durch die katalytische Reaktivität der Partikeloberfläche, die zur Entstehung von Radikalen beitragen, ausgelöst. Zum anderen aktivieren Partikel Enzyme, wie Oxidasen, Oxygenasen, Peroxidasen und Cytochrom P450 Enzyme, die ROS in Zellen generieren. Die Fähigkeit der Partikel oxidativen Stress zu induzieren hängt dabei von deren Größe und Oberfläche ab. Das Verhältnis der Reaktivität der Partikeloberfläche steigt dabei mit sinkender Partikelgröße an, womit ultrafeine Partikel aufgrund ihrer großen Oberflächen eine wesentliche Bedeutung in der Induktion von oxidativem Stress übernehmen (Nel *et al.* 2006; Oberdörster *et al.* 2005). Brown und Kollegen (2000) untersuchten die Wirkung von ultrafeinen *Carbon Black* Partikeln und feinen *Carbon Black* Partikeln sowohl *in vitro* an Mono Mac 6, einer humanen Monozyten-Zelllinie, als auch *in vivo* an instillierten Ratten. Nach der Partikelexposition konnte mit ultrafeinem, aber nicht mit feinen, *Carbon Black* Partikeln eine verstärkte inflammatorische Antwort festgestellt werden. Untersuchungen von (Gilmour *et al.* 2004) zeigten ferner, dass bei gleicher Masse ultrafeine TiO<sub>2</sub>-Partikel mehr DNA-Strangbrüche erzeugten als ihre größeren Äquivalente. Dieser Effekt ließ sich mit Mannitol, einem Radikalfänger, hemmen, was als Hinweis darauf zu werten ist, dass oxidativer Stress eine bedeutende Rolle spielt.

Des Weiteren konnte in früheren Arbeiten bewiesen werden, dass komplexe Umweltpartikel in Rinderalveolarmakrophagen nach Behandlung mit Flugasche die Entstehung von ROS bewirkten (Gercken *et al.* 1996). Die Wirksamkeit von komplexen Umweltpartikeln bestätigen sowohl die Arbeiten von Dye *et al.* (1999), die eine Generierung von ROS in Rattenepithelzellen beobachten konnten, als auch die Arbeiten von Beck-Speier *et al.* (2005), die mit DEP eine Erhöhung von ROS in primären Lungenmakrophagen detektierten.

In dieser Arbeit konnte ebenfalls eine dosisabhängige Erhöhung von intrazellulären ROS infolge der Exposition von RAW264.7 Makrophagen mit MAF02 Partikeln gezeigt werden (Abb. 24). Als Indikator für die Bildung von unspezifischen, intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies wurde die Oxidation des Fluoreszenzfarbstoffes 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat (H<sub>2</sub>DCF-DA) beobachtet. In Gegenwart von Peroxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, <sup>•</sup>O<sub>2</sub>R, <sup>•</sup>OR, <sup>•</sup>OH, HOCl und ONOO<sup>-</sup>, nicht jedoch <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup>, wird der Farbstoff zu fluoreszierendem Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert.

Komplexe Umweltpartikel, wie auch Flugstaubpartikel, bestehen aus Partikeln unterschiedlicher Größe, die von einigen Mikrometern bis zu wenigen Nanometern variiert. Die in diesem Projekt verwendeten Flugaschepartikel beinhalten Partikel <20 µm, wobei der mittlere aerodynamische Durchmesser 165 nm beträgt (Diabaté *et al.* 2008). Die Partikelmasse wird dabei hauptsächlich durch die Feinstaubfraktion bestimmt, während ca. 30% der Partikelanzahl durch ultrafeine Partikel repräsentiert werden. Aus diesem Grund wäre es möglich, dass die Fraktion der ultrafeinen Partikel eine wesentliche Rolle in der MAF02-induzierten ROS-Bildung spielt.

Oxidativer Stress kann zur Aktivierung redox-sensitiver Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise Nrf2, führen. Nrf2 reguliert die Transkription zahlreicher Gene, die direkt oder indirekt antioxidative Wirkung innehaben. Zu diesen zählen u.a. die Hämoxxygenase-1 (HO-1) (Alam *et al.* 1999; Rushworth *et al.* 2005), die γ-Glutamyl-Cystein Synthase (GCS) (Li *et al.* 2007; Reddy *et al.* 2008), Katalase und Superoxid Dismutase (Zhu *et al.* 2005).

In der Literatur finden sich einige Hinweise auf eine ROS-induzierte Nrf2 Stabilisierung, Aktivierung und Translokation in den Zellkern. So stellten Li *et al.* (2007) fest, dass ROS, welche durch ein Insektizid namens Deltamethrin gebildet wurden, eine Translokation von Nrf2 vom Zytosol in den Nukleus auslöst. Des



Weiteren ergab diese Studie, dass ROS zu einer Aktivierung von Nrf2 mit anschließender Expression des antioxidativ wirkenden HO-1 Enzyms führte. Auch He *et al.* (2008) vermuten nach einer Cadmium-induzierten ROS Generierung die Stabilisierung von Nrf2, welches daraufhin in den Zellkern transloziert und über die Bindung an ARE des HO-1 Gens dessen Transkription induziert.

In Kenntnis der Literaturdaten wurde der Effekt von MAF02-Partikeln auf die Regulation des Transkriptionsfaktors Nrf2, sowie die Induktion der HO-1 näher untersucht. Zunächst erfolgte mit Hilfe der Western Blot Analyse die Untersuchung der Akkumulation von Nrf2 in RAW264.7 Makrophagen nach Flugaschebehandlung. In MAF02-behandelten Zellen akkumulierte Nrf2 in einer zeitabhängigen Art und Weise (Abb. 26). Fast zeitgleich erfolgte die Induktion der HO-1 (Abb. 27), wobei ab der zweieinhalbstündigen Inkubation mit MAF02 Partikeln eine starke, zeitabhängige HO-1 Induktion zu beobachten war. In der Arbeitsgruppe wurde in Experimenten mit höherer Zeitauflösung mit BEAS-2B Epithelzellen gezeigt, dass die Flugasche-induzierte Stabilisierung von Nrf2 zeitlich ca. 1 h vor der HO-1 Expression stattfindet (Übel 2008).

Die Exposition von RAW264.7 und BEAS-2B Zellen mit ultrafeinen Umweltpartikeln führte in der Studie von Li *et al.* (2003) gleichfalls zur Induktion der HO-1. Außerdem konnte sowohl eine Akkumulation von Nrf2 im Zellkern, eine Aktivierung des *antioxidant response element* (ARE), als auch eine HO-1 Induktion gezeigt werden, nachdem Epithelzellen und Makrophagen mit Extrakten von Dieselrußpartikeln (DEP, *diesel exhaust particles*) exponiert wurden. Die Arbeitsgruppe von Xiao *et al.* (2003) konnte ebenfalls durch eine Proteomanalyse beobachten, dass das HO-1 Protein aber auch die Katalase nach Inkubation mit Extrakten von Dieselrußpartikeln in RAW264.7 Makrophagen hochreguliert wurden.

In dieser Arbeit wurde sowohl die durch MAF02 verursachte Akkumulation von Nrf2 als auch die Induktion der HO-1 durch die Vorbehandlung der RAW264.7 Makrophagen mit N-Acetylcystein (NAC) konzentrationsabhängig reduziert (Abb. 28 und Abb. 29). Interessanterweise, führte dabei der Einsatz von 5 mM NAc zu einer vollständigen Inhibierung der HO-1 Induktion, während die Akkumulation von Nrf2 lediglich reduziert wurde. Generell bekräftigen diese Beobachtungen den Einfluss von partikel-generierten ROS auf die Nrf2 vermittelte Induktion ARE-abhängiger Gene sowie auf die HO-1 Induktion. Die differierende NAc Konzentrationsabhängigkeit lässt vermuten, dass neben der Nrf2 abhängigen HO-1

Induktion weitere regulatorische Mechanismen an der MAF02-bedingten HO-1 Induktion beteiligt sein müssen. Als Kandidat käme der redox-sensitive Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B in Frage, der ebenfalls an der Regulation der HO-1 involviert zu sein scheint (Wijayanti *et al.* 2004).

Nrf2 fungiert als Regulator der Transkription der  $\gamma$ -Glutamyl-Cystein Synthase (Chan und Kwong 2000; Jeyapaul und Jaiswal 2000; Li *et al.* 2007; Reddy *et al.* 2008; Wild *et al.* 1999). Die  $\gamma$ -Glutamyl-Cystein Synthase, ein aus einer schweren katalytischen und einer leichten regulatorischen Untereinheit bestehendes Heterodimer, ist an der Synthese von Glutathion beteiligt ist, indem es die  $\gamma$ -Carboxylgruppe der Glutaminsäure mit Cystein verknüpft. Abschließend konjugiert die Glutathionsynthetase das Dipeptid mit Glycin, wodurch Glutathion entsteht. Das Tripeptid Glutathion (GSH) spielt eine Schlüsselrolle in der zellulären Abwehr gegen ROS und im Fremdstoffmetabolismus.

In Korrelation mit der Akkumulation von Nrf2 wurde eine Erhöhung des GSH-Gehaltes mit nicht toxischen Dosen von Flugaschepartikeln in RAW264.7 Makrophagen beobachtet. Dieser Effekt könnte auf einer Nrf2-vermittelten verstärkten Transkription der  $\gamma$ -Glutamyl-Cystein Synthase basieren. Im Kontrast zu diesen Ergebnisse stehen aber andere Literaturdaten, welche einerseits eine Induktion des antioxidativen HO-1 Proteins und andererseits eine Depletion des Antioxidanz Glutathion nach Inkubation von Dieselrußextrakten demonstrierten (Li *et al.* 2003; Xiao *et al.* 2003). Daraus lässt sich schließen, dass möglicherweise ROS eine Rolle bei der Regulation des Glutathion spielen.

Zusammengefasst wurde im ersten Teil dieser Arbeit nachgewiesen, dass die Partikelexposition in der RAW264.7 Zelllinie oxidativen Stress induziert. Die Hypothese war daher, dass das oxidative Potential der Partikel bei der Interaktion mit Membranen Radikalreaktionen auslöst, was zur Aktivierung der PLA<sub>2</sub> führt und dadurch die Arachidonsäurekaskade induziert. Deshalb wurde im zweiten Teil der Arbeit zum einen die Freisetzung der Arachidonsäure, die Synthese der Lipidmediatoren und zum anderen die Regulation des Arachidonsäurestoffwechsels nach Partikelinkubation untersucht.

## **4.2 Flugaschepartikel – Wechselwirkungen mit inflammatorischen Signalwegen – der Arachidonsäuremetabolismus**

Wie bereits erwähnt stand im Mittelpunkt der Untersuchung der MAF02-induzierten inflammatorischen Prozesse die Regulation des Arachidonsäuremetabolismus. Die Freisetzung und Metabolisierung der Arachidonsäure zu Lipidmediatoren ist relevant für die Initiation und Aufrechterhaltung von Entzündungen und spielt folglich eine entscheidende Rolle in der Entstehung von chronischen Entzündungen, aber auch in der Entwicklung von Lungenerkrankungen (Carpenter *et al.* 1998). Außerdem ist bekannt, dass Fehlsteuerungen des Arachidonsäuremetabolismus zur Entstehung von Krebs, insbesondere Lungenkrebs, beitragen (Bauer *et al.* 2000; Hida *et al.* 1998; Meyer *et al.* 2004; Nakanishi und Rosenberg 2006).

Der Gehalt an freier Arachidonsäure in Zellen ist sehr gering und streng reguliert. Die Regulation erfolgt über den sog. Lands-Zyklus (Lands 1979), bei dem die Fettsäuren ständig deacyliert und daraufhin wieder reacyliert werden. Eine Anhäufung freier Arachidonsäure im Zytosol könnte somit auf einer Inhibition der Reacylierung zurückzuführen sein. Andererseits kann die Arachidonsäure über eine Deacylierungsreaktion vermittelt durch Phospholipasen aus Phospholipiden freigesetzt werden und im Zytosol akkumulieren.

In dieser Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass die Behandlung von RAW264.7 Makrophagen zu einer zeit- und konzentrationsabhängigen Freisetzung von Arachidonsäure führt (Abb. 30). Mit  $12,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  MAF02 Flugaschepartikeln ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) war nach einer zweieinhalbstündigen Behandlung ein deutliches Signal detektierbar, weshalb diese Konzentration zur Untersuchung der Regulation des Arachidonsäuremetabolismus eingesetzt wurde.

### **Die MAF02-induzierte Arachidonsäurefreisetzung setzt die Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> voraus**

Die Hydrolyse von Phospholipiden durch Phospholipasen A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) führt u.a. zur Freisetzung von Arachidonsäure. Man unterscheidet innerhalb der PLA<sub>2</sub>-Superfamilie drei verschiedene Phospholipasen: die sekretorische PLA<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>), die calcium-unabhängige PLA<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>) und die zytosolische PLA<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) (Schaloske und Dennis 2006; Six und Dennis 2000). In Kenntnis der vorliegenden Ergebnisse, dass MAF02 Partikel Arachidonsäure aus Phospholipiden freisetzen, stellte sich nun die

Frage welche der bekannten Phospholipasen in die MAF02-induzierte AA-Freisetzung involviert sind. Zur Klärung wurden zunächst Inhibitions-Studien mit selektiven Inhibitoren der verschiedenen PLA<sub>2</sub> durchgeführt (Kapitel 3.4.2.1). Die Zugabe eines sPLA<sub>2</sub> und iPLA<sub>2</sub> Inhibitors hatte keinen hemmenden Einfluss auf die AA-Freisetzung. Die Anwendung eines spezifischen Inhibitors der cPLA<sub>2</sub> zeigte hingegen einen deutlichen Effekt. Die MAF02-induzierte Freisetzung der Arachidonsäure war um 80% reduziert. Interessanterweise, führte der Einsatz des cPLA<sub>2</sub> Inhibitors nicht zur vollständigen Inhibition der Arachidonsäurefreisetzung nach Partikelinkubation. So berichten Sporn *et al.* (1992) in ihren Studien mit Alveolarmakrophagen, dass H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Inkorporierung Tritium-markierter Arachidonsäure in Phospholipide inhibiert, so dass die Arachidonsäure im Vergleich zu unbehandelten Zellen im Zytosol akkumulierte. Dies bedeutet, dass die Mobilisation der Arachidonsäure nach Behandlung der Makrophagen mit Flugasche nicht nur durch die Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> hervorgerufen wird, sondern dass die Arachidonsäure möglicherweise auch infolge einer Inhibition der Reacylierung im Zytosol akkumulieren kann. Die Inhibition der Reacylierung der freien Fettsäure wird durch die Bildung von ROS hervorgerufen, wobei diese nicht direkt auf die Arachidonoyl-CoA-Synthase oder Arachidonoyl-CoA-Lysophosphatid Acyltransferase hemmend wirken. Die Inhibition könnte durch eine ROS-induzierte Depletion von ATP hervorgerufen werden (Sporn *et al.* 1992). ATP wird für den Umbau von Arachidonsäure in das Zwischenprodukt Arachidonoyl-CoA, welches in Phospholipide eingebaut wird, benötigt.

Zusammenfassend lieferten diese Ergebnisse den Hinweis auf eine Beteiligung der cPLA<sub>2</sub> in der MAF02-induzierten AA-Freisetzung. Aus diesem Grund wurde in einer weiteren Analyse die cPLA<sub>2</sub> näher untersucht. Die cPLA<sub>2</sub> wird über die Phosphorylierung des Enzyms an verschiedenen Aminosäureresten aktiviert (Gijon *et al.* 2000; Lin *et al.* 1993). Insbesondere die Phosphorylierung an Serinrest 505 bewirkt eine Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> (Borsch-Haubold *et al.* 1998). Somit erfolgte mit Hilfe des Western Blots die Untersuchung der Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> über deren Phosphorylierung an Serin 505. Und tatsächlich wiesen die Partikel-belasteten Zellen (Abb. 47) eine leichte, aber stetige Zunahme der phosphorylierten Form der cPLA<sub>2</sub> auf. Der Zeitverlauf der MAF02-induzierten Phosphorylierung stimmte mit dem der Arachidonsäurefreisetzung überein (Vgl. Abb. 30).

### **Aktivierung der MAP Kinasen**

Die Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> erfolgt über die Phosphorylierung des Enzyms durch den ERK1/2 und p38 MAPK Signalweg (Hirabayashi *et al.* 2004). Auch eine Involvierung des JNK1/2 Signalweges wurde beschrieben (Van Putten *et al.* 2001).

In Kenntnis der vorliegenden Ergebnisse und der Hinweise aus der Literatur wurde die Aktivierung des ERK1/2 sowie des p38 Signalweges durch MAF02 Flugasche analysiert und deren Einfluss auf die MAF02-induzierte Freisetzung der Arachidonsäure überprüft.

Auf Proteinebene konnte eine zeitabhängige Zunahme der Menge an phosphoryliertem ERK1/2 und JNK1/2 nachgewiesen werden (Abb. 41 und Abb. 45). Eine solche zeitabhängige Aktivierung konnte für p38 nur in geringem Maße beobachtet werden (Abb. 43). Um den Einfluss dieser Kinasen auf die MAF02-bedingte Arachidonsäurefreisetzung zu untersuchen, wurden daraufhin Versuche mit Inhibitoren, die spezifisch diese unterschiedlichen Signaltransduktionswege beeinflussen, durchgeführt. Übereinstimmend mit den Proteinanalysen führte die Inhibition des ERK1/2 Signalweges zur Reduktion der MAF02-induzierten Arachidonsäurefreisetzung (Abb. 37), während die Inhibition des p38 Signalweges nur einen geringen inhibitorischen Effekt zeigte. Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden. (Abb. 38). Die Inhibition der JNK1/2 Signaltransduktion resultierte in einer abgeschwächteren Arachidonsäuremobilisation nach MAF02 Exposition (Abb. 39).

Diese Ergebnisse deuten zweifellos auf eine Funktion der ERK1/2 in der Flugasche-induzierten Arachidonsäurekaskade hin, während eine Involvierung der p38 nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte. Der JNK1/2 Signalweg scheint ebenfalls in der MAF02-induzierten Arachidonsäurefreisetzung involviert zu sein. Ähnliche Beobachtungen wurden auch für DEP gezeigt, die eine ERK1/2-, aber nicht eine p38-abhängige Arachidonsäuremobilisation beschreiben (Beck-Speier *et al.* 2005).

**Die MAF02-induzierte Arachidonsäurefreisetzung ist von der Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels abhängig**

Das zweite wesentliche Merkmal einer cPLA<sub>2</sub> Aktivierung stellt die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration dar. Diese bewirkt die Translokation des Enzyms vom zytosolischen Kompartiment zu perinukleären Membrankompartimenten, um daraufhin die Arachidonsäure aus Phospholipiden abzuspalten (Evans *et al.* 2001; Evans und Leslie 2004; Hirabayashi *et al.* 1999; Schievella *et al.* 1995). Da aufgrund der cPLA<sub>2</sub>-Inhibitor-Studien, sowie der Proteinanalyse die zytosolische PLA<sub>2</sub> für die beobachtete Arachidonsäurefreisetzung verantwortlich gemacht wurde, wurde im nächsten Schritt der Einfluss von Calcium auf die PLA<sub>2</sub> Aktivierung untersucht. Als indirekter Nachweis für eine Phospholipase A<sub>2</sub> Aktivität eignete sich die Analyse der Mobilisation der Arachidonsäure. In der vorliegenden Arbeit konnte eine calciumabhängige Arachidonsäurefreisetzung bestätigt werden. Die MAF02-induzierte Arachidonsäurefreisetzung ließ sich durch Supplementierung des Kulturmediums mit Hilfe des intrazellulären Calciumchelators BAPTA/AM konzentrationsabhängig unterdrücken (Abb. 35). Schließlich konnte durch die Komplexbildung des extrazellulären Calciums mit Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-tetraessigsäure (EGTA) die MAF02-bedingte Freisetzung von Arachidonsäure effektiv gehemmt werden (Abb. 36).

Ähnliches konnte eine Studie von Stone *et al.* (2000) mit der humanen Mono Mac 6 Zelllinie feststellen. Infolge einer Inkubation mit ultrafeinen *Carbon Black* Partikeln war eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration zu verzeichnen. Dieser Effekt basiert vermutlich auf dem Einstrom von extrazellulärem Calcium über Calcium-Kanäle in der Plasmamembran, da der Calciumeinstrom durch EGTA unterdrückt wurde. Die *Carbon Black*-induzierte Freisetzung von Calcium konnte ebenfalls durch Verapamil, einem Calcium-Kanalblocker, vermindert werden. Hierbei geht man davon aus, dass die Öffnung dieser Kanäle durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies ausgelöst wird und folglich Calcium aus dem extrazellulären Raum ins Zytosol strömt (Brown *et al.* 2007; Stone *et al.* 2000). Die gleiche Arbeitsgruppe bestätigte diese Ergebnisse in einer weiteren Studie (Brown *et al.* 2004). Expositionen von primären, alveolaren Makrophagen von Ratten und primären Monozyten aus dem Mensch mit ultrafeinen *Carbon Black* Partikeln (UfCB, Printex 90) hatten eine erhöhte Expression von TNF- $\alpha$  zur Folge. Dieser Effekt ließ sich sowohl mit einem intrazellulären Calciumchelator als auch mit einem

Radikalfänger (Nacystelin) hemmen, was auf einen direkten Zusammenhang zwischen inflammatorischen Effekten und oxidativem Stress hindeutet. Denkbar wäre auch, dass ROS nicht nur einen Calciumeinstrom in die Zelle bewirken, sondern auch gleichzeitig den ATP-abhängigen Transport von Calcium aus der Zelle hemmen, wodurch die intrazelluläre Calciumkonzentration ansteigt (Ermak und Davies 2002).

### **Bildung von Lipidmediatoren**

Als Endpunkt der Arachidonsäuremetabolisierung kommt Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), dessen Bildung durch die Cyclooxygenase (COX) katalysiert wird, in Frage. Prinzipiell unterscheidet man die konstitutiv exprimierte COX-1 und die induzierbare COX-2. Eine Induktion der COX-2 und damit auch die Synthese von PGE<sub>2</sub> werden mit der Entstehung von entzündlichen Vorgängen in Verbindung gebracht. Es wird in diesem Zusammenhang postuliert, dass eine chronische Induktion der COX-2 und der daraus resultierenden Bildung von PGE<sub>2</sub> neben der Entwicklung von chronischen Entzündungen, auch zur Entstehung und Entwicklung von Tumoren beitragen kann (Bauer *et al.* 2000; Buckman *et al.* 1998). Dabei ist einerseits in malignen Tumoren die COX-2 überexprimiert und andererseits führt die spezifische Inhibition der COX-2 Expression zur Reduktion des Wachstums von Tumorzellen (Hida *et al.* 1998; Higashi *et al.* 2000) .

Da die Exposition mit MAF02 Partikeln dazu führte, dass das Substrat der COX-2 aus Phospholipiden freigesetzt wurde, lag es aufgrund der Literaturhinweise nahe, den Einfluss der Flugaschepartikel auf die Induktion der COX-2 und der PGE<sub>2</sub> Bildung in Makrophagen zu untersuchen. Und tatsächlich konnte infolge einer MAF02 Behandlung von RAW264.7 Zellen eine Induktion der COX-2 und die daraus resultierende PGE<sub>2</sub> Synthese beobachtet werden (Abb. 48 und Abb. 49). Dabei stimmten die Zeitkinetiken beider Prozesse überein.

Sowohl die Induktion der COX-2 als auch die Freisetzung von PGE<sub>2</sub> durch inflammatorische Zellen nach deren Behandlung mit Partikeln wurde auch in anderen Studien nachgewiesen. So zeigte eine Studie zu DEP-vermittelten Effekten in LPS-vorbehandelten Mono Mac 6 Zellen, dass die Partikelbehandlung sowohl zur Aktivierung der COX-2 als auch zur Synthese von PGE<sub>2</sub> führt. Ohne Vorbelastung der Zellen konnte keine PGE<sub>2</sub>-Freisetzung nach Partikelbehandlung detektiert werden (Hofer *et al.* 2004). Des Weiteren konnten Demers und Kuhn (1994) eine

erhöhte PGE<sub>2</sub>-Synthese nach Belastung von primären Alveolarmakrophagen aus Ratten mit Quarzstäuben zeigen. Beck-Speier und Kollegen (2001) beschrieben ebenfalls eine Freisetzung von PGE<sub>2</sub> durch ultrafeine TiO<sub>2</sub> Partikel (10 µg/ml) in primären Makrophagen aus dem Hund. Dagegen war mit feinen TiO<sub>2</sub> Partikeln erst mit einer Konzentration von 100 µg/ml TiO<sub>2</sub> Partikeln eine signifikante Produktion von PGE<sub>2</sub> detektierbar. Die Arbeitsgruppe postuliert eine Assoziation zwischen der reaktiven Oberfläche der ultrafeinen Partikel und der Fähigkeit oxidativen Stress zu induzieren, was zu einer Freisetzung der Arachidonsäure und damit letztendlich zur Bildung von PGE<sub>2</sub> führt.

Partikel, die durch Inhalation in den menschlichen Organismus gelangen, induzieren die Bildung von ROS. Dabei sind besonders Zellmembranen des Lungenepithels betroffen, welche in direkten Kontakt mit den inhalierten Partikeln treten. Die Radikale lösen an Zellmembranen Lipidperoxidation aus. Besonders anfällig für die Lipidperoxidation sind ungesättigte Fettsäuren, wie die Arachidonsäure. Über die nicht-enzymatische Umsetzung der Arachidonsäure durch Lipidperoxidation entstehen Isoprostane (Milne *et al.* 2008). Das 8-Isoprostan, ein wichtiger *in vivo* Marker für oxidativen Stress, repräsentiert einen der wichtigsten Vertreter der Isoprostane (Makris *et al.* 2008). Es bewirkt im Organismus eine starke pulmonale Vasokonstriktion, zeigt außerdem potente bronchokonstriktorische Eigenschaften und eine verstärkte Plasmaexsudation in die Atemwege. Bei Rauchern, die immerfort einer hohen Belastung an reaktiven Sauerstoffradikalen ausgesetzt sind, wurde beispielsweise ein zweifacher Anstieg von 8-Isoprostan gegenüber gesunden Nichtrauchern beobachtet (Montuschi *et al.* 2000). Außerdem fand man bei Patienten mit ARDS (*acute respiratory distress syndrome*) und Asthma erhöhte 8-Isoprostan Werte im Atemkondensat (Carpenter *et al.* 1998; Montuschi *et al.* 1999), was ebenfalls auf die erhöhten oxidativen Prozesse, die bei der Entwicklung dieser Krankheiten eine entscheidende Rolle übernehmen, zurückzuführen ist.

Basierend auf den Daten aus der Literatur und den zuvor erzielten Ergebnissen, dass MAF02 Partikel die Freisetzung von ROS induzieren, konnte ein zeitabhängiger Anstieg des 8-Isoprostans nach Inkubation von Flugasche festgestellt werden (Abb. 50). Dies ist erneut ein Hinweis, dass die Bildung von ROS ein wichtiges zelluläres Ereignis der partikel-auslösenden Wirkung darstellt.



### **4.3 Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies – ein entscheidender Faktor der MAF02-induzierten inflammatorischen Prozesse**

Die bisher erzielten Ergebnisse dieser Arbeit deuteten auf einen Zusammenhang der MAF02-induzierten ROS Bildung und der Aktivierung des Arachidonsäuremetabolismus hin. Um aber einen direkten Zusammenhang zwischen der ROS Bildung und des Arachidonsäurestoffwechsels aufzuzeigen, wurde in den weiterführenden Experimenten das Antioxidanz N-Acetylcystein (NAC) eingesetzt. NAC schützt Zellen, indem es durch Membranen ins Zytosol gelangt und dort zu Cystein hydrolysiert wird. Cystein wiederum stimuliert die Glutathionsynthese. Andererseits fungiert NAC direkt als Radikalfänger verschiedener Sauerstoffradikale. In der Tat führte die Vorbehandlung der Zellen mit NAC zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der MAF02-induzierten Arachidonsäurefreisetzung (Abb. 40). Die Bildung von ROS beeinflusst die Arachidonsäurekaskade. Übereinstimmend zeigte die Arbeitsgruppe um Beck-Speier *et al.* (2005) eine Assoziation zwischen der reaktiven Oberfläche, der damit verbundenen verstärkten oxidativen Kapazität der Partikel und der Mobilisation von Arachidonsäure in Makrophagen. Als Begründung für die stärkere oxidative Wirkung wird postuliert, dass die bei Verbrennungstemperaturen flüchtigen Metalle aufgrund des größeren Oberflächen-Volumen-Verhältnisses bei der Abkühlphase auf den kleineren Partikeln abgelagert werden.

In dieser Arbeit wurde überprüft, ob die unlösliche oder lösliche Fraktion der Flugaschepartikel die Arachidonsäuremobilisation induziert. Dabei zeigte die unlösliche Fraktion eine deutlich höhere Wirksamkeit als die wasserlösliche (Daten nicht gezeigt). Die lösliche Fraktion enthält hauptsächlich Salze von Alkali- und Erdalkalimetallen, von denen erwartet wird, dass sie geringe biologische Wirkungen auslösen. Möglicherweise werden die zellulären Effekte der unlöslichen Fraktion durch Übergangsmetalle verursacht. Denn Übergangsmetalle übernehmen als Radikal bildendes System in der Generierung von ROS und dadurch in der Entstehung von oxidativem Stress eine wesentliche Rolle (He *et al.* 2008; Stewart *et al.* 2003; Voelkel *et al.* 2003). Die MAF02 Partikel enthalten einen hohen Anteil an Metallen (12 Gewichts-%), darunter auch Übergangsmetalle wie Eisen und Zink (Diabaté *et al.* 2008). Übergangsmetalle können über eine Fenton-ähnliche Reaktion

Sauerstoffradikale, wie beispielsweise das  $\cdot\text{OH}$  Radikal, bilden (Diabate *et al.* 2002; Voelkel *et al.* 2003). Die Arbeitsgruppe von He *et al.* (2008) zeigte in diesem Kontext, dass Cadmium, ebenfalls Bestandteil der Flugasche, jedoch nur in geringem Anteil, in der Lage ist oxidativen Stress zu induzieren. Weitere Studien von Dreher *et al.* (1997), die in ihren Arbeiten ROFA (*residual oil fly ash*) verwendeten, zeigten einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen der Übergangsmetalle Eisen, Vanadium und Nickel und dem Auftreten Lungenschädigungen. Ebenfalls demonstrierten Studien von Ghio und Devlin (2001) nach bronchialer Instillation von wässrigen Extrakten aus metallhaltigem Umweltstaub nach 24 Stunden einen verstärkten Einstrom von Entzündungszellen in die Lunge. Partikel, die einen geringeren Metallgehalt aufwiesen und in den Atemtrakt von gesunden Menschen instilliert wurden, induzierten eine schwächere Entzündungsreaktion. Somit scheint der Metallanteil in Partikeln entscheidend bei der Auslösung von Partikel-induzierten Effekten beizutragen. Dies könnte auch eine Erklärung dafür sein, dass die getesteten Referenzpartikel wie *Carbon Black* und  $\text{TiO}_2$ , welche keine Übergangsmetalle beinhalten, die Arachidonsäurefreisetzung in RAW264.7 Makrophagen nicht auslösten (Abb. 31).

Nachdem eine ROS-induzierte Arachidonsäurefreisetzung gezeigt werden konnte, wurde anschließend untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der ROS Generierung und der Aktivierung von Signaltransduktionswegen des Arachidonsäurestoffwechsels besteht.

Die Vorbehandlung der Makrophagen mit NAc führte zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Menge an phosphoryliertem MEK sowie ERK1/2 nach Partikelbehandlung (Abb. 51 und Abb. 52).

In der Literatur wurde mehrfach gezeigt, dass ROS in der Lage sind, Kinasen verschiedener Signalwege zu aktivieren. ROS induzierten sowohl die Phosphorylierung der p38 Kinase als auch die ERK1/2 und JNK1/2 (Guyton *et al.* 1996; Kang *et al.* 2008; Stevenson *et al.* 1994; van Rossum *et al.* 2004).

Neben der Aktivierung von Kinasen könnte auch eine Hemmung der entsprechenden Phosphatasen zu einer persistierenden Phosphorylierung und somit zur andauernden Aktivität der Kinase führen (Kamata *et al.* 2005). In diesem Zusammenhang wurde dokumentiert, dass Zink die Aktivität von Phosphatasen, welche die ERK1/2 und JNK1/2 dephosphorylieren und deaktivieren, inhibiert. Dabei

käme als mögliche Phosphatase die dualspezifische MKP-1 (MAPK Phosphatase-1) in Frage, welche für die Dephosphorylierung von MAPK, insbesondere von ERK1/2 und JNK1/2 verantwortlich gemacht wird (Kim *et al.* 2006). Cruz *et al.* (2007) beschreiben, dass ROS die Phosphatidylinositol 3-Kinase stimulieren (PI3K) und folglich die ERK1/2 aktiviert wird. ROS entfalten dabei ihre Wirkung durch die Glutathionylation von PTEN (*phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome 10*), was in einer Inaktivierung dieser Phosphatase und damit in einer persistierenden Aktivierung der PI3Kinase resultiert. In ähnlicher Weise könnten die durch MAF02 generierten Radikale die Phosphorylierung bzw. Aktivierung der MAP Kinasen beeinflussen.

Die MAF02-induzierte Aktivierung der ERK1/2 kann neben der Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> noch zahlreiche zusätzliche Effekte auslösen. Die ERK1/2 Signaltransduktionskaskade übermittelt eine Reihe von extra- und intrazellulären Signalen bis in den Zellkern und steuert die zelluläre Antwort, indem Transkriptionsfaktoren aktiviert werden. Beispielsweise wird der redox-sensitive Transkriptionsfaktor NF-κB oder auch CREB durch den ERK1/2 Signalweg aktiviert. Interessanterweise ist in der Literatur beschrieben, dass die Induktion der COX-2 mit der Aktivierung von NF-κB in Verbindung gebracht wird (Chen *et al.* 2004; Lu und Wahl 2005). Auch von einer Regulation der COX-2 Expression durch CREB ist berichtet worden (Eliopoulos *et al.* 2002).

Durch den Einsatz von NAc war eine Inhibierung der COX-2 Induktion nach Inkubation mit MAF02 Partikeln in einer konzentrationsabhängigen Art und Weise, vergleichbar zu derjenigen der ERK1/2, zu erkennen (Abb. 55). Dieses Ergebnis lässt eine Involvierung des ERK1/2 Signalwegs, möglicherweise über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB oder aber CREB, an der Induktion der COX-2 Expression vermuten. In weiterführenden Studien könnte mit Hilfe des MEK1 Inhibitors untersucht werden, ob die ERK1/2 Signaltransduktionskaskade an der COX-2 Induktion beteiligt ist.

Es wurde auch eine Involvierung von c-Jun an der COX-2 Induktion beschrieben (Kang *et al.* 2006; Wadleigh *et al.* 2000). In den vorliegenden Experimenten konnte eine Zunahme der JNK sowie der c-Jun Phosphorylierung infolge einer MAF02 Exposition beobachtet werden. Interessanterweise führte die Vorinkubation der Zellen bereits mit der niedrigen Konzentration von 1 mM NAc zu einer vollständigen Inhibierung der Phosphorylierung bzw. der damit verbundenen Aktivierung der

JNK1/2 aber auch des redox-sensitiven Transkriptionsfaktors c-Jun (Abb. 54 und Abb. 53). Dies bedeutet, dass die MAF02-bedingte Aktivierung des JNK1/2 Signalweges unabhängig von der Induktion der COX-2 verläuft, zumindest in dieser untersuchten Makrophagen-Zelllinie.

#### **4.4 Primäre humane Makrophagen und die murine Makrophagen Zelllinie RAW264.7 im Vergleich**

Der Einsatz von Zelllinien bietet den Vorteil, dass unter standardisierten Bedingungen umfangreiche *in vitro* Untersuchungen an Zellkulturen durchgeführt werden können, was die Aufklärung physiologischer Prozesse auf zellulärer und molekularer Ebene bedeutend vereinfacht. Die Charakteristika der Zellen können über mehrere Passagen aufrechterhalten werden, wodurch eine gute Reproduzierbarkeit der Versuche erreicht wird. Der Nachteil der Zelllinien besteht in ihrer Transformation, welche den Zellen eine unbegrenzte Teilungsfähigkeit ermöglicht. Viele Zelllinien, die über einen langen Zeitraum kultiviert werden, zeigen Unterschiede hinsichtlich ihres Differenzierungsgrades, Wachstumsverhaltens aber auch in ihrer Funktion im Vergleich zur Ausgangskultur (Guillouzo *et al.* 2007), was eine Übertragung der *in vitro* Ergebnisse auf die *in vivo* Situation einschränkt. Dagegen beinhalten Primärkulturen kein transformiertes Erbmaterial und repräsentieren daher ein realistischeres Zellmodell, das näher an *in vivo* Situationen angepasst ist. Bedingt durch den hohen Arbeitsaufwand und die damit verbundenen hohen Kosten können primäre Zellen aber nicht für zahlreiche *in vitro* Untersuchungen eingesetzt werden. Aus diesem Grund sollten im Anschluss die in RAW264.7 Makrophagen gezeigten zellulären Effekte hinsichtlich des Arachidonsäurestoffwechsels partiell in primären, humanen Makrophagen verifiziert werden. Ferner wurden sowohl akut zytotoxische Effekte als auch die Bildung von ROS analysiert.

Die primären MDM wiesen sowohl einen ähnlichen, dosisabhängigen Vitalitätsverlust als auch eine vergleichbare Bildung von ROS nach Flugaschebehandlung auf (Abb. 23 und Abb. 24). Die zeitabhängige Aktivierung der ERK1/2 nach Partikelinkubation konnte in den primären Zellen bestätigt werden (Abb. 42). Allerdings differierte der Zeitverlauf der Phosphorylierung leicht, denn schon nach einer Stunde lag eine geringe Menge an phosphorylierter ERK1/2 in den

Primärzellen vor. Beim Vergleich der Primärzellen und der Makrophagen-Zelllinie zeigte sich eine deutliche Übereinstimmung im Zeitverlauf der Zunahme der Menge an phosphorylierter JNK1/2 (Abb. 46), wohingegen die Aktivierung der p38 Kinase Unterschiede erkennen ließ (Abb. 44). So war nach MAF02 Inkubation eine zeitabhängige Aktivierung der p38 in den primären MDM zu verzeichnen, während in den RAW264.7 Zellen nur eine moderate p38 Kinase Aktivierung vorlag. Die MDM scheinen in Bezug auf die MAPK geringfügig empfindlicher zu sein als die getestete Makrophagen-Zelllinie.

Obwohl eine Aktivierung der ERK1/2 zu beobachten war, konnte interessanterweise nach der Behandlung der primären MDM mit Flugaschepartikel keine signifikante Freisetzung der Arachidonsäure festgestellt werden (Abb. 30). Aufgrund der Unterschiede in der Arachidonsäurefreisetzung wurde die Expression der cPLA<sub>2</sub> in den Makrophagen analysiert (Daten nicht gezeigt). Dabei konnte gezeigt werden, dass in den primären Zellen eine deutlich geringere Menge an cPLA<sub>2</sub> vorhanden war als in der Makrophagen-Zelllinie. Worin diese unterschiedliche Expression der cPLA<sub>2</sub> begründet liegt, bleibt unklar. Denkbar wäre, dass die isolierten primären Monozyten nach 10 Tagen nicht vollständig zu Makrophagen differenziert waren, weshalb eine reduzierte Expression der cPLA<sub>2</sub> nachgewiesen wurde. So beobachteten Matheson *et al.* (2002), nachdem humane Monozyten aus dem Blut über 14 Tage zu MDM differenziert wurden, ebenfalls eine verminderte Expression der cPLA<sub>2</sub> im Vergleich zur humanen U937 Zelllinie, die mit Hilfe von TPA (12-o-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat) über 72 Stunden zu Makrophagen differenziert wurde. Folglich resultierte die geringere Expression der cPLA<sub>2</sub> in einer geminderten Fähigkeit, nach Flugstaub Exposition, die Arachidonsäure aus Phospholipiden freizusetzen. Weiterführende Studien müssen klären, ob die Monozyten nach einer 10-tägigen Differenzierung vollständig zu Makrophagen ausgereift sind.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass die eingesetzte RAW264.7 Zelllinie ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung inflammatorischer und oxidativer Prozesse darstellt, was von anderen Arbeiten unterstützt wird, die ebenfalls diese Zelllinie zur Analyse inflammatorischer und oxidativer Effekte nach Partikelexposition verwendeten (Li *et al.* 2004; Wang *et al.* 2005b). Außerdem lässt sich postulieren, dass die hier untersuchten Wirkmechanismen zwischen den unterschiedlichen Spezies konserviert sind.

#### **4.5 Aufnahme von Flugstaubpartikeln in Makrophagen**

Die Inhalation stellt den Hauptaufnahmeweg für partikuläre Luftverunreinigungen dar. Dabei werden die mit der Atemluft aufgenommenen Umweltpartikel in Abhängigkeit ihrer Größe in unterschiedlichen Bereichen der Atemwege deponiert (Heyder *et al.* 1986; Oberdörster *et al.* 2005). Partikel mit einem aerodynamischen Durchmesser kleiner als 2,5 µm dringen bis in die Peripherie der Lunge vor, wo sie in direkten Kontakt mit dem Lungenepithel kommen.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Partikel in Zellen aufgenommen werden. So detektierten Wottrich *et al.* (2004) mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie Hämatit Nanopartikel sowohl als Einzelpartikel als auch als Partikelagglomerate im Zytosol von humanen A549 Epithelzellen. Ebenso wurden in Alveolarmakrophagen, die mit Nanoröhrchen exponiert wurden, Partikelaggregate beobachtet, die an Membranen und Lamellarkörperchen gebunden waren (Pulskamp *et al.* 2007). Dagegen konnten keine Partikel innerhalb des Zellkerns oder anderen zellulären Organellen nachgewiesen werden (Singh *et al.* 2007). Im Gegensatz dazu detektierten sowohl Chen und Mikecz (2005) als auch Geiser und Kollegen (2005) ultrafeine Partikel im Zellkern. Eine Studie von Li *et al.* (2003) unterscheidet zwischen der Lokalisation von feinen und ultrafeinen Stäuben in RAW264.7 Makrophagen und BEAS-2B Epithelzellen. Sie beschreiben, dass die feinen Partikel in cytoplasmatischen Vakuolen, während die ultrafeinen Partikel vorwiegend in Mitochondrien vorzufinden sind. Dabei scheint eine Schädigung der charakteristischen Membranstrukturen der Mitochondrien vorzuliegen. Die Autoren vermuten hier einen direkten Zusammenhang zwischen der subzellulären Lokalisation der ultrafeinen Partikel in den Mitochondrien, der Generierung von ROS und der geschädigten Mitochondrienmembran. Einerseits können die Partikel intrazellulär ROS bilden. Dies führt zur Schädigung der Mitochondrienmembran, was ein Eindringen der Partikel in die Mitochondrien ermöglicht. Andererseits können die ultrafeinen Partikel aufgrund ihrer geringen Größe Membranen permeieren und innerhalb der Mitochondrien die innere Mitochondrienmembran schädigen.

In einem Triple Zellkultursystem, bestehend aus Monozyten abstammenden Makrophagen (MDM), Epithelzellen (A549) und Monozyten abstammenden dendritischen Zellen (MDDC) konnte eine Aufnahme von fluoreszierenden Polystyrenpartikeln (aerodynamischer Durchmesser 1 µm) in Zellfortsätze von

dentritischen Zellen beobachtet werden (Blank *et al.* 2007). Nach Internalisierung wurde sogar ein Transfer der Partikel von den dentritischen Zellen in Makrophagen beschrieben.

Aus der Literatur ist weiterhin bekannt, dass Partikel durch die Aufnahme in Zellen oder durch die Interaktion mit Rezeptoren verschiedene Signaltransduktionskaskaden aktivieren können. So zeigte die Arbeitsgruppe um Balduzzi *et al.* (2004), dass in RAW264.7 Makrophagen eine dosisabhängige Freisetzung der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-6 mit der Aufnahme von Quarzpartikeln einhergeht. Des Weiteren konnte in einer Studie, infolge der Aufnahme von Quarzpartikeln in Alveolarmakrophagen aus der Ratte, eine verstärkte Freisetzung von ROS sowie von TNF- $\alpha$  festgestellt werden (Haberzettl *et al.* 2007). Untersuchungen an primären Hamster Alveolarmakrophagen demonstrierten dass eine dosisabhängige Aufnahme von ROFA (*residual oil fly ash*) mit der gesteigerten ROS Bildung korreliert (Goldsmith *et al.* 1997). Die Aufnahme von Titandioxid und Quarz Partikeln in primären Hamster Alveolarmakrophagen zeigte eine Calcium-Abhängigkeit (Stringer *et al.* 1995).

Aus der Literatur gab es somit Hinweise, dass die MAF02-induzierten zellulären Effekte mit der Aufnahme der Partikel in Makrophagen einhergehen. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die Internalisierung von MAF02 Partikeln mit der Aktivierung der in dieser Arbeit untersuchten Signalwege korreliert.

Die Untersuchung der Partikelaufnahme erfolgte zunächst mit Hilfe der FACS-Analyse (*Fluorescence Cytometry*). Hierbei wird mit dem Fluoreszenzsignal im SSC (*sidescatter*) die Granularität der Zellen, die sich mit Aufnahme von Partikeln erhöhen soll, erfasst. Die geometrischen Mittelwerte der SSC-Fluoreszenzintensitäten zeigten eindeutig eine dosis- und zeitabhängige Zunahme der Granularität der Makrophagen nach MAF02 Exposition (Abb. 56 und Abb. 57). Diese Daten stimmten soweit mit der Aktivierung der Signalwege überein. Die zunehmende Granularität der Zellen korreliert mit der zunehmenden Aktivierung der Makrophagen in Bezug auf die Aktivierung des Arachidonsäuremetabolismus. Es gibt jedoch Hinweise in der Literatur, dass das Anheften von Partikeln auf der Zelloberfläche zur Granularitätsänderung führt (Nuutila und Lilius 2005). Man kann dadurch keine genaue Aussage darüber treffen, ob die Partikel auf der Oberfläche der Zellen lokalisiert sind oder ob die Partikel in die Zelle aufgenommen wurden. Aus diesem Grund wurden die durch FACS-Analyse ermittelten Ergebnisse durch die

Transmissionselektronenmikroskopie verifiziert. Die TEM-Analyse ermöglicht nicht nur die Dokumentation der Partikelaufnahme, sondern auch die genaue Bestimmung der Partikellokalisierung. Man kann eindeutig zwischen Partikeln, die auf der Zelloberfläche haften, und Partikeln, die die Zellmembran permeiert haben und im Zytosol oder anderen zellulären Kompartimenten lokalisiert sind, unterscheiden.

Die TEM-Analysen ergänzen die Ergebnisse der FACS-Analyse. Mit zunehmender Inkubationsdauer wurden vermehrt Partikel in die Zellen aufgenommen (Abb. 58). Nach der einstündigen Behandlung konnte man vereinzelt Partikel bzw. Partikelagglomerate innerhalb der Zelle vorfinden. Dagegen waren die Partikelagglomerate häufig auf der Zelloberfläche zu finden. Dort waren sie zumeist von Makrophagen-typischen Zellfortsätzen umgeben, welche möglicherweise auf eine aktive Aufnahme der Partikel mittels Phagozytose schließen lassen. Nach einer zweieinhalbstündigen Inkubation war ein signifikanter Anstieg der internalisierten Partikel zu beobachten, der sich nach einer fünfstündigen Inkubation noch leicht verstärkte. Die Resultate der TEM-Analysen stimmen somit mit der Hypothese überein, dass die MAF02-ausgelösten zellulären Effekte direkt mit der Aufnahme von MAF02 Partikeln in Makrophagen assoziiert sind. Um eine genaue Aussage über den Aufnahmemechanismus von MAF02 Partikeln treffen zu können, ob dieser aktiv oder passiv erfolgt, müsste man in weiteren Versuchsreihen die aktive Aufnahme durch die Behandlung der Makrophagen mit Cytochalasin D hemmen und anschließend die Zellen für die TEM-Analyse präparieren. Es kann jedoch vorab festgestellt werden, dass die Abwesenheit von FCS bei der Exposition von Makrophagen keinen Einfluss auf die Aufnahme der Partikel hatte. Serumproteine im Zellkulturmedium bewirken eine unspezifische Adsorption von Serumproteinen an der Partikeloberfläche (Brown *et al.* 2000). Diese Opsonierung löst die Phagozytose der Partikel beispielsweise über den Komplement-Rezeptor oder den Fcγ-Rezeptor aus, was somit in diesem System ausgeschlossen werden kann.

In der Literatur gibt es Hinweise auf einen aktiven energie-abhängigen Aufnahmemechanismus von Partikeln. Beispielsweise konnte die Gruppe um Haberzettl *et al.* (2007) mit Hilfe von Cytochalasin D, einem Inhibitor der Aktinpolymerisation, eine Hemmung der Aufnahme von ultrafeinen Quarzpartikeln, feinen und ultrafeinen TiO<sub>2</sub> Partikeln in Makrophagen nachweisen. Dabei wird die Aufnahme der Partikel über die klassische Aktin-abhängige Phagozytose mit dem Phagozytose-Rezeptor FcγRII diskutiert. Andererseits gibt es Hinweise in der



Literatur auf eine passive, nicht-endozytotische Aufnahme von feinen und ultrafeinen Partikeln (Geiser *et al.* 2005). Obwohl zum Blockieren der Phagozytose Cytochalasin D in Lungenmakrophagen aus dem Schwein eingesetzt wurde, konnten Polystyren-Partikel mit einem Durchmesser von 200 nm sowie 78 nm innerhalb der Makrophagen detektiert werden. Außerdem konnten im Zytosol von Erythrozyten, die nicht zur Phagozytose fähig sind, sowohl feine (aerodynamischer Durchmesser von 0,2 µm) als auch ultrafeine fluoreszierende Polystyren-Partikel (aerodynamischer Durchmesser < 100 nm) nachgewiesen werden, was auf eine passive Aufnahme durch Diffusion oder adhäsive Interaktionen hindeutet.

#### **4.6 Kokultursystem von Lungenzellen – Interzellulärer Crosstalk**

Um das Risikopotential von Partikeln im Bereich der Inhalationstoxikologie zu analysieren, werden häufig Tierversuche durchgeführt. Tierversuche sind mit hohen Tierhaltungskosten verbunden, was Versuchsreihen mit vielen Wiederholungen begrenzt. Im Gegensatz dazu ermöglichen *in vitro* Studien unter standardisierten Versuchsbedingungen zahlreiche Untersuchungen auf zellulärer und molekularer Ebene. Es kann hierbei auf ein breites Spektrum von Untersuchungsmethoden zugegriffen werden. Die meisten *in vitro* Studien beschränken sich auf die Verwendung von Monokulturen, wie beispielsweise Makrophagen, Epithel- aber auch Endothelzellen. Unter realistischen Bedingungen ist aber nicht nur ein Zelltyp betroffen. Denn nach Deposition von Partikeln interagieren die verschiedenen Zelltypen der Lunge, um koordiniert auf das „Eindringen“ der Partikel antworten zu können (Blank *et al.* 2007).

So führte die Kokultur von humanen Epithelzellen (A549) und humanen Makrophagen (Mono Mac 6, THP-1) nach der Exposition von ultrafeinen Partikeln im Vergleich zu den jeweiligen Monokulturen zu einer Steigerung der IL-6 und IL-8 Produktion (Wottrich *et al.* 2004). Des Weiteren resultierte die zelluläre Interaktion von humanen PMN (polymorphkernigen Neutrophile) und Lungenkarzinomzellen (HTB54) nach Behandlung mit Umweltpartikeln, die einen Durchmesser  $\leq 2,5$  µm aufweisen, in einer verstärkten Freisetzung des Zytokins IL-8 (Ning *et al.* 2004). Eine ältere Studie der gleichen Arbeitsgruppe zeigte eine Erhöhung der TNF- $\alpha$  und MIP-2 (Makrophagen inflammatorisches Protein-2) Freisetzung in einer Kokultur aus Makrophagen und Epithelzellen nach Belastung mit Titandioxid, Quarz und ROFA Partikeln (Tao und Kobzik 2002). Dieser Effekt war mit keiner vermehrten Aufnahme

von Partikeln assoziiert und kann auf die interzellulären Wechselwirkungen zurückgeführt werden. Ähnliche Effekte wurden bei Diabaté *et al.* (2004) beobachtet. Die Kokultur der Alveolarmakrophagen-Zelllinie (NR8383) und der Alveolarepithel-Zelllinie (RLE-6TN) aus der Ratte setzte nach gleichzeitiger Exposition mit Flugaschepartikeln und LPS mehr MIP-2 frei als die Summe der jeweiligen Monokulturen. Außerdem belegte eine aus humanen Lungenepithelzellen (BEAS-2B) und primären mononukleären Zellen (PBMC) bestehende Kokultur-Studie, dass die Freisetzung von IL-6 und IL-8 infolge einer Behandlung mit Rußpartikeln im Kokultursystem, verglichen mit den jeweiligen Monokulturen, synergistisch erhöht war (Drumm *et al.* 2000).

Um die Wechselwirkungen der in der Lunge benachbarten Makrophagen und Epithelzellen zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit ebenfalls ein realistischeres *in vitro* Kokultursystem mit beiden Zelltypen etabliert. Dabei kamen die bereits ausführlich untersuchte RAW264.7 Makrophagen-Zelllinie und die LA-4 Lungenepithel-Zelllinie zum Einsatz. Der Fokus der experimentellen Untersuchung lag erneut auf der Freisetzung der Arachidonsäure.

Wie bereits erwähnt, reagierten die RAW264.7 Zellen in Monokultur bei nicht-zytotoxischen Konzentrationen der Flugasche mit der Freisetzung der Arachidonsäure. Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen stieg der Gehalt an freier AA um das 6-fache nach einer zweieinhalbstündigen sowie fünfstündigen Inkubation mit MAF02 Partikeln an. In LA-4 Epithelzellen hatte die Flugasche keine Wirkung in Bezug auf die Arachidonsäuremobilisation (Abb. 60). Die unterschiedliche Empfindlichkeit der verschiedenen Zelltypen in Bezug auf die Arachidonsäurefreisetzung könnte mit deren Phagozytosefähigkeit verbunden sein. Denn Epithelzellen sind nur im begrenzten Maße fähig, Partikel aufzunehmen. Interessanterweise wurde in Kokulturen, bestehend aus den Epithelzellen und Makrophagen, die Freisetzung der Arachidonsäure synergistisch verstärkt (Abb. 61). Das Kokultursystem reagierte sensitiver als die jeweiligen Monokulturen, der Anteil freier Arachidonsäure erhöhte sich um das 8-fache. Dies lässt auf eine wichtige Rolle der Zell-Zell-Interaktionen bei Entzündungsreaktionen im Allgemeinen und bei der Arachidonsäuremobilisation im Besonderen schließen. Der synergistische Effekt ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die RAW264.7 Makrophagen durch Partikelbehandlung Lipidmediatoren, wie das in dieser Arbeit nachgewiesene PGE<sub>2</sub>, ausschütten und dadurch die Epithelzellen zur erhöhten Freisetzung von

Arachidonsäure anregen. In verschiedenen Arbeiten wird auch diskutiert, dass der direkte Zell-Zell-Kontakt für die synergistische Wirkung verantwortlich ist (Hoebe *et al.* 2001; Tao und Kobzik 2002).

Um Aufschluss über die Beteiligung von Epithelzellen an der Arachidonsäuremobilisation im Kokultursystem zu erlangen, müssten die Makrophagen und Epithelzellen mit unterschiedlich markierter Arachidonsäure gekennzeichnet werden. Diese Doppelmarkierung, bei der die Epithelzellen beispielsweise mit Tritium-markierter Arachidonsäure und die Makrophagen mit <sup>14</sup>C-markierter Arachidonsäure gekennzeichnet wurden, ermöglicht die Differenzierung der Arachidonsäure aus den einzelnen Zelllinien nach MAF02 Inkubation.

#### 4.7 Zeitlicher Ablauf der durch Flugaschepartikel induzierten zellulären Prozesse

Die Untersuchungen lassen einen zeitlichen Ablauf der MAF02-induzierten zellulären Prozesse, die in Abb. 62 dargestellt sind, erkennen.

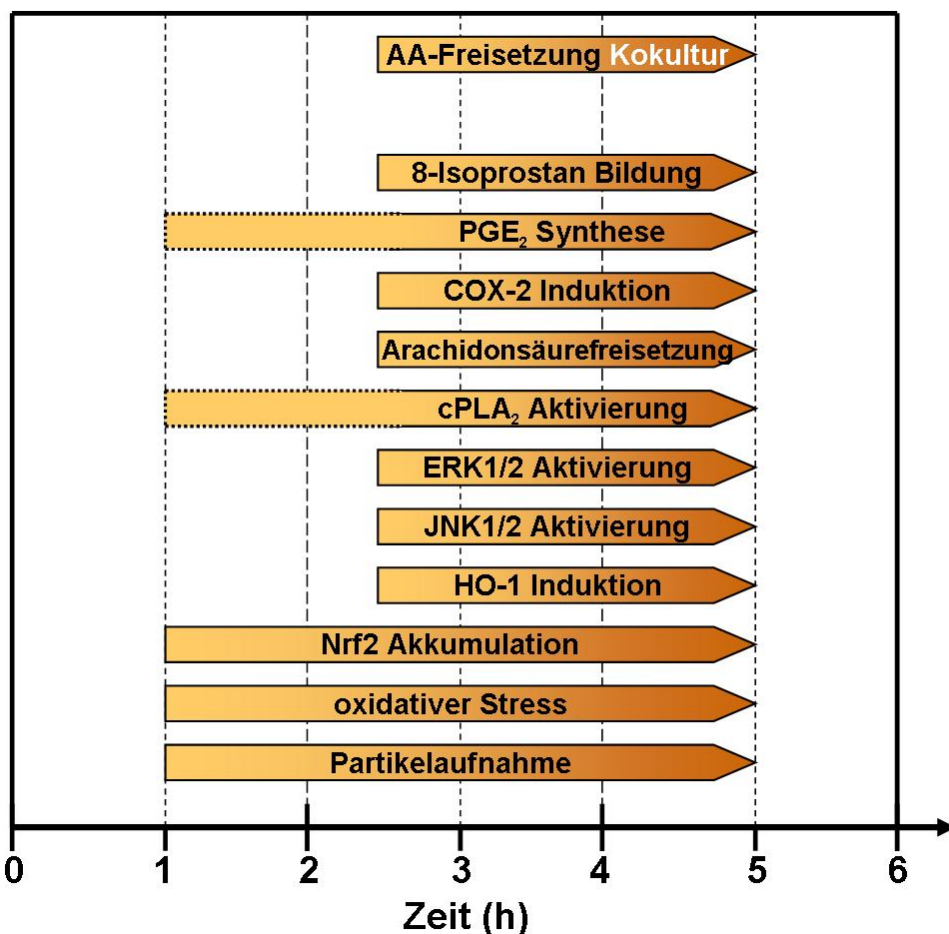


Abb. 62: Zeitlicher Reaktionsablauf der in der Arbeit analysierten zellulären Prozesse

In murinen RAW264.7 Makrophagen erfolgte die Aufnahme der MAF02 Partikel in geringem Maße schon nach einer einstündigen Inkubationszeit. In diesem Zeitraum sank der überwiegende Teil der Partikel im Kulturmedium, setzte sich auf den Zellen ab, um daraufhin in die Zellen aufgenommen zu werden. Mit der Aufnahme der Partikel trat nach etwa einer bis zweieinhalb Stunden oxidativer Stress auf, der sich durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, durch die Akkumulation des Nrf2 Transkriptionsfaktors, aber auch durch die Formation von 8-Isoprostan charakterisierte. Weiterhin erfolgte nach einer zweistündigen Partikelbehandlung sowohl die Aktivierung der ERK1/2 und JNK1/2 Signalwege als auch die deutliche Aktivierung der cPLA<sub>2</sub>. Nach der Aktivierung dieser Enzyme konnte infolge einer zweieinhalbstündigen Flugstaubinkubation die Freisetzung der Arachidonsäure aus Phospholipiden beobachtet werden. Die Mobilisation der Arachidonsäure ging mit einer leichten Induktion der Cyclooxygenase-2, jedoch mit einer starken Induktion der Hämoxygenase-1 einher. Als ein Endpunkt der Arachidonsäurekaskade war eine schwache Zunahme von PGE<sub>2</sub> im Kulturüberstand nach einer Stunde zu verzeichnen, die aber erst nach einer zweieinhalbstündigen Inkubation signifikant wurde.

Des Weiteren zeigte das Zellkulturmodell, bei dem die etablierten murinen RAW264.7 Makrophagen und LA-4 Epithelzellen kokultiviert wurden, nach einer zweieinhalbstündigen MAF02 Inkubation in Bezug auf die Arachidonsäuremobilisation eine verstärkte Sensitivität gegenüber MAF02 Partikeln als die jeweiligen Monokultur.

#### **4.8 Möglicher Verlauf der partikel-bedingten Induktion des Arachidonsäurestoffwechsels – eine Arbeitshypothese**

Die Ergebnisse dieser vorliegenden Arbeit liefern einen Überblick der zellulären Prozesse, die an der MAF02-induzierten Inflammation *in vitro* beteiligt sind. Aufgrund der untersuchten Interaktionen kann ein Modell postuliert werden, das die Signalwege und deren Wechselwirkungen in RAW264.7 Makrophagen beschreibt (Abb. 63):

- I. Die Flugaschepartikel werden zunächst von den Makrophagen aufgenommen und reichern sich sowohl als Primärpartikel als auch als Partikelagglomerate im Zytosol an. Dort liegen sie entweder frei oder in Membraneinschlüssen vor, was

vermuten lässt, dass die Partikel möglicherweise sowohl aktiv als auch passiv aufgenommen werden. Die Mechanismen der MAF02 Aufnahme bleiben aber weiterhin ungeklärt.

Die Internalisierung der Partikel kann mit zellulären Reaktionen in Verbindung gebracht werden:

- II. Im Zytosol verursachen die Partikel die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) als initialen Schritt der Partikelwirkung. Die Generierung der ROS könnte auf die Fraktion der ultrafeinen Partikel, die eine große Oberfläche aufweisen und/oder auf die in der Flugasche enthaltenen Übergangsmetalle zurückzuführen sein.
- III. Die Generierung von ROS resultiert in der Aktivierung des ERK1/2 sowie des JNK1/2 Signalweges. Außerdem könnte die Bildung von ROS zur Inaktivierung von Phosphatasen beitragen, wodurch die Dephosphorylierung und damit die Inaktivierung der MAPK verhindert wird und die phosphorylierten Formen persistieren.

Infolge der Aktivierung der ERK1/2, möglicherweise auch der JNK1/2, kommt es zur Phosphorylierung und dadurch zur Aktivierung der zytosolischen, aber nicht der sekretorischen oder  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen  $\text{PLA}_2$ .

- IV. Des Weiteren erhöht sich, möglicherweise bedingt durch die Bildung von ROS, der intrazelluläre Calciumspiegel. Dadurch kann die  $\text{cPLA}_2$  zu ihrem Substratzielort, an perinukleäre Membranen, translozieren. Dort bewirkt sie die Freisetzung der Arachidonsäure.

Denkbar wäre auch, dass ROS inhibierend auf die Reacylierung der Arachidonsäure wirken, was ebenfalls zu einer Akkumulation der Arachidonsäure im Zytosol führen würde.

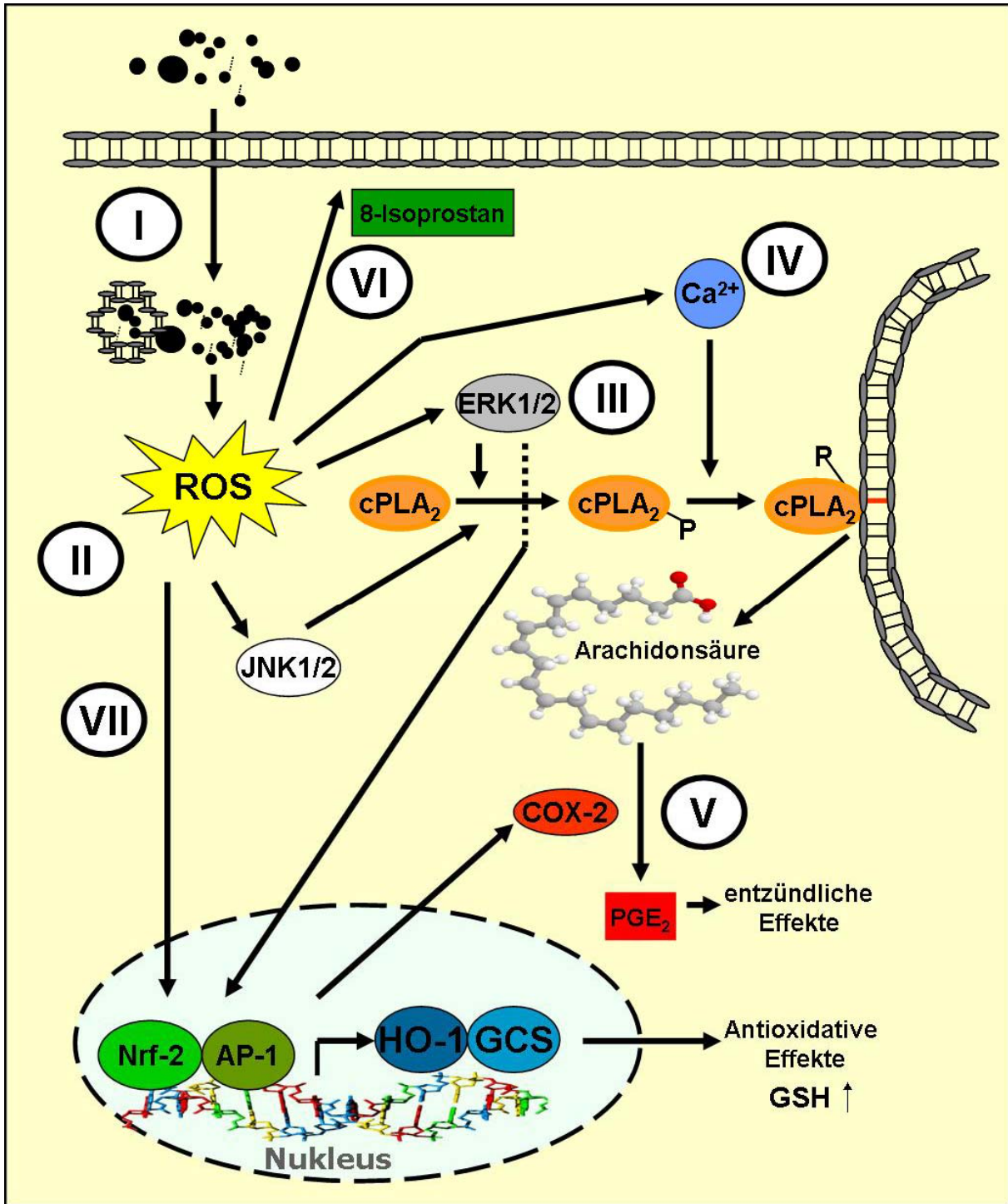
- V. Frei im Zytosol vorliegende Arachidonsäure wird durch die Cyclooxygenase-2 (COX-2) und Prostaglandinsynthasen zu Prostaglandin  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ) metabolisiert. Die Regulation der COX-2 erfolgt auf transkriptioneller Ebene und die Enzymaktivität wird durch die Anwesenheit seines Substrates induziert.
- VI. Andererseits wird infolge von oxidativem Stress die an Phospholipide gebundene Arachidonsäure nicht-enzymatisch zu 8-Isoprostan, einem pulmonalen Vasokonstriktor, oxidiert und durch  $\text{PLA}_2$  freigesetzt.
- VII. Antioxidative Mechanismen werden induziert, welche z.B. durch die Akkumulation des Transkriptionsfaktors Nrf2 charakterisiert sind. Die

Akkumulation von Nrf2 im Zellkern bewirkt die Induktion der  $\gamma$ -Glutamyl-Cystein Synthase (GCS) auf transkriptioneller Ebene. Infolgedessen erhöht sich in der Zelle der Gehalt des antioxidativ wirkenden Glutathions (GSH).

Außerdem erfolgt die Induktion der antioxidativen Hämoxxygenase-1 (HO-1). Dabei könnte der Transkriptionsfaktor Nrf2, aber auch AP-1, über die Aktivierung des ERK1/2, jedoch nicht des JNK1/2 Signalweges, für die Regulation der Transkription des *ho-1* Gens verantwortlich sein.

Prozesse wie die Generierung von ROS, aber auch die Aktivierung der ERK1/2, JNK1/2 und p38 MAPK wurden auch in primären Monozyten-abstammenden Makrophagen nach MAF02 Exposition nachgewiesen. Die Freisetzung der Arachidonsäure jedoch konnte nicht gezeigt werden, was möglicherweise an der unvollständigen Ausdifferenzierung der primären, humanen Zellen lag.

Zusammenfassend zeigen die Resultate dieser Arbeit, dass die von umweltrelevanten Flugstaubpartikeln induzierten inflammatorischen Prozesse durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies initiiert werden. Dies gilt für die untersuchte murine RAW264.7 Makrophagen-Zelllinie. Aber auch die realistischeren Zellsysteme der primären humanen Makrophagen sowie der Kokultur belegen das Potential von Umweltpartikeln Entzündungsprozesse hervorzurufen. Der postulierte MAF02-induzierte Reaktionsweg könnte auch *in vivo* für die Entstehung von Lungenerkrankungen, wie beispielsweise COPD und chronischen Entzündungen, nach akuter Exposition von Feinstaub relevant sein.



**Abb. 63: Zusammenfassendes Modell und aktuelle Arbeitshypothese der Vorgänge während der MAF02 Inkubation von RAW264.7 Makrophagen**

Die Beschreibung der verschiedenen Prozesse wurde im vorangehenden Kapitel 4.8 detailliert erläutert





## 5 Literaturverzeichnis

Ackermann, E. J., Conde-Frieboes, K., and Dennis, E. A. (1995). Inhibition of macrophage Ca-independent phospholipase A(2) by bromoenol lactone and trifluoromethyl ketones. *J Biol Chem.* **270**(1), 445-450.

Alam, J., Stewart, D., Touchard, C., Boinapally, S., Choi, A. M. K., and Cook, J. L. (1999). Nrf2, a cap'n'collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem.* **274**(37), 26071-26078.

Albrecht, C., Borm, P., Adolf, B., Timblin, C., and Mossman, B. (2002). In vitro and in vivo activation of extracellular signal-regulated kinases by coal dusts and quartz silica. *Toxicol Appl Pharmacol.* **184**(1), 37-45.

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

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

Alonso, F., Henson, P. M., and Leslie, C. C. (1986). A cytosolic phospholipase in human neutrophils that hydrolyzes arachidonoyl-containing phosphatidylcholine. *BBA* **878**(2), 273-280.

Ames, B. (1989). Endogenous DNA damage as related to cancer and aging. *Mutat Res.* **214**(1), 41-46.

Araujo, J. A., Barajas, B., Kleinman, M., Wang, X., Bennett, B. J., Gong, K. W., Navab, M., Harkema, J., Sioutas, C., Lulis, A. J., and Nel, A. E. (2008). Ambient particulate pollutants in the ultrafine range promote early atherosclerosis and systemic oxidative stress. *Circ Res.* **102**(5), 589-596.

Ardies, C. M. (2003). Inflammation as cause for scar cancers of the lung. *Integr Cancer Ther.* **2**(3), 238-246.

Aruoma, O., Halliwell, B., Laughton, M., and Gutteridge, J. (1989). The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an Iron(II)-Iron(III) complex. *Biochem J.* **258**(2), 617-620.

Asai, K., Hirabayashi, T., Houjou, T., Uozumi, N., and Shimizu, T. (2003). Human group IVC phospholipase A2 (cPLA2gamma). Roles in the membrane remodeling and activation induced by oxidative stress. *J Biol Chem.*, 8809-8814.

Atkinson, R. W., Ross Anderson, H., Sunyer, J., Ayres, J., Baccini, M., Vonk, J. M., Boumghar, A., Forastiere, F., Forsberg, B., Touloumi, G., Schwartz, J., and Katsouyanni, K. (2001). Acute effects of particulate air pollution on respiratory admissions. Results from APHEA 2 project. *Am Respir Crit Care Med.* **164**(10), 1860-1866.

Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2002). Involvement of calcium-independent phospholipase A2 in hydrogen peroxide-induced accumulation of free fatty acids in human U937 cells. *J Biol Chem.* **277**(43), 40384-40389.

- Balduzzi, M., Diociaiuti, M., De Beradis, B., Paradisi, S., and Paoletti, L. (2004). In vitro effects on macrophages induced by noncytotoxic doses of silica particles possibly relevant to ambient exposure. *Environ Res.* **96**(1), 62-71.
- Balsinde, J., Bianco, I., Ackermann, E., Conde-Frieboes, K., and Dennis, E. (1995). Inhibition of calcium-independent phospholipase A2 prevents arachidonic acid incorporation and phospholipid remodeling in P388D1 macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92**(18), 8527-8531.
- Barañano, D. E., Rao, M., Ferris, C. D., and Snyder, S. H. (2002). Biliverdin reductase: A major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**(25), 16093-16098.
- Bauer, A. K., Dwyer-Nield, L. D., and Malkinson, A. M. (2000). High cyclooxygenase 1 (COX-1) and cyclooxygenase 2 (COX-2) contents in mouse lung tumors. *Carcinogenesis.* **21**(4), 543-550.
- Beck-Speier, I., Dayal, N., Karg, E., Maier, K., Roth, C., Ziesenis, A., and Heyder, J. (2001). Agglomerates of ultrafine particles of elemental carbon and TiO<sub>2</sub> induce generation of lipid mediators in alveolar macrophages. *Environ Health Perspect.* **109**(4), 613-618.
- Beck-Speier, I., Dayal, N., Karg, E., Maier, K., Schumann, G., Schulz, H., Semmler, M., Takenaka, S., Stettmaier, K., Bors, W., Ghio, A., Samet, J., and Heyder, J. (2005). Oxidative stress and lipid mediators induced in alveolar macrophages by ultrafine particles. *Free Radic Biol Med.* **38**(8), 1080-1092.
- Beck-Speier, I., Dayal, N., Karg, E., Maier, K. L., Schumann, G., Semmler, M., and Koelsch, S. M. (2006). Oxymetazoline Inhibits Proinflammatory Reactions: Effect on Arachidonic Acid-Derived Metabolites. *J Pharmacol Exp Ther.* **316**(2), 843-851.
- Behndig, A. F., Mudway, I. S., Brown, J. L., Stenfors, N., Helleday, R., Duggan, S. T., Wilson, S. J., Boman, C., Cassee, F. R., Frew, A. J., Kelly, F. J., Sandstrom, T., and Blomberg, A. (2006). Airway antioxidant and inflammatory responses to diesel exhaust exposure in healthy humans. *Eur Respir J.* **27**(2), 359-365.
- Berberat, P. O., Katori, M., Kaczmarek, E., Anselmo, D., Lassman, C., Ke, B., Shen, X., Busuttill, R. W., Yamashita, K., Csizmadia, E., Tyagi, S., Otterbein, L. E., Brouard, S., Tobiasch, E., Bach, F. H., Kupiec-Weglinski, J. W., and Soares, M. P. (2003). Heavy chain ferritin acts as an anti-apoptotic gene that protects livers from ischemia-reperfusion injury. *FASEB J.*, 03-0229fje.
- Bernard, G. R., Wheeler, A. P., Arons, M. M., Morris, P. E., Paz, H. L., Russell, J. A., Wright, P. E., and The Antioxidant in ARDS Study Group (1997). A trial of antioxidants N-acetylcysteine and procysteine in ARDS. *Chest.* **112**(1), 164-172.
- Blank, F., Rothen-Rutishauser, B., and Gehr, P. (2007). Dendritic cells and macrophages form a transepithelial network against foreign particulate antigens. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **36**(6), 669-677.
- Bonventre, J. V., Huang, Z., Taheri, M. R., O'Leary, E., Li, E., Moskowitz, M. A., and Sapirstein, A. (1997). Reduced fertility and postischemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A2. *Nature.* **390**(6660), 622-625.
- Borsch-Haubold, A. G., Bartoli, F., Asselin, J., Dudler, T., Kramer, R. M., Pitz-Castro, R., Watson, S. P., and Gelb, M. H. (1998). Identification of the phosphorylation sites of cytosolic phospholipase A2 in agonist-stimulated human platelets and HeLa cells. *J Biol Chem.* **273**(8), 4449-4458.

- Böyum, A. (1968). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* **97**, 77-89.
- Brouard, S., Otterbein, L. E., Anrather, J., Tobiasch, E., Bach, F. H., Choi, A. M. K., and Soares, M. P. (2000). Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med.* **192**(7), 1015-1026.
- Brown, D. M., Donaldson, K., Borm, P. J., Schins, R. P., Dehnhardt, M., Gilmour, P., Jimenez, L. A., and Stone, V. (2004). Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF- $\alpha$  cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **286**(2), L344-L353.
- Brown, D. M., Hutchison, L., Donaldson, K., and Stone, V. (2007). The effects of PM10 particles and oxidative stress on macrophages and lung epithelial cells: modulating effects of calcium-signaling antagonists. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **292**(6), L1444-L1451.
- Brown, D., Stone, V., Findlay, P., NacNee, W., and Donaldson, K. (2000). Increased inflammation and intracellular calcium caused by ultrafine carbon black is independent of transition metals or other soluble components. *Occup Environ Med.* **57**(10), 685-691.
- Buckman, S. Y., Gresham, A., Hale, P., Hruza, G., Anast, J., Masferrer, J., and Pentland, A. P. (1998). COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: implications for the development of skin cancer. *Carcinogenesis.* **19**(5), 723-729.
- Cai, H., and Harrison, D. G. (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* **87**(10), 840-844.
- Carpenter, C. T., Price, P. V., and Christman, B. W. (1998). Exhaled Breath Condensate Isoprostanes Are Elevated in Patients With Acute Lung Injury or ARDS. *Chest* **114**(6), 1653-1659.
- Castranova, V. (2004). Signaling pathways controlling the production of inflammatory mediators in response to crystalline silica exposure: role of reactive oxygen/nitrogen species. *Free Radic Biol Med.* **37**(7), 916-925.
- Chan, J., and Kwong, M. (2000). Impaired expression of glutathione synthetic enzyme genes in mice with targeted deletion of the Nrf2 basic-leucine zipper protein. *BBA.* **1517**(1), 19-26.
- Chandler, A., Eighmy, T., Hartlen, J., Hjelm, O. K. D., Sawell, S., van der Sloot, H., and Vehlow, J. (1997). The international ash working group (IAWG): Municipal solid waste incinerator residues. *Studies in environmental science 67. Elsevier Sci.*
- Channon, J. Y., and Leslie, C. C. (1990). A calcium-dependent mechanism for associating a soluble arachidonoyl-hydrolyzing phospholipase A2 with membrane in the macrophage cell line RAW 264.7. *J Biol Chem.* **265**(10), 5409-5413.
- Charbeneau, R. P., and Peters-Golden, M. (2005). Eicosanoids: mediators and therapeutic targets in fibrotic lung disease. *Clin Sci (Lond).* **108**(6), 479-491.
- Chen, B. C., Chang, Y. S., Kang, J. C., Hsu, M. J., Sheu, J. R., Chen, T. L., Teng, C. M., and Lin, C. H. (2004). Peptidoglycan induces nuclear factor- $\kappa$ B activation and cyclooxygenase-2 expression via Ras, Raf-1, and ERK in RAW 264.7 macrophages. *J Biol Chem.* **279**(20), 20889-20897.

Chen, M., and von Mikecz, A. (2005). Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Exp Cell Res.* **305**(1), 51-62.

Chen, Y., Shen, S., Lee, W., Lin, H., and Ko, C. L. T. (2002). Nitric oxide and prostaglandin E<sub>2</sub> participate in lipopolysaccharide/interferon-gamma-induced heme oxygenase 1 and prevent RAW264.7 macrophages from UV-irradiation-induced cell death. *J Cell Biochem.* **86**(2), 331-339.

Cruz, C. M., Rinna, A., Forman, H. J., Ventura, A. L. M., Persechini, P. M., and Ojcius, D. M. (2007). ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem.* **282**(5), 2871-2879.

Cuenda, A., Rouse, J., Doza, Y. D., Meier, R., Cohen, P., Gallagher, T. F., Young, P. R., and Lee, J. C. (1995). SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett.* **364**(2), 229-233.

D'Agostini, F., Balansky, R. M., Camoirano, A., and De Flora, S. (2005). Modulation of light-induced skin tumors by N-acetylcysteine and/or ascorbic acid in hairless mice. *Carcinogenesis.* **26**(3), 657-664.

D'Ippoliti, D., Forastiere, F., Ancona, C., Agabiti, N., Fusco, D., Michelozzi, P., and Perucci, C. (2003). Air pollution and myocardial infarction in Rome: a case-crossover analysis. *Epidemiology.* **14**(5), 528-535.

De Flora, S., Izzotti, A., D'Agostini, F., and Balansky, R. M. (2001). Mechanisms of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-points. *Carcinogenesis.* **22**(7), 999-1013.

Demers, K., and Kuhn, D. (1994). Influence of mineral dusts on metabolism of arachidonic acid by alveolar macrophage. *Environ Health Perspect.* **102**(10), 97-100.

Diabaté, S., Mülhopt, S., Paur, H., and Krug, H. (2008). The response of a co-culture lung model to fine and ultrafine particles of incinerator fly ash at the air-liquid interface. *Altern Lab Anim.* **36**(3), 285-298.

Diabaté, S., Mülhopt, S., Paur, H., Wottrich, R., and Krug, H. (2002). In vitro effects of incinerator fly ash on pulmonary macrophages and epithelial cells. *Int J Hyg Environ Health.* **204**(5-6), 323-326.

Diabaté, S., Völkel, K., Wottrich, R., and Krug, H. (2004). Macrophages and epithelial cells in co-culture as targets for pulmonary toxicity assessment. *Effects of air contaminants on the respiratory tract-interpretations from molecules to meta analysis (U. Heinrich ed.)*, 233-243.

Diez, E., Chilton, F., Stroup, G., Mayer, R., Winkler, J., and Fonteh, A. (1994). Fatty acid and phospholipid selectivity of different phospholipase A<sub>2</sub> enzymes studied by using a mammalian membrane as substrate. *Biochem J.* **301**(3), 721-726.

Dockery, D. W., Cunningham, J., Damokosh, A., Neas, L., Spengler, J., Koutrakis, P., Ware, J., Raizenne, M., and Speizer, F. (1996). Health effects of acid aerosols on North American children: respiratory symptoms. *Environ Health Perspect.* **104**(5), 500-505.

Dockery, D. W., Luttmann-Gibson, H., Rich, D. Q., Link, M. S., Mittleman, M. A., Gold, D. R., Koutrakis, P., Schwartz, J., and Verrier, R. L. (2005). Association of air pollution with increased incidence of ventricular tachyarrhythmias recorded by implanted cardioverter defibrillators. *Environ Health Perspect.* **113**(6), 670-674.

Dockery, D. W., Pope, C. A., Xu, X., Spengler, J. D., Ware, J. H., Fay, M. E., Ferris, B. G., and Speizer, F. E. (1993). An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N Engl J Med.* **329**(24), 1753-1759.

Dominici, F., McDermott, A., Zeger, S. L., and Samet, J. (2003). National maps of the effects of particulate matter on mortality: exploring geographical variation. *Environ Health Perspect.* **111**(1), 39-44.

Dominici, F., Zanobetti, A., Zeger, S. L., Schwartz, J., and Samet, J. M. (2004). Hierarchical bivariate time series models: a combined analysis of the effects of particulate matter on morbidity and mortality. *Biostatistics.* **5**(3), 341-360.

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

Dreher, K., Jaskot, R., Lehmann, J., Richards, J., McGee, J., Ghio, A., and Costa, D. (1997). Soluble transition metals mediate residual oil fly ash induced acute lung injury. *J Toxicol Environ Health.* **50**(3), 285-305.

Drumm, K. A. D., Kannt, S., Micke, P., Buhl, R., and Kienast, K. (2000). Soot-exposed mononuclear cells increase inflammatory cytokine mRNA expression and protein secretion in cocultured bronchial epithelial cells. *Respiration.* **67**(3), 291-297.

Ebelt, S., Brauer, M., Cyrys, J., Tuch, T., Kreyling, W., Wichmann, H., and Heinrich, J. (2001). Air quality in postunification Erfurt, East Germany: associating changes in pollutant concentrations with changes in emissions. *Environ Health Perspect.* **109**(4), 325-333.

Elder, A., Gelein, R., Silva, V., Feikert, T., Opanashuk, L., Carter, J., Potter, R., Maynard, A., Ito, Y., Finkelstein, J., and Oberdörster, G. (2006). Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environ Health Perspect.* **114**(8), 1172-1178.

Eliopoulos, A., Dumitru, C., Wang, C., Cho, J., and Tschlis, P. (2002). Induction of COX-2 by LPS in macrophages is regulated by Tpl2-dependent CREB activation signals. *EMBO J.* **21**(18), 4831-4840.

Ermak, G., and Davies, K. (2002). Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Mol Immunol.* **38**(10), 713-721.

Europäische Gemeinschaft (1997). Umweltstatistik 1996. *Europäische Gemeinschaft.*

Evans, J. H., and Leslie, C. C. (2004). The cytosolic phospholipase A2 catalytic domain modulates association and residence time at golgi membranes. *J Biol Chem.* **279**(7), 6005-6016.

Evans, J. H., Spencer, D. M., Zweifach, A., and Leslie, C. C. (2001). Intracellular calcium signals regulating cytosolic phospholipase A2 translocation to internal membranes. *J Biol Chem.* **276**(32), 30150-30160.

Finkelstein, J., Johnston, C., Barrett, T., and Oberdörster, G. (1997). Particulate-cell interactions and pulmonary cytokine expression. *Environ Health Perspect.* **105**(5), 1179-1182.

Friket, J. (1936). Fog along the Meuse Valley. *Trans Faradae Soc.* **32**(1192), 1197.

- Fritsch, S., Diabate, S., and Krug, H. (2006). Incinerator fly ash provokes alteration of redox equilibrium and liberation of arachidonic acid in vitro. *Biol Chem.* **387**(10/11), 1421-1428.
- Funk, C. D., Funk, L. B., Kennedy, M. E., Pong, A. S., and Fitzgerald, G. A. (1991). Human platelet/erythrocyte cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *FASEB J.* **5**(9), 2304-2312.
- Geiser, M., Rothen-Rutishauser, B., Kapp, N., Schürch, S., Kreyling, W., Schulz, H., Semmler, M., Im Hof, V., Heyder, J., and Gehr, P. (2005). Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect.* **113**(11), 1555-1560.
- Gercken, G., Berg, I., Dörger, M., and Schlüter, T. (1996). Mechanisms of particle-induced activation of alveolar macrophages. *Toxicol Lett.* **88**(1-3), 121-129.
- Ghio, A., and Devlin, R. B. (2001). Inflammatory lung injury after bronchial instillation of air pollution particles. *Am Respir Crit Care Med.* **164**(4), 704-708.
- Gijon, M. A., Spencer, D. M., Siddiqi, A. R., Bonventre, J. V., and Leslie, C. C. (2000). Cytosolic phospholipase A2 is required for macrophage arachidonic acid release by agonists that do and do not mobilize calcium. Novel role of mitogen-activated protein kinase pathways in cytosolic phospholipase A2 regulation. *J Biol Chem.* **275**(26), 20146-20156.
- Gillissen, A., Jaworska, M., Orth, M., Coffiner, M., Maes, P., App, E., Cantin A.M., and Schultze-Werninghaus, G. (1997). Nacystelyn, a novel lysine salt of N-acetylcysteine, to augment cellular antioxidant defence *in vitro*. *Respir Med.* **91**(3), 159-168.
- Gilmour, M., O'Connor, S., Dick, C., Miller, C., and Linak, W. (2004). Differential pulmonary inflammation and in vitro cytotoxicity of size-fractionated fly ash particles from pulverized coal combustion. *J Air Waste Manag Assoc.* **54**(3), 286-295.
- Goldsmith, C., Frevet, C., Imrich, A., Sioutas, C., and Kobzik, L. (1997). Alveolar macrophage interaction with air pollution particulates. *Environ Health Perspect.* **105**(5), 1191-1195.
- Gong, P., Stewart, D., Hu, B., Vinson, C., and Alam, J. (2002). Multiple basic-leucine zipper proteins regulate induction of the mouse heme oxygenase-1 gene by arsenite. *Arch Biochem Biophys.* **405**(2), 265-274.
- Guillouzo, A., Corlu, A., Aninat, C., Glaise, D., Morel, F., and Guquen-Guillouzo, C. (2007). The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem Biol Interact.* **168**(1), 66-73.
- Guyton, K. Z., Liu, Y., Gorospe, M., Xu, Q., and Holbrook, N. J. (1996). Activation of mitogen-activated protein kinase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J Biol Chem.* **271**(8), 4138-4142.
- Haberzettl, P., Duffin, R., Krämer, U., Höhr, D., Schins, R. P., Borm, P. J., and Albrecht, C. (2007). Actin plays a crucial role in the phagocytosis and biological response to respirable quartz particles in macrophages. *Arch Toxicol.* **81**(7), 459-470.
- Halliwell, B. (2007a). Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J.* **401**(1), 1-11.
- Halliwell, B. (2007b). Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* **035**(5), 1147-1150.

- He, X., Chen, M., and Ma, Q. (2008). Activation of Nrf2 in defense against cadmium-induced oxidative stress. *Chem Res Toxicol*.
- Herbst, U., Toborek, M., Kaiser, S., Mattson, M. P., and Hennig, B. (1999). 4-Hydroxynonenal induces dysfunction and apoptosis of cultured endothelial cells. *J Cell Physiol*. **181**, 295-303.
- Herschman, H. (1996). Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta*. **1299**(1), 125-140.
- Heyder, J., Gebhart, J., Rudolf, G., Schiller, C., and Stahlhofen, W. (1986). Deposition of particles in the human respiratory tract in the size range 0.005–15 µm. *J Aerosol Sci*. **17**, 811-825.
- Hida, T., Yatabe, Y., Achiwa, H., Muramatsu, H., Kozaki, K. i., Nakamura, S., Ogawa, M., Mitsudomi, T., Sugiura, T., and Takahashi, T. (1998). Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. *Cancer Res*. **58**(17), 3761-3764.
- Higashi, Y., Kanekura, T., and Kanzaki, T. (2000). Enhanced expression of cyclooxygenase (COX)-2 in human skin epidermal cancer cells: Evidence for growth suppression by inhibiting COX-2 expression. *Int J Cancer*. **86**(5), 667-671.
- Hirabayashi, T., Murayama, T., and Shimizu, T. (2004). Regulatory mechanism and physiological role of cytosolic phospholipase A2. *Biol Pharm Bull*. **27**(8), 1168-1173.
- Hirabayashi, T., Kume, K., Hirose, K., Yokomizo, T., Iino, M., Itoh, H., and Shimizu, T. (1999). Critical duration of intracellular Ca<sup>2+</sup> response required for continuous translocation and activation of cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem*. **274**(8), 5163-5169.
- Hoebe, K. H. N., Witkamp, R. F., Fink-Gremmels, J., Van Miert, A. S. J. P., and Monshouwer, M. (2001). Direct cell-to-cell contact between Kupffer cells and hepatocytes augments endotoxin-induced hepatic injury. *AJP - Gastrointest Liver Physiol*. **280**(4), G720-G728.
- Hoek, G., Brunekreef, B., Goldbohm, S., Fischer, P., and van den Brandt, P. A. (2002). Association between mortality and indicators of traffic-related air pollution in the Netherlands: a cohort study. *Lancet*. **360**(9341), 1203-1209.
- Hofer, T. P. J., Bitterle, E., Beck-Speier, I., Maier, K. L., Frankenberger, M., Heyder, J., and Ziegler-Heitbrock, L. (2004). Diesel exhaust particles increase LPS-stimulated COX-2 expression and PGE2 production in human monocytes. *J Leuk Biol*. **75**(5), 856-864.
- Hozumi, M., Fumiki, K., James, D. E., and Masayuki, Y. (2004). Small Maf proteins serve as transcriptional cofactors for keratinocyte differentiation in the Keap1–Nrf2 regulatory pathway. *PNAS*. **101**(17), 6379-6384.
- Ibald-Mulli, A., Stieber, J., Wichmann, H. E., Koenig, W., and Peters, A. (2001). Effects of air pollution on blood pressure: a population-based approach. *Am J Pub Health*. **91**(4), 571-577.
- Ikeda, H., Nishi, S., and Sakai, M. (2004). Transcription factor Nrf2/MafK regulates rat placental glutathione S-transferase gene during hepatocarcinogenesis. *Biochem J*. **380**(2), 515-521.
- Ishii, T., Itoh, K., Takahashi, S., Sato, H., Yanagawa, T., Katoh, Y., Bannai, S., and Yamamoto, M. (2000). Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *J Biol Chem*. **275**(21), 16023-16029.

- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J. D., and Yamamoto, M. (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* **13**(1), 76-86.
- Jeyapaul, J., and Jaiswal, A. (2000). Nrf2 and c-Jun regulation of antioxidant response element (ARE)-mediated expression and induction of gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene. *Biochem Pharmacol.* **59**(11), 1433-1439.
- John, A., Kuhlbusch, T., and Lutz, M. (2004). "Quellenzuordnung anhand aktueller Immissions- und Emissionsdaten in Berlin", IUTA-Workshop "PMx-Quellenidentifizierung, Ergebnisse als Grundlage für Maßnahmepläne". *Umweltbundesamt*, 112-120.
- Johnson, G., and Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science.* **298**(5600), 1911-1912.
- Jones, D. A., Carlton, D. P., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A., and Prescott, S. M. (1993). Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J Biol Chem.* **268**(12), 9049-9054.
- Kamata, H., Honda, S., Maeda, S., Chang, L., Hirata, H., and Karin, M. (2005). Reactive oxygen species promote TNF $\alpha$ -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell.* **120**(5), 649-661.
- Kang, J., Moon, C., Lee, H., Lee, H., Park, E., Kim, H., and Castranova, V. (2008). Comparison of the biological activity between ultrafine and fine titanium dioxide particles in RAW 264.7 cells associated with oxidative stress. *J Toxicol Environ Health A.* **71**(8), 478-485.
- Kang, Y. J., Wingerd, B. A., Arakawa, T., and Smith, W. L. (2006). Cyclooxygenase-2 gene transcription in a macrophage model of inflammation. *J Immunol.* **177**(11), 8111-8122.
- Katsouyanni, K., Touloumi, G., Samoli, E., Gryparis, A., Le Tertre, A., Monopoli, Y., Rossi, G., Zmirou, D., Ballester, F., Boumghar, A., Anderson, H., Wojtyniak, B., Paldy, A., Braunstein, R., Pekkanen, J., Schindler, C., and Schwartz, J. (2001). Confounding and effect modification in the short-term effects of ambient particles on total mortality: results from 29 European cities within the APHEA2 project. *Epidemiology.* **12**(5), 521-531.
- Kawashima, A., Oda, Y., Yachie, A., Koizumi, S., Nakanishi, I., and (2002). Heme oxygenase-1 deficiency: the first autopsy case. *Hum Pathol.* **33**(1), 125-130.
- Keyse, S., and Tyrell, R. (1989). Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86**(1), 99-103.
- Kim, Y. M., Reed, W., Wu, W., Bromberg, P. A., Graves, L. M., and Samet, J. M. (2006). Zn<sup>2+</sup>-induced IL-8 expression involves AP-1, JNK, and ERK activities in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **290**(5), L1028-L1035.
- Klot, S. v., Wolke, G., Tuch, T., Heinrich, J., Dockery, D. W., Schwartz, J., Kreyling, W. G., Wichmann, H. E., and Peters, A. (2002). Increased asthma medication use in association with ambient fine and ultrafine particles. *Europ Respir J.* **20**(3), 691-702.
- Klotz, L.-O., Holbrook, N. J., and Sies, H. (2001). UVA and singlet oxygen as inducers of cutaneous signaling events. *Curr Probl Dermatol.* **29**, 95-113.
- Kobayashi, A., Kang, M. I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., and Yamamoto, M. (2004). Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-



based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol.* **24**(16), 7130-7139.

Kramer, R., Checani, G., Deykin, A., Pritzker, C., and Deykin, D. (1986). Solubilization and properties of Ca<sup>2+</sup>-dependent human platelet phospholipase A<sub>2</sub>. *BBA* **878**(3), 394-403.

Krewski, D., Burnett, R. T., Goldberg, M., Hoover, K., Siemiatycki, J., Abrahamowicz, M., Villeneuve, P. J., and White, W. (2005). Reanalysis of the Harvard Six Cities Study, Part II: Sensitivity Analysis. *Inhal Toxicol.* **17**(7-8), 343-353.

Krewski, D., Burnett, R., Goldberg, M., Hoover, B., Siemiatycki, J., Jerrett, M., Abrahamowicz, M., and White, W. (2003). Overview of the reanalysis of the Harvard Six Cities Study and American Cancer Society Study of particulate air pollution and mortality. *J Toxicol Environ Health A.* **66**(16-19), 1507-1551.

Kreyling, W., Semmler, M., Erbe, F., Mayer, P., Takenaka, S., Schulz, H., Oberdörster, G., and Ziesenis, A. (2002). Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *J Toxicol Environ Health A.* **65**(20), 1513-1530.

Krug, H., and Berndt, J. (1985). Inhibition by pesticides of prostaglandin formation in blood platelets. *Blut.* **51**(1), 19-23.

Kudo, M., and Murakami, M. (2002). Phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **68-69**, 3-58.

Kypta, R., Hemming, A., and Courtneidge SA (1988). Identification and characterization of p59fyn (a src-like protein tyrosine kinase) in normal and polyoma virus transformed cells. *EMBO J.* **7**(12), 3837-3844.

Lands, W. (1979). Geometrical and positional fatty acid isomers. *Am Oil Chem Soc. Illinois*(181).

Langenbach, R., Loftin, C., Lee, C., and Tiano, H. (1999). Cyclooxygenase knockout mice: models for elucidating isoform-specific functions. *Biochem Pharmacol.* **58**(8), 1237-1246.

Laurent, T., Markert, M., Feihl, F., Schaller, M. D., and Perret, C. (1996). Oxidant-antioxidant balance in granulocytes during ARDS: effect of N-Acetylcysteine. *Chest.* **109**(1), 163-166.

Li, H., Wu, S., and Shi, N. (2007). Transcription factor Nrf2 activation by deltamethrin in PC12 cells: Involvement of ROS. *Toxicol Lett.* **171**(1-2), 87-98.

Li, N., Sioutas, C., Cho, A., Schmitz, D., Misra, C., Sempf, J., Wang, M., Oberley, T., Froines, J., and Nel, A. (2003). Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect.* **111**(4), 455-460.

Li, N., Alam, J., Venkatesan, M. I., Eiguren-Fernandez, A., Schmitz, D., Di Stefano, E., Slaughter, N., Killeen, E., Wang, X., Huang, A., Wang, M., Miguel, A. H., Cho, A., Sioutas, C., and Nel, A. E. (2004). Nrf2 is a key transcription factor that regulates antioxidant defense in macrophages and epithelial cells: protecting against the proinflammatory and oxidizing effects of diesel exhaust chemicals. *J Immunol.* **173**(5), 3467-3481.

Liao, D., Creason, J., Shy, C., Williams, R., Watts, R., and Zweidinger, R. (1999). Daily variation of particulate air pollution and poor cardiac autonomic control in the elderly. *Environ Health Perspect.* **107**(7), 521-527.

- Lin, Wartmann, Lin, Knopf, Seth, and Davis (1993). cPLA<sub>2</sub> is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell*. **72**(2), 269-278.
- Linak, W., Yoo, J., Wasson, S., Zhu, W., Wendt, J., Huggins, F., Chen, Y., Shad, N., Huffman, G., and Gilmour, M. (2007). Ultrafine ash aerosols from coal combustion: Characterization and health effects. *Proc Comb Inst*. **31**, 1929-1937.
- Liu, C. H., Chang, S. H., Narko, K., Trifan, O. C., Wu, M. T., Smith, E., Haudenschild, C., Lane, T. F., and Hla, T. (2001). Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem*. **276**(21), 18563-18569.
- Liu, M., Yang, S. C., Sharma, S., Luo, J., Cui, X., Peebles, K. A., Huang, M., Sato, M., Ramirez, R. D., Shay, J. W., Minna, J. D., and Dubinett, S. M. (2007). EGFR signaling is required for TGF-beta1 mediated COX-2 induction in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **37**(5), 578-588.
- London County Council (1953). London County Council. *London County Council*.
- Lovell, M., and Markesbery, W. (2007). Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease. *Nucl Acids Res*. **35**(22), 7497-7504.
- Lu, Y., and Wahl, L. M. (2005). Oxidative stress augments the production of matrix metalloproteinase-1, cyclooxygenase-2, and prostaglandin E2 through enhancement of NF- $\kappa$ B activity in lipopolysaccharide-activated human primary monocytes. *J Immunol*. **175**(8), 5423-5429.
- Makris, D., Paraskakis, E., Korakas, P., Karaqiannakis, E., Sourvinos, G., Siafakas, N., and Tzanakis, N. (2008). Exhaled breath condensate 8-isoprostane, clinical parameters, radiological indices and airway inflammation in COPD. *Respiration*. **75**(2), 138-144.
- Matheson, L., Labow, R., and Santerre, J. (2002). Biodegradation of polycarbonate-based polyurethanes by the human monocyte-derived macrophages and U937 cell system. *J Biomed Mater Res*. **61**(4), 505-513.
- Mayer, C., and Grummt, I. (2005). Cellular stress and nucleolar function. *Cell Cycle*. **4**(8), 1036-1038.
- Mayer, C., Bierhoff, H., and Grummt, I. (2005). The nucleolus as a stress sensor: JNK2 inactivates the transcription factor TIF-IA and down-regulates rRNA synthesis. *Genes Dev*. **19**(8), 933-941.
- Meyer, A. M., Dwyer-Nield, L. D., Hurteau, G. J., Keith, R. L., O'Leary, E., You, M., Bonventre, J. V., Nemenoff, R. A., and Malkinson, A. M. (2004). Decreased lung tumorigenesis in mice genetically deficient in cytosolic phospholipase A2. *Carcinogenesis*. **25**(8), 1517-1524.
- Milne, G., Yin, H., and Morrow, J. (2008). Human biochemistry of the isoprostane pathway. *J Biol Chem*. **283**(23), 15533-15537.
- Minamino, T., Christou, H., Hsieh, C. M., Liu, Y., Dhawan, V., Abraham, N. G., Perrella, M. A., Mitsialis, S. A., and Kourembanas, S. (2001). Targeted expression of heme oxygenase-1 prevents the pulmonary inflammatory and vascular responses to hypoxia. *PNAS*. **98**(15), 8798-8803.
- Ministry of Health (1954). Mortality and morbidity during the London fog of december 1952. *Report on Public Health and Medical Subjects* **95**.

- Moinova, H. R., and Mulcahy, R. T. (1998). An electrophile responsive element (EpRE) regulates beta -Naphthoflavone induction of the human gamma -glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene. Constitutive expression is mediated by an adjacent AP-1 site. *J Biol Chem.* **273**(24), 14683-14689.
- Monn, C., Naef, R., and Koller, T. (2003). Reactions of macrophages exposed to particles <10 microm. *Environ Res.* **91**(1), 35-44.
- Montuschi, P., Collins, J., Ciabattini, G., Lazzeri, N., Corradi, M., Kharitonov, S., and Barnes, P. (2000). Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. *Am Respir Crit Care Med.* **162**(3), 1175-1177.
- Montuschi, P., Corradi, M., Ciabattini, G., Nightingale, J., Kharitonov, SA., and Barnes, P. (1999). Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients. *Am Respir Crit Care Med.* **160**(1), 216-220.
- Morrow, J., Awad, J., Boss, H., Blair, I., and Roberts, J. (1992). Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *PNAS.* **89**(22), 10721-10725.
- Morrow, J., and Roberts, L. (1997). The isoprostanes: Unique bioactive products of lipid peroxidation. *Prog Lipid Res.* **1**, 1-21.
- Mroz, R., Schins, R., Li, H., Drost, E., MacNee, W., and Donaldson, K. (2007). Nanoparticle carbon black driven DNA damage induces growth arrest and AP-1 and NFkappaB DNA binding in lung epithelial A549 cell line. *J Physiol Pharmacol.* **58**(5), 461-470.
- Nagase T, Uozumi N, Ishii S, Kita Y, Yamamoto H, Ohga E, Ouchi Y, and Shimizu T (2002). A pivotal role of cytosolic phospholipase A(2) in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Nat Med.* **8**(5), 480-484.
- Nagase T., Uozumi N., Ishii S., Kume K., Izumi T., Ouchi Y., and Shimizu T. (2000). Acute lung injury by sepsis and acid aspiration: a key role for cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>. *Nat Immunol.* **1**, 42-46.
- Nakanishi, M., and Rosenberg, D. W. (2006). Roles of cPLA2[alpha] and arachidonic acid in cancer. *BBA.* **1761**(11), 1335-1343.
- Nel, A., Xia, T., Mädler, L., and Li, N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science.* **311**(5761), 622-627.
- Nemmar, A., Hoet, P., Vanquickenborne, B., Dinsdale, D., Thomeer, M., Hoylaerts, M., Vanbilloen, H., Mortelmans, L., and Nemery, B. (2002). Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation.* **105**(4), 411-414.
- Nemmar, A., Vanbilloen, H., Hoylaerts, M., Hoet, P., Verbruggen, A., and Nemery, B. (2001). Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster. *Am Respir Crit Care Med.* **164**(9), 1665-1668.
- Neuzil, J., Gebicki, J., and Stocker, R. (1993). Radical-induced chain oxidation of proteins and its inhibition by chain-breaking antioxidants. *Biochem J.* **293**(3), 601-606.
- Nguyen, T., Sherratt, P. J., Huang, H. C., Yang, C. S., and Pickett, C. B. (2003). Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S Proteasome. *J Biol Chem.* **278**(7), 4536-4541.

- Nguyen, T., Sherratt, P. J., Nioi, P., Yang, C. S., and Pickett, C. B. (2005). Nrf2 controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by Keap1. *J Biol Chem.* **280**(37), 32485-32492.
- Nightingale, J., Maggs, R., Cullinan, P., Donnelly, L., Rogers, D., Kinnersley, R., Chung, K., Barnes, P. A. M., and Newman-Taylor, A. (2000). Airway inflammation after controlled exposure to diesel exhaust particulates. *Am J Respir Crit Care Med.* **162**(1), 161-166.
- Ning, Y., Tao, F., Qin, G., Imrich, A., Goldsmith, C. A., Yang, Z., and Kobzik, L. (2004). Particle-epithelial interaction: effect of priming and bystander neutrophils on interleukin-8 release. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **30**(5), 744-750.
- Nordenhall, C., Pourazar, J., Ledin, M. C., Levin, J. O., Sandstrom, T., and Adelroth, E. (2001). Diesel exhaust enhances airway responsiveness in asthmatic subjects. *Eur Respir J.* **17**(5), 909-915.
- Novotny, V., Prieschl, E., Csonga, R., Fabjani, G., and Baumruker, T. (1998). Nrf1 in a complex with fosB, c-jun, junD and ATF2 forms the AP1 component at the TNF alpha promoter in stimulated mast cells. *Nucleic Acid Res.* **26**(23), 5480-5485.
- Nuutila, J., and Lilius, E. (2005). Flow cytometric quantitative determination of ingestion by phagocytes needs the distinguishing of overlapping populations of binding and ingesting cells. *Cytometry A.* **65**(2), 93-102.
- Oberdörster, G., Finkelstein, J., Johnston, C., Gelein, R., Cox, C., Baggs, R., and Elder, A. (2000). Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. *Res Rep Health Eff Inst.* **96**, 5-86.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., and Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* **113**(7), 823-839.
- Oberdörster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Kreyling, W., Cox, C., and (2004). Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol.* **16**(6-7), 437-445.
- Oberdörster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Lunts, A., Kreyling, W., and Cox, C. (2002). Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health A.* **65**(20), 1531-1543.
- Olsson, S., and Sundler, R. (2007). The macrophage beta-glucan receptor mediates arachidonate release induced by zymosan: essential role for Src family kinases. *Mol Immunol.* **44**(7), 1509-1515.
- Ortolani, O., Conti, A., De Gaudio, A., Masoni, M., and Novelli, G. (2000). Protective effects of N-acetylcysteine and rutin on the lipid peroxidation of the lung epithelium during the adult respiratory distress syndrome. *Shock.* **13**(1), 14-18.
- Otterbein, L. E., Bach, F. H., Alam, J., Soares, M., Lu, H. T., Wysk, M., Davis, R. J., Flavell, R. A., and Choi, A. M. K. (2000). Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med.* **6**(4), 422-428.
- Pawliczak, R., Huang, X. L., Nanavaty, U. B., Lawrence, M., Madara, P., and Shelhamer, J. H. (2002). Oxidative stress induces arachidonate release from human lung cells through the epithelial growth factor receptor pathway. *Am Respir Cell Mol Biol.* **27**(6), 722-731.

Pekkanen, J., Brunner, E. J., Anderson, H. R., Tiittanen, P., and Atkinson, R. W. (2000). Daily concentrations of air pollution and plasma fibrinogen in London. *Occup Environ Med.* **57**(12), 818-822.

Pekkanen, J., Peters, A., Hoek, G., Tiittanen, P., Brunekreef, B., de Hartog, J., Heinrich, J., Ibaldo-Mulli, A., Kreyling, W. G., Lanki, T., Timonen, K. L., and Vanninen, E. (2002). Particulate air pollution and risk of ST-segment depression during repeated submaximal exercise tests among subjects with coronary heart disease: the exposure and risk assessment for fine and ultrafine particles in ambient air (ULTRA) study. *Circulation.* **106**(8), 933-938.

Perez, R., Melero, R., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2004). Role of group VIA calcium-independent phospholipase A2 in arachidonic acid release, phospholipid fatty acid incorporation, and apoptosis in U937 cells responding to hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* **279**(39), 40385-40391.

Peters, A., Döring, A., Wichmann HE, and König, W. (1997). Increased plasma viscosity during an air pollution episode: a link to mortality? *Lancet.* **349**(9065), 1582-1587.

Peters, A., Frohlich, M., Doring, A., Immervoll, T., Wichmann, H. E., Hutchinson, W. L., Pepys, M. B., and Koenig, W. (2001a). Particulate air pollution is associated with an acute phase response in men. Results from the MONICA-Augsburg Study. *Eur Heart.* **22**(14), 1198-1204.

Peters, A., Dockery, D. W., Muller, J. E., and Mittleman, M. A. (2001b). Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction. *Circulation.* **103**(23), 2810-2815.

Peters, A., Perz, S., Doring, A., Stieber, J., Koenig, W., and Wichmann, H. E. (1999). Increases in heart rate during an air pollution episode. *Am J Epidemiol.* **150**(10), 1094-1098.

Peters, A., von Klot, S., Heier, M., Trentinaglia, I., Hormann, A., Wichmann, H. E., Lowel, H., and the Cooperative Health Research in the Region of Augsburg Study Group (2004). Exposure to traffic and the onset of myocardial infarction. *N Engl J Med.* **351**(17), 1721-1730.

Pietsch, E. C., Chan, J. Y., Torti, F. M., and Torti, S. V. (2003). Nrf2 mediates the induction of ferritin H in response to xenobiotics and cancer chemopreventive dithiolethiones. *J Biol Chem.* **278**(4), 2361-2369.

Piper, P., and Vane, J. (1969). Release of additional factors in anaphylaxis and its antagonism by anti-inflammatory drugs. *Nature.* **223**(5201), 29-35.

Pope III, C. A., Burnett, R. T., Thun, M. J., Calle, E. E., Krewski, D., Ito, K., and Thurston, G. D. (2002). Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA. : The Journal of the American Medical Association* **287**(9), 1132-1141.

Pope III, C. A., Verrier, R. L., Lovett, E. G., Larson, A. C., Raizenne, M. E., Kanner, R. E., Schwartz, J., Villegas, G. M., Gold, D. R., and Dockery, D. W. (1999). Heart rate variability associated with particulate air pollution. *Am Heart J.* **138**, 890-899.

Pope, C. A., III, Burnett, R. T., Thurston, G. D., Thun, M. J., Calle, E. E., Krewski, D., and 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.

Pope, C. A., III, Muhlestein, J. B., May, H. T., Renlund, D. G., Anderson, J. L., and Horne, B. D. (2006). Ischemic heart disease events triggered by short-term exposure to fine particulate air pollution. *Circulation*. **114**(23), 2443-2448.

Pulskamp, K., Diabaté, S., and Krug, H. (2007). Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. *Toxicol Lett*. **168**(1), 58-74.

Rahman, I., van Schadewijk, A. A. M., Crowther, A. J. L., Hiemstra, P. S., Stolk, J., MacNee, W., and De Boer, W. I. (2002). 4-hydroxy-2-nonenal, a specific lipid peroxidation product, is elevated in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am Respir Crit Care Med*. **166**(4), 490-495.

Reddy, N. M., Kleeberger, S. R., Yamamoto, M., and Reddy, S. P. (2008). Nrf2-dependent glutathione-regulated transcriptional program controls lung type II cell proliferation and protection against oxidative stress. *Proc Am Thorac Soc*. **5**(3), 367.

Reiter, T. A., Pang, B., Dedon, P., and Demple, B. (2006). Resistance to nitric oxide-induced necrosis in heme oxygenase-1 overexpressing pulmonary epithelial cells associated with decreased lipid peroxidation. *J Biol Chem*. **281**(48), 36603-36612.

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

Riediker, M., Cascio, W. E., Griggs, T. R., Herbst, M. C., Bromberg, P. A., Neas, L., Williams, R. W., and Devlin, R. B. (2004). Particulate matter exposure in cars is associated with cardiovascular effects in healthy young men. *Am J Respir Crit Care Med*. **169**(8), 934-940.

Rückerl, R., Greven, S., Ljungman, P., Aalto, P., Antoniades, C., Bellander, T., Berglind, N., Chrysohoou, C., Forastiere, F., Jacquemin, B., von Klot, S., Koenig, W., Küchenhoff, H., Lanki, T., Pekkanen, J., Perucci, C., Schneider, A., Sunyer, J., Peters, A., and Group for the AIRGENE Study (2007). Air pollution and inflammation (interleukin-6, C-reactive protein, fibrinogen) in myocardial infarction survivors. *Environ Health Perspect*. **115**(7), 1072-1080.

Rückerl, R., Ibalid-Mulli, A., Koenig, W., Schneider, A., Woelke, G., Cyrys, J., Heinrich, J., Marder, V., Frampton, M., Wichmann, H. E., and Peters, A. (2006). Air pollution and markers of inflammation and coagulation in patients with coronary heart disease. *Am Respir Crit Care Med*. **173**(4), 432-441.

Rushworth, S. A., Chen, X. L., Mackman, N., Ogborne, R. M., and O'Connell, M. A. (2005). Lipopolysaccharide-induced heme oxygenase-1 expression in human monocytic cells is mediated via Nrf2 and protein kinase C. *J Immunol*. **175**(7), 4408-4415.

Samet, J. M., Dominici, F., Curriero, F. C., Coursac, I., and Zeger, S. L. (2000). Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. cities, 1987-1994. *N Engl J Med*. **343**(24), 1742-1749.

Sapirstein, A., and Bonventre, J. V. (2000). Phospholipases A2 in ischemic and toxic brain injury. *Neurochem Res*. **25**(5), 745-753.

Sarady-Andrews, J. K., Liu, F., Gallo, D., Nakao, A., Overhaus, M., Ollinger, R., Choi, A. M., and Otterbein, L. E. (2005). Biliverdin administration protects against endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **289**(6), L1131-L1137.

Schaloske, R. H., and Dennis, E. A. (2006). The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *BBA*. **1761**(11), 1246-1259.

- Schaumann, F., Borm, P. J. A., Herbrich, A., Knoch, J., Pitz, M., Schins, R. P. F., Luettig, B., Hohlfeld, J. M., Heinrich, J., and Krug, N. (2004). Metal-rich ambient particles (particulate matter<sub>2.5</sub>) cause airway inflammation in healthy subjects. *Am Respir Crit Care Med.* **170**(8), 898-903.
- Schievella, A. R., Regier, M. K., Smith, W. L., and Lin, L. L. (1995). Calcium-mediated translocation of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> to the nuclear envelope and endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* **270**(51), 30749-30754.
- Semmler, M., Seitz, J., Erbe, F., Mayer, P., Heyder, J., Oberdörster, G., and Kreyling, W. (2004). Long-term clearance kinetics of inhaled ultrafine insoluble iridium particles from the rat lung, including transient translocation into secondary organs. *Inhal Toxicol.* **16**(6-7), 453-459.
- Semmler-Behnke, M., Takenaka, S., Fertsch, S., Wenk, A., Seitz, J., Mayer, P., Oberdörster, G., and Kreyling, W. (2007). Efficient elimination of inhaled nanoparticles from the alveolar region: evidence for interstitial uptake and subsequent reentrainment onto airways epithelium. *Environ Health Perspect.* **115**(5), 728-733.
- Shahid, S., Kharitonov, S., Wilson, N., Bush, A., and Barnes, P. (2005). Exhaled 8-isoprostane in childhood asthma. *Respir Res.* **6**(1), 79.
- Shin, C. S., Moon, B. S., Park, K. S., Kim, S. Y., Park, S. J., Chung, M. H., and Lee, H. K. (2001). Serum 8-hydroxy-guanine levels are increased in diabetic patients. *Diabetes Care.* **24**(4), 733-737.
- Shirai, Y., Balsinde, J., and Dennis, E. A. (2005). Localization and functional interrelationships among cytosolic Group IV, secreted Group V, and Ca<sup>2+</sup>-independent Group VI phospholipase A<sub>2</sub>s in P388D1 macrophages using GFP/RFP constructs. *BBA.* **1735**(2), 119-129.
- Sies, H., and Menck, C. (1992). Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutat Res.* **275**(3-6), 367-375.
- Sies, H. (1986). Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chem. Int. Ed.* **25**, 1058-1071.
- Singh, S., Shi, T., Duffin, R., Albrecht, C., van Berlo, D., Höhr, D., Fubini, B., Marta, G., Fenoglio, I., and Borm, P. S. R. (2007). Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO<sub>2</sub>: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicol Appl Pharmacol.* **222**(2), 141-151.
- Six, D. A., and Dennis, E. A. (2000). The expanding superfamily of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: classification and characterization. *BBA.* **1488**(1-2), 1-19.
- Smalley, W., and DuBois, R. (1997). Colorectal cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Adv Pharmacol.* **39**, 1-20.
- Soslow, R., Dannenberg, A., Rush, D., Woerner, B., Khan, K., Masferrer, J., and Koki, A. (2000). COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer.* **89**(12), 2637-2645.
- Soumaoro, L. T., Uetake, H., Higuchi, T., Takagi, Y., Enomoto, M., and Sugihara, K. (2004). Cyclooxygenase-2 expression: a significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* **10**(24), 8465-8471.

- Sporn, P., Marshall, T., and Peters-Golden, M. (1992). Hydrogen peroxide increases the availability of arachidonic acid for oxidative metabolism by inhibiting acylation into phospholipids in the alveolar macrophage. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **7**(3), 307-316.
- Stahelin, R. V., Rafter, J. D., Das, S., and Cho, W. (2003). The molecular basis of differential subcellular localization of C2 domains of protein kinase C- $\alpha$  and group IVa cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem.* **278**(14), 12452-12460.
- Stenfors, N., Nordenhall, C., Salvi, S. S., Mudway, I., Soderberg, M., Blomberg, A., Helleday, R., Levin, J. O., Holgate, S. T., Kelly, F. J., Frew, A. J., and Sandstrom, T. (2004). Different airway inflammatory responses in asthmatic and healthy humans exposed to diesel. *Eur Respir J.* **23**(1), 82-86.
- Stevenson, M. A., Pollock, S. S., Coleman, C. N., and Calderwood, S. K. (1994). X-irradiation, phorbol esters, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulate mitogen-activated protein kinase activity in NIH-3T3 cells through the formation of reactive oxygen intermediates. *Cancer Res.* **54**(1), 12-15.
- Stewart, D., Killeen, E., Naquin, R., Alam, S., and Alam, J. (2003). Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. *J Biol Chem.* **278**(4), 2396-2402.
- Stone, V., Tuinman, M., Vamvakopoulos, J. E., Shaw, J., Brown, D., Petterson, S., Faux, S. P., Borm, P., MacNee, W., Michaelangeli, F., and Donaldson, K. (2000). Increased calcium influx in a monocytic cell line on exposure to ultrafine carbon black. *Eur Respir J.* **15**(2), 297-303.
- Street, I., Lin, H., Laliberte, F., Ghomashchi, F., Wang, Z., Perrier, H., Tremblay, N., Huang, Z., Weech, P., and Gelb, M. (1993). Slow- and tight-binding inhibitors of the 85-kDa human phospholipase A2. *Biochemistry.* **32**(23), 5935-5940.
- Stringer, B., Imrich, A., and Kobzik, L. (1995). Flow cytometric assay of lung macrophage uptake of environmental particulates. *Cytometry.* **20**(1), 23-32.
- Sunyer, J., Schwartz, J., Tobias, A., Macfarlane, D., Garcia, J., and Ant $\leq$ , J. M. (2000). Patients with chronic obstructive pulmonary disease are at increased risk of death associated with urban particle air pollution: a case-crossover analysis. *Am J Epidemiol.* **151**(1), 50-56.
- Suram, S., Brown, G. D., Ghosh, M., Gordon, S., Loper, R., Taylor, P. R., Akira, S., Uematsu, S., Williams, D. L., and Leslie, C. C. (2006). Regulation of cytosolic phospholipase A2 activation and cyclooxygenase 2 expression in macrophages by the beta-glucan receptor. *J Biol Chem.* **281**(9), 5506-5514.
- Tabuchi S, Uozumi N, Ishii S, Shimizu Y, Watanabe T, and Shimizu T (2003). Mice deficient in cytosolic phospholipase A2 are less susceptible to cerebral ischemia/reperfusion injury. *Acta Neurochir Suppl.* **86**, 169-172.
- Taketani, S., Sato, H., Yoshinaga, T., Tokunaga, R., Ishii, T., and Bannai, S. (1990). Induction in mouse peritoneal macrophages of 34 kDa stress protein and heme oxygenase by sulfhydryl-reactive agents. *J Biochem.* **108**(1), 28-32.
- Tao, F., Gonzalez-Flecha, B., and Kobzik, L. (2003). Reactive oxygen species in pulmonary inflammation by ambient particulates. *Free Radic Biol Med.* **35**(4), 327-340.
- Tao, F., and Kobzik, L. (2002). Lung macrophage-epithelial cell interactions amplify particle-mediated cytokine release. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **26**(4), 499-505.



- Tonne, C., Melly, S., Mittleman, M., Coull, B., Goldberg, R., and Schwartz, J. (2007). A case-control analysis of exposure to traffic and acute myocardial infarction. *Environ Health Perspect.* **115**(1), 53-57.
- Übel, C. (2008). Regulation antioxidativer und inflammatorischer Gene nach Partikelinkubation in humanen Lungenepithelzellen. *Diplomarbeit*, Karlsruhe.
- Unfried, K., Albrecht, C., Klotz, L., von Mikecz, A., Grether-Beck, S., and Schins, R. P. (2007). Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms. *Nanotox.*, 1-20.
- van Overveld, F., Demkow, U., Gorecka, D., de Backer, W., and Zielinski, J. (2005). New developments in the treatment of COPD: comparing the effects of inhaled corticosteroids and N-acetylcysteine. *J Physiol Pharmacol.* **56**(4), 126-142.
- Van Putten, V., Refaat, Z., Dessev, C., Blaine, S., Wick, M., Butterfield, L., Han, S. Y., Heasley, L. E., and Nemenoff, R. A. (2001). Induction of cytosolic phospholipase A2 by oncogenic Ras is mediated through the JNK and ERK pathways in rat epithelial cells. *J Biol Chem.* **276**(2), 1226-1232.
- van Rossum, G., Drummen, G., Verkleij, A., Post, J., and Boonstra, J. (2004). Activation of cytosolic phospholipase A2 in Her14 fibroblasts by hydrogen peroxide: a p42/44(MAPK)-dependent and phosphorylation-independent mechanism. *BBA.* **1636**(2-3), 193-195.
- Van Schooten, F. J., Besarati Nia, A., De Flora, S., D'Agostini, F., Izzotti, A., Camoirano, A., Balm, A. J. M., Dallinga, J. W., Bast, A., Haenen, G. R. M. M., Van't Veer, L., Baas, P., Sakai, H., and Van Zandwijk, N. (2002). Effects of oral administration of N-Acetyl-L-cysteine: a multi-biomarker study in smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **11**(2), 167-175.
- Voelkel, K., Krug, H., and Diabate, S. (2003). Formation of reactive oxygen species in rat epithelial cells upon stimulation with fly ash. *J Biosci.* **28**, 51-55.
- Wadleigh, D. J., Reddy, S. T., Kopp, E., Ghosh, S., and Herschman, H. R. (2000). Transcriptional activation of the cyclooxygenase-2 gene in endotoxin-treated RAW 264.7 macrophages. *J Biol Chem.* **275**(9), 6259-6266.
- Wakabayashi, N., Dinkova-Kostova, A., Holtzclaw, D., Kang, M., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Kensler, T., and Talalay, P. (2004). Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: Fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *PNAS.* **101**(7), 2040-2045.
- Wang, J., Xiong, S., Xie, C., Markesbery, W. R., and Lovell, M. A. (2005a). Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* **93**(4), 953-962.
- Wang, M., Xiao, G., Li, N., Xie, Y., Loo, J. A., and Nel, A. E. (2005b). Use of a fluorescent phosphoprotein dye to characterize oxidative stress-induced signaling pathway components in macrophage and epithelial cultures exposed to diesel exhaust particle chemicals. *Electrophoresis.* **26**(11), 2092-2108.
- Wang, W., Bergh, A., and Damber, J. E. (2005c). Cyclooxygenase-2 expression correlates with local chronic inflammation and tumor neovascularization in human prostate cancer. *Clin Cancer Res.* **11**(9), 3250-3256.
- Wasserman, W., and Fahl, W. (1997). Functional antioxidant responsive elements. *PNAS.* **94**(10), 5361-5366.

Wichmann, H., Spix, C., Tuch, T., Wölke, G., Peters, A., Heinrich, J., Kreyling, W., and Heyder J (2000). Daily mortality and fine and ultrafine particles in Erfurt, Germany part I: role of particle number and particle mass. *Res Rep Health Eff Inst.* **98**, 5-94.

Wijayanti, N., Huber, S., Samoylenko, A., Kietzmann, T., and Immenschuh, S. (2004). Role of NF-kappaB and p38 MAP kinase signaling pathways in the lipopolysaccharide-dependent activation of heme oxygenase-1 gene expression. *Antioxid Redox Signal.* **6**(5), 802-810.

Wild, A., Moinova, H., and Mulcahy, R. (1999). Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem.* **274**(47), 33627-33636.

Winstead, M., Balsinde, J., and Dennis, E. (2000). Calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub>: structure and function. *BBA.* **1488**(1-2), 28-39.

Woodruff, T., Parker, J., and Schoendorf, K. (2006). Fine particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) air pollution and selected causes of postneonatal infant mortality in California. *Environ Health Perspect.* **114**(5), 786-790.

Wottrich, R., Diabaté, S., and Krug, H. (2004). Biological effects of ultrafine model particles in human macrophages and epithelial cells in mono- and co-culture. *Int J Hyg Environ Health.* **207**(4), 353-361.

Xia, C., Meng, Q., Liu, L. Z., Rojanasakul, Y., Wang, X. R., and Jiang, B. H. (2007). Reactive oxygen species regulate angiogenesis and tumor growth through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res.* **67**(22), 10823-10830.

Xia, T., Korge, P., Weiss, J., Li, N., Venkatesen, M., Sioutas, C., and Nel, A. (2004). Quinones and aromatic chemical compounds in particulate matter induce mitochondrial dysfunction: implications for ultrafine particle toxicity. *Environ Health Perspect.* **112**(14), 1347-1358.

Xiao, G., Wang, M., Li, N., Loo, J., and Nel, A. (2003). Use of proteomics to demonstrate a hierarchical oxidative stress response to diesel exhaust particle chemicals in a macrophage cell line. *J Biol Chem.* **278**(50), 50781-50790.

Yet, S. F., Tian, R., Layne, M. D., Wang, Z. Y., Maemura, K., Solovyeva, M., Ith, B., Melo, L. G., Zhang, L., Ingwall, J. S., Dzau, V. J., Lee, M. E., and Perrella, M. A. (2001). Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice. *Circ Res.* **89**(2), 168-173.

Yu, L., Deems, R. A., Hajdu, J., and Dennis, E. A. (1990). The interaction of phospholipase A<sub>2</sub> with phospholipid analogues and inhibitors. *J Biol Chem.* **265**(5), 2657-2664.

Zanobetti, A., and Schwartz, J. (2005). The effect of particulate air pollution on emergency admissions for myocardial infarction: a multicity case-crossover analysis. *Environ Health Perspect.* **113**(8), 978-982.

Zanobetti, A., and Schwartz, J. (2001). Are diabetics more susceptible to the health effects of airborne particles? *Am Respir Crit Care Med.* **164**(5), 831-833.

Zanobetti, A., Canner, M. J., Stone, P. H., Schwartz, J., Sher, D., Eagan-Bengston, E., Gates, K. A., Hartley, L. H., Suh, H., and Gold, D. R. (2004). Ambient pollution and blood pressure in cardiac rehabilitation patients. *Circulation.* **110**(15), 2184-2189.

Zhang, D. D., and Hannink, M. (2003). Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol Cell Biol.* **23**(22), 8137-8151.

Zhang, D. D., Lo, S. C., Cross, J. V., Templeton, D. J., and Hannink, M. (2004). Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol Cell Biol.* **24**(24), 10941-10953.

Zhu, H., Itho, K., Yamamoto, M., Zweier, J., and Li, Y. (2005). Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury. *FEBS Lett.* **579**(14), 3029-3036.



## 6 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### Abbildungen

Abb. 1: Übersicht über anthropogene Quellgruppen der Schwebstaub-Belastung.....	2
Abb. 2: Depositionswahrscheinlichkeiten von Partikeln mit unterschiedlichen aerodynamischen Durchmessern in den verschiedenen Regionen des menschlichen Atemtrakts (Oberdörster <i>et al.</i> 2005).....	4
Abb. 3: Strukturformel der Arachidonsäure .....	14
Abb. 4: Schematische Darstellung wichtiger Arachidonsäure-Stoffwechselwege.....	15
Abb. 5: Schematische, vereinfachte Darstellung der Aktivierung der zytosolischen Phospholipase A <sub>2</sub> (cPLA <sub>2</sub> ).....	19
Abb. 6: Schematische Darstellung der wichtigsten MAP Kinase Signalwege in Eukaryoten.	23
Abb. 7: Strukturformel des reduzierten Glutathion .....	24
Abb. 8: Katalysemechanismus der Hämoxygenase-1 (HO-1).....	27
Abb. 9: Strukturformel des N-Acetylcysteins (NAc).....	28
Abb. 10: RAW264.7 Maus-Makrophagen-Zelllinie .....	36
Abb. 11: LA-4 Epithel-Zelllinie .....	37
Abb. 12: Kokultur von RAW264.7 Makrophagen und LA-4 Epithelzellen.....	38
Abb. 13: Charakteristika von Flugaschepartikeln .....	40
Abb. 14: PBMC-Isolierung mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation .....	45
Abb. 15: Separation von Monozyten durch anti-CD14 Magnetpartikel .....	46
Abb. 16: Primäre Monozyten und Monozyten-abstammende Makrophagen (MDM) .....	47
Abb. 17: Umwandlung von WST-1 zu Formazan .....	49
Abb. 18: Prinzip des ACE <sup>TM</sup> (Acetylcholinesterase) Enzym-Immunoassays von Cayman Chemicals (USA).....	60
Abb. 19: Messung von reaktiven Sauerstoffspezies mittels DCF-Test .....	63
Abb. 20: Schematische Darstellung des Transwell <sup>®</sup> -Systems (Corning, USA) für die Transmissionselektronenmikroskopie .....	67
Abb. 21: Durchflusszytometrische Analyse von PBMCs und isolierten Monozyten eines Probanden zur Bestimmung der Verteilung von CD14-positiven Zellen.....	71
Abb. 22: Durchflusszytometrische Analyse der Granularität von Monozyten und Monozyten- abstammenden Makrophagen (MDM) eines Probanden.....	73
Abb. 23: Effekt von MAF02 Flugasche auf die Viabilität von Makrophagen.....	77
Abb. 24: Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in RAW264.7 und primären Makrophagen nach MAF02 Inkubation.....	79
Abb. 25: Erhöhung des intrazellulären Glutathiongehalts nach MAF02 Inkubation .....	80

Abb. 26: Zeitabhängige Akkumulation des Transkriptionsfaktors Nrf2 in Makrophagen nach Behandlung mit MAF02 Partikeln .....	82
Abb. 27: Effekt von MAF02 Partikeln auf die Expression des HO-1 Proteins in RAW264.7 Makrophagen.....	83
Abb. 28: Das Antioxidanz N-Acetylcystein (NAC) reduziert die MAF02-bedingte Akkumulation des Transkriptionsfaktors Nrf2.....	84
Abb. 29: Das Antioxidanz N-Acetylcystein (NAC) reduziert die MAF02-bedingte Induktion der Hämoxygenase-1 (HO-1) .....	86
Abb. 30: Dosis- und zeitabhängige Freisetzung von Arachidonsäure aus zellulären Lipiden nach Behandlung von Makrophagen mit MAF02 Partikeln.....	89
Abb. 31: Quarz, Titandioxid und <i>Carbon Black</i> induzieren keine Änderung der Arachidonsäurefreisetzung in RAW264.7 Makrophagen.....	90
Abb. 32: Effekt von Thioetheramid-Phosphatidylcholin (TEA) auf die MAF02-induzierte Mobilisation der Arachidonsäure in RAW264.7 Zellen .....	92
Abb. 33: Der Inhibitor Arachidonyltrifluoromethylketon (AACOCF <sub>3</sub> ) reduziert die MAF02- induzierte Freisetzung der Arachidonsäure in RAW264.7 Zellen .....	93
Abb. 34: Bromoenol Lacton (BEL) bewirkt keine Reduktion der MAF02-induzierten Freisetzung der Arachidonsäure in RAW264.7 Zellen.....	94
Abb. 35: Konzentrationsabhängige Reduktion der MAF02-induzierten Mobilisation von Arachidonsäure in RAW264.7 Zellen durch den intrazellulären Calciumchelator BAPTA/AM .....	95
Abb. 36: Der Calciumchelator EGTA reduziert die MAF02-induzierte Arachidonsäurefreisetzung.....	96
Abb. 37: Der ERK1/2 Inhibitor PD98059 inhibiert die MAF02-induzierte Arachidonsäurefreisetzung in RAW264.7 Makrophagen.....	98
Abb. 38: Der p38 Inhibitor SB203580 bewirkt keine Reduktion der MAF02-bedingten Mobilisation der Arachidonsäure in RAW264.7 Makrophagen .....	98
Abb. 39: Wirkung des JNK Inhibitors SP600125 auf die MAF02-induzierte Arachidonsäurefreisetzung in RAW264.7 Zellen.....	99
Abb. 40: Reduktion der MAF02-induzierten Freisetzung der Arachidonsäure in RAW264.7 Makrophagen durch N-Acetylcystein (NAC).....	101
Abb. 41: MAF02 Partikel bewirken eine zeitabhängige Aktivierung der MEK1/2 und ERK1/2 MAP Kinase in RAW264.7 Makrophagen.....	103
Abb. 42: Flugaschepartikel induzieren eine zeitabhängige Aktivierung der ERK1/2 MAP Kinase von primären, humanen Monozyten abstammenden Makrophagen (MDM) .....	104

Abb. 43: MAF02 bewirkt keine Phosphorylierung der p38 Kinase in RAW264.7 Makrophagen .....	105
Abb. 44: MAF02 Partikel induzieren die Aktivierung der p38 Kinase von primären, humanen Monozyten abstammenden Makrophagen (MDM) .....	105
Abb. 45: Kinetik der Aktivierung der c-Jun NH <sub>2</sub> -terminalen Kinase (JNK) und c-Jun nach Inkubation mit MAF02 Partikeln in RAW264.7 Makrophagen.....	106
Abb. 46: Flugstaub induziert eine zeitabhängige Aktivierung der c-Jun NH <sub>2</sub> -terminalen Kinase (JNK) von primären, humanen Monozyten abstammenden Makrophagen (MDM)	107
Abb. 47: Zeitabhängige Aktivierung der zytosolischen Phospholipase A <sub>2</sub> nach Behandlung von RAW264.7 Zellen mit MAF02 Partikeln .....	108
Abb. 48: MAF02 Partikel induzieren eine zeitabhängige Expression der Cyclooxygenase-2 in RAW264.7 Makrophagen .....	110
Abb. 49: Prostaglandin E <sub>2</sub> -Titer im Zellkulturmedium nach MAF02 Behandlung in RAW264.7 Makrophagen.....	111
Abb. 50: 8-Isoprostan Gehalt im Zellkulturmedium nach MAF02 Behandlung in RAW264.7 Makrophagen.....	112
Abb. 51: Effekt des Antioxidanz N-Acetylcystein (NAC) auf die MAF02-induzierte Aktivierung der MAP Kinase MEK1/2.....	114
Abb. 52: Das Antioxidanz N-Acetylcystein (NAC) reduziert konzentrationsabhängig die MAF02-induzierte Aktivierung der MAP Kinase ERK1/2 .....	115
Abb. 53: Das Antioxidanz N-Acetylcystein (NAC) inhibiert die MAF02-induzierte Aktivierung der c-Jun NH <sub>2</sub> -terminalen Kinase (JNK).....	116
Abb. 54: Das Antioxidanz N-Acetylcystein (NAC) inhibiert die MAF02-induzierte Aktivierung von c-Jun .....	117
Abb. 55: Das Antioxidanz N-Acetylcystein (NAC) reduziert die MAF02-bedingte Induktion der Cyclooxygenase-2 (COX-2).....	119
Abb. 56: Zunahme der Granularität von RAW264.7 Makrophagen nach Behandlung mit MAF02 Partikeln .....	121
Abb. 57: RAW264.7 Makrophagen nehmen MAF02 Partikel auf .....	122
Abb. 58: Transmissionselektronenmikroskopie von MAF02 behandelten RAW264.7 Makrophagen.....	124
Abb. 59: Quantifizierung der zeitabhängigen Aufnahme von MAF02 Partikeln in RAW264.7 Zellen.....	125
Abb. 60: Dosis- und zeitabhängige Freisetzung von Arachidonsäure aus zellulären Lipiden nach Behandlung der Lungenepithelzelllinie LA-4 mit MAF02 Partikeln .....	127

Abb. 61: Zeitabhängige Arachidonsäurefreisetzung von LA-4 Epithelzellen und RAW264.7 Makrophagen in Mono- und Kokulturen nach Exposition mit MAF02 Flugaschepartikeln ..... 129

Abb. 62: Zeitlicher Reaktionsablauf der in der Arbeit analysierten zellulären Prozesse ..... 157

Abb. 63: Zusammenfassendes Modell und aktuelle Arbeitshypothese der Vorgänge während der MAF02 Inkubation von RAW264.7 Makrophagen ..... 161

## Tabellen

Tab. 1: Zusammensetzung des Kulturmediums der RAW264.7 Makrophagen (500 ml) ..... 37

Tab. 2: Zusammensetzung des Kulturmediums der LA-4 Zelllinie (500 ml) ..... 38

Tab. 3: Analyse der in der Flugasche enthaltenen Elemente ..... 41

Tab. 4: Auflistung der in dieser Arbeit eingesetzten Inhibitoren ..... 43

Tab. 5: Zusammensetzung des MACS-Puffers ..... 47

Tab. 6: Zusammensetzung des Kulturmediums der primären Monozyten/Makrophagen (500 ml) ..... 48

Tab. 7: Zusammensetzung des RIPA-Lysepuffers ..... 50

Tab. 8: Zusammensetzung der BCA-Reagenz-Lösung ..... 50

Tab. 9: Zusammensetzung eines 5%igen Sammel- und 10%igen Trenngels ..... 51

Tab. 10: Zusammensetzung des Laufpuffers ..... 51

Tab. 11: Zusammensetzung des SDS-Gel-Probenpuffers ..... 52

Tab. 12: Zusammensetzung des Blotpuffers ..... 53

Tab. 13: Zusammensetzung von TBS (Tris-gepufferte Salzlösung) ..... 53

Tab. 14: Auflistung der im Western Blot verwendeten primären und sekundären Antikörper 55

Tab. 15: Auflistung der in der FACS-Analyse verwendeten Antikörper ..... 71