

**Regulation der anti-oxidativen,  
inflammatorischen und zytotoxischen  
Wirkungen nach SiO<sub>2</sub> Nanopartikel  
Exposition in Makrophagen**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften  
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) - Universitätsbereich  
genehmigte

DISSERTATION

von

**Clarissa Marquardt**

aus Pforzheim

2011

Dekan: Prof. Dr. S. Bräse

Referent: PD. Dr. C. Weiss

Koreferent: Prof. Dr. A. Hartwig

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Juli 2011



## **Erklärung der Selbstständigkeit**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, dass alle Stellen der Arbeit, die wörtlich oder sinngemäß aus anderen Quellen übernommen wurden, als solche kenntlich gemacht sind und dass die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt wurde.

Karlsruhe, den 31. Mai 2011

Clarissa Marquardt



## Zusammenfassung

Metalloxid-Nanopartikel kommen heutzutage immer mehr in Bereichen des täglichen Lebens, in der Medizin sowie auch in der Hightech-Industrie zum Einsatz, da ihre neuartigen und vielversprechenden Eigenschaften zur Verbesserung der Produkte dienen. Insbesondere Siliziumdioxid Nanopartikel (SiO<sub>2</sub> NP) werden schon seit Jahren in großen Mengen hergestellt und sind als schwach pathogen eingestuft.

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass SiO<sub>2</sub> NP zytotoxisch sind und Entzündungsreaktionen auslösen, was bereits teilweise aus der Literatur bekannt war. Kaum Informationen gab es dagegen über die zellulären Mechanismen SiO<sub>2</sub> NP Wirkung. Es sollte deshalb in dieser *in vitro* Studie aufgeklärt werden, wie die Regulation der Zellantworten nach Exposition mit SiO<sub>2</sub> NP auf zellulärer und molekularer Ebene gesteuert werden. Besonderes Interesse galt dabei der Überprüfung der Hypothese, dass Nanopartikel ihre toxische Wirkung durch Auslösen von oxidativem Stress vermitteln. Mittels Flamm synthese generierte, amorphe SiO<sub>2</sub> NP (Aerosil<sup>®</sup>200) wurden dabei in Submerskultur in murinen RAW264.7 Makrophagen auf die Endpunkte Viabilität und Zelltod, ROS Generierung, der Induktion stress-sensitiver Signalwege sowie veränderter Genexpression von anti-oxidativen Enzymen und proinflammatorischen Mediatoren untersucht. Der Fokus lag dabei insbesondere auf der Aktivierung des MAPK-Signalwegs sowie der redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren AP-1 und Nrf2. Zur genaueren Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen kamen verschiedene Inhibitoren für die einzelnen Signalwege zum Einsatz.

Es konnte gezeigt werden, dass die SiO<sub>2</sub> NP serumabhängig toxisch auf die Makrophagen wirkten und Zelltod hauptsächlich über Nekrose erfolgte. Untersuchungen zur Aufnahme der Partikel in Abhängigkeit von Serum zeigten, dass die Partikel in Anwesenheit von FCS über Phagozytose bzw. Pinozytose aufgenommen werden und intrazellulär in Vesikeln lokalisiert sind. Im Gegensatz dazu wurden die SiO<sub>2</sub> NP ohne FCS wesentlich schlechter aufgenommen und lagen nicht Membran-umschlossen im intrazellulären Raum vor. Die erhöhte Toxizität in Abwesenheit von Serum konnte daher nicht mit der Aufnahme der Partikel korreliert werden. Zusätzlich konnten jedoch über TEM-Analysen und Hellfeldaufnahmen Marker für Autophagie unabhängig von der An- bzw. Abwesenheit von FCS gefunden werden, deren Ausbildung in Anwesenheit von FCS lediglich zeitlich verzögert erfolgte. Über Autophagie könnte ein möglicher Bezug zu LMP-vermittelten Zelltod (LMP = lysosomale Membran-Permeabilisierung) hergestellt werden.

Hinsichtlich der Aktivierung stress-sensitiver Signalwege nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition konnte gezeigt werden, dass zum einen eine Aktivierung der MAPK-Signalwege stattfand, wobei keine ROS detektiert wurden und eine Beteiligung von oxidativem Stress an der zellulären Stressantwort ausgeschlossen werden konnte. Das Genexpressionsprofil nach SiO<sub>2</sub> NP Behandlung zeigte

eine starke Induktion inflammatorischer Mediatoren wie  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{MCP-1}$ ,  $\text{Cxcl2}$ ,  $\text{COX-2}$  und  $\text{iNOS}$ . Allerdings konnte eine entsprechende Proteinsynthese und Freisetzung nur im Fall von  $\text{TNF}\alpha$  festgestellt werden. Die anti-oxidative Zellantwort hingegen wurde nur sehr schwach aktiviert.

Mit spezifischen Inhibitoren konnten eine Regulation der untersuchten proinflammatorischen Gene über die MAP-Kinasen nachgewiesen werden, allerdings hatte eine Hemmung der MAPK Signalwege keinen Einfluss auf den  $\text{SiO}_2$  NP induzierten nekrotischen Zelltod der Makrophagen. Umgekehrt ist jedoch nicht ganz auszuschließen, dass die beobachteten Signalaktivierungen ein Resultat der Toxizität waren, da unter subtoxischen Bedingungen nur eine leichte Aktivierung der Genexpression sowie auch das Auftreten von Autophagie gezeigt werden konnten. Zusammenfassend konnte neu gezeigt werden, dass die Toxizität von  $\text{SiO}_2$  NP nicht auf oxidativem Stress basiert und dass über die Aktivierung der MAPK-Signalwege die proinflammatorischen Zellantwort gesteuert wurde. Die Zusammenhänge zwischen nekrotischem Zelltod, Autophagie und Signalvermittlung müssen allerdings noch genauer untersucht werden, um die Mechanismen der  $\text{SiO}_2$  NP induzierten Toxizität vollständig verstehen zu können.

## Abstract

Metal-oxide nanoparticles are used in more and more applications of our everyday life, in medicine and in the high-tech industry because of their special and promising properties which can improve the properties of the products. Especially SiO<sub>2</sub> nanoparticles (NP) are being produced in large quantities since many years and are regarded as low-pathogenic.

The present study however showed that SiO<sub>2</sub> NP are cytotoxic and induced inflammatory responses which was partly known from the literature. But only few information were available on the cellular mechanisms of the SiO<sub>2</sub> NP effects. The aim of this *in vitro* study was therefore to elucidate the regulation of the responses upon exposure to SiO<sub>2</sub> NP on cellular and molecular level. The prevailing hypothesis of oxidative stress as mode of action for nanoparticle-mediated toxicity was also being reassessed. Flame-synthesis generated amorphous SiO<sub>2</sub> NP were being tested in murine RAW264.7 macrophages under submerged conditions. The assessed biological endpoints comprised viability, cell death, ROS generation, induction of stress-sensitive signaling pathways and altered gene expression of antioxidant enzymes and proinflammatory cytokines. Especially the activation of the MAPK-signaling pathways as well as involvement of redox-sensitive transcription factors Nrf2 and AP-1 was being evaluated. To clarify the underlying mechanisms a set of specific inhibitors of the different signaling pathways has been used.

The experiments did show a serum-dependent toxicity of the SiO<sub>2</sub> NP which resulted mainly in necrotic cell death. Uptake studies in presence or absence of serum demonstrated a phagocytotic or pinocytotic particle uptake under serum conditions which resulted in cytosolic vesicular localisation of the particles. Lack of serum hindered particle uptake and resulted in cytosolic localisation without membrane enclosure. A correlation between increased uptake and higher degree of cytotoxicity could not be made. In addition to that TEM-analysis as well as light microscopic analysis showed distinct markers of autophagy in macrophages independent of serum present. This might link autophagic processes to LMP-mediated cell death (LMP = lysosomal membrane permeability).

In context of activated stress sensitive signaling pathways SiO<sub>2</sub> NP induced MAPK-signaling could be observed whereas no ROS were being generated and oxidative stress as mode of action for the cellular stress response could be excluded. The gene expression profile after particle exposure showed a strong induction of inflammatory mediators such as TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1, CXCL2, COX-2 and iNOS, which could only be validated for TNF $\alpha$  synthesis and secretion. The anti-oxidative stress response upon particle exposure was only weakly activated. Using a specific set of MAPK-inhibitors, influence of MAPK on gene expression patterns could clearly be demonstrated whilst no effect of MAPK inhibitors could be observed upon necrotic cell death. On the other hand effects of cytotoxicity on induction of signaling pathways and altered gene expression cannot fully be excluded as subtoxic concentrations of

SiO<sub>2</sub> NP only slightly induced gene expression and occurrence of autophagy could be observed. Taken together it could be shown that SiO<sub>2</sub> NP toxicity to macrophages is not based upon oxidative stress and that MAPK-signaling is mediating proinflammatory cellular response. The possible correlations regarding cell death, autophagic processes and signaling need further clarifications to fully explain the mode of action of SiO<sub>2</sub> NP toxicity.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Nanomaterialien . . . . .	1
1.1.1	Anwendungsgebiete der verschiedenen Nanomaterialien . . . . .	1
1.1.2	Risiken der Nanotechnologie . . . . .	2
1.1.3	Toxizität von SiO <sub>2</sub> . . . . .	4
1.2	Aufnahme-Wege für Nanomaterialien . . . . .	5
1.3	Aktivierung von Stress-induzierten Signalwegen . . . . .	6
1.3.1	Oxidativer Stress . . . . .	6
1.3.2	Zielgene der Anti-Oxidativen Zellantwort . . . . .	8
1.3.3	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen . . . . .	9
1.3.4	Proinflammatorische Antwort . . . . .	11
1.4	Formen des Zelltods . . . . .	14
1.4.1	Apoptose . . . . .	14
1.4.2	Nekrose . . . . .	15
1.4.3	Zwischenformen des apoptotischen bzw. nekrotischen Zelltods . . . . .	16
1.4.4	Autophagie . . . . .	17
1.5	Zielsetzung der Arbeit . . . . .	19
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>21</b>
2.1	Material . . . . .	21
2.1.1	Chemikalien . . . . .	21
2.1.2	Inhibitoren . . . . .	22
2.1.3	Antikörper . . . . .	22
2.1.4	Laborgeräte und Programmsoftware . . . . .	24
2.2	Methoden . . . . .	25
2.2.1	Zellkultur . . . . .	25
2.2.2	Behandlung von Zellen . . . . .	26
2.2.3	Zytotoxizitäts-Assays . . . . .	28
2.2.4	ROS-Messung mittels DCF-Assay . . . . .	29
2.2.5	Proteinanalytik . . . . .	30
2.2.6	Proteinnachweis mittels ELISA . . . . .	33
2.2.7	RNA Analytik . . . . .	34

2.2.8	Automatisierter Zelltod Screening Assay (Apoptose-Assay)	38
2.2.9	Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)	40
2.2.10	Größenbestimmung der Partikel in Suspension mittels DLS	42
2.2.11	Statistische Auswertung	43
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>
3.1	Charakterisierung der verwendeten Partikel	46
3.1.1	Analyse der verwendeten Nanopartikel mittels TEM und DLS	46
3.2	Zytotoxizitäts-Studien	48
3.2.1	Vergleichende Untersuchung verschiedener Nanopartikel	48
3.2.2	Zeitkinetik und Serum-Abhängigkeit nach SiO <sub>2</sub> NP Exposition	49
3.2.3	Keine ROS Erhöhung nach SiO <sub>2</sub> NP Exposition in Makrophagen	50
3.3	Aufnahme der SiO <sub>2</sub> NP in Makrophagen	52
3.3.1	TEM-Analyse der 12 nm SiO <sub>2</sub> NP in Makrophagen in Abhängigkeit von Serum	52
3.3.2	TEM-Analyse der 40 nm SiO <sub>2</sub> NP in Makrophagen in Abhängigkeit von Serum	56
3.4	Identifizierung von Signalwegen, die nach Partikel-Exposition aktiviert werden	58
3.4.1	Aktivierung der anti-oxidativen Stressantwort und von Nrf2	58
3.4.2	Aktivierung des MAPK-Signalwegs nach SiO <sub>2</sub> NP Exposition	59
3.5	Aktivierung der Genexpression der anti-oxidativen und proinflammatorischen Zellantwort nach SiO <sub>2</sub> NP Exposition	62
3.5.1	Konzentrationsabhängige Genexpression nach Behandlung mit SiO <sub>2</sub> NP	63
3.5.2	Zeitabhängige Genexpression nach Behandlung mit SiO <sub>2</sub> NP	65
3.5.3	Validierung der Genexpressionsdaten auf Protein-Ebene	66
3.6	Inhibitor-Studien zur Aufklärung der Regulation der Signalaktivierung nach SiO <sub>2</sub> NP Exposition	68
3.6.1	Inhibierung von oxidativem Stress mittels N-Acetyl-Cystein	68
3.6.2	Hemmung des MAPK-Signalwegs durch MAPK-Inhibitoren	73
3.7	Etablierung eines Mikroskopie-basierten Hochdurchsatz-Verfahrens (HTC) zur genaueren Untersuchung der Zelltod-Mechanismen	82
3.7.1	Apoptose-Assay mit 12 nm SiO <sub>2</sub> NP	82
3.7.2	Apoptose-Assay - Einfluss des pan-Caspase-Inhibitors ZVAD-fmk	87
3.7.3	Apoptose-Assay - Hemmung von oxidativem Stress mittels NAC	91
3.7.4	Apoptose-Assay - Einsatz von MAPK-Inhibitoren	93
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>101</b>
4.1	Eigenschaften der untersuchten SiO <sub>2</sub> NP	102
4.2	Toxizität der SiO <sub>2</sub> Nanopartikel	103
4.2.1	Die SiO <sub>2</sub> NP Toxizität ist serumabhängig	103

---

4.2.2	Hypothesen zur Erklärung der SiO <sub>2</sub> NP Toxizität . . . . .	104
4.3	Aufnahme der SiO <sub>2</sub> NP in die Makrophagen . . . . .	105
4.3.1	Zusammenhang Aufnahme - Toxizität von SiO <sub>2</sub> NP . . . . .	107
4.3.2	SiO <sub>2</sub> NP induzieren Serum-unabhängig Vakuolenbildung . . . . .	107
4.4	Aktivierte Signalwege nach SiO <sub>2</sub> NP Exposition . . . . .	109
4.4.1	Anti-Oxidative Stressantwort nach SiO <sub>2</sub> NP Exposition . . . . .	110
4.4.2	Aktivierung des MAPK-Signalwegs nach SiO <sub>2</sub> NP Exposition . . . . .	110
4.4.3	Aktivierung der übergeordneten MAP2-Kinasen . . . . .	111
4.5	Proinflammatorisches Genexpressionsprofil nach SiO <sub>2</sub> NP Exposition . . . . .	112
4.6	Oxidativer Stress ist nicht der Auslöser für die SiO <sub>2</sub> NP vermittelten Effekte .	113
4.7	MAPK-vermittelte Aktivierung der Genexpression nach SiO <sub>2</sub> NP Exposition .	114
4.8	Zelltod nach SiO <sub>2</sub> NP Behandlung . . . . .	116
4.9	Modell . . . . .	119
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>123</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>139</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>141</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>143</b>
	<b>A</b>	<b>147</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Nanomaterialien

Die Nanotechnologie gilt als eine der Schlüsseltechnologien des 21. Jahrhunderts. Schätzungen der US National Science Foundation (NSF) zufolge soll das Marktpotential dieser Industrie bis zum Jahr 2015 auf bis zu 1 Billiarde US Dollar ansteigen. Anwendung findet die Nanotechnologie in vielen verschiedenen Branchen wie der Automobilindustrie, Kommunikationstechnik, Maschinenbau, Bio- und Umwelttechnik, aber auch in der Chemie, Pharmazie und der Kosmetik- und Lebensmittelindustrie. Gemäß der DIN-Norm aus dem Jahre 2008 (CEN ISO/TS 27687:200) erfolgt die Bezeichnung der Nanomaterialien nach ihrer Struktur in Nanopartikel (in drei Dimensionen  $<100$  nm), Nanostäbchen (in zwei Dimensionen  $<100$  nm) und Nanoblättchen ( $<100$  nm in einer Dimension). Unter dem Begriff Nanoobjekte werden Agglomerate und Aggregate zusammengefasst, die zwar größer als 100 nm sind, sich aber ursprünglich aus Nanopartikeln zusammensetzen. Im Vergleich von Nanopartikeln mit dem äquivalenten Bulkmaterial besitzen diese ein sehr großes Verhältnis von Oberfläche zu Volumen, so dass sich völlig andere physikalisch-chemische Eigenschaften ergeben. Dies betrifft Veränderungen von Leitfähigkeit, Magnetismus, Farbe, Härte, Schmelzpunkt, Lichtabsorption oder chemische Reaktionsfähigkeit.

### 1.1.1 Anwendungsgebiete der verschiedenen Nanomaterialien

**Titandioxid** Nanopartikel ( $\text{TiO}_2$ ) werden beispielsweise als Zusatzstoff in Sonnencremes zur Reflektion von UV-Strahlung eingesetzt. Als Weißpigment findet es Anwendung in Farben, Lacken, Kunststoffen und Papier und unter der Kennzeichnung E171 wird es als Lebensmittelzusatzstoff geführt, der u.a. in Zahncremes, verschiedenen anderen Kosmetika und Medikamenten zu finden ist. **Eisenoxid**-Nanopartikel werden in der Medizintechnik bereits als Kontrastmittel eingesetzt und finden bereits Anwendung in der gezielten Tumor-Therapie (Neuberger et al., 2005). **Carbon Black** (CB), auch Industrieruß genannt, wird hauptsächlich als Füllstoff in der Gummiindustrie oder als Schwarzpigment in Druckerfarben, Lacken oder auch in Mascara verwendet. Synthetische **Siliziumdioxid**-Nanopartikel ( $\text{SiO}_2$ ) besitzen ebenfalls ein breitgefächertes Anwendungsspektrum. So werden sie z.B. bei Farben, Lacken zur Verbesserung der Fließfähigkeit eingesetzt. Als Lebensmittelzusatzstoff mit der Kennzeichnung E551 werden sie

in pulverförmigen Lebensmitteln zur Verbesserung der Rieselfähigkeit bzw. zum Verhindern des Verklumpens verwendet. Unter der Bezeichnung hochdisperses (nanoskaliges), amorphes  $\text{SiO}_2$  ist es in verschiedensten Produkten der Pharmaindustrie (Tabletten, Zäpfchen, Gele) enthalten (FAO/WHO 2010; OECD 2005).

### 1.1.2 Risiken der Nanotechnologie

Die Nanotechnologie und insbesondere ihre Produkte sind in fast jedem Bereich des menschlichen Lebens zu finden. Daher sind mögliche gesundheitsschädigende Aspekte für Mensch und Umwelt nicht außer Acht zu lassen (Xia et al., 2009; Oberdörster et al., 2005). Durch die Industrialisierung im letzten Jahrhundert hat sich die Partikelbelastung, der Mensch und Umwelt täglich ausgesetzt sind, stark vergrößert. Zahlreiche epidemiologische Studien konnten eine Korrelation zwischen der Exposition mit Partikeln (inhalierbare Fein- und Ultrafeinstäube) und einer erhöhten Rate der Morbidität bzw. Mortalität feststellen (Pope et al., 2004; Dockery et al., 1993). Ultrafeinstäube (UFP) liegen im Größenbereich bis 100 nm, wozu auch die Nanomaterialien gezählt werden können. Untersuchungen von Fein- ( $<2.5 \mu\text{m}$ ) und Ultrafeinpartikeln ( $<0.1 \mu\text{m}$ ) zeigten, dass die UFP bei gleicher Masse im Vergleich zu den Feinpartikeln verstärkte Entzündungsreaktionen und Lungenkrankheiten auslösten. Bei Instillationsexperimenten mit feinen (100 - 1000  $\mu\text{m}$ ) und ultrafeinen (100 nm)  $\text{TiO}_2$  Partikeln in Ratten wurde eine höhere Toxizität der UFP gefunden, was auf die größere Oberfläche und erhöhte Reaktivität der Nanopartikel zurückgeführt wurde (Oberdörster et al., 2000; Nemmar et al., 2003).

Eine Exposition mit synthetischen Nanomaterialien kann am Arbeitsplatz, durch die Verbraucherprodukte selbst oder umweltbedingt (Freisetzung bei der Herstellung, Verwendung oder Entsorgung der Produkte) geschehen. Am Arbeitsplatz gibt es festgelegte Arbeitsplatzgrenzwerte für luftgetragene Partikel, welche jedoch massebezogen angegeben werden. Dass die ultrafeinen Partikel bzw. Nanopartikel eine viel geringere Masse haben, wird dabei nicht berücksichtigt (Krug et al., 2007). Bislang gibt es noch keine festgelegten Grenzwerte für die Exposition mit Nanomaterialien, weshalb 2009 die Arbeitsgruppe Nanotoxikologie der MAK-Kommission (MAK = Maximale Arbeitsplatz Konzentration) gegründet wurde. Der Bericht des Umweltbundesamts vom Oktober 2010 über die Emission von Nanopartikeln aus ausgewählten Produkten zeigte deutlich auf, dass Nanopartikel aus den hergestellten Produkten wieder austreten können. Als Beispiele sind die Auswaschung von  $\text{TiO}_2$  NP aus Wandfarben oder die Freisetzung von Carbon Black aus Druckertoner oder Reifen angeführt (UBA, 2010). Bislang gibt es aber noch keine gesicherten Erkenntnisse darüber, ob industriell hergestellte Nanomaterialien ein Gesundheitsrisiko für Mensch und Umwelt darstellen, weshalb es einer genaueren Überprüfung hinsichtlich der biologischen Wirkungen dieser Materialien bedarf (Xia et al., 2006; Oberdörster et al., 2007).

## Aufnahmewege

Nanopartikel können über mehrere Wege in den menschlichen Körper gelangen. Der Hauptaufnahmeweg erfolgt über Inhalation in den Atemtrakt, die Partikel können aber auch über die Haut, den Verdauungstrakt oder direkt für medizinische Zwecke durch intravenöse Injektion in den Körper gelangen und dort mit Blut, Zellen, Proteinen oder der DNA interagieren (Nel et al., 2006; Oberdörster et al., 2005).

### Aufnahme über die Haut

Studien des EU-Projekts NANODERM zeigten, dass trotz dermalen Applikation von TiO<sub>2</sub> und ZnO NP die gesunde Haut eine gute Schutzbarriere darstellte und keine NP in die tieferen Hautschichten vordringen konnten (Butz et al., 2007). *In vitro* Untersuchungen mit humanen Keratinozyten zeigten nach Exposition mit SWNT (*single wall carbon nano tubes*) die Induktion von oxidativem Stress und eine proinflammatorische Zellantwort (Shvedova et al., 2003).

### Aufnahme über den GI-Trakt

Nanopartikel können direkt über die orale Aufnahme von Medikamenten oder Nahrung, aber auch durch Verschlucken zuvor inhalierten Partikel (Hoet et al., 2004) über den Gastrointestinaltrakt (GIT) in den Körper kommen. Dort gelangen sie über den Darm ins Blut und verteilen sich im ganzen Körper (Jani et al., 1990). Nach Sonden-Verabreichung von Kupfer Nano- und Mikropartikeln in Mäusen wurden schädliche Effekte, insbesondere in Leber, Milz und Nieren nur für die Nanopartikel und nicht für die Mikropartikel beobachtet (Chen et al., 2006).

### Aufnahme über die Lunge

Der Hauptaufnahmeweg für Nanopartikel stellen die Atemwege dar. Beim Einatmen gelangen die Partikel durch den Mund bzw. die Nase in die Lunge und werden je nach Größe in den verschiedenen Bereichen der Lunge deponiert. Im oberen Respirationstrakt deponieren hauptsächlich Partikel  $> 2.5 \mu\text{m}$ , während feine Partikel ( $< 2.5 \mu\text{m}$ ) in die Bronchien sowie die Bronchiolen und Alveolen gelangen können. Ultrafeine Partikel bzw. Nanopartikel ( $< 0.1 \mu\text{m}$ ), können in den Alveolen die Gas-Blut-Schranke passieren und sich über die Blutzirkulation im Körper verteilen und sekundäre Zielorgane wie Herz, Leber oder das zentrale Nervensystem erreichen (Heyder et al., 1986). Inhalationsstudien an Ratten mit Iridiumpartikeln (15 und 80 nm) zeigten, dass nur ein sehr kleiner Teil der Partikel (1 %) in sekundären Organen wie Herz, Leber, Milz und Gehirn wiedergefunden werden konnte (Kreyling et al., 2002). In den Alveolen deponierte Partikel können zum einen je nach Löslichkeit längerfristig akkumulieren, von Alveolarmakrophagen phagozytiert und abtransportiert oder aber von den alveolären Epithelzellen aufgenommen werden (Oberdörster et al., 2005). Bei Inhalationsstudien an Ratten, die mit TiO<sub>2</sub> Partikeln (21 nm, 250 nm) über 12 Wochen exponiert wurden, zeigten

die Nanopartikel im Vergleich mit den Mikropartikeln eine verstärkte Entzündungsreaktion und eine längere Verweildauer in der Lunge (Ferrin et al., 1992). Die stärkeren Effekte der Nanopartikel wurden dabei auf die größere Oberfläche der Partikel und nicht auf die Partikelgröße selbst zurückgeführt. Nach Inhalation von SWCNT in Mäusen konnten eine frühe Immunreaktion und oxidativer Stress nachgewiesen werden, was letztlich zur Ausbildung von granulomatöser Pneumonie und interstitieller Fibrose führte (Shvedova et al., 2008).

### 1.1.3 Toxizität von SiO<sub>2</sub>

Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Wirkung von amorphen SiO<sub>2</sub> NP lag, soll im Folgenden auf die bisher hierzu publizierten Arbeiten näher eingegangen werden. Siliziumdioxid kann entweder kristallin oder amorph vorliegen. Von natürlichem kristallinem SiO<sub>2</sub> (Quarz) ist bekannt, dass es nach chronischer Inhalation die progressive fibrotische Lungenerkrankung Silikose (Pneumokoniose) auslösen kann. Exposition mit kristallinem SiO<sub>2</sub> findet vor allem am Arbeitsplatz statt, beispielsweise im Bergbau oder bei der Verarbeitung von Edelsteinen (Hessel et al., 1987; Calvert et al., 2003).

#### Kristallines SiO<sub>2</sub>

Von kristallinen SiO<sub>2</sub> Partikeln (0,5 - 10 µm) ist bekannt, dass durch die Generierung von ROS oxidativer Stress in der Zelle ausgelöst wird und es zu einer starken proinflammatorischen Antwort kommt. DNA-Schäden nach Exposition von humanen Lungenepithelzellen mit Quarz-Partikeln konnten ebenfalls gezeigt werden (Schins et al., 2002; Fanizza et al., 2007). Eine Aktivierung der Signalwege von AP-1 und NF-κB wurde ebenfalls nach SiO<sub>2</sub> Exposition *in vitro* sowie auch *in vivo* nachgewiesen (Castranova, 2004). Untersuchungen *in vitro* sowie auch *in vivo* konnten zeigen, dass eine Aktivierung des Nalp3-Inflammasomkomplexes nach Exposition mit kristallinem SiO<sub>2</sub> stattfand und die inflammatorische Antwort sowie die Entwicklung einer Lungenfibrose Nalp3-abhängig waren (Hornung et al., 2008; Cassel et al., 2008).

#### Amorphes SiO<sub>2</sub>

Studien aus den 50er Jahren an Ratten, die mit Aerosil<sup>®</sup>200 (amorphes SiO<sub>2</sub>) intratracheal exponiert wurden, zeigten bereits neben toxischen Effekten eine Vergrößerung der Lunge mit einhergehender Fibrose (Schlipköter et al., 1956; Schiller, 1955). Auch eine hämolytische Wirkung von SiO<sub>2</sub> NP konnte schon nachgewiesen werden (Harley und Margolis, 1961). Intratracheale Instillation von 14 nm SiO<sub>2</sub> NP führte in Mäusen zu einer transienten Inflammation, gekennzeichnet durch die starke Infiltration von Neutrophilen in die Lunge sowie auch erhöhter mRNA- und Protein-Level von Zytokinen (TNFα, IL-1β, IL-6, IL-8) und Chemokinen (MCP-1, MIP-2) (Cho et al., 2007). Transiente Inflammationseffekte nach SiO<sub>2</sub> NP Instillation in Mäusen und Ratten wurden auch von anderen Gruppen beschrieben (Warheit et al., 1995; Sayes et al., 2007). Direkte intravenöse Injektion von SiO<sub>2</sub> NP verschiedener Größen (70, 300, 1000 nm) in Mäusen führte bei Anwendung der kleinsten NP zu Schäden in der Leber,



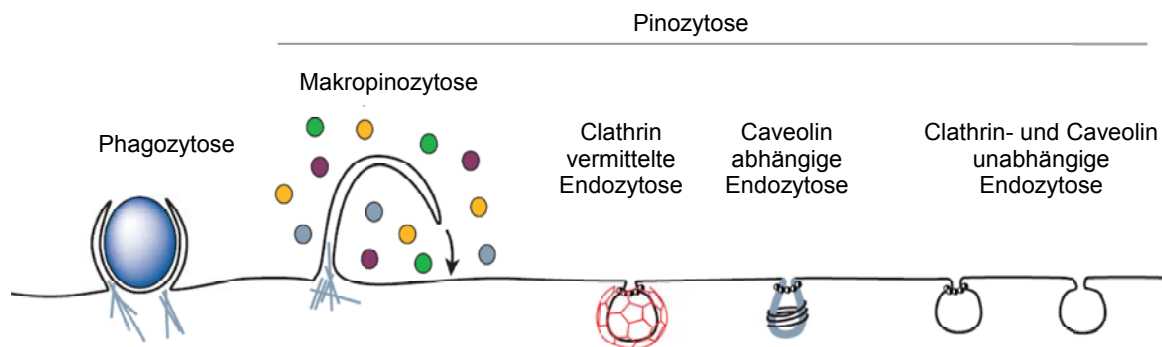
welche nach chronischer Applikation auch eine Leberfibrose verursachten (Nishimori et al., 2009). Park und Kollegen fanden in vergleichenden Studien zur *in vitro* und *in vivo* Exposition von Makrophagen bzw. Mäusen mit SiO<sub>2</sub> NP (12 nm), dass die Partikel im Zellkultursystem oxidativen Stress sowie die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) verursachten. *In vivo* konnten nach intraperitonealer Injektion der SiO<sub>2</sub> Partikel erhöhte Blutlevel von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und NO gemessen werden, welche auch in isolierten Makrophagen erhöhte mRNA-Level der Zytokine (IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) hervorriefen (Park et al., 2009). Beim Vergleich von Nano- und Mikro-SiO<sub>2</sub> NP verursachten die Nanopartikel sowohl im Zellkultursystem als auch in der Maus eine verstärkte Inflammation und Zytotoxizität (Kim et al., 2009).

Untersuchungen in *in vitro* Systemen zeigten für die verschiedensten Zelltypen, darunter Endothelzellen (EAHY926)(Napierska et al., 2009), humane alveoläre Epithelzellen (A549) (Lin et al., 2006; Lison et al., 2008), Maus-Keratinocyten (Hel-30)(Yu et al., 2009) und Makrophagen (RAW264.7, MH-S) (Park et al., 2009; Constantini et al., 2011) größenabhängige toxische Effekte. Die Exposition von humanen Darmzellen (Caco-2) mit 12 nm SiO<sub>2</sub> NP verursachte einen verstärkten Zelltod, sowie Schädigung der DNA und vollständige GSH-Depletion (Gerloff et al., 2009). Oxidativer Stress als Auslöser für die SiO<sub>2</sub> NP Toxizität wurde in BEAS-2B (Eom et al., 2008), in A549 (Lin et al., 2006) sowie auch in RAW264.7 (Park et al., 2009; Yang et al., 2009) postuliert. Eine Aktivierung des Nalp3-Inflammasoms nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition wurde bereits für differenzierte THP-1 Makrophagen (Morishige et al., 2010) sowie für dendritische Zellen (Winter et al., 2010) gezeigt. Mikroarray-Analysen in Makrophagen nach Stimulation mit verschiedenen Größen und Dosen an SiO<sub>2</sub> NP zeigten eher eine oberflächen-abhängige als größen-abhängige Induktion der Genexpression, insbesondere von TNF $\alpha$  und Cxcl2 (Waters et al., 2008).

## 1.2 Aufnahme-Wege für Nanomaterialien

Generell können Zellen Makromoleküle und /oder auch Nanopartikel über Phagozytose oder Pinozytose aufnehmen. Für die Rezeptor-vermittelte Phagozytose (Partikelgröße 0.1  $\mu$ m - 10  $\mu$ m) sind insbesondere Oberflächenrezeptoren wie der Mannose- (MR), der Komplement- (CR) oder der Immunglobulin-Rezeptor (Fc $\gamma$ R) wichtig. Eine Beteiligung von Scavenger-Rezeptoren ist aber auch möglich (Dobrovolskaia et al., 2007). Komponenten des FCS, wie beispielsweise Albumin, IgGs, Komponenten des Komplementsystems oder Wachstumsfaktoren, die an die NP binden, können an solche Oberflächenrezeptoren binden und eine Aufnahme vermitteln. Die Pinozytose lässt sich in Makropinozytose, Clathrin- und Caveolin-vermittelte Endozytose sowie Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose unterteilen (Conner & Schmid, 2003). Die Makropinozytose (Partikel bis 1  $\mu$ m) ist wie auch die Phagozytose durch Aktin-vermittelte Prozesse gekennzeichnet und kann durch Wachstumsfaktoren oder andere Signale ausgelöst werden. Bei endozytotischer Aufnahme erfolgt die Aufnahme über Einstülpung der

Plasmamembran und Abschnürung von Vesikeln. An sogenannten *clathrin coated pits* der Plasmamembran erfolgt die Rezeptor-vermittelte Clathrin-abhängige Aufnahme (Partikelgröße 100 nm - 200 nm), wobei Clathrin zusammen mit verschiedenen Adaptorproteinen und Dynamin die Einstülpung und Vesikelabschnürung vermittelt. Caveolin-abhängige Aufnahme findet an den kolbenförmigen Caveolae statt (Partikelgröße 50 nm - 80 nm), in denen neben dem stabilisierenden Caveolin auch Sphingomyeline und Membrantransporter in der Plasmamembran eingelagert sind. Die Clathrin- und Caveolin-unabhängige Aufnahme kann Rezeptor-abhängig oder -unabhängig erfolgen und benötigt Proteine zur Abschnürung der Vesikel.



adaptiert von Conner & Schmid, Nature, 2003

**Abbildung 1.1: Mögliche Aufnahmewege von Makromolekülen / Nanopartikeln in Zellen.** Dargestellt sind die 5 möglichen Aufnahmewege von Makromolekülen / Nanopartikeln in Säugetierzellen (adaptiert von Conner & Schmid, 2003). Genauere Erläuterungen siehe Text.

Xia et al. zeigten eine Caveolin-abhängige Aufnahme von Amino-modifizierten Polystyrol-Beads (60 nm) in BEAS-2B Zellen (Xia et al., 2008). Untersuchungen von Orr et al. konnten zeigen, dass kleine SiO<sub>2</sub> NP (< 500 nm, amorph) in RAW264.7 Makrophagen Clathrin-abhängig über den Scavenger-Rezeptor A aufgenommen wurden (Orr et al., 2010). Eine BSA-abhängige Aufnahme von BSA-gecoateten Nanopartikeln in Endothelzellen über Caveolin-vermittelte Endozytose wurde von Wang et al. postuliert (Wang et al., 2009).

## 1.3 Aktivierung von Stress-induzierten Signalwegen

### 1.3.1 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress beschreibt einen Zustand der Zelle, bei dem durch ein Ungleichgewicht bei der Bildung und Eliminierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) die oxidativen Prozesse überwiegen. Zu den gebildeten ROS zählen unter anderem die Radikale Superoxid-Anion ( $\cdot\text{O}_2^-$ ),

Stickstoffmonoxid ( $\text{NO}\cdot$ ), Hydroxylradikal ( $\cdot\text{OH}$ ) sowie auch nicht-radikale Komponenten wie  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder Hypochlorsäure ( $\text{HOCL}$ ). Neben ihren toxischen Effekten (Schädigung von DNA; Lipid-Peroxidation, Proteindenaturierung) können sie aber auch als Signalmoleküle fungieren und Signaltransduktionskaskaden (Aktivierung  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , Nrf2) anschalten sowie auch als Schutz gegen mikrobielle Infektionen dienen (Aggarwal et al., 2006; D'Autreaux & Toledano, 2007). Die Generierung von ROS spielt auch bei der Pathogenese vieler Krankheiten eine große Rolle. Dazu zählen kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes, Krebs, neurodegenerative Erkrankungen und Alterungsprozesse (Dhalla et al., 2000; Dalle-Donne et al., 2006; Sayre et al., 2001; Valko et al., 2007).

### Hierarchie der zellulären Antwort auf oxidativen Stress

Eine Möglichkeit, die Toxizität von Nanopartikeln zu erklären, ist die Bildung von Reaktiven Sauerstoff- oder Stickstoff Spezies (ROS/RNS) durch die Partikel. Diese können entweder außerhalb oder - nach Aufnahme - innerhalb der Zelle gebildet werden, dadurch verschiedene Signalwege anschalten und je nach Stresslevel über das Überleben der Zelle entscheiden. Nel et al. postulieren ein hierarchisches Prinzip (Nel et al., 2006), nach dem die Zelle zunächst bei niedrigem oxidativen Stress als Abwehrreaktion anti-oxidativ wirkende und entgiftende Enzyme aktiviert. In diesem Zusammenhang ist der Transkriptionsfaktor Nrf2 von entscheidender Bedeutung, da er an das Anti-oxidative Response Element (ARE) des Promotors von Phase II Genen bindet und deren Transkription aktiviert. Wird der Stresslevel zu hoch, so erfolgt eine Entzündungsreaktion, bei der wichtige Mediatoren wie Zytokine und Chemokine ausgeschüttet und entsprechende Zielzellen des Immunsystems aktiviert werden. Bei der Initiation der Entzündungsreaktion sind vor allem die Signalwege der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) sowie die Transkriptionsfaktoren  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  und AP-1 beteiligt. Im weiteren Verlauf treten auch zytotoxische Effekte auf und wird der Stress zu hoch, so erfolgt der Zelltod durch Apoptose oder Nekrose.

### Transkriptionsfaktor Nrf2

Nrf2 zählt zur Familie der Cap'n'Collar (CNC) Transkriptionsfaktoren, welche sich durch basische Leucin-Zipper-Elemente (bZIP) auszeichnen. Er kann an die ARE-Elemente (*antioxidant response element*) der Promotoren verschiedener Gene binden und so deren Transkription aktivieren. Unter normalen Bedingungen liegt Nrf2 an das Zytoskelett-assoziierte Protein Keap-1 (*Kelch-like erythroid CNC homologue ECH-associated protein 1*) gebunden vor. Durch die Assoziation mit Keap-1 wird zum einen die zytosolische Lokalisation von Nrf2 bestimmt und zum anderen der Ubiquitin-abhängige proteasomale Abbau des Transkriptionsfaktors gewährleistet (Kobayashi et al., 2004; Zhang, 2006).

Unter oxidativen Stressbedingungen werden verschiedene Cystein-Reste am Keap-1 Protein modifiziert, wodurch es zu Konformationsänderungen von Keap-1 und als Konsequenz zur

Freisetzung und Stabilisierung von Nrf2 kommt. Die Halbwertszeit von Nrf-2 erhöht sich dadurch von ca. 15 Minuten auf etwa 100 Minuten (Stewart et al., 2002). Freigesetztes Nrf2 kann dann in den Zellkern translozieren und dort nach Komplexbildung mit weiteren Transkriptionsfaktoren (small MAF-Proteine, cJun, cFos, Fra-1) die Expression ARE-abhängiger Gene aktivieren (Boutten et al., 2011). Die Aktivierung von Nrf2 kann auch über die direkte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors durch verschiedene Kinasen, wie PKC (Protein Kinase C), PI3-Kinase (Phosphatidylinositol-3 Kinase) oder der MAP-Kinasen (p38, JNK1/2, ERK1/2) erfolgen (Huang et al., 2000; Boutten et al., 2011).

Nrf2-Zielgene umfassen hauptsächlich Phase-II Entgiftungsenzyme und anti-oxidativ wirkende Proteine, zu denen unter anderem die Hämoxxygenase-1 (HO-1), die NADPH-Chinon-Oxidoreduktase (NQO1) sowie die  $\gamma$ Glutamat-Cystein Ligase ( $\gamma$ -GCL) gehören. Ihre genaueren Funktionen werden im nächsten Abschnitt genauer erläutert. Es ist bereits bekannt, dass Nrf2 eine essentielle Rolle in der Lunge zum Schutz gegen Erkrankungen, wie beispielsweise durch Zigarettenrauch induzierte COPD (*chronic obstructive pulmonary disease*), hat, bei denen oxidative Prozesse eine wichtige Rolle spielen (Kensler et al., 2007).

### 1.3.2 Zielgene der Anti-Oxidativen Zellantwort

Die **NADPH-Chinon-Oxidoreduktase** (NQO-1) gehört zu den Flavoproteinen und hat bei der zellulären Antwort auf von Chinonen ausgelösten oxidativen Stress eine entscheidende Funktion (Xia et al., 2004). Das Enzym katalysiert die Reduktion von Chinonen und inhibiert so letztlich die ROS Bildung. Im Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass NQO1 eine Schutzfunktion gegen die Toxizität von Menadion oder gegen die Entstehung von Hautkrebs nach Benzo[a]pyren Exposition bietet (Radjendirane et al., 1998; Long et al., 2000). Die Genexpression kann nach entsprechendem Stimulus durch die Transkriptionsfaktoren Nrf2 und AP-1 reguliert werden (Nioi et al., 2003).

Die  **$\gamma$ Glutamat-Cystein-Ligase** ( $\gamma$ -GCL) katalysiert den geschwindigkeits-bestimmenden Schritt der *de novo* Synthese von Glutathion. Zu den wichtigen Funktionen von Glutathion in der Zelle zählen unter anderem die anti-oxidative Abwehr, Regulation des Zellzyklus oder auch der Schutz der Zelle vor Toxinen bzw. bei der Entgiftung von Xenobiotika. Außerdem werden über Glutathion auch Enzyme wie die NOS (*nitric oxide synthase*), Cyclooxygenasen und Lipxygenasen reguliert. Elektrophile Substanzen wie ROS oder Xenobiotika gehen eine Bindung mit der Thiol-Gruppe ein und können so eliminiert werden. Dies führt zu einem Absinken des GSH-Levels in der Zelle, der durch Neusynthese wieder aufgefüllt wird (Dickinson et al., 2004). Das Enzym  $\gamma$ -GCL ist ein Heterodimer, der sich aus einer katalytischen ( $\gamma$ -GCL-C) und modifizierenden Untereinheit ( $\gamma$ -GCL-M) zusammensetzt, wobei die katalytische Untereinheit hauptsächlich für die Synthese von GSH zuständig ist, während über die modifizierende Untereinheit lediglich die Syntheselevel gesteuert werden (Krzywanski et al., 2004). Aktiviert

werden kann die Genexpression von den Transkriptionsfaktoren Nrf2 bzw. auch von AP-1 (Li et al., 2006; Dickinson et al., 2003).

Die **Häm-Oxygenase 1** (HO-1) katalysiert den geschwindigkeits-bestimmenden Schritt beim Häm-Abbau und kann so über die gebildeten Reaktionsprodukte (CO, Bilirubin) die Zelle *in vitro* und *in vivo* vor oxidativem Stress schützen. Bislang wurden drei Isoformen dieses Enzyms identifiziert, welche sich durch die Verteilung in verschiedenen Geweben sowie auch in der Regulation der Genexpression unterscheiden. Unter physiologischen Bedingungen liegt die HO-1 in den meisten Geweben nur in geringen Mengen vor und ihre Genexpression kann als einzige durch verschiedene Stimuli induziert werden. Zu den wichtigsten induzierenden Agenzien der HO-1 gehören neben Häm auch UV-Strahlung, Hyperthermie, Schwermetalle, proinflammatorische Zytokine, Endotoxine und Stickstoffmonoxid (NO) (Ryter et al., 2002). Das Reaktionsprodukt CO besitzt neben seiner Funktion als Vasodilatator oder der Regulierung von Muskeltonus und Plättchenaggregation auch anti-inflammatorische und anti-apoptotische Eigenschaften, welche auf Interaktionen mit dem MAPK-Signalling zurückzuführen sind (Otterbein et al., 2000; Brouard et al., 2000). Bilirubine wirken zytotoxisch und können oxidativen Stress durch direkte Neutralisierung von Sauerstoffradikalen bzw. der Hemmung von Lipidperoxidation verhindern (Ryter et al., 2002). Die Genaktivität wird unter Stressbedingungen hauptsächlich über Nrf2 reguliert, wobei eine Beteiligung von AP-1 unter bestimmten Bedingungen nicht ausgeschlossen werden kann (Alam et al., 2000; Ryter et al., 2002).

### 1.3.3 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen

Die mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK) gehören zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen und sind für die Weiterleitung von extrazellulären Signalen in den Zellkern zuständig. Sie sind evolutionär hochkonserviert und an den verschiedensten zellulären Prozessen, wie Proliferation, Differenzierung sowie Inflammation und Apoptose beteiligt. Zu ihnen zählen die Kinasen ERK (*extracellular signal regulated kinase*), p38 und JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), wobei jede Familie eine unterschiedlichen Anzahl von Isoformen aufweist. Die Kinasen p38 und JNK werden auch unter dem Begriff Stress-aktivierte Proteinkinasen (SAPK) geführt, da sie vor allem nach Stressfaktoren wie UV-Strahlung, oxidativem Stress oder bei Entzündungsreaktionen aktiviert werden (Pearson et al., 2001; Kyriakis et al., 2001; Dong et al., 2002; Herrlich et al., 2008). Mitogene Signale, wie Wachstumsfaktoren, Hormone oder Neurotransmitter, führen zur Aktivierung von ERK, sodass wichtige Gene für Zellwachstum und Differenzierung aktiviert werden (Rubinfeld & Seger, 2005).

Die Aktivierung der MAPK erfolgt über eine dreifache Kinase-Kaskade. So werden die MAPK von den übergeordneten MAPK-Kinasen (auch MAP2K genannt) aktiviert, welche ihrerseits Substrate der MAPKK-Kinasen (MAP3K) sind (Seger & Krebs, 1995). Eine schematische Darstellung dieser Kinase-Kaskade ist in Abb. 1.2 dargestellt. Nach der Aktivierung der

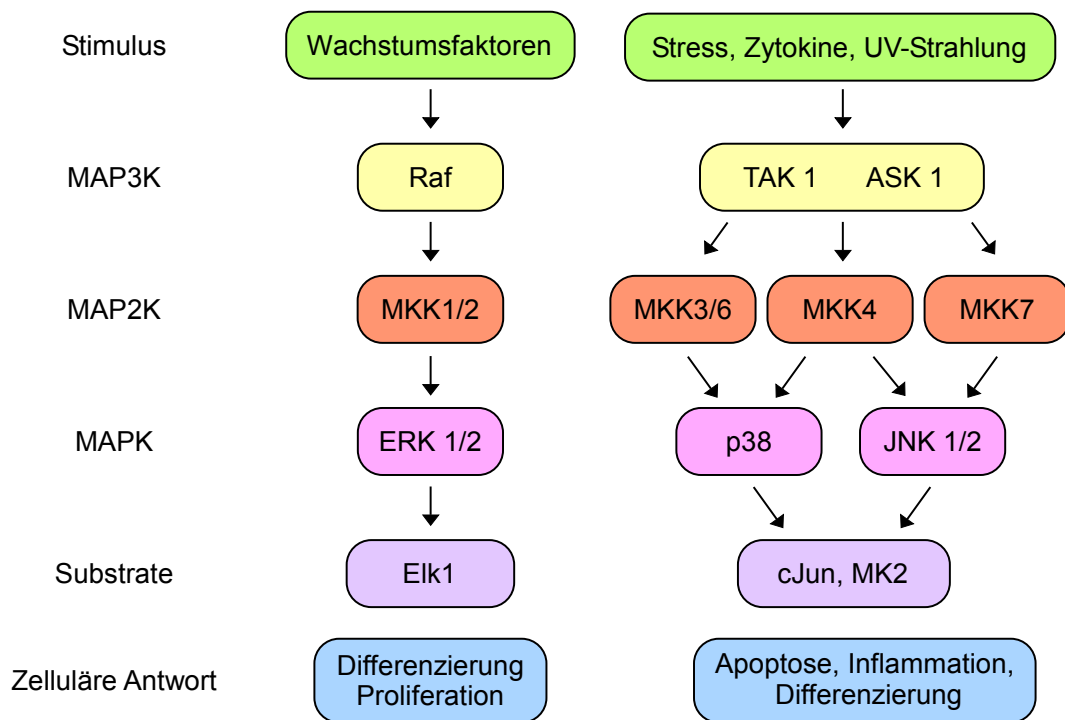
MAPK im Zytosol translozieren diese in den Zellkern, um dort Substrate, insbesondere Transkriptionsfaktoren, zu aktivieren und eine spezifische Genexpression auszulösen. Einer der bekanntesten von den MAPK aktivierten Transkriptionsfaktoren stellt AP-1 dar, welcher in Abschnitt 1.3.3 genauer beschrieben wird.

Nach Stimulation mit Mitogenen vermitteln die MAP3-Kinasen Raf und Mos die Phosphorylierung von MKK1/2, die ihrerseits ERK1/2 aktiviert. Zu den Substraten von ERK gehören neben Elk1 und c-Myc auch die ribosomale S6 Kinase (RSK), deren Aktivierung zur Induktion von *immediate early* Genen wie c-Fos führt (Rubinfeld & Seger, 2005). Auf Ebene der MAP3-Kinasen sind TAK1 (*transforming growth factor  $\beta$  activated kinase-1*) und ASK1 (*Apoptosis signal regulating kinase 1*) anzuführen. Nach oxidativem Stress wurden die Kinasen p38 und JNK über ASK1 phosphoryliert, was letztlich Apoptose auslöste (Nagai et al., 2007). TAK1 wird über verschiedene Stimuli wie Zytokine (IL-1), mikrobielle Pathogene, TGF- $\beta$  und Toll-like Rezeptoren (TLR) aktiviert und hat wichtige Funktionen bei der angeborenen und adaptiven Immunantwort (Sato et al., 2005).

Die Phosphorylierung von p38 wird hauptsächlich über MKK3/6 vermittelt, wobei nur die Isoform p38 $\alpha$  zusätzlich auch über MKK4 phosphoryliert werden kann. MKK4 sowie auch MKK7 führen ihrerseits zur Aktivierung der JNK (Lin et al., 1995; Kyriakis et al., 2001). Substrate der p38 und JNK besitzen eine MAPK-spezifische Konsensus-Sequenz, an der die Phosphorylierung stattfindet. Zu den typischen Substraten zählen vor allem Transkriptionsfaktoren wie ATF-2 (*activating transcription factor-2*), Elk-1, cJun oder andere Proteinkinasen wie MK2 (MAPK-aktivierte Protein Kinase 2). MK2 beispielsweise hat wichtige Funktionen bei der Regulation der Zytokin-Produktion durch Stabilisierung transkribierter mRNAs (Kaminska et al., 2005).

### **Transkriptionsfaktor AP-1**

Der Transkriptionsfaktor AP-1 (*activating protein 1*) ist ein Proteinkomplex, der sich aus Homo- bzw. Heterodimeren der Mitglieder der Jun-, Fos- und CREB/ATF-Familie zusammensetzt. Er gehört ebenso wie Nrf2 zur Gruppe der bZIP Transkriptionsfaktoren und aktiviert oder reprimiert durch Sequenz-spezifische Bindung an Promotorelemente die Expression verschiedenster Gene. Diese sind an einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Zellwachstum, Differenzierung, Zelltod, Migration und Tumorentstehung beteiligt. Zur Jun-Familie gehören cJun, JunB und JunD, welche sowohl Homo- als auch Heterodimere ausbilden können. Die Mitglieder der Fos-Proteine (cFos, FosB, Fra-1, Fra-2) hingegen bilden ausschließlich Heterodimere aus. Die Aktivität des Transkriptionsfaktors wird zum einen über die Phosphorylierung durch die MAPK gesteuert, zum anderen auch über die Verfügbarkeit der Dimerisationspartner, die Zusammensetzung der Dimere sowie auch durch posttranslationale Modifikationen und Interaktion mit zusätzlichen Proteinen (Reddy et al., 2002; Vesely et al., 2009).



**Abbildung 1.2: Der MAPK-Signalweg.** Dargestellt ist die Aktivierung der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) über die MAPK-Kaskade. Nähere Erläuterungen siehe Text.

AP-1 ist unter anderem auch an der Aktivierung verschiedener Gene der proinflammatorischen Zellantwort beteiligt. Diese werden im nächsten Abschnitt näher erläutert.

### 1.3.4 Proinflammatorische Antwort

Inflammation ist eine schützende Reaktion des Körpers auf exogene oder endogene Stressfaktoren, wie mikrobielle Infektionen oder Gewebeschäden, um diese schädigenden Stimuli zu beseitigen und den Heilungsprozess einzuleiten. Gerät diese Immunabwehr außer Kontrolle, so kann dies zu einer Reihe von Krankheiten, wie rheumatoide Arthritis, chronische Entzündungen des Darms oder auch neurodegenerative Krankheiten führen. Pathogenspezifische Muster, auch PAMP (*pathogen associated molecular pattern*) oder DAMP (*danger associated molecular pattern*) genannt, werden über spezifische Oberflächenrezeptoren von Makrophagen und Mastzellen erkannt, so dass Signalkaskaden im Zellinneren aktiviert werden, die zur Sezernierung verschiedener inflammatorischer Mediatoren (Zytokine, Chemokine, vasoaktive Amine, Lipidmediatoren, proteolytische Enzyme) führen. Es kommt zur Rekrutierung und zum Einstrom weiterer Immunzellen in das entzündete Gewebe, welche nach entsprechender Aktivierung die Pathogene entfernen und Reparatur- bzw. Heilungsprozesse einleiten.

**TNF $\alpha$** , **IL-1 $\beta$**  sowie auch **IL-6** sind wichtige proinflammatorische Zytokine, welche an der Vermittlung von Entzündungsprozessen in der Lunge beteiligt sind. TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  werden hauptsächlich von Makrophagen nach Stimulation durch Bakterien, Viren, LPS, etc. sezerniert. Diese Zytokine regeln die Aktivität verschiedener Immunzellen, induzieren die Freisetzung von Zytokinen in anderen Zellen (z.B. Epithelzellen) und lösen Fieber aus. In der Lunge induziert das von Makrophagen sezernierte TNF $\alpha$  u.a. die Freisetzung von IL-6 und IL-8 in Epithelzellen, was zu einer Verstärkung der inflammatorischen Wirkung führt. IL-6 wirkt systemisch auf den Gesamtorganismus, indem es z.B. die Bildung von Akute-Phase Proteinen in der Leber auslöst. IL-6 spielt auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Krebs sowie bei Erkrankungen des kardiovaskulären Systems und Diabetes (Heikkilä et al., 2008; Heinrich et al., 2003). Zu den Oberflächenrezeptoren, die über PAMPs und DAMPs aktiviert werden, gehören unter anderem TLRs (Toll-like Rezeptoren), CLRs (C-type Lectin Rezeptoren), NLRs (NOD-like Rezeptoren) oder spezifische Zytokin-Rezeptoren wie TNF $\alpha$  -R oder IL-1-R. Diese vermitteln über die Aktivierung von verschiedenen Signalkaskaden die Biosynthese der benötigten Zytokine, welche auf unterschiedlichen Ebenen (transkriptionell, posttranskriptionell und sekretorisch) reguliert werden.

Die Biosynthese von **TNF $\alpha$**  unterliegt vielfachen Regulationsschritten, wobei die MAPK einen wesentlichen Beitrag dazu leisten. Über NF- $\kappa$ B und AP-1 wird die mRNA-Synthese reguliert und über die Phosphorylierung von ARE-bindenden Proteinen, beispielsweise HNRNP, durch die MAP-Kinase ERK der nukleäre Export der mRNA gewährleistet. Eine erhöhte mRNA-Stabilität wird über das Zusammenspiel von p38 - MK2 erreicht. Die Prozessierung von pro-TNF $\alpha$  sowie auch die Sekretion des reifen Proteins wird mittels des Enzyms TACE (*TNF $\alpha$  converting enzyme*) realisiert, welches von ERK phosphoryliert wird, (Gaestel et al., 2009; Cuenda et al., 2007).

**IL-1 $\beta$**  ist neben TNF $\alpha$  einer der Hauptregulatoren bei der inflammatorischen Antwort. Die Biosynthese von IL-1 $\beta$  kann neben infektiöser Stimuli auch durch UV-Strahlung, Asbest oder kristallines SiO<sub>2</sub> ausgelöst werden (Hornung et al., 2008). Reguliert wird die Biosynthese auf den drei Ebenen Transkription, Prozessierung und Sezernierung. Die mRNA-Synthese wird zum einen nach Rezeptor-Aktivierung über NF- $\kappa$ B, p38 - CK2 (Casein Kinase 2) bzw. Calcium-Signalling angeschaltet und über p38 - MK2 die Stabilität der mRNA erhöht. Zum anderen erfolgt die Prozessierung von pro-IL-1 $\beta$  über den Nalp3-Inflammasom - Caspase-1 Komplex, was letztlich zur Sezernierung des reifen Zytokins über P2X<sub>7</sub> Rezeptoren führt. Freigesetztes IL-1 $\beta$  kann in den Zielzellen über Bindung an den IL-1R die Genexpression von IL-6, IL-9, COX-2 sowie MCP-1 bewirken (Gaestel et al., 2009; Weber et al., 2010).

Die Biosynthese von **IL-6** wird vor allem nach Stimulation mit TNF $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  angeregt und ebenfalls über NF- $\kappa$ B und p38 - MK2 reguliert. IL-6 selbst aktiviert in Zielzellen sowohl den JAK-STAT- als auch den MAPK-Signalweg, über welche Inflammation, Proliferation und Apoptose reguliert werden (Heikkilä et al., 2008; Heinrich et al., 2003)



**MCP-1** (*monocyte chemoattractant protein*) und **Cxcl2**, auch MIP-2 (*macrophage inflammatory protein*) genannt, gehören zur Familie der Chemokine, die an der Regulation verschiedener Prozesse (Angiogenese, Inflammation, Zellrekrutierung, Migration) beteiligt sind. Ihre Hauptaufgabe bei der Inflammation ist die Chemotaxis, also die Rekrutierung von Immunzellen an den Entzündungsort, wobei über MCP-1 hauptsächlich Monozyten und über Cxcl2 Neutrophile rekrutiert werden. Sie werden hauptsächlich von Makrophagen, aber auch von Epithelzellen oder Fibroblasten sezerniert. Ihre Funktion üben sie durch Bindung an Chemokin-spezifische Rezeptoren (G-Protein gekoppelte Rezeptoren) aus, so dass es zur Aktivierung der PKC (Protein Kinase C) bzw. auch des MAPK-Signalwegs kommt (Yen et al., 1997; Yadav et al., 2010).

Die Biosynthese der Chemokine wird hauptsächlich durch die Ausschüttung inflammatorischer Stimuli wie beispielsweise Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-4, TNF $\alpha$ ), LPS oder IFN- $\gamma$  aktiviert. An der Genregulation sind die beiden Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- $\kappa$ B beteiligt, wobei die MCP-1 Genaktivierung durch Zytokine bzw. Wachstumsfaktoren hauptsächlich über NF- $\kappa$ B vermittelt wird (Ueda et al., 1997; Yadav et al., 2010). Im Gegensatz dazu wird die Cxcl2 mRNA-Synthese nach LPS bzw. TPA eher über AP-1 vermittelt (Ogawa et al., 2004).

Die Cyclooxygenase 2 (**COX-2**) ist an der Biosynthese verschiedener Lipidmediatoren beteiligt. Ihr Hauptsubstrat ist die Arachidonsäure, welche entweder mittels COX-2 zu Prostaglandinen und Thromboxanen oder aber über den Lipoxygenase-Weg zu Leukotrienen umgesetzt wird. Das Enzym kann über LPS, inflammatorische Mediatoren wie TNF $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  sowie durch Wachstumsfaktoren induziert werden. Reguliert wird die COX-2 Genexpression sowohl über AP-1 als auch über NF- $\kappa$ B, wobei nach Stimulation von Makrophagen mit LPS hauptsächlich NF- $\kappa$ B beteiligt ist (Kang et al., 2007). Die Stabilität der COX-2 mRNA kann zum einen durch p38 - MK2 erhöht werden, während miRNAs die Translation blockieren bzw. den schnellen Abbau der mRNA bewirken können (Mbonye et al., 2009).

Die induzierbare NO-Synthase (**iNOS**) katalysiert die Bildung großer Mengen Stickstoffmonoxid (NO), welches den Makrophagen zur direkten Immunabwehr dient. NO reagiert mit  $\cdot\text{O}_2$  zu dem stark oxidativ wirkenden ONOO $^-$  Radikal, welches eingedrungene Mikroorganismen abtöten soll. Die bekanntesten Induktoren der iNOS sind TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  sowie LPS. Die Genexpression wird hauptsächlich über NF- $\kappa$ B reguliert und die mRNA-Stabilität über p38 - MK2 bzw. verschiedene miRNAs beeinflusst (Lechner et al., 2005; Pautz et al., 2010).

**MMP9** gehört zur Familie der Matrix-Metalloproteinasen, welche sowohl den Abbau der extrazellulären Matrix (ECM) als auch von Nicht-ECM Proteinen (Proteasen, Protease Inhibitoren, chemotaktische Moleküle) vermitteln. Sie sind an physiologischen Prozessen wie Embryogenese, Inflammation, Gewebeumbau und bei Krankheiten wie Arthritis oder Krebs (Tumorinvasion, Metastasierung) beteiligt. Bei Entzündungsprozessen regulieren sie physikalische Barrieren, verändern Zytokine und Chemokine und sorgen für Aufbau von Chemokin-Gradienten, um die

Leukozytenrekrutierung in entzündetes Gewebe zu regulieren. Die mRNA-Synthese wird über AP-1 bzw. NF- $\kappa$ B reguliert. MMPs werden zunächst als Proenzyme synthetisiert und erst nach der Sezernierung aktiviert. An der Steuerung der proteolytischen Aktivität sind weitere extrazelluläre Proteasen sowie TIMPs (*tissue inhibitors of MMPs*) beteiligt (Chakraborti et al., 2003; Manicone et al., 2008).

### 1.4 Formen des Zelltods

Zelltod kann sowohl durch natürliches Absterben (physiologischer Prozess) oder auch durch Zytotoxizität infolge der Einwirkung von Fremd-Substanzen auf die Zelle erfolgen. Anhand verschiedener Kriterien wie morphologische Veränderungen, Beteiligung verschiedener Enzyme (Nukleasen, Proteasen) oder immunologischer Gesichtspunkte kann eine Klassifizierung des Zelltods in Apoptose, Nekrose und Autophagie stattfinden (Kroemer et al., 2008). Die genaue Erläuterung der einzelnen Begriffe sowie deren charakteristische Merkmale werden in den folgenden Abschnitten genauer erläutert.

#### 1.4.1 Apoptose

Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, beschreibt einen streng geregelten Prozess des Zelltods (Kerr et al., 1972), bei dem unter Energieverbrauch der enzymatische Abbau der zellulären Komponenten bei intakter Zellmembran ohne Schädigung des umliegenden Gewebes stattfindet. Charakteristische Merkmale der Apoptose sind das Schrumpfen und Abrunden der Zelle, der enzymatische Abbau der zellulären DNA über Chromatin-Kondensation und Fragmentierung, die Ausbildung von Ausstülpungen der Zellmembran (*blebbing*) und schließlich das Verpacken der Zelle in Vesikel (*apoptotic bodies*), welche dann von Makrophagen phagozytiert werden können.

Ausgelöst werden kann dieser Prozess zum einen über externe Faktoren, oder durch intrazelluläre Signale wie beispielweise DNA-Schäden (Fink et al., 2005; Orrhenius et al., 2011; Kroemer et al., 2008). Hauptsächlich an der Regelung der intrazellulär ablaufenden Prozesse beteiligt sind Aspartat-spezifische Cystein Proteasen, die sogenannten Caspasen (*cysteine-dependent aspartyl-specific proteases*). Diese werden im Rahmen einer Caspase-Kaskade durch Spaltung der Pro-Form zur funktionalen Caspase aktiviert (Pop & Salvesen, 2009). Sie bewirken den proteolytischen Abbau von z.B. zellulären Strukturproteinen wie Aktin oder auch von Nukleasen, welche für den Abbau nukleärer DNA zuständig sind. Die Caspasen lassen sich in Initiator-Caspasen (z.B. Caspase 8 und 9), die am Anfang der Caspase-Kaskade stehen, und Effektor-Caspasen (z.B. Caspase 3 und 7), welche für das Einleiten der Apoptose verantwortlich sind, einteilen. Desweiteren sind einige Caspasen auch an der Vermittlung von Entzündungsprozessen (z. B. Caspase 1, 12) beteiligt. Näheres dazu unter Abschnitt 1.4.3.

Über den extrinsischen Weg wird nach Bindung verschiedenster Stimuli ( $\text{TNF}\alpha$ , FasL) an sogenannte "Todes-Rezeptoren" (Mitglieder der TNF-Superfamilie) über verschiedene Schritte Caspase 8 aktiviert und die Caspase-Kaskade ausgelöst. Ein wichtiger Faktor hierbei ist die RIP-Kinase 1, über die entweder das Überleben der Zelle oder das Einleiten der Apoptose bzw. der Nekroptose gesteuert wird. Näheres dazu siehe Abschnitt 1.4.3. Der intrinsische Apoptoseweg wird durch intrazelluläre Signale (z.B. DNA-Schäden, oxidativer Stress, Chemotherapeutika, Infektion) ausgelöst. Durch die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrien-Membran (MOMP = *mitochondrial outer membrane permeability*) kommt es zur Freisetzung von Cytochrom C und anderen proapoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien ins Zytosol. Nach Bildung des Apoptosom-Komplexes, bestehend aus Cytochrom C, Apaf-1 (*apoptosis protease activating factor*) und Pro-Caspase 9 wird diese Caspase aktiviert und damit die Caspase-Kaskade und letztlich der Zelltod ausgelöst (Yeretssian et al., 2009; Chowdhury et al., 2008; Krysko et al., 2009).

### 1.4.2 Nekrose

Unter dem Begriff Nekrose wurde bislang die Form des Zelltods beschrieben, die weder Merkmale der Apoptose (Abschnitt 1.4.1) noch von Autophagie (Abschnitt 1.4.4) aufweist und über exogene Stressfaktoren (extreme Hitze oder Kälte, Sauerstoffmangel, toxische Substanzen, Nährstoffmangel) ausgelöst wird. Morphologische Charakteristika der Nekrose sind ein Anschwellen der zytoplasmatischen Organellen, Kondensation des Chromatins in runde, unregelmäßige Flecken sowie das Anschwellen der Zelle (Onkose), infolgedessen es zur Ruptur der Zellmembran und somit zum Aufplatzen der Zelle kommt. Die Ausschüttung des Zellinhalts in das extrazelluläre Milieu verursacht eine Inflammationsreaktion des umliegenden Gewebes. Eine Beteiligung des nekrotischen Zelltods bei verschiedenen pathologischen Krankheiten wie Schlaganfall, Ischämie und einiger neurodegenerativer Krankheiten wurde nachgewiesen (Han et al., 2008; Golstein & Kroemer, 2006; Fink et al., 2005). Neuere Studien konnten zeigen, dass es sich, nicht wie bislang angenommen, bei der Nekrose um eine zufällige unkontrollierte Form des Zelltods handelt, sondern dass diese Form des Zelltods über ein Set verschiedener Signalwege und katabolischer Mechanismen reguliert wird. Eine Beteiligung der Toll-like-Rezeptoren (TLR), die Aktivierung von Proteasen wie Cathepsin und Calpain sowie der RIP-Kinase 1 wurde bereits beschrieben (Festjens et al., 2006). Eine spezielle Form der kontrollierten Nekrose, Nekroptose genannt, wird in Abschnitt 1.4.3 näher erläutert.

### 1.4.3 Zwischenformen des apoptotischen bzw. nekrotischen Zelltods

#### Pyroptose

Pyroptose, auch Caspase-1 abhängiger Zelltod genannt, beschreibt eine spezielle Art des Zelltods, der morphologische Kennzeichen von Apoptose als auch Nekrose aufweist und hauptsächlich inflammatorischer Art ist. Dieser Mechanismus wurde erstmalig nach mikrobieller Infektion von Makrophagen beschrieben und dient als Verteidigungsmechanismus des Wirts gegen intrazelluläre Erreger wie Salmonellen oder Listerien (Lara-Tejero et al., 2006; Tsuji et al., 2004). Neben infektiösen Stimuli konnte aber auch pyroptotischer Zelltod durch freigesetzte Faktoren nach einem Myokard-Infarkt gezeigt werden (Frantz et al., 2003). Dieser Prozess ist streng Caspase-1 abhängig, welche nach Aktivierung der Pro-Caspase und Ausbildung eines Inflammasom-Komplexes die Prozessierung und Sekretion der proinflammatorischen Stimuli IL-1 $\beta$  und IL-18 reguliert. Hauptkennzeichen der Pyroptose sind der Verlust der Integrität der Plasmamembran sowie die Sekretion von IL-1 $\beta$  und IL-18. Typische Apoptose-Marker wie eine Beteiligung der Caspasen 3, 6 und 8 sowie die Spaltung von PARP (Poly [ADP-Ribose] Polymerase 1) und ICAD (Inhibitor der Caspase-aktivierten Desoxyribonuklease) können nicht gefunden werden. Typisch ist allerdings die Kondensation und Spaltung der DNA bei intakter Kernmembran, wobei ein Apoptose-untypisches Spaltmuster von einer bislang unbekanntem Endonuklease erzeugt wird. Die Caspase-1 vermittelte Porenformation in der Zellmembran führt zur Zerstörung von Ionengradienten, wodurch es über gesteigerten osmotischen Druck zum Einstrom von Wasser und dem daraus resultierendem Anschwellen der Zelle und schließlich zu deren Lyse kommt (Fink et al., 2006). Eine Beteiligung der Toll-Like Rezeptoren (TLR) an der Signalvermittlung sowie der Nod-like Rezeptoren (NLR) bei der Ausbildung der Inflammasom-Komplexe (Nalp1 - Nalp3) konnte ebenfalls schon gezeigt werden (Bergsbaken et al., 2009; Bortoluci et al., 2010; Labbé et al., 2008).

#### Nekroptose

Der Begriff Nekroptose beschreibt eine spezielle Form des geregelten Zelltods durch Nekrose (siehe Abschnitt 1.4.2). Erstmals wurde 1988 gezeigt, dass nach Stimulation mit TNF $\alpha$  in verschiedenen Zellen sowohl Apoptose als auch Nekrose ausgelöst wurde (Laster et al., 1988). Die Aktivierung der kontrollierten Nekroptose verläuft nach Bindung an den TNF-Rezeptor über die Rekrutierung und Aktivierung von RIP-Kinase 1 (RIPK1) und RIP-Kinase 3 (RIPK3) infolgedessen es zur Membran-Desintegration der Mitochondrien, Lysosomen und der Zelle kommt. Die RIPK-Aktivität wird dabei über Spaltung durch Caspase 8 reguliert, die für das Einleiten der Apoptose zuständig ist (Holler et al., 2000). Für einige Zelltypen konnte gezeigt werden, dass nach TNF $\alpha$  Gabe und Einsatz eines Caspase-Inhibitors Nekrose anstelle von Apoptose ausgelöst wurde (Vandenabeele et al., 2010; Degterev et al., 2008; Verkammen et al., 1998).

#### 1.4.4 Autophagie

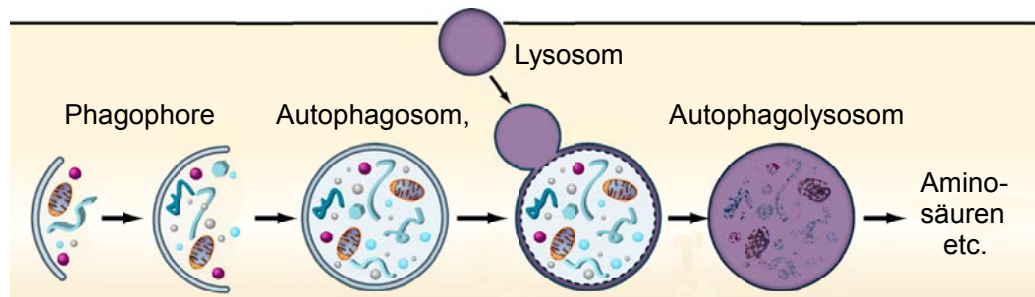
Autophagie beschreibt einen evolutionär konservierten Mechanismus der Zelle, der zum lysosomalen Abbau von Organellen bzw. Komponenten des Zytosols führt. Diese werden in Vesikeln mit Doppelmembran (Autophagosomen) eingeschlossen und nach Fusion der Autophagosomen mit den Lysosomen (Autophagolysosomen) enzymatisch abgebaut. Unter normalen Bedingungen wird über den Autophagie-Mechanismus der Erhalt der intrazellulären Homöostase durch den Abbau geschädigter Zellorganellen oder Proteinen erhalten. Unter Stressbedingungen, wie z.B. Nährstoffmangel, Entzündung oder Infektionen mit intrazellulären Bakterien, Viren oder Parasiten, werden zum einen durch den Abbau zytosolischer Bestandteile lebenswichtige Reserven für die Zelle geschaffen bzw. intrazelluläre Erreger elimiert und das Überleben der Zelle gesichert. Bei exzessivem Auftreten von Autophagie kann es aber auch zum Zelltod kommen (Deretic et al., 2009; Kroemer et al., 2010; Kroemer et al., 2008; Glick et al., 2010). Neben den Autophagie-auslösenden Stimuli wie Nährstoffmangel oder Immunstress kann Autophagie auch durch Nanopartikel ausgelöst werden. Untersuchungen von Li und Kollegen (Li et al., 2010) konnten nach Behandlung von MRC-5 Zellen mit 20 nm Goldnanopartikeln Autophagie-Marker sowie auch einen Zusammenhang mit oxidativem Stress nachweisen. Es wurde spekuliert, dass der Einschluss der Partikel in Autophagosomen die Zellen vor dem Partikel-induzierten oxidativen Stress schützen sollte. Studien von Seleverstov et al. zeigten auch eine größenabhängige Induktion von Autophagie nach Behandlung von humanen mesenchymalen Stammzellen mit Quantum Dots (Seleverstov et al., 2006).

Es wird zwischen drei Formen der Autophagie, Makroautophagie, Mikroautophagie und Chaperon vermittelter Autophagie, unterschieden. Makroautophagie, oft auch nur mit Autophagie bezeichnet, wurde schon im vorangegangenen Abschnitt erläutert. Mit dem Begriff Mikroautophagie wird die direkte Aufnahme der abzubauenen zytosolischen Komponenten in die Lysosome beschrieben, während bei Chaperon-vermittelter Autophagie die Zielkomponenten zusammen in einem Chaperon-Komplex durch die lysosomale Membran translozieren (Mizushima et al., 2010). Der Ablauf des Autophagie-Prozesses sowie daran beteiligte Signalwege werden im nächsten Abschnitt genauer erläutert.

#### Ablauf der Autophagie und beteiligte Signalwege

Einer der Hauptregulatoren der Autophagie ist die Kinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*) sowie auch der an der Aktivierung des Autophagie-Prozesses beteiligte PI3-Kinaseweg. Unter physiologischen Bedingungen ist nur eine geringe basale Autophagie-Aktivität zu finden, was von der Hemmung der Kinase ATG1 (*autophagy related protein 1*) durch die Serin/Threonin-Kinase mTOR herrührt. Unter Stressbedingungen kann dann durch Inhibierung von mTOR Autophagie über ATG1 ausgelöst werden. Der Ablauf des Autophagie-Prozesses lässt sich in die Phasen Initiation, Elongation und Reifung unterteilen. Zunächst erfolgt

die Ausbildung einer Isolationsmembran (Phagophore) ausgehend vom Endoplasmatischen Retikulum (ER), der äußeren Mitochondrien-Membran oder auch der Plasmamembran unter Beteiligung des Klasse-3 PI3-Kinase Komplexes. Weitere ATG-Proteine sind an der Vermittlung der Elongation beteiligt, wobei LC3 (eukaryotisches Homolog zu ATG8) während des Aufbaus des Autophagosoms proteolytisch am C-Terminus gespalten wird (LC3-I) und dann zusammen mit Phosphatidylethanolamin in der Phagophore gebunden wird (membrangebundenes LC3-II). LC3 wird daher als spezifischer Marker für das Vorhandensein von Autophagosomen verwendet. Im letzten Schritt, der Reifung, fusionieren dann die Autophagosomen mit den Lysosomen zu Autophagolysosomen, wobei die innere Membran des Autophagosoms abgebaut wird. Im Anschluss können dann die im Autophagosom enthaltenen Komponenten durch die lysosomalen Enzyme degradiert werden (He & Klionsky, 2009; Kroemer et al., 2010; Glick et al., 2010). In Abb. 1.3 ist der schematische Ablauf der Autophagie-Prozesse dargestellt.



adaptiert von Mizushima et al., Cell, 2010

**Abbildung 1.3: Übersicht über den Ablauf der Vorgänge bei der Autophagie.** Dargestellt ist der schematische Ablauf der grundlegenden Vorgänge bei der Autophagie (adaptiert von Mizushima 2010). Nähere Erläuterungen siehe Text.

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Bislang gibt es zur toxikologischen Bewertung von Substanzen, die mittels Inhalation in den menschlichen Körper gelangen können, noch keine anerkannten Ersatzmethoden für Tierversuche (Aufderheide et al., 2005). Solche Substanzen / Partikel können entweder absichtlich in Form von Zigarettenrauch oder Medikamenten, oder auch unbeabsichtigt durch Emissionen aus Industrie und Verkehr, Passivrauchen oder Staubbelastungen am Arbeitsplatz in die Atemluft und so in den Körper gelangen. Aus epidemiologischen Studien ist bereits bekannt, dass die Inhalation solcher Stäube zu einer erhöhten Mortalität und Morbidität geführt hat (Pope et al., 2002; Dockery et al., 2005; Atkinson et al., 2001).

Synthetische Nanopartikel (NP), insbesondere unlösliche, besitzen aufgrund ihrer neuartigen physikalischen und chemischen Eigenschaften ebenso das Potential, sich schädlich auf Mensch und Umwelt auszuwirken (Oberdörster et al., 2005; Nel et al., 2006). Bislang wird das Risikopotential neuer, industriell hergestellter Nanopartikel nach Inhalation fast ausschließlich in Tierversuchen durch Inhalation bzw. Instillation der Testsubstanzen ermittelt. Die Verwendung von *in vitro* Messungen direkt an der Partikelquelle wird angestrebt, jedoch erschweren bzw. verhindern die häufig sehr geringen Partikelkonzentrationen die Messung der biologischen Effekte.

Das Ziel dieser Arbeit war, den Mechanismus der zellulären Antwort nach Exposition mit Nanopartikeln auf zellulärer und molekularer Ebene aufzuklären. Als geeignetes Modellsystem für die Untersuchungen wurde die murine Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 eingesetzt, welche im Vergleich mit humanen primären Makrophagen ähnliche Reaktionen nach Exposition mit Umweltpartikeln zeigten (Fritsch-Decker, 2008). Als Modellpartikel wurden zunächst SiO<sub>2</sub> und TiO<sub>2</sub> NP in Submerskultur getestet, um davon ausgehend die genaueren Untersuchungen auf die wirksamste Partikelsorte zu konzentrieren. Die 12 nm SiO<sub>2</sub> NP erwiesen sich als hoch wirksam und wurden deshalb für die mechanistischen Untersuchungen eingesetzt.

Als mögliche Endpunkte für die partikulären Wirkungen auf zellulärer und molekularer Ebene sollten die Zytotoxizität, Proliferation und Apoptose, Aktivierung von Signalwegen der antioxidativen und proinflammatorischen Zellantwort sowie die Aufnahme der Partikel in die Zelle untersucht werden. Es ist bereits bekannt, dass die Inhalation von bestimmten Partikeln zu Entzündungsreaktionen in der Lunge führt und die Partikel oxidativen Stress auslösen können. Daher standen die Signalwege der MAP-Kinasen sowie die Transkriptionsfaktoren AP-1 und Nrf2 im Fokus der Arbeit. Wichtige Fragestellungen hierbei waren, wie die Aktivierung der MAP-Kinasen erfolgt und wodurch die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und Nrf2 vermittelt wird. Zur Aufklärung dieser Mechanismen sollten zum einen die Aktivierung beteiligter Kinasen bzw. Transkriptionsfaktoren durch Nachweis der Phosphorylierung oder Anreicherung der Proteine mittels Western Blot Analyse untersucht werden und zum anderen sollte über qRT-PCR-Analyse eine veränderte Genexpression ausgewählter Zielgene der

verschiedenen Signalwege festgestellt werden. Zur genaueren Aufklärung der verschiedenen Mechanismen sollten spezifische Inhibitoren der jeweiligen Signalwege verwendet werden. Desweiteren sollte die Aufnahme der Partikel in die Zellen mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen analysiert werden. Ein automatisierter Fluoreszenzmikroskopie-basierter Screening Assay wurde für die Applikation mit Nanopartikeln weiterentwickelt und damit der Zelltod nach Partikel-Exposition untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit sollten nun zusammengefasst folgende Fragen beantwortet werden.

- Welche Effekte sind auf zellulärer und molekularer Ebene nach Exposition mit synthetischen SiO<sub>2</sub> Nanopartikeln zu beobachten?
  - Aufnahme der Partikel in die Zelle
  - Zytotoxizität, Proliferation, Apoptose
  - Aktivierung von Signalwegen der anti-oxidativen und proinflammatorischen Antwort
- Welche Signalwege werden nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition aktiviert und wie werden diese reguliert?
  - MAP-Kinasen
  - Transkriptionsfaktoren Nrf2 & AP-1

Die Ergebnisse dieser Studie sollen in die Weiterentwicklung eines *in vitro* Testsystems für die Bewertung des toxikologischen Potentials von Aerosolen einfließen.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Feinchemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben von Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe bezogen.

Chemikalien	Bezugsquelle
Acrylamid/Bis-Acrylamid (30/0,8)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Casy <sup>®</sup> ton	Schärfe Systems, Reutlingen
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
H <sub>2</sub> DCF-DA (2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
ECL-Lösung	GE Healthcare, Freiburg
ECL PLUS <sup>™</sup> Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, Freiburg
Entwickler und Fixierer	Kodak GmbH, Stuttgart
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
HBSS	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Hoechst33258	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

*weiter auf der nächsten Seite*

Chemikalien	Bezugsquelle
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
PBS (1x) steril	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
®Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
®Tween 20	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Agarose	PeqLab, Erlangen
Ethidiumbromid	PeqLab, Erlangen
PeqGOLD	PeqLab, Erlangen
Glykogen	PeqLab, Erlangen
dNTPS	PeqLab, Erlangen

**Tabelle 2.1:** Verwendete Chemikalien und Bezugsnachweise

### 2.1.2 Inhibitoren

Die verwendeten Inhibitoren bzw. Neutralisierungs-Antikörper sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Inhibitoren	Bezugsquelle
N-Acetyl-L-Cystein (NAC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SB203580 (4-(4-Fluorophenyl-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazol)	Merck KGaA, Darmstadt
SP600125 (anthra-(1,9-cd)pyrazol-6(2H)-one)	Merck KGaA, Darmstadt
PD98059 (2'-Amino-3'-methoxyflavon)	Merck KGaA, Darmstadt
zVAD-fmk (pan-Caspase Inhibitor)	Enzo Life Sciences, Lörrach
anti-TNF $\alpha$ Neutralisierungs-Antikörper	R&D Systems, Wiesbaden

**Tabelle 2.2:** Übersicht verwendete Inhibitoren

### 2.1.3 Antikörper

Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2.3 aufgeführt.

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>Primäre Antikörper</b>		
anti-PCNA (PC-10)	1:5.000	Santa Cruz, Heidelberg
anti-ERK1 (K-23)	1:1.000	Santa Cruz, Heidelberg
anti-HO-1 (H-105)	1:2.000	Santa Cruz, Heidelberg
anti-cJun (H-79)	1:1.000	Santa Cruz, Heidelberg
anti-Nrf2 (C-20)	1:2.000	Santa Cruz, Heidelberg
anti-JNK2 (D2)	1:1.000	Santa Cruz, Heidelberg
anti-LaminB (M-20)	1:1.000	Santa Cruz, Heidelberg
anti-COX2	1:1.000	Cayman Chemical Company, USA
anti-MKK3/6 (H-90)	1:1.000	Santa Cruz, Heidelberg
anti-MEK1/2 (12-B)	1:1.000	Santa Cruz, Heidelberg
anti-MKK7 (H-160)	1:1.000	Santa Cruz, Heidelberg
anti-p38 (C-20)	1:1.000	Santa Cruz, Heidelberg
anti-PARP1/2 (H-250)	1:1.000	Santa Cruz, Heidelberg
anti-LC3 (B)	1:1.000	Cell Signalling, Frankfurt
anti-MK2	1:1.000	Cell Signalling, Frankfurt
anti-Caspase 3 Cleavage (Asp175)	1:400	Cell Signalling, Frankfurt
anti-TNF $\alpha$ (ab66579)	1:1.000	AbCam, Cambridge, UK
anti-SEK1 (H-98)	1:1.000	Santa Cruz, Heidelberg
<b>Primäre phosphospezifische Antikörper</b>		
anti-phospho p38 (Thr180/Tyr182)	1:1.000	Cell Signalling, Frankfurt
anti-phospho ERK1/2 (Th202/Tyr204)	1:1.000	Cell Signalling, Frankfurt
anti-phospho JNK1/2 (Thr183/Tyr185)	1:1.000	Cell Signalling, Frankfurt
anti-phospho MKK3/6 (Ser189/207)	1:1.000	Cell Signalling, Frankfurt
anti-phospho MEK1/2 (Ser217/221)	1:1.000	Cell Signalling, Frankfurt
anti-phospho MKK4 (Thr261)	1:1.000	Cell Signalling, Frankfurt
anti-phospho MKK7 (Ser271/Thr275)	1:1.000	Cell Signalling, Frankfurt
anti-phospho cJun (Ser63)	1:1.000	Cell Signalling, Frankfurt
anti-phospho MK2 (Thr334)	1:1.000	Cell Signalling, Frankfurt
<b>Sekundäre Antikörper</b>		
anti-mouse-HRP	1:5.000	DakoCytomation GmbH, Hamburg

*weiter auf der nächsten Seite*

Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
anti-rabbit-HRP	1:5.000	DakoCytomation GmbH, Hamburg
anti-goat-HRP	1:5.000	DakoCytomation GmbH, Hamburg
anti-rabbit IRDye-700	1:5.000	Biomol, Hamburg
anti-mouse IRDye-800	1:10.000	Biomol, Hamburg

Tabelle 2.3: Verwendete Antikörper

### 2.1.4 Laborgeräte und Programmsoftware

Die eingesetzten Laborgeräte und die verwendete Programmsoftware sind in Tabelle 2.4 aufgelistet.

Laborgeräte und Programmsoftware	Bezugsquelle
Absorptionsspektrometer	Molecular Devices, Ismaning
Brutschrank	CO <sub>2</sub> -Auto-Zero WTB Binder Labortechnik, Tuttlingen
Casy <sup>®</sup> 1 Cell Counter	Schärfe Systems, Reutlingen
Mini-Protean Gelelektrophorese-System	BioRad, München
Mini-Transblot System	BioRad, München
Electrophoresis Power Supply EPS 500/400	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Mikrotiterplatten-Waschgerät	Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, USA
Fluoreszenzspektrometer	Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, USA
Kühlzentrifuge Centrifuge 5415 C	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrotiterplatten-Zentrifuge	Hettrich GmbH, Tuttlingen
Odyssey <sup>®</sup> Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences, Nebraska, USA
Odyssey <sup>®</sup> Software	LI-COR Biosciences, Nebraska, USA
OptiQuant Acquisition & Analysis Software	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 Multiporator, Sonifier <sup>®</sup>	Branson, Danbury, USA
Fluoreszenzmikroskop IX81	Olympus, Hamburg
Thermoblock Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Scan <sup>®</sup> Analysis Software	Olympus, Hamburg

*weiter auf der nächsten Seite*

Laborgeräte und Programmsoftware	Bezugsquelle
Spektralphotometer Nanodrop ND-1000	Peqlab, Erlangen
ABI StepOne Plus	Applied Biosystems AB, Darmstadt
PCR Primus 96 Thermocycler	Peqlab, Erlangen
UV Transilluminator	PeqLab
DNA Gelkammer	VWR, Bruchsal

Tabelle 2.4: Verwendete Laborgeräte und Programmsoftware

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Die Zellkultur- und Plastikwaren wurden von Greiner Labortechnik (Nürtingen) sowie die Zellschaber von Techno Plastic Products, Trasadingen (CH) bezogen.

#### Kultivierung der Zellen

Bei der RAW264.7 Zelllinie (bezogen von LCG Standards-ATCC, USA) handelt es sich um eine adhärenz 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 Zellen produzieren keine Retroviren, besitzen charakteristische Merkmale von Makrophagen (Migration, Phagozytose)(Raschke et al., 1978) und die Abwesenheit von Mykoplasmen wurde ebenfalls geprüft. Die Zellen zeigen eine Verdopplungszeit von ungefähr 24 h und werden in DMEM-Medium supplementiert mit 10 % FCS und 0.5 % Penicillin/Streptomycin (100 U/ml) im Brutschrank bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchte und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Zur Passage werden die Zellen nach Erreichen einer Konfluenz von 80-90 % vom Boden der Kulturflasche abgeschabt, vereinzelt und die Zellkonzentration mittels CASY Cell Counter bestimmt. Die Weiterpassage erfolgt alle 3-4 Tage.

Medium/Zusatz	Bezugsquelle
DMEM (Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium)	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Fötales Kälber Serum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
PBS-CaCl <sub>2</sub> /-MgCl <sub>2</sub>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Tabelle 2.5: Verwendete Zellkulturmedien und Zusätze

### **Bestimmung der Zellzahl**

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt mit dem CASY-Cell Counter (Schärfe Systems, Reutlingen). Hierfür wird die Zellsuspension 1:1000 in Casyton verdünnt und die Lebendzellzahl bestimmt. Das Messprinzip basiert dabei auf der Widerstandsmessung der Membran der Zellen, wodurch sich lebende von toten Zellen unterscheiden lassen.

### **Langzeitkonservierung und Auftauen von Zellen**

Zur Langzeitkonservierung werden die Zellen bei  $-196\text{ °C}$  in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dafür werden die Zellen zunächst wie beschrieben vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und die Zellzahl bestimmt. Eine entsprechende Menge Zellen wird im nächsten Schritt in ein steriles Bluecap transferiert und bei  $350\text{-g}$  für  $5\text{ min}$  zentrifugiert. Dann wird der Überstand entfernt, die Zellen in Einfriermedium (Kulturmedium mit  $10\%$  DMSO) resuspendiert und in Kryogefäße überführt. Damit die Zellen langsam eingefroren werden, werden sie zunächst  $30\text{ min}$  auf Eis gelagert und dann in einem Einfriergefäß (Nalgene<sup>TM</sup>, Labware, USA) mit kaltem Isopropanol bei  $-80\text{ °C}$  ü.N. gelagert. Nach 1-2 Tagen werden die Kryogefäße in den Stickstofftank überführt.

Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen, werden die Kryogefäße in einem  $37\text{ °C}$  Wasserbad schnell aufgetaut, in ein Bluecap mit vorgewärmten Medium transferiert und nach Zentrifugation das DMSO vollständig entfernt. Nach Resuspension mit frischem, vorgewärmten Medium wird die Zellsuspension in eine frische, mit Kulturmedium versetzte, Zellkulturflasche überführt. Nach Anheften der Zellen wird das Medium gewechselt und die Zellen wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben kultiviert.

## **2.2.2 Behandlung von Zellen**

### **Herstellung der Partikel-Suspension**

Am Behandlungstag werden die Partikel-Suspensionen immer frisch hergestellt, da Alterungsprozesse eine längerfristige Lagerung nicht erlauben. Zu Beginn werden jeweils  $10\text{ mg}$  Partikel in ein  $15\text{ ml}$  Bluecap eingewogen und dann eine Stammlösung von  $10\text{ mg/ml}$  in sterilem PBS<sup>-/-</sup> hergestellt. Nach Vortexen der Partikelsuspension für ca.  $15\text{ sec}$  wird diese mit einem Ultraschallgerät (Branson Sonifier, USA) behandelt. Dazu wird die Mikrospritze aus Titan in die Partikellösung eingetaucht und mit  $30\text{ Pulsen}$  von einer Sekunde Dauer beschallt (output control  $50\%$ , duty cycle  $8$ ). Ein Aufschäumen der Suspension wird dabei vermieden. Von dieser fertigen Stammsuspension wird dann eine Arbeitslösung ( $1\text{ mg/ml}$ ) im entsprechenden Medium hergestellt und davon ausgehend die gewünschten Verdünnungen für die Exposition der Zellen erstellt. Durch zwischenzeitliches Vortexen wird ein Absetzen der Partikel verhindert.

Partikel	Bezugsquelle
SiO <sub>2</sub> A200	Evonik, Frankfurt
SiO <sub>2</sub> O×50	Evonik, Frankfurt
TiO <sub>2</sub> P25	Evonik, Frankfurt
Carbon Black (CB14)	Evonik, Frankfurt
Cadmiumoxid (CdO)	Merck KGaA, Darmstadt

**Tabelle 2.6:** Verwendete Partikel und Nanomaterialien

### Behandlung der Zellen mit Partikeln

Am Vortag der Behandlung werden die Zellen in den entsprechenden Kulturgefäßen mit einer Konfluenz von 60-70 % in Medium mit 10 % FCS ausgesät. In Tabelle 2.7 sind die verwendeten Kulturgefäße mit den entsprechenden Zelldichten und Behandlungsvolumina aufgeführt.

Kulturgefäß	Kulturfläche	ausgesäte Zellzahl	Behandlungsvolumen
6-well	9,6 cm <sup>2</sup>	2×10 <sup>6</sup>	3 ml
3 cm Petri-Schale	9,6 cm <sup>2</sup>	2×10 <sup>6</sup>	3 ml
24-well	2,0 cm <sup>2</sup>	3×10 <sup>5</sup>	625 µl
96-well	0,32 cm <sup>2</sup>	5×10 <sup>4</sup>	100 µl

**Tabelle 2.7:** Verwendete Zelldichten für die Versuche

Zunächst wird das Kulturmedium vollständig abgenommen und durch das entsprechende Behandlungsmedium (-/+ 10 % FCS, -/+ Inhibitor) ersetzt. Dabei wird zunächst die Hälfte des Behandlungsvolumens vorgelegt und dann die Zellen mit den hergestellten Partikel-Verdünnungen (2-fach konzentriert) exponiert. Um ein Absetzen der Partikel zu vermeiden, wird direkt vor jeder Behandlung die Partikelsuspension nochmals für 10-15 s gevortext. Nach der entsprechenden Inkubationszeit werden die Zellen bzw. der Kulturüberstand für die entsprechenden Versuche weiterprozessiert. Bei der Behandlung mit den Partikeln wurden die eingesetzten Volumen- und Flächenkonzentrationen für alle Kulturgefäße konstant gehalten. Die entsprechenden Volumen- und Flächenkonzentrationen sind in Tabelle 2.8 zusammengefasst.

Bei Behandlung der Zellen mit Partikeln und Inhibitoren werden die Zellen zunächst für 30 min bei 37 °C mit dem Inhibitor bzw. dem entsprechenden Lösungsmittel (Medium oder DMSO) vorbehandelt (Tabelle 2.9) und die Verdünnungen der Partikel in Medium mit und ohne Inhibitor angesetzt. Die Behandlung wird dann wie schon beschrieben durchgeführt.

Volumenkonzentration	Flächenkonzentration
[ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]	[ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]
1	0,32
5	1,6
10	3,1
50	15,6
100	31,3
200	62,5

Tabelle 2.8: Vergleich Volumen- und Flächenkonzentrationen

Inhibitor	Konzentration
SB203580	10 $\mu\text{M}$
SP600125	10 $\mu\text{M}$
PD98059	10 $\mu\text{M}$
zVAD-fmk	50 $\mu\text{M}$
N-Acetyl-Cystein	5 mM
$\alpha$ -TNF $\alpha$ Neutralisierungs-Antikörper	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Tabelle 2.9: Endkonzentrationen der eingesetzten Inhibitoren

### 2.2.3 Zytotoxizitäts-Assays

#### WST-1

Mittels WST-1 Assay kann die mitochondriale Aktivität (MA) von Zellen bestimmt werden. Der Assay beruht auf der Umsetzung des Tetrazoliums Salzes WST-1 durch mitochondriale Succinatdehydrogenasen stoffwechselaktiver, vitaler Zellen, so dass ein wasserlösliches, gelbes Formazansalz entsteht. Dieser Farbumsatz kann dann am Absorptionsspektrometer gemessen werden. Die Intensität des Farbumschlags ist dabei proportional zur Stoffwechselaktivität der Zellen und somit auch der Zellzahl.

Der Test wird mit dem Proliferations-Reagenz WST-1 (4-(3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benzene disulphonat)) der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wird im Anschluss an die Behandlung der Kulturüberstand abgenommen, durch 200  $\mu\text{l}$  WST-1 Lösung (1:20 in HBSS verdünnt) ersetzt und für 1 - 2 h im Brutschrank bei 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die optische Dichte kann dann am Absorptionsspektrometer bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden. Der Test findet im 96-well Format statt und jeder Ansatz wird im Quadruplikat gemessen. Die mitochondriale Aktivität (MA) wird nach der unten stehenden Formel berechnet.

$$\text{Mitochondriale Aktivität [MA]}(\%) = \frac{\text{Kontrolle}}{\text{Probe}} \cdot 100$$



## LDH-Assay

Mithilfe des LDH-Assays kann die Zytotoxizität von Substanzen über die Freisetzung der Lactat-Dehydrogenase (LDH) der behandelten Zellen bestimmt werden. Das Testprinzip basiert darauf, dass nur bei toten Zellen die Zellmembran permeabel und das ansonsten im Zytosol lokalisierte Enzym LDH in den Kulturüberstand abgegeben wird. Der Nachweis freigesetzter LDH im Kulturüberstand basiert auf der Umwandlung eines schwach gelben Tetrazoliumsalzes zu rotem Formazan. Dabei katalysiert die LDH zunächst die Oxidation von Laktat zu Pyruvat mit gleichzeitiger Reduktion von  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}+\text{H}^+$ . Über die Protonenübertragung von  $\text{NADH}+\text{H}^+$  auf das Tetrazoliumsalz findet dann die Umwandlung in das rote Formazan statt. Die Intensität der Rot-Färbung ist dabei proportional zur LDH-Aktivität der Probe, d.h. je höher die Intensität der Rotfärbung, desto zytotoxischer war die erfolgte Behandlung. Der Test mit dem Cytotoxicity Detection Kit Plus (Roche) wird nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Behandlung erfolgt im 96-well Format und jeder Ansatz wird im Quadruplikat durchgeführt. Nach Abstoppen der Reaktion wird die Farbumsetzung am Absorptionsspektrometer bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die Berechnung der LDH Freisetzung (% Positivkontrolle Triton-X 100) erfolgt nach der unten stehenden Formel.

$$\text{LDH-Freisetzung (\% Triton-Kontrolle)} = \frac{\text{Positivkontrolle}}{\text{Probe}} \cdot 100$$

### 2.2.4 ROS-Messung mittels DCF-Assay

Intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies (ROS) können mit Hilfe des DCF-Assays nachgewiesen werden. Das ungeladene, nicht-fluoreszierende  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  (2',7'-Dichlorodihydro-fluorescein Diacetat) kann durch die Zytoplasmamembran in die Zelle diffundieren und wird dort von unspezifischen Esterasen deacetyliert. So entsteht  $\text{H}_2\text{DCF}$  (Dichlorodihydrofluorescein), welches aufgrund seiner Ladung die Zelle nicht wieder verlassen kann. In Gegenwart von Peroxidase /  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{O}_2\text{R}$ ,  $\cdot\text{OR}$ ,  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{HOCl}$  sowie  $\text{ONOO}^-$  wird der Farbstoff zu fluoreszierendem DCF (Dichlorofluorescein) oxidiert. Die so entstandene Fluoreszenz ist zellgebunden und kann dann am Fluoreszenzspektrometer gemessen werden.

Der DCF-Assay wird im 96-well Format in Vierfachbestimmungen durchgeführt. Dazu wird im Anschluss an die Behandlung (4 h, 24 h) der Kulturüberstand abgenommen, die Zellen mit HBSS gewaschen und dann für 40 min mit 50  $\mu\text{l}$  der  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ -Lösung (50  $\mu\text{M}$  in HBSS) im Brutschrank bei 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Zum Entfernen von überschüssigem  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  werden die Zellen zweimal mit HBSS gewaschen, 100  $\mu\text{l}$  HBSS zugegeben und nach 0 h, 1 h und 2 h die Fluoreszenz am Fluoreszenzspektrometer nach Anregung bei 488 nm bei einer Wellenlänge von 530 nm gemessen. Die Zunahme der Fluoreszenz wird nach der unten stehenden Formel berechnet und als % der Kontrolle angegeben.

$$\text{DCF-Intensität (\% Kontrolle)} = \frac{\text{Kontrolle}}{\text{Probe}}$$

## 2.2.5 Proteinanalytik

### Herstellung von Gesamtzell-Lysaten

Nach Beendigung einer Behandlung der Zellen wird das Medium abgenommen, die Zellen direkt in 300  $\mu$ l Lysepuffer (Tabelle 2.10) (bei 3 cm Zellkulturschalen) von der Kulturschale abgelöst und in ein Eppendorfreaktionsgefäß transferiert. Die Menge des Lysepuffers wird für kleinere Kulturschalen entsprechend angepasst. Die Lysate werden für 5 min bei 95 °C gekocht, anschließend die DNA mit Hilfe eines Ultraschallgeräts (Branson Sonifier, USA) für 15 sec zerkleinert und bei 15.000-g zentrifugiert. Danach können die Proben entweder direkt auf das SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen oder bis zur weiteren Verwendung kurzfristig bei –20 °C oder längerfristig bei –80 °C gelagert werden.

4x Lysepuffer	
1M Tris pH 6,8	12.5 ml
H <sub>2</sub> O	17.5 ml
Glycerin	20 ml
SDS	4 g
Bromphenolblau	25 mg
$\beta$ -Mercaptoethanol	10 %

**Tabelle 2.10:** Zusammensetzung des Lysepuffers

### SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

In einem diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gel können Proteine elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Hierfür wird ein Laufgel verwendet, welches aus einem 4 % Sammelgel und einem Trenngel (6 %, 10 % oder 15 %) (siehe Tabelle 2.11) je nach Größe der aufzutrennenden Proteine besteht. Im zuerst durchlaufenen Sammelgel werden die Proben zunächst konzentriert und im sich anschließenden Trenngel in scharfe Banden aufgetrennt. Zur Auftrennung der Proteine wird ein vertikales Gelelektrophoresesystem (Bio-Rad, München) mit dem Laufpuffer (Tabelle 2.12) bei einer Spannung von 170 V für 50 - 60 min verwendet. Zur Größenbestimmung der Proteinbanden wird zusätzlich ein Größenmarker (PageRuler, Fermentas) mit auf das Gel aufgetragen.

### Western Blot

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Verfahren, das Enhanced Chemiluminescence (ECL) Detektierungssystem und das Odyssey<sup>®</sup> Infrared Imaging System, eingesetzt, um zelluläre Proteine nachzuweisen. Das in dieser Arbeit verwendete Odyssey<sup>®</sup> Infrared Imaging System kann für zwei unterschiedliche Farbstofftypen verwendet werden, die verschiedene Anregungs-

	4 % Sammelgel	10 - 15 % Trenngel
Rotiphorese	4 %	10-15 %
Tris-HCl pH 6,8	125 mM	
Tris-HCl pH 8,8		375 mM
SDS	0.1 %	0.1 %
APS	0.1 %	0.1 %
TEMED	0.01 %	0.01 %

**Tabelle 2.11:** Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels

Laufpuffer	
Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0.1 %

**Tabelle 2.12:** Zusammensetzung des Laufpuffers

und Emissionsmaxima im langwelligen (Infrarot-) Bereich besitzen. Optimal geeignet für dieses System sind z.B. die Fluoreszenzfarbstoffe IRDye700 (Biomol, Anregungsmaximum 685 nm, Emissionsmaximum 710 nm) und IRDye800 (Biomol, Anregungsmaximum 778 nm, Emissionsmaximum 806 nm). Die Farbstoffe können getrennt oder auch gleichzeitig nachgewiesen werden, was eine Detektion unterschiedlicher Protein- Spezies auf einem Blot ermöglicht.

Zum immunologischen Nachweis der aufgetrennten Proteine werden diese auf eine Polyvinylidendifluorid Membran (PVDF, 0.45 µm Porengröße, Millipore GmbH, Schwalbach) transferiert gemäß des Nassblotverfahrens von Herrmann und Wiche (1987). Zunächst wird die PVDF Membran mit 100 % Methanol aktiviert und zusammen mit dem Gel in eine sogenannte Blot-Kassette gepresst. Der Transfer erfolgt in einer gekühlten, mit Blotpuffer gefüllten, Blot-Kammer (Bio-Rad, München) bei 100 V für 60 min. Für das Odyssey-Verfahren wird eine Fluoreszenz-spezifische PVDF-Membran verwendet.

Blotpuffer	
Tris-BASE	25 mM
Glycin	200 mM
Methanol (v/v)	10 %

**Tabelle 2.13:** Zusammensetzung des Blotpuffers

### Immunologischer Nachweis von Proteinen

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wird diese kurz in TBS-Puffer (Tabelle 2.14) gewaschen und anschließend im jeweiligen Blocking-Puffer für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, um freie Proteinbindestellen auf der Membran zu sättigen. Für Odyssey-Blots wird der Licor-Odyssey-Blocking Puffer und ansonsten ein Blockingpuffer bestehend aus 5 % (w/v) Milchpulver in TBS-T (TBS mit 0.1 % Tween) verwendet. Anschließend wird die Membran dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen und dann über Nacht bei 4 °C mit dem jeweiligen Primär-Antikörper inkubiert. Phosphospezifische Antikörper werden in 3 % BSA/ TBS-T verdünnt, während alle restlichen Antikörper in dem jeweiligen Blocking-Puffer zugegeben werden. Nach erfolgter Inkubation werden ungebundene Primär-Antikörper durch dreimaliges Waschen mit TBS-T entfernt und dann die Membranen für 1 h bei Raumtemperatur mit dem jeweiligen Spezies-spezifischen Sekundär-Antikörper (HRP-gekoppelt) in 5 % Milchpulver/ TBS-T inkubiert. Odyssey-Sekundärantikörper sind zur späteren Detektion Fluoreszenz-markiert und werden daher im Dunkeln in Licor-Odyssey-Blocking Puffer zugegeben. Nach erfolgter Bindung werden überschüssige Sekundär-Antikörper durch dreimaliges Waschen für 10 min mit TBS-T entfernt gefolgt von der sich anschließenden Detektion der Protein-Antikörper-Komplexe.

TBS	
Tris-HCl	20 mM
NaCl	150 mM
pH 7,6	

**Tabelle 2.14:** Zusammensetzung TBS-Puffer

### Detektion mittels ECL-System

Die konventionelle Visualisierung der Proteine erfolgt durch Zugabe des Substrats der Peroxidase (ECL, GE Healthcare, Freiburg). Die an den Sekundär-Antikörper gekoppelte Peroxidase katalysiert hierbei die Oxidation von Luminol (ECL-Substrat), so dass ein chemilumineszentes Signal entsteht, welches dann mit Hilfe eines lichtempfindlichen Films detektiert werden kann. Zur Durchführung werden die ECL-Komponenten nach Herstellerangaben gemischt und auf die Membran gegeben. Nach 1 - 2 min Inkubation wird das überschüssige ECL entfernt und die Membran im Dunkeln mit einem Film exponiert. Der Film wird anschließend solange in einer Entwicklungslösung geschwenkt, bis die Proteinbanden sichtbar sind und dann zur Fixierung in ein Fixierbad gegeben.

### Detektion mittels Odyssey-System

Die Detektion der sekundären Antikörper der Odyssey-Blots erfolgt 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.

## Stripping und erneute Antikörperfärbung von Membranen

Das Entfernen (stripping) bzw. Denaturieren gebundener Antikörper von einer PVDF Membran ermöglicht ein mehrmaliges Detektieren von Antigenen. So können z.B. bei Versuchen mit phosphospezifischen Antikörpern die geladene Gesamtproteinmenge mit Hilfe von Antikörpern bestimmt werden, welche die nicht-phosphorylierte Form des Proteins erkennen. Hierzu werden die Membranen für 20 - 30 min bei RT mit Stripping Puffer (Restore™ Western Blot Stripping Buffer, Pierce, Rockford) unter ständigem Schütteln inkubiert und anschließend dreimal mit TBS-T gewaschen. Die nachfolgenden Schritte erfolgen wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben.

### 2.2.6 Proteinnachweis mittels ELISA

Über einen ELISA-Assay (*enzyme linked immunosorbent assay*) können Proteine im Kulturüberstand über ein immunologisches Nachweisverfahren quantitativ erfasst werden. Bei den verwendeten kommerziell erhältlichen ELISA-Kits handelt es sich um Festphasen-Sandwich ELISAs. Dazu wird zunächst ein monoklonaler Antikörper (spezifisch für das Zielprotein) auf eine speziell beschichtete 96-well Platte aufgebracht. Dann werden Proteinstandards und die Proben zugegeben und vorhandenes Zielprotein bindet an den immobilisierten Antikörper. Nach mehreren Waschschritten wird ein polyklonaler, biotinylierter, Zielprotein-spezifischer Antikörper zugegeben, so dass ein Antikörper-Antigen-Antikörper Sandwich entsteht. Nach weiteren Waschschritten erfolgt die Zugabe des Streptavidin-HRP-Konjugats zum späteren enzymatischen Nachweis. Dann wird das chromogene Enzym-Substrat (TMB, ABTS) zugegeben, durch dessen Umsetzung ein Farbumschlag (blau, grün) erfolgt. Dieser ist direkt proportional zur Menge an vorhandenem Antigen. Nach Abstoppen der Enzymreaktion mit Schwefelsäure bzw. SDS kann die Platte dann am Absorptionsspektrometer gemessen und über die Extinktion der aufgetragenen Proteinstandards die vorhandene Proteinmenge berechnet werden (Angabe in pg/ml).

Die ELISAs wurden alle nach Herstelleranleitung durchgeführt. Für die Durchführung des ELISAs wurden 96-well Platten sowie Klebefolie von NUNC (ThermoFischer Scientific) verwendet.

verwendete ELISA-Kits:

- BDOptEIA mouse TNF $\alpha$  (BD Pharmingen, Heidelberg)
- BDOptEIA mouse IL-6 (BD Pharmingen, Heidelberg)
- BDOptEIA mouse IL-1 $\beta$  (BD Pharmingen, Heidelberg)
- KC-ELISA KIT (Peprotech, Hamburg)

## 2.2.7 RNA Analytik

### Isolierung von RNA

Nach erfolgter Behandlung werden die Zellen mit 1 ml peqGOLD RNA-Pure<sup>TM</sup> (PeqLab, Erlangen) direkt in der Kulturschale lysiert und bis zur Isolierung der Gesamt-RNA bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgt nach Hersteller-Anleitung. Die so gewonnene Gesamt-RNA wird in 20  $\mu\text{l}$  DEPC-behandeltem Wasser gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert, um einen möglichen Abbau durch die ubiquitär vorhandenen RNasen zu verhindern. Die Bestimmung der RNA-Gesamt-Konzentration erfolgt durch Messung am UV/VIS-Spektralphotometer (NanoDrop<sup>®</sup> ND-7000 von PeqLab, Erlangen).

### Herstellung cDNA

Zur weiteren Analyse mittels qRT-PCR wird die in der Gesamt-RNA enthaltene mRNA in copy-DNA (cDNA) umgeschrieben. Hierfür wird 1  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA eingesetzt und mittels der Reversen Transkriptase M-MLV1 (Promega, Mannheim) in cDNA umgeschrieben. Die cDNA-Herstellung erfolgt in zwei Schritten, wobei die RNA zunächst mit Zufallshexameren (Random-Primer, 100 pmol) für 5 min bei  $70^{\circ}\text{C}$  inkubiert und dann auf Eis abgekühlt wird. Im nächsten Schritt wird der Reverse Transkriptase-Mix (Promega, Mannheim; Tabelle 2.15) zugegeben und der gesamte Ansatz wie folgt inkubiert.

- 10 min bei  $25^{\circ}\text{C}$
- 60 min bei  $40^{\circ}\text{C}$
- 10 min bei  $70^{\circ}\text{C}$

Reagenzien	pro Ansatz (1 $\mu\text{g}$ RNA)
5x RT-Puffer	4 $\mu\text{l}$
dNTP (10 mM)	2 $\mu\text{l}$
RNAsin [40 u/ $\mu\text{l}$ ]	0,5 $\mu\text{l}$
Reverse Transkriptase [200 u/ $\mu\text{l}$ ]	1 $\mu\text{l}$

**Tabelle 2.15:** Zusammensetzung Reverse Transkriptase - Mix

Nach Abschluss der cDNA-Synthese wird die cDNA mit DEPC-Wasser 1:10 verdünnt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Zum Ausschluss von Verunreinigungen mit genomischer DNA wird jeweils ein Ansatz mit und ohne Reverse Transkriptase erstellt und in einer späteren Kontroll-PCR mit Primern für ein ubiquitär vorkommendes Gen (GAPDH) getestet. Das PCR-Produkt wird dann im Anschluss auf ein 1.5 % Agarose-Gel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und dann mit dem

UV Transilluminator (PeqLab, Erlangen) visualisiert. Die Zusammensetzung des PCR-Mixes (Promega) sowie die Schritte des PCR-Programms sind in Tabelle 2.16 und Tabelle 2.17 dargestellt.

Reagenzien	pro Ansatz
cDNA-Template	5 $\mu$ l
10x GoTaqReaction Buffer	2,5 $\mu$ l
dNTPs (10 mM)	0,5 $\mu$ l
QC-Primer For (10 pM)	1,25 $\mu$ l
QC-Primer Rev (10 pM)	1,25 $\mu$ l
Taq-Polymerase (5u/ $\mu$ l)	0,25 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	14,25 $\mu$ l

**Tabelle 2.16:** Zusammensetzung QC-PCR Mastermix

	Temperatur [°C]	Zeit
Denaturierung	95	2 min
Amplifikation : 24 Zyklen		
Denaturierung	95	30 sec
Annealing	56	30 sec
Elongation	72	1,25 $\mu$ l
↔ zu Schritt 2		
End-Elongation	72	5 min
Pause	8	-

**Tabelle 2.17:** PCR-Programm für QC-PCR

### Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die Analyse der hergestellten cDNA mittels qRT-PCR wird mit dem Gerät ABIStepOnePlus (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt. Es werden für das Gerät kompatible 96-well Platten mit passender optischer Folie verwendet. Pro Ansatz werden 5  $\mu$ l cDNA zusammen mit genspezifischen Primer-Paaren (jeweils 10 pmol) und 10  $\mu$ l 2x PCR-Master-Mix (Quantitect SYBR Green Mix<sup>®</sup>; Qiagen, Hilden) gemischt und im Duplikat gemessen. Die einzelnen Schritte des PCR-Programms sind in Tabelle 2.18 dargestellt.

Die Analyse der Daten wird über die  $\Delta \Delta$  Ct-Methode durchgeführt. Die während der Amplifikation detektierten SYBR-Green Signale werden in einem Amplifikationsplot (SYBR-Green Signal versus PCR-Zyklus) dargestellt und beschreiben eine exponentielle Amplifikationsphase gefolgt von einem Plateau. Der Beginn der exponentiellen Amplifikation wird über einen Threshold festgelegt, der für alle analysierten Gene konstant gehalten wird. Über den Schnittpunkt der Amplifikationskurve mit dem Threshold wird der sogenannte Ct-Wert erhalten.

	Temperatur [°C]	Zeit
Denaturierung	95	15 min
Amplifikation : 40 Zyklen		
Denaturierung	95	15 sec
Annealing & Elongation	60	30 sec
↔ zu Schritt 2		
Denaturierung	95	15 sec
Schmelzkurve	60-95 in 0.5 °C Schritten	1 min
Denaturierung	95	15 sec

**Tabelle 2.18:** Programm für qRT-PCR

Dieser dient zur weiteren Berechnung der Induktion der Genexpression. Dazu wird zunächst eine Normalisierung der untersuchten Gene auf eine endogene Kontrolle durchgeführt und dann die so erhaltenen Werte einer Behandlung mit den Werten der unbehandelten Kontrolle verrechnet. Die endogene Kontrolle, im vorliegenden Fall eine ribosomale Untereinheit (RibPO), beschreibt ein Gen, welches durch ein ubiquitäres Vorkommen und eine von der Behandlung unabhängige, hohe Expressionsrate in allen Zellen gekennzeichnet ist. Die genaue Berechnung ist im Folgenden dargestellt.

- (1) Expression Zielgen relativ zur endogenen Kontrolle

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{endogene Kontrolle}}$$

- (2) Expression relativ zur Kontrolle

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{\text{unbehandelte Kontrolle}} - \Delta Ct_{\text{Behandlung}}$$

- (3) Berechnung der Expressionsänderung

$$\text{relativer Expressionslevel (E)} = 2^{(-\Delta \Delta Ct)}$$

Die verwendeten Primer für die qRT-PCR wurden von Metabion (Martinsried) bezogen. Für das Design der Primer wurde die Primer-BLAST Software von NCBI unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> verwendet. Kriterien für die Primer- Auswahl waren eine Größe der PCR-Produkte von 200 - 300 bp (Basenpaaren), eine einheitliche Schmelztemperatur bei 60 °C und wenn möglich die Lage über Exon-Intron Grenzen hinweg. Alle verwendeten Primer sind in der folgenden Tabelle dargestellt.



Primer		Sequenz (5' - 3' Orientierung)	refseq
HO-1	For	GCCACCAAGGAGGTACACAT	NM_010442.2
	Rev	GCTTGTGCGCTCTATCTCC	
NQO1	For	TGAGCCCAGATATTGTGGCC	NM_008706.5
	Rev	GCAGCATATGTGTAGGCAAATCC	
$\gamma$ GCL-C	For	GGATTCCGGATGGGCAAC	NM_010295.2
	Rev	CTGACACGTAGCCTCGGTAAAAT	
$\gamma$ GCL-M	For	CATGTCCCATGCAGTGGAGA	NM_008129.3
	Rev	GTCCAGCTGTGCAACTCCAA	
TNF $\alpha$	For	GGTGCCTATGTCTCAGCCTCTT	NM_013693.2
	Rev	GTGAGGGTCTGGGCCATAGA	
IL-1 $\beta$	For	AAGTTGACGGACCCCAAAAGA	NM_008361.3
	Rev	CACAGCTTCTCCACAGCCAC	
IL-6	For	TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC	NM_031168.1
	Rev	GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG	
COX-2	For	ACGAAGGAACTCAGCACTGCA	NM_011198.3
	Rev	ACATGGATTGGAACAGCAAGG	
Cxcl2	For	CACAGTTGCCGGCTGGAGCA	NM_009140.2
	Rev	TGGGGTCAGCACAGACCTCTCTC	
Cxcl1	For	TGATCCCAGCCACCCGCTCG	NM_008176.3
	Rev	CAAGGCAAGCCTCGCGACCA	
MCP-1	For	ACTGAAGCCAGCTCTCTTCTCCTC	NM_011333.3
	Rev	TTCCTTCTTGGGGTCAGCACAGAC	
FOS	For	TGGGCTCTCTGTCAACACA	NM_010234.2
	Rev	CGTAAGCCCCAGCAGACT	
iNOS	For	GAGCAACTACTGCTGGTGGTGA	NM_010927.3
	Rev	GAGGGTACATGCTGGAGCCA	
RibPO	For	GGACCCGAGAAGACCTCCTT	NM_007475.5
	Rev	GCACATCACTCAGAATTTCAATGG 3'	
Mmp9	For	CTGTTCCCTGGTGGCAGCGCA 3'	NM_013599.2
	Rev	AGTGGGAGGTGCTGTCGGCT 3'	
QC-Primer GAPDH	For	CTGAGGACCAGGTTGTCTCC	NM_010927.3
	Rev	TGTGAGGGAGATGCTCAGTG	
Random-Primer		dUUUU, dAAAA, dCCCC, dGGGG	

Tabelle 2.19: Verwendete Primer für die qRT-PCR

### 2.2.8 Automatisierter Zelltod Screening Assay (Apoptose-Assay)

Über den Einsatz verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe kann eine Vielfalt von biologischen Endpunkten (Zellzahl, verschiedene Formen des Zelltods, usw.) charakterisiert werden. Zusätzlich können auch über Auswertung des Hellfeldbilds Aussagen über Veränderungen der Zellmorphologie oder die Ausbildung von Vakuolen getroffen werden. Durch die Lebendfärbung im Anschluss an die Behandlung und die direkte Zugabe der Farbstoffe in das Medium werden Fixier- und Waschschriffe vermieden, so dass ein Verlust an Zellen minimiert wird. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe werden im folgenden erläutert. Hoechst33342, ein DNA-interkalierender Farbstoff, kann sowohl in lebende als auch in tote Zellen diffundieren, während Propidiumjodid (PI), ebenfalls ein DNA-interkalierender Farbstoff, nur tote Zellen durchdringen kann, bei denen die Zellmembran nicht mehr intakt ist. Hoechst33342 wird über UV-Licht (350 nm) angeregt und emittiert blaues Licht (450 nm Emissionsmaximum), während PI bei 488 nm angeregt wird und rotes Licht (590 nm Emissionsmaximum) emittiert.

#### Durchführung des Apoptose Assays

Nach erfolgter Behandlung werden die Zellen mit Hoechst und PI für 30 min im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> gefärbt. Anschließend erfolgt die Aufnahme der gefärbten Zellen mit einem Mikroskop IX81 der Firma Olympus. Es werden 4 Bildausschnitte pro well einer 96-well-Platte mit einem 10-er Objektiv aufgenommen und jeder Ansatz wird im Quadruplikat (4 wells) durchgeführt. Von jedem Bildausschnitt werden das Hoechst- und das PI-Signal sowie das Durchlichtbild detektiert und gespeichert. Die quantitative Auswertung der Fluoreszenzsignale erfolgt dann im Anschluss mit der Scan<sup>®</sup>-Analysis Software von Olympus. Die Schritte der Bildakquisition mit dem Mikroskop sowie auch die Auswertung der Fluoreszenzsignale werden automatisiert durchgeführt.

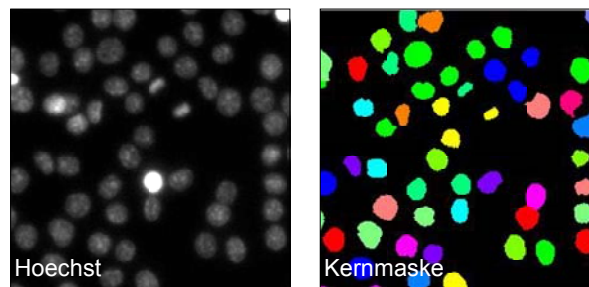
#### Analyse des Zelltod-Assays mithilfe der Scan<sup>®</sup>-Software

Anhand der generierten Bilder können verschiedene Parameter bestimmt werden. Zum einen die Morphologie der Zellen anhand des Durchlichtbilds, die Gesamtzellzahl der analysierten Zellen über das Hoechst-Signal und genauere Informationen über die Art des Zelltods durch Doppelfärbung von Hoechst und PI.

#### Ermittlung Gesamtzellzahl

Mittels Hoechst-Färbung werden alle Zellkerne angefärbt, aus deren Summe sich die Gesamtzellzahl ergibt. Mit der Scan<sup>®</sup>-Software wird eine Maske generiert, welche über das Hoechst-Signal gelegt wird (Abb. 2.1). Anschließend wird über die Software die Anzahl der

erzeugten Masken ermittelt und daraus die Gesamtzellzahl abgeleitet. Randobjekte werden dabei nicht berücksichtigt.



**Abbildung 2.1: Darstellung der Kernmaske.** Linkes Bild: Hoechst-Färbung von RAW264.7 Zellkernen, aufgenommen mit einem Olympus IX81 Mikroskop; rechtes Bild: Kernmasken generiert von der Olympus Scan<sup>®</sup>-Analysis Software. Die Anzahl der Kernmasken wird von der Software als Gesamtzellzahl ausgegeben.

### Analyse der verschiedenen Stadien des Zelltods

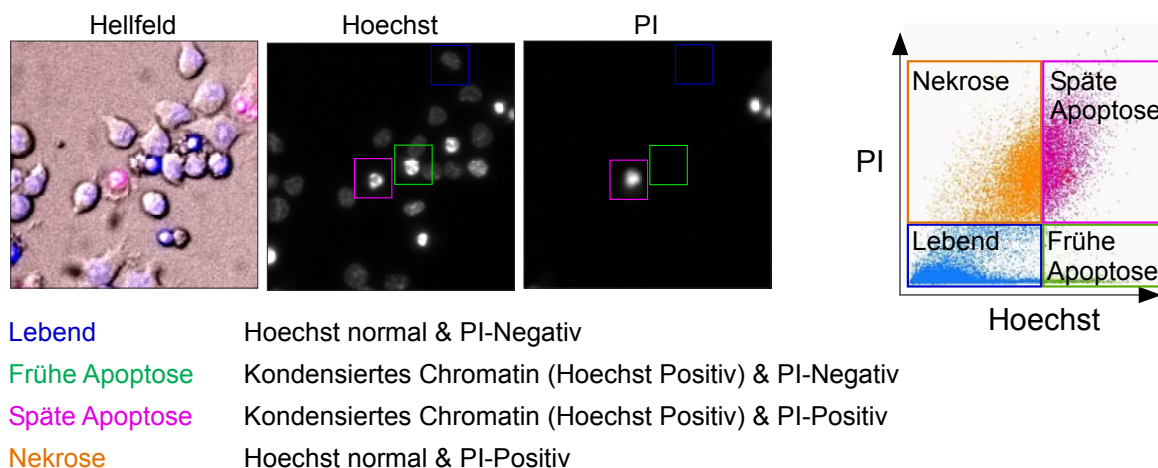
Die Bestimmung der verschiedenen Stadien des Zelltods erfolgt über die Doppelfärbung der Zellen mit den Fluoreszenzfarbstoffen Hoechst und PI. Mittels Hoechst werden sowohl lebende als auch tote Zellen angefärbt, während PI nur in Zellen mit defekter Zellmembran eindringen kann.

Bei apoptotischen Zellen findet eine Kondensation der DNA statt, so dass die Kernfärbung ein intensiveres Hoechst-Signal als lebende Zellen aufweist. Zusätzlich verändert sich die Zellmorphologie und die Zellen werden klein und rund (Frühe Apoptose). Im späteren Verlauf der Apoptose erfolgt dann eine Fragmentierung der DNA und Permeabilisierung der Zellmembran (Späte Apoptose). Überschreitet also das detektierte Hoechst-Fluoreszenzsignal einen bestimmten Schwellenwert, so werden diese Zellen als apoptotisch gewertet.

Nekrotische Zellen werden über das PI-Fluoreszenzsignal detektiert. Sie zeichnen sich morphologisch durch ein Anschwellen der Zellen aus, gefolgt von einer Permeabilisierung der Zellmembran und nicht-kondensierter DNA. Wird also ein PI-Signal detektiert und die Kernintensität liegt unter dem vorher bestimmten Schwellenwert, so handelt es sich um nekrotische Zellen (Hoechst-normal & PI-positiv). Weiterhin können mithilfe des PI-Signals früh- und spät-apoptotische Zellen unterschieden werden. Früh-apoptotische Zellen besitzen eine intakte Zellmembran, so dass sie nicht PI gefärbt sind und nur eine Chromatin-Kondensierung aufweisen (Hoechst-positiv & PI-negativ). Bei spät-apoptotischen Zellen wurde die Kernfragmentierung und Permeabilisierung der Zellmembran durchlaufen, so dass diese Zellen sowohl ein intensives Hoechst-Signal als auch ein PI-Färbung aufweisen (Hoechst-positiv & PI-positiv).

Anhand der erhaltenen Daten können dann die verschiedenen Parameter Gesamtzellzahl,

lebende und tote Zellen sowie die Verteilung der toten Zellen in die einzelnen Arten des Zelltods berechnet und grafisch dargestellt werden. Die genaue Ermittlung der lebenden und toten Zellen über die Scan<sup>®</sup> Software ist in Abb. 2.2 grafisch dargestellt.



**Abbildung 2.2: Schema der Auswertung für die einzelnen Zelltod-Phasen.** Dargestellt sind links Bilder des Apoptose-Assays nach Behandlung der RAW264.7 Zellen (Hellfeld, Hoechst, PI) sowie ein Dot-Plot (Auftragung Hoechst über PI) der detektierten Zellen mit entsprechender Hoechst- und PI-Färbung. Die Schwellenwerte für die Hoechst- bzw. PI-Färbung wurden zuvor festgelegt. Die farbigen Kästchen kennzeichnen die Einteilung der Zellen in die einzelnen Phasen des Zelltods anhand ihrer Färbung. Blau kennzeichnet lebende Zellen, die eine normale Kernfärbung und kein PI-Signal (Hoechst-normal & PI-negativ) aufweisen. Apoptotische Zellen zeichnen sich durch ein intensives Hoechst-Signal auf (kondensiertes Chromatin) und werden nach ihrer PI-Färbung in grünen Kasten = Früh-apoptotische Zellen (Hoechst-positiv & PI-negativ) und pinkfarbener Kasten = Spät-apoptotische Zellen (Hoechst-positiv & PI positiv) unterteilt. Nekrotische Zellen (oranger Kasten) besitzen einen normal-gefärbten Kern, sind aber PI positiv (Hoechst-normal & PI-positiv).

## 2.2.9 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

### Präparation von Partikeln

Zur Untersuchung der Partikel mittels TEM wird zunächst, wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben, eine Stammsuspension von 10 mg/ml in destilliertem Wasser hergestellt. Diese wird auf eine Endkonzentration von 50 µg/ml verdünnt und ein Tropfen davon auf ein Kupfer-Grid (Kisker, Steinfurt) aufgetropft und trocknen gelassen. Danach kann die Probe im EM untersucht werden.

### Präparation von Zellen für die Elektronenmikroskopie

Für die Präparation von Zellen für die Elektronenmikroskopie wird ein spezielles Transwell<sup>®</sup> System (Corning Life Sciences, USA) verwendet. Hierbei trennt ein Transwell<sup>®</sup> Einsatz mit einer Polykarbonat-Membran die Kulturschale in eine obere und eine untere Kammer. Die Membran hat einen Durchmesser von 24 mm, eine Wachstumsoberfläche von 4,67 cm<sup>2</sup> und Poren mit einer Größe von 0,4 µm. Die für die Elektronenmikroskopie verwendeten Substanzen wurden von der Firma Serva (Heidelberg) bezogen.

Für den Versuch werden die Zellen im oberen Kompartiment in 1,5 ml Medium ausgesät und das untere Kompartiment mit 2 ml Medium gefüllt. Die Behandlung der Zellen erfolgt dann am folgenden Tag ganz normal wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben.

### Präparation und Einbettung

Nach Beendigung der Exposition wird der Transwelleinsatz in eine neue Petrischale transferiert, der Kulturüberstand vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit 0,1 M Pipes gewaschen. Anschließend werden mit einem Biopsy-Punch (Stiefel Laboratorium, Offenbach) runde Membranstücke aus der Membran gestanzt und zur Erst-Fixierung der Zellen in ein mit Fixier-Lösung (Tabelle 2.20) vorgelegtes Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschrritten von je 10 min mit 0,1 M Pipes erfolgt die Zweit-Fixierung (Tabelle 2.21) auf Eis. Anschließend werden die Proben zweimal für 10 min mit 0,1 M Pipes und dann zweimal für 15 min in destilliertem H<sub>2</sub>O gewaschen. Es folgt die Blockfärbung über Nacht mit Uranylacetat (2 % in 25 % Ethanol und 75 % H<sub>2</sub>O).

	Stock-Lösung	Endkonzentration
Pipes, pH 7,0	0,2 M	0,1 M
Glutaraldehyd	25 % in H <sub>2</sub> O	1,25 %
Paraformaldehyd	20 % in H <sub>2</sub> O	2 %
NaN <sub>3</sub>	1 % in H <sub>2</sub> O	0,1 %

**Tabelle 2.20:** Zusammensetzung Erst-Fixierlösung

	Stock-Lösung	Endkonzentration
Pipes pH7,0	0,2 M in H <sub>2</sub> O	0,1 M
OsO <sub>4</sub>	4 % in H <sub>2</sub> O	0,5 %
K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	3,2 % in H <sub>2</sub> O	0,8 %

**Tabelle 2.21:** Zusammensetzung Zweit-Fixierlösung

Am nächsten Tag werden die Proben mit einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert.

- 2x 10 min 50 % Ethanol
- 2x 10 min 70 % Ethanol

- 2x 10 min 95 % Ethanol
- 2x 10 min 100 % Ethanol (getrocknet)

Da Ethanol mit dem Einbettungsharz nicht mischbar ist, wird nach der Dehydratation Propylenoxid als Intermedium eingesetzt. Die Proben werden bei Raumtemperatur auf einem Überkopfschüttler nach den folgenden Schritten in das Einbettungsharz EPON transferiert.

- 2x 5 min Propylenoxid (getrocknet)
- 60 min EPON / Propylenoxid (v/v: 30-70)
- über Nacht EPON / Propylenoxid (v/v: 70-30)
- 6 h EPON 100 %

Nach der dritten Einbettungsstufe in 100 % EPON werden die Proben vorsichtig mit einer Pinzette in die Flacheinbettungsformen mit 100 % EPON überführt und zur Polymerisation für drei Tage bei 65 °C im Wärmeschrank inkubiert.

### **Ultramikrotomie und Transmissionselektronenmikroskopie**

Von den gehärteten EPON-Blöckchen werden 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 dienen runde Netze (Grids) aus Gold (Kisker, Steinfurt) mit hexagonalen Maschen (300 Mesh/Grid). Die Objektträgernetze werden 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.

### **2.2.10 Größenbestimmung der Partikel in Suspension mittels DLS**

Die Methode der dynamischen Lichtstreuung (*dynamic light scattering*) wird häufig eingesetzt, um den hydrodynamischen Durchmesser suspendierter Stoffe (Proteine, Partikel, etc.) zu bestimmen. Die Messmethode beruht dabei auf der Analyse des Streulichts gelöster bzw. suspendierter Probe.

Die DLS-Messungen wurden in Kooperation mit dem Institut für Technische Chemie - Thermische Abfallbehandlung (KIT) durchgeführt. Zur Probenvorbereitung wird zunächst eine Partikel-Stammlösung wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben hergestellt und anschließend zur Messung eine Verdünnung von 200 µg/ml in H<sub>2</sub>O, Medium sowie Medium mit 10 % FCS hergestellt. Die Messung wird in Dreifachbestimmung am DLS Messgerät (Horiba LB 550; HORIBA Scientific Instruments, USA) durchgeführt. Für alle Messungen mit Medium wurde der Brechungsindex von Wasser verwendet.

### 2.2.11 Statistische Auswertung

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse werden als arithmetischer Mittelwert ( $M \pm$  Standardfehler (s.e.m., *standard error of the mean*) und der Anzahl der durchgeführten Experimente ( $n$ ) dargestellt. Für jede Versuchsreihe wurden Zellen aus mindestens drei unterschiedlichen Passagen verwendet. Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgt über den Student's t-Test. Die p-Werte von  $< 0,05$  (\*),  $< 0,01$  (\*\*) und  $< 0,001$  (\*\*\*) werden zur Anzeige von signifikanten Unterschieden verwendet.





## 3 Ergebnisse

Synthetische Nanopartikel (NP), insbesondere unlösliche, besitzen aufgrund ihrer neuartigen physikalischen und chemischen Eigenschaften ebenso wie Umweltstäube (z. B. Zigarettenrauch, Industrie- und Autoabgase) das Potential, sich schädlich auf Mensch und Umwelt auszuwirken (Oberdörster et al., 2005; Nel et al., 2006). Bislang wird das Risikopotential neuer, industriell hergestellter Nanopartikel fast ausschließlich in Tierversuchen (Inhalation, Instillation) ermittelt. Die Verwendung von *in vitro* Messungen direkt an der Partikelquelle wird angestrebt, jedoch erschweren bzw. verhindern die häufig sehr geringen Partikelkonzentrationen die Messung der biologischen Effekte.

Ziel des Forschungsprojektes war es, das bereits existierende *in vitro* Testsystem für die Bewertung des toxikologischen Potentials von Aerosolen weiter zu entwickeln. Dazu sollten in Submers-Kultur zum einen Partikeleffekte auf zellulärer und molekularer Ebene geklärt werden, zum anderen sollte ein Set sensitiver Parameter zur Detektion der Aktivierung stresssensitiver Signalwege etabliert werden. Es wurden *in vitro* die Zytotoxizität, Proliferation und Apoptose, Aktivierung von Signalwegen der anti-oxidativen und proinflammatorischen Zellantwort sowie die Aufnahme der Partikel in die Zelle untersucht. Der Hauptaugenmerk der Untersuchungen lag dabei auf der Aktivierung des MAPK-Signalwegs sowie der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und Nrf2, da nachweislich die Inhalation von Partikeln zu Entzündungsreaktionen in der Lunge führt.

Zur Aufklärung dieser Mechanismen sollte zum einen die Aktivierung beteiligter Kinasen durch Nachweis der Phosphorylierung oder Anreicherung der Proteine mittels Western Blot Analyse untersucht werden und zum anderen konnte über die qRT-PCR eine veränderte Genexpression ausgewählter Zielgene der verschiedenen Signalwege festgestellt werden. Weiterhin sollten spezifische Inhibitoren zur genaueren Aufklärung der verschiedenen Mechanismen zum Einsatz kommen. Als Partikelmodell wurden zunächst verschiedene Metalloxid-Nanopartikel ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ ) auf mögliche toxische Effekte getestet und davon ausgehend auf eine wirksame Partikel-sorte konzentriert. Metalloxide wie Titandioxid oder Siliziumdioxid werden bereits seit Jahren industriell in großem Maßstab hergestellt und in einer Vielzahl von Produkten eingesetzt. Die Exposition der Menschen, insbesondere der an der Herstellung und Verarbeitung der Partikel beteiligten Arbeiter, findet bereits statt und eine mögliche Gesundheitsgefährdung kann bislang noch nicht abgeschätzt werden.

Im Rahmen der *in vitro* Experimente wurden Makrophagen als repräsentative Zielzellen der Lunge eingesetzt. Die etablierte, murine Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 besitzt zum einen charakteristische Merkmale primärer Makrophagen, wie Migration sowie Phagozytose (Raschke et al., 1978), und es werden zum anderen keine weiteren Substanzen zu deren Differenzierung benötigt. Untersuchungen in der Arbeitsgruppe (Fritsch-Decker, 2008) konnten zeigen, dass die RAW264.7 Zellen im Vergleich mit humanen, primären von Monozyten abstammenden Makrophagen (MDM) nach Exposition mit Flugasche gleiche Reaktionen zeigten und sich somit gut als Modellsystem für Makrophagen eigneten. Zelllinien bieten generell den Vorteil, dass sie im Gegensatz zu primären Zellen immortalisiert sind, d.h. in unbegrenzter Zahl zur Verfügung stehen und keine spenderabhängigen Varianzen aufweisen.

## 3.1 Charakterisierung der verwendeten Partikel

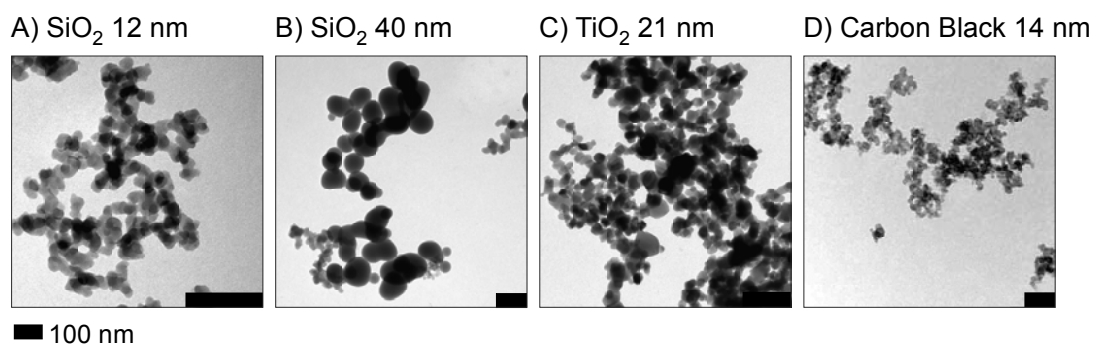
Die Exposition der Zellen mit den Nanopartikeln wird unter Submers-Bedingungen durchgeführt, weshalb eine genaue Charakterisierung der Partikel in wässrigen Systemen (Größe, Aggregationsverhalten, Oberflächenladung, Oberflächeneigenschaften) benötigt wird. Es wurde bereits beschrieben, dass die Interaktion von Nanopartikeln in Medium mit Proteinen zur Ausbildung einer Proteinkorona führt, durch welche die Eigenschaften der Partikel beeinflusst werden und auch deren Effekte auf zellulärer und molekularer Ebene (Aufnahme, Interaktion mit Rezeptoren, Signalaktivierung, etc.) beeinflusst werden können (Nel et al., 2009).

### 3.1.1 Analyse der verwendeten Nanopartikel mittels TEM und DLS

Für die *in vitro* Untersuchungen unter Submers-Bedingungen wurden mehrere Nanomaterialien unterschiedlicher Zusammensetzung und Größenverteilung aus dem Bereich der Metalloxide ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ ) sowie auch Carbon Black (CB14; Referenzpartikel) verwendet.

Zur Charakterisierung bzw. der Bestimmung von Größe und Morphologie wurden zum einen Aufnahmen der Partikel am Transmissionselektronenmikroskop (TEM) angefertigt, zum anderen wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Technische Chemie - Thermische Abfallbehandlung (KIT) Messungen zur Größenbestimmung der  $\text{SiO}_2$  Partikel in wässrigen Suspensionen mittels DLS (*Dynamic Light Scattering*) durchgeführt. Die Daten der 12 nm  $\text{SiO}_2$  NP wurden von Alicja Panas übernommen.

Die TEM-Ergebnisse (Abb. 3.1) zeigten, dass die Primärpartikel aller untersuchter Partikelsorten eine runde Morphologie aufwiesen. Die Größenverteilung erstreckte sich über einen weiten Bereich und die Partikel wiesen eine starke Tendenz zur Agglomeration auf. Ob die Partikel bereits in ihrer Pulverform aggregiert, d.h. miteinander verschmolzen, oder sich erst in wässriger Lösung zusammengelagert hatten, konnte mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.1: TEM-Bilder der verwendeten Nanomaterialien** A) & B) SiO<sub>2</sub> (12 nm, 40 nm), C) TiO<sub>2</sub> (21 nm), D) Carbon Black (14 nm).

Im Weiteren wurden nur die SiO<sub>2</sub> NP genauer charakterisiert, da der Fokus der Arbeit aufgrund der stärksten Effekte auf diesen Partikeln lag. Die DLS-Messungen bestätigten das Ergebnis der TEM-Analyse, dass die SiO<sub>2</sub> NP als Agglomerate/ Aggregate in wässrigen Lösungen vorlagen. Die Messung der Größenverteilung der SiO<sub>2</sub> NP wurde in verschiedenen wässrigen Systemen (H<sub>2</sub>O, DMEM, DMEM mit FCS) durchgeführt und ergaben für die 12 nm SiO<sub>2</sub> NP einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von 215 nm in Wasser (Tabelle 3.2). In Kulturmedium (DMEM) konnte ein leichter Anstieg des hydrodynamischen Durchmessers festgestellt werden, der sich durch Zugabe von FCS noch weiter erhöhte. Bei den 40 nm SiO<sub>2</sub> NP wurde in Wasser ein hydrodynamischen Durchmesser von 247 nm gemessen, der sich ebenfalls in Kulturmedium vergrößerte. Hier konnte allerdings durch Zugabe von Serum der hydrodynamische Durchmesser von 483 nm auf 375 nm verringert werden.

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Angewandte Biowissenschaften (AG Schuchmann, KIT) wurde das Zetapotential der SiO<sub>2</sub> NP in Wasser bestimmt. Bei pH 7,0 ergab sich ein negatives Zetapotential. Dieser Ladungszustand kommt wahrscheinlich durch Deprotonierung der OH-Gruppen an der Oberfläche der Partikel zustande. Die Oberflächenladung hat einen Einfluss auf die Anlagerung von geladenen Teilchen, wie beispielsweise Proteine oder Salz-Ionen, und kann so die Größe und Agglomeration der Partikel und möglicherweise auch die Interaktion mit Zelloberflächen beeinflussen.

Material	Handelsname	Nominale Größe	BET [m <sup>2</sup> ·g <sup>-1</sup> ]	Kristallstruktur
SiO <sub>2</sub>	Aerosil <sup>®</sup> 200	12 nm	200 ± 25	amorph
SiO <sub>2</sub>	Aerosil <sup>®</sup> Ox50	40 nm	50 ± 15	amorph
TiO <sub>2</sub>	Aeroxide <sup>®</sup> P25	21 nm	50 ± 15	Anatase / Rutil
Carbon Black	Printex <sup>®</sup> 90	14 nm	300	amorph

**Tabelle 3.1: Herstellerangaben zu den verwendeten Nanopartikeln.** BET = spezifische Oberfläche nach Brunauer, Emmett & Teller

Partikel	MA in H <sub>2</sub> O	MA in DMEM	MA in DMEM + FCS	Zetapotential [mV]
SiO <sub>2</sub> 12 nm	215 ± 25 nm	243 ± 20 nm	610 ± 221 nm	- 40
SiO <sub>2</sub> 40 nm	247 ± 11 nm	483 ± 37 nm	375 ± 8 nm	- 62

**Tabelle 3.2: Übersicht der gemessenen Partikeleigenschaften.** MA = mittlerer hydrodynamischer Durchmesser. Für die DLS-Messungen wurde eine Partikel-Konzentration von 200 µg/ml eingesetzt. Das Zetapotential wurde in H<sub>2</sub>O bei pH 7,0 gemessen.

Desweiteren konnte mittels LAL-Test (LAL = Limulus-Amöbocyten-Lysat) nachgewiesen werden, dass alle untersuchten Partikel Endotoxin-frei waren.

## 3.2 Zytotoxizitäts-Studien

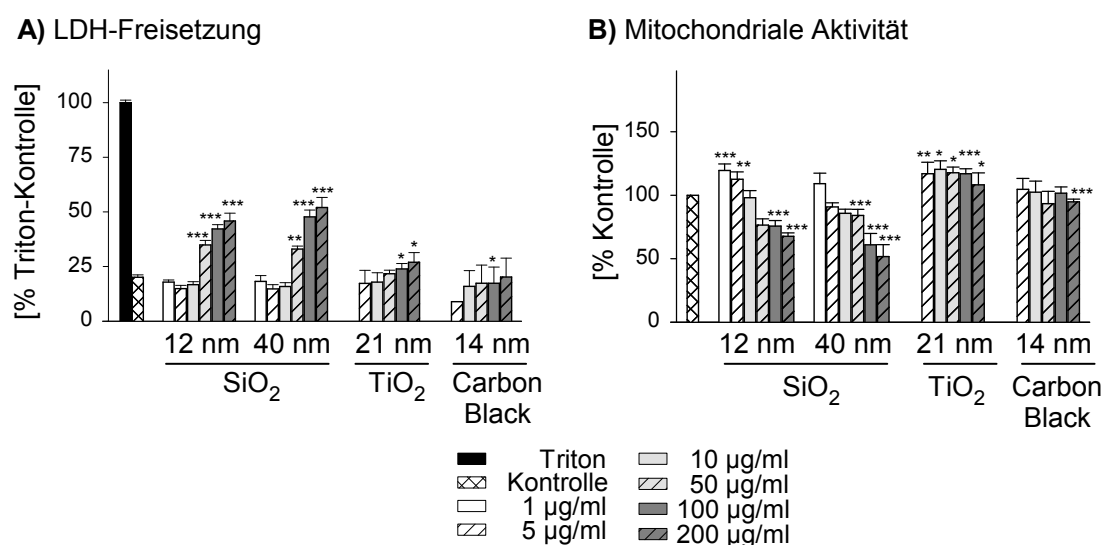
Aus Studien ist bereits bekannt, dass insbesondere Silica-Partikel (kristallin, amorph) toxisch auf verschiedene Zelltypen wirken (Park et al., 2008; Waters et al., 2009). Auch von Titandioxid ist bekannt, dass es sich schädigend auf einige Zelltypen auswirkt (Abschnitt 1.1.2; Abschnitt 1.1.3).

Daher wurden die in Abschnitt 3.1 beschriebenen Nanopartikel zunächst in den RAW264.7 Makrophagen auf ihre akute Zytotoxizität getestet. Über den LDH-Assay kann die Freisetzung des Enzyms LDH (Laktat Dehydrogenase) und darüber die Durchlässigkeit der Zellmembran festgestellt werden. Mithilfe des WST-1 Assay wird die mitochondriale Aktivität der Zellen bestimmt.

### 3.2.1 Vergleichende Untersuchung verschiedener Nanopartikel

Zur Untersuchung der zwei Parameter LDH-Freisetzung und mitochondriale Aktivität wurden die Zellen zunächst für 24 h mit den Nanopartikeln in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt und anschließend die beiden Tests durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.2 dargestellt. Für alle Kulturgefäße wurden die Volumen- und Flächenkonzentrationen konstant gehalten und sind in Tabelle 2.8 zusammengefasst.

Aus Abb. 3.2 wird ersichtlich, dass nur die verwendeten SiO<sub>2</sub> NP eine toxische Wirkung ab einer Konzentration von 50 µg/ml auf die RAW264.7 Zellen nach 24 h ausübten. Ein Anstieg der LDH-Freisetzung von basal 20 % auf 50 % bei der höchsten Konzentration der SiO<sub>2</sub> NP (12 nm, 40 nm) war zu beobachten, was auch mit der Abnahme der mitochondrialen Aktivität auf 60 % (12 nm) bzw. 50 % (40 nm) korrelierte. Die beiden Größen der SiO<sub>2</sub> NP zeigten einen ähnlich toxischen Effekt auf die Zellen, wohingegen die Behandlung mit TiO<sub>2</sub> NP sowie mit Carbon Black zu keinen toxischen Effekten in den Zellen führte.



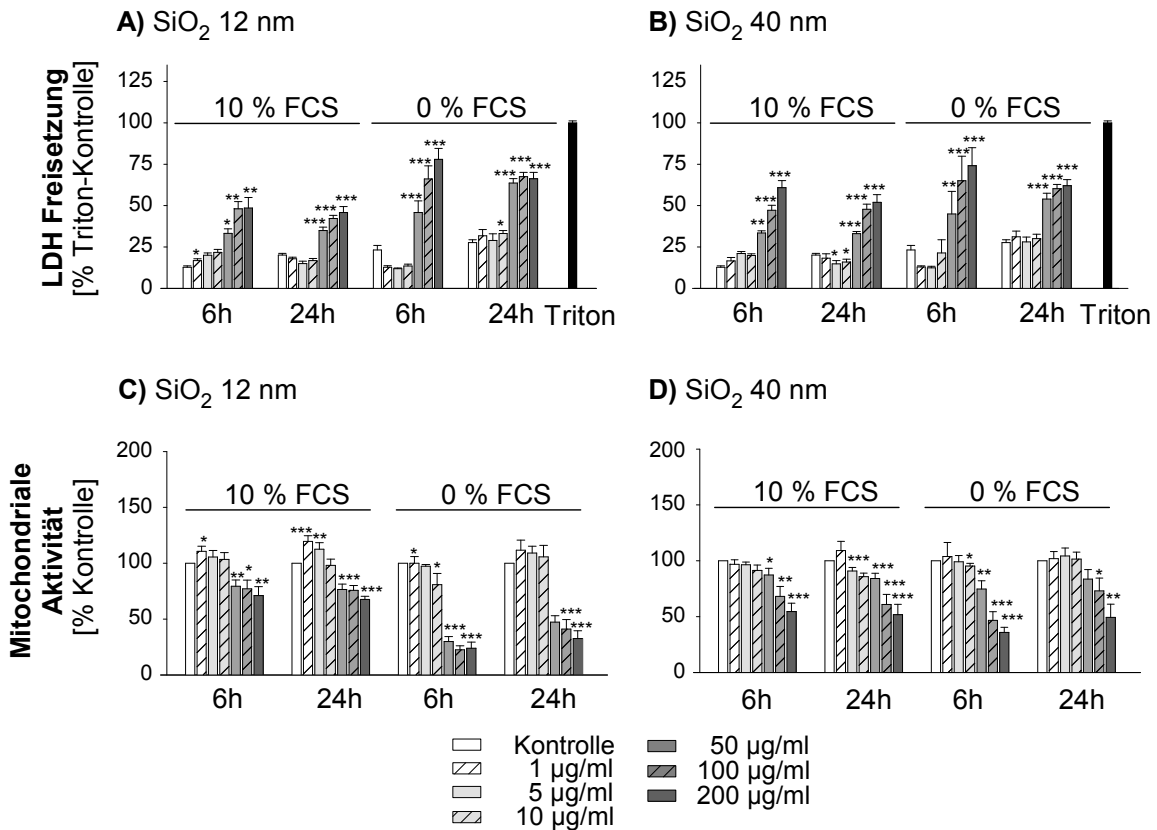
**Abbildung 3.2: SiO<sub>2</sub> NP wirken toxisch auf die RAW264.7 Makrophagen.** Dargestellt sind die Ergebnisse des A) LDH-Assay und B) WST-1 Assay nach 24 h submerser Behandlung der RAW264.7 Makrophagen mit verschiedenen Nanopartikeln (SiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, CB14) in unterschiedlichen Konzentrationen in Medium mit 10% FCS. Die LDH-Freisetzung wurde auf die Positivkontrolle Triton und die mitochondriale Aktivität (MA) auf die unbehandelte Kontrolle bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± s.e.m. aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Vierfachbestimmung durchgeführt wurden (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle).

### 3.2.2 Zeitkinetik und Serum-Abhängigkeit nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition

Die SiO<sub>2</sub> NP wiesen die stärksten Effekte nach 24 h Behandlung auf, weshalb der weitere Fokus auf der genaueren Untersuchung der SiO<sub>2</sub> NP hinsichtlich Kinetik und Serumabhängigkeit der Toxizität lag. Es ist bekannt, dass NP mit Serum-Proteinen interagieren und durch die so veränderte Oberfläche sich unterschiedliche zelluläre Effekte (Aufnahme, Interaktion mit Rezeptoren, Signalling, etc.) ergeben können. Daher wurden die RAW264.7 Makrophagen für 6 h und 24 h mit beiden Größen der SiO<sub>2</sub> NP in Medium mit und ohne Serum exponiert und anschließend die LDH-Freisetzung sowie die mitochondriale Aktivität (MA) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.3 (A-D) dargestellt.

Die Behandlung der Zellen mit den 12 nm SiO<sub>2</sub> NP (Abb. 3.3-A) in Medium mit FCS führte bereits nach 6 h konzentrationsabhängig zu einer LDH-Freisetzung von basal 13% auf 50% bei der höchsten Dosis, welche durch längere Exposition nicht wesentlich verstärkt wurde. In Abwesenheit von FCS wurde ebenfalls eine frühe Freisetzung von LDH beobachtet, wobei bei gleicher Partikel-Konzentration das Fehlen von FCS die toxischen Effekte noch verstärkte. Für die Konzentration von 50 µg/ml nach 6 h ergab das einen Anstieg von 30% (mit FCS) auf 50% (ohne FCS) LDH-Freisetzung. Analog hierzu war auch die mitochondriale Aktivität (MA) der

Zellen nach 12 nm SiO<sub>2</sub> NP Exposition (Abb. 3.3-B) bereits nach 6 h verringert. Gleichmaßen war auch eine verstärkte Reduktion der MA in Abwesenheit von FCS zu beobachten. Hier sank die MA bei einer Konzentration von 50 µg/ml SiO<sub>2</sub> nach 6 h von 80 % (mit FCS) auf unter 50 % (ohne FCS). Für die größeren 40 nm SiO<sub>2</sub> NP (Abb. 3.3, B & D) ergaben sich ähnliche Effekte, wobei die mitochondriale Aktivität der Zellen weniger stark konzentrationsabhängig reduziert wurde.



**Abbildung 3.3: SiO<sub>2</sub> NP führen zu erhöhter Toxizität in Abwesenheit von FCS.** Dargestellt sind die Ergebnisse nach Behandlung der RAW264.7 Makrophagen für 6 h und 24 h mit den SiO<sub>2</sub> NP (12 nm, 40 nm) in An- und Abwesenheit von FCS. A) LDH-Assay 12 nm SiO<sub>2</sub>, B) LDH-Assay 40 nm SiO<sub>2</sub>, C) WST-1 Assay 12 nm SiO<sub>2</sub>, D) WST-1 Assay 40 nm SiO<sub>2</sub>. Die LDH-Freisetzung wurde auf die Positivkontrolle Triton und die mitochondriale Aktivität (MA) auf die unbehandelte Kontrolle bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± s.e.m. aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Vierfachbestimmung durchgeführt wurden (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle).

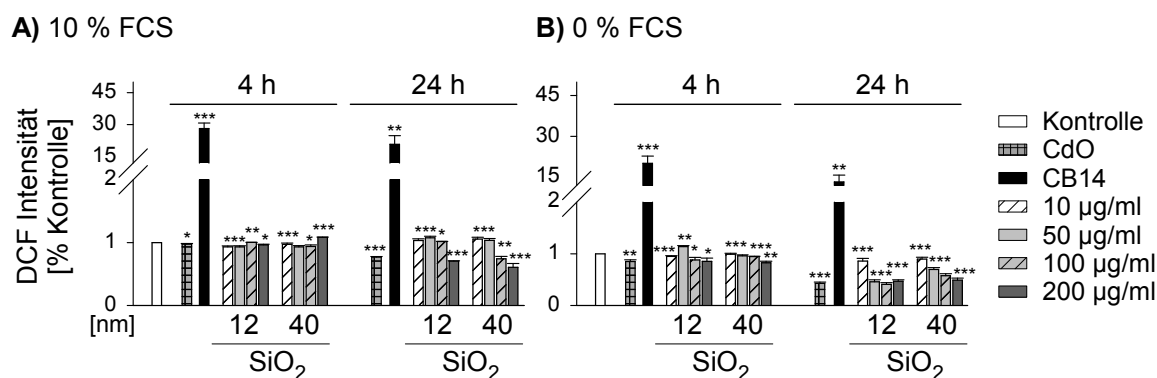
### 3.2.3 Keine ROS Erhöhung nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition in Makrophagen

Eine mögliche Erklärung für die Toxizität von Nanopartikeln ist die übermäßige Generierung reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS). Werden mehr ROS gebildet, als es der Zelle möglich ist, zu neutralisieren, so kommt es zu oxidativem Stress, welcher zellschädigende Effekte verursachen

kann. Wie in Abschnitt 1.3.1 beschrieben wurde, beruht eine Theorie über die mögliche toxische Wirkung von Nanopartikeln auf der Generierung von ROS und somit oxidativem Stress für die Zelle.

Zu diesem Zweck wurden nach erfolgter Behandlung mit den Nanopartikeln die entstandenen ROS mittels DCF-Assay nachgewiesen. Mithilfe dieses Tests lassen sich sensitiv die folgenden Radikale nachweisen:  $\text{H}_2\text{O}_2$ / Peroxidase,  $\cdot\text{O}_2\text{R}$ ,  $\cdot\text{OR}$ ,  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{HOCl}$  sowie  $\text{ONOO}^-$ , jedoch nicht das Superoxid-Anion  $\text{O}_2^-$ . Die RAW264.7 Makrophagen wurden dazu für 4 h und 24 h mit den  $\text{SiO}_2$  NP bzw. den Kontrollen Carbon Black (CB14) und Cadmiumoxid (CdO) mit und ohne Serum behandelt und anschließend der DCF-Assay durchgeführt.

In Abb. 3.4 (A & B) ist deutlich zu erkennen, dass lediglich für die Positivkontrolle Carbon Black ein Anstieg der ROS-Bildung sowohl mit als auch ohne FCS zu detektieren war. Für beide Größen der  $\text{SiO}_2$  NP konnte nur eine sehr geringe ROS-Bildung (1,3-fach im Vergleich zur Kontrolle) gemessen werden unabhängig von der An- bzw. Abwesenheit von Serum. Der Rückgang der detektierten ROS nach 24 h Behandlung ist auf das Absterben der Zellen zu diesem Zeitpunkt zurückzuführen. Da über den DCF-Assay allerdings nicht alle ROS detektiert werden können, ist nicht vollständig auszuschließen, dass keine ROS von den  $\text{SiO}_2$  NP gebildet wurden. CdO ist zwar ein bekannter Auslöser von oxidativem Stress, für den aber ebenfalls keine ROS detektiert werden konnten. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass Cadmium-induzierter oxidativer Stress auf der Inhibierung anti-oxidativ wirkender Enzyme, wie z.B. Katalase oder Glutathion-Reduktase, und nicht auf der Generierung von ROS beruht (Beyersmann & Hartwig, 2008).



**Abbildung 3.4:  $\text{SiO}_2$  NP generieren keine ROS.** RAW264.7 Makrophagen wurden konzentrationsabhängig (10, 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) mit  $\text{SiO}_2$  NP (12 nm, 40 nm) sowie mit 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  CdO und 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Carbon Black (CB14) für 4 h und 24 h A) mit 10 % FCS und B) ohne FCS behandelt und im Anschluss der DCF-Assay durchgeführt. Der Anstieg der DCF-Intensität wurde auf die unbehandelte Kontrolle bezogen und angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  s.e.m. aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Vierfachbestimmung durchgeführt wurden (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zur Kontrolle).

### 3.3 Aufnahme der SiO<sub>2</sub> NP in Makrophagen

Generell können Zellen Makromoleküle und /oder auch Nanopartikel über Phagozytose oder Pinozytose aufnehmen. Für die Rezeptor-vermittelte Phagozytose sind insbesondere Oberflächenrezeptoren wie der Mannose- (MR), der Komplement- (CR) oder der Immunglobulin-Rezeptor (Fc $\gamma$ R) wichtig. Eine Beteiligung von Scavenger-Rezeptoren ist aber auch möglich (Dobrovolskaia et al., 2007). Komponenten des FCS, wie beispielsweise Albumin, IgGs, Komponenten des Komplementsystems oder Wachstumsfaktoren können an solche Oberflächenrezeptoren binden und eine Aufnahme vermitteln (siehe Abschnitt 1.2).

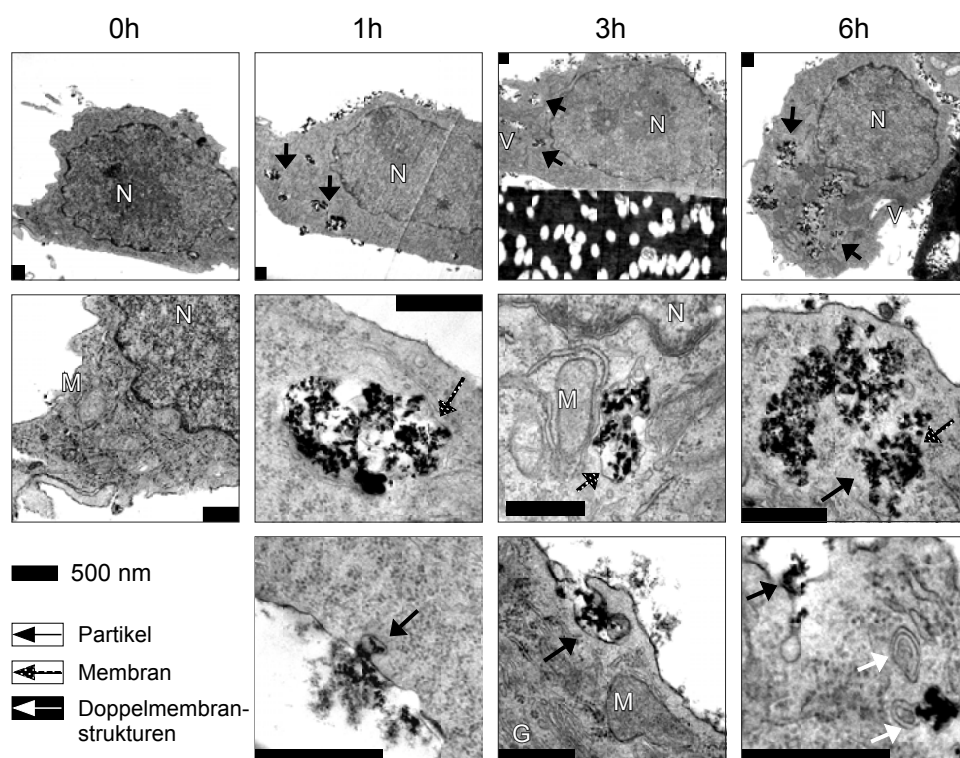
#### 3.3.1 TEM-Analyse der 12 nm SiO<sub>2</sub> NP in Makrophagen in Abhängigkeit von Serum

Die Aufnahme der SiO<sub>2</sub> NP (12 nm) in die Makrophagen wurde mittels TEM-Analyse untersucht. Dazu wurden die RAW264.7 Zellen mit den 12 nm SiO<sub>2</sub> NP (50  $\mu$ g/ml) für 1, 3 und 6 h in Medium mit und ohne 10 % FCS behandelt und anschließend für die Analyse am TEM aufbereitet.

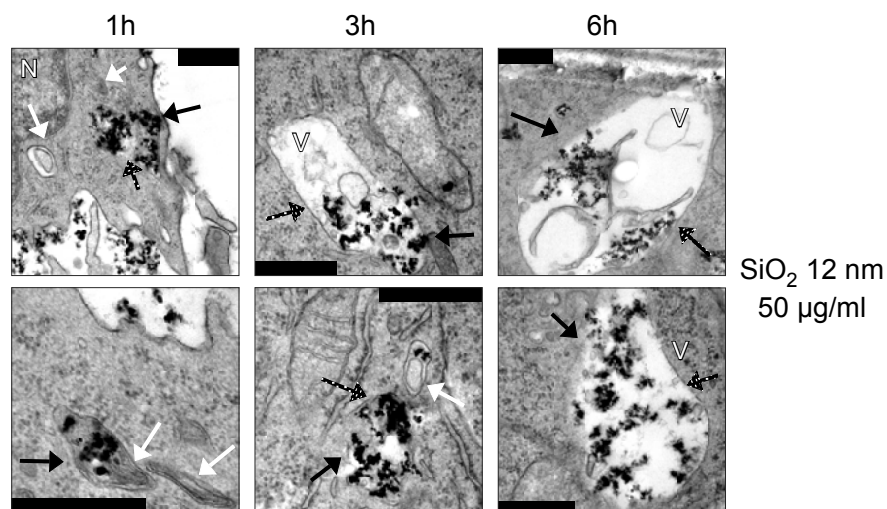
Anhand der TEM-Bilder (Abb. 3.5) ist deutlich zu sehen, dass die SiO<sub>2</sub> NP (schwarzer Pfeil) bereits nach 1 h Exposition in Medium mit 10 % FCS von den Makrophagen aufgenommen wurden. Innerhalb der Zelle lagen die Partikel als größere Agglomerate in hauptsächlich Membran-umschlossenen Vesikeln (gepunkteter Pfeil) im Zytosol vor. Einzeln vorliegende Partikel waren nicht zu finden und es konnten auch keine Nanopartikel im Zellkern oder in den Mitochondrien gefunden werden. Charakteristische Ausstülpungen der Zellmembran im Größenbereich von 200 nm deuten auf einen Endozytose-vermittelten Aufnahmeweg der SiO<sub>2</sub> NP in Anwesenheit von FCS hin. Die Anzahl intrazellulär vorliegender Partikel-Vesikel nahm mit zunehmender Expositionsdauer ebenfalls zu.

Es konnte außerdem beobachtet werden, dass es bei der Behandlung mit SiO<sub>2</sub> NP zur Ausbildung von Doppelmembran-Strukturen und später zu Vakuolen innerhalb der Zelle kam. Zu frühen Zeitpunkten wurde zunächst die Ausbildung von Doppelmembranenstrukturen um Zytosol-Komponenten bzw. um Partikel-Ansammlungen (weißer Pfeil) herum beobachtet, was auf frühe Autophagosomen hindeutet. Mit zunehmender Expositionsdauer konnte ein Anstieg der Vakuolengröße beobachtet werden. Zusätzlich waren vermehrt zelluläre Strukturen zusammen mit Partikeln in den Vakuolen zu finden bzw. eine Fusion von verschiedenen Vakuolen zu beobachten, was Anzeichen von späten Autophagosomen bzw. Autophagolysosomen sind (Abschnitt 1.4.4). Zusätzlich konnten auch nekrotische Zellen sowie Reste kaputter Zellen in der TEM-Analyse detektiert werden.



A) Behandlung mit 50  $\mu\text{g/ml}$   $\text{SiO}_2$  12 nm mit 10 % FCS

## B) Beispiele für die Ausbildung von Vakuolen

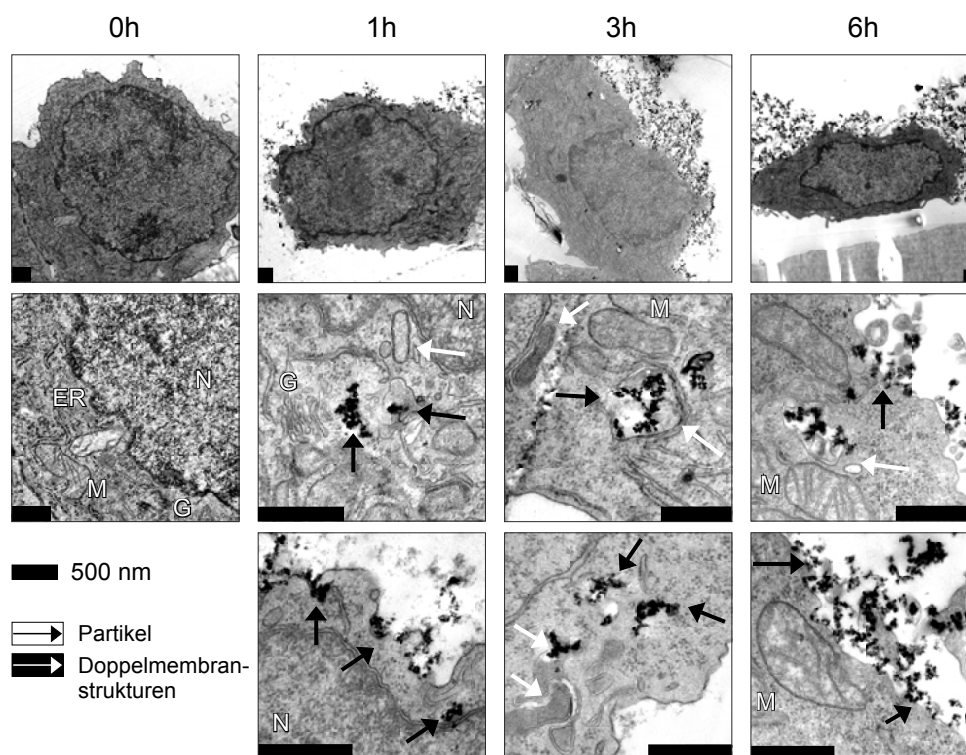


**Abbildung 3.5: Makrophagen nehmen  $\text{SiO}_2$  12 nm NP in Anwesenheit von FCS schon nach 1h auf.** RAW264.7 Makrophagen wurden für 1, 3 und 6 h mit 50  $\mu\text{g/ml}$   $\text{SiO}_2$  NP (12 nm) in Medium mit 10 % FCS behandelt und anschließend für die Analyse mittels TEM aufbereitet. Dargestellt sind A) die zeitabhängige Aufnahme und B) Beispiele für die Ausbildung von Vakuolen für die verschiedenen Zeitpunkte. Der angezeigte Maßstab beträgt 500 nm. N = Nukleus, M = Mitochondrium, G = Golgi-Apparat, ER = Endoplasmatisches Retikulum, V = Vakuole.

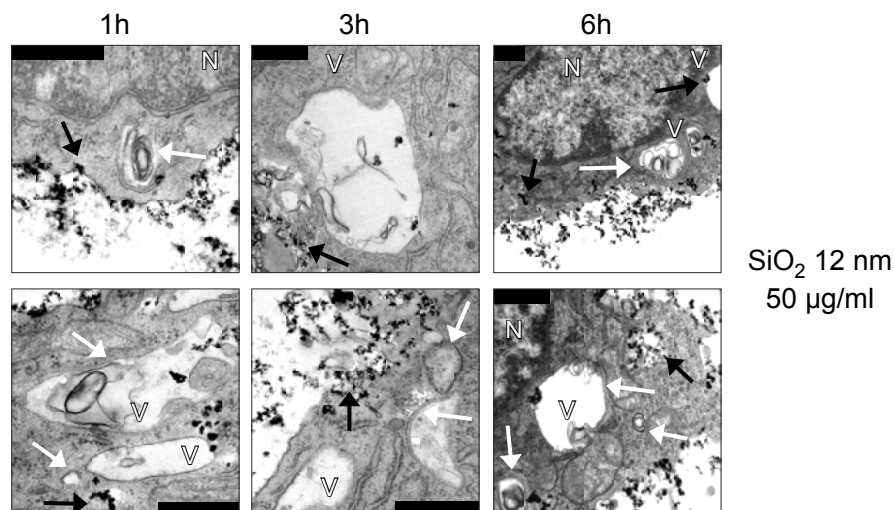
In Abwesenheit von FCS dagegen ergab sich ein anderes Bild für die Aufnahme der SiO<sub>2</sub> NP in die Makrophagen. Der Großteil der Partikel war im äußeren Bereich der Zelle zu finden, wo sie mit der Zellmembran assoziiert vorlagen. Aufgenommene Partikel lagen hauptsächlich nicht Membran-umschlossen als kleinere Aggregate im Zytosol vor. Hinweise auf eine endozytotische Aufnahme konnten nicht gefunden werden. Ebenso wie bei der Aufnahme mit FCS waren jedoch keine Partikel im Zellkern oder in den Mitochondrien zu finden. Insgesamt waren über den beobachteten zeitlichen Verlauf etwas weniger aufgenommene Partikel pro Zelle ohne FCS zu detektieren als mit FCS. Für quantitative Aussagen müssten jedoch andere Analysemethoden zum Einsatz kommen, da mittels normaler TEM-Analyse nur ein geringer Teil der Zelle analysiert werden kann.

Die schon beschriebene Ausbildung von Doppelmembranstrukturen und Vakuolen konnte auch bei der Behandlung ohne Serum beobachtet werden, wobei hier der Effekt wesentlich stärker ausgeprägt und früher zu detektieren war. Die Exposition mit den 12 nm SiO<sub>2</sub> NP führte jedoch schon nach 3 - 4 h zu einem vermehrten Auftreten toter Zellen sowie Partikel-assoziiierter Zellreste, welche unter normalen Bedingungen von den Makrophagen phagozytiert werden. Daher ist für den Inhalt der Vakuolen nicht auszuschließen, dass diese zusätzlich von phagozytierten Resten kaputter Zellen herrührten.

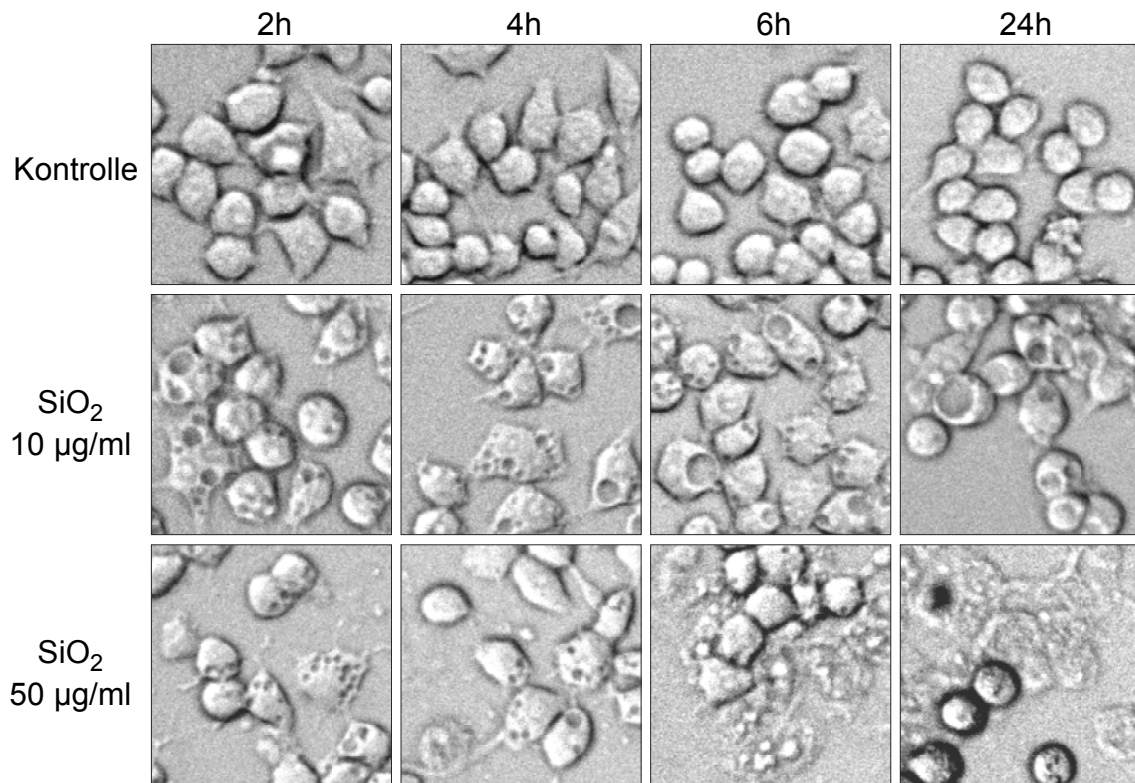
Die bereits beschriebene Vakuolenbildung kann auch im Hellfeld eines normalen Lichtmikroskops nachgewiesen werden. Hier sind die Hellfeld-Bilder des Apoptose-Assays (Abschnitt 3.7.1) der zeitabhängigen Behandlung der Makrophagen mit 10 µg/ml und 50 µg/ml SiO<sub>2</sub> NP (12 nm) in Abwesenheit von FCS gezeigt (Abb. 3.7). Es ist deutlich zu erkennen, dass die Ausbildung der Vakuolen bereits nach 2 h Behandlung eingesetzt hatte. Bei der niedrigen, subtoxischen Dosis (10 µg/ml) nahm die Anzahl sowie auch die Größe der Vakuolen pro Zelle mit der Zeit zu, während die hohe Dosis (50 µg/ml) bereits nach 6 h Behandlung zum Absterben der Zellen führte. Die Zellen mit noch intakter Zellmembran wiesen aber ebenfalls eine stark ausgeprägte Vakuolenbildung auf.

A) Behandlung mit 50  $\mu\text{g/ml}$   $\text{SiO}_2$  12 nm ohne FCS

## B) Beispiele für die Ausbildung von Vakuolen



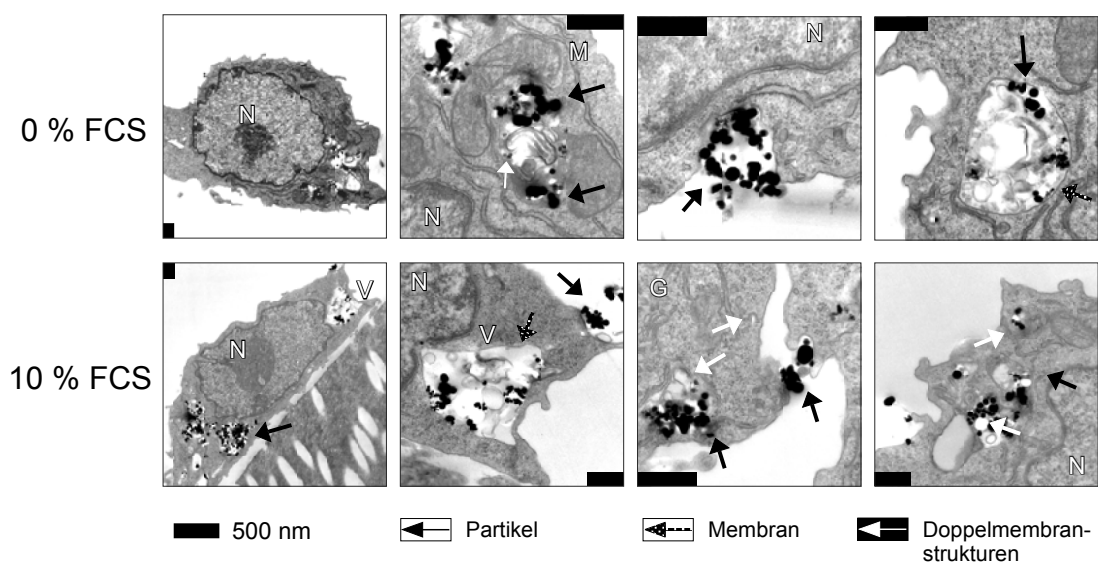
**Abbildung 3.6:  $\text{SiO}_2$  12 nm NP werden in Abwesenheit von Serum schlechter aufgenommen als mit Serum.** RAW264.7 Makrophagen wurden für 1, 3 und 6 h mit 50  $\mu\text{g/ml}$   $\text{SiO}_2$  NP (12 nm) in Medium mit 0% FCS behandelt und anschließend für die Analyse mittels TEM aufbereitet. Dargestellt sind A) die zeitabhängige Aufnahme und B) Beispiele für die Ausbildung von Vakuolen für die verschiedenen Zeitpunkte. Der angezeigte Maßstab beträgt 500 nm. N = Nucleus, M = Mitochondrium, G = Golgi-Apparat, ER = Endoplasmatisches Retikulum, V = Vakuole.



**Abbildung 3.7: Vakuolen-Ausbildung nach  $\text{SiO}_2$  NP Exposition ist auch im Hellfeld nachweisbar.** Gezeigt sind hier die Hellfeld-Bilder des Apoptose-Assays nach zeitabhängiger Behandlung (2, 4, 6, 24 h) der RAW264.7 Makrophagen mit 10 und 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$   $\text{SiO}_2$  NP in Abwesenheit von FCS.

### 3.3.2 TEM-Analyse der 40 nm $\text{SiO}_2$ NP in Makrophagen in Abhängigkeit von Serum

Es wurde auch die Aufnahme der größeren  $\text{SiO}_2$  NP (40 nm) in die Makrophagen mittels TEM-Analyse untersucht. Dazu wurden die RAW264.7 Makrophagen für 6 h mit 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$   $\text{SiO}_2$  NP (40 nm) in Medium -/+ 10 % FCS behandelt und anschließend für die Analyse am TEM aufbereitet. Nach 6-stündiger Behandlung konnten unabhängig von FCS größere Ansammlungen der 40 nm  $\text{SiO}_2$  NP in den Zellen gefunden werden. Diese lagen auch teilweise Membran-umschlossen im Zytosol vor. Keine Partikel hingegen konnten im Zellkern oder den Mitochondrien gefunden werden. Ebenso wie bei den kleineren  $\text{SiO}_2$  NP waren sowohl die Ausbildung von Doppelmembran-Strukturen als auch von Vakuolen zu beobachten. In den Vakuolen waren neben den  $\text{SiO}_2$  NP auch andere zelluläre Strukturen zu finden, deren Herkunft, (zelleigen oder phagozytierte Reste toter Zellen) nicht genau geklärt werden konnte. Die größeren  $\text{SiO}_2$  NP (40 nm) scheinen demnach ähnlich den 12 nm  $\text{SiO}_2$  NP Autophagie in den Makrophagen auszulösen.



**Abbildung 3.8: Auch die 40 nm SiO<sub>2</sub> NP werden in An- bzw. Abwesenheit von FCS in die Makrophagen aufgenommen.** RAW264.7 Makrophagen wurden für 6 h mit 50 µg/ml SiO<sub>2</sub> NP (40 nm) in Medium -/+ 10% FCS behandelt und anschließend für die Analyse mittels TEM aufbereitet. Dargestellt sind Beispiele für die Aufnahme und für die Ausbildung von Vakuolen. Der angezeigte Maßstab beträgt 500 nm. N = Nukleus, M = Mitochondrium, G = Golgi-Apparat, ER = Endoplasmatisches Retikulum, V = Vakuole.

Basierend auf den Ergebnissen der Zytotoxizitäts-Studien wurden für die weiteren Experimente nur noch die 12 nm SiO<sub>2</sub> NP verwendet, da sie die stärksten Effekte auf die Makrophagen ausübten. Desweiteren wurden die Experimente nur noch unter Serum-freien Bedingungen durchgeführt, da zum einen die beobachteten Effekte durch die Abwesenheit von FCS verstärkt wurden und zum anderen dieses Expositionsszenario die Verhältnisse in der Lunge am ehesten widerspiegelt.

### 3.4 Identifizierung von Signalwegen, die nach Partikel-Exposition aktiviert werden

Bislang ist noch nicht geklärt, worauf die toxische Wirkung von amorphen SiO<sub>2</sub> NP auf Makrophagen zurückzuführen ist. Daher sind verschiedene Hypothesen entwickelt worden, um diese Tatsache zu erklären. Eine Möglichkeit ist die Interaktion von SiO<sub>2</sub> NP mit unterschiedlichen Rezeptoren (Macrophage Scavenger Rezeptoren, Toll-like Rezeptoren, etc.) an der Oberfläche der Makrophagen, welche verschiedene Signalkaskaden im Zellinneren anschalten. Studien von Iyer et al. konnten zeigen, dass der Scavenger Rezeptor für die Initiierung der Apoptose durch kristallines SiO<sub>2</sub> in humanen Makrophagen benötigt wird (Iyer et al., 1996).

Eine andere Möglichkeit ist die Bildung von Reaktiven Sauerstoff- oder Stickstoff Spezies (ROS/RNS) durch die Partikel. Diese können entweder außerhalb oder - nach Aufnahme - innerhalb der Zelle gebildet werden, dadurch verschiedene Signalwege anschalten und je nach Stresslevel über das Überleben der Zelle entscheiden. Nel et al. postulieren ein hierarchisches Prinzip (Nel et al., 2006), nach dem die Zelle zunächst bei niedrigem oxidativen Stress als Abwehrreaktion anti-oxidativ wirkende und entgiftende Enzyme aktiviert. In diesem Zusammenhang ist der Transkriptionsfaktor Nrf2 von entscheidender Bedeutung, da er an das Anti-oxidative Response Element (ARE) des Promotors von Phase-II Genen bindet und deren Transkription aktiviert. Wird der Stresslevel höher, so erfolgt eine Entzündungsreaktion, bei der wichtige Mediatoren wie Zytokine und Chemokine ausgeschüttet und entsprechende Zielzellen des Immunsystems aktiviert werden. Bei der Initiation der Entzündungsreaktion sind vor allem die Signalwege der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) sowie die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 beteiligt. Im weiteren Verlauf treten auch zytotoxische Effekte auf und wird der Stress zu hoch, so erfolgt der Zelltod durch Apoptose oder Nekrose.

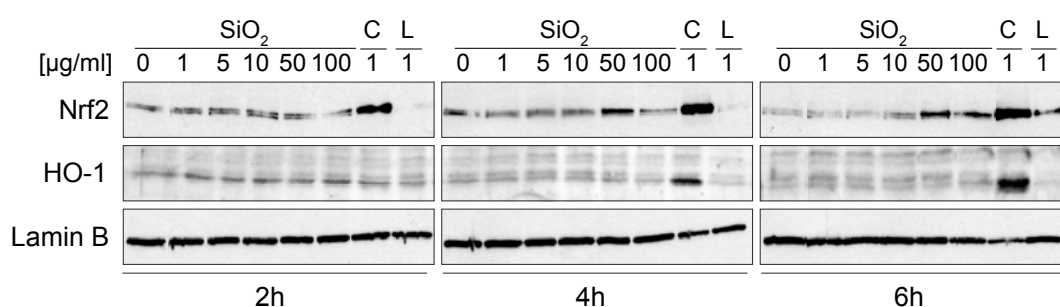
#### 3.4.1 Aktivierung der anti-oxidativen Stressantwort und von Nrf2

Oxidativer Stress kann eine mögliche Ursache für die Toxizität von SiO<sub>2</sub> NP sein. Ein wichtiger Transkriptionsfaktor stellt in diesem Zusammenhang Nrf2 dar. Die Regulation von Nrf2 erfolgt über den zytoplasmatischen Repressor Keap-1. Durch die Bindung von Nrf2 und Keap-1 wird der ständige Abbau von Nrf2 durch das Proteasom begünstigt. Unter oxidativen Stressbedingungen in der Zelle wird Keap-1 modifiziert, so dass Nrf2 dissoziieren, akkumulieren, in den Zellkern translozieren und dort entsprechende Zielgene aktivieren kann (Bouten et al., 2011). Eines dieser Zielgene ist die Hämoxxygenase-1 (HO-1), ein Enzym, welches die Zelle gegen oxidativen Stress durch die Reaktionsprodukte des Häm-Abbaus (Bilirubin, CO) schützt. Die Anreicherung des Transkriptionsfaktors und die Aktivierung der HO-1 sind gute Marker, um oxidativen Stress in der Zelle festzustellen.

Zu diesem Zweck wurden die RAW264.7 Makrophagen zeit- und konzentrationsabhängig mit den 12 nm SiO<sub>2</sub> NP in Medium ohne FCS exponiert und die Zellysate im Western Blot auf

die Stabilisierung von Nrf2 bzw. die Aktivierung der HO-1 getestet.

Zu den getesteten Zeitpunkten 2, 4 und 6 h konnte lediglich nach 6 h eine geringe Stabilisierung von Nrf2 für die SiO<sub>2</sub> NP exponierten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.9, 6h). Analog dazu konnte auch keine Aktivierung des Zielproteins HO-1 detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurde bei der CdO-Behandlung (Positivkontrolle für oxidativen Stress) eine Stabilisierung von Nrf2 mit korrespondierender Aktivierung des Proteins HO-1 erzeugt. Die geringe Aktivierung der oxidativen Stressantwort der Zellen nach SiO<sub>2</sub> NP Behandlung korrelierte auch mit dem Ergebnis des DCF-Assays (Abschnitt 3.2.3), dass durch die SiO<sub>2</sub> NP keine ROS generiert wurden. Die Behandlung mit LPS bewirkte weder eine Stabilisierung von Nrf2 noch eine Aktivierung der HO-1.



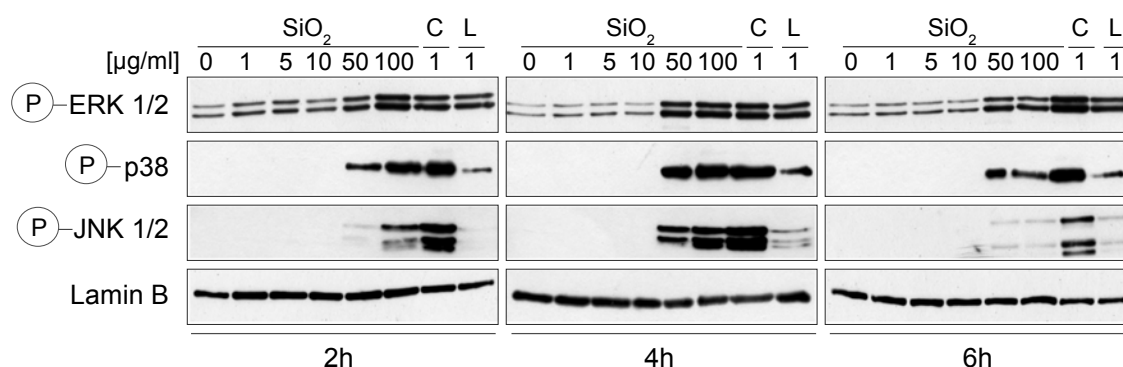
**Abbildung 3.9: Die oxidative Stressantwort wird nur gering nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition aktiviert.** Die RAW264.7 Makrophagen wurden konzentrationsabhängig (1, 5, 10, 50, 100 µg/ml mit 12 nm SiO<sub>2</sub> NP in Medium ohne FCS für 2, 4, 6 h behandelt und anschließend die Zellysate im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen Nrf2 und HO-1 analysiert. Als Ladekontrolle für gleiche aufgetragene Proteinmengen wurde PCNA verwendet.

### 3.4.2 Aktivierung des MAPK-Signalwegs nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition

Untersuchungen verschiedener Gruppen haben bereits belegt, dass die MAP-Kinasen an der Signaltransduktion nach Partikel-Behandlung beteiligt sein können (Hu et al., 2009). Für diese Arbeit stellte sich nun die Frage, ob auch die SiO<sub>2</sub> NP die MAPK aktivieren können und wenn ja, von welchen Faktoren die Induktion abhängig ist (Zeit, Konzentration). Weiterführend sollte auch untersucht werden, ob die Aktivierung der MAPK funktional ist, d.h. ob Substrate der MAPK ebenfalls aktiviert werden. Eine Aktivierung der verschiedenen Kinasen wurde über den Nachweis der Phosphorylierung der Proteine mittels Western Blot nachgewiesen. Als Positivkontrollen wurden CdO und LPS verwendet.

### Aktivierung der MAP-Kinasen p38, JNK1/2 und ERK 1/2

Zur Untersuchung der Aktivierung des MAPK-Signalweges wurden die RAW264.7 Zellen zeit- und konzentrationsabhängig mit den 12 nm SiO<sub>2</sub> NP in Medium ohne FCS exponiert und die Zelllysate im Western Blot auf die Aktivierung, d.h. Phosphorylierung, der MAP-Kinasen p38, JNK1/2 und ERK1/2 getestet. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.10 dargestellt. Alle drei MAP-Kinasen wurden zeit- und konzentrationsabhängig durch SiO<sub>2</sub> NP Exposition aktiviert. Eine Aktivierung der Kinasen war ab einer NP-Konzentration von 50 µg/ml zu beobachten und alle Kinasen wiesen ein Aktivitätsmaximum nach 4 h auf. Der Rückgang der Aktivierung war nach 6 h bei JNK1/2 am ausgeprägtesten. Gleiches galt auch für die verwendeten Positivkontrollen CdO und LPS. CdO aktivierte die MAPK sehr stark, wohingegen bei der LPS-Behandlung nur eine schwache Aktivierung der MAPK zu den untersuchten Zeitpunkten zu sehen war.



**Abbildung 3.10: Die MAP-Kinasen p38, JNK1/2 und ERK1/2 werden nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition aktiviert.** Die RAW264.7 Makrophagen wurden konzentrationsabhängig (1, 5, 10, 50, 100 µg/ml mit 12 nm SiO<sub>2</sub> NP sowie mit 1 µg/ml CdO (C) bzw. LPS (L) in Medium ohne FCS für 2, 4, 6 h behandelt. Die Aktivierung der MAP-Kinasen p38, JNK1/2 und ERK1/2 wurde im Western Blot mithilfe von phosphospezifischen Antikörpern durchgeführt. Als Ladekontrolle für gleiche aufgetragene Proteinmengen wurde Lamin B verwendet.

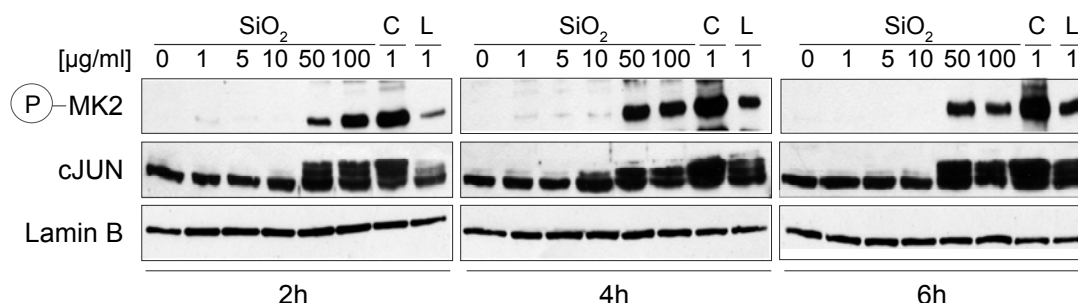
### Aktivierung der MAPK-Substrate MK2 und cJun

Zur Untersuchung der Funktionalität der Aktivierung der MAPK wurden mittels Western Blot die Aktivierung der entsprechenden Proteine MK2 (p38-Substrat) und cJun (JNK-Substrat) analysiert. MK2 ist an der Aktivierung der COX-2 bzw. an der posttranskriptionellen Regulation von TNF $\alpha$  beteiligt. cJun gehört mit zum AP-1 Komplex, einem Transkriptionsfaktor, der für die Aktivierung verschiedener Zielgene, u.a. der inflammatorischen Antwort, zuständig ist (Kaminska, 2005; Cuenda, 2007).

Die Ergebnisse sind in Abb. 3.11 dargestellt. Die Zielproteine MK2 und cJun wurden nach Exposition mit Partikeln zeitabhängig von den zugehörigen MAP-Kinasen phosphoryliert und demnach aktiviert. Phosphoryliertes cJun ist im Western Blot in Abb. 3.11 als Shift der Banden oberhalb des unphosphorylierten Proteins erkennbar. Die zeitliche Aktivierung der MK2 und



cJun korrelierte mit der Aktivierung der übergeordneten MAP-Kinasen p38 und JNK1/2, wodurch eine funktionale Aktivierung des MAPK-Signalwegs festgestellt werden konnte. Auch bei den verwendeten Positivkontrollen CdO und LPS war die MAPK-Aktivierung funktional und eine Phosphorylierung von MK2 und cJun konnte nachgewiesen werden.



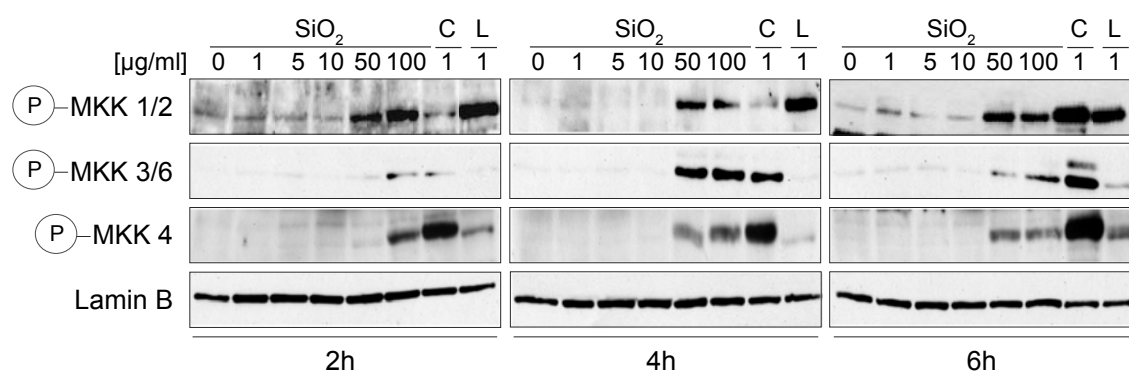
**Abbildung 3.11: Die MAPK-Substrate MK2 und cJun werden durch SiO<sub>2</sub> NP Exposition aktiviert** Die RAW264.7 Makrophagen wurden konzentrationsabhängig (1, 5, 10, 50, 100 µg/ml mit 12 nm SiO<sub>2</sub> NP sowie mit 1 µg/ml CdO (C) bzw. LPS (L) in Medium ohne FCS für 2, 4, 6 h behandelt. Die Aktivierung der MAPK-Substrate erfolgte im Western Blot mithilfe eines phosphospezifischen Antikörpers für MK2 und eines spezifischen Antikörpers für cJun. Als Ladekontrolle für gleiche aufgetragene Proteinmengen wurde Lamin B verwendet.

### Aktivierung der übergeordneten MAPK-Kinasen (MAP2K)

Ausgehend von der Induktion der MAP-Kinasen p38, JNK1/2 und ERK 1/2 wurde mittels Western Blot Analyse untersucht, ob auch die entsprechenden MAPK-Kinasen (MAP2K) nach Partikel-Exposition aktiviert wurden. Die Kinase MKK1/2 ist hauptsächlich für die Aktivierung der ERK1/2 zuständig, während MKK3/6 und MKK4 die Regulation der p38 beeinflussen und JNK über MKK4 und MKK7 aktiviert wird. (siehe auch Abb. 1.2).

Die Ergebnisse der Western Blots sind in Abb. 3.12 dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass auch die übergeordneten MAPK-Kinasen MKK1/2, MKK3/6 und MKK4 nach SiO<sub>2</sub> NP Behandlung aktiviert wurden und zeitlich mit der Aktivierung der MAPK korrelierten. Gleiches galt auch für die verwendeten Positivkontrollen CdO und LPS. Eine Aktivierung der MAPK-Kinase MKK7 nach Partikel-Exposition konnte nicht nachgewiesen werden.

Über die Vermittlung des Signals an die MAP2K nach Partikel-Behandlung ist bislang noch nichts Genaueres bekannt. Mögliche Kandidaten aus der Familie der MAP3-Kinasen sind TAK1, ASK1, RIPK1. Die Kinasen können über Oberflächenrezeptor-vermittelte Signale aktiviert werden. Wichtig sind hierbei die Toll-like Rezeptoren (TLRs) sowie der TNF $\alpha$ - und IL-1 Rezeptor. Diese Rezeptoren erkennen Pathogen- assoziierte Moleküle (PAMPs) wie Bakterien oder Viren, oder auch Gefahr-assozierte Moleküle (DAMPs), wie LPS oder Partikel, und aktivieren nach Oligomerisierung intrazelluläre Signalkaskaden (Gaestel et al., 2009).



**Abbildung 3.12: Die MAPK-Kinasen MKK1/2, MKK3/6 und MKK4 werden nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition aktiviert.** Die RAW264.7 Makrophagen wurden konzentrationsabhängig (1, 5, 10, 50, 100 µg/ml mit 12 nm SiO<sub>2</sub> NP sowie mit 1 µg/ml CdO (C) bzw. LPS (L) in Medium ohne FCS für 2, 4, 6 h behandelt. Der Nachweis der Aktivierung der MAP2K (MKK1/2, MKK3/6, MKK4) erfolgte im Western Blot mithilfe von phosphospezifischen Antikörpern. Als Ladekontrolle für gleiche aufgetragene Proteinmengen wurde Lamin B verwendet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition die oxidative Stressantwort nur sehr schwach aktiviert wurde, wohingegen bereits zu frühen Zeitpunkten (2 h) eine Aktivierung des MAPK-Signalwegs (MAP2K, MAPK, MAPK-Substrate) gezeigt werden konnte. Aber welche Konsequenzen hat die Aktivierung dieser Signalwege für die Zelle? Zu diesem Zweck wurden Genexpressionsstudien durchgeführt, die im nächsten Abschnitt erläutert werden.

### 3.5 Aktivierung der Genexpression der anti-oxidativen und proinflammatorischen Zellantwort nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition

Mögliche biologische Endpunkte der zellulären Reaktion nach Partikelexposition sollten vor allem bei sehr niedrigen Konzentrationen und zu frühen Zeitpunkten gewählt werden, da kurze Expositionszeiten sekundäre Nebeneffekte vermindern bzw. ausschließen können. Hierzu eignet sich die Analyse der Genexpression mittels quantitativer RealTime-PCR (qRT-PCR) sehr gut. Die möglichen auftretenden biologischen Effekte können zum einen auf eine Abwehrreaktion (anti-oxidativ) oder auf eine beginnende Entzündung hinweisen (proinflammatorisch). Basierend auf der Hypothese von Nel (Nel et al., 2006) und Untersuchungen von Ogawa (Ogawa et al., 2004) wurden verschiedene charakteristische Zielgene sowohl der anti-oxidativen als auch der proinflammatorischen Zellantwort ausgewählt und mittels qRT-PCR analysiert.

### Anti-Oxidative Zellantwort

Als Zielgene der anti-oxidativen Antwort wurden die Hämoxigenase 1 (HO-1), die NADPH-Chinon-Oxidoreduktase (NQO1) sowie die  $\gamma$ -Glutamat-Cystein Ligase ( $\gamma$ -GCL-C) ausgewählt. Die  $\gamma$ -GCL-C (C = katalytische Untereinheit) katalysiert den geschwindigkeits- bestimmenden Schritt der *de novo* Synthese von Glutathion und die NQO1 hat bei der zellulären Antwort auf von Chinonen ausgelösten oxidativen Stress eine entscheidende Funktion (Xia et al., 2004). Das Enzym katalysiert die Reduktion von Chinonen und inhibiert letztlich die ROS Bildung. Alle drei Gene werden über den Transkriptionsfaktor Nrf2 und auch über AP-1 reguliert.

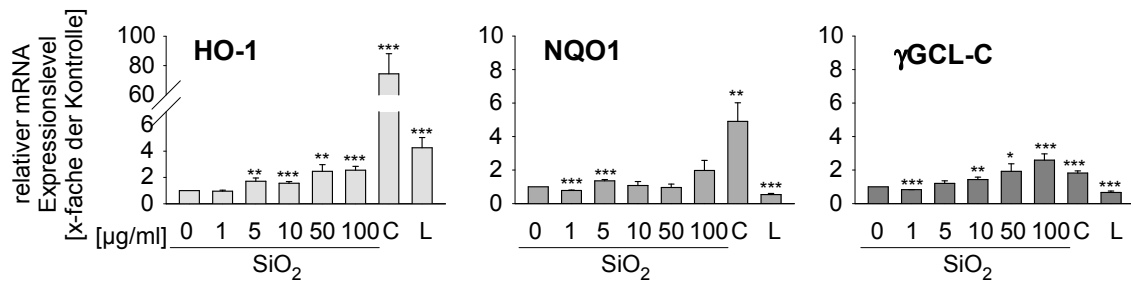
### Proinflammatorische Zellantwort

Als mögliche Zielgene der proinflammatorischen Zellantwort wurde eine Reihe von Genen ausgesucht, deren genauere Funktion und Regulation bereits in Abschnitt 1.3.4 erläutert wurde. Zu diesen Genen zählen  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$ , COX-2, IL-6, iNOS, MCP-1, Cxcl2, Mmp9 und FOS. Die Regulation der Biosynthese der Zytokine, Chemokine und Enzyme erfolgt auf verschiedenen Ebenen (transkriptionell, posttranskriptionell und sekretorisch). Hauptsächlich an der Aktivierung der Genexpression beteiligt sind die Transkriptionsfaktoren AP-1 und  $Nf-\kappa B$ , während bei der Stabilisierung der mRNA und der Translation die MAP-Kinase p38 sowie verschiedene miRNAs Einfluss nehmen können. Zusätzlich gibt es auch noch Regulationsmechanismen auf sekretorischer Ebene. Beispielsweise wird über die MAP-Kinase ERK das  $TNF\alpha$  sekretierende Enzym TACE (*TNF $\alpha$  converting enzyme*) reguliert (Ogawa et al., 2004, Kaminska, 2005; Cuenda et al., 2007; Gaestel et al., 2009).

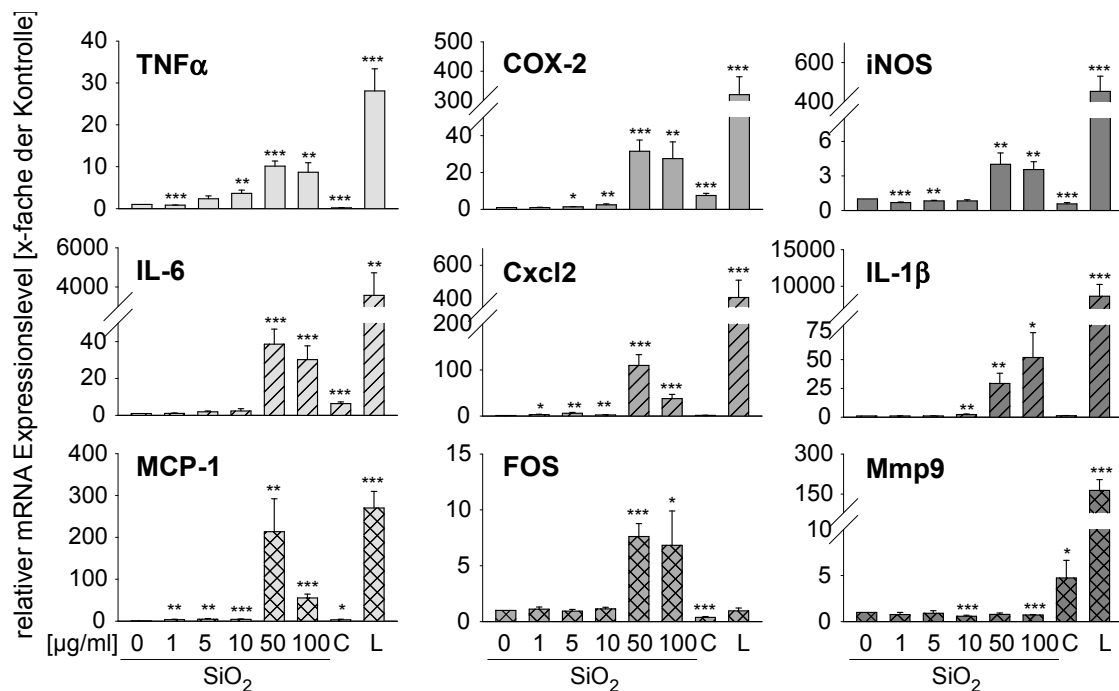
#### 3.5.1 Konzentrationsabhängige Genexpression nach Behandlung mit SiO<sub>2</sub> NP

Zunächst sollte ein Expressionsprofil der Makrophagen nach SiO<sub>2</sub> NP Behandlung erstellt werden. Dazu wurden zunächst die RAW264.7 Makrophagen konzentrationsabhängig (1, 5, 10, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ ) mit SiO<sub>2</sub> NP in Medium ohne FCS für 6 h behandelt und dann die Proben für die Analyse mittels qRT-PCR aufbereitet. Als Positivkontrollen wurden hierbei CdO für die anti-oxidative und LPS für die proinflammatorische Stressantwort verwendet. Für die Durchführung der qRT-PCR wurden genspezifische Primer eingesetzt und die Induktion der Genexpression nach der  $\Delta \Delta$  Ct-Methode in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle berechnet. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen (Abb. 3.13, Abb. 3.14) dargestellt.

Die untersuchten Zielgene der anti-oxidativen Stressantwort, HO-1 und  $\gamma$ -GCL-C, wurden konzentrationsabhängig nach Partikelexposition induziert und erreichten maximal eine 3-fache Induktion nach 6 h bei 50  $\mu\text{g/ml}$  SiO<sub>2</sub> NP. Eine schwache Induktion der NQO1 war lediglich bei der höchsten Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  zu sehen (Abb. 3.13). Die Positivkontrolle CdO zeigte eine starke Aktivierung der HO-1 und NQO1 mRNA Produktion, wohingegen nach LPS-Behandlung keine Aktivierung anti-oxidativer Gene zu beobachten war.



**Abbildung 3.13: Die anti-oxidative Zellantwort wird nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition auf Gen-Ebene nur schwach konzentrationsabhängig induziert.** RAW264.7 Makrophagen wurden für 6 h konzentrationsabhängig mit 12 nm SiO<sub>2</sub> NP (1, 5, 10, 50, 100 µg/ml) sowie mit jeweils 1 µg/ml CdO (C) und LPS (L) ohne FCS behandelt und mittels qRT-PCR analysiert. Dargestellt sind Gene der anti-oxidativen Zellantwort (HO-1, NQO1, γ-GCL-C). Angegeben sind die Mittelwerte ± s.e.m. aus drei unabhängigen Experimenten (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle).



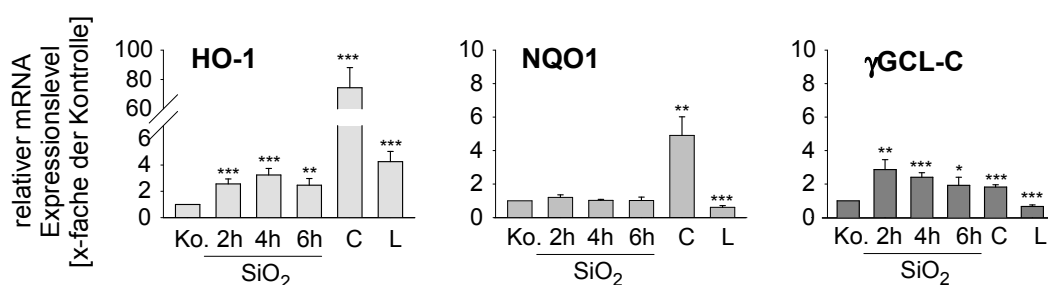
**Abbildung 3.14: SiO<sub>2</sub> NP (12 nm) aktivieren konzentrationsabhängig die proinflammatorische Zellantwort auf Gen-Ebene.** RAW264.7 Makrophagen wurden für 6 h konzentrationsabhängig mit 12 nm SiO<sub>2</sub> NP (1, 5, 10, 50, 100 µg/ml) sowie mit jeweils 1 µg/ml CdO (C) und LPS (L) ohne FCS behandelt und mittels qRT-PCR analysiert. Dargestellt sind Gene der proinflammatorischen Zellantwort (TNFα, COX-2, iNOS, IL-6, Cxcl2, IL-1β, MCP-1, FOS, Mmp9). Angegeben sind die Mittelwerte ± s.e.m. aus drei unabhängigen Experimenten (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle).

Die Gene der proinflammatorischen Zellantwort,  $\text{TNF}\alpha$ , COX-2, iNOS, IL-6, IL-1 $\beta$  und FOS, wurden ebenfalls konzentrationsabhängig nach 6 h Exposition mit  $\text{SiO}_2$  NP aktiviert, wobei die maximale Induktion bereits bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$   $\text{SiO}_2$  NP erreicht wurde (Abb. 3.14). Die Gene Cxcl2 und MCP-1 wurden zwar auch konzentrationsabhängig induziert, allerdings ging bei der höchsten  $\text{SiO}_2$  NP Dosis (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) die Aktivierung wieder stark zurück, was vermutlich durch die verstärkte Toxizität erklärt werden kann. Das Gen Mmp9 wurde nach  $\text{SiO}_2$  NP Exposition nicht aktiviert. Die Behandlung mit CdO bewirkte lediglich eine schwache Aktivierung der Gene COX-2, IL-6 sowie Mmp9. LPS hingegen konnte, wie erwartet, alle untersuchten Gene der proinflammatorischen Zellantwort stark aktivieren.

### 3.5.2 Zeitabhängige Genexpression nach Behandlung mit $\text{SiO}_2$ NP

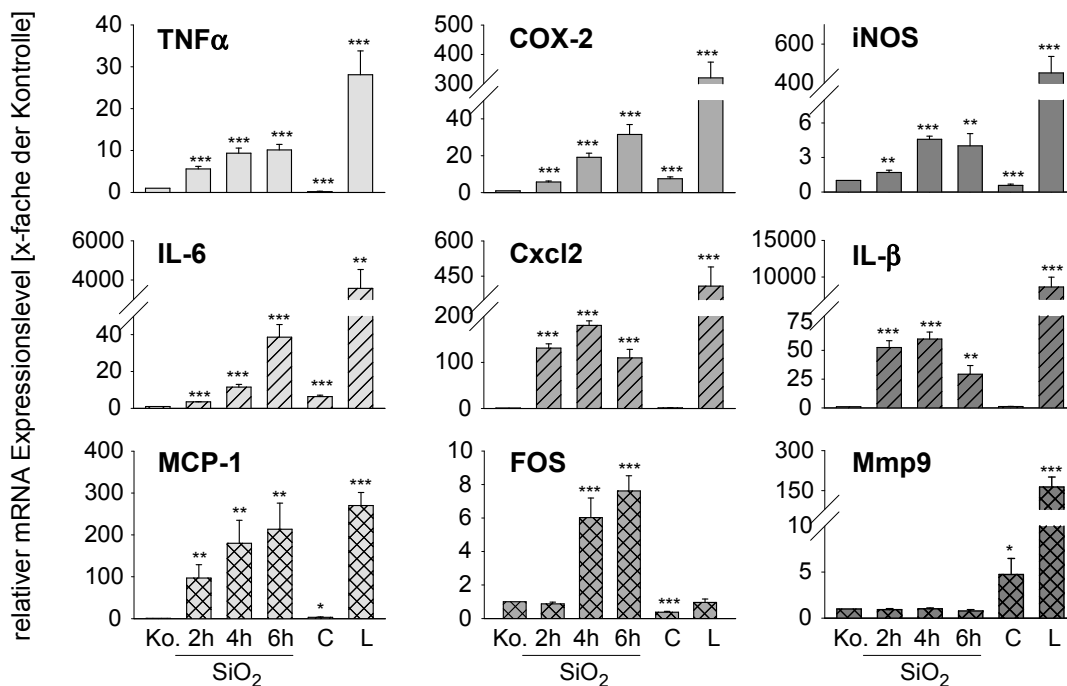
Beim Erstellen des Expressionsprofils der Makrophagen nach  $\text{SiO}_2$  NP Exposition erwies sich die Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  nach 6 h Behandlung am effektivsten. Es sollte nun aber auch der zeitliche Verlauf dieser Aktivierung untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die RAW264.7 Makrophagen für 2, 4, 6 h mit 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$   $\text{SiO}_2$  NP in Medium ohne FCS behandelt und dann die Proben für die Analyse mittels qRT-PCR aufbereitet. Für die Durchführung der qRT-PCR wurden genspezifische Primer eingesetzt und die Induktion der Genexpression nach der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle berechnet. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen (Abb. 3.15, Abb. 3.16) dargestellt.

Die Induktion der HO-1 blieb über den betrachteten Zeitraum von 2 - 6 h konstant niedrig (2,5 - 3 faches der Kontrolle), während für die NQO1 keine Aktivierung beobachtet werden konnte. Die  $\gamma\text{-GCL-C}$  wurde zum frühen Zeitpunkt 2 h aktiviert (3,5 fach) und nahm mit der Zeit wieder ab.



**Abbildung 3.15:  $\text{SiO}_2$  NP induzierte Genexpression der anti-oxidativen Zellantwort ist zeitabhängig.** RAW264.7 Makrophagen wurden für 2, 4 und 6 h mit 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  12 nm  $\text{SiO}_2$  NP sowie für 6 h mit jeweils 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  CdO (C) und LPS (L) ohne FCS behandelt und mittels qRT-PCR analysiert. Dargestellt sind Gene der anti-oxidativen Zellantwort (HO-1, NQO1,  $\gamma\text{-GCL-C}$ ). Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  s.e.m. aus drei unabhängigen Experimenten (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zur Kontrolle).

Bei der Analyse der Genexpression der proinflammatorischen Antwort (Abb. 3.16) war auffällig, dass sich die untersuchten Gene in früh- und spätaktivierte Gene unterteilen ließen. So wurde bei den Genen von  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{Cxcl2}$  und  $\text{MCP-1}$  bereits nach 2 h Exposition eine starke Aktivierung festgestellt. Nach längerer Exposition nahm die Aktivierung für  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{MCP-1}$  weiter zu, wohingegen bei  $\text{IL-1}\beta$  und  $\text{Cxcl2}$  das Aktivitätsmaximum nach 4 h wieder abnahm. Die Gene  $\text{COX-2}$ ,  $\text{iNOS}$ ,  $\text{IL-6}$  und  $\text{FOS}$  erreichten ihr Aktivitätsmaximum erst nach 6 h Behandlung und wurden so zu den spät-aktivierten Genen gezählt. Das Gen  $\text{Mmp9}$  wies auch im zeitlichen Verlauf keine Aktivierung auf.



**Abbildung 3.16:  $\text{SiO}_2$  NP Exposition induziert die Zielgenexpression der proinflammatorischen Zellantwort zeitabhängig.** RAW264.7 Makrophagen wurden für 2, 4, 6 h mit  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$   $12 \text{ nm}$   $\text{SiO}_2$  NP sowie für 6 h mit jeweils  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$   $\text{CdO}$  (C) und  $\text{LPS}$  (L) ohne FCS behandelt und mittels qRT-PCR analysiert. Dargestellt sind Gene der proinflammatorischen Zellantwort ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{COX-2}$ ,  $\text{iNOS}$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{Cxcl2}$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{MCP-1}$ ,  $\text{FOS}$ ,  $\text{Mmp9}$ ). Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  s.e.m. aus drei unabhängigen Experimenten (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zur Kontrolle).

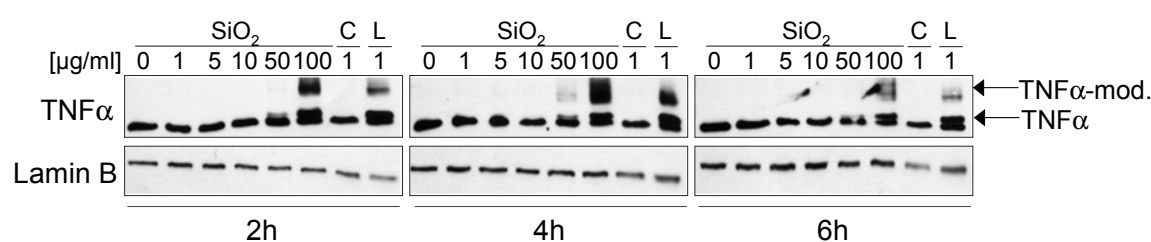
### 3.5.3 Validierung der Genexpressionsdaten auf Protein-Ebene

Nachdem nun eine ganze Reihe an Genen der proinflammatorischen Zellantwort durch  $\text{SiO}_2$  NP Exposition ( $12 \text{ nm}$ ) angeschaltet wurden, stellte sich die Frage, ob die Gen-Induzierung auch Auswirkungen auf Proteinebene hatte. Dazu wurden RAW264.7 Makrophagen konzentrationsabhängig ( $1, 5, 10, 50, 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) mit  $12 \text{ nm}$   $\text{SiO}_2$  NP für 2, 4 und 6 h behandelt. Der Kulturüberstand wurde für den Proteinnachweis mittels ELISA verwendet und die Zellysate

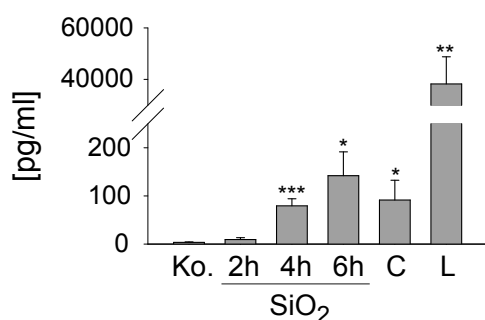
wurden im Western Blot auf die Aktivierung von intrazellulärem TNF $\alpha$  mithilfe spezifischer Antikörper getestet. Die Daten zur Validierung der Genexpression sind in Abb. 3.17 dargestellt. CdO und LPS wurden hier als Positiv-Kontrollen verwendet.

In Abb. 3.17 -A ist deutlich zu sehen, dass intrazelluläres TNF $\alpha$  nach 2 h Behandlung ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  12 nm SiO $_2$  NP produziert und auch über eine N-Glykosylierung modifiziert (TNF $\alpha$ -mod.) wurde, was nach 6 h wieder rückläufig war. Nach CdO-Behandlung war kein TNF $\alpha$  detektierbar, wohingegen die Behandlung mit LPS zu einem starken Anstieg von TNF $\alpha$  führte, was die Daten der Genaktivierung von TNF $\alpha$  bestätigte.

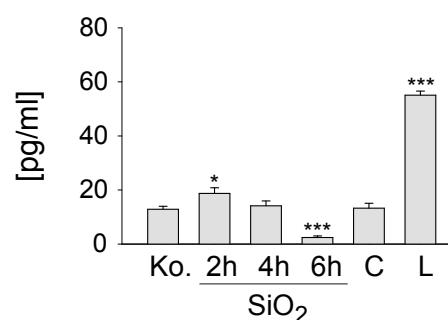
### A) TNF $\alpha$ intrazellulär



### B) Freisetzung TNF $\alpha$



### C) Freisetzung IL-6



**Abbildung 3.17: Validierung der Genexpressionsdaten auf Proteinebene** A) RAW264.7 Makrophagen wurden konzentrationsabhängig (1, 5, 10, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ ) mit 12 nm SiO $_2$  NP für 2, 4 und 6 h sowie für 6 h mit jeweils 1  $\mu\text{g/ml}$  CdO (C) und LPS (L) ohne FCS behandelt und mittels Western Blot auf die Produktion von intrazellulärem TNF $\alpha$  analysiert. Lamin B wurde als Kontrolle für gleich aufgetragene Proteinmengen verwendet. B + C) RAW264.7 Makrophagen wurden mit 50  $\mu\text{g/ml}$  12 nm SiO $_2$  NP für 2, 4 und 6 h sowie für 6 h mit jeweils 1  $\mu\text{g/ml}$  CdO (C) und LPS (L) ohne FCS behandelt und im Kulturüberstand die Freisetzung der Proteine B) TNF $\alpha$  und C) IL-6 mittels ELISA analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  s.e.m. aus vier unabhängigen Experimenten (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle).

Mittels ELISA (Abb. 3.17, B & C) wurde auch die Sekretion der untersuchten Proteine getestet. Nach Behandlung der Makrophagen mit 50  $\mu\text{g/ml}$  SiO $_2$  NP konnte eine zeitliche Zunahme der TNF $\alpha$ -Sekretion gemessen werden, wohingegen kaum IL-6 sezerniert wurde. LPS-Behandlung führte sowohl zur Freisetzung von TNF $\alpha$  als auch IL-6. Die Ergebnisse der TNF $\alpha$ -Sekretion korrelierten ebenfalls mit den Daten der Genexpression.

Im Gegensatz dazu konnte trotz IL-6 Genaktivierung nur eine sehr geringe Freisetzung des zugehörigen Zytokins gemessen werden. Ähnliches galt auch für die IL-1 $\beta$ -Sekretion. Die Messwerte des ELISAs für die Freisetzung des IL-1 $\beta$  Proteins nach SiO<sub>2</sub> NP- sowie LPS-Behandlung lagen unterhalb der Nachweisgrenze. Eine Generierung von NO als Indikator für eine iNOS Proteinsynthese und deren Funktionalität konnte ebenfalls nach Partikel-Behandlung nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Es ist sehr wahrscheinlich, dass trotz Genaktivierung von IL-6, IL-1 $\beta$  und iNOS weitere Regulationsmechanismen eine Freisetzung der Proteine bzw. von NO verhindern, was weitere Untersuchungen erfordert. Es besteht auch die Möglichkeit, dass die Zytokine von den Nanopartikeln gebunden und nicht mehr im ELISA nachgewiesen werden können.

Die gefundene Aktivierung verschiedener Gene der proinflammatorischen Zellantwort konnte also für einige Gene validiert werden. Wie aber hängen nun die gefundene Genexpression mit der Aktivierung der Signalwege zusammen? Zu diesem Zweck wurden Inhibitor-Studien durchgeführt, um die möglichen Zusammenhänge aufzuklären. Diese werden im nächsten Abschnitt ausführlich erläutert.

## **3.6 Inhibitor-Studien zur Aufklärung der Regulation der Signalaktivierung nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition**

In den vorangegangenen Abschnitten (Abschnitt 3.4; Abschnitt 3.5) konnte gezeigt werden, dass nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition die anti-oxidative Stressantwort der Zelle nur schwach aktiviert wurde. Im Gegensatz dazu wurden sowohl der MAPK-Signalweg als auch verschiedene Gene der proinflammatorischen Zellantwort stark aktiviert. Um die Zusammenhänge der Aktivierung der verschiedenen Signalwege mit der Induktion der Genexpression nach Nanopartikel-Exposition zu klären, wurden Inhibitor-Studien durchgeführt, welche in den folgenden Abschnitten erläutert werden.

### **3.6.1 Inhibierung von oxidativem Stress mittels N-Acetyl-Cystein**

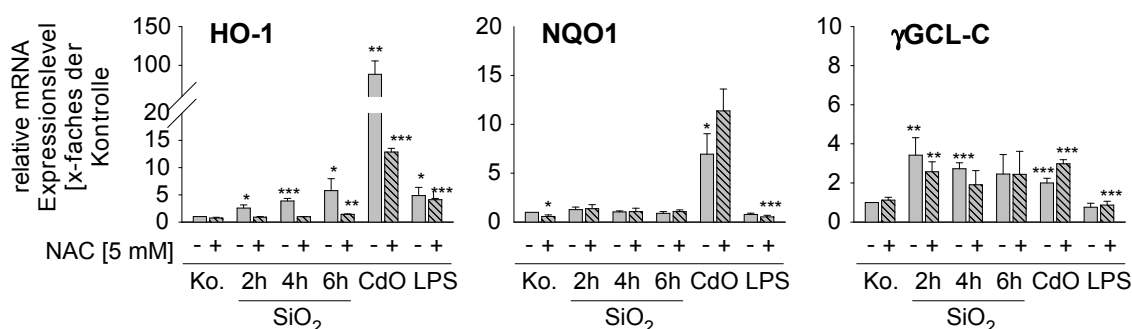
Bislang wurde nur eine sehr schwache Aktivierung der anti-oxidativen Stressantwort nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition in den RAW264.7 Makrophagen beobachtet. Auch konnten keine intrazellulär gebildeten ROS detektiert werden. Allerdings gibt es Beispiele aus der Literatur, die moderaten oxidativen Stress nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition gezeigt haben (Park et al., 2009; Eom et al., 2009). Deshalb wurde zur genaueren Aufklärung das Antioxidanz N-Acetyl-L-Cystein (NAC) bei der Partikel-Exposition der Makrophagen mit 12 nm SiO<sub>2</sub> NP eingesetzt. Die anti-oxidative Wirkung von NAC beruht zum einen auf seiner Rolle als Radikalfänger. Über die freie SH-Gruppe kann direkt eine Interaktion mit Oxidantien wie beispielsweise Wasserstoffperoxid



(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Hydroxylradikal ( $\cdot$ OH) oder hypochlorige Säure (HOCl) stattfinden (Gillissen et al., 1997), so dass zwei freie Sulfhydrylgruppen zu einer Disulfidverbindung oxidiert werden. Zum anderen dient NAC durch die Bereitstellung von Cystein der Glutathion-Synthese, einem weiteren zentralen, zelleigenen Antioxidanz.

### Untersuchung der Genexpression in Abhängigkeit von NAC

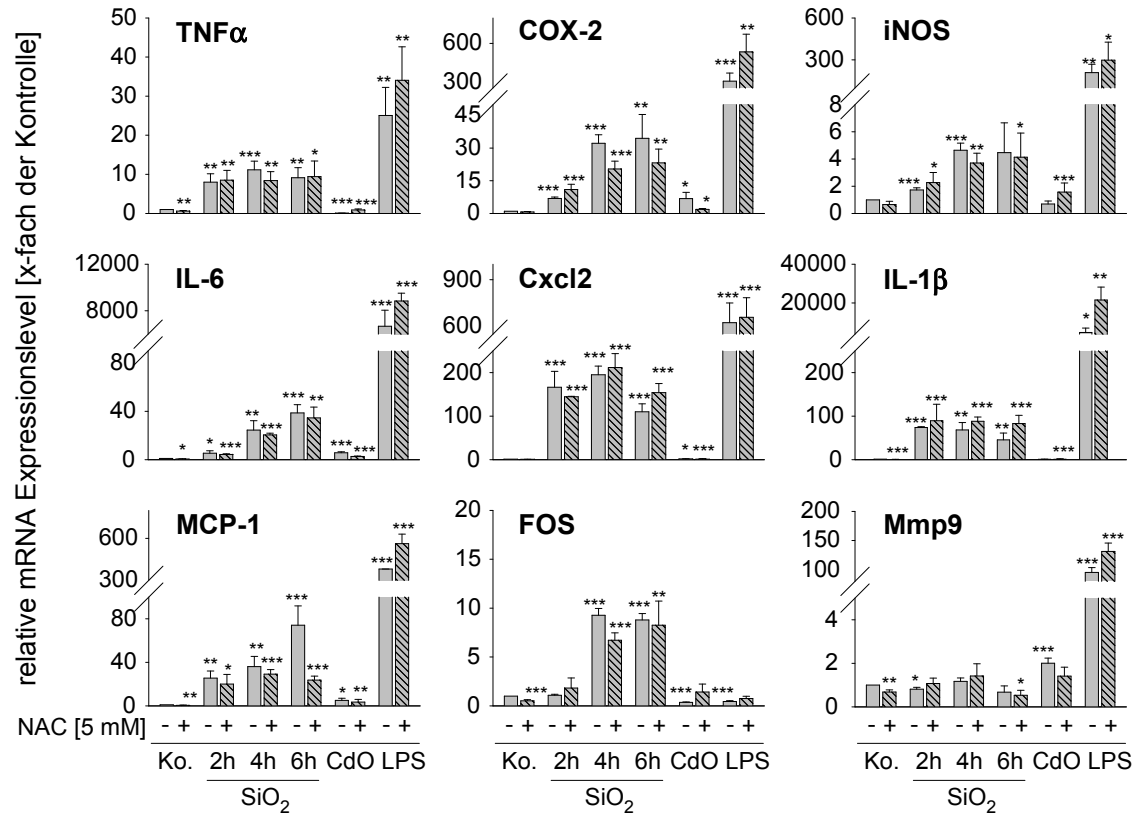
Nach 12 nm SiO<sub>2</sub> NP Exposition wurden in den Makrophagen sowohl Gene der anti-oxidativen als auch der proinflammatorischen Zellantwort zeit- und konzentrationsabhängig angeschaltet. Die stärkste Induktion der Genexpression wurde für eine Konzentration von 50 µg/µl zwischen 4 h und 6 h gemessen. Daher sollte nun der Einfluss von NAC auf die verschiedenen Gene der zellulären Stressantwort getestet werden. Nach erfolgter Präinkubation mit NAC (5 mM) wurden die Zellen für 2, 4 und 6 h mit 50 µg/µl SiO<sub>2</sub> NP +/- 5 mM NAC behandelt und nach Aufarbeitung der Proben die Zielgene mittels qRT-PCR analysiert. Als Positivkontrollen wurden CdO für die anti-oxidative und LPS für die proinflammatorische Zellantwort verwendet. Angegeben sind die Induktionswerte der Gene in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle. Die Funktionalität von NAC wurde mittels DCF-Assay nachgewiesen (Anhang Abb. A.1).



**Abbildung 3.18: NAC hemmt die HO-1 Genexpression nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition.** RAW264.7 Makrophagen wurden zunächst 30 min mit 5 mM NAC vorbehandelt, dann für 2, 4 und 6 h mit 50 µg/ml 12 nm SiO<sub>2</sub> NP sowie für 6 h mit jeweils 1 µg/ml CdO (C) und LPS (L) ohne FCS +/- 5 mM NAC exponiert und mittels qRT-PCR analysiert. Dargestellt sind Gene der anti-oxidativen Zellantwort (HO-1, NQO1,  $\gamma$ -GCL-C). Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  s.e.m. aus drei unabhängigen Experimenten (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle).

Es ist deutlich zu erkennen (Abb. 3.18), dass die HO-1 Induktion nach CdO-Behandlung durch NAC gehemmt wurde, wohingegen NAC die schwache Aktivierung der NQO1 sogar leicht verstärkte. Die  $\gamma$ -GCL-C wurde auch unabhängig von NAC durch CdO kaum aktiviert. Für die Behandlung mit den SiO<sub>2</sub> NP galt ähnliches. Nur die Genexpression der HO-1 wurde durch NAC gehemmt, die anderen beiden Gene der anti-oxidativen Antwort wurden nicht beeinflusst. Für die proinflammatorische Zellantwort nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition (Abb. 3.19) ergab sich ein ähnliches Bild. Lediglich die Induktion der untersuchten Gene COX-2 und MCP-1 konnte

leicht durch die Behandlung mit NAC inhibiert werden, während die Expression der restlichen Gene ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{iNOS}$ ,  $\text{Cxcl2}$ ,  $\text{FOS}$ ,  $\text{Mmp9}$ ) nicht beeinflusst wurde. Auch wurden durch NAC die basalen Expressionslevel der Zielgene nicht wesentlich verändert.



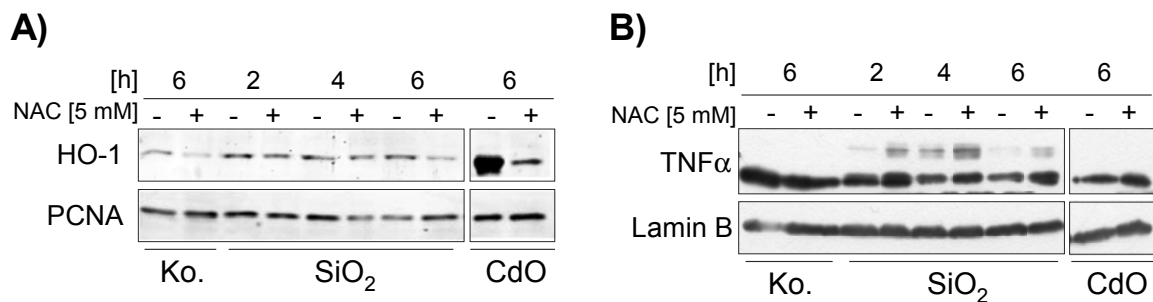
**Abbildung 3.19: NAC hemmt nur leicht die Induktion einiger Gene der proinflammatorischen Stressantwort.** RAW264.7 Makrophagen wurden zunächst 30 min mit 5 mM NAC vorbehandelt, dann für 2, 4 und 6 h mit 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  12 nm  $\text{SiO}_2$  NP sowie für 6 h mit jeweils 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  CdO (C) und LPS (L) ohne FCS -/+5 mM NAC exponiert und mittels qRT-PCR analysiert. Dargestellt sind Gene der proinflammatorischen Zellantwort ( $\text{TNF}\alpha$ , COX-2,  $\text{iNOS}$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{Cxcl2}$ ,  $\text{IL-1}\beta$ , MCP-1, FOS, Mmp9). Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  s.e.m. aus drei unabhängigen Experimenten (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zur Kontrolle).

### Validierung der reprimierten Geninduktion nach $\text{SiO}_2$ NP Exposition durch NAC

Durch NAC konnte nur die Genexpression der HO-1, COX-2 und MCP-1 nach  $\text{SiO}_2$  NP Behandlung gehemmt werden. Welche Konsequenzen hat dies nun auf Proteinebene? Hierfür wurden die Makrophagen wie unter Abschnitt 3.6.1 beschrieben, behandelt und anschließend die Zellysate im Western Blot auf die Aktivierung der Proteine mittels spezifischer Antikörper getestet. Als Positivkontrolle wurde hierfür CdO eingesetzt.

Die Induktion der HO-1 auf Proteinebene (Abb. 3.20 -A) konnte nur im Falle der Positivkontrolle CdO durch NAC gehemmt werden, wohingegen NAC keinen eindeutigen Einfluss auf die geringe HO-1 Induktion nach SiO<sub>2</sub> NP Behandlung hatte. Über den HO-1 Nachweis auf Proteinebene konnten somit die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse bestätigt werden.

SiO<sub>2</sub> NP-induziertes intrazelluläres TNF $\alpha$  (Abb. 3.20-B) wurde durch Präinkubation mit NAC sogar leicht verstärkt. Dieser Verstärkungseffekt war auf Gen-Ebene nicht zu detektieren, was sich aber durch die verschiedenen Regulationsebenen der TNF $\alpha$  -Produktion (siehe Abschnitt 1.3.4) erklären lässt. Nach CdO-Behandlung wurde weder die Genexpression noch die Proteinproduktion von TNF $\alpha$  aktiviert (siehe auch Abb. 3.17).



**Abbildung 3.20: NAC-Effekte auf die durch SiO<sub>2</sub> NP induzierte Genexpression können auf Proteinebene validiert werden.** Die RAW264.7 Makrophagen wurden zunächst 30 min mit 5 mM NAC vorbehandelt, dann für 2, 4 und 6 h mit 50  $\mu$ g/ml 12 nm SiO<sub>2</sub> NP oder mit 1  $\mu$ g/ml CdO (C) in Medium ohne FCS -/+5 mM NAC exponiert und anschließend die Zellysate im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen A) HO-1 und B) intrazelluläres TNF $\alpha$  untersucht. Als Ladekontrolle für gleiche aufgetragene Proteinmengen wurde Lamin B verwendet.

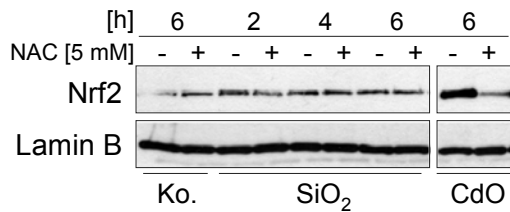
### Einfluss von NAC auf die durch SiO<sub>2</sub> NP aktivierten Signalwege

Es sollte nun auch der Einfluss von NAC auf die durch SiO<sub>2</sub> NP Behandlung erzeugte Aktivierung der Signalwege untersucht werden. Dazu wurden die Makrophagen wie unter Abschnitt 3.6.1 beschrieben, behandelt und anschließend die Zellysate im Western Blot auf die Induktion bzw. Phosphorylierung der entsprechenden Proteine mittels spezifischer Antikörper getestet. Als Positivkontrolle wurde CdO verwendet.

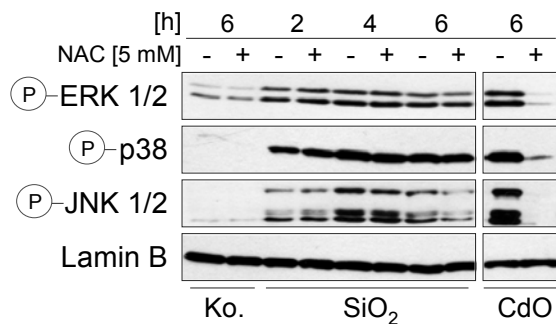
In Abb. 3.21 -A ist deutlich erkennbar, dass durch NAC nur die CdO-induzierte Stabilisierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 gehemmt wurde, während die schwache Nrf2-Stabilisierung in SiO<sub>2</sub> NP exponierten Zellen nicht beeinflusst wurde. Desweiteren wurde auch die Aktivierung der MAP-Kinasen p38, JNK1/2 und ERK1/2, sowie deren Substrate MK2 und cJun (Abb. 3.21 -B) nicht durch NAC beeinflusst. Bei der Positivkontrolle CdO allerdings konnte die Partikel-bedingte Aktivierung des MAPK-Signalwegs mittels NAC effektiv gehemmt werden. Dadurch lassen sich dann auch die Hemmung der durch CdO induzierten COX-2 auf Genebene (Abb. 3.19 -B) durch NAC erklären, da p38 und JNK an der Genexpression sowie Stabilisierung

der COX-2 mRNA beteiligt sind, was bereits für verschiedene Stimuli wie LPS, TPA oder  $\text{TNF}\alpha$  gezeigt wurde (Kang et al., 2007).

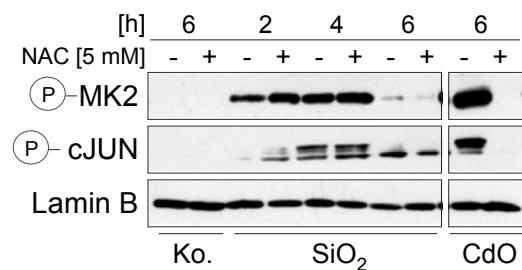
### A) Stabilisierung von Nrf2



### B) MAPK Aktivierung



### C) MAPK Zielproteine



**Abbildung 3.21: NAC hemmt weder die SiO<sub>2</sub> NP induzierte Aktivierung des Nrf2- noch des MAPK-Signalwegs.** RAW264.7 Makrophagen wurden zunächst 30 min mit 5 mM NAC vorbehandelt, dann für 2, 4 und 6 h mit 50 µg/ml 12 nm SiO<sub>2</sub> NP in Medium ohne FCS -/+5 mM NAC exponiert und anschließend die Zellysate im Western Blot mit spezifischen Antikörpern auf A) die Stabilisierung von Nrf2 und B) die Aktivierung des MAPK-Signalwegs untersucht. Als Ladekontrolle für gleiche aufgetragene Proteinmengen wurde Lamin B verwendet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition oxidativer Stress in den RAW264.7 Makrophagen nur extrem schwach detektiert werden konnte und die Zugabe des Antioxidanz NAC auch nicht die durch SiO<sub>2</sub> NP aktivierte MAPK Kaskade bzw. Genexpression hemmen konnte.

### 3.6.2 Hemmung des MAPK-Signalwegs durch MAPK-Inhibitoren

Zur Klärung der Zusammenhänge zwischen der Partikel-induzierten Aktivierung des MAPK-Signalwegs und der beobachteten Aktivierung der proinflammatorischen Stressantwort auf Genebene wurden die Inhibitoren SB203580 (SB), SP600125 (SP) und PD98059 (PD) zur Hemmung der MAPK-Funktion eingesetzt. Diese hemmen über ihre Funktion als ATP-Antagonisten die Phosphorylierung der jeweiligen Zielproteine. Über den SB-Inhibitor wird die Phosphorylierung von p38-Substraten, wie beispielsweise MK2, gehemmt. Gleichermaßen kann in Anwesenheit des SP-Inhibitors keine Phosphorylierung von JNK-Zielproteinen, wie cJun, stattfinden. Der Angriffspunkt des PD-Inhibitors ist die upstream lokalisierte MAPK-Kinase MKK1/2, so dass eine Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK1/2 nicht mehr stattfinden kann.

Für die Versuche wurden die Zellen zunächst für 30 min mit den jeweiligen MAPK-Inhibitoren (SB, SP, PD; 10  $\mu$ M) vorbehandelt und im Anschluss mit den Partikeln in Medium ohne FCS -/+ Inhibitor exponiert. Die Kulturüberstände wurden für die ELISA-Untersuchungen verwendet und die Zellen mittels Western Blot bzw. qRT-PCR analysiert.

#### Funktionalität der MAPK-Inhibitoren

Zunächst sollte getestet werden, ob die MAPK-Inhibitoren SB, SP und PD die Aktivierung der Zielproteine MK2, cJun und ERK1/2 effektiv hemmen konnten. Dazu wurden die RAW264.7 Makrophagen mit den MAPK-Inhibitoren bzw. 0,1 % DMSO behandelt und im Western Blot mittels phosphospezifischer Antikörper die Aktivierung der MAPK sowie deren Substrate MK2 und cJun getestet. Bei der Kontrollbehandlung der Zellen mit 0,1 % DMSO und SiO<sub>2</sub> NP (Abb. 3.22) konnte, wie schon in Abschnitt 3.4.2 gezeigt, eine Aktivierung der MAPK sowie ihrer Substrate MK2 und cJun festgestellt werden. Gleiches galt auch für die verwendeten Positivkontrollen CdO und LPS nach sechsständiger Behandlung.

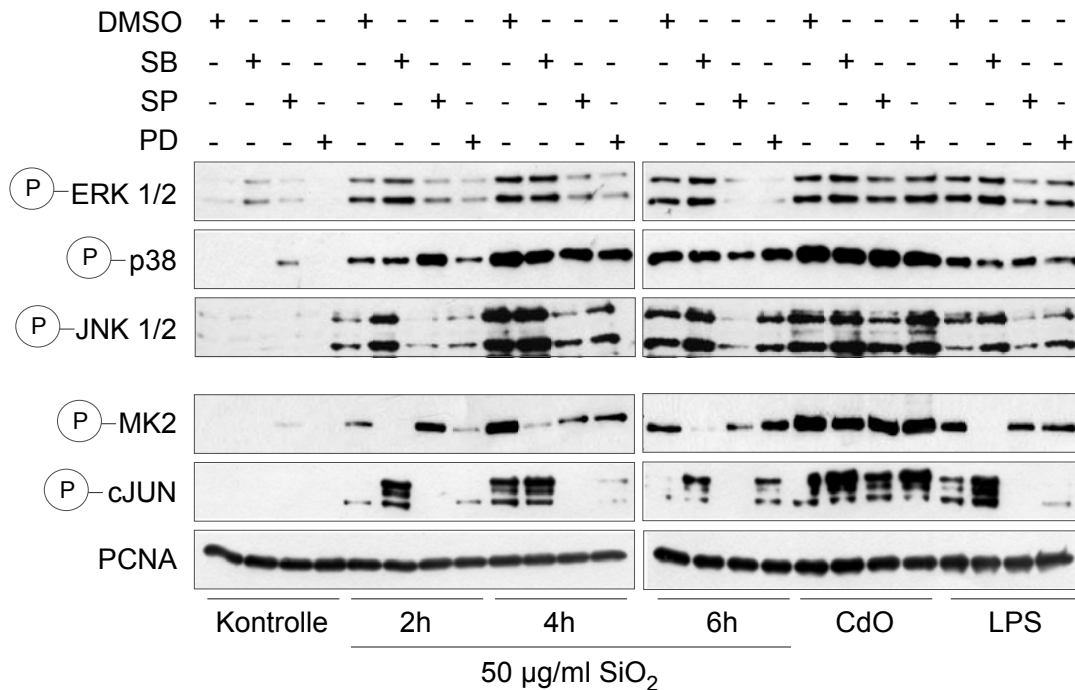
Nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition konnte der SB-Inhibitor effektiv die MK2-Aktivierung hemmen und hatte keinen Einfluss auf die Aktivierung von p38 und ERK1/2. Allerdings wurde eine verstärkte Phosphorylierung der JNK1/2 sowie des Substrats cJun detektiert, was durch die Feedback-Regulation von p38 und JNK1/2 bei der Signaltransduktion der MAPK erklärt werden kann (Cuadrado und Nebreda, 2010).

Über den SP-Inhibitor konnte die cJun-Phosphorylierung dauerhaft gehemmt werden. Allerdings wurden dadurch auch die Aktivierung der JNK1/2 sowie ERK1/2 nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition dauerhaft gemindert. Im Gegensatz dazu ergab sich bereits basal eine verstärkte Phosphorylierung von p38 und MK2, was wiederum eine Folge der schon erwähnten Feedback-Regulation des MAPK-Signalwegs war.

Der PD-Inhibitor erfüllte seine Funktion, in dem er dauerhaft die Phosphorylierung der ERK1/2 minderte, aber diese nicht vollständig hemmen konnte. Die Phosphorylierungen von p38 und MK2 blieben durch den PD-Inhibitor unbeeinflusst nach SiO<sub>2</sub> NP Behandlung und

für die JNK1/2 sowie ihres Substrats cJun wurde lediglich nach 4h Behandlung eine reduzierte Aktivierung festgestellt.

Für die Positivkontrolle LPS ergab sich ein ähnliches Bild. Die Inhibitoren SB, SP und PD konnten effektiv die Phosphorylierung von MK2 bzw. cJun und ERK1/2 hemmen. Die bereits beschriebene Feedbackregulation bei der Aktivierung der p38 und JNK konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnten die Inhibitoren die CdO-vermittelte Aktivierung der MAPK sowie ihrer Substrate nicht beeinflussen.



**Abbildung 3.22: MAPK-Inhibitoren hemmen effektiv die Aktivierung ihrer jeweiligen Zielproteine.** Die RAW264.7 Makrophagen wurden zunächst 30 min mit 10 µM MAPK-Inhibitor (SB, SP, PD) vorbehandelt, dann für 2, 4 und 6 h mit 50 µg/ml 12 nm SiO<sub>2</sub> NP sowie mit jeweils 1 µg/ml CdO (C) und LPS (L) in Medium ohne FCS -/+10 µM Inhibitor (SB, SP, PD) bzw. 0,1% DMSO exponiert und anschließend die Zellysate im Western Blot mit phosphospezifischen Antikörpern auf die Aktivierung der MAPK (p38, JNK, ERK) und ihrer Substrate (MK2, cJun) untersucht. Als Ladekontrolle für gleiche aufgetragene Proteinmengen wurde PCNA verwendet.

Die MAPK-Inhibitoren erfüllten also ihre hemmende Funktion effektiv, wobei auch die bereits in der Literatur beschriebene Feedback-Regulation von p38 und JNK1/2 zu detektieren war.

### Einfluss der MAPK-Inhibitoren auf die durch SiO<sub>2</sub> NP induzierten Genexpression

Nachdem die Funktionalität der MAPK-Inhibitoren getestet worden war, sollten nun die Effekte der Hemmung des MAPK-Signalwegs auf Gen-Ebene nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition getestet werden. Die Expression der meisten Gene der proinflammatorischen Zellantwort wird über die Transkriptionsfaktoren AP-1 und Nf- $\kappa$ B vermittelt. AP-1 ist ein dimerer Transkriptionsfaktor, der sich aus unterschiedlichen Proteinen zusammensetzt (siehe auch Abschnitt 1.3.3). Unter anderem zählen dazu cJun und FOS. Im Hinblick darauf kann also eine Hemmung des JNK-vermittelten Signals Einfluss auf die Aktivierung der Transkription nehmen. Die Biosynthese der getesteten Zytokine wird aber auf mehreren Ebenen reguliert. So nimmt p38 über eine MK2-vermittelte Stabilisierung der generierten mRNA auch Einfluss auf die Expression der Zielgene. ERK1/2 kann über Regulation von FOS auch Einfluss auf die AP-1 regulierten Gene nehmen (Kaminska, 2005; Cuenda, 2007). Dazu wurden die RAW264.7 Makrophagen mit den MAPK-Inhibitoren bzw. DMSO vorbehandelt, dann mit SiO<sub>2</sub> NP sowie den Positivkontrollen CdO und LPS behandelt und anschließend die Genexpression mittels qRT-PCR analysiert. Die Geninduktionen wurden dabei auf die DMSO-behandelte Kontrolle bezogen.

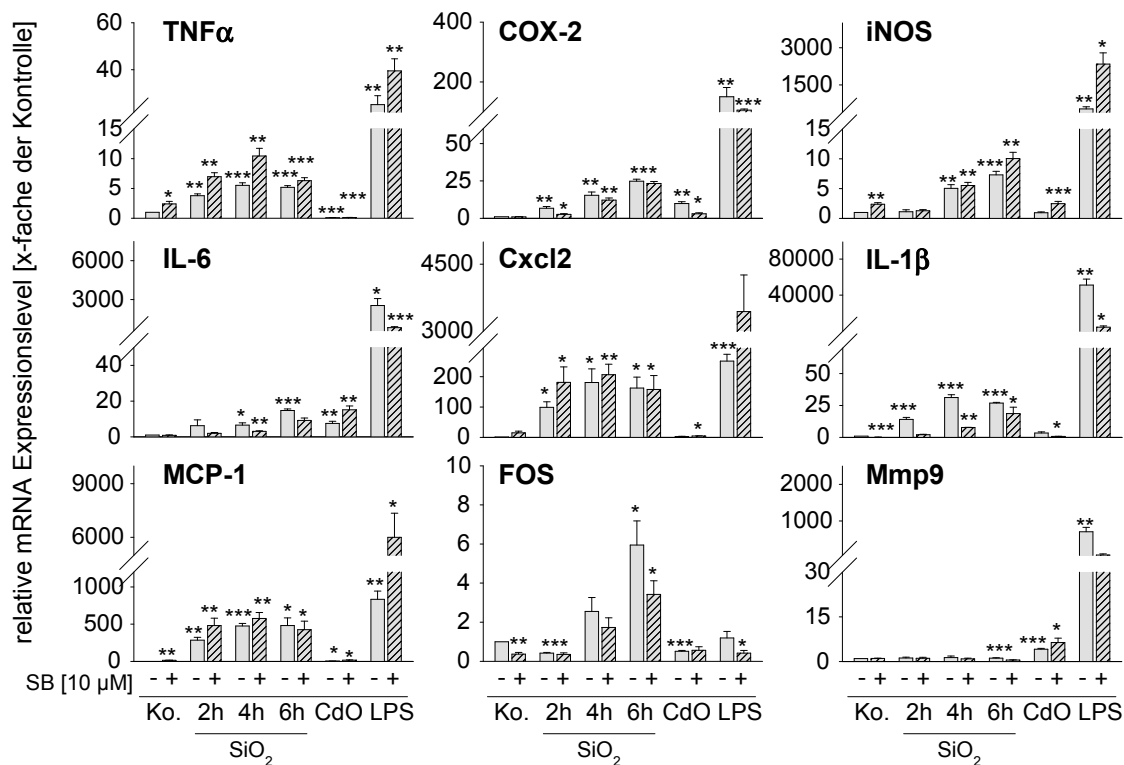
Generell ist anzumerken, dass durch die DMSO-Behandlung die Expression der Gene COX-2, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und FOS im Vergleich zur normalen Behandlung insgesamt leicht vermindert war. Die Expressionslevels von iNOS, Cxcl2 und Mmp9 wurden nicht beeinflusst, wohingegen die MCP-1 Genexpression nach DMSO Gabe stark anstieg. Die Induzierbarkeit selbst wurde aber nicht beeinflusst. Die eingesetzten Inhibitoren hatten mehr oder weniger stark ausgeprägt einen Einfluss auf die basalen Level der Zielgene. Daher sind in Tabelle (Tabelle 3.3) die Änderung der basalen Genexpression sowie der Einfluss auf die Induzierbarkeit der Gene zusammengefasst dargestellt.

Gen	+ SB	(I)	+ SP	(I)	+ PD	(I)
TNF $\alpha$	2,5	-	1,5	2-fach $\uparrow$	0,5	-
COX-2	1	-	6,5	5-fach $\downarrow$	0,5	3-fach $\downarrow$
IL-6	0,7	-	2	-	2	-
IL-1 $\beta$	0,2	3-fach $\uparrow$	3	3-fach $\uparrow$	1,5	5-fach $\downarrow$
iNOS	2,5	2-fach $\downarrow$	4,5	5-fach $\downarrow$	1,5	-
MCP-1	13,5	10-fach $\downarrow$	3	-	2	10-fach $\downarrow$
Cxcl2	15	5-fach $\downarrow$	2	3-fach $\uparrow$	1,5	2,5-fach $\downarrow$
Mmp9	1	-	5	3-fach $\downarrow$	1,5	2,5-fach $\downarrow$
FOS	0,5	-	0,5	-	0,5	4-fach $\downarrow$

**Tabelle 3.3: Übersicht über die Effekte der MAPK-Inhibitoren auf den Basallevel und die Induzierbarkeit der untersuchten Gene.** Angegeben sind die Änderung des Basallevels für den jeweiligen Inhibitor als Vielfaches der unbehandelten Kontrolle sowie die Änderung der Induzierbarkeit (I) des Gens nach Behandlung mit SiO<sub>2</sub> NP. (-): Induzierbarkeit unverändert; ( $\uparrow$ ): x-fach erhöhte Induzierbarkeit; ( $\downarrow$ ): x-fach erniedrigte Induzierbarkeit.

### Effekte des SB-Inhibitors (Hemmung der p38 Funktion)

Die Hemmung der p38-Funktion mittels SB-Inhibitor verursachte eine basale Erhöhung der Expression von  $\text{TNF}\alpha$ , iNOS, MCP-1 und Cxcl2. Die basale Expression von IL-1 $\beta$  und FOS wurde stark vermindert, wohingegen die Gene COX-2, IL-6 und Mmp9 basal nicht beeinflusst wurden (Abb. 3.23). Keine Hemmung der Geninduktion nach  $\text{SiO}_2$  NP Exposition war für die Gene  $\text{TNF}\alpha$  und COX-2 zu beobachten. Bei MCP-1, Cxcl2 und iNOS war ebenfalls kein inhibierender Effekt auf die induzierte Gesamtmenge der jeweiligen mRNA zu beobachten. Da jedoch die basalen Expressionslevel durch den SB-Inhibitor schon stark erhöht waren, wurde die Induzierbarkeit durch die  $\text{SiO}_2$  NP Behandlung stark reduziert (siehe Tabelle 3.3). Dauerhaft gehemmt werden konnte die induzierte mRNA Gesamtmenge der Gene von IL-6, IL-1 $\beta$  und FOS, wobei allerdings die Induzierbarkeit durch die Partikel-Behandlung erhalten blieb.



**Abbildung 3.23: Der SB-Inhibitor beeinflusst das Genexpressionsprofil der Makrophagen nach  $\text{SiO}_2$  NP Exposition.** RAW264.7 Makrophagen wurden zunächst 30 min mit 10  $\mu\text{M}$  SB-Inhibitor bzw. 0,1 % DMSO vorbehandelt und dann für 2, 4 und 6 h mit 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  12 nm  $\text{SiO}_2$  NP sowie für 6 h mit jeweils 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  CdO (C) und LPS (L) ohne FCS -/+10  $\mu\text{M}$  SB-Inhibitor bzw. 0,1% DMSO exponiert und mittels qRT-PCR analysiert. Dargestellt sind Gene der proinflammatorischen Zellantwort ( $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 $\beta$ , COX-2, iNOS, IL-6, Cxcl2, MCP-1, FOS, Mmp9). Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  s.e.m. aus 3 unabhängigen Experimenten (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zur Kontrolle).

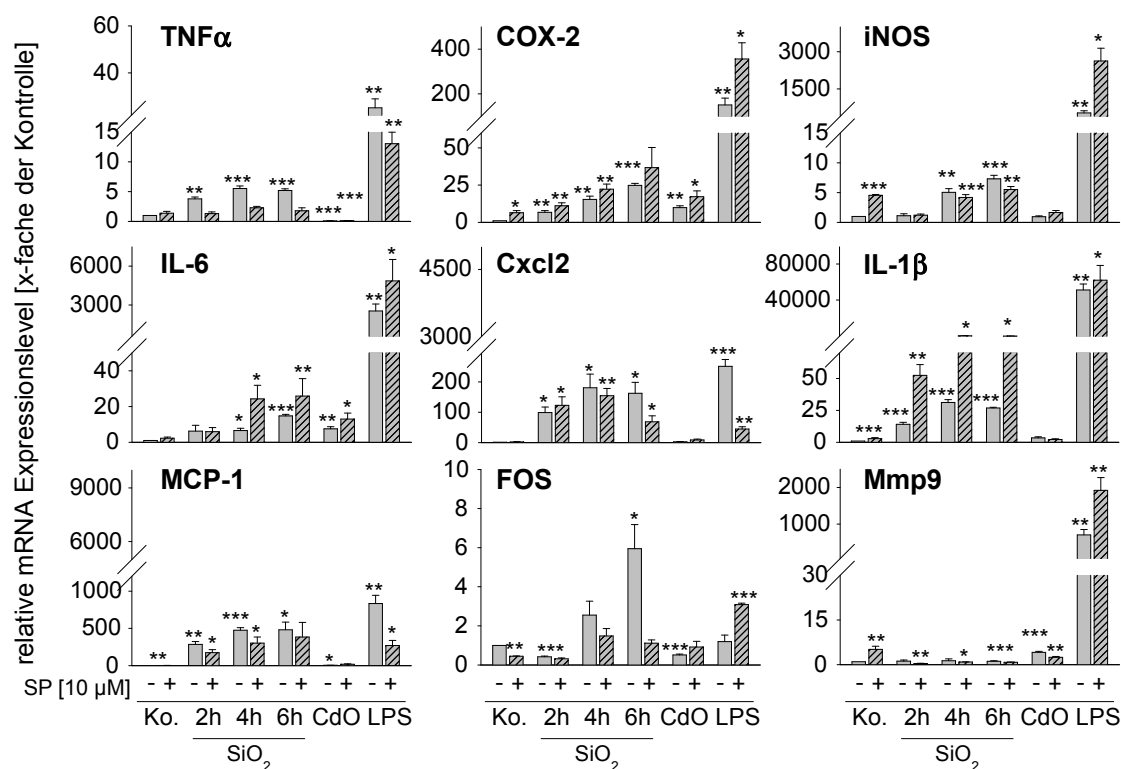
Die Behandlung mit CdO führte für alle untersuchten Gene nur zu einer geringen Aktivierung



der Genexpression, wobei der SB-Inhibitor lediglich die Geninduktion der COX-2 hemmen konnte. Nach LPS-Behandlung wurden alle getesteten Gene stark aktiviert. Ein hemmender Einfluss des SB-Inhibitors war dabei für IL-6, IL-1 $\beta$ , FOS und Mmp9 zu beobachten. Nicht wesentlich beeinträchtigt wurde die Aktivierung der Gene TNF $\alpha$ , iNOS und COX-2. Auffällig war, dass nach SB-Behandlung die LPS-induzierte Expression von MCP-1 und Cxcl2 weiter erhöht wurde, was aber auf den erhöhten Basal-Level der Gene zurückzuführen ist (Tabelle 3.3).

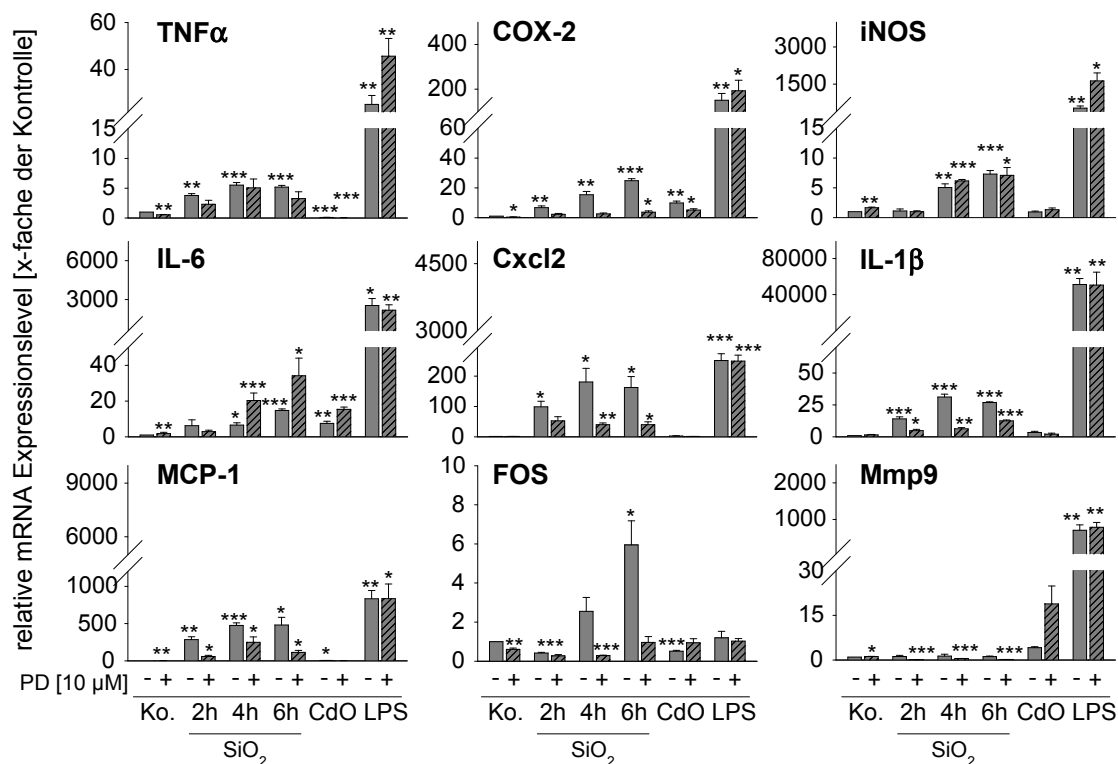
### Effekte des SP-Inhibitors (Hemmung der JNK1/2 Funktion)

Nach Hemmung der JNK1/2-Funktion mittels SP-Inhibitor wurden alle untersuchten Gene bis auf FOS basal verstärkt exprimiert (Tabelle 3.3). Die induzierte Gesamt-mRNA von iNOS und COX-2 nach SiO<sub>2</sub> NP-Behandlung konnte durch den SP-Inhibitor nicht gehemmt werden. Jedoch wurde aufgrund der erhöhten basalen Expression die Induzierbarkeit durch den SP-Inhibitor verringert.



**Abbildung 3.24: Der SP-Inhibitor beeinflusst das Genexpressionsprofil der Makrophagen nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition.** RAW264.7 Makrophagen wurden zunächst 30 min mit 10  $\mu$ M SP-Inhibitor bzw. 0,1 % DMSO vorbehandelt, dann für 2, 4 und 6 h mit 50  $\mu$ g/ml 12 nm SiO<sub>2</sub> NP sowie für 6 h mit jeweils 1  $\mu$ g/ml CdO (C) und LPS (L) ohne FCS -/+10  $\mu$ M SP-Inhibitor bzw. 0,1% DMSO exponiert und mittels qRT-PCR analysiert. Dargestellt sind Gene der proinflammatorischen Zellantwort (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , COX-2, iNOS, IL-6, Cxcl2, MCP-1, FOS, Mmp9). Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  s.e.m. aus 3 unabhängigen Experimenten (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle).

Bei den Genen MCP-1, Cxcl2 und FOS war eine geminderte Gen-Aktivierung durch die SiO<sub>2</sub> NP nach SP-Inhibitor Behandlung zu beobachten, wobei die Induktion von TNF $\alpha$  fast vollständig gehemmt werden konnte (Abb. 3.24). Im Gegensatz dazu verursachte der SP-Inhibitor eine verstärkte Expression der Gene IL-6 und IL-1 $\beta$  nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition. Die Behandlung mit CdO zusammen mit SP-Inhibitor hatte lediglich auf die Expression von Mmp9 eine hemmende Wirkung. Die schwache Induktion der restlichen proinflammatorischen Gene blieb unverändert. Eine Reduktion der LPS induzierten Genaktivierung durch den SP-Inhibitor konnte für Cxcl2, TNF $\alpha$  und MCP-1 beobachtet werden, wohingegen die induzierte Gesamt-mRNA von iNOS, IL6, Mmp9, COX-2 und FOS durch den SP-Inhibitor verstärkt wurde.



**Abbildung 3.25: Der PD-Inhibitor beeinflusst das Genexpressionsprofil der Makrophagen nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition.** RAW264.7 Makrophagen wurden zunächst 30 min mit 10  $\mu$ M PD-Inhibitor bzw. 0,1 % DMSO vorbehandelt und dann für 2, 4 und 6 h mit 50  $\mu$ g/ml 12 nm SiO<sub>2</sub> NP sowie für 6 h mit jeweils 1  $\mu$ g/ml CdO (C) und LPS (L) ohne FCS -/+10  $\mu$ M PD-Inhibitor bzw. 0,1% DMSO exponiert und mittels qRT-PCR analysiert. Dargestellt sind Gene der proinflammatorischen Zellantwort (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , COX-2, iNOS, IL-6, Cxcl2, MCP-1, FOS, Mmp9). Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  s.e.m. aus 3 unabhängigen Experimenten (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle).

### Effekte des PD-Inhibitors (Hemmung ERK1/2 Aktivierung)

Durch Einsatz des PD-Inhibitors konnte die Phosphorylierung von ERK1/2 vermindert werden (Abb. 3.22). Auswirkungen auf die basalen Expressionslevels der untersuchten Gene wurden ebenfalls kaum beobachtet (Tabelle 3.3). Nach SiO<sub>2</sub> NP-Exposition konnte mittels PD-Inhibitor

die Aktivierung von  $\text{TNF}\alpha$  leicht gehemmt werden (Abb. 3.25). Eine drastischere Reduktion bewirkte der PD-Inhibitor auf die  $\text{SiO}_2$  NP induzierte Expression von  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{Cxcl2}$ ,  $\text{MCP-1}$ ,  $\text{COX-2}$  und  $\text{FOS}$  zu allen beobachteten Zeitpunkten. Die Expression von  $\text{IL-6}$  hingegen wurde noch verstärkt, wohingegen die Induktion der  $\text{iNOS}$  PD-unabhängig verlief.

Nach CdO-Behandlung wurde durch Hemmung der Kinase  $\text{ERK1/2}$  die Expression der  $\text{COX-2}$  reduziert und die Expression von  $\text{IL-6}$  und  $\text{Mmp9}$  verstärkt. Der PD-Inhibitor hatte nur eine verstärkende Wirkung auf die LPS induzierte Expression der Gene  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{iNOS}$ , wohingegen die restlichen untersuchten Gene unbeeinflusst blieben auf die Aktivierung aller untersuchten Gene.

Zusammenfassen lässt sich sagen, dass die MAPK-Inhibitoren eine vielfältige Wirkung auf das Expressionsprofil der proinflammatorischen Gene nach  $\text{SiO}_2$  NP Behandlung hatten, was sich durch bisherige Erkenntnisse der Regulation der untersuchten Gene erklären lässt. Welche Konsequenzen haben aber nun die Hemmung der verschiedenen Kinasen auf die Biosynthese der untersuchten Proteine? Im nächsten Abschnitt wurden daher einige Gene auf Proteinebene untersucht.

### **Einfluss der MAPK-Inhibitoren auf die $\text{SiO}_2$ NP induzierte Proteinsynthese**

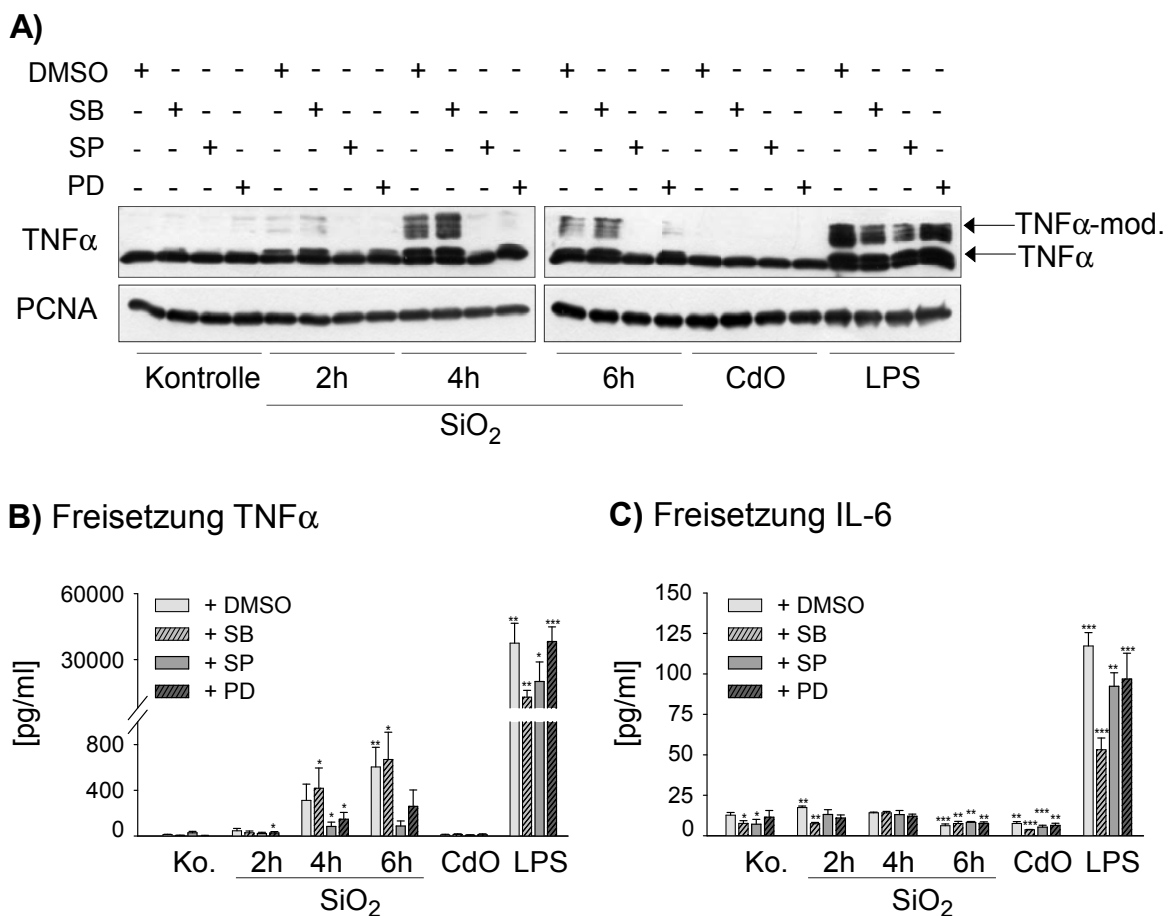
Zur Validierung der Daten der Genexpressionsanalyse nach Partikel-Behandlung in Anwesenheit der MAPK-Inhibitoren (SB, SP, PD) wurden zum einen intrazelluläres  $\text{TNF}\alpha$  im Zellysats mittels Western Blot analysiert, zum anderen die Sekretion von  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-6}$  mittels ELISA gemessen. Die RAW264.7 Makrophagen wurden wie bei der Genexpressionsanalyse mit den Inhibitoren vorbehandelt und im Anschluss mit Partikeln exponiert.

#### **Effekte des SB-Inhibitors**

Die Behandlung mit dem SB-Inhibitor hatte keine Auswirkungen auf den basalen Proteinlevel von intrazellulärem  $\text{TNF}\alpha$  sowie auch der sezernierten Zytokine  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-6}$  (Abb. 3.26). Nach 4 h und 6 h Behandlung mit  $\text{SiO}_2$  NP konnte auch unabhängig vom SB-Inhibitor eine starke Produktion an intrazellulärem  $\text{TNF}\alpha$  detektiert werden. Die sezernierten Mengen an  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-6}$  wurden ebenfalls nicht durch den SB-Inhibitor beeinflusst, was die Daten der Genexpressionsanalyse bestätigt. Nach CdO-Behandlung wurde keiner der untersuchten Parameter aktiviert, was ebenfalls mit den Daten der Genexpression korreliert. Die Positivkontrolle LPS hingegen verursachte eine starke Aktivierung von intrazellulärer Behandlung zeigte eine starke Induktion inflammatorischer Mediatoren wie  $\text{TNF}\alpha$ , welche nur leicht durch den Einsatz des SB-Inhibitors gehemmt werden konnte. Stärker ausgeprägt war hingegen die Reduktion der sezernierten Proteine  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-6}$  nach SB-Behandlung. Diese leichte Hemmung durch den SB-Inhibitor auf Proteinebene war auch bei der Analyse der Genexpression wiederzufinden.

### Effekte des SP-Inhibitors

Intrazelluläres TNF $\alpha$  konnte zwar nach Behandlung mit SP-Inhibitor noch detektiert werden, wohingegen modifiziertes TNF $\alpha$  nicht mehr vorhanden war. Infolgedessen war auch die gemessene Menge an sezerniertem TNF $\alpha$  durch SP-Behandlung drastisch reduziert worden. Auch dieses Ergebnis korrelierte mit den Daten der Genexpressionsstudie. Der Effekt des SP-Inhibitors auf die LPS induzierten Proteine zeigte ein ähnliches Bild. Hier war der Proteinlevel von intrazellulärem TNF $\alpha$  nur gering erniedrigt und eine leichte Verringerung der freigesetzten Proteine TNF $\alpha$  und IL-6 konnte im ELISA gemessen werden. Diese Daten korrelierten ebenfalls mit der Genexpression.



**Abbildung 3.26: Einfluss der MAPK-Inhibitoren auf die SiO<sub>2</sub> NP induzierte Proteinsynthese.** Die RAW264.7 Makrophagen wurden zunächst 30 min mit 10  $\mu$ M MAPK-Inhibitor (SB, SP, PD) bzw. 0,1 % DMSO vorbehandelt und dann für 2, 4 und 6 h mit 50  $\mu$ g/ml 12 nm SiO<sub>2</sub> NP und mit jeweils 1  $\mu$ g/ml CdO (C) bzw. LPS (L) in Medium ohne FCS -/+10  $\mu$ M Inhibitor (SB, SP, PD) bzw. 0,1% DMSO exponiert. A) Die Zellysate wurden im Western Blot mit spezifischen Antikörpern auf die Aktivierung von intrazellulärem TNF $\alpha$  untersucht. Als Ladekontrolle für gleiche aufgetragene Proteinmengen wurde PCNA verwendet. Die Kulturüberstände wurden quantitativ auf die Freisetzung von B) TNF $\alpha$  und C) IL-6 analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  s.e.m. aus vier unabhängigen Experimenten (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle).

**Effekte des PD-Inhibitors**

Nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition mit dem PD-Inhibitor konnte eine verminderte Bildung und Modifizierung von intrazellulärem TNF $\alpha$  (Abb. 3.26 -A) sowie sezerniertem TNF $\alpha$  (Abb. 3.26 -B) detektiert werden, was zum einen die Daten der Genexpression bestätigt, zum anderen aber noch auf zusätzliche Funktionen von ERK1/2 bei der Sezernierung von TNF $\alpha$  schließen lässt. PD hatte keine Effekte auf die LPS induzierte Genaktivierung und Proteinsynthese, was sich auf die schwache Hemmung der LPS-induzierten ERK-Phosphorylierung zurückführen lässt (Abschnitt 3.6.2).

Es konnte demnach gezeigt werden, dass die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse nach Behandlung mit den MAPK-Inhibitoren auf Proteinebene validiert werden konnten.

### 3.7 Etablierung eines Mikroskopie-basierten Hochdurchsatz-Verfahrens (HTC) zur genaueren Untersuchung der Zelltod-Mechanismen

In den vorangegangenen Abschnitten wurden bereits die vielfältigen Effekte der Behandlung von Makrophagen mit SiO<sub>2</sub> NP auf Gen- und Proteinebene erläutert. Es wurde auch versucht, unter Zuhilfenahme von verschiedenen Inhibitoren die genaueren Zusammenhänge der aktivierten Signalmechanismen aufzuklären. Die Konsequenzen der Behandlung für die Zellen wurden bislang nur über colorimetrische Zytotoxizitäts-Assays (LDH, WST-1) erfasst, wobei die gemessenen Indikatoren für Zelltod (Membran-Permeabilität, metabolische Aktivität) sich auf die gesamte Zellpopulation beziehen. Um nun aber ein genaueres Bild über die zellulären Konsequenzen zu erhalten und möglichst viele Parameter in kurzer Zeit mit wenig Aufwand zu analysieren, wurde ein automatisiertes, Fluoreszenz-Mikroskopie basiertes Screening-Verfahren entwickelt. Hier werden die Zellen zunächst im 96-well Format mit den zu untersuchenden Substanzen (Chemikalien, Partikel) exponiert, dann entweder lebend oder fixiert mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt und über ein automatisiertes Fluoreszenzmikroskop die Bildakquisition durchgeführt. Die sich anschließende quantitative Auswertung der Bilddaten erfolgt ebenfalls automatisiert mithilfe der Scan<sup>®</sup>Software.

Vorteile dieser Fluoreszenz-Mikroskopie basierten Screening-Methode liegen in ihrer Schnelligkeit und Effizienz. Über die Lebend-Anfärbung der Zellen mit Hoechst und PI können in einem Versuch Aussagen über die Zellzahl, die Vitalität der Zellen, die Art des Zelltods (Apoptose, Nekrose) sowie morphologische Veränderungen auf Einzelzellebene getroffen werden. Für die Versuche wurden 96-well Platten verwendet, wodurch auch ein hoher Durchsatz an verschiedenen Behandlungen (*High-throughput*) mit z.B. verschiedenen Nanopartikeln oder Inhibitoren erzielt wird. Über die Fluoreszenzmikroskopie wird ein hoher Informationsgehalt (*High-content*) generiert, so dass eine Vielzahl verschiedener Parameter auf Einzelzellebene analysiert werden können.

Die genaue Durchführung des Apoptose-Assays und das Auswertungsprinzip sind in Abschnitt 2.2.8 genauer erläutert. Im Folgenden werden die ausgewerteten Daten sowie exemplarische Bilder für die jeweiligen Behandlungen dargestellt.

#### 3.7.1 Apoptose-Assay mit 12 nm SiO<sub>2</sub> NP

Es konnte bereits über konventionelle Toxizitätsassays (LDH- und WST-1 Assay, Abschnitt 3.2) gezeigt werden, dass die Behandlung der RAW264.7 Makrophagen mit 50 µg/ml SiO<sub>2</sub> NP (12 nm) schon zu frühen Zeitpunkten (6 h) in Abwesenheit von FCS zur Freisetzung von LDH und zu einem Rückgang der mitochondrialen Aktivität führte. Eine genauere Untersuchung des

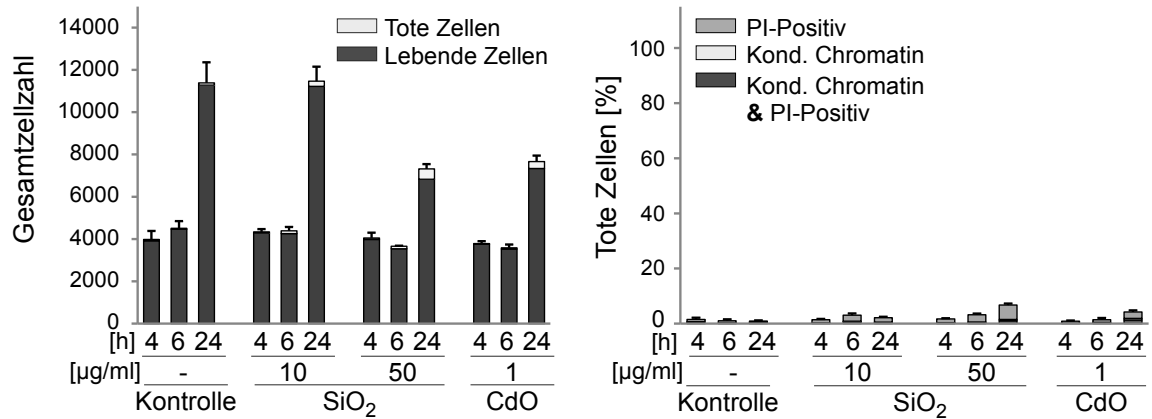
Zelltods wurde mittels des Apoptose-Assays durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen nach der Partikelexposition lebend mit Hoechst und PI gefärbt, dann Bilder mit einem automatisierten Fluoreszenzmikroskop aufgenommen und die Daten über die Scan<sup>®</sup> Software ausgewertet. In Abb. 3.27 ist die quantitative Auswertung der Behandlung -/+10 % FCS dargestellt.

Es ist deutlich zu erkennen (Abb. 3.27 -A), dass bei der Behandlung mit SiO<sub>2</sub> NP in Medium mit FCS die Proliferation der Zellen nur bei der hohen Dosis von 50 µg/ml und 24 h Inkubationszeit leicht beeinträchtigt wurde, während bei der niedrigen SiO<sub>2</sub> NP Dosis (10 µg/ml) sowie der unbehandelten Kontrolle eine Verdreifachung der Gesamtzellzahl nach 24 h detektiert wurde. Auch der Anteil an toten Zellen war nach Behandlung mit 50 µg/ml SiO<sub>2</sub> NP nach 24 h leicht erhöht auf 6 %, wobei die meisten Zellen nekrotisch (PI-positiv) waren. Nach Behandlung mit CdO wurde ebenfalls nur die Proliferation leicht beeinträchtigt, es waren aber kaum tote Zellen zu detektieren.

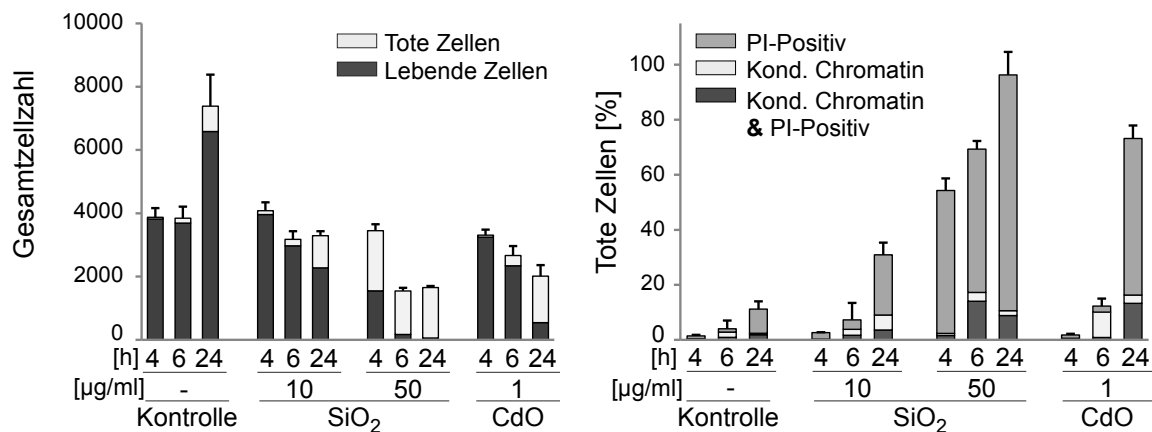
Die gleiche Behandlung unter Serum-freien Bedingungen (Abb. 3.27 -B) lieferte dagegen drastischere Ergebnisse. Die Proliferation der Kontrollzellen wurde durch den Mangel an Serum etwas eingeschränkt, da nach 24 h Behandlung im Gegensatz zu einer Verdreifachung in Anwesenheit von Serum nur eine Verdopplung der Gesamtzellzahl stattgefunden hatte. Allerdings war nach 24 h auch ein größerer Anteil an toten Zellen von 9 % zu beobachten. Bei der niedrigen SiO<sub>2</sub> NP Konzentration (10 µg/ml) nahm die Gesamtzellzahl im Vergleich zur Kontrolle nach 6 h bzw. 24 h Behandlung nur leicht auf 85 % ab, während bei 50 µg/ml eine starke Reduktion der Gesamtzellzahl auf 42 % nach 24 h Behandlung zu beobachten war. Hier betrug der Anteil toter Zellen bereits nach vierstündiger Behandlung knapp 55 %, wobei davon 85 % nekrotisch waren. Auch bei der Positivkontrolle CdO trat nach 24 h ein Rückgang der Zellzahl auf 56 % gekoppelt mit einem Anstieg toter Zellen nach 24 h auf.

Bei der Unterteilung der toten Zellen in die einzelnen Zelltod-Arten war ein kleiner Teil der Kontrollzellen (8 %) nach 24 h PI-positiv, also durch Nekrose wahrscheinlich infolge des Mangels an Wachstumsfaktoren geschädigt. Bei der subtoxischen SiO<sub>2</sub> NP Dosis (10 µg/ml) nahm der Anteil an toten Zellen in allen drei Zelltod-Arten mit der Zeit zu, wobei der Hauptteil der Zellen nach 24 h nekrotisch (22 %) war. Bei der hohen SiO<sub>2</sub> NP Dosis (50 µg/ml) befand sich der Hauptteil der toten Zellen bereits nach 4 h Behandlung in der PI-positiven Fraktion (52 %). Der Anteil der nekrotischen Zellen nahm mit der Zeit noch zu sowie auch der Anteil der Zellen (9- 14 %), die doppelt positiv (kondensiertes Chromatin & PI-positiv) waren. Die Fraktion der Zellen, welche nur kondensiertes Chromatin aufwiesen, lag unter 5 %. Die SiO<sub>2</sub> NP verursachten also konzentrationsabhängig ein Absterben der Makrophagen hauptsächlich durch nekrotische Prozesse. Bei der Positivkontrolle CdO dagegen befanden sich die toten Zellen zunächst in der früh-apoptotischen Phase (nach 6 h), gekennzeichnet durch kondensiertes Chromatin, während nach 24 h Behandlung 57 % der Zellen nekrotisch und nur noch 15 % spät-apoptotisch waren.

**A) Behandlung mit 10 % FCS**

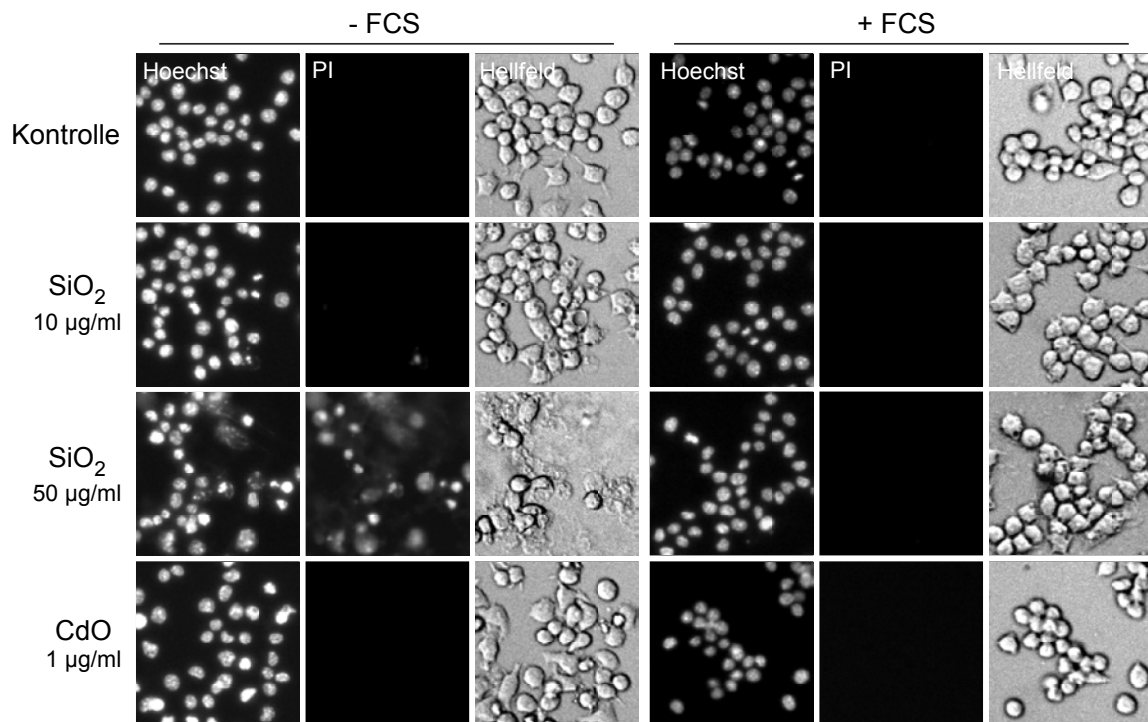


**B) Behandlung ohne FCS**



**Abbildung 3.27: SiO<sub>2</sub> NP verursachen Serum-abhängig Nekrose.** RAW264.7 Makrophagen wurden für 4, 6 und 24 h mit 10 und 50 µg/ml 12 nm SiO<sub>2</sub> NP sowie mit 1 µg/ml CdO A) mit 10 % FCS und B) ohne FCS behandelt, im Anschluss direkt mit Hoechst und PI gefärbt, dann Bilder mittels automatisiertem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen und über die Scan<sup>®</sup>-Software ausgewertet. Dargestellt sind die Gesamtzellzahlen unterteilt in lebende und tote Zellen sowie die prozentuale Aufteilung der toten Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl in die verschiedenen Stadien des Zelltods (PI-positiv, kondensiertes Chromatin, kondensiertes Chromatin & PI-positiv). Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente, die jeweils im Quadruplikat gemessen wurden.





**Abbildung 3.28: Mikroskopische Analyse des SiO<sub>2</sub> NP induzierten Zelltods in Abhängigkeit von Serum.** RAW264.7 Makrophagen wurden für 4, 6 und 24 h mit 10 und 50 µg/ml 12 nm SiO<sub>2</sub> NP sowie mit 1 µg/ml CdO in Medium -/+10 % FCS behandelt und mit dem Apoptose-Assay analysiert. Gezeigt sind exemplarische Bilder nach 6 h Behandlung (Hoechst, PI und Hellfeld).

Exemplarisch sind hier Bilder nach 6 h Behandlung mit Partikeln mit und ohne 10 % FCS gezeigt (Abb. 3.28). Die Kontrollzellen zeigen eine rundliche Form mit Ausläufern, einen runden, mit Hoechst gefärbten, Kern und kein Signal im PI-Kanal. Bei den Kontrollzellen mit 10 % FCS sind zwei Zellen zu erkennen, die sich gerade in der Mitose befunden hatten. Nach der Behandlung mit den SiO<sub>2</sub> NP war bei der geringen Konzentration (10 µg/ml) noch kein großer Unterschied der Kernfärbung im Vergleich zu den Kontrollzellen sowie auch keine PI-positiven Zellen zu sehen. Beim Vergleich der Hellfeldbilder von Kontrolle und Behandlung fiel allerdings auf, dass die behandelten Zellen eine Vielzahl an Vakuolen unterschiedlicher Größe aufwiesen, wobei dies bei der Behandlung ohne FCS stärker ausgeprägt war (Abb. 3.28; siehe auch Abb. 3.7).

Die Bilder im Hoechst-Kanal nach Behandlung mit der hohen Dosis SiO<sub>2</sub> NP (50 µg/ml) ohne FCS zeigen deutlich, dass die Zellen kondensierte Kerne besaßen und auch stark PI-positiv waren. Diese Zellen hatten im Hellfeld vollständig ihre Form und den Kontrast verloren. Das zugehörige PI-Signal zeigte eine Beschädigung der Plasmamembran an. Die restlichen Zellen, deren Hülle noch intakt zu sein schien, zeigten ebenfalls die Ausbildung der erwähnten Vakuolen

auf. Bei der gleichen Behandlung mit FCS wurden jedoch kaum Zellen mit kondensiertem Chromatin bzw. PI-positive Zellen detektiert. Allerdings war auch hier das Auftreten der Vakuolenbildung zu beobachten.

Die Behandlung mit CdO war nur unter Serum-freien Bedingungen schädlich für die Makrophagen Zellen. Hier waren bereits Zellen mit kondensiertem Chromatin sowie mit Kernfragmentierung zu erkennen, die aber alle PI-negativ waren. Im Hellfeld zeichneten sich diese Zellen durch Abrunden und Ausbilden sogenannter *apoptotic bodies* aus. Die Zellen der Behandlung mit Serum glichen den Kontrollzellen. Für die CdO-Behandlung in Abwesenheit von FCS wurden also eindeutige Hinweise für Apoptose in den RAW264.7 Makrophagen gefunden.

Die Behandlung der RAW264.7 Makrophagen in Anwesenheit von FCS schützte offensichtlich die Zellen vor dem Partikel-induzierten Zelltod und es konnten kaum tote Zellen detektiert werden. Deshalb werden im weiteren Verlauf nur die Ergebnisse des Apoptose-Assay ohne FCS gezeigt.

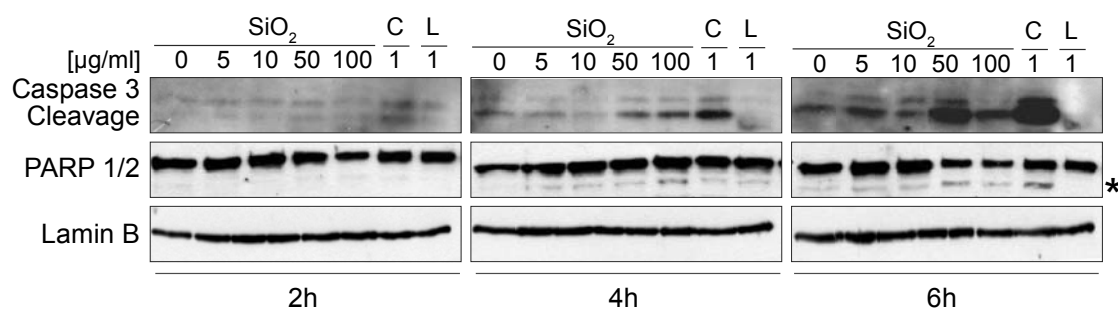
#### **Aktivierung von Apoptose-Markern auf Proteinebene**

Die Daten des Apoptose-Assays deuteten stark darauf hin, dass nach SiO<sub>2</sub> NP Behandlung Nekrose in den RAW264.7 Makrophagen ausgelöst wurde, wohingegen die Zellen nach Behandlung mit CdO eher Merkmale der Apoptose aufwiesen. Deshalb wurde die Aktivierung charakteristischer Apoptose-Marker wie der Spaltung von Caspase 3 und ihres Zielproteins PARP-1 auf Proteinebene getestet. Caspase 3 gehört zu den sogenannten Effektorcaspasen, die nach Aktivierung der Caspase-Kaskade durch Spaltung aktiviert werden und so die Apoptose einleiten. Bei der Spaltung entstehen zwei Fragmente mit einer Größe von 17 bzw. 19 kDa, welche über einen spezifischen Antikörper im Western Blot detektiert werden können. Ein Zielprotein der Caspase 3 ist PARP-1, ein DNA-bindendes Zinkfinger-Protein, dessen Aufgabenbereich die DNA-Reparatur, Replikation und Funktionen bei der Apoptose umfasst. Durch Spaltung entstehen auch hier zwei Fragmente mit einer Größe von 89 und 24 kDa, welche ebenfalls mittels Western Blot detektiert werden können.

Zu diesem Zweck wurden RAW264.7 Makrophagen für 2, 4 und 6 h konzentrationsabhängig mit SiO<sub>2</sub> NP ohne FCS behandelt und im Western Blot auf die Spaltung von Caspase 3 und ihres Substrates PARP-1 untersucht. CdO und LPS wurden als Positivkontrollen verwendet.

Es ist deutlich zu erkennen (Abb. 3.29), dass bereits nach 4 h Behandlung bei der Positivkontrolle CdO die Spaltprodukte von Caspase 3 mit entsprechender Spaltung des Substrats PARP-1 detektiert werden konnten. Bei 6 h Behandlung nahm die Banden-Intensität der Spaltprodukte weiter zu, was die Ergebnisse des Apoptose-Assays (Abb. 3.27 -B) bestätigte. Nach Behandlung mit SiO<sub>2</sub> NP konnten ebenfalls nach 4 h die Spaltprodukte von Caspase 3 und ihres Substrats PARP-1 ab einer Konzentration von 50 µg/ml detektiert werden, die im weiteren Verlauf der Behandlung akkumulierten. Bei der mikroskopischen Auswertung

(Abb. 3.28 -B) wurde bei der gleichen Dosis von 50  $\mu\text{g/ml}$   $\text{SiO}_2$  NP jedoch gezeigt, dass nur ein kleiner Teil der Zellen apoptotisch waren und der größere Teil nekrotisch. Möglicherweise durchlaufen die Makrophagen nach Behandlung mit  $\text{SiO}_2$  NP eine spezielle Form der Nekrose, die sogenannte Nekroptose, bei der auch Merkmale der Apoptose wie beispielsweise Spaltung von Caspase 3 und PARP-1 auftreten können (siehe auch Abschnitt 1.4.3).



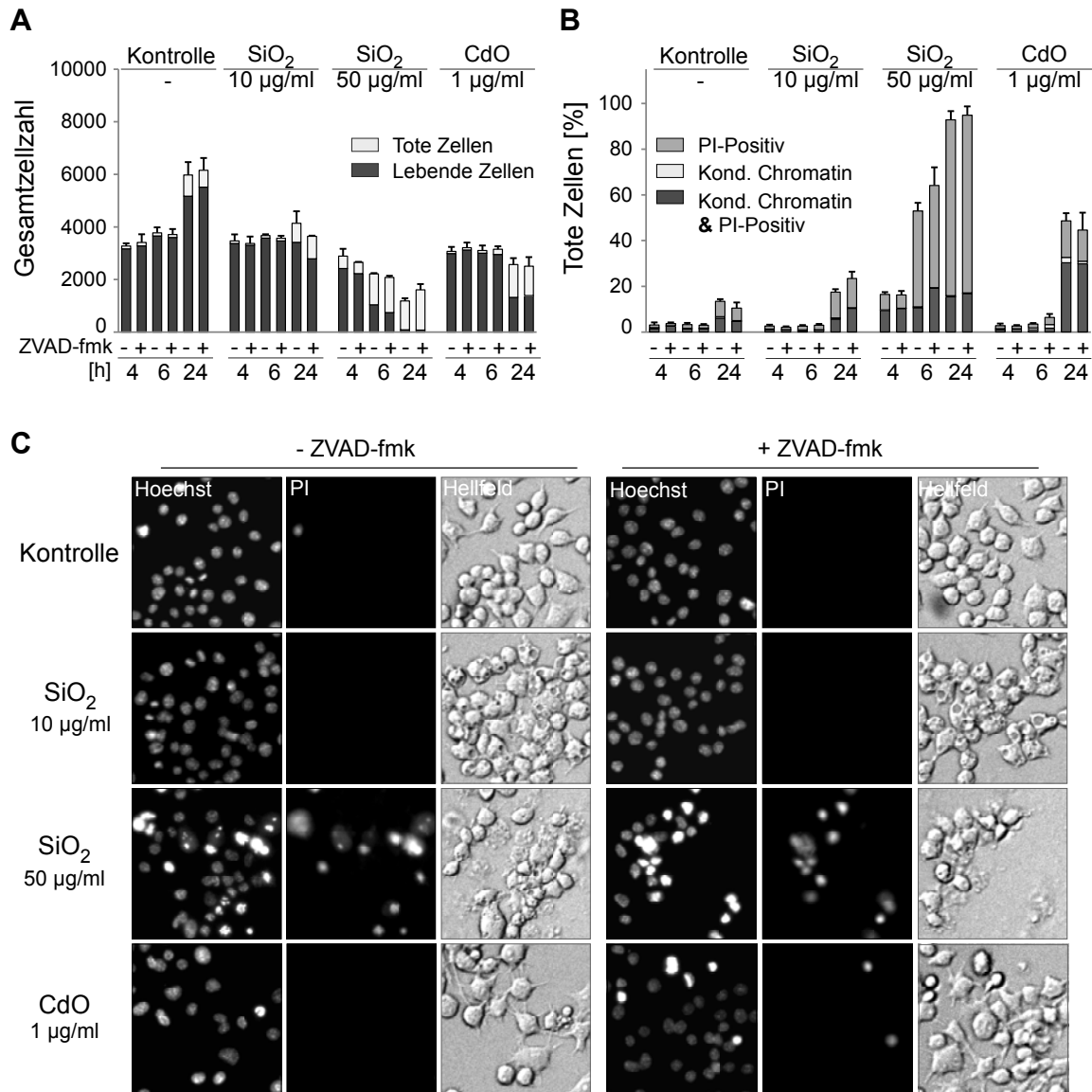
**Abbildung 3.29:  $\text{SiO}_2$  NP verursachen zeit- und konzentrationsabhängig eine Spaltung von Caspase 3 und PARP-1 in Makrophagen.** Die RAW264.7 Makrophagen wurden konzentrationsabhängig (1, 5, 10, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ ) mit 12 nm  $\text{SiO}_2$  NP sowie mit jeweils 1  $\mu\text{g/ml}$  CdO (C) bzw. LPS (L) in Medium ohne FCS für 2, 4 und 6 h behandelt und anschließend die Zelllysate im Western Blot mit spezifischen Antikörpern auf die Spaltung von Caspase 3 und PARP-1, gekennzeichnet durch (\*), analysiert. Als Ladekontrolle für gleiche aufgetragene Proteinmengen wurde Lamin B verwendet.

### 3.7.2 Apoptose-Assay - Einfluss des pan-Caspase-Inhibitors ZVAD-fmk

Bei den Untersuchungen zur Art des Zelltods der RAW264.7 Makrophagen nach  $\text{SiO}_2$  NP Exposition wurden sowohl Merkmale der Apoptose (Caspase 3 - und PARP-1 Spaltung) als auch der Nekrose (PI-Färbung, morphologische Veränderungen der Zellen) gefunden. Zur weiteren Klärung wurde der pan-Caspase Inhibitor ZVAD-fmk (Carbobenzoxy-Valyl-Alanyl-Aspartyl-(O-methyl)-Fluoromethylketon) eingesetzt. Dieser synthetische, zellpermeable Inhibitor bindet als Pseudosubstrat irreversibel an die katalytische Untereinheit der Caspasen und inhibiert so deren Protease-Funktion (Ekert et al., 1999). Als Konsequenz wird also die Aktivierung der Apoptose verhindert und die Zellen sterben über Nekrose (Vandenabeele et al., 2006).

Zunächst wurden die Zellen für 30 min mit 50  $\mu\text{M}$  ZVAD bzw. 0.1 % DMSO vorbehandelt und anschließend mit  $\text{SiO}_2$  NP sowie CdO in An- bzw. Abwesenheit des Inhibitors exponiert. Nach Beendigung der Behandlung wurde der Apoptose-Assay durchgeführt und die aufgenommenen Fluoreszenzbilder Software-gestützt analysiert. Die quantitative Auswertung ist in Abb. 3.30 -A & -B zu sehen sowie exemplarische Bilder nach 6-stündiger Behandlung in Abb. 3.30 -C.

Der Einsatz von ZVAD-fmk hatte keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Kontrollzellen (Abb. 3.30 -A). Sowohl bei den DMSO- als auch ZVAD-behandelten Kontrollen wurde eine Verdopplung der Gesamtzellzahl nach 24 h Behandlung beobachtet, wobei der



**Abbildung 3.30: Der pan-Caspase-Inhibitor ZVAD-fmk hatte keinen Einfluss auf den SiO<sub>2</sub> NP induzierten Zelltod.** RAW264.7 Makrophagen wurden zunächst für 30 min mit 0.1 % DMSO bzw. 50  $\mu$ M ZVAD-fmk vorbehandelt, dann für 4, 6 und 24 h mit 10 und 50  $\mu$ g/ml mit 12 nm SiO<sub>2</sub> NP sowie mit 1  $\mu$ g/ml CdO -/+50  $\mu$ M ZVAD-fmk ohne FCS behandelt und im Anschluss direkt mit Hoechst und PI gefärbt. Die Bildakquisition erfolgte mittels automatisiertem Fluoreszenzmikroskop und die erhaltenen Bilder wurden mit der Scan<sup>®</sup>-Software automatisiert ausgewertet. Dargestellt sind A) die Gesamtzellzahl unterteilt in lebende und tote Zellen sowie B) die prozentuale Aufteilung der toten Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl in die verschiedenen Stadien des Zelltods (PI-positiv, kondensiertes Chromatin, kondensiertes Chromatin & PI-positiv). Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente und wurden jeweils im Quadruplikat gemessen. C) zeigt exemplarische Bilder der aufgenommenen Kanäle (Hoechst, PI, Hellfeld) des Apoptose-Assays nach 6 h Behandlung ohne FCS.

Anteil der toten Zellen nach 24 h bei ca. 10 % lag. Wie schon in Abb. 3.27 -B gezeigt, blieb die Gesamtzellzahl nach Behandlung mit 10 µg/ml SiO<sub>2</sub> NP konstant, während bei der hohen Dosis von 50 µg/ml eine starke Abnahme der Gesamtzellzahl mit zunehmender Anzahl toter Zellen zu beobachten war. ZVAD-fmk hatte dabei keinen Einfluss auf die SiO<sub>2</sub> NP verursachten Effekte. Gleiches galt auch für die Behandlung mit CdO, bei der die Gesamtzellzahl erst nach 24 h auf 70 % absank. Die Aufteilung der toten Zellen in die einzelnen Phasen des Zelltods (Abb. 3.30 -B) nach Behandlung mit SiO<sub>2</sub> NP bzw. mit CdO wurde durch die Anwesenheit des Inhibitors ZVAD nicht beeinflusst. Nach SiO<sub>2</sub> NP Behandlung zeigte der Hauptteil der Zellen bereits zu frühen Zeitpunkten nekrotische Merkmale auf, wohingegen bei der CdO-Behandlung sich die Mehrheit in der spät-apoptotischen Phase zu befinden schien.

Auffallend war jedoch, dass bei der SiO<sub>2</sub> NP Behandlung mit 0.1 % DMSO bereits früh (4 h) 10 % doppelt-positive Zellen detektiert werden konnten, deren Anteil dann auf 20 % im weiteren zeitlichen Verlauf zunahm. Im Vergleich dazu waren bei der Behandlung ohne DMSO (Abb. 3.27 -B) nach 4 h weniger als 2 % der toten Zellen doppelt-positiv. Ähnliches war auch bei der CdO-Behandlung mit und ohne DMSO zu beobachten. Hier verschob sich die Verteilung der Zellen von nekrotischer zu spät-apoptotischer Phase nach Exposition mit DMSO. Nach 24 h Behandlung sank der Anteil an nekrotischen Zellen von 57 % (ohne DMSO) auf 15 % (mit DMSO), wohingegen die Anzahl spät-apoptotischer Zellen von 14 % (ohne DMSO) auf 30 % (mit DMSO) zunahm. DMSO scheint also einen Einfluss auf das Absterbe-Verhalten der Makrophagen nach Partikelexposition zu haben. Dies lässt sich möglicherweise durch die Bindung des DMSO an die Partikel und so veränderten Partikel-Zellinteraktionen erklären.

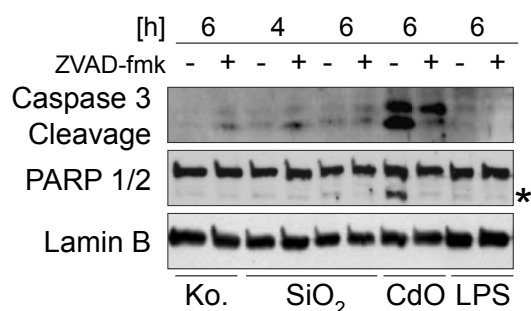
Auch auf den Bildern nach 6-stündiger Behandlung (Abb. 3.30 -C) ist zu erkennen, dass die Anwesenheit des Inhibitors ZVAD-fmk keinen Einfluss auf die Partikel-induzierten Veränderungen der Zellen hatte. Bei der niedrigen SiO<sub>2</sub> NP Dosis (10 µg/ml) war bei der Kernfärbung kein Unterschied zu den Kontrollzellen mit und ohne Inhibitor zu beobachten und es konnten auch keine PI-positiven Zellen detektiert werden. Ebenso blieb die Ausbildung der Vakuolen nach SiO<sub>2</sub> NP unbeeinflusst von ZVAD. Bei der hohen Dosis waren sowohl mit als auch ohne Inhibitor vermehrt Zellen mit kondensiertem Chromatin und positiver PI-Färbung zu beobachten. In beiden Fällen verloren diese Zellen im Hellfeld ihre Form und den Kontrast, während bei noch intakten Zellen die Vakuolenbildung deutlich zu sehen war. Nach Behandlung mit CdO waren nach 6 h nur sehr wenige früh-apoptotische Zellen erkennbar, so dass eine Wirkung von ZVAD zu diesem Zeitpunkt nicht erkennbar war.

### **Nachweis der Apoptose-Marker Caspase 3 - und PARP-1 Spaltung nach ZVAD-Behandlung**

Der Einfluss von ZVAD auf die Hemmung der Caspase-Aktivität sollte nun auch auf Protein-Ebene durchgeführt werden. Dazu wurden die RAW264.7 Makrophagen für 30 min mit 0.1 %

DMSO bzw. 50  $\mu\text{M}$  ZVAD-fmk vorbehandelt und im Anschluss für 2, 4, 6 h mit 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$   $\text{SiO}_2$  NP behandelt. CdO und LPS wurden als Positivkontrollen (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) verwendet.

Es ist zu erkennen (Abb. 3.31), dass durch ZVAD die CdO-vermittelte Spaltung von Caspase-3 sowie deren Substrat PARP-1 gehemmt wurde. Keinen Einfluss dagegen schien ZVAD auf die Behandlung mit  $\text{SiO}_2$  NP gehabt zu haben. Hier konnten keine Spaltprodukte von Caspase-3 oder PARP-1 detektiert werden, was auch zu den Daten des Apoptose-Assays (Abb. 3.30) passt.



**Abbildung 3.31: ZVAD-fmk hat keinen Einfluss auf die Caspase 3- und PARP-1 Spaltung nach  $\text{SiO}_2$  NP Exposition.** Die RAW264.7 Makrophagen wurden 30 min mit 50  $\mu\text{M}$  ZVAD-fmk bzw. 0.1 % DMSO vorbehandelt und dann für 2, 4 und 6 h mit 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  12 nm  $\text{SiO}_2$  NP und 6 h mit jeweils  $\mu\text{g}/\text{ml}$  CdO und LPS -/+50  $\mu\text{M}$  ZVAD-fmk in Medium ohne FCS behandelt. Anschließend wurden die Zellysate im Western Blot mit spezifischen Antikörpern auf die Spaltung von Caspase 3 und PARP-1, gekennzeichnet durch (\*), analysiert. Als Ladekontrolle für gleiche aufgetragene Proteinmengen wurde Lamin B verwendet.

Neben den Apoptose-Markern Caspase-3 und PARP-1 Spaltung wurde auch noch die Aktivierung des MAPK-Signalwegs (Anhang, Abb. A.3) sowie von  $\text{TNF}\alpha$  (Anhang, Abb. A.4) mittels Western Blot analysiert. ZVAD konnte weder die Phosphorylierung der MAP-Kinasen p38, JNK1/2 und ERK1/2 noch der MAPK-Substrate MK2 und cJun hemmen. Zusätzlich wurde auch die Produktion von intrazellulärem  $\text{TNF}\alpha$  nach  $\text{SiO}_2$  NP bzw. CdO Behandlung nicht durch ZVAD beeinträchtigt. Die Menge an freigesetztem  $\text{TNF}\alpha$  (Anhang, Abb. A.4 -B) konnte allerdings durch den Inhibitor sowohl für die  $\text{SiO}_2$  NP als auch LPS-behandelten Zellen reduziert werden. Dies lässt sich möglicherweise durch off-target Effekte des Inhibitors bei hohen Konzentrationen ( $> 50 \mu\text{M}$ ) erklären, da auch eine Bindung an Cystein-Reste anderer Proteine möglich ist (Kroemer et al., 2008).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der pan-Caspase Inhibitor ZVAD-fmk weder das  $\text{SiO}_2$  NP induzierte Absterben der Makrophagen durch Nekrose verhindern konnte, noch hatte er einen Einfluss auf die Aktivierung des MAP-Kinase Signalwegs. Lediglich die Freisetzung von  $\text{TNF}\alpha$  konnte gehemmt werden.

### 3.7.3 Apoptose-Assay - Hemmung von oxidativem Stress mittels NAC

In Abschnitt 3.6.1 konnte bereits gezeigt werden, dass einige SiO<sub>2</sub> NP induzierte Effekte wie die Induktion der Genexpression von HO-1, COX-2 und MCP-1 durch das Antioxidanz NAC reduziert werden konnten, was auf eine Beteiligung von oxidativem Stress schließen lässt. Es sollte nun durch Einsatz von NAC geprüft werden, ob oxidativer Stress als Ursache für den SiO<sub>2</sub> NP-induzierten Zelltod in Frage kommt.

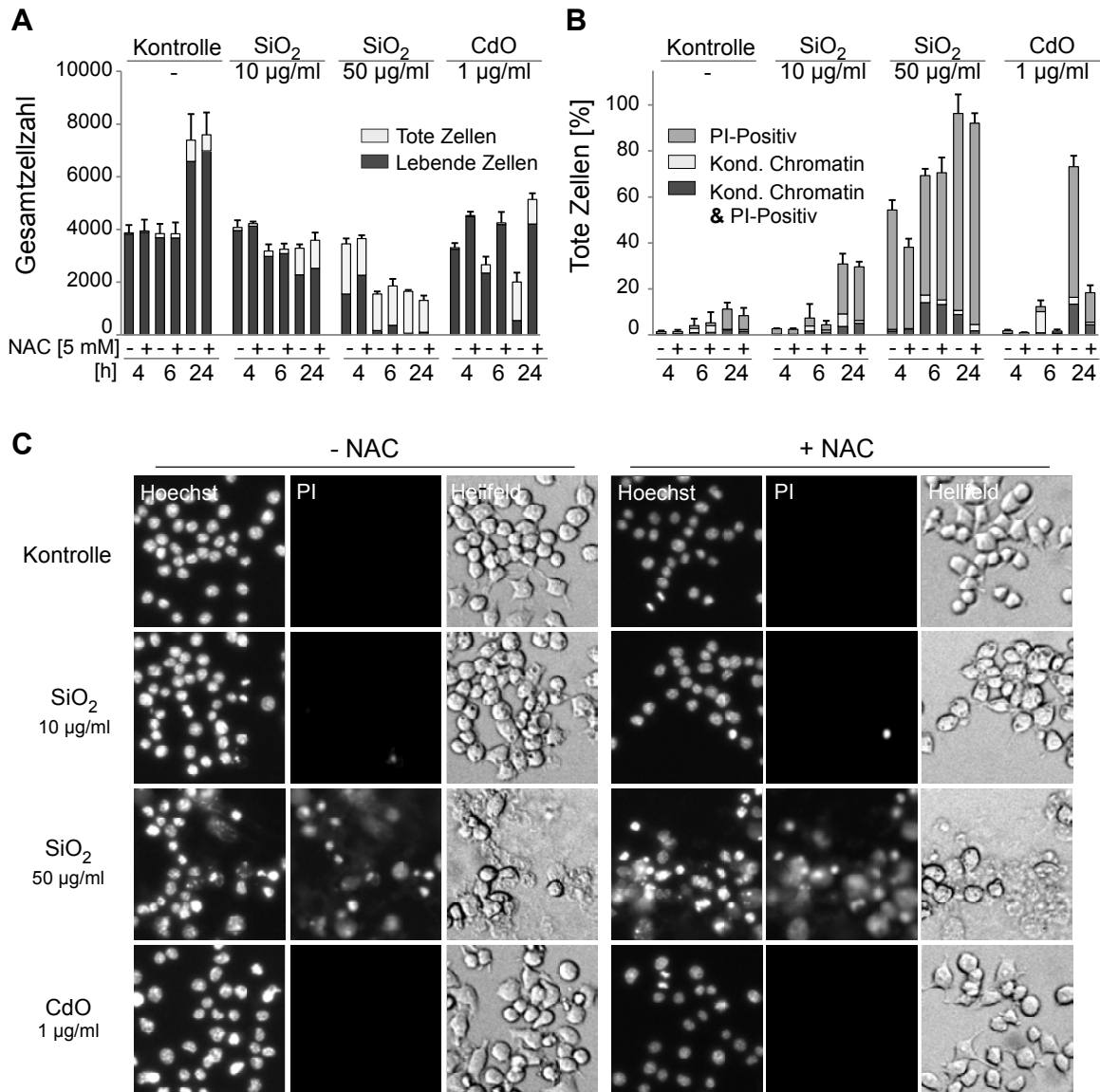
Daher wurde die Auswirkung von NAC auf das Überleben der Makrophagen nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition getestet. Hierzu wurden die RAW264.7 Zellen für 30 min -/+ 5 mM NAC vorbehandelt und anschließend ohne FCS in An- bzw. Abwesenheit von NAC mit SiO<sub>2</sub> NP und CdO exponiert. Nach Beendigung der Behandlung wurde der Apoptose-Assay durchgeführt und die aufgenommenen Fluoreszenzbilder Software-gestützt analysiert. Die quantitative Auswertung ist in Abb. 3.32 -A & -B und exemplarische Bilder nach 6-stündiger Behandlung in Abb. 3.32 -C zu sehen.

Das Antioxidanz selbst hatte keinen Einfluss auf die Proliferation der Zellen, da bei den Kontrollen eine Verdopplung der Gesamtzellzahl nach 24 h Behandlung erkennbar war. Die dosis-abhängige Abnahme der Gesamtzellzahl bei gleichzeitigem Anstieg toter Zellen nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition konnte auch durch NAC-Gabe nicht gehemmt werden (Abb. 3.32 -A). SiO<sub>2</sub> NP induzierter Zelltod wird also nicht durch oxidativen Stress ausgelöst.

Im Gegensatz dazu konnte das Absterben der Makrophagen nach CdO-Behandlung durch NAC verhindert werden. Dies wird auch bei der Aufteilung der toten Zellen in die einzelnen Zelltod-Arten deutlich (Abb. 3.32 -B). Nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition trat unabhängig von NAC hauptsächlich Nekrose auf. Bei der CdO-Behandlung konnten mittels NAC sowohl die Anzahl der früh-apoptotischen Zellen nach 6 h als auch ein Großteil der nekrotischen Zellen nach 24 h reduziert werden.

Die Bilder des Assays veranschaulichen nochmals die Ergebnisse der quantitativen Auswertung (Abb. 3.32 -C). Für die SiO<sub>2</sub> NP behandelten Zellen war kein Unterschied zwischen der Behandlung mit und ohne NAC sichtbar. Im Gegensatz dazu wiesen die Zellen nach 24 h Behandlung mit NAC und CdO eine normale Kernfärbung auf und es waren wenige Zellen mit fragmentierten Kernen oder PI-positiver Färbung zu erkennen. Die Ausbildung von Vakuolen nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition blieb ebenfalls unbeeinflusst durch die Gabe von NAC.

Die Untersuchung auf den Nachweis der Apoptose-Marker zeigte lediglich für die Positivkontrolle CdO eine Hemmung von Caspase 3 und PARP-1 Spaltung in Anwesenheit von NAC. Die geringe Aktivierung nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition wurde durch NAC nicht beeinflusst (Anhang, Abb. A.2).



**Abbildung 3.32: NAC hat keinen Einfluss auf den SiO<sub>2</sub> NP vermittelten Zelltod.** RAW264.7 Makrophagen wurden zunächst für 30 min mit 5 mM NAC vorbehandelt, dann für 4, 6 und 24 h mit 10 und 50 µg/ml 12 nm SiO<sub>2</sub> NP sowie mit 1 µg/ml CdO -/+ 5 mM NAC ohne FCS behandelt und im Anschluss direkt mit Hoechst und PI gefärbt. Die Bildakquisition erfolgte mittels automatisiertem Fluoreszenzmikroskop und die erhaltenen Bilder wurden mit der Scan<sup>®</sup>-Software automatisiert ausgewertet. Dargestellt sind A) die Gesamtzellzahl unterteilt in lebende und tote Zellen sowie B) die prozentuale Aufteilung der toten Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl in die verschiedenen Stadien des Zelltods (PI-positiv, kondensiertes Chromatin, kondensiertes Chromatin & PI-positiv). Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente und wurden jeweils im Quadruplikat gemessen. C) zeigt exemplarische Bilder der aufgenommenen Kanäle (Hoechst, PI, Hellfeld) des Apoptose-Assays nach 6 h Behandlung ohne FCS.



### 3.7.4 Apoptose-Assay - Einsatz von MAPK-Inhibitoren

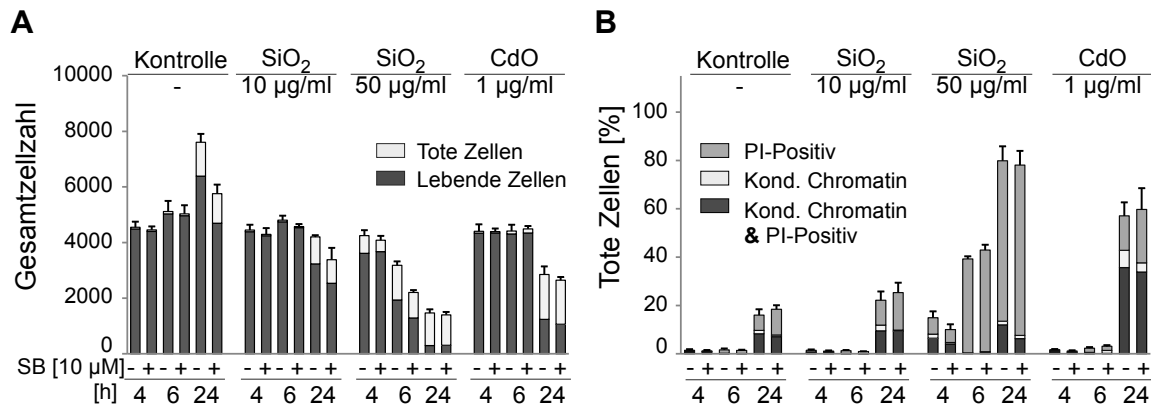
In Abschnitt 3.6.2 wurde bereits ausgiebig der Einfluss der MAPK-Inhibitoren (SB, SP, PD) auf die Induktion der proinflammatorische Genexpression nach SiO<sub>2</sub> NP Behandlung untersucht. Es konnte die Hemmung spezifischer, von den MAPK regulierter Gene wie TNF $\alpha$  oder COX-2 nachgewiesen und für TNF $\alpha$  auch auf Proteinebene bestätigt werden. Welche Konsequenzen ergaben sich nun aber für das Absterben der Zellen nach Behandlung mit Partikeln und MAPK-Inhibitoren? Um dies genauer zu untersuchen, wurde das Absterbeverhalten der Zellen nach Partikel-Behandlung in Abhängigkeit der MAPK-Inhibitoren mit dem Apoptose-Assay untersucht. Zunächst wurden die Zellen für 30 min mit 10  $\mu$ M MAPK-Inhibitor (SB, SP, PD) bzw. 0.1 % DMSO vorbehandelt und anschließend mit SiO<sub>2</sub> NP sowie CdO in An- bzw. Abwesenheit des Inhibitors exponiert. Nach Beendigung der Behandlung wurde der Apoptose-Assay durchgeführt und die aufgenommenen Fluoreszenzbilder Software-gestützt analysiert.

#### Einfluss des SB-Inhibitors (Hemmung der p38-Funktion)

Die quantitative Auswertung der Behandlung mit SB-Inhibitor (Abb. 3.33) zeigte, dass nach 24 h Behandlung die Proliferation der Makrophagen durch SB allein leicht gehemmt wurde, wobei sich allerdings der Anteil an toten Zellen im Vergleich zur Kontrolle nicht unterschied (20 %). Die Exposition mit der niedrigen SiO<sub>2</sub> NP Dosis (10  $\mu$ g/ml) zeigte ein ähnliches Bild. Auch hier ging mit SB-Inhibitor die Gesamtzellzahl nach 24 h Behandlung trotz gleichbleibendem Anteil toter Zellen leicht zurück. Die detektierten toten Zellen nach 24 h teilten sich gleichermaßen in nur PI-positive, also nekrotische Zellen, sowie doppelt-positive Zellen (kondensiertes Chromatin & PI-positiv) auf. Bei der Behandlung mit der hohen SiO<sub>2</sub> NP Dosis konnte ebenfalls kein Einfluss des Inhibitors auf das Absterbeverhalten der Zellen beobachtet werden. Schon zum frühen Zeitpunkt von 6 h waren bereits mehr als 50 % der Zellen nekrotisch. Die Exposition der Makrophagen mit CdO führte erst nach 24 h zu einem starken Absterben der Zellen. Wie schon in Abschnitt 3.7.2 bei der Behandlung mit ZVAD beschrieben, war die Mehrheit der DMSO & CdO-behandelten Zellen doppelt-positiv und befand sich demnach in der spät-apoptotischen Phase.

Anhand der Bilder des Apoptose-Assays (Abb. 3.36) wird ersichtlich, dass der SB-Inhibitor selbst die Ausbildung von Vakuolen in den Zellen bewirkte. Die Zellen mit Vakuolen zeigten aber ansonsten eine normale Kernfärbung auf und waren nicht PI-gefärbt. Die Behandlung mit den SiO<sub>2</sub> NP führte ebenfalls zur Vakuolenbildung, wobei ein zusätzlicher Effekt durch die Anwesenheit des SB-Inhibitors nicht festgestellt werden konnte. Nach 6 h Behandlung zeigten die Zellen bei der niedrigen Dosis eine normale Kernfärbung auf, wohingegen bei der hohen SiO<sub>2</sub> Dosis viele PI-positive Zellen mit teilweise kondensierten Kernen zu beobachten waren. Die Exposition der Zellen mit CdO und SB-Inhibitor verhinderte die Ausbildung von Vakuolen

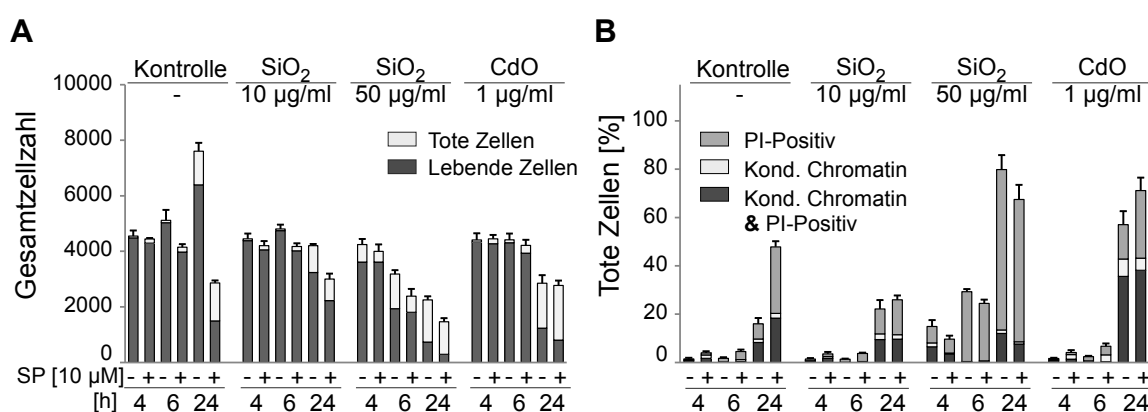
und zeigte die schon für CdO-beschriebenen Apoptose-Merkmale.



**Abbildung 3.33: Der SB-Inhibitor hat keinen Einfluss auf den Zelltod nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition.** RAW264.7 Makrophagen wurden zunächst für 30 min mit 0.1 % DMSO bzw. 10  $\mu$ M SB-Inhibitor vorbehandelt, dann für 4, 6 und 24 h mit 10 und 50  $\mu$ g/ml 12 nm SiO<sub>2</sub> NP sowie mit 1  $\mu$ g/ml CdO -/+10  $\mu$ M SB ohne FCS behandelt und im Anschluss direkt mit Hoechst und PI gefärbt. Die Bildakquisition erfolgte mittels automatisiertem Fluoreszenzmikroskop und die erhaltenen Bilder wurden über die Scan<sup>®</sup>-Software automatisiert ausgewertet. Dargestellt sind A) die Gesamtzellzahl unterteilt in lebende und tote Zellen sowie B) die prozentuale Aufteilung der toten Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl in die verschiedenen Stadien des Zelltods (PI-positiv, kondensiertes Chromatin, kondensiertes Chromatin & PI-positiv). Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente und wurden jeweils im Quadruplikat gemessen.

### Einfluss des SP-Inhibitors (Hemmung der JNK1/2-Funktion)

Die quantitative Auswertung des Apoptose-Assays +/- SP-Inhibitor (Abb. 3.34) zeigte, dass der Inhibitor selbst sich schädigend auf die Zellen auswirkte. So war zum einen die Proliferation beeinträchtigt und zum anderen stieg der Anteil toter Zellen nach 24 h Behandlung auf knapp 50 % an. Die toxischen Effekte des Inhibitors selbst waren erst nach 24 h Behandlung zu beobachten, da nach 6 h die Kontrollzellen (Abb. 3.36) noch eine normale Kernfärbung und kein PI-Signal aufwiesen. Die Behandlung mit den SiO<sub>2</sub> NP ergab ein ähnliches Bild. So war lediglich nach 24 h Behandlung mit SP-Inhibitor ein verstärktes Absterben der Zellen für beide untersuchten Konzentrationen an SiO<sub>2</sub> NP zu beobachten. Die Verteilung der toten Zellen in die einzelnen Zelltod-Arten blieb davon jedoch unbeeinflusst. Nach Behandlung mit der niedrigen Dosis konnten zu gleichen Teilen nekrotische und doppelt-gefärbte Zellen (kondensiertes Chromatin & PI-positiv) detektiert werden, wohingegen bei der hohen SiO<sub>2</sub> NP Dosis hauptsächlich Nekrosen auftraten. Die Ausbildung von Vakuolen nach SiO<sub>2</sub> Behandlung blieb unbeeinträchtigt durch die Inhibitor-Behandlung (Abb. 3.36). Die Anwesenheit des SP-Inhibitors konnte auch weder den CdO-vermittelten Zelltod hemmen noch die Aufteilung der Zellen in die einzelnen Zelltod-Arten wesentlich beeinflussen.



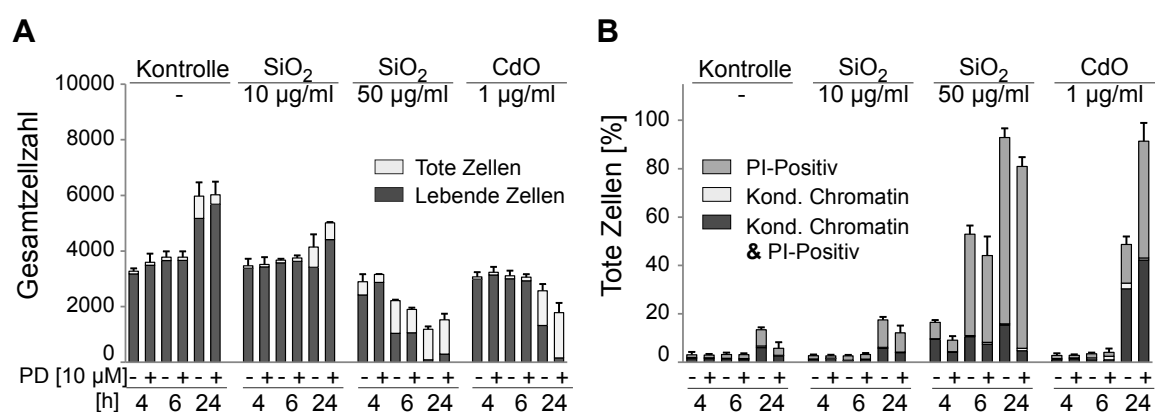
**Abbildung 3.34: SP-Inhibitor hat keinen Einfluss auf den Zelltod nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition.** RAW264.7 Makrophagen wurden zunächst für 30 min mit 0.1 % DMSO bzw. 10 μM SP-Inhibitor vorbehandelt, dann für 4, 6 und 24 h mit 10 und 50 μg/ml 12 nm SiO<sub>2</sub> NP sowie mit 1 μg/ml CdO -/+10 μM SP ohne FCS behandelt und im Anschluss direkt mit Hoechst und PI gefärbt. Die Bildakquisition erfolgte mittels automatisiertem Fluoreszenzmikroskop und die erhaltenen Bilder wurden über die Scan<sup>®</sup>-Software automatisiert ausgewertet. Dargestellt sind A) die Gesamtzellzahl unterteilt in lebende und tote Zellen sowie B) die prozentuale Aufteilung der toten Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl in die verschiedenen Stadien des Zelltods (PI-positiv, kondensiertes Chromatin, kondensiertes Chromatin & PI-positiv). Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente und wurden jeweils im Quadruplikat gemessen.

### Einfluss des PD-Inhibitors (Hemmung der ERK1/2-Aktivierung)

Durch Inhibierung der ERK-Phosphorylierung mittels PD-Inhibitor wurden die Proliferation der Kontrollzellen nicht beeinflusst. Es konnte sogar nach 24 h Behandlung die Anzahl der toten Zellen von 15 % auf 10 % reduziert werden (Abb. 3.35). Morphologisch war auch kein Unterschied zur DMSO-Kontrolle zu erkennen (Abb. 3.36). Nach Behandlung mit SiO<sub>2</sub> NP konnte ebenfalls für beide Konzentrationen (10, 50 μg/ml) ein leichter Rückgang der toten Zellen beobachtet werden, wobei allerdings die Verteilung der Zellen in die einzelnen Zelltod-Phasen nicht verändert wurde und hauptsächlich Nekrosen auftraten. Die charakteristische Vakuolen-Ausbildung nach SiO<sub>2</sub> NP Behandlung war sowohl mit als auch ohne PD-Inhibitor zu beobachten. Anders gestaltete sich das Ergebnis bei der Exposition mit CdO. In Anwesenheit des Inhibitors trat ein verstärkter Zelltod (Anstieg auf 90 %) nach 24 h auf, wobei fast 50 % der Zellen nekrotisch waren.

Die Aktivierung der ERK1/2 hatte demnach eine schützende Funktion für die Zelle im Falle von CdO, nicht jedoch bei den SiO<sub>2</sub> NP, welche geringfügig weniger toxisch für die Zellen in Anwesenheit des PD-Inhibitors waren.

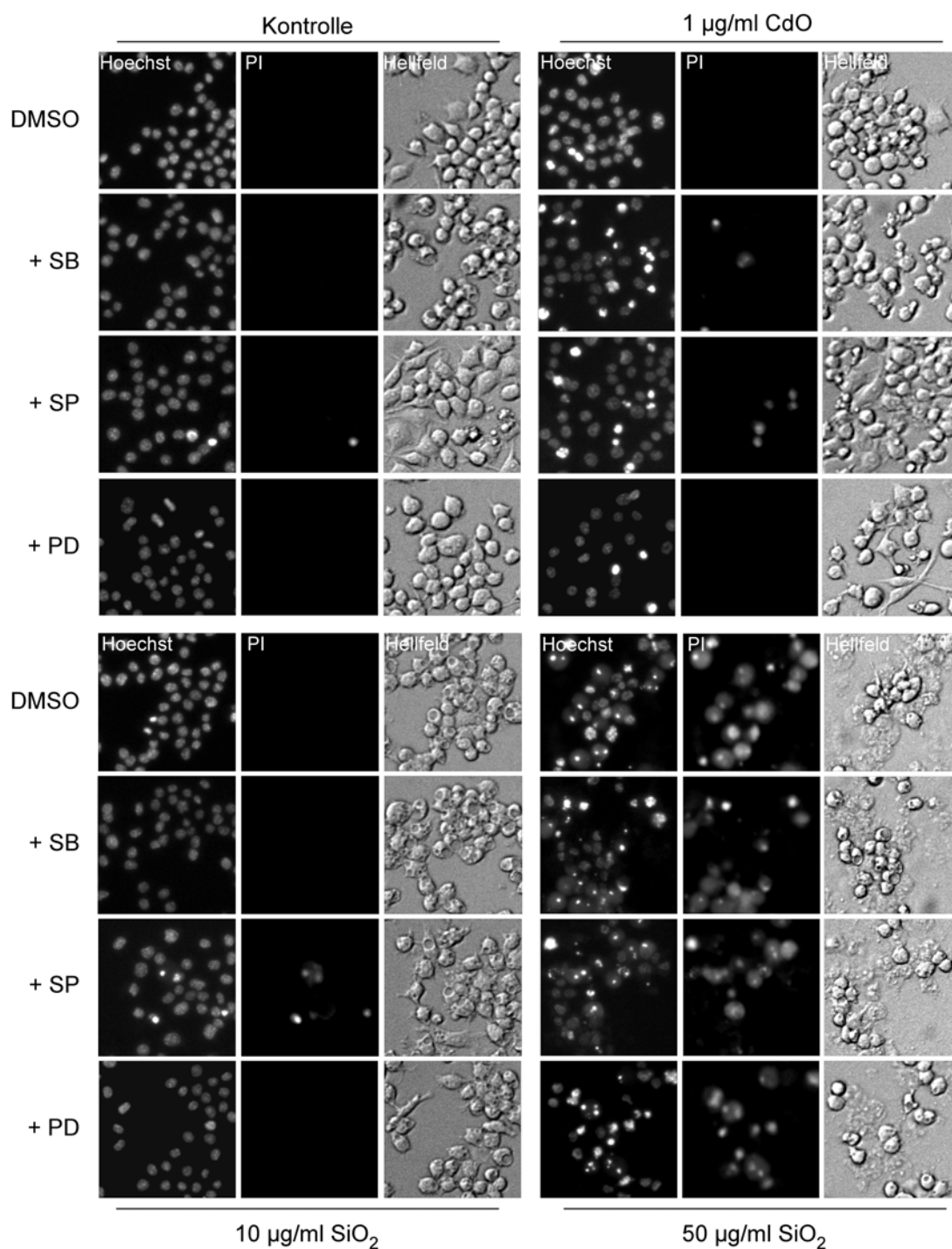
Es wurde bereits in Abschnitt 3.6.2 beschrieben, dass die Kinasen p38 und JNK sich gegenseitig über eine sogenannte Feedback-Regulation beeinflussen. Es wurde gezeigt, dass im Falle der



**Abbildung 3.35: PD-Inhibitor hat einen leichten Einfluss auf den Zelltod nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition.** RAW264.7 Makrophagen wurden zunächst für 30 min mit 0.1 % DMSO bzw. 10 µM PD-Inhibitor vorbehandelt, dann für 4, 6 und 24 h mit 10 und 50 µg/ml 12 nm SiO<sub>2</sub> NP sowie mit 1 µg/ml CdO -/+10 µM PD ohne FCS behandelt und im Anschluss direkt mit Hoechst und PI gefärbt. Die Bildakquisition erfolgte mittels automatisiertem Fluoreszenzmikroskop und die erhaltenen Bilder wurden über die Scan<sup>®</sup>-Software automatisiert ausgewertet. Dargestellt sind A) die Gesamtzellzahl unterteilt in lebende und tote Zellen sowie B) die prozentuale Aufteilung der toten Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl in die verschiedenen Stadien des Zelltods (PI-positiv, kondensiertes Chromatin, kondensiertes Chromatin & PI-positiv). Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente und wurden jeweils im Quadruplikat gemessen.

Behandlung mit SB-Inhibitor die Phosphorylierung der JNK1/2 sowie ihres Substrat cJun erhöht wurde und der SP-Inhibitor seinerseits zu einer verstärkten Aktivität der p38 führte. Daher wurden auch Experimente mit Doppel-Inhibitor (SP & SB) bzw. Dreifachbehandlungen (SB & SP & PD) durchgeführt, um mögliche redundante Funktionen auszuschalten.

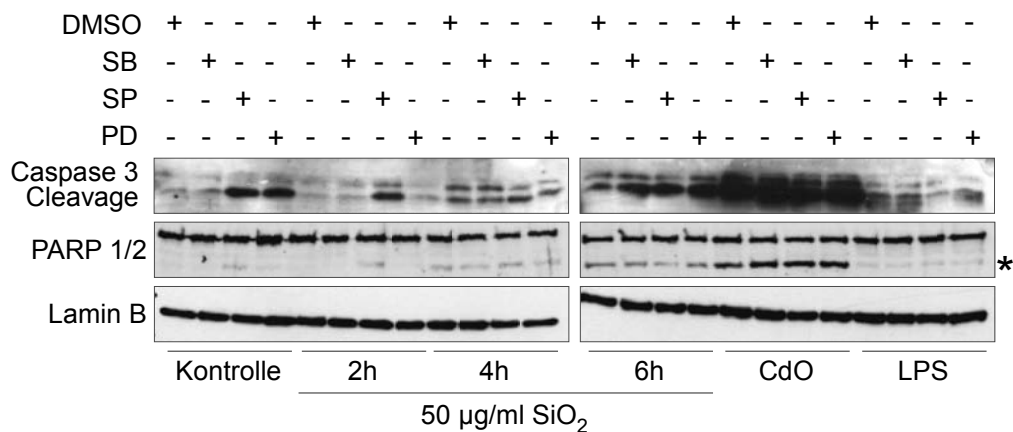
Die Doppelbehandlung mit den Inhibitoren SB und SP (Anhang, Abb. A.5) konnte die toxischen Effekte des SP-Inhibitors selbst nicht reduzieren, sondern verstärkte noch das Absterben der Zellen nach 24 h Behandlung. Die Aufteilung der Zellen in die einzelnen Zelltod-Phasen nach Behandlung mit SiO<sub>2</sub> NP wurde nicht beeinträchtigt, wobei nach 24 h Exposition mit CdO und den beiden Inhibitoren mehr tote Zellen detektiert wurden, die hauptsächlich doppelt-positiv gefärbt, also spät-apoptotisch, waren. Im Zusammenspiel aller drei Inhibitoren (Anhang, Abb. A.6) wurden die toxischen Effekte nach SiO<sub>2</sub> NP Behandlung weiter verstärkt, ohne aber das Absterbeverhalten der Zellen mittels Nekrose zu beeinflussen. Auffällig war auch, dass die durch den SB-Inhibitor verursachte Vakuolenbildung auch noch bei der Doppel- bzw. Dreifach-Inhibitor Behandlung zu beobachten war. Die gleichzeitige Hemmung von zwei bzw. allen drei MAP-Kinasen hatte also keinen Effekt auf den SiO<sub>2</sub> NP induzierten Zelltod.



**Abbildung 3.36: MAPK-Inhibitor Behandlung hatte keinen Einfluss auf den SiO<sub>2</sub> NP induzierten Zelltod** RAW264.7 Makrophagen wurden zunächst für 30 min mit 0.1 % DMSO bzw. 10 µM MAPK-Inhibitoren (SB, SP, PD) vorbehandelt, dann für 4, 6 und 24 h mit 10 µg/ml und 50 µg/ml 12 nm SiO<sub>2</sub> NP sowie mit 1 µg/ml CdO +/- 10 µM Inhibitor ohne FCS behandelt und über den Apoptose-Assay analysiert. Gezeigt sind exemplarische Bilder des Apoptose-Assays nach 6 h Behandlung (Hoechst, PI und Hellfeld).

### Einfluss der Behandlung mit MAPK-Inhibitoren auf SiO<sub>2</sub> NP induzierte Apoptose-Marker

Neben den Untersuchungen der Auswirkungen der SiO<sub>2</sub> NP Exposition mittels Apoptose-Assay wurde auch die Aktivierung der Apoptose-Marker Caspase 3 und PARP-1 Spaltung auf Proteinebene analysiert (Abb. 3.37). Dazu wurden die RAW264.7 Makrophagen zunächst für 30 min mit den MAPK-Inhibitoren (SB, SP, PD) bzw. mit 0.1 % DMSO vorbehandelt, dann die Partikel-Exposition in Medium ohne FCS +/- Inhibitor durchgeführt und anschließend die Zellysate im Western Blot mittels spezifischer Antikörper auf die Aktivierung der Apoptose-Marker getestet. CdO und LPS wurden hierbei als Kontrolle verwendet.



**Abbildung 3.37: Einfluss der MAPK-Inhibitoren auf die SiO<sub>2</sub> NP induzierte Caspase-3 und PARP-1 Spaltung.** Die RAW264.7 Makrophagen wurden zunächst für 30 min mit 0.1 % DMSO bzw. 10 µM MAPK-Inhibitoren (SB, SP, PD) vorbehandelt und dann für 2, 4 und 6 h mit 50 µg/ml SiO<sub>2</sub> NP und für 6 h mit jeweils 1 µg/ml CdO und LPS +/- 10 µM Inhibitor in Medium ohne FCS exponiert. Anschließend wurden die Zellysate im Western Blot mit spezifischen Antikörpern auf die Spaltung von Caspase 3 und PARP-1, gekennzeichnet durch (\*), analysiert. Als Ladekontrolle für gleiche aufgetragene Proteinmengen wurde Lamin B verwendet.

Die Inhibierung von JNK1/2 sowie von ERK1/2 verursachte schon basal eine Spaltung der Caspase 3, was im Falle des SP-Inhibitors mit den Daten des Apoptose-Assays korrelierte (Abb. 3.34). Die beobachtete Aktivierung von Caspase 3 und ihres Substrats PARP-1 nach 4 h Exposition mit SiO<sub>2</sub> NP wurde weder durch den SB-Inhibitor noch den PD-Inhibitor beeinflusst. Dieses Ergebnis bestätigt auch die Daten des Apoptose-Assays. Hier kam es lediglich im Falle des PD-Inhibitors insgesamt zu einer leichten Hemmung des Zelltods, wobei die Verteilung der Zellen in die einzelnen Zelltod-Phasen nicht verändert wurde. Ebenso konnte kein Unterschied zwischen der DMSO- bzw. SP-Behandlung detektiert werden, außer der bereits erwähnten basalen Aktivierung der Caspase 3 durch den SP-Inhibitor. Für die Behandlung mit CdO konnten bereits im Apoptose-Assay charakteristische Merkmale des apoptotischen Zelltods detektiert werden, was auch auf Proteinebene (Spaltung Caspase 3 und PARP-1) der Fall war. Jedoch stieg nach Behandlung mit dem PD-Inhibitor der Anteil nekrotischer Zellen stark an, was aber anhand des Western Blot-Ergebnisses nicht deutlich wird.

Hier besitzt der Apoptose-Assay klare Vorteile, da zwischen den Reaktionen der einzelnen Zellen unterschieden werden kann, wohingegen bei der Proteinanalyse mittels Western Blot nur die Gesamtheit der Zellantwort betrachtet wird.

Mithilfe des Apoptose-Assays konnte auf einfache Weise eine Vielzahl an Informationen nach Behandlung mit Partikeln und die Abhängigkeit verschiedener Inhibitoren untersucht werden. Die so gewonnenen Informationen auf Einzelzellebene lieferten dabei im Vergleich zu herkömmlichen Methoden (Western Blot, colorimetrische Zytotoxizitätsassays) ein genaueres Bild über das Absterbeverhalten der Zellen nach Partikel-Behandlung. Der Assay bietet allerdings noch vielfältige Ausbaumöglichkeiten durch den Einsatz weiterer Farbstoffe zusätzliche Parameter, wie z.B. Veränderungen der Mitochondrien, Endosomen oder Lysosomen sowie die Aufnahme von markierten Partikeln, zu untersuchen.





## 4 Diskussion

Die Nanotechnologie gilt als eine der Schlüsseltechnologien des 21. Jahrhunderts. Die Anwendungsgebiete reichen von der Automobilindustrie über die Kommunikationstechnik bis hin zu Pharmazie, Kosmetik- und Lebensmitteltechnologie. Zum einen weisen Nanopartikel ein sehr großes Verhältnis von Oberfläche zu Volumen auf und zum anderen besitzen sie im Vergleich mit dem Bulk-Material völlig neue physikalisch-chemische Eigenschaften, wie Leitfähigkeit, Farbe, Lichtabsorption oder chemische Leitfähigkeit.

Eingesetzt werden synthetisch hergestellte Siliziumdioxid-Nanopartikel vor allem in Farben, Lacken und Klebstoffen zur Verbesserung der Fließeigenschaften, aber auch als Zusatzstoff in der Lebensmitteltechnologie sowie in pharmazeutischen und kosmetischen Produkten. Neuartige SiO<sub>2</sub>-Komposit NP bzw. mesoporöse Nanopartikel werden in der Medizin zu diagnostischen und therapeutischen Zwecken entwickelt, um beispielsweise gezielt Medikamente wie Chemotherapeutika zu ihrem Wirkort zu transportieren und dort freizusetzen (Coti et al., 2009). SiO<sub>2</sub> NP werden in großen Mengen bereits seit den 50er Jahren produziert und gelten als schwach pathogen. Es wurde jedoch schon gezeigt, dass die Inhalation von SiO<sub>2</sub> NP eine transiente Entzündungsreaktion in Ratten (Arts et al., 2007) und in Mäusen (Cho et al., 2007) zur Folge hatte. *In vitro* in Zellkultursystemen konnten für die verschiedensten Zelltypen (Makrophagen, Lungenepithelzellen, Darmzellen) toxische Effekte sowie auch Entzündungsreaktionen gezeigt werden (Park et al., 2009; Lison et al., 2008; Gerloff et al., 2009).

Bislang wird das Risikopotential neuer, industriell hergestellter Nanopartikel nach Inhalation fast ausschließlich in Tierversuchen durch Inhalation bzw. Instillation der Testsubstanzen ermittelt. Die Verwendung von *in vitro* Messungen direkt an der Partikelquelle wird angestrebt, jedoch erschweren bzw. verhindern die häufig sehr geringen Partikelkonzentrationen die Messung der biologischen Effekte.

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Mechanismus der zellulären Antwort nach Exposition mit Nanopartikeln auf zellulärer und molekularer Ebene aufzuklären. Als Modellsystem für die Untersuchungen wurden Makrophagen verwendet, da diese zusammen mit den Epithelzellen nach Inhalation als erste mit den Partikeln in Kontakt kommen und für das Entfernen von Fremdpartikeln bzw. der Vermittlung einer Entzündungsreaktion zuständig sind. Es bestehen verschiedene Hypothesen, um die Toxizität von Nanopartikeln zu erklären. Eine der Haupttheorien postuliert das Auslösen von oxidativem Stress durch die Partikel, so dass zunächst bei niedrigen Stressleveln die anti-oxidative Zellantwort aktiviert wird und erst

bei hohem Stresslevel eine Entzündungsreaktion auftritt bzw. der Zelltod eintreten kann (Nel et al., 2006). Wichtige Vermittler dieser Signalwege sind dabei die MAP-Kinasen sowie die redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren AP-1 und Nrf2. In diesem Zusammenhang sollte geklärt werden, wie die Aktivierung der Signalwege erfolgt und welche Konsequenzen dies für die Zelle hinsichtlich veränderter Genexpressionsmuster und bezüglich des Zelltods hat. Desweiteren sollten die Ergebnisse dieser Studie in die Weiterentwicklung eines existierenden *in vitro* Testsystem für die Bewertung des toxikologischen Potentials von Aerosolen einfließen.

## 4.1 Eigenschaften der untersuchten SiO<sub>2</sub> NP

Nanopartikel besitzen im Vergleich zum äquivalenten Bulk Material ein sehr großes Verhältnis von Oberfläche zu Volumen, so dass sich völlig neue physikalisch-chemische Eigenschaften ergeben. Eine genaue Charakterisierung der verwendeten Nanopartikel speziell in Submerskultur ist essentiell, da erwiesenermaßen die Partikel in wässrigen Systemen mit vorhandenen Komponenten, wie beispielsweise Salze, Aminosäuren, Proteine, interagieren, was zu veränderten Partikel-Eigenschaften führen kann. Über die so gebildete Proteinkorona können die Effekte auf zellulärer und molekularer Ebene, wie Aufnahme, Interaktion mit Rezeptoren, Aktivierung von Signalwegen verändert werden (Nel et al., 2009).

Bei den untersuchten SiO<sub>2</sub> NP handelte es sich um kommerziell erhältliche, über die Flamm-synthese generierte Nanopartikel. Laut Herstellerangaben besitzen sie eine große spezifische Oberfläche und eine nominale Partikel-Größe von 12 nm bzw. 40 nm. Die TEM-Analyse hatte ergeben, dass die einzelnen Partikel zwar eine runde Morphologie aufwiesen, aber als Agglomerate bzw. Aggregate im Größenbereich von über 100 nm vorlagen. Ob die Partikel bereits in ihrer Pulverform aggregiert, d.h. miteinander verschmolzen waren oder sich erst in wässriger Lösung zusammengelagert hatten, konnte mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht nachgewiesen werden. Die Messungen in wässriger Lösung ergaben ein negatives Zetapotential der Nanopartikel, was wahrscheinlich durch Deprotonierung der Silanolgruppen zustande kam. Die Oberflächenladung hat einen Einfluss auf die Anlagerung von geladenen Teilchen, wie beispielsweise Proteine oder Salz-Ionen, und kann so die Größe und Agglomeration der Partikel und möglicherweise auch die Interaktion mit Zelloberflächen beeinflussen (Nel et al., 2009). Beispielsweise werden positiv geladene Polymer-Nanopartikel besser aufgenommen als solche mit negativer Oberflächenladung (Mailander & Landfester, 2009).

Ein Anstieg der Partikel-Agglomeration in Zellkulturmedien (DMEM, DMEM mit Serum) konnte mittels DLS-Messung festgestellt werden. Bei den 12 nm Partikeln wurde die Agglomeration durch FCS noch verstärkt, wohingegen FCS bei den 40 nm Partikeln gegenteiliges bewirkte. Normalerweise haben Proteine aufgrund sterischer Behinderungen eine deagglomerierende Wirkung auf Partikelsuspensionen, was auch schon für TiO<sub>2</sub>, ZnO und Platin NP

gezeigt werden konnte (Xia et al., 2008; Pelka et al., 2009). Der gegenteilige Effekt wurde aber auch schon für Gold NP beschrieben (Zhang et al., 2009). In vergleichenden Studien mit SiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub> und ZnO NP konnte die Bindung von Albumin sowie auch von Apolipoprotein E, Transferrin oder GM-CSF an NP nachgewiesen werden. Für diese Proteine existieren spezielle Oberflächenrezeptoren, über die Aufnahme bzw. Signalwege aktiviert werden können (Deng et al., 2009).

## 4.2 Toxizität der SiO<sub>2</sub> Nanopartikel

Die SiO<sub>2</sub> NP zeigten im Vergleich mit TiO<sub>2</sub> und CB14 NP die stärksten toxischen Effekte nach 24 h Exposition auf, weshalb der weitere Fokus der Arbeit auf den SiO<sub>2</sub> NP lag. Verschiedene Studien konnten bereits zeigen, dass eine Korrelation zwischen Partikel-Effekten (Toxizität, inflammatorische Antwort) eher mit der Partikel-Oberfläche als mit der Partikelgröße korrelierten (Nabeshi et al., 2010; Waters et al., 2010). Für die beiden untersuchten Größen der SiO<sub>2</sub> NP ergaben sich ähnliche toxische Effekte bei gleicher eingesetzter Volumenkonzentration. Laut Herstellerangaben ist die spezifische Oberfläche der 12 nm SiO<sub>2</sub> NP zwar 5-mal so groß wie die der 40 nm SiO<sub>2</sub> NP, aber beide Partikelsorten lagen als Agglomerate bzw. Aggregate vor, so dass keine Rückschlüsse auf oberflächenspezifische Effekte gezogen werden können.

### 4.2.1 Die SiO<sub>2</sub> NP Toxizität ist serumabhängig

Es ist bekannt, dass Nanopartikel in biologischen Systemen eine Proteinkorona ausbilden und sich dadurch veränderte Effekte für die Partikel ergeben können. Zu diesem Zweck wurde die Toxizität der 12 nm und 40 nm SiO<sub>2</sub> NP in Abhängigkeit von Serum zu verschiedenen Zeiten untersucht. Toxische Effekte konnten bereits nach 6 h Exposition mit einer Konzentration von 50 µg/ml detektiert werden, wobei die Anwesenheit von FCS die Toxizität zwar mindern, aber nicht vollständig hemmen konnte. Ähnliches konnte auch in einem Kooperationsprojekt mit der Arbeitsgruppe Marko gezeigt werden (Gehrke et al., in Revision). Durch Reduktion der FCS-Konzentration in Kulturmedium von 10 % auf 1 % waren sowohl für HT29 als auch für A549 Zellen erhöhte toxische Effekte der 12 nm und 40 nm SiO<sub>2</sub> NP zu beobachten, welche eher durch Interaktion mit zellulären Signalwegen als durch oxidativen Stress erklärt werden konnten. Die Ausbildung der Proteinkorona könnte zum einen reaktive Oberflächengruppen maskiert haben, zum anderen aber auch eine veränderte Aufnahme oder Interaktion mit Oberflächenrezeptoren bewirkt haben. Worauf die Toxizität der SiO<sub>2</sub> NP beruht, ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Es bestehen aber verschiedene Erklärungshypothesen, welche im Folgenden vorgestellt werden.

### 4.2.2 Hypothesen zur Erklärung der SiO<sub>2</sub> NP Toxizität

Durch welche Faktoren wird die SiO<sub>2</sub> NP Toxizität bedingt bzw. wie wird diese ausgelöst? Wichtige Eckpunkte zur Erklärung der SiO<sub>2</sub> NP Toxizität sind zum einen die Bildung von ROS als Auslöser für oxidativen Stress, die Interaktion der Nanopartikel mit Oberflächenrezeptoren und dadurch vermittelte Aktivierung verschiedenster Signalwege, zum anderen die Aufnahme und Lokalisation der Partikel sowie deren Fähigkeit, aus zellulären Membran-umschlossenen Kompartimenten ins Zytoplasma zu gelangen.

Die Bildung von extra- oder intrazellulären ROS kann in der Zelle oxidativen Stress auslösen, was zur Aktivierung verschiedenster Signalwege führt. Die Hypothese von Nel (Nel et al., 2006) besagt, dass bei niedrigem Stresslevel zunächst die anti-oxidative Zellantwort, bestehend aus anti-oxidativ wirkenden und entgiftenden Enzymen, angeschaltet wird. Bei hohem oxidativen Stress hingegen kommt es zu Entzündungsreaktionen und letztlich wird der Zelltod eingeleitet. Oxidativer Stress nach Exposition mit SiO<sub>2</sub> NP sowie auch der Nachweis spezifischer Inflammationsmarker konnte für verschiedene Zelllinien, z.B. RAW264.7 Makrophagen oder A549 Zellen, bereits nachgewiesen werden (Park et al., 2009; Lin et al., 2006). Zum Nachweis von vorliegendem oxidativem Stress werden meist die Generierung von ROS, eine GSH-Depletion sowie die Aktivierung der anti-oxidativen Stressantwort angeführt. In der vorliegenden Arbeit konnten keine ROS und nur eine schwache anti-oxidative Zellantwort gezeigt werden, was noch gesondert diskutiert wird.

Eine weitere Erklärungshypothese zur toxischen Wirkung von Nanopartikeln allgemein ist deren Interaktion mit Membran-Rezeptoren. So können einerseits intrazelluläre Signalwege aktiviert werden und andererseits eine Aufnahme der Partikel in die Zelle erfolgen. Die Ausbildung der Proteinkorona um die Nanopartikel beeinflusst dabei entscheidend die biologische Wirksamkeit (Nel et al., 2009). Interessante Kandidaten für die Interaktion von Nanopartikeln mit Oberflächenrezeptoren sind unter anderem die Scavenger-Rezeptoren (SR), sowie auch Toll-like Rezeptoren (TLR) oder Integrine. Zu den typischen Liganden der SR zählen unter anderem Bakterien, nicht-opsonisierte Partikel sowie modifizierte *low-density* Lipoproteine. Eine essentielle Rolle des MARCO-Rezeptors bei der Toxizität von kristallinem SiO<sub>2</sub> in Makrophagen wurde bereits nachgewiesen (Iyer et al., 1996) und die Blockierung des SR-AII Rezeptors mittels spezifischem Antikörper konnte *in vitro* die toxischen Effekte von SiO<sub>2</sub> hemmen (Hamilton et al., 2000). Unfried und Kollegen konnten nach Exposition von Ratten-Lungenzellen mit Carbon Black NP eine Aktivierung des EGF-Rezeptors nachweisen, was zur Aktivierung des MAPK-Signalwegs und JNK-vermittelter Apoptose führte (Unfried et al., 2007).

Ein anderer Wirkmechanismus wird über die lysosomale Ruptur beschrieben (Boya & Krämer, 2008). Nach der Aufnahme kommt es zur Anhäufung der Nanopartikeln in Lysosomen, in denen normalerweise der enzymatische Abbau von aufgenommenen Partikeln bzw. zelleigenen Komponenten stattfindet. Unlösliche Partikel können aber nicht abgebaut werden und stören infolgedessen die Membranintegrität, so dass es schließlich zur Ruptur der Membran und

Freisetzung des lysosomalen Inhalts (u.a. Cathepsine, andere Hydrolasen) sowie der Partikel ins Zytosol kommt. Freigesetzte Enzyme können Caspasen aktivieren und so Apoptose über den mitochondrialen Weg einleiten. Dieser Mechanismus wurde bereits für die Exposition von RAW264.7 Makrophagen sowie BEAS-2B Zellen mit amino-modifizierten Polystyrol NP beschrieben (Xia et al., 2008). Desweiteren konnte ein Zusammenhang zwischen lysosomaler Ruptur und der Aktivierung des Nalp3-Inflammasoms nach Exposition mit kristallinem SiO<sub>2</sub> (Hornung et al., 2008) bzw. mit amorphen SiO<sub>2</sub> NP (Morishige et al., 2010) hergestellt werden. Über die Aktivierung des Nalp3-Inflammasoms wird die Prozessierung und Sezernierung von IL-1 $\beta$ , einem potenten proinflammatorischen Zytokin, vermittelt.

### 4.3 Aufnahme der SiO<sub>2</sub> NP in die Makrophagen

Um genauere Rückschlüsse auf die möglichen Auslöser der toxischen Wirkung der SiO<sub>2</sub> NP ziehen zu können, musste zunächst geklärt werden, ob die Partikel in die Makrophagen aufgenommen werden bzw. wie sie in der Zelle vorliegen. Hierzu wurden TEM-Analysen von NP behandelten Zellen in Abhängigkeit von Serum durchgeführt, da die gebildete Proteinkorona einen wesentlichen Einfluss auf die Aufnahme bzw. die Interaktion mit verschiedenen Membran-Rezeptoren haben kann. Über die TEM-Analyse kann nicht nur die Aufnahme der Partikel, sondern auch ihre Lokalisation in und außerhalb der Zelle bestimmt werden. So kann eindeutig zwischen Oberflächen-assoziierten Partikeln und solchen, welche die Zellmembran permeiert haben, unterschieden und ihre Lokalisation im Zytosol bzw. in anderen zellulären Kompartimenten bestimmt werden. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die 12 nm als auch die 40 nm SiO<sub>2</sub> NP unabhängig von Serum in die Makrophagen aufgenommen wurden. Unterschiede ergaben sich allerdings in der Lokalisation der Nanopartikel in der Zelle bzw. in der Menge der aufgenommenen Partikel.

Unter Serum-reichen Bedingungen (10 % FCS) lagen die Partikel-Ansammlungen im Zytosol in Membran-umschlossenen Vesikeln vor. Charakteristische Membran-Einstülpungen für eine endozytotische Aufnahme konnten ebenfalls beobachtet werden, was auf eine Aufnahme der Partikel über Phagozytose bzw. auch Pinozytose schließen lässt.

Im Gegensatz dazu waren die aufgenommenen SiO<sub>2</sub> NP unter Serum-freien Bedingungen nur im äußeren Randbereich der Zelle bzw. Membran-assoziiert vorzufinden, wobei internalisierte Partikel-Ansammlungen meist nicht Membran-umschlossen vorlagen. Dies deutet darauf hin, dass die Partikel über unterschiedliche Aufnahmewege je nach Expositionsszenario in die Zelle gelangen. Anhand der EM-Bilder lassen sich jedoch keine weiteren Rückschlüsse auf die zugrundeliegenden Aufnahmemechanismen treffen, da für genauere Aussagen weitere Untersuchungen wie beispielsweise Inhibitor- oder siRNA-Studien benötigt werden.

Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede bei der Serum-abhängigen Aufnahme der Partikel ist die Ausbildung einer Proteinkorona um die Nanopartikel, sobald diese in Kontakt mit Protein-haltigen Flüssigkeiten kommen (Nel et al., 2009). FCS besteht größtenteils aus Albuminen, IgGs, Komponenten des Komplementsystems sowie Wachstumsfaktoren, welche dann an Oberflächenrezeptoren binden und eine Aufnahme vermitteln können. Zu diesen möglichen Oberflächenrezeptoren zählen der Mannose- (MR), der Komplement- (CR) oder der Immunglobulin- Rezeptor (Fc $\gamma$ R) (Dobrovolskaia et al., 2007).

Eine Studie zur Serum-abhängigen Aufnahme von modifizierten Polystyrol-Beads (100 nm) in humanen Makrophagen, THP-1 Monozyten und differenzierten THP-1 Zellen konnte sowohl Serum-abhängige als auch Zelltyp-spezifische Unterschiede bei der Aufnahme feststellen (Lunov et al., 2011). Die humanen Makrophagen nahmen die Nanopartikel mit Serum über CD64-vermittelte Phagozytose (CD64: Bestandteil Fc $\gamma$ -Rezeptor) auf, wohingegen unter Serum-freien Bedingungen Endozytose vermittelt über den Scavenger-Rezeptor, Clathrin und Dynamin stattfand. Die Makrophagen-ähnlichen differenzierten THP-1 Zellen nahmen die NP ohne Serum ebenfalls über Endozytose auf, wohingegen mit Serum Makropinozytose detektiert wurde. Eine Beteiligung des Scavenger-Rezeptors A an der Clathrin-vermittelten Endozytose von SiO<sub>2</sub> NP in RAW264.7 Makrophagen unter Serum-freien Bedingungen wurde auch von einer anderen Gruppe bestätigt (Orr et al., 2010). Die Scavenger-Rezeptor A vermittelte NP-Aufnahme korrelierte dabei mit der induzierten proinflammatorischen Zellantwort. Stayton und Kollegen demonstrierten, dass die Abwesenheit von FCS die Aufnahme von SiO<sub>2</sub> NP in Lungenepithelzellen stark verlangsamte (Stayton et al., 2009), und schon eine Hitzeinaktivierung von Serum ebenfalls die NP-Aufnahme in A549 verschlechterte (Lesniak et al., 2010).

Eine mögliche Erklärung für die Aufnahme der SiO<sub>2</sub> NP unter Serum-freien Bedingungen ist der Zelleintritt über passive Diffusion. Geiser und Kollegen demonstrierten, dass nach Exposition von Lungenmakrophagen (aus dem Schwein) mit Nano- und Mikro-Polystyrol-Beads die NP nicht über Endozytose, sondern über Diffusion bzw. adhäsive Interaktionen aufgenommen wurden. Die Partikel lagen nicht Membran-umschlossen im Zytosol der Zelle vor, wodurch das toxische Potential durch den direkten Zugang zu intrazellulären Proteinen, Organellen und DNA wesentlich verstärkt werden könnte (Geiser et al., 2005).

Aufnahmestudien von 70 nm SiO<sub>2</sub> NP in HEP-2 Zellen konnten eine Lokalisation der NP im Zellkern zeigen (Chen & von Mikecz, 2005), was im Gegensatz zu den eigenen Ergebnissen steht. Untersuchungen aus der Arbeitsgruppe an Hela-Zellen (Al-Rawi et al., 2011) und RAW264.7 Makrophagen (mündl. Aussage M. Al-Rawi) zeigten ebenfalls nur eine zytosolische Lokalisation von internalisierten SiO<sub>2</sub> NP in Endosomen bzw. Lysosomen und keine NP im Zellkern oder den Mitochondrien. Ebenfalls konnten keine NP im Zellkern von Maus-Keratinocyten (Yu et al., 1999) oder in A549 Zellen (Jin et al., 2007; Stayton et al., 2009) gefunden werden.

### 4.3.1 Zusammenhang Aufnahme - Toxizität von SiO<sub>2</sub> NP

Unterschiede in der Aufnahme bzw. in der intrazellulären Lokalisation der Nanopartikel können weitere Hinweise auf die Wirkweise der SiO<sub>2</sub> NP Toxizität geben. Die untersuchten SiO<sub>2</sub> Nanopartikel zeigten in Abwesenheit von FCS bereits nach 6 h Exposition eine verstärkte Toxizität auf. Unter beiden Bedingungen wurden die Partikel in die Makrophagen aufgenommen, allerdings waren die Partikel ohne Serum eher Membran-assoziiert und mit Serum in intrazellulären Vesikeln zu finden.

Untersuchungen verschiedener Gruppen konnten zeigen, wie bereits besprochen, dass die NP eine lysosomale Ruptur auslösen können, durch welche die Partikel selbst sowie auch lysosomale Enzyme freigesetzt werden und dadurch den Zelltod einleiten können.

Eine weitere Erklärung ist die Interaktion der freiliegenden Silanol-Gruppen an der Oberfläche der Nanopartikel mit der Zellmembran und der so ausgelösten Membranolyse. Die hämolytische Wirkung von SiO<sub>2</sub> NP konnte schon in Studien mit Erythrozyten gezeigt werden (Harley & Margolis, 1966; Slowing et al., 2009). Bereits 1966 postulierten Nash und Kollegen, dass die Denaturierung von Proteinen in Gegenwart azider Silanolgruppen zur Membranschädigung und schließlich zur Hämolyse führte (Nash et al., 1966). Die Interaktion der Nanopartikel mit Oberflächenrezeptoren wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, allerdings lässt die unterschiedliche Aufnahme der Partikel in Abhängigkeit von Serum auch auf unterschiedliche Wechselwirkungen mit Oberflächenrezeptoren schließen.

### 4.3.2 SiO<sub>2</sub> NP induzieren Serum-unabhängig Vakuolenbildung

Die TEM-Analysen konnten einen weiteren Phänotyp nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition aufzeigen. Es wurde die Ausbildung von Doppelmembranstrukturen im Zytosol sowie von Vakuolen verschiedener Größen beobachtet, was auch im Lichtmikroskop deutlich sichtbar war. Die detektierten Vakuolen enthielten neben Partikel-Ansammlungen auch zelluläre Strukturen, was auf Autophagie-Prozesse hindeutet. Diese Prozesse waren sowohl mit als auch ohne Serum für beide SiO<sub>2</sub> NP Größen zu beobachten, wobei die Effekte ohne Serum wesentlich stärker ausgeprägt waren.

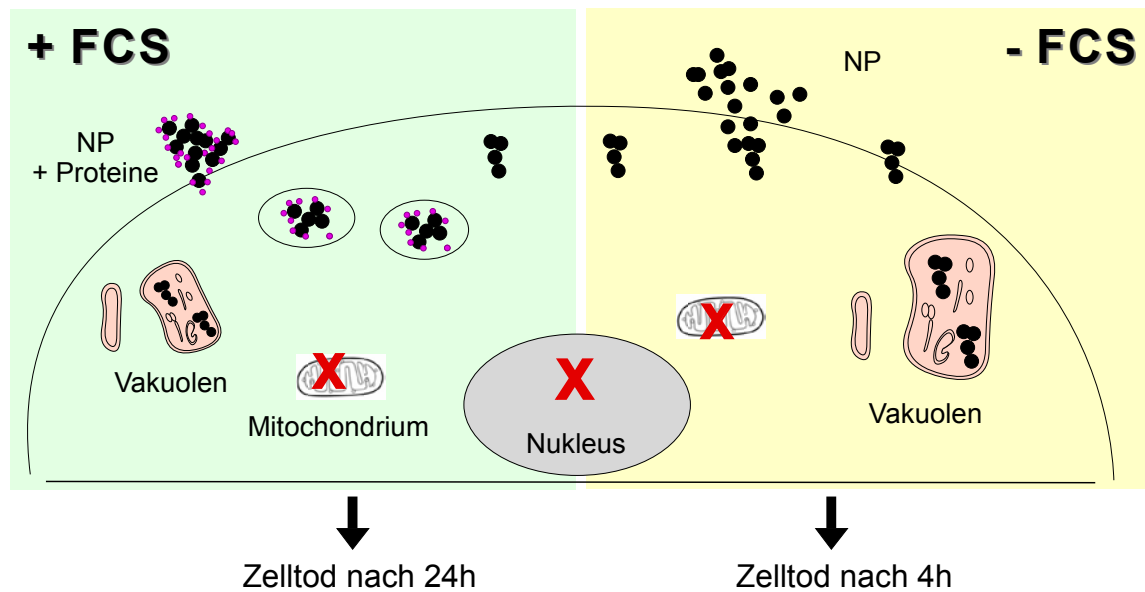
Bei der Autophagie handelt es sich um einen Schutzmechanismus der Zelle in Zeiten von Nährstoffmangel, um das Überleben der Zelle zu sichern. Komponenten des Zytosols sowie auch Organellen werden lysosomal abgebaut, um der Zelle dann wieder Nährstoffe für wichtige biologische Reaktion zur Verfügung zu stellen. Autophagie spielt auch eine wesentliche Rolle bei Krebs. Zum einen wird das Überleben der Krebszellen bei Nährstoff- und Sauerstoffmangel in größeren Tumoren gefördert, und zum anderen über verstärkte Aktivierung der Autophagie der Chemotherapeutika-vermittelte Zelltod umgangen (Eeskilinen, 2011).

Zunächst kommt es bei der Autophagie zur Ausbildung von Doppelmembranstrukturen um

Komponenten des Zytosols, wobei als Kennzeichen bei TEM-Analysen gleiche Elektronendichte von Zytosol und Autophagosom-Inneren zu beobachten sind. Bei weiterem Fortschreiten der Prozesse, also der Fusion mit Lysosomen bzw. Endosomen kommt es dann zum Abbau der eingeschlossenen Komponenten erkennbar im TEM durch einen Anstieg der Elektronendichte (Eskelinen, 2008). Eine Interpretation der EM-Bilder ist häufig schwierig bzw. auch nicht immer eindeutig, weshalb weitere Marker, wie beispielsweise die Prozessierung von LC3-I zu LC3-II auf Proteinebene oder immunhistochemisch über Antikörperfärbung benötigt werden. In der Diplomarbeit von Muna Ali (Ali, 2011) konnte nach Exposition von Makrophagen mit monodispersen 50 nm SiO<sub>2</sub> NP ebenfalls mikroskopisch die Bildung von Vakuolen und auf Proteinebene der Autophagosomen-Marker LC3-II nachgewiesen werden. Gehemmt werden konnten beide Prozesse durch Bafilomycin, einem Inhibitor, welcher die Ansäuerung der Lysosomen und somit deren Verschmelzung mit Autophagosomen verhindert. Neuere Studien konnten Quantum Dot Nanopartikel als eine neue Klasse Autophagie-auslösender Substanzen identifizieren (Zabirnyk et al., 2007). Gold-Nanopartikel lösten in humanen Fibroblasten Autophagie sowie auch oxidativen Stress aus. Es wurde postuliert, dass der Einschluss der Nanopartikel in Autophagosomen als Schutz vor oxidativem Stress fungierte (Li et al., 2010). Desweiteren konnte nach Exposition von A549 mit PAMAM Nanopartikeln (Starburst Polyamidoamin Dendrimere) Autophagie über den Akt-mTOR-Signalweg ausgelöst werden (Li et al., 2009). Autophagie kann auch bei verstärkter Vakuolenbildung zum Zelltod führen (Kroemer et al., 2008). Dieser Aspekt wird im Zusammenhang mit dem SiO<sub>2</sub> NP verursachten Zelltod gesondert diskutiert.

In Abb. 4.1 sind die Serum-abhängigen Effekte bezüglich Aufnahme und Toxizität der SiO<sub>2</sub> NP bei einer Konzentration von 50 µg/ml in den RAW264.7 Makrophagen zusammengefasst dargestellt. In Anwesenheit von Serum wurden die SiO<sub>2</sub> NP in die Zellen aufgenommen, was über Phagozytose bzw. Pinozytose erfolgte. Intrazellulär waren die Partikel hauptsächlich in Membran-umschlossenen Vesikeln aber auch nicht Membran-umschlossen im Zytosol lokalisiert. Im Gegensatz dazu wurden die Partikel in Abwesenheit von FCS schlechter aufgenommen und waren eher mit der Plasmamembran assoziiert bzw. lagen intrazellulär nicht Membran-umschlossen vor. Es wurden keine Partikel in den Mitochondrien oder im Zellkern (rote Kreuze) detektiert. Unabhängig von Serum konnten in beiden Fällen charakteristische Merkmale der Autophagie über die Ausbildung von Vakuolen nachgewiesen werden, wobei die Intensität der Vakuolenbildung in Abwesenheit von FCS wesentlich verstärkt war. Dies bedarf allerdings noch genauerer Untersuchungen, insbesondere die Klärung der Regulation der Autophagie-Prozesse sowie der Zusammenhang zwischen Autophagie und NP-induziertem Zelltod.





**Abbildung 4.1:** Zusammenfassung der Serum-abhängigen Effekte der SiO<sub>2</sub> NP auf die RAW264.7 Makrophagen. Zusammengefasst sind die serumabhängigen Effekte (Aufnahme, Vakuolenbildung, Toxizität) nach Exposition von RAW264.7 Makrophagen mit SiO<sub>2</sub> NP (50 µg/ml) dargestellt. Nähere Erläuterungen siehe Text.

#### 4.4 Aktivierte Signalwege nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition

Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag hauptsächlich auf der Nanopartikel vermittelten Aktivierung verschiedener Signalwege bzw. der Überprüfung der oxidativen Stress Hypothese. Zu diesem Zweck wurden alle mechanistischen Studien mit den 12 nm SiO<sub>2</sub> NP unter Serum-freien Bedingungen durchgeführt, da zum einen die beobachteten Effekte durch die Abwesenheit von FCS verstärkt wurden und zum anderen dieses Expositionsszenario die Verhältnisse in der Lunge am ehesten widerspiegelt. CdO und LPS wurden bei den mechanistischen Studien als Positivkontrollen für oxidativen Stress bzw. Inflammation eingesetzt.

Das Auslösen von oxidativem Stress gilt als eine der Hypothesen zur Erklärung der Nanopartikel Toxizität. Die so generierten ROS können dabei entweder als *second messenger* verschiedene Signalwege aktivieren und Genexpression induzieren oder aber auch zum Zelltod führen. Das von Nel et al. postulierte hierarchische Prinzip geht dabei bei geringem Stress von einer anti-oxidativen Stressantwort aus, was dann bei hohem Stress zu Entzündungsreaktionen und letztlich zum Zelltod führt (Nel et al., 2006). Die am meisten in diesem Zusammenhang untersuchten Signalwege sind dabei die redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren AP-1, Nrf2 und NF-κB. Der Fokus der Arbeit wurde deshalb auf die anti-oxidative und die proinflammatorische Zellantwort nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition gelegt.

#### 4.4.1 Anti-Oxidative Stressantwort nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition

Nach Exposition der Makrophagen mit den SiO<sub>2</sub> NP konnte keine verstärkte ROS-Bildung beobachtet werden und eine Aktivierung bzw. Stabilisierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 war nur schwach zu detektieren. Die mRNA-Level der untersuchten Nrf2-Zielgene waren nach Behandlung mit SiO<sub>2</sub> NP nur leicht erhöht für HO-1 und  $\gamma$ GCL-C, wohingegen die NQO1 Genexpression nicht induziert wurde. Erhöhte HO-1 Proteinlevel konnten ebenfalls kaum detektiert werden. Dies zusammengenommen zeigt, dass die SiO<sub>2</sub> NP induzierte anti-oxidative Zellantwort sehr schwach ausfiel. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Untersuchungen anderer Gruppen, die nachweislich durch SiO<sub>2</sub> NP ausgelösten oxidativen Stress zeigten. Vergleichende Untersuchungen von Park und Kollegen *in vivo* in Mäusen sowie auch *in vitro* in Makrophagen zeigten nach Exposition mit 12 nm SiO<sub>2</sub> NP sowohl ROS-Bildung und erniedrigte GSH-Level als auch eine Entzündungsreaktion, die durch erhöhte mRNA-Level proinflammatorischer Gene (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) und erhöhte Zytokin-Level von TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  im Blut nachgewiesen wurde. Auch in anderen Zelllinien konnte SiO<sub>2</sub> NP induzierter oxidativer Stress demonstriert werden. So wurde nach Exposition von humanen Keratinozyten mit 12 nm SiO<sub>2</sub> NP reduzierte GSH-Levels gefunden, wobei keine ROS detektiert wurden (Yu et al., 2009) und in BEAS-2B war neben der ROS-Bildung und erniedrigten GSH-Level ein ERK-vermittelte Aktivierung von Nrf2 beobachtet worden (Eom et al., 2009). Außerdem konnten in Caco-2 Zellen oxidative DNA-Schäden sowie auch eine GSH-Depletion nach Exposition mit SiO<sub>2</sub> NP festgestellt werden (Gerloff et al., 2009).

Die Generierung von ROS alleine ist also noch kein eindeutiges Indiz für oxidativen Stress, da der standardmäßig eingesetzte DCF-Assay nicht alle möglichen generierten ROS nachweisen kann. Vielmehr ist auch die Aktivierung entsprechender Signalwege wichtig. Die eigenen Daten deuten jedoch darauf hin, dass ROS sowie auch die beobachtete schwache anti-oxidative Antwort eine nebensächliche Rolle bei den SiO<sub>2</sub> NP induzierten Effekten in den Maus-Makrophagen spielten.

#### 4.4.2 Aktivierung des MAPK-Signalwegs nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition

Eine Aktivierung der MAP-Kinasen p38, JNK1/2 und ERK1/2 nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition konnte sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig nachgewiesen werden. Die effektive Dosis von 50  $\mu$ g/ml SiO<sub>2</sub> NP (12 nm) zeigte bereits nach 2 h eine Phosphorylierung aller drei untersuchten MAP-Kinasen. Zeitlich korrelierend wurde auch die Aktivierung der MAPK-Substrate cJun (JNK-Substrat) und MK2 (p38 Substrat) beobachtet.

Die Aktivierung des MAPK-Signalwegs in Zusammenhang mit oxidativem Stress, Inflammation und Zelltod konnte für verschiedenste Nanomaterialien bereits gezeigt werden. Kristallines SiO<sub>2</sub> verursachte Inflammation wird wesentlich über den MAPK-Signalweg und AP-1 vermittelt (Castranova et al., 2004). So wird nach Stimulation mit kristallinem SiO<sub>2</sub> über die Src-vermittelte ERK1/2 Aktivierung die Produktion von TNF $\alpha$  und TGF- $\beta$  in Makrophagen (Li et al., 2009)

sowie die IL-8 Sekretion in A549 (Ovrevrik et al., 2004) reguliert. In Epithelzellen wurde über die Bindung von Carbon Black NP an den EGF-Rezeptor der MAPK-Signalweg aktiviert, dessen  $\beta$ 1-Integrin spezifische ERK1/2 Aktivierung proliferationsfördernd war, während über die JNK1/2 Apoptose eingeleitet wurde (Sydlik et al., 2006). Eine Beteiligung der JNK an Partikel-induzierter Apoptose konnte ebenso für TiO<sub>2</sub> NP gezeigt werden (Wu et al., 2009). Für unterschiedliche Nanopartikel konnten demnach über die Aktivierung des MAPK-Signalwegs wichtige Prozesse wie Inflammation, Proliferation und Apoptose reguliert werden, was mit detektiertem oxidativen Stress korrelierte. Die eigenen Untersuchungen konnten jedoch nur schwachen oxidativen Stress nachweisen, was darauf schließen lässt, dass die Aktivierung des MAPK-Signalwegs unabhängig von oxidativem Stress erfolgte. Es muss aber noch berücksichtigt werden, dass bei der effektiven Dosis von 50  $\mu$ g/ml bereits nach 6 h Exposition toxische Effekte auftraten, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass die beobachteten Effekte nicht direkt durch Partikel induziert wurden, sondern ein Resultat der Partikel-induzierten Zytotoxizität waren.

#### 4.4.3 Aktivierung der übergeordneten MAP2-Kinasen

Es stellt sich nun die Frage, wie die Aktivierung der MAP-Kinasen erfolgte. Auf Ebene der MAP2-Kinasen konnte gezeigt werden, dass nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition die Kinasen MKK1/2, MKK3/6 und MKK4 ebenfalls bereits nach 2 h phosphoryliert wurden, wohingegen MKK7 nicht beteiligt zu sein schien. MKK4 und MKK7 werden beide nach UV-Strahlung, Anisomycin oder osmotischem Stress phosphoryliert, wobei MKK7 speziell auch über proinflammatorische Zytokine aktiviert werden kann (Haeusgen et al., 2011). Welche Faktoren jedoch für die Weitergabe des Signals an die MAP2K zuständig waren, wurde mangels spezifischer Antikörper nicht näher untersucht. Mögliche Kandidaten aus der Familie der MAP3-Kinasen sind ASK1, TAK1 und RIPK-1. TAK1 kann über verschiedene Stimuli wie Zytokine und mikrobielle Pathogene (über Toll-like Rezeptoren) aktiviert werden und hat wichtige Funktionen bei der angeborenen und adaptiven Immunantwort. Ein bekanntes Beispiel ist LPS, welches nach Bindung an TLR4 über IRAK und TAK die Aktivierung der MAP-Kinasen und NF- $\kappa$ B vermittelt und so die proinflammatorische Zellantwort auslöst (Sato et al., 2005; Carpenter et al., 2009). Kontinuierliche orale Verabreichung von TiO<sub>2</sub> NP verursachte Leberschäden in Mäusen, was auf eine Aktivierung der Signalkaskade ausgehend von den TLR über NF- $\kappa$ B zur TNF $\alpha$  Produktion und dadurch entstandener Inflammation und Apoptose zurückgeführt werden konnte (Cui et al., 2011). Eine weitere MAP3-Kinase, ASK1, wird über verschiedene Stressoren wie ROS, LPS oder TNF $\alpha$  stimuliert (Tobiome et al., 2001; Nagai et al., 2006). Die RIPK-1 ist ein entscheidender Faktor TNF-Rezeptor-vermittelter Signale, so dass zum einen das Überleben durch Aktivierung von NF- $\kappa$ B und der resultierenden Induktion anti-apoptotische Gene gesichert wird, zum anderen aber auch Zelltod durch Apoptose, Nekroptose bzw. Autophagie verursacht wird (Van Herreweghe et al., 2010; Baehrecke, 2005).

## 4.5 Proinflammatorisches Genexpressionsprofil nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition

Partikel-induzierter oxidativer Stress wird meistens auch von einer inflammatorischen Antwort begleitet, was schon über *in vivo* Studien an Mäusen und Ratten sowie in verschiedenen Zellkultursystemen nachgewiesen wurde. Zu diesem Zweck wurde mittels quantitativer Real-Time PCR das Genexpressionsprofil ausgewählter proinflammatorischer Gene nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition untersucht. Zu den untersuchten Genen gehören neben FOS als Teil des AP-1 Transkriptionsfaktors und der iNOS, welche die Bereitstellung von NO für die direkte Immunabwehr vermittelt, auch Vertreter wichtiger inflammatorischer Mediatoren wie die Zytokine TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, die Chemokine MCP-1 und Cxcl2, die COX-2 für die Generierung von Lipid-Mediatoren und Mmp9 als Vertreter proteolytischer Enzyme.

Konzentrationsabhängig wurden alle proinflammatorischen Gene bis auf Mmp9 bei der effektiven Dosis von 50  $\mu$ g/ml induziert, wobei es beim zeitlichen Verlauf früh-aktivierte (hoher mRNA-Level bereits nach 2h) und spät-induzierte (maximaler Expressionslevel nach 6h) gab. Aber auch für die subtoxische Dosis von 10  $\mu$ g/ml konnte nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition eine schwache Induktion der proinflammatorischen Gene (2 - 5-faches der Kontrolle) bis auf iNOS, FOS und Mmp9 festgestellt werden. Dies lässt eher auf direkte Partikel-bedingte als indirekt durch Toxizität verursachte Induktion der Zielgene schließen. In der Literatur zeigen verschiedene Studien sowohl *in vivo* als auch *in vitro* ebenfalls eine Aktivierung dieser Gene nach Stimulation mit Silica. So konnten Cho und Kollegen in einer Instillationsstudie in Mäusen mit amorphen SiO<sub>2</sub> NP eine transiente aber heftige Inflammation in der Lunge nachweisen. Auf mRNA- und Protein-Ebene konnte eine Induktion von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 sowie MCP-1 und Cxcl2 (Cho et al., 2009) sowie auch von COX-2 und iNOS (Park et al., 2008) nachgewiesen werden, was die eigenen Daten bestätigt. *In vivo* in der Ratte konnten nach Stimulation mit kristallinem SiO<sub>2</sub> durch Hemmung von Cxcl2 und TNF $\alpha$  mittels inhibierender Antikörper sowohl die Infiltration von Neutrophilen (Cxcl-2 vermittelt) verhindert und der Inflamationsprozess (TNF $\alpha$  induziert) gestoppt werden (Driscoll et al., 2000).

Die Untersuchungen ergaben auch, dass sich die zelluläre Antwort in eine frühe und späte Aktivierungsphase aufteilte. Zu den früh aktivierte Genen gehörten TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MCP-1 und Cxcl2. Von TNF $\alpha$  ist bekannt, dass es über auto- bzw. parakrine Wirkung die Expression anderer Gene wie IL-6, COX-2 oder IL-1 $\beta$  auslösen kann (Gaestel, 2009; Driscoll et al., 2000). Untersuchungen mit einem Neutralisierungs-Antikörper konnten aber eine Beteiligung von TNF $\alpha$  an der Signalvermittlung sowie auch am SiO<sub>2</sub> NP induzierten Zelltod ausschließen (Daten nicht gezeigt).

Die Induktion der FOS-mRNA sowie auch die Phosphorylierung von cJun lassen auf eine Aktivierung des AP-1 Transkriptionsfaktor-Komplexes nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition schließen. Auf Proteinebene konnte lediglich die Freisetzung von TNF $\alpha$  verifiziert werden. Es konnte keine

Bildung von NO oder eine Freisetzung von IL-1 $\beta$  nachgewiesen werden. Möglicherweise wird zwar durch die Partikel-Behandlung die mRNA-Synthese induziert, die Sekretion aber aufgrund weiterer Regulationsmechanismen verhindert. IL-1 $\beta$  beispielsweise muss vor der Sekretion erst über den Nalp3-Inflammasom-Komplex prozessiert werden, bevor eine Freisetzung erfolgen kann. Es wurde außerdem schon gezeigt, dass NF- $\kappa$ B ein negativer Regulator der IL-1 $\beta$  Sekretion ist (Greten et al. 2007). In einer Mikroarray-Studie an Makrophagen, die mit verschiedenen Größen von amorphen SiO<sub>2</sub> NP behandelt wurden, konnten unter anderem eine schnelle Aktivierung der mRNA von TNF $\alpha$  und Cxcl2 detektiert werden, welche sich aber nur für TNF $\alpha$  auf Proteinebene verifizieren ließen. Die Mengen an sezerniertem IL-1 $\beta$  sowie Mmp2 lagen unterhalb des Detektionslimits (Waters et al., 2010). Zur Messung von freigesetztem IL-1 $\beta$  *in vitro* werden beispielsweise Makrophagen mit LPS zunächst vorstimuliert, um dann nach Exposition mit Partikeln eine messbare IL-1 $\beta$  Freisetzung zu erreichen (Yazdi et al., 2010). Die Notwendigkeit des "Priming", um eine IL-1 $\beta$  Sekretion *in vitro* zu beobachten, wird dadurch begründet, dass Makrophagen im Organismus meistens durch ihren ständigen Kontakt mit verschiedenen Stressoren aktiviert vorliegen.

Um nun die Zusammenhänge zwischen der Aktivierung des MAPK-Signalwegs, der Entstehung von oxidativem Stress und der beobachteten veränderten Genexpression zu klären, kamen verschiedenen Inhibitoren zum Einsatz, was in den folgenden Abschnitten diskutiert wird.

## 4.6 Oxidativer Stress ist nicht der Auslöser für die SiO<sub>2</sub> NP vermittelten Effekte

Bislang konnte nur eine sehr schwache anti-oxidative Zellantwort nach SiO<sub>2</sub> NP beobachtet werden, wohingegen der MAPK-Signalweg sowie auch proinflammatorische Gene stark aktiviert wurden. Um die Rolle von oxidativem Stress in diesem Zusammenhang zu klären, wurde unter Verwendung des Antioxidanz N-Acetyl-L-Cystein (NAC) der MAPK-Signalweg sowie die Genexpression genauer untersucht. Die anti-oxidative Wirkung von NAC beruht zum einen auf seiner Rolle als Radikalfänger und zum anderen auf der Bereitstellung von Cystein für die Glutathion-Synthese (Gillissen et al., 1997). NAC wird unter anderem schon seit den 60er Jahren als Mukolytikum eingesetzt, da es die Disulfid-Brücken der Mukoproteine reduziert. Außerdem ist es eines der gebräuchlichsten Gegenmittel bei Paracetamol-Vergiftungen. NAC werden auch anti-inflammatorische Eigenschaften zugeschrieben, da sich bei COPD-Patienten sowohl die Menge der Entzündungszellen als auch von IL-8 im Sputum durch NAC-Gabe reduzieren ließen (van Overveld et al. 2005).

In der Arbeit konnten mittels NAC die Effekte der Positivkontrolle CdO, einem bekannten Auslöser von oxidativem Stress, bezüglich Toxizität, Signalling und Genexpression gehemmt werden. Allerdings hatte NAC keinen Einfluss auf die SiO<sub>2</sub> NP induzierten Effekte. Die Aktivierung des MAPK-Signalwegs wurde nicht gehemmt und lediglich die Genexpression von

HO-1 und COX-2 wurde leicht gemindert. Auch der SiO<sub>2</sub> NP induzierte Zelltod konnte durch NAC nicht gehemmt werden. In Studien mit ZnO Nanopartikeln in BEAS-2B Zellen konnte über NAC oxidativer Stress gehemmt werden, so dass die Zytotoxizität verhindert und die erhöhten intrazellulären Calcium-Level gesenkt wurden (Huang et al., 2010). Ebenso konnte durch NAC in humanen Keratinozyten die Generierung von ROS, Lipidperoxidation und Apoptose ausgelöst durch TiO<sub>2</sub> NP gehemmt werden (Xue et al., 2011). All dies zusammengenommen deutet darauf hin, dass die untersuchten SiO<sub>2</sub> NP kaum oxidativen Stress in Makrophagen verursachten und dieser nur eine nebensächliche Rolle bei den beobachteten Effekten spielt.

## 4.7 MAPK-vermittelte Aktivierung der Genexpression nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition

Die Biosynthese der untersuchten Gene der proinflammatorischen Antwort wird auf verschiedensten Ebenen reguliert, wobei die MAPK sowie auch die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- $\kappa$ B eine wichtige Rolle spielen. Zur Klärung des Zusammenhangs zwischen Partikel-induzierter Aktivierung des MAPK-Signalwegs sowie der beobachteten proinflammatorischen Genantwort kamen spezifische MAPK-Inhibitoren (SB, SP, PD) zum Einsatz. Es wurde sowohl die Genexpression als auch die Sezernierung von TNF $\alpha$  und IL-6 in Abhängigkeit der Inhibitoren getestet.

Über den SB203580-Inhibitor wird die Kinase-Aktivität der p38 gehemmt, so dass die Phosphorylierung von MK2 verhindert wird. Über p38 - MK2 wird die Stabilität gebildeter mRNAs, welche ein spezifisches ARE-Bindemotiv besitzen, wesentlich beeinflusst. Zu den so regulierten Genen zählen alle hier untersuchten proinflammatorischen Gene (Kaminska, 2005; Frevel et al., 2003) p38 kann weiterhin über Proteine, die für Chromatin-Umbau und Modifikation zuständig sind, die Genexpression beeinflussen. So tritt an den Promotoren von IL-6, IL-8 und MCP-1 verstärkte Phosphorylierung von Histon H3 auf, so dass NF- $\kappa$ B verstärkt daran binden kann. (Cuadrado & Nebreda, 2010). p38 kann auch indirekt die Genexpression von Jun und Fos über Aktivierung von ATF-2 oder Elk-1 vermitteln (Reddy et al., 2002).

Die JNK-Funktion kann über den SP600125-Inhibitor gehemmt werden, so dass eine Phosphorylierung von cJun nicht mehr erfolgen kann. Infolgedessen wird die Aktivität des AP-1 Transkriptionsfaktor-Komplexes, der aus Mitgliedern der Jun- und Fos-Familie gebildet wird, vermindert bzw. gehemmt (Karin et al., 2004). Es ist allerdings bekannt, dass p38 und JNK sich gegenseitig über positive Feedback-Schleifen beeinflussen können. So konnte in den eigenen Experimenten eine verstärkte JNK1/2- und cJun Phosphorylierung bei Hemmung von p38 ebenso wie erhöhte Aktivierung von p38 und MK2 bei gehemmter JNK1/2 Funktion festgestellt werden, was auch schon bei Gaestel et al. (2009) beschrieben wird.

Über den PD98059 -Inhibitor wird durch Hemmung der MKK1/2 Funktion die Phosphorylierung von ERK1/2 verhindert. ERK1/2 ist zum einen für die Phosphorylierung von

Fos-Proteinen zuständig und vermittelt so die Aktivierung des AP-1 Komplexes. Zum anderen kann auch indirekt über Aktivierung von Elk1 die Genexpression von Fos aktiviert werden (Karin, et al., 1997; Reddy et al., 2002). Desweiteren wurde speziell für  $\text{TNF}\alpha$  gezeigt, dass ERK1/2 sowohl den Kernexport der mRNA sowie auch die Sekretion von  $\text{TNF}\alpha$  über das Enzym TACE vermittelt (Gaestel et al., 2009).

Die mRNA-Synthese von FOS nach Stimulation mit  $\text{SiO}_2$  NP wurde von allen drei MAPK-Inhibitoren gehemmt, was mit den Daten der Literatur übereinstimmt. Reduzierte Level von FOS können auf eine geminderte AP-1 Aktivität schließen lassen, was möglicherweise zusätzlich die Genexpression der anderen untersuchten proinflammatorischen Gene beeinflusst hat.

Die  $\text{SiO}_2$  NP induzierte Genexpression von  $\text{TNF}\alpha$  wurde hauptsächlich über JNK1/2 vermittelt, da sowohl die mRNA-Synthese als auch die Freisetzung gehemmt wurden. ERK1/2 schien in diesem Zusammenhang eher die Sekretion von  $\text{TNF}\alpha$  über die Regulation des Enzyms TACE, welches die Prozessierung und Freisetzung von  $\text{TNF}\alpha$  vermittelt, zu beeinflussen. Keinen Einfluss hatte p38 auf die mRNA-Synthese und Sekretion von  $\text{TNF}\alpha$  nach  $\text{SiO}_2$  NP Exposition. Eine AP-1- und ERK vermittelte  $\text{TNF}\alpha$  Aktivierung auf Gen- und Proteinebene konnte nach Exposition von Makrophagen mit kristallinem  $\text{SiO}_2$  gezeigt werden (Li et al., 2008)

An der Regulation der Genexpression von  $\text{IL-1}\beta$  nach  $\text{SiO}_2$  NP waren vor allem p38 und ERK1/2 beteiligt. Durch Hemmung der JNK-Funktion ergab sich sogar noch eine gesteigerte Genexpression, was sich nicht allein durch Hemmung des AP-1 Komplexes bzw. gesteigerter p38-Aktivität erklären lässt. Möglicherweise wird in Abwesenheit von cJun im Transkriptionskomplex die Bindung anderer Transkriptionsfaktoren wie  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , PU.1 oder STAT1 begünstigt (Gaestel et al., 2008). Bei der Aktivierung der  $\text{IL-6}$  Genexpression konnte nur eine Beteiligung von p38 über die Stabilisierung der mRNA nachgewiesen werden. Inhibierung von JNK und ERK führten sogar zu einer verstärkten Genexpression, was möglicherweise durch verbesserte Bindung von  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  zu erklären ist.

An der Regulation der Genexpression von iNOS, einem typischen  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  Zielgen, waren die MAPK nicht beteiligt. Die Aktivierung der COX-2 wurde dauerhaft nur durch den ERK-Inhibitor gehemmt, wobei für den p38-Inhibitor eine leichte Reduktion zu frühen Zeitpunkten zu sehen war. Ein Einfluss der JNK konnte nicht festgestellt werden. Die Aktivierung der COX-2 Genexpression kann generell sowohl von AP-1 als auch von  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  vermittelt werden, was in diesem Fall eher auf eine Beteiligung von  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  und ERK an der Silica-vermittelten Aktivierung hinweist. Eine Regulation der COX-2 Induktion über die MAP-Kinasen p38 und ERK1/2 sowie auch über  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  konnte nach Exposition von A549 mit kristallinem  $\text{SiO}_2$  bereits gezeigt werden (Tomaru et al., 2011).

Die Genexpression der Chemokine MCP-1 und Cxcl2 verlief hauptsächlich JNK- und ERK-abhängig, und wurde also über AP-1 vermittelt. Die Hemmung von p38 verursachte lediglich eine basale Erhöhung der Expressionsstärke, was sich ebenfalls über die Feedbackregulation von p38 und JNK erklären lässt. In Makrophagen, welche mit  $\text{TiO}_2$  NP exponiert wurden, konnte eine ERK-vermittelte Aktivierung der Genexpression sowie eine Freisetzung von  $\text{TNF}\alpha$  und

Cxcl2 nachgewiesen werden (Kang et al., 2008). In Lungenepithelzellen konnte für amorphe SiO<sub>2</sub> NP (Singal & Finkelstein, 2005) eine AP-1 vermittelte Cxcl2 Genexpression gezeigt werden, welche im Fall von kristallinem SiO<sub>2</sub> über ERK und p38 vermittelt wurde (Ovrevrik et al., 2008).

Eine mögliche Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in Zusammenhang mit SiO<sub>2</sub> NP induzierter Genexpression wurde in der Arbeit nicht näher untersucht. Die meisten untersuchten proinflammatorischen Gene können neben AP-1 und NF- $\kappa$ B auch über weitere Transkriptionsfaktoren je nach Stimulus aktiviert werden, weshalb eine eindeutige Zuordnung der beteiligten MAP-Kinasen nicht immer einfach ist. Es ist auch bekannt dass bestimmte AP-1 bzw. NF- $\kappa$ B Zielgene (Mmp9, Cxcl2, MCP-1, iNOS) negativ über den NCoR/SMART Repressor-Komplex reguliert werden. Im Normalzustand wird über cJun die Bindung des Repressorkomplexes an den Promotor vermittelt, welcher nach Phosphorylierung von cJun ubiquitinyliert wird und vom Promotor dissoziiert und die Transkription ermöglicht (Ogawa et al., 2004; Ghisletti et al., 2009).

## 4.8 Zelltod nach SiO<sub>2</sub> NP Behandlung

Um die Art des Zelltods nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition genauer zu untersuchen, wurde ein automatisierter Fluoreszenzmikroskopie-basierter Screening Assay für die Applikation mit Nanopartikeln weiterentwickelt und über Hoechst-PI Doppelfärbung der Zelltod genauer analysiert. Neben der mikroskopischen Charakterisierung des Zelltods wurden auch die Aktivierung von Apoptose-Markern auf Proteinebene getestet. Caspase-3 gehört zu den sogenannten Effektorcaspasen, die nach Aktivierung der Caspase-Kaskade durch Spaltung aktiviert werden und so die Apoptose einleiten. Eines ihrer Zielproteine ist PARP-1, welches in gesunden Zellen an der DNA-Replikation und Reparatur beteiligt ist und während der Apoptose durch Caspase-3 abhängige Spaltung inaktiviert wird (Yeretssian et al., 2009).

Serum- und Dosis-abhängige Effekte auf den Zelltod konnten für die SiO<sub>2</sub> NP beobachtet werden. In Anwesenheit von Serum wurde lediglich das Zellwachstum bei der toxischen Dosis (50  $\mu$ g/ml) beeinträchtigt und nach 24 h eine geringe Anzahl toter Zellen detektiert. Dies bestätigt die schon geäußerten Vermutungen, dass FCS protektiv gegen SiO<sub>2</sub> NP induzierten Stress wirkt.

In Abwesenheit von FCS konnte konzentrationsabhängiger Zelltod mit Kennzeichen von Nekrose gefunden werden. Die Zellen hatten im Hellfeld vollständig ihre Form und den Kontrast verloren und das zugehörige PI-Signal zeigte eine Permeabilisierung der Zellmembran an. Allerdings war ein kleiner Teil der Zellen bereits nach 6 h Behandlung PI gefärbt und zeigte eine Kondensation des Chromatins, normalerweise Kennzeichen spät-apoptotischer Zellen. Auf Proteinebene konnte eine Aktivierung der Apoptosemarker ebenfalls nach 4 h Exposition festgestellt werden. Die Makrophagen zeigten nach Exposition mit SiO<sub>2</sub> NP demnach sowohl Kennzeichen der



Nekrose als auch der Apoptose auf. Möglicherweise durchlaufen sie eine der Spezialformen des Zelltods, wie Pyroptose, Nekroptose oder Autophagie-vermitteltem Zelltod, bei denen sowohl Merkmale der Apoptose als auch der Nekrose auftreten können (vgl. Abschnitt 1.4).

Für SiO<sub>2</sub> NP wird in der Literatur sowohl über Beispiele zu nekrotischem sowie apoptotischem Zelltod berichtet. In Endothelzellen konnte nekrotischer Zelltod nach Exposition mit SiO<sub>2</sub> NP in Abhängigkeit von der Partikeloberfläche beobachtet werden (Napierska et al., 2009), wohingegen verschiedene andere Gruppen Silica-induzierte Apoptose zeigen konnten. Über AnnexinV/PI-Färbung konnte nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition Apoptose in RAW264.7 Makrophagen (Sohaebuddin et al., 2010), in HUVEC-Zellen (Liu et al., 2010) sowie in humanen Leberzellen (Ye et al., 2010) nachgewiesen werden. Lysosomale Ruptur als Auslöser für Apoptose (Boya & Kroemer, 2008) wurde schon für kristallines SiO<sub>2</sub> gezeigt (Thibodeau et al., 2003), wobei die Aktivierung der Apoptose-Kaskade über Cathepsin D und Sphingomyelinase vermittelt wurde. Lysosomale Ruptur steht auch in Zusammenhang mit der Aktivierung des Nalp3-Inflammasoms und der Freisetzung von IL-1 $\beta$  (Hornung et al., 2008).

Eine mögliche Erklärung für den SiO<sub>2</sub> NP induzierten Zelltod könnte die Pyroptose sein. Dabei handelt es sich um einen Caspase-1 abhängigen inflammatorischen Zelltod, dessen Hauptkennzeichen der schnelle Verlust der Integrität der Plasmamembran sowie die Prozessierung und Freisetzung der inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 sind. Typische Apoptose-Marker wie die Spaltung von Caspase 3 oder PARP werden nicht aktiviert, wohingegen eine Kondensation und Spaltung der DNA bei intakter Kernmembran stattfinden. Eine schnelle Lyse der Zellmembran sowie auch die Kondensation der DNA war nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition ebenfalls detektiert worden. Allerdings konnte in den Makrophagen nur die Aktivierung der IL-1 $\beta$  - mRNA Synthese nicht jedoch die Sezernierung des Proteins gemessen werden. eine Hemmung von Caspase 1 über den Caspase-Inhibitor ZVAD hatte ebenfalls keinen Einfluss auf den SiO<sub>2</sub> NP induzierten Zelltod. Ebenso spricht die Aktivierung von Caspase 3 und PARP-1 gegen einen pyroptotischen Zelltod nach SiO<sub>2</sub> Exposition.

Zur genaueren Klärung der Zusammenhänge zwischen apoptotischem und nekrotischem Zelltod nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition wurde der pan-Caspase Inhibitor ZVAD-fmk eingesetzt. Dieser kann durch Hemmung der Caspase-Aktivität die Apoptose hemmen bzw. Zelltod über Nekroptose auslösen, aber auch zu Autophagie-vermitteltem Zelltod beitragen (Ekert et al., 1999; Vandenabeele et al., 2010). Das Absterben der Makrophagen nach SiO<sub>2</sub> NP Behandlung wurde jedoch nicht durch ZVAD beeinflusst und es konnte auch keine verstärkte Nekrose detektiert werden. Ebenso wenig wurde die Ausbildung von Vakuolen nach SiO<sub>2</sub> beeinträchtigt. In Makrophagen wurde bereits gezeigt, dass durch kristallines SiO<sub>2</sub> ausgelöste Apoptose über ZVAD-fmk gehemmt werden konnte (Iyer et al., 1996). Da bei eigenen Untersuchungen mit amorphen SiO<sub>2</sub> NP aber eher nekrotische Merkmale auftraten, ist es nicht verwunderlich, dass keine ZVAD-Effekte zusätzlich mehr beobachtet werden konnten. Beim normalen Ablauf der

Apoptose wird über Caspase 8 die RIPK-1 inaktiviert, so dass bei deren Hemmung durch ZVAD die RIPK1 ihre Funktion ausführen und die Prozesse Nekroptose bzw. Autophagie-vermittelter Zelltod eingeleitet werden können. Über den Einsatz von Necrostatin, einem spezifischen RIPK-Inhibitor, konnte bereits in verschiedenen Zellmodellen die Nekroptose gehemmt werden (Detgrev et al., 2008).

Die MAP-Kinasen haben auch entscheidende Rollen bei der Vermittlung des Zelltods. JNK1/2 beispielsweise hat wichtige Funktionen bei der Apoptose einerseits durch Aktivierung pro-apoptotischer Proteine mittels AP-1, über die Phosphorylierung von p53 sowie auch für die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien nach UV-Stress (Dhanasekaran & Reddy 2008). Die pro-apoptotische Funktion von ERK1/2 nach Stress durch DNA-schädigende Agenzien wie UV-Strahlung oder Chemikalien (Doxorubizin, Etoposid) ist auch hinlänglich bekannt. ERK-vermittelte Apoptose kann sowohl über den intrinsischen Weg (Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien) oder extrinsisch über die Aktivierung von Caspase 8 realisiert werden. Desweiteren nimmt ERK1/2 über Regulation wichtiger Autophagie-Marker (LC3, Beclin-1) auch Einfluss auf den Autophagie-vermittelten Zelltod (Cagnol et al., 2010). Eine Beteiligung von JNK und p53 an durch Nanopartikel induziertem Zelltod wurde bereits für Leber- und neuronale Zellen gezeigt (Ye et al., 2010; Wu et al., 2009.) Die Untersuchung des Zelltods nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition in Anwesenheit der drei bereits beschriebenen MAPK-Inhibitoren (SB, SP, PD) ergab lediglich eine leichte Hemmung des Zelltods durch Inhibierung des ERK Signalweges. Hemmung von p38 und JNK hatte bereits basale Effekte auf die Kontrollzellen. Der SB-Inhibitor löste schon nach 30 min Präinkubation Vakuolenbildung in den Makrophagen aus, was in der Arbeitsgruppe auch für andere Zelllinien (A549, HCT) gezeigt werden konnte. Nach Partikelexposition wurde jedoch weder der Zelltod noch das Absterben über Nekrose gehemmt. Inhibierung der JNK-Funktion mittels SP-Inhibitor verstärkte sogar den basalen Zelltod, was den verstärkten Zelltod nach SiO<sub>2</sub> NP Behandlung erklärte. Die Aktivierung des MAPK-Signalwegs und die darüber vermittelte proinflammatorische Antwort scheint demnach keinen großen Einfluss auf das Absterbeverhalten der Makrophagen nach Exposition mit SiO<sub>2</sub> NP zu haben.

Die Ausbildung von Vakuolen konnte in den SiO<sub>2</sub> NP exponierten Makrophagen konzentrationsunabhängig schon zu frühen Zeitpunkten in der TEM-Analyse (1h) bzw. in den Hellfeldaufnahmen (2h) beobachtet werden. Bei der subtoxischen Dosis (10 µg/ml) konnte über die mikroskopische Analyse ein Fortschreiten der Vakuolenbildung beobachtet werden, was nicht mit verstärktem Zelltod einherging. Ebenso konnte keine Aktivierung der Apoptose-Marker Caspase-3 und PARP-1 detektiert werden. Bei der hohen SiO<sub>2</sub> NP Dosis (50 µg/ml) hingegen konnte neben der Vakuolenbildung bereits ein Absterben der Zellen nach 4h beobachtet werden, wobei die Stärke der Vakuolisierung der Zellen im Vergleich zur subtoxischen Dosis schwächer ausgeprägt war. Möglicherweise sind die ausgelösten Autophagie-Prozesse dem Zelltod vorgeschaltet bzw. führen erst ab einem bestimmten Stresslevel zum Zelltod.

Über die Inhibitoren Bafilomycin und Wortmannin konnte in der Diplomarbeit von Muna Ali, sowohl die Silica-induzierte Vakuolenbildung sowie auch der Zelltod gehemmt werden (Ali, 2011). Es wurde postuliert, dass über Bafilomycin zunächst die Verschmelzung von Lysosomen und Autophagosomen verhindert wurde, so dass nicht mehr über lysosomale Ruptur Nekrose ausgelöst werden konnte. Lysosomale Membran-Permeabilisierung (LMP) als vorgeschalteter Prozess von Apoptose und Nekrose wurde bereits in der Literatur beschrieben (Boya & Kroemer, 2008). Autophagie als Schutzmechanismus vor durch oxidativen Stress vermittelter Zytotoxizität wurde ebenfalls schon postuliert (Li et al., 2010).

Ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung des MAPK-Signalwegs und der Autophagie konnte nur insofern betrachtet werden, als dass eine Hemmung der MAPK keinen Einfluss auf die Vakuolenbildung nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition hatte. Die zeitliche Aktivierung der MAPK sowie auch der Vakuolenausbildung findet bereits nach 1 - 2 h Exposition statt, was eine mögliche gegenseitige Beeinflussung der beiden Prozesse nicht ausschließt. Die Klärung dieses Zusammenhangs bedarf allerdings noch weiterer Untersuchung.

## 4.9 Modell

In Abb. 4.2 sind zusammengefasst die Effekte der SiO<sub>2</sub> NP Exposition der Makrophagen hinsichtlich der Aktivierung verschiedener Signalwege dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass durch die SiO<sub>2</sub> Nanopartikel keine ROS generiert wurden und oxidativer Stress nicht die Ursache der SiO<sub>2</sub> NP induzierten Aktivierung des MAPK-Signalwegs sowie der proinflammatorischen Zellantwort war. Die Aktivierung des MAPK-Signalwegs konnte bis zu den MAP2K zurückverfolgt werden. Weiterhin konnte eine Beteiligung der MAPK an der Regulation der Expression der untersuchten proinflammatorischen Gene nachgewiesen werden. Auf Genebene wurden verschiedene Mediatoren der Inflammation aktiviert, allerdings konnte nur für TNF $\alpha$  eine Proteinsynthese und Sezernierung nachgewiesen werden, welche keine auto- bzw. parakrinen Effekte auf die Makrophagen hatte. Bei der Untersuchung zur Art des Zelltods nach SiO<sub>2</sub> NP Behandlung konnten vornehmlich nekrotische Merkmale detektiert werden. Bevor jedoch zeitlich gesehen der Zelltod der Makrophagen einsetzte, konnten dosis-unabhängig Autophagie-Kennzeichen detektiert werden, was einen möglichen Zusammenhang zwischen nekrotischem Zelltod bzw. Autophagie-vermitteltem Zelltod aufzeigt. Eine Beteiligung der MAPK an der Vermittlung des Zelltods nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition konnte nicht nachgewiesen werden. Allerdings ist umgekehrt nicht auszuschließen, dass die Aktivierung des Signalwegs ein Resultat der Toxizität ist. Dagegen spricht, dass zwar auf Proteinebene bei subtoxischen Konzentrationen keine Aktivierung der MAPK detektiert wurde, dafür aber eine leichte Induktion der Genexpression zu beobachten war. Zur Klärung der genauen Zusammenhänge zwischen der Aufnahme der Partikel, dem Auslösen von Autophagie und der genauen Art des Zelltods kann das weiterentwickelte Mikroskopie-basierte Screeningverfahren zum Einsatz kommen, da so

auf einfache und schnelle Weise eine große Anzahl an Inhibitoren oder siRNAs zur Hemmung der einzelnen Prozesse getestet werden können.

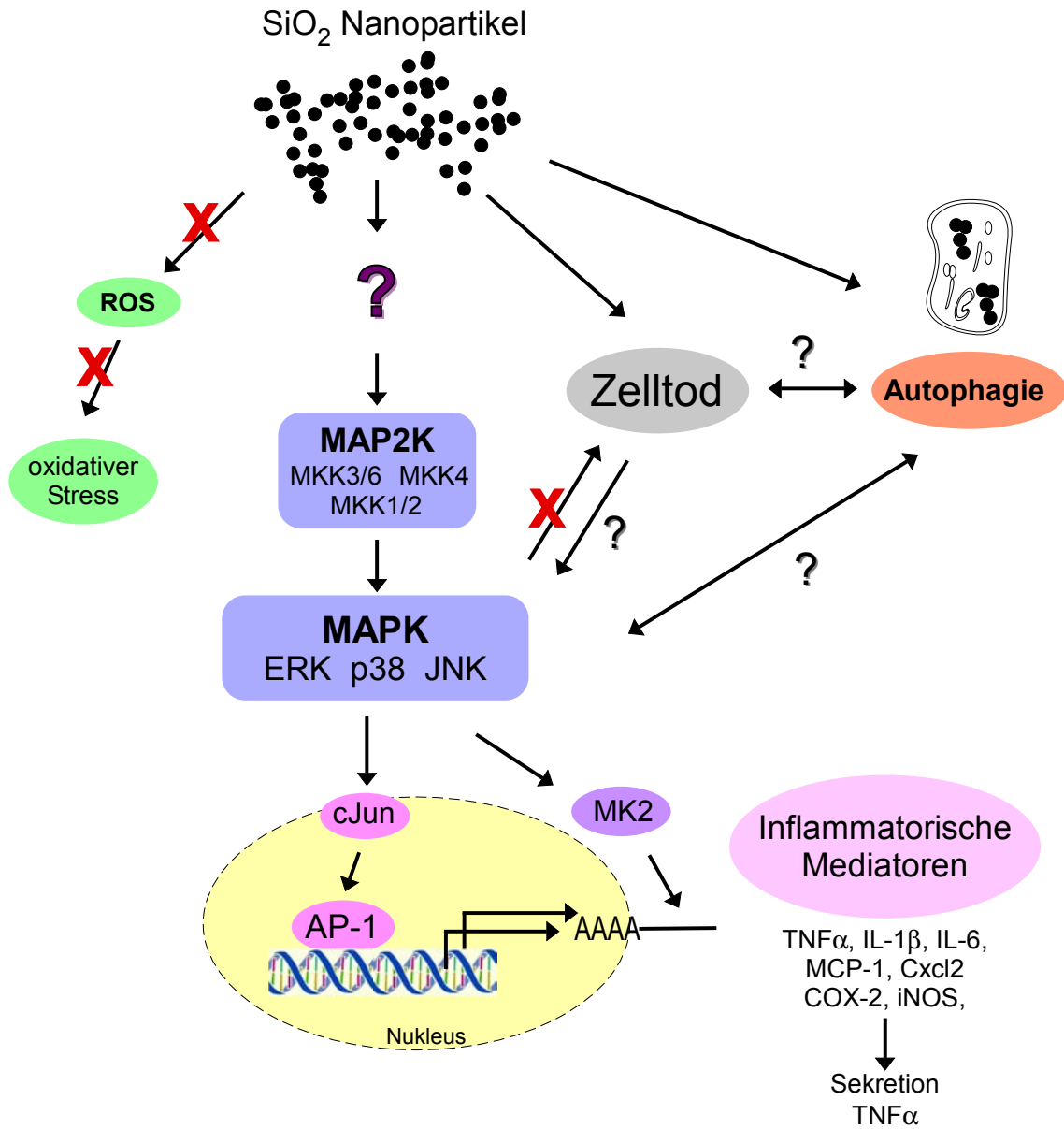


Abbildung 4.2: Zusammenfassendes Modell und aktuelle Arbeitshypothese der Vorgänge während der Exposition von RAW264.7 Makrophagen mit SiO<sub>2</sub> Nanopartikeln. Nähere Erläuterungen siehe Text.

Alle Ergebnisse dieser Arbeit wurden im Zellkultursystem erzielt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die RAW264.7 Makrophagen im Vergleich mit primären humanen Makrophagen ähnlich sensitiv auf Stimulation mit Flugasche reagieren (Fritsch-Decker, 2008) und somit ein repräsentatives Zellmodell darstellen. Um allerdings zu zeigen, dass die Ergebnisse auch eine Relevanz für lebende Organismen haben, sollten zukünftig auch *in vivo* Studien bzw. Vergleiche mit der Exposition an der Luft-Flüssigkeitsgrenzschicht (ALI) miteinbezogen werden.



# Literaturverzeichnis

- Aggarwal, B. B., S. Shishodia, S. K. Sandur, M. K. Pandey, and G. Sethi (2006). Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem. Pharmacol.* 72(11): 1605–21.
- Al-Rawi, Marco, Silvia Diabaté, and Carsten Weiss (2011). Uptake and intracellular localization of submicron and nano-sized SiO<sub>2</sub> particles in HeLa cells. *Arch. Toxicol.* pp. 1–14.
- Ali, Muna (2011). Untersuchung von Siliziumdioxid-Nanopartikeln auf Toxizität und Aufnahme in Makrophagen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopie-basierten Screenings. Diplomarbeit, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe.
- Arthur, J. S. (2008). MSK activation and physiological roles. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13: 5866–79.
- Arts, Josje H. E., Hans Muijser, Evert Duistermaat, Karin Junker, and C. Frieke Kuper (2007). Five-day inhalation toxicity study of three types of synthetic amorphous silicas in Wistar rats and post-exposure evaluations for up to 3 Å months. *Food Chem. Toxicol.* 45(10): 1856–1867.
- Baehrecke, E. H. (2005). Autophagy: dual roles in life and death? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6(6): 505–10.
- Barrett, Edward G., Carl Johnston, Günter Oberdörster, and Jacob N. Finkelstein (1998). Silica-induced chemokine expression in alveolar type II cells is mediated by TNF- $\alpha$ . *Am. J. Physiol.* 275(6): L1110–L1119.
- Ben-Levy, Rachel, Steven Hooper, Rebecca Wilson, Hugh F. Paterson, and Christopher J. Marshall (1998). Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Curr. Biol.* 8(19): 1049–1057.
- Bergsbaken, Tessa, Susan L. Fink, and Brad T. Cookson (2009). Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat. Rev. Microbiol.* 7(2): 99–109.
- Beyersmann, Detmar and Andrea Hartwig (2008). Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch. Toxicol.* 82(8): 493–512.
- Bortoluci, Karina and Ruslan Medzhitov (2010). Control of infection by pyroptosis and autophagy: role of TLR and NLR. *Cell. Mol. Life Sci.* 67(10): 1643–1651.
- Boutten, A., D. Goven, E. Artaud-Macari, J. Boczkowski, and M. Bonay (2011). NRF2 targeting: a promising therapeutic strategy in chronic obstructive pulmonary disease. *Trends Mol. Med.* In Press, Corrected Proof: 1–9.

- Boya, P. and G. Kroemer (2008). Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* 27(50): 6434–6451.
- Brouard, S., L. E. Otterbein, J. Anrather, E. Tobiasch, F. H. Bach, A. M. Choi, and M. P. Soares (2000). Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J. Exp. Med.* 192(7): 1015–26.
- Butz, Tilman, Tilo Reinert, Teresa Pinheiro, Philippe Moretto, Jan Pallon, Arpad Zoltan Kiss, Jerzy Stachura, Wojciech Dabros, Zbigniew Stachura, Janusz Lekki, Malgorzata Lekka, Janos Hunyadi, Tamas Biro, Michael Sticherling, Luc Van Vaeck, Pieter Van Royen, and Jean-Etienne Surleve-Bazeille (2007). NANODERM - Quality of Skin as a Barrier to ultra-fine Particles. Technical report, QLK4-CT-2002-02678.
- Cagnol, Sebastien and Jean-Claude Chambard (2010). ERK and cell death: Mechanisms of ERK-induced cell death - apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS Journal* 277(1): 2–21.
- Calvert, G. M., F. L. Rice, J. M. Boiano, J. W. Sheehy, and W. T. Sanderson (2003). Occupational silica exposure and risk of various diseases: an analysis using death certificates from 27 states of the United States. *Occ. Env. Med.* 60(2): 122–9.
- Carpenter, S. and L. A. O'Neill (2009). Recent insights into the structure of Toll-like receptors and post-translational modifications of their associated signalling proteins. *The Biochemical journal* 422(1): 1–10.
- Cassel, S. L., S. C. Eisenbarth, S. S. Iyer, J. J. Sadler, O. R. Colegio, L. A. Tephly, A. B. Carter, P. B. Rothman, R. A. Flavell, and F. S. Sutterwala (2008). The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105(26): 9035–9040.
- Castranova, Vincent (2004). Signaling Pathways Controlling The Production Of Inflammatory Mediators in Response To Crystalline Silica Exposure: Role Of Reactive Oxygen/Nitrogen Species. *Free Radical Biol. Med.* 37(7): 916–925.
- Chakraborti, Sajal, Sudip Das Malay Mandal, Amritlal Mandal, and Tapati Chakraborti (2003). Regulation of matrix metalloproteinases: An overview. *Mol Cell Biochem* 253: 269–285.
- Chang, Kun-Che, Chih-Wei Lo, Tan-chi Fan, Margaret Chang, Chih-Wen Shu, Chuan-Hsin Chang, Cheng-Ta Chung, Shun-lung Fang, Chih-Chung Chao, Jaw-Ji Tsai, and Yiu-Kay Lai (2010). TNF-alpha Mediates Eosinophil Cationic Protein-induced Apoptosis in BEAS-2B Cells. *BMC cell biology* 11(1): 6.
- Chen, M. and A. Mikecz (2005). Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Exp. Cell Res.* 305(1): 51–62.
- Cho, Wan-Seob, Mina Choi, Beom Seok Han, Minjung Cho, JaeHo Oh, Kidae Park, Sung Jun Kim, Seung Hee Kim, and Jayoung Jeong (2007). Inflammatory mediators induced by intratracheal instillation of ultrafine amorphous silica particles. *Toxicol. Lett.* 175(1-3): 24–33.
- Chowdhury, I., B. Tharakan, and G. K. Bhat (2008). Caspases - an update. *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* 151(1): 10–27.
- Conner, Sean D. and Sandra L. Schmid (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422(6927): 37–44.



- Coti, Karla K., Matthew E. Belowich, Monty Liong, Michael W. Ambrogio, Yuen A. Lau, Hussam A. Khatib, Jeffrey I. Zink, Niveen M. Khashab, and J. Fraser Stoddart (2009). Mechanised nanoparticles for drug delivery. *Nanoscale* 1(1): 16.
- Cuadrado, Ana and Angel Nebreda (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem. J.* 429(3): 403–417.
- Cuenda, A. and S. Rousseau (2007). p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* 1773(8): 1358–1375.
- Cui, Yaling, Huiting Liu, Min Zhou, Yanmei Duan, Na Li, Xiaolan Gong, Renping Hu, Mengmeng Hong, and Fashui Hong (2011). Signaling pathway of inflammatory responses in the mouse liver caused by TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* 96A(1): 221–229.
- Dalle-Donne, I., R. Rossi, R. Colombo, D. Giustarini, and A. Milzani (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry* 52(4): 601–623.
- D'Autreaux, Benoit and Michel B. Toledano (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8(10): 813–824.
- Degterev, A., J. Hitomi, M. Gernscheid, I. L. Ch'en, O. Korkina, X. Teng, D. Abbott, G. D. Cuny, C. Yuan, G. Wagner, S. M. Hedrick, S. A. Gerber, A. Lugovskoy, and J. Yuan (2008). Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat. Chem. Biol.* 4(5): 313–21.
- Degterev, Alexei and Junying Yuan (2008). Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(5): 378–390.
- Deng, Zhou J., Gysell Mortimer, Tara Schiller, Anthony Musumeci, Darren Martin, and Rodney F. Minchin (2009). Differential plasma protein binding to metal oxide nanoparticles. *Nanotechnology* 20(45): 455101.
- Deretic, V., M. Delgado, I. Vergne, S. Master, S. De Haro, M. Ponpuak, and S. Singh (2009). Autophagy in Immunity Against Mycobacterium tuberculosis: a Model System to Dissect Immunological Roles of Autophagy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 335: 169–88.
- Dhalla, N.S., R.M. Temsah, and T. Netticadan (2000). Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J. Hypertens.* 18(6): 655–673.
- Dhanasekaran, D. N. and E. P. Reddy (2008). JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* 27(48): 6245–6251.
- Dickinson, Dale A, Karen E Iles, Hongqiao Zhang, Volker Blank, and Henry Jay Forman (2003). Curcumin alters EpRE and AP-1 binding complexes and elevates glutamate-cysteine ligase gene expression. *FASEB J* 17(3): 473–475.
- Dickinson, Dale A., Anna-Liisa Levonen, Douglas R. Moellering, Erin K. Arnold, Hongqiao Zhang, Victor M. Darley-Usmar, and Henry Jay Forman (2004). Human glutamate cysteine ligase gene regulation through the electrophile response element. *Free Radical Biol. Med.* 37(8): 1152–1159.

- Dobrovolskaia, M. A. and S. E. McNeil (2007). Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nat. Nanotechnol.* 2(8): 469–78.
- Dockery, D. W., 3rd Pope, C. A., X. Xu, J. D. Spengler, J. H. Ware, M. E. Fay, Jr. Ferris, B. G., and F. E. Speizer (1993). An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N. Engl. J. Med.* 329(24): 1753–9.
- Dong, Chen, Roger J. Davis, and Richard A. Flavell (2002). Map Kinases in the Immune Response. *Annu. Rev. Immunol.* 20(1): 55–72.
- Driscoll, Kevin E. (2000). TNF[alpha] and MIP-2: role in particle-induced inflammation and regulation by oxidative stress. *Toxicol. Lett.* 112-113: 177–183.
- Ekert, P. G., J. Silke, and D. L. Vaux (1999). Caspase inhibitors. *Cell Death and Differentiation* 6(11): 1081–6.
- Eom, Hyun-Jeong and Jinhee Choi (2009). Oxidative stress of silica nanoparticles in human bronchial epithelial cell, Beas-2B. *Toxicol. in Vitro* 23(7): 1326–1332.
- Eskelinen, Eeva-Liisa (2008). Examples of incorrect identification of autophagic compartments in conventional transmission electron microscopy of mammalian cells. *Autophagy* 4(2): 257–260.
- Eskelinen, Eeva-Liisa (2011). The dual role of autophagy in cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* In Press, Corrected Proof.
- Fanizza, Carla, Cinzia Lucia Ursini, Emilia Paba, Aureliano Ciervo, Arianna Di Francesco, Raffaele Maiello, Paolo De Simone, and Delia Cavallo (2007). Cytotoxicity and DNA-damage in human lung epithelial cells exposed to respirable [alpha]-quartz. *Toxicol. in Vitro* 21(4): 586–594.
- FAO/WHO (2010). Expert meeting on the application of nanotechnologies in the food and agriculture sectors: Potential food safety implications - meeting report. Technical report.
- Ferin, J., G. Oberdorster, and D. P. Penney (1992). Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 6(5): 535–42.
- Festjens, N., T. Vanden Berghe, and P. Vandenabeele (2006). Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim. Biophys. Acta* 1757(9-10): 1371–87.
- Fink, S. L. and B. T. Cookson (2006). Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell. Microbiol.* 8(11): 1812–25.
- Frantz, S., A. Ducharme, D. Sawyer, L. E. Rohde, L. Kobzik, R. Fukazawa, D. Tracey, H. Allen, R. T. Lee, and R. A. Kelly (2003). Targeted deletion of caspase-1 reduces early mortality and left ventricular dilatation following myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35(6): 685–94.
- Frevel, Mathias A. E., Tala Bakheet, Aristobolo M. Silva, John G. Hissong, Khalid S. A. Khabar, and Bryan R. G. Williams (2003). p38 Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent and -Independent Signaling of mRNA Stability of AU-Rich Element-Containing Transcripts. *Mol. Cell. Biol.* 23(2): 425–436.

- Fritsch-Decker, Susanne (2008). Partikelexpositionen von Zellkulturen: Untersuchungen zur Rolle von Lipidmediatoren bei der inflammatorischen Antwort. Dissertation, Universität Karlsruhe, Karlsruhe.
- Gaestel, Matthias, Alexey Kotlyarov, and Michael Kracht (2009). Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation. *Nat. Rev. Drug Discovery* 8(6): 480–499.
- Geiser, Marianne, Barbara Rothen-Rutishauser, Nadine Kapp, Samuel Schürch, Wolfgang Kreyling, Holger Schulz, Manuela Semmler, Vinzenz Im Hof, Joachim Heyder, and Peter Gehr (2005). Ultrafine Particles Cross Cellular Membranes by Nonphagocytic Mechanisms in Lungs and in Cultured Cells. *Environ. Health Perspect.* 113(11): 1555.
- Gerloff, Kirsten, Catrin Albrecht, Agnes W. Boots, Irmgard Foerster, and Roel P. F. Schins (2009). Cytotoxicity and oxidative DNA damage by nanoparticles in human intestinal Caco-2 cells. *Nanotoxicology* 3(4): 355–364.
- Ghisletti, S., W. Huang, K. Jepsen, C. Benner, G. Hardiman, M. G. Rosenfeld, and C. K. Glass (2009). Cooperative NCoR/SMRT interactions establish a corepressor-based strategy for integration of inflammatory and anti-inflammatory signaling pathways. *Genes & Development* 23(6): 681–693.
- Gillissen, A. and D. Nowak (1998). Characterization of N-acetylcysteine and ambroxol in anti-oxidant therapy. *Resp. Med.* 92(4): 609 – 623.
- Glick, Danielle, Sandra Barth, and Kay F. Macleod (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J. Pathol.* 221(1): 3–12.
- Golstein, Pierre and Guido Kroemer (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem. Sci.* 32(1): 37–43.
- Greten, Florian R., Melek C. Arkan, Julia Bollrath, Li-Chung Hsu, Jason Goode, Cornelius Miething, Serkan I. Göktuna, Michael Neuenhahn, Joshua Fierer, Stephan Paxian, Nico Van Rooijen, Yajun Xu, Timothy O’Cain, Bruce B. Jaffee, Dirk H. Busch, Justus Duyster, Roland M. Schmid, Lars Eckmann, and Michael Karin (2007). NF- $\kappa$ B Is a Negative Regulator of IL-1 $\beta$  Secretion as Revealed by Genetic and Pharmacological Inhibition of IKK $\beta$ . *Cell* 130(5): 918–931.
- Haeusgen, Wiebke, Thomas Herdegen, and Vicki Waetzig (2011). The bottleneck of JNK signaling: Molecular and functional characteristics of MKK4 and MKK7. *Eur J Cell Biol* 90(6-7): 536–544.
- Hamilton, R. F., W. J. Villiers, and A. Holian (2000). Class A type II scavenger receptor mediates silica-induced apoptosis in Chinese hamster ovary cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 162(2): 100–6.
- Han, S. I., Y. S. Kim, and T. H. Kim (2008). Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions. *BMB reports* 41(1): 1–10.
- Harley, J. D. and J. Margolis (1961). Haemolytic activity of colloidal silica. *Nature* 189: 1010–1.
- He, Congcong and Daniel J. Klionsky (2009). Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annu. Rev. Genet.* 43(1): 67–93.

- Heikkilä, Katriina, Shah Ebrahim, and Debbie A. Lawlor (2008). Systematic review of the association between circulating interleukin-6 (IL-6) and cancer. *Eur. J. Cancer* 44(7): 937–945.
- Heinrich, P. C., I. Behrmann, S. Haan, H. M. Hermanns, G. Muller-Newen, and F. Schaper (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical journal* 374(Pt 1): 1–20.
- Henriquez, Mauricio, Ricardo Armisen, Andres Stutzin, and Andrew F. G. Quest (2008). Cell Death by Necrosis, a Regulated Way to Go. *Curr. Mol. Med.* 8(3): 187–206.
- Herrlich, Peter, Michael Karin, and Carsten Weiss (2008). Supreme EnLIGHTenment: Damage Recognition and Signaling in the Mammalian UV Response. *Mol. Cell* 29(3): 279–290.
- Hessel, P. A. and G. K. Sluis-Cremer (1987). Silica, silicosis, and lung cancer among ceramic workers: a case-referent study. *Am. J. Ind. Med.* 12(2): 219–22.
- Heyder, J., J. Gebhart, G. Rudolf, C. F. Schiller, and W. Stahlhofen (1986). Deposition of particles in the human respiratory tract in the size range 0.005-15 [ $\mu$ m]. *J. Aerosol Sci.* 17(5): 811–825.
- Hoet, Peter Hm, Irene Brueske-Hohlfeld, and Oleg V Salata (2004). Nanoparticles - known and unknown health risks. *J Nanobiotechnology* 2(1): 12.
- Holler, Nils, Rossana Zaru, Olivier Micheau, Margot Thome, Antoine Attinger, Salvatore Valitutti, Jean-Luc Bodmer, Pascal Schneider, Brian Seed, and Jurg Tschopp (2000). Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat. Immunol.* 1(6): 489–495.
- Hornung, Veit, Franz Bauernfeind, Annett Halle, Eivind O. Samstad, Hajime Kono, Kenneth L. Rock, Katherine A. Fitzgerald, and Eicke Latz (2008). Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat. Immunol.* 9(8): 847–856.
- Huang, Chuan-Chin, Robert S Aronstam, Da-Ren Chen, and Yue-Wern Huang (2010). Oxidative stress, calcium homeostasis, and altered gene expression in human lung epithelial cells exposed to ZnO nanoparticles. *Toxicol In Vitro* 24(1): 45–55.
- Huang, H. C. (2000). Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97(23): 12475–12480.
- Iyer, R., R. F. Hamilton, L. Li, and A. Holian (1996). Silica-induced apoptosis mediated via scavenger receptor in human alveolar macrophages. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 141(1): 84–92.
- Jimenez, L. A., E. M. Drost, P. S. Gilmour, I. Rahman, F. Antonicelli, H. Ritchie, W. MacNee, and K. Donaldson (2002). PM10-exposed macrophages stimulate a proinflammatory response in lung epithelial cells via TNF- $\alpha$ . *Am. J. Physiol.* 282(2): L237–L248.
- Jin, Yuhui, Shibichakravarthy Kannan, Min Wu, and Julia Xiaojun Zhao (2007). Toxicity of Luminescent Silica Nanoparticles to Living Cells. *Chem. Res. Toxicol.* 20(8): 1126–1133.
- Kaminska, Bozena (2005). MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy—from

- molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* 1754(1-2): 253–262.
- Kang, Jihee Lee, Changsuk Moon, Hui Su Lee, Hae Won Lee, Eun-Mi Park, Hee Sun Kim, and Vincent Castanova (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, Part A* 71(8): 478–485.
- Kang, Y. J., U. R. Mbonye, C. J. DeLong, M. Wada, and W. L. Smith (2007). Regulation of intracellular cyclooxygenase levels by gene transcription and protein degradation. *Prog. Lip. Res.* 46(2): 108–25.
- Karin, M. (2004). Mitogen activated protein kinases as targets for development of novel anti-inflammatory drugs. *Ann. Rheum. Dis.* 63: ii62–ii64.
- Karin, M., Z. Liu, and E. Zandi (1997). AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9(2): 240–6.
- Kensler, Thomas W., Nobunao Wakabayashi, and Shyam Biswal (2007). Cell Survival Responses to Environmental Stresses Via the Keap1-Nrf2-ARE Pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47(1): 89–116.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, and A. R. Currie (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26(4): 239–57.
- Kim, Hye, Eun-Kyung Ahn, Bo Jee, Hyoung-Kyu Yoon, Kweon Lee, and Young Lim (2009). Nanoparticulate-induced toxicity and related mechanism in vitro and in vivo. *J. Nanopart. Res.* 11(1): 55–65.
- Kobayashi, A., M. I. Kang, Y. Watai, K. I. Tong, T. Shibata, K. Uchida, and M. Yamamoto (2005). Oxidative and Electrophilic Stresses Activate Nrf2 through Inhibition of Ubiquitination Activity of Keap1. *Mol. Cell Biol.* 26(1): 221–229.
- Kreyling, W. G., M. Semmler, F. Erbe, P. Mayer, S. Takenaka, H. Schulz, G. Oberdoerster, and A. Ziesenis (2002). Translocation Of Ultrafine Insoluble Iridium Particles From Lung Epithelium To Extrapulmonary Organs Is Size Dependent But Very Low. *J. Toxicol. Environ. Health, Part A* 65(20): 1513 – 1530.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, W. S. El-Deiry, P. Golstein, D. R. Green, M. Hengartner, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, W. Malorni, G. Nunez, M. E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky, and G. Melino (2008). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation* 16(1): 3–11.
- Kroemer, Guido, Guillermo Marino, and Beth Levine (2010). Autophagy and the Integrated Stress Response. *Mol. Cell* 40(2): 280–293.
- Krug, H. F., S. Diabate, J.M. Woerle-Knirsch, S. Muelhopt, and H.-R. Paur (2007). Synthetische Nanopartikel am Arbeitsplatz und in der Umwelt. *ASU* 42(1): 4–14.
- Krysko, Dmitri V., Agnieszka Kaczmarek, and Peter Vandenabeele (2009). Molecular Pathways of Different Types of Cell Death: Many Roads to Death. In *Phagocytosis of Dying Cells: From Molecular Mechanisms to Human Diseases*, pp. 3–31. Springer Netherlands.

- Krzywanski, David M., Dale A. Dickinson, Karen E. Iles, Amanda F. Wigley, Christopher C. Franklin, Rui-Ming Liu, Terrance J. Kavanagh, and Henry Jay Forman (2004). Variable regulation of glutamate cysteine ligase subunit proteins affects glutathione biosynthesis in response to oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.* 423(1): 116–125.
- Kyriakis, J. M. and J. Avruch (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81(2): 807–869.
- Labbé, K. and M. Saleh (2008). Cell death in the host response to infection. *Cell Death and Differentiation* 15(9): 1339–1349.
- Lara-Tejero, M., F. S. Sutterwala, Y. Ogura, E. P. Grant, J. Bertin, A. J. Coyle, R. A. Flavell, and J. E. Galan (2006). Role of the caspase-1 inflammasome in *Salmonella typhimurium* pathogenesis. *J. Exp. Med.* 203(6): 1407–12.
- Laster, SM, JG Wood, and LR Gooding (1988). Tumor necrosis factor can induce both apoptic and necrotic forms of cell lysis. *J. Immunol.* 141(8): 2629–2634.
- Lechner, Matthias, Philipp Lirk, and Josef Rieder (2005). Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: The two sides of the same coin. *Sem. Cancer Biol.* 15(4): 277–289.
- Lesniak, Anna, Abigail Campbell, Marco P. Monopoli, Iseult Lynch, Anna Salvati, and Kenneth A. Dawson (2010). Serum heat inactivation affects protein corona composition and nanoparticle uptake. *Biomaterials* 31(36): 9511–9518.
- Li, C., H. Liu, Y. Sun, H. Wang, F. Guo, S. Rao, J. Deng, Y. Zhang, Y. Miao, C. Guo, J. Meng, X. Chen, L. Li, D. Li, H. Xu, B. Li, and C. Jiang (2009). PAMAM Nanoparticles Promote Acute Lung Injury by Inducing Autophagic Cell Death through the Akt-TSC2-mTOR Signaling Pathway. *Journal of Molecular Cell Biology* 1(1): 37–45.
- Li, Jasmine J., Deny Hartono, Choon-Nam Ong, Boon-Huat Bay, and Lin-Yue L. Yung (2010). Autophagy and oxidative stress associated with gold nanoparticles. *Biomaterials* 31(23): 5996–6003.
- Li, Muyao, Rui-Ming Liu, Cynthia R. Timblin, Suzanne G. Meyer, Brooke T. Mossman, and Naomi K. Fukagawa (2006). Age affects ERK1/2 and NRF2 signaling in the regulation of GCLC expression. *J. Cell. Physiol.* 206(2): 518–525.
- Lin, A, A Minden, H Martinetto, FX Claret, C Lange-Carter, F Mercurio, GL Johnson, and M Karin (1995). Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2. *Science* 268(5208): 286–290.
- Lin, Weisheng, Yue-wern Huang, Xiao-Dong Zhou, and Yinfa Ma (2006). In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 217(3): 252–259.
- Lison, Dominique, Leen C. J. Thomassen, Virginie Rabolli, Laetitia Gonzalez, Dorota Napierska, Jin Won Seo, Micheline Kirsch-Volders, Peter Hoet, Christine E. A. Kirschhock, and Johan A. Martens (2008). Nominal and Effective Dosimetry of Silica Nanoparticles in Cytotoxicity Assays. *Toxicol. Sci.* 104(1): 155–162.

- Liu, Xin and Jiao Sun (2010). Endothelial cells dysfunction induced by silica nanoparticles through oxidative stress via JNK/P53 and NF-[kappa]B pathways. *Biomaterials* 31(32): 8198–8209.
- Long II, D. J., R. L. Waikel, X. J. Wang, L. Perlaky, D. R. Roop, and A. K. Jaiswal (2000). NAD(P)H:Quinone oxidoreductase 1 deficiency increases susceptibility to benzo(a)pyrene-induced mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 60(21): 5913–5915.
- Lunov, Oleg, Tatiana Syrovets, Cornelia Loos, Johanna Beil, Michael Delacher, Kyrylo Tron, G. Ulrich Nienhaus, Anna Musyanovych, Volker Mailander, Katharina Landfester, and Thomas Simmet (2011). Differential Uptake of Functionalized Polystyrene Nanoparticles by Human Macrophages and a Monocytic Cell Line. *ACS Nano* 5(3): 1657–1669.
- Mailander, V. and K. Landfester (2009). Interaction of nanoparticles with cells. *Biomacromolecules* 10(9): 2379–400.
- Manicone, Anne M. and John K. McGuire (2008). Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. *Sem. Cell Dev. Biol.* 19(1): 34–41.
- Mbonye, Uri R and Inseok Song (2009). Posttranscriptional and posttranslational determinants of cyclooxygenase expression. *BMB Rep* 42(9): 552–560.
- Mizushima, Noboru, Tamotsu Yoshimori, and Beth Levine (2010). Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell* 140(3): 313–326.
- Morishige, Tomohiro, Yasuo Yoshioka, Hiroshi Inakura, Aya Tanabe, Xinglei Yao, Shogo Narimatsu, Youko Monobe, Takayoshi Imazawa, Shin-ichi Tsunoda, and Yasuo Tsutsumi (2010). The effect of surface modification of amorphous silica particles on NLRP3 inflammasome mediated IL-1[beta] production, ROS production and endosomal rupture. *Biomaterials* 31(26): 6833–6842.
- Nabeshi, H., T. Yoshikawa, K. Matsuyama, Y. Nakazato, A. Arimori, M. Isobe, S. Tochigi, S. Kondoh, T. Hirai, T. Akase, T. Yamashita, K. Yamashita, T. Yoshida, K. Nagano, Y. Abe, Y. Yoshioka, H. Kamada, T. Imazawa, N. Itoh, S. Tsunoda, and Y. Tsutsumi (2010). Size-dependent cytotoxic effects of amorphous silica nanoparticles on Langerhans cells. *Pharmazie* 65(3): 199–201.
- Nagai, H., T. Noguchi, K. Takeda, and H. Ichijo (2007). Pathophysiological roles of ASK1-MAP kinase signaling pathways. *J. Biochem. Mol. Biol.* 40(1): 1–6.
- Napierska, D., L. C. Thomassen, D. Lison, J. A. Martens, and P. H. Hoet (2010). The nanosilica hazard: another variable entity. *Part. Fibre. Toxicol.* 7(1): 39.
- Napierska, D., L. C. Thomassen, V. Rabolli, D. Lison, L. Gonzalez, M. Kirsch-Volders, J. A. Martens, and P. H. Hoet (2009). Size-dependent cytotoxicity of monodisperse silica nanoparticles in human endothelial cells. *Small* 5(7): 846–53.
- Nash, T., A. C. Allison, and J. S. Harington (1966). Physico-chemical properties of silica in relation to its toxicity. *Nature* 210(5033): 259–61.

- Nel, A., T. Xia, L. Madler, and N. Li (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311(5761): 622–7.
- Nel, A. E., L. Madler, D. Velegol, T. Xia, E. M. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova, and M. Thompson (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat. Mater.* 8(7): 543–57.
- Nemmar, Abderrahim, Marc F. Hoylaerts, Peter H. M. Hoet, Jozef Vermeylen, and Benoit Nemery (2003). Size effect of intratracheally instilled particles on pulmonary inflammation and vascular thrombosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 186(1): 38 – 45.
- Neuberger, Tobias, Bernhard Schoepf, Heinrich Hofmann, Margarete Hofmann, and Brigitte Rechenberg (2005). Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. *J. Magn. Magn. Mater.* 293(1): 483–496.
- Nishimori, Hikaru, Masuo Kondoh, Katsuhiko Isoda, Shin-ichi Tsunoda, Yasuo Tsutsumi, and Kiyohito Yagi (2009). Silica nanoparticles as hepatotoxicants. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72(3): 496–501.
- Oberdörster, G., J. N. Finkelstein, C. Johnston, R. Gelein, C. Cox, R. Baggs, and A. C. Elder (2000). Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. *Res Rep Health Eff Inst* 96: 5–74; disc. 75–86.
- Oberdörster, G., A. Maynard, K. Donaldson, V. Castranova, J. Fitzpatrick, K. Ausman, J. Carter, B. Karn, W. Kreyling, D. Lai, S. Olin, N. Monteiro-Riviere, D. Warheit, and H. Yang (2005). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part. Fibre. Toxicol.* 2: 8.
- Oberdörster, G., E. Oberdörster, and J. Oberdörster (2005). Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environ. Health. Perspect.* 113(7): 823–839.
- Oberdörster, Guenter, Vicki Stone, and Ken Donaldson (2007). Toxicology of nanoparticles: A historical perspective. *Nanotoxicology* 1(1): 2–25.
- OECD (2005). Screening information data set (synthetic amorphous silica and silicates); casno. 1344-00-9, cas-no.1344-95-2, cas-no.7631-86-9, cas-no.112926-00-8, cas-no.112945-52-5. Technical report.
- Ogawa, S. (2004). A nuclear receptor corepressor transcriptional checkpoint controlling activator protein 1-dependent gene networks required for macrophage activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101(40): 14461–14466.
- Ogawa, Sumito, Jean Lozach, Chris Benner, Gabriel Pascual, Rajendra K. Tangirala, Stefan Westin, Alexander Hoffmann, Shankar Subramaniam, Michael David, and Michael G. Rosenfeld (2005). Molecular Determinants of Crosstalk between Nuclear Receptors and Toll-like Receptors. *Cell* 122(5): 707–721.
- Ogawa, Sumito, Jean Lozach, Kristen Jepsen, Dominique Sawka-Verhelle, Valentina Perissi, Roman Sasik, David W. Rose, Randall S. Johnson, Michael G. Rosenfeld, and Christopher K. Glass (2004). A nuclear receptor corepressor transcriptional checkpoint controlling activator protein 1-dependent gene networks required for macrophage activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101(40): 14461–14466.



- Orr, Galya A., William B. Chrisler, Kaylyn J. Cassens, Ruimin Tan, Barbara J. Tarasevich, Lye Meng Markillie, Richard C. Zangar, and Brian D. Thrall (2010). Cellular recognition and trafficking of amorphous silica nanoparticles by macrophage scavenger receptor A. *Nanotoxicology* 0(0): 1–16.
- Orrenius, Sten, Pierluigi Nicotera, and Boris Zhivotovsky (2011). Cell Death Mechanisms and Their Implications in Toxicology. *Toxicol. Sci.* 119(1): 3–19.
- Otterbein, L. E., F. H. Bach, J. Alam, M. Soares, H. Tao Lu, M. Wysk, R. J. Davis, R. A. Flavell, and A. M. Choi (2000). Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat. Med.* 6(4): 422–8.
- Ovrevik, J., M. Lag, P. Schwarze, and M. Refsnes (2004). p38 and Src-ERK1/2 pathways regulate crystalline silica-induced chemokine release in pulmonary epithelial cells. *Toxicol. Sci.* 81(2): 480–490.
- Ovrevik, J., M. Refsnes, P. Schwarze, and M. Lag (2008). The ability of oxidative stress to mimic quartz-induced chemokine responses is lung cell line-dependent. *Toxicol. Lett.* 181(2): 75–80.
- Park, E. J. and K. Park (2009). Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro. *Toxicol. Lett.* 184(1): 18–25. .
- Pautz, Andrea, Julia Art, Susanne Hahn, Sebastian Nowag, Cornelia Voss, and Hartmut Kleinert (2010). Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* 23(2): 75–93.
- Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B. E. Xu, M. Karandikar, K. Berman, and M. H. Cobb (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22(2): 153–183.
- Pelka, J., H. Gehrke, M. Esselen, M. Turk, M. Crone, S. Brase, T. Muller, H. Blank, W. Send, V. Zibat, P. Brenner, R. Schneider, D. Gerthsen, and D. Marko (2009). Cellular uptake of platinum nanoparticles in human colon carcinoma cells and their impact on cellular redox systems and DNA integrity. *Chem. Res. Toxicol.* 22(4): 649–59.
- Pop, Cristina and Guy S. Salvesen (2009). Human Caspases: Activation, Specificity, and Regulation. *J. Biol. Chem.* 284(33): 21777–21781.
- Pope, C. A., 3rd, R. T. Burnett, G. D. Thurston, M. J. Thun, E. E. Calle, D. Krewski, and J. J. Godleski (2004). Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation* 109(1): 71–7.
- Radjendirane, V., P. Joseph, Y. H. Lee, S. Kimura, A. J. P. Klein-Szanto, F. J. Gonzalez, and A. K. Jaiswal (1998). Disruption of the DT diaphorase (NQO1) gene in mice leads to increased menadione toxicity. *J. Biol. Chem.* 273(13): 7382–7389.
- Raschke, W. C., S. Baird, P. Ralph, and I. Nakoinz (1978). Functional macrophage cell lines transformed by abelson leukemia virus. *Cell* 15(1): 261–267.
- Reddy, Sekhar P M and Brooke T Mossman (2002). Role and regulation of activator protein-1 in toxicant-induced responses of the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283(6): L1161–L1178.

- Rubinfeld, H. and R. Seger (2005). The ERK Cascade: A Prototype of MAPK Signaling. *Mol. Biotechnol.* 31: 151–174.
- Ryter, Stefan W, Leo E Otterbein, Danielle Morse, and Augustine M K Choi (2002). Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Mol Cell Biochem* 234-235(1-2): 249–263.
- Sato, Shintaro, Hideki Sanjo, Kiyoshi Takeda, Jun Ninomiya-Tsuji, Masahiro Yamamoto, Taro Kawai, Kunihiro Matsumoto, Osamu Takeuchi, and Shizuo Akira (2005). Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 6(11): 1087–1095.
- Sayes, C. M., K. L. Reed, and D. B. Warheit (2007). Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. *Toxicol. Sci.* 97(1): 163–80.
- Sayre, L.M., M.A. Smith, and G. Perry (2001). Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr. Med. Chem.* 8(7): 721–738.
- Schins, Roel P. F., Rodger Duffin, Doris Hoehr, Ad M. Knaapen, Tingming Shi, Christel Weishaupt, Vicki Stone, Ken Donaldson, and Paul J. A. Borm (2002). Surface Modification of Quartz Inhibits Toxicity, Particle Uptake, and Oxidative DNA Damage in Human Lung Epithelial Cells. *Chem. Res. Toxicol.* 15(9): 1166–1173.
- Seger, R and EG Krebs (1995). The MAPK signaling cascade. *The FASEB Journal* 9(9): 726–735.
- Seleverstov, Oleksandr, Olga Zabirnyk, Matthias Zscharnack, Larysa Bulavina, Marcin Nowicki, Jan-Michael Heinrich, Maksym Yezhelyev, Frank Emmrich, Ruth O'Regan, and Augustinus Bader (2006). Quantum Dots for Human Mesenchymal Stem Cells Labeling. A Size-Dependent Autophagy Activation. *Nano Lett.* 6(12): 2826–2832.
- Shealy, D. J. and S. Visvanathan (2008). Anti-TNF antibodies: lessons from the past, roadmap for the future. *Handb. Exp. Pharmacol.* 181: 101–29.
- Shvedova, A. A., E. Kisin, A. R. Murray, V. J. Johnson, O. Gorelik, S. Arepalli, A. F. Hubbs, R. R. Mercer, P. Keohavong, N. Sussman, J. Jin, J. Yin, S. Stone, B. T. Chen, G. Deye, A. Maynard, V. Castranova, P. A. Baron, and V. E. Kagan (2008). Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis. *Am. J. Physiol.* 295(4): L552–L565.
- Shvedova, Anna A, Vincent Castranova, Elena R Kisin, Diane Schwegler-Berry, Ashley R Murray, Vadim Z Gandelsman, Andrew Maynard, and Paul Baron (2003). Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *J Toxicol Environ Health A* 66(20): 1909–1926.
- Singal, Madhuri and Jacob N. Finkelstein (2005). Amorphous Silica Particles Promote Inflammatory Gene Expression Through The Redox Sensitive Transcription Factor AP-1 In Alveolar Epithelial Cells. *Exp. Lung Res.* 31(6): 581–597.
- Smale, Stephen T. (2010). Selective Transcription in Response to an Inflammatory Stimulus. *Cell* 140(6): 833–844.
- Sohaebuddin, Syed, Paul Thevenot, David Baker, John Eaton, and Liping Tang (2010). Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Part. Fibre. Toxicol.* 7(1): 22.

- Stayton, Isaac, Jeffrey Winiarz, Katie Shannon, and Yinfa Ma (2009). Study of uptake and loss of silica nanoparticles in living human lung epithelial cells at single cell level. *Anal. Bioanal. Chem.* 394(6): 1595–1608.
- Stewart, D. (2002). Degradation of Transcription Factor Nrf2 via the Ubiquitin-Proteasome Pathway and Stabilization by Cadmium. *J. Biol. Chem.* 278(4): 2396–2402.
- Sydlik, Ulrich, Katrin Bierhals, Maria Soufi, Josef Abel, Roel P. F. Schins, and Klaus Unfried (2006). Ultrafine carbon particles induce apoptosis and proliferation in rat lung epithelial cells via specific signaling pathways both using EGF-R. *Am. J. Physiol.* 291(4): L725–L733.
- Thibodeau, M., C. Giardina, and A. K. Hubbard (2003). Silica-induced caspase activation in mouse alveolar macrophages is dependent upon mitochondrial integrity and aspartic proteolysis. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 76(1): 91–101.
- Tobiome, K., A. Matsuzawa, T. Takahashi, H. Nishitoh, K. Morita, K. Takeda, O. Minowa, K. Miyazono, T. Noda, and H. Ichijo (2001). ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep* 2(3): 222–228.
- Tomaru, Makoto and Masato Matsuoka (2011). The role of mitogen-activated protein kinases in crystalline silica-induced cyclooxygenase-2 expression in A549 human lung epithelial cells. *Toxicol. Mech. Methods* 0(0): 1–7.
- Tsuji, N. M., H. Tsutsui, E. Seki, K. Kuida, H. Okamura, K. Nakanishi, and R. A. Flavell (2004). Roles of caspase-1 in *Listeria* infection in mice. *Int. Immunol.* 16(2): 335–43.
- UBA (2010). Emission von Nanopartikeln aus ausgewählten Produkten in ihrem Lebenszyklus - 52/2010. Technical report, Umweltforschungsplan des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit.
- Ueda, A., Y. Ishigatsubo, T. Okubo, and T. Yoshimura (1997). Transcriptional regulation of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. Cooperation of two NF-kappaB sites and NF-kappaB/Rel subunit specificity. *J. Biol. Chem.* 272(49): 31092–9.
- Unfried, Klaus, Catrin Albrecht, Lars-Oliver Klotz, Anna Von Mikecz, Susanne Grether-Beck, and Roel P.F. Schins (2007). Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms. *Nanotoxicology* 1(1): 52–71.
- Valko, Marian, Dieter Leibfritz, Jan Moncol, Mark T. D. Cronin, Milan Mazur, and Joshua Telser (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39(1): 44–84.
- Van Herreweghe, Franky, Nele Festjens, Wim Declercq, and Peter Vandenabeele (2010). Tumor necrosis factor-mediated cell death: to break or to burst, that's the question. *Cell. Mol. Life Sci.* 67(10): 1567–1579.
- van Overveld, F. J., U. Demkow, D. Gorecka, W. A. Backer, and J. Zielinski (2005). New developments in the treatment of COPD: comparing the effects of inhaled corticosteroids and N-acetylcysteine. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 56 Suppl 4: 135–42.

- Vandenabeele, P., L. Galluzzi, T. Vanden Berghe, and G. Kroemer (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11(10): 700–14.
- Vandenabeele, P., T. Vanden Berghe, and N. Festjens (2006). Caspase inhibitors promote alternative cell death pathways. *Science* 2006(358): pe44.
- Vercammen, Dominique, Rudi Beyaert, Geertrui Denecker, Vera Goossens, Geert Van Loo, Wim Declercq, Johan Grooten, Walter Fiers, and Peter Vandenabeele (1998). Inhibition of Caspases Increases the Sensitivity of L929 Cells to Necrosis Mediated by Tumor Necrosis Factor. *J. Exp. Med.* 187(9): 1477–1485.
- Vesely, Paul Willi, Philipp Bernhard Staber, Gerald Hoefler, and Lukas Kenner (2009). Translational regulation mechanisms of AP-1 proteins. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 682(1): 7–12.
- Vila-del Sol, V., M. D. Diaz-Munoz, and M. Fresno (2007). Requirement of tumor necrosis factor alpha and nuclear factor-kappaB in the induction by IFN-gamma of inducible nitric oxide synthase in macrophages. *J. Leukocyte Biol.* 81(1): 272–83.
- Wang, Zhenjia, Chinnaswamy Tirupathi, Richard D. Minshall, and Asrar B. Malik (2009). Size and Dynamics of Caveolae Studied Using Nanoparticles in Living Endothelial Cells. *ACS Nano* 3(12): 4110–4116.
- Warheit, D. B., T. A. McHugh, and M. A. Hartsky (1995). Differential pulmonary responses in rats inhaling crystalline, colloidal or amorphous silica dusts. *Scand. J. work. env. health.* 21 Suppl 2: 19–21.
- Waters, K. M., L. M. Masiello, R. C. Zangar, B. J. Tarasevich, N. J. Karin, R. D. Quesenberry, S. Bandyopadhyay, J. G. Teeguarden, J. G. Pounds, and B. D. Thrall (2008). Macrophage Responses to Silica Nanoparticles are Highly Conserved Across Particle Sizes. *Toxicol. Sci.* 107(2): 553–569.
- Weber, Axel, Peter Wasiliew, and Michael Kracht (2010). Interleukin-1 (IL-1) Pathway. *Sci. Signal.* 3(105): cm1–.
- Wu, Jie, Jiao Sun, and Yang Xue (2010). Involvement of JNK and P53 activation in G2/M cell cycle arrest and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in neuron cells. *Toxicol Lett* 199(3): 269–276.
- Xia, Tian, Paavo Korge, James N. Weiss, Ning Li, M. Indira Venkatesen, Constantinos Sioutas, and Andre Nel (2004). Quinones and Aromatic Chemical Compounds in Particulate Matter Induce Mitochondrial Dysfunction: Implications for Ultrafine Particle Toxicity. *Environ. Health. Perspect.* 112(14): 1347–1358.
- Xia, Tian, Michael Kovoichich, Monty Liong, Lutz Madler, Benjamin Gilbert, Haibin Shi, Joanne I. Yeh, Jeffrey I. Zink, and Andre E. Nel (2008a). Comparison of the Mechanism of Toxicity of Zinc Oxide and Cerium Oxide Nanoparticles Based on Dissolution and Oxidative Stress Properties. *ACS Nano* 2(10): 2121–2134.
- Xia, Tian, Michael Kovoichich, Monty Liong, Jeffrey I. Zink, and Andre E. Nel (2008b). Cationic Polystyrene Nanosphere Toxicity Depends on Cell-Specific Endocytic and Mitochondrial Injury Pathways. *ACS Nano* 2(1): 85–96.
- Xia, Tian, Ning Li, and Andre E. Nel (2009). Potential Health Impact of Nanoparticles. *Annual Review of Public Health* 30(1): 137–150.

- Xue, Chengbin, Wei Liu, Jianhong Wu, Xiangliang Yang, and Huibi Xu (2011). Chemoprotective effect of N-acetylcysteine (NAC) on cellular oxidative damages and apoptosis induced by nano titanium dioxide under UVA irradiation. *Toxicol. in Vitro* 25(1): 110–116.
- Yadav, A., V. Saini, and S. Arora (2010). MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. *Clin. Chim. Acta* 411(21-22): 1570–9.
- Yazdi, A. S., G. Guarda, N. Riteau, S. K. Drexler, A. Tardivel, I. Couillin, and J. Tschopp (2010). Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1alpha and IL-1beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107(45): 19449–54.
- Ye, Yiyi, Jianwen Liu, Jianhe Xu, Lijuan Sun, Mingcang Chen, and Minbo Lan (2010). Nano-SiO<sub>2</sub> induces apoptosis via activation of p53 and Bax mediated by oxidative stress in human hepatic cell line. *Toxicol. in Vitro* 24(3): 751–758.
- Yen, H., Y. Zhang, S. Penfold, and B. J. Rollins (1997). MCP-1-mediated chemotaxis requires activation of non-overlapping signal transduction pathways. *J. Leukocyte Biol.* 61(4): 529–32.
- Yeretssian, G., K. Labbe, and M. Saleh (2008). Molecular regulation of inflammation and cell death. *Cytokine* 43(3): 380–390.
- Yu, Kyung, Christin Grabinski, Amanda Schrand, Richard Murdock, Wei Wang, Baohua Gu, John Schlager, and Saber Hussain (2009). Toxicity of amorphous silica nanoparticles in mouse keratinocytes. *J. Nanopart. Res.* 11(1): 15–24.
- Zabirnyk, O., M. Yezhelyev, and O. Seleverstov (2007). Nanoparticles as a novel class of autophagy activators. *Autophagy* 3(3): 278–81.
- Zhang, Dongmao, Oara Neumann, Hui Wang, Virany M. Yuwono, Aoune Barhoumi, Michael Perham, Jeffrey D. Hartgerink, Pernilla Wittung-Stafshede, and Naomi J. Halas (2009). Gold Nanoparticles Can Induce the Formation of Protein-based Aggregates at Physiological pH. *Nano Letters* 9(2): 666–671.
- Zhang, H., H. Liu, D. Dickinson, R. Liu, E. Postlethwait, Y. Laperche, and H. Forman (2006). [gamma]-Glutamyl transpeptidase is induced by 4-hydroxynonenal via EpRE/Nrf2 signaling in rat epithelial type II cells. *Free Radical Biol. Med.* 40(8): 1281–1292.



# Abbildungsverzeichnis

1.1	Schema der Aufnahmewege in Säugetierzellen . . . . .	6
1.2	MAPK-Signalweg . . . . .	11
1.3	Ablauf Autophagie . . . . .	18
2.1	Darstellung der Kernmaske . . . . .	39
2.2	Auswertung Zelltod-Phasen . . . . .	40
3.1	TEM-Bilder der verwendeten Nanomaterialien . . . . .	47
3.2	Zytotoxizität der SiO <sub>2</sub> NP nach 24 h NP . . . . .	49
3.3	SiO <sub>2</sub> NP wirken toxischer in Abwesenheit von FCS . . . . .	50
3.4	SiO <sub>2</sub> NP generieren keine ROS . . . . .	51
3.5	Aufnahme 12 nm SiO <sub>2</sub> NP mit 10 % FCS . . . . .	53
3.6	Aufnahme 12 nm SiO <sub>2</sub> NP mit 0 % FCS . . . . .	55
3.7	Nachweis Vakuolen-Bildung über Hellfeld-Bilder . . . . .	56
3.8	Aufnahme 40 nm SiO <sub>2</sub> NP in Makrophagen . . . . .	57
3.9	Aktivierung oxidative Stressantwort nach SiO <sub>2</sub> NP Exposition . . . . .	59
3.10	Aktivierung MAPK-Signalweg nach SiO <sub>2</sub> NP Exposition . . . . .	60
3.11	Aktivierung MAPK-Substrate nach SiO <sub>2</sub> NP Exposition . . . . .	61
3.12	Aktivierung MAP2K nach SiO <sub>2</sub> NP Exposition . . . . .	62
3.13	Konz.-abh. Genexpression d. anti-oxidativen Zellantwort . . . . .	64
3.14	Konz.-abh. Genexpression d. proinflammatorischen Zellantwort . . . . .	64
3.15	Zeitabh. Genexpression d. anti-oxidativen Zellantwort . . . . .	65
3.16	Zeitabh. Genexpression d. proinflammatorischen Zellantwort . . . . .	66
3.17	Validierung Genexpressionsdaten auf Proteinebene . . . . .	67
3.18	NAC hemmt die HO-1 Genexpression nach SiO <sub>2</sub> NP Exposition . . . . .	69
3.19	Proinflammatorische Genexpression in Abhängigkeit von NAC . . . . .	70
3.20	Validierung der Genexpression nach NAC . . . . .	71
3.21	Keine Hemmung der SiO <sub>2</sub> NP induzierten Signalwege durch NAC . . . . .	72
3.22	Funktionalität der MAPK-Inhibitoren . . . . .	74
3.23	Genexpression nach SB-Behandlung . . . . .	76
3.24	Genexpression nach SP-Behandlung . . . . .	77
3.25	Genexpression nach PD-Behandlung . . . . .	78

---

3.26	Validierung d. Genexpression mit MAPK-Inhibitoren . . . . .	80
3.27	SiO <sub>2</sub> NP verursachen Nekrose in Makrophagen . . . . .	84
3.28	Bilder Apoptose-Assay nach 6 h Behandlung -/+10 % FCS . . . . .	85
3.29	Caspase-3 und PARP-1 Spaltung nach SiO <sub>2</sub> NP Exposition . . . . .	87
3.30	Einfluss ZVAD auf SiO <sub>2</sub> NP induzierten Zelltod . . . . .	88
3.31	Nachweis Apoptose-Marker nach ZVAD-Behandlung . . . . .	90
3.32	Einfluss NAC auf SiO <sub>2</sub> NP induzierten Zelltod . . . . .	92
3.33	Einfluss SB-Inhibitor auf SiO <sub>2</sub> NP induzierten Zelltod . . . . .	94
3.34	Einfluss SP-Inhibitor auf SiO <sub>2</sub> NP induzierten Zelltod . . . . .	95
3.35	Einfluss PD-Inhibitor auf SiO <sub>2</sub> NP induzierten Zelltod . . . . .	96
3.36	Bilder Apoptose-Assay nach 6 h Behandlung -/+MAPK-Inhibitoren . . . . .	97
3.37	Nachweis Apoptose-Marker nach Einsatz von MAPK-Inhibitoren . . . . .	98
4.1	Modell der SiO <sub>2</sub> NP induzierten Effekte . . . . .	109
4.2	Modell der SiO <sub>2</sub> NP induzierten Effekte . . . . .	120
A.1	ROS Generierung in Abhängigkeit von NAC . . . . .	147
A.2	Nachweis Apoptose-Marker nach NAC-Behandlung . . . . .	147
A.3	Aktivierung d. MAPK-Signalwegs nach SiO <sub>2</sub> NP unabhängig von ZVAD . . . . .	148
A.4	Einfluss ZVAD auf Aktivierung von TNF $\alpha$ . . . . .	148
A.5	Apoptose-Assay mit SB +SP-Inhibitor . . . . .	149
A.6	Apoptose-Assay mit SB +SP + PD-Inhibitor . . . . .	149



# Tabellenverzeichnis

2.1	Verwendete Chemikalien . . . . .	22
2.2	Übersicht verwendete Inhibitoren . . . . .	22
2.3	Verwendete Antikörper . . . . .	24
2.4	Verwendete Laborgeräte und Programmsoftware . . . . .	25
2.5	Verwendete Zellkulturmedien und Zusätze . . . . .	25
2.6	Verwendete Partikel und Nanomaterialien . . . . .	27
2.7	Verwendete Zelldichten für die Versuche . . . . .	27
2.8	Vergleich Volumen- und Flächenkonzentrationen . . . . .	28
2.9	Endkonzentrationen der eingesetzten Inhibitoren . . . . .	28
2.10	Zusammensetzung des Lysepuffers . . . . .	30
2.11	Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels . . . . .	31
2.12	Zusammensetzung des Laufpuffers . . . . .	31
2.13	Zusammensetzung des Blotpuffers . . . . .	31
2.14	Zusammensetzung TBS-Puffer . . . . .	32
2.15	Zusammensetzung Reverse Transkriptase - Mix . . . . .	34
2.16	Zusammensetzung QC-PCR Mastermix . . . . .	35
2.17	PCR-Programm für QC-PCR . . . . .	35
2.18	Programm für qRT-PCR . . . . .	36
2.19	Verwendete Primer für qRT-PCR . . . . .	37
2.20	Zusammensetzung Erst-Fixierlösung . . . . .	41
2.21	Zusammensetzung Zweit-Fixierlösung . . . . .	41
3.1	Herstellerangaben der verwendeten Partikel . . . . .	47
3.2	Übersicht Partikel-Charakterisierung . . . . .	48
3.3	Effekte MAPK-Inhibitoren auf Basallevel und Induzierbarkeit d. Gene . . . . .	75



# Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP-1	Aktivator-Protein-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASK1	“apoptosis signal-regulating kinase 1”
Atg	Autophagie
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumine</i> )
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindolhydrochlorid
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	“epidermal growth factor”
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
et al.	und andere (“et alii”)
FCS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde (“hour”)
HRP	Meerrettichperoxidase (“horseradish peroxidase”)
J	Joule
JNK	c-Jun-N-terminale Proteinkinase
k	Kilo
kD	Kilodalton
l	Liter
LC3	“light chain 3”
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
m	Meter, milli

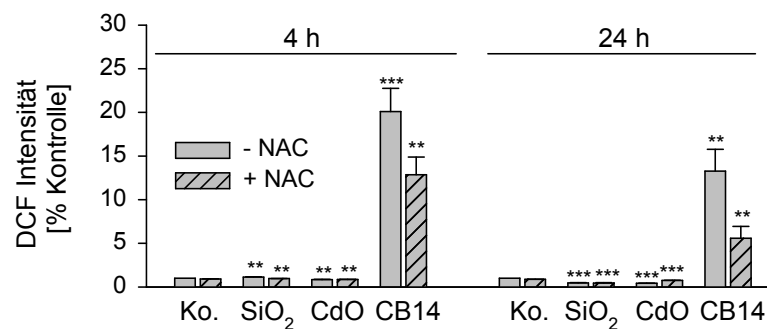
M, mM	Mol pro Liter; Millimol pro Liter
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	MAPK-Kinase
MAPKKK	MAPKK-Kinase
MK2	MAPK-aktivierte Proteinkinase-2
min	Minuten
NP	Nanopartikel
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMPs	“Pathogen-associated molecular patterns”
PARP	Poly(ADP-Ribose)Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (“phosphate buffered saline”)
PI	Propidiumiodid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PRR	“pathogen recognition receptor”
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (“reactive oxygen species”)
RT	Raumtemperatur
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase(n) (“stress-activated protein kinase”)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SiO <sub>2</sub>	Siliziumdioxid
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TF	Transkriptionsfaktor
TiO <sub>2</sub>	Titandioxid
TLR	“Toll-like receptor”
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TPA	12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween20	Polyoxyethen-sorbitan-monolaurat
U	Enzymeinheit (“unit”)
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolette Strahlung
V	Volt
wt	Wildtyp
v/v	“Volume to Volume”
w/v	“Weight per Volume”
z.B.	Zum Beispiel

## **Danksagung**

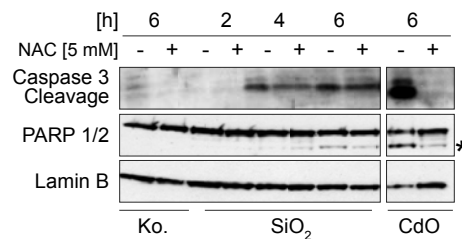
Dem Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit (Projektnummer BfR-ZEBET-1328-209).



## Anhang A

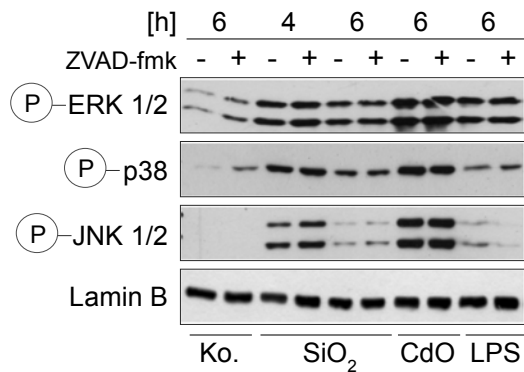


**Abbildung A.1: NAC inhibiert effizient die ROS-Produktion.** RAW264.7 Makrophagen wurden zunächst 30 min mit NAC vorbehandelt, dann für 4 h und 24 h mit 50 µg/ml SiO<sub>2</sub> NP, 1 µg/ml CdO und 50 µg/ml Carbon Black (CB14) -/+5 mM NAC ohne FCS exponiert und mittels DCF-Assay auf die Bildung von ROS analysiert. Angegeben ist der Mittelwert ± s.e.m. aus drei unabhängigen Experimenten (\*\*\*) p < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle).

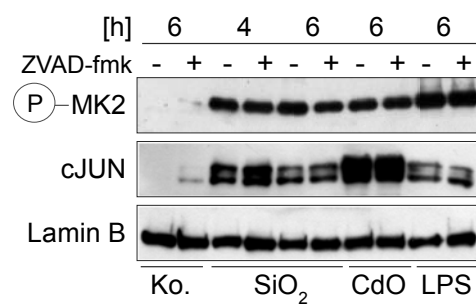


**Abbildung A.2: NAC verhindert nicht die Aktivierung der Apoptose-Kaskade durch SiO<sub>2</sub> NP.** Die RAW264.7 Makrophagen wurden zunächst für 30 min mit 5 mM NAC vorbehandelt und dann für 2, 4 und 6 h mit 50 µg/ml 12 nm SiO<sub>2</sub> NP und für 6 h mit jeweils µg/ml CdO und LPS -/+5 mM NAC in Medium ohne FCS exponiert. Anschließend wurden die Zellysate im Western Blot mit spezifischen Antikörpern auf die Spaltung von Caspase 3 und PARP-1, gekennzeichnet durch (\*), analysiert. Als Ladekontrolle für gleiche aufgetragene Proteinmengen wurde Lamin B verwendet.

**A) MAPK Aktivierung**

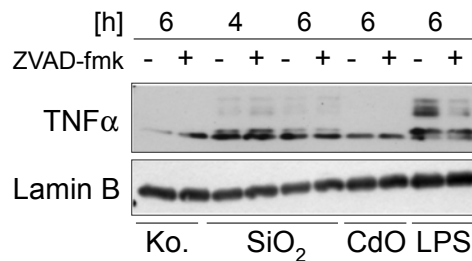


**B) MAPK Zielproteine**

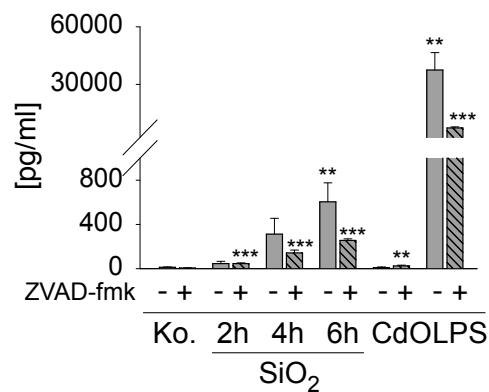


**Abbildung A.3: Caspase-Inhibitor ZVAD hat keinen Einfluss auf die SiO<sub>2</sub> NP induzierte Aktivierung des MAPK-Signalwegs.** Die RAW264.7 Makrophagen wurden für 2, 4, 6 h mit 50 µg/ml SiO<sub>2</sub> NP und für 6 h mit jeweils µg/ml CdO und LPS -/+50 µM ZVAD-fmk in Medium ohne FCS behandelt. Anschließend wurden die Zellysate im Western Blot mit phosphospezifischen Antikörpern auf die Aktivierung der A) MAP-Kinasen ERK1/2, p38, JNK1/2 sowie B) deren Substrate MK2 und cJun analysiert. Als Ladekontrolle für gleiche aufgetragene Proteinmengen wurde Lamin B verwendet.

**A)**

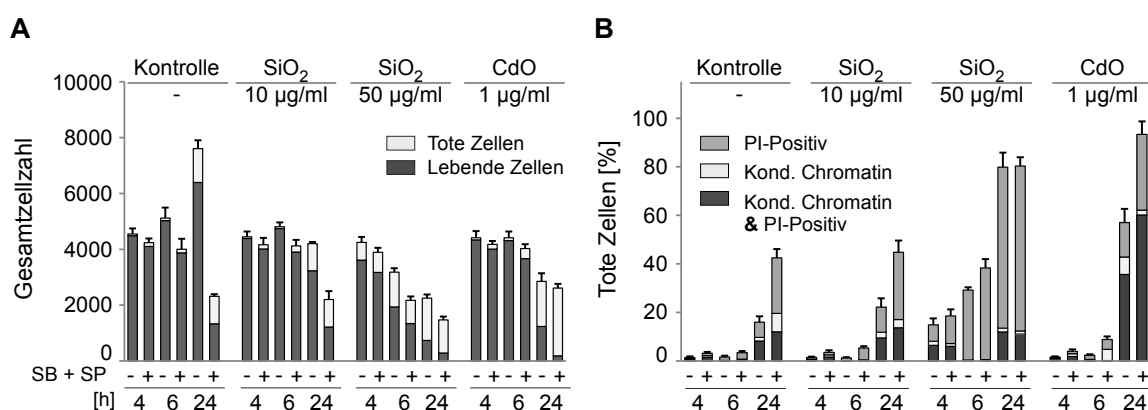


**B) Freisetzung TNFα**

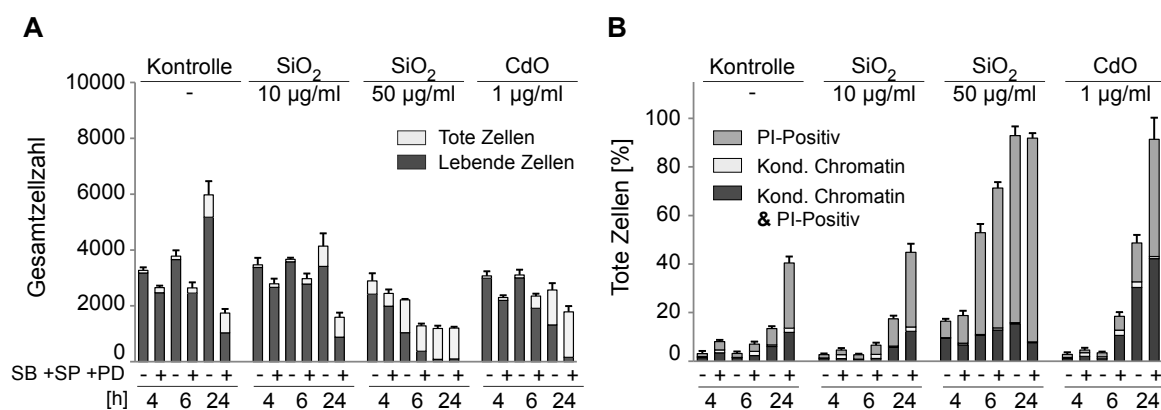


**Abbildung A.4: ZVAD vermindert nur die Freisetzung von TNFα nach SiO<sub>2</sub> NP Exposition** Die RAW264.7 Makrophagen wurden für 2, 4, 6 h mit 50 µg/ml SiO<sub>2</sub> NP und für 6 h mit jeweils µg/ml CdO und LPS -/+ 50 µM ZVAD-fmk in Medium ohne FCS behandelt. A) Die Zellysate wurden im Western Blot mit spezifischen Antikörpern auf die Aktivierung von intrazellulärem TNFα getestet. Als Ladekontrolle für gleiche aufgetragene Proteinmengen wurde Lamin B verwendet. B) Die Freisetzung von TNFα wurde mittels ELISA quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert ± s.e.m. aus drei unabhängigen Experimenten (\*\*\*) p < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle).





**Abbildung A.5: Wirkung einer Doppelbehandlung mit SB- und SP-Inhibitor auf den SiO<sub>2</sub> NP induzierten Zelltod.** RAW264.7 Makrophagen wurden zunächst für 30 min mit 0.1 % DMSO bzw. 10 µM SB- und SP-Inhibitor vorbehandelt, dann für 4, 6, 24 h mit 10 und 50 µg/ml sowie 1 µg/ml CdO -/+10 µM Sb und SP ohne FCS behandelt und im Anschluss direkt mit Hoechst und PI gefärbt. Die Bildakquisition erfolgte mittels automatisiertem Fluoreszenzmikroskop und die erhaltenen Bilder wurden über die Scan<sup>®</sup>-Software automatisiert ausgewertet. Dargestellt sind A) die Gesamtzellzahl unterteilt in lebende und tote Zellen sowie B) die prozentuale Aufteilung der toten Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl in die verschiedenen Stadien des Zelltods (PI-positiv, kondensiertes Chromatin, kondensiertes Chromatin & PI-positiv). Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente und wurden jeweils im Quadruplikat gemessen.



**Abbildung A.6: Wirkung einer Dreifachbehandlung mit SB-, SP und PD-Inhibitor auf den SiO<sub>2</sub> NP induzierten Zelltod.** RAW264.7 Makrophagen wurden zunächst für 30 min mit 0.1 % DMSO bzw. 10 µM SB-, SP und PD-Inhibitor vorbehandelt, dann für 4, 6, 24 h mit 10 und 50 µg/ml sowie 1 µg/ml CdO -/+10 µM SB, SP und PD ohne FCS behandelt und im Anschluss direkt mit Hoechst und PI gefärbt. Die Bildakquisition erfolgte mittels automatisiertem Fluoreszenzmikroskop und die erhaltenen Bilder wurden über die Scan<sup>®</sup>-Software automatisiert ausgewertet. Dargestellt sind A) die Gesamtzellzahl unterteilt in lebende und tote Zellen sowie B) die prozentuale Aufteilung der toten Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl in die verschiedenen Stadien des Zelltods (PI-positiv, kondensiertes Chromatin, kondensiertes Chromatin & PI-positiv). Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente und wurden jeweils im Quadruplikat gemessen.

