

# Toxizität und pro-inflammatorisches Potenzial verschiedener Metalloxid Nanopartikel in Lungenzellen

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

Alicja Panas

aus

Teschen (Polen)

2011

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Referent: PD. Dr. Carsten Weiss

Korreferent: Prof. Dr. Andrea Hartwig

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2011



## **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 14. September 2011

Alicja Panas



## Zusammenfassung

Synthetisch hergestellte Nanopartikel stellen aufgrund ihrer kleinen Größe und ihrer neuartigen physikalisch-chemischen Eigenschaften ein noch nicht einschätzbares Gesundheitsrisiko dar. Im Fokus der Untersuchungen steht die Toxizität nach Freisetzung der Nanopartikel in die Atemluft bei der Herstellung und Verarbeitung, wobei die Interaktion der Partikelstäube mit dem Lungengewebe nach Inhalation betrachtet wird. Die Untersuchung der Wirkung von luftgetragenen Partikeln wurde bislang sowohl in Tierversuchen mittels Inhalation und Instillation als auch *in vitro* in Zellkultursystemen durchgeführt. Dennoch konnten die Wirkmechanismen von Nanopartikeln aufgrund der Vielfalt ihrer Eigenschaften, der komplexen Wechselwirkungen mit den biologischen Systemen sowie mit den *in vitro* Messverfahren immer noch nicht vollständig geklärt werden. Insbesondere fehlen derzeit Methoden zur Dosisbestimmung, die dabei helfen können, Grenzwerte für Luftkonzentrationen der freigesetzte Nanopartikel festzulegen.

Derzeit wird postuliert, dass die besonders reaktive Nanopartikeloberfläche das Potenzial besitzt, zelluläre Bestandteile wie Membranen, Proteine, DNA sowie die Organellen durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies zu schädigen, infolgedessen kann oxidativer Stress, Entzündungsprozesse und Zelltod ausgelöst werden. Das Ziel dieser Arbeit war die Überprüfung dieser Hypothese mit verschiedenen *in vitro* Testmethoden in humanen Lungenepithelzellen (A549) und Maus-Makrophagen (RAW264.7). Im Fokus dieser Untersuchungen stand die Frage, ob Wechselwirkungen zwischen Nanopartikeln und den Proteinen im Zellkulturmedium auf die biologische Wirkung einen Einfluss haben. Deshalb wurden zunächst verschiedene Metalloxid Nanopartikel ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2$ ) in einem Screening Verfahren auf Zytotoxizität, ROS Bildung, Induktion von anti-oxidativen Enzymen und pro-inflammatorischen Mediatoren bei An- und Abwesenheit von fötalem Kälberserum (FCS) im Zellkulturmedium untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass  $\text{SiO}_2$  Nanopartikel selektiv in Medium ohne Serum zytotoxisch und pro-inflammatorisch in beiden Zelllinien wirkten. Eine anti-oxidative Antwort wurde hingegen nur sehr schwach in RAW264.7 Makrophagen induziert.  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ - und  $\text{TiO}_2$ -NP lösten keine Zytotoxizität und keine anti-oxidative Antwort, sondern nur eine sehr geringe pro-inflammatorische Antwort aus. Weiterhin wurde die intrazelluläre ROS Generierung nur durch  $\text{TiO}_2$ -NP und nicht durch  $\text{SiO}_2$ - oder  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -NP induziert. Daher konnte keine Korrelation von oxidativem Stress und Toxizität festgestellt werden. Trotz unterschiedlicher Wirkmechanismen konnte mittels TEM Analyse gezeigt werden, dass alle Partikelsorten aufgenommen wurden und im Zellinneren meist von Membranen umschlossen vorlagen.

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (p38, JNK, ERK) an der Signaltransduktion nach Inkubation mit  $\text{SiO}_2$ -NP in serumfreiem Medium

beteiligt waren. Durch Beschichtung der SiO<sub>2</sub>-NP mit FCS und Albumin (BSA) konnte gezeigt werden, dass die Proteinkorona die Zellen vor der Partikeloberfläche schützte und mögliche Wechselwirkungen mit den zellulären Bestandteilen verhindert wurden. Die Proteinkorona reduzierte die Partikel-induzierte Toxizität, die COX-2 Synthese und p38 Phosphorylierung. Dabei spielte jedoch die Zusammensetzung der Proteinkorona eine wichtige Rolle, denn nur die mit FCS beschichteten und nicht die mit BSA-beschichteten SiO<sub>2</sub>-NP konnten den AKT Signalweg spezifisch aktivieren.

Um Veränderungen der Eigenschaften von Nanopartikeln aufgrund von Testmedien zu verhindern, wurde in dieser Arbeit die Exposition von luftgetragenen Nanopartikeln an der Luft-/ Flüssigkeitsgrenzschicht (*air-liquid interphase*, ALI) in Zusammenarbeit mit dem Institut für Meteorologie und Klimaforschung etabliert. Diese Methode sollte die Exposition in der Lunge realistischer nachstellen. Dabei wurden die SiO<sub>2</sub>-NP nicht in wässrigen Suspensionen auf die Zellen gegeben, sondern in einem Aerosol mit den Zellen in Kontakt gebracht. Gleichzeitig wurde die applizierte Dosis mittels TEM Analyse bestimmt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Lungenepithelzellen unter ALI Bedingungen im Vergleich zur Submerskultur in serumfreien Medium weniger sensitiv auf die Behandlung mit SiO<sub>2</sub>-NP reagierten. Denn obwohl eine 5-fach höhere Dosis unter ALI Bedingungen im Vergleich zur Submerskultur appliziert wurde, lösten die Partikel eine geringere Toxizität, p38 Aktivierung, Freisetzung von IL-8 und Induktion von COX-2 aus. Welche Faktoren hierbei eine Rolle spielen, muss noch untersucht werden. Mögliche Ursachen könnten eine schlechtere Verfassung der Zellen und folglich eine schlechtere Aufnahme der Partikel oder die Sezernierung von Surfactant sein. Surfactant könnte wie die Proteine an die Partikel binden und eine schützende Wirkung besitzen.

Zusammenfassend konnte neu gezeigt werden, dass der Einfluss der Proteinkorona auf die biologische Wirkung von SiO<sub>2</sub>-NP durch das Abschirmen der Partikeloberfläche vermittelt wird und dass dies sogar einen Einfluss auf die Interaktion mit intrazellulären Signalwegen hat. Außerdem konnte dargestellt werden, dass es eine Rolle spielt, unter welchen Expositionsbedingungen Nanopartikel auf ihre Toxizität und Wirkmechanismen getestet werden. Insbesondere muss die Reaktion der Zellen bei Exposition unter ALI Bedingungen noch ausführlicher untersucht werden.

## Abstract

Due to their small size and their novel physico-chemical properties engineered nanoparticles may present a risk to human health which is difficult to predict. Especially the risk of nanoparticles (NPs) which can be released into the air during production and processing is in the focus of investigations and therefore the interactions of NPs with the lung tissue are of special interest. So far, the studies on toxicity of airborne particles were carried out both in animal studies *in vivo* by inhalation and instillation as well as in cell culture systems *in vitro*. But the mode of action of NPs is still not fully elucidated because of their diverse properties, the complex interactions with biological systems and with the *in vitro* test methods. In particular, specific methods are lacking which enable the determination of the deposited dose in order to help setting limits for air concentrations of released NPs.

Currently, there exists one prevailing hypothesis which explains the mode of action of NPs. According to that hypothesis the NP surface characteristics have the potential to damage cellular components such as membranes, proteins, DNA and organelles through the formation of reactive oxygen species (ROS), which trigger oxidative stress, inflammation and cell death. One aim of this work was to test this hypothesis by using different *in vitro* test methods and the human lung epithelial (A549) and the mouse macrophage cell line (RAW264.7) as target cells. The main objective was to study the biological effects of different metal-oxide NPs ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  and  $\text{TiO}_2$ ) and the influence of serum proteins in the media on the biological outcome. Therefore, cells were exposed to a panel of metal-oxide NPs which were screened for their ability to induce cytotoxicity, generation of ROS, the anti-oxidative and pro-inflammatory response in presence and absence of fetal calf serum (FCS) in the medium. Surprisingly, it was observed that amorphous  $\text{SiO}_2$ -NPs selectively in medium without FCS were the most cytotoxic nanoparticles for both cell types and induced a significant pro-inflammatory response. However, the anti-oxidative response was induced only slightly in RAW264.7 macrophages.  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ - and  $\text{TiO}_2$ - NPs induced neither cytotoxicity, nor an anti-oxidative response and only a low pro-inflammatory response. Furthermore intracellular ROS formation was only enhanced in cells treated with  $\text{TiO}_2$  nanoparticles but not with  $\text{SiO}_2$ - and  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -NPs. Based on these data cytotoxicity did not correlate with ROS formation. Although the particles induced different effects it was shown by transmission electron microscopy that all particles were localized intracellularly mostly surrounded by membranes. Furthermore the mitogen-activated protein kinases (p38, JNK, ERK) were involved in the signal transduction of the  $\text{SiO}_2$ - NP-induced effects in absence of serum. The pre-coating of  $\text{SiO}_2$ -NP with both FCS and albumin had a protective effect on particle induced effects, suggesting that the protein corona prevented the interaction of the particle surface with cellular components. The protein corona reduced the  $\text{SiO}_2$ -NP induced cytotoxicity, pro-

inflammatory gene expression and the phosphorylation of p38. Thereby the composition of the protein corona was very important since only FCS precoated NPs but not albumin precoated SiO<sub>2</sub> NPs induced the AKT signaling pathway.

In order to avoid changes of the NP properties due to test media, the exposure of airborne NPs at the air-liquid interface (ALI) was used in this study, in cooperation with the Institute of Meteorology and Climate Research. This exposure method should reflect the situation in the lung during inhalation more realistically. Therefore cells were not exposed to NPs under submerged conditions via an aqueous suspension but to a defined generated aerosol of SiO<sub>2</sub>-NPs. In parallel, the applied NP dose was determined by TEM analysis. It could be shown that cells were less sensitive to treatment with SiO<sub>2</sub>-NPs after ALI exposure compared to the submerged conditions in serum-free medium. Although the administered dose under ALI conditions was 5 times higher than under submerged condition a lower toxicity, p38 activation, release of IL-8 and induction of COX-2 was observed. Further investigations have to be performed to elucidate these differences. Possible causes could be a different behavior of the cells, a reduced uptake of the particles or the secretion of surfactant. Surfactant might also bind to the particles as observed for serum proteins and could therefore act protective.

In conclusion, a protective influence of the protein corona on the SiO<sub>2</sub>-NP induced effects was observed which is supposed to be mediated through inhibiting the interaction between the NP surface and the cellular components. Furthermore a specific interaction of the components of the protein corona with a cellular signaling pathway was shown. In addition, it was demonstrated that the conditions of nanoparticle exposure also have an impact on the outcome of toxicity assays and the mode of action of particles. In particular, the reaction of the cells during *air-liquid interphase* exposure has to be further investigated.

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Verwendung von Nanomaterialien .....	1
1.1.1. Titandioxid (TiO <sub>2</sub> ).....	2
1.1.2. Eisenoxid (Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) .....	3
1.1.3. Siliziumdioxid (SiO <sub>2</sub> ) .....	3
1.2. Epidemiologische Studien zum gesundheitsgefährdendem Potenzial von inhalierbaren Partikeln .....	3
1.2.1. Deposition von Partikeln im Organismus .....	4
1.2.2. Mortalität, kardiovaskuläre und pulmonale Erkrankungen durch Partikel aus Verbrennungsprozessen.....	7
1.2.3. Studien zu biologischen Effekten von TiO <sub>2</sub> Nanopartikeln.....	7
1.2.4. Studien zu biologischen Effekten von Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Nanopartikeln .....	8
1.2.5. Studien zu biologischen Effekten von SiO <sub>2</sub> Partikeln.....	9
1.3. Wirkung von Nanopartikeln auf zellulärer und molekularer Ebene .....	10
1.3.1. Anti-oxidative Antwort .....	12
1.3.2. Die angeborene (unspezifische) Immunabwehr .....	14
1.3.3. Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen.....	20
1.3.4. Der Phosphatidylinositol-3-Kinase / AKT-Signalweg.....	21
1.4. Untersuchung der Wirkung von Nanopartikeln mit verschiedenen Expositionsverfahren .....	22
1.4.1. Adsorption von Proteinen aus dem Medium an Nanopartikel.....	23
1.4.2. Untersuchung der Wirkung von Nanopartikeln an der Luft- / Flüssigkeitsgrenzschicht.....	25
1.4.3. Abschätzungen zur Dosimetrie in der Realität und <i>in vitro</i> .....	26
1.5. Zielsetzung der Arbeit.....	27
2. Material und Methoden .....	29
2.1. Chemikalien.....	29
2.2. Partikel .....	30
2.2.1. Herstellung .....	30
2.2.2. Charakterisierung .....	31
2.2.3. Vorbereitung der Partikelsuspensionen für Experimente unter submersen Bedingungen .....	35
2.2.4. Beschichtung von Siliziumdioxid Partikeln mit Proteinen .....	36
2.3. Zellkultur.....	37

2.3.1.	Murine Makrophagen Zelllinie RAW264.7 .....	37
2.3.2.	Humane Lungenepithel Zelllinie A549.....	37
2.3.3.	Einfrieren und Auftauen der Zellen .....	38
2.3.4.	Zellzahlbestimmung.....	38
2.4.	Elektronenmikroskopische Aufnahmestudien.....	39
2.4.1.	Probenvorbereitung und Einbettung in Epoxidharz .....	39
2.4.2.	Herstellung von Ultradünnschnitten und Mikroskopie.....	40
2.5.	AlamarBlue Assay - Zellvitalitätstest .....	40
2.6.	Bestimmung der Membranintegrität anhand des LDH Assays .....	40
2.7.	DCF-Assay zur Ermittlung von reaktiven Sauerstoffspezies .....	41
2.8.	Expressionsanalyse der anti-oxidativen und pro-inflammatorischen Gene.....	41
2.8.1.	Primer Sequenzen .....	43
2.8.2.	mRNA Aufreinigung .....	44
2.8.3.	cDNA Herstellung .....	44
2.8.4.	Qualitätsprüfung der cDNA.....	45
2.8.5.	Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) .....	46
2.9.	Proteinanalyse .....	48
2.9.1.	Antikörper .....	48
2.9.2.	Herstellung eines Gesamtzellextrakts .....	48
2.9.3.	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	49
2.9.4.	Western Blot.....	50
2.9.5.	Detektion mittels ECL (enhanced chemiluminescence).....	51
2.9.6.	Detektion mittels des Odyssey Verfahrens .....	51
2.9.7.	Strippen der Membranen nach ECL-Detektion.....	52
2.9.8.	Detektion der an SiO <sub>2</sub> NP gebundenen Proteine mittels Coomassie Färbung.....	52
2.10.	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	53
2.11.	Exposition von humanen Lungenepithelzellen an der Luft-/ Flüssigkeitsgrenzschicht (ALIDA Experimente).....	54
2.11.1.	ALIDA-Depositionsanlage.....	54
2.11.2.	Herstellung von Aerosolen und Charakterisierung für Experimente an der Luft-/Flüssigkeitsgrenzschicht .....	56
2.11.3.	Vorbereitung und Transport der Zellen .....	57
2.11.4.	Nachbereitung der Zellen im Anschluss an die Exposition .....	58
2.11.5.	Bestimmung der Dosis mittels TEM-Analyse .....	58
3.	Ergebnisse .....	61
3.1.	Charakterisierung der Nanopartikel.....	62

3.2.	Akute Toxizität der Nanopartikel .....	64
3.2.1.	SiO <sub>2</sub> -NP sind selektiv zytotoxisch in Abwesenheit von FCS.....	64
3.2.2.	Die Toxizität von SiO <sub>2</sub> NP ist abhängig von der spezifischen Oberfläche.....	66
3.3.	Aufnahme und Lokalisation von Nanopartikeln in Lungenepithelzellen und Makrophagen.....	69
3.4.	Nanopartikel-induzierte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies .....	72
3.4.1.	Intrazelluläre ROS Bildung.....	72
3.5.	Untersuchung der anti-oxidativen Antwort.....	73
3.5.1.	SiO <sub>2</sub> -NP induzieren HO-1 nur in RAW264.7 Makrophagen .....	74
3.6.	Untersuchung der Induktion von Entzündungsmediatoren .....	76
3.6.1.	Gene der pro-inflammatorischen Antwort werden sowohl in RAW264.7 Makrophagen als auch A549 Zellen hauptsächlich nach SiO <sub>2</sub> Exposition induziert. ....	76
3.6.2.	SiO <sub>2</sub> -NP induzierte Freisetzung von TNF- $\alpha$ erfolgt nur in RAW264.7 Makrophagen.....	79
3.6.3.	SiO <sub>2</sub> -NP induzieren die Freisetzung von IL-8, IL-6 und die Synthese von COX-2 in A549 Zellen in Abwesenheit von FCS. ....	80
3.7.	SiO <sub>2</sub> -NP induzieren die Aktivierung von Mitogen- und Stress-aktivierten Proteinkinasen.....	82
3.8.	Einfluss der Proteinkorona aus Bestandteilen des FCS auf die zelluläre Antwort nach SiO <sub>2</sub> -NP Exposition .....	84
3.8.1.	Adsorption von Serumproteinen an SiO <sub>2</sub> -NP .....	84
3.8.2.	Die Adsorption von Serumproteinen reduziert die SiO <sub>2</sub> -NP induzierte Toxizität in A549 Zellen.....	85
3.8.3.	Die Expression der Gene der pro-inflammatorischen Antwort wird durch die Proteinbeschichtung der SiO <sub>2</sub> -NP reduziert. ....	86
3.8.4.	Die Induktion der COX-2 und die Phosphorylierung der p38 MAP Kinase wird durch die Proteinbeschichtung inhibiert. ....	86
3.9.	FCS Bestandteile aktivieren den PI3K/AKT Signalweg .....	88
3.9.1.	Die Anwesenheit von FCS führt zu konstanter AKT Phosphorylierung.....	88
3.9.2.	Nur die Beschichtung von SiO <sub>2</sub> -NPn mit dem Proteingemisch des FCS bewirkt eine Phosphorylierung von AKT. ....	89
3.10.	Exposition von A549 Zellen mit SiO <sub>2</sub> -NP an der Luft-/ Flüssigkeitsgrenzschicht im Vergleich zu submersen Bedingungen.....	90
3.10.1.	Charakterisierung der SiO <sub>2</sub> -NP Aerosole .....	90
3.10.2.	Akute Toxizität .....	92
3.10.3.	Freisetzung des Entzündungsmediators IL-8.....	93
3.10.4.	Induktion der COX-2 und p38 Phosphorylierung.....	94
4.	Diskussion.....	97

4.1.	Charakterisierung von Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -, TiO <sub>2</sub> - und SiO <sub>2</sub> -NP .....	99
4.2.	Welche Rolle spielen ROS bei der Induktion von toxischen Effekten durch Nanopartikel? .....	100
4.2.1.	TiO <sub>2</sub> -NP lösen keine akute Toxizität trotz Bildung von ROS aus .....	101
4.2.2.	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -NP lösen keine akute Toxizität aus .....	103
4.2.3.	Die Zytotoxizität von SiO <sub>2</sub> -NP ist serumabhängig und korreliert nicht mit der Bildung von ROS .....	104
4.2.4.	SiO <sub>2</sub> -NP induzierte Wechselwirkungen mit inflammatorischen Signalwegen ist serumabhängig .....	105
4.2.5.	Die Aktivierung der Mitogen- und Stress-aktivierten Proteinkinasen ist serumabhängig .....	106
4.3.	Aufnahme und Lokalisation von Nanopartikeln .....	107
4.3.1.	Mechanismen der Zytotoxizität von SiO <sub>2</sub> -NP .....	110
4.4.	Die Proteinkorona wirkt protektiv auf die SiO <sub>2</sub> -NP-induzierte Toxizität in Lungenepithelzellen .....	112
4.4.1.	Die Proteinkorona aus Serumproteinen aktiviert den PI3K/AKT-Signalweg .....	114
4.5.	Modell für die SiO <sub>2</sub> -NP induzierte Toxizität und den protektiven Effekt von Serumproteinen in Lungenepithelzellen .....	115
4.6.	Neue <i>in vitro</i> Methoden verbessern die toxikologische Charakterisierung der NP und ermöglichen die Bestimmung der deponierten Dosis .....	118
	Literaturverzeichnis .....	125
	Abkürzungsverzeichnis .....	145
	Abbildungsverzeichnis .....	147
	Tabellenverzeichnis .....	149

# 1. Einleitung

## 1.1. Verwendung von Nanomaterialien

Die Nanotechnologie ist eine zunehmend wachsende Technologie mit großer wirtschaftlicher Bedeutung. Diese Technologie beschäftigt sich mit Strukturen, die in mindestens einer Dimension zwischen 1-100 nm ( $10^{-9}$ - $10^{-7}$  m) groß sind. Dazu zählen nanoskalige Oberflächenstrukturen und die sogenannten Nanoobjekte wie Nanopartikel (NP), Nanoröhrchen, Nanofasern und Nanoplättchen.

Ein besonderes Merkmal der Nanoobjekte und -strukturen sind die veränderten physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften im Vergleich zu größeren Partikeln und Festkörpern desselben Materials. Dieser Nano-Effekt beruht darauf, dass die Oberfläche eines Partikels im Vergleich zu seinem Volumen und seiner Masse riesig groß wird. Ein hoher Anteil der Gesamtatome eines Partikels befindet sich an der Oberfläche und kann mit seiner Umgebung interagieren. Die hohe Reaktivität der Oberfläche kann bei verschiedenen Verfahren wie der Katalyse von Reaktionen eingesetzt werden. Aber auch andere Effekte kommen im nanoskaligen Bereich zum Tragen und verändern die elektrische Leitfähigkeit, den Magnetismus, die Fluoreszenz, die Härte oder die Festigkeit der Materialien.

Deshalb gewann die Nanotechnologie in den letzten 10 Jahren immer mehr an Popularität unter den Ingenieuren und Materialwissenschaftlern. Durch die Entwicklung dieser Technologie versprach man sich nicht nur ein besseres Verständnis der Materie an sich, sondern vielmehr die Verbesserung von Verfahren und Produkten in allen Bereichen des Lebens, angefangen bei den Dingen des täglichen Gebrauchs über die Elektronik bis hin zu neuen Therapieansätzen in der Medizin. Heutzutage werden Nanoobjekte und Strukturen in vielen Bereichen verwendet. Dazu werden sie entweder auf Oberflächen aufgetragen, als Einzelsubstanz verwendet oder mit anderen Werkstoffen zusammengemischt. Häufig kommen die Nanoobjekte nicht als Primärpartikel (<100 nm) vor, sondern als Aggregate und Agglomerate (>100 nm). Aggregate entstehen aus mehreren Primärpartikeln, die schon während des Herstellungsprozesses durch chemische Bindungen stabil miteinander verknüpft werden. Agglomerate hingegen bestehen aus Einzelpartikeln oder Aggregaten, die durch die schwächeren Van-der-Waals Kräfte zusammengehalten werden, sodass sie mittels verschiedener Verfahren wieder zu Aggregaten zerkleinert werden können (aus DIN ISO/TS 27687:2008). In dieser Form werden sie mit dem Begriff „Nanomaterialien“ bezeichnet.

Die Nanotechnologie verwendet bereits ein breites Spektrum an Substanzen, die schon heute in zahlreichen Produkten eingearbeitet sind. Dazu zählen, um nur ein paar der bekanntesten zu nennen, Kohlenstoff-Modifikationen wie Kohlenstoffnanoröhrchen (Carbon Nanotubes, CNT), Fullerene (sphärische Kohlenstoffgitter) und Industrieruß (Carbon Black),

Quantumpunkte (Quantum Dots) aus z.B. Cadmiumselenid, metallische Nanopulver aus Silber und Metalloxide wie Zinkoxid, Aluminiumoxid, Ceroxid, Eisenoxid, Titandioxid und das Halbmetalloxid Siliziumdioxid. Die Einsatzgebiete für Nanomaterialien sind sehr vielfältig, beispielsweise sind CNTs in Kompositwerkstoffen eingearbeitet, um die Bruchzähigkeit und Festigkeit von Sportgeräten wie Tennis-, Eishockey- oder Baseballschlägern zu erhöhen (BMBF, 2009). Carbon Black wird schon seit vielen Jahren in Autoreifen zur Verbesserung der Straßenhaftung und Haltbarkeit verwendet. Außerdem wird es als Pigment dem Druckertoner beigemischt. Quantum Dots werden aufgrund ihrer optischen Eigenschaften als stabile Fluoreszenzfarbstoffe in der Forschung verwendet und können durch ihre zusätzlichen elektrischen Eigenschaften in Dioden, LEDs und Lasern Anwendung finden. Silbernanopartikel werden aufgrund ihrer antibakteriellen Wirkung mittlerweile in Textilien, Wandfarben, Klarlacken, Kunststoffgehäusen und -verpackungen eingesetzt, um z.B. geruchsfreie Kleidung oder keimhemmende Oberflächen für Operationsbesteck sowie Wundauflagen zu erhalten (BMBF, 2009). Im Folgenden soll nun ausführlicher auf die Metalloxide Titandioxid, Eisenoxid und das Halbmetalloxid Siliziumdioxid eingegangen werden, da sie Gegenstand dieser Studie waren. Sie werden bereits jährlich im Kilotonnenmaßstab produziert und angewendet, stehen jedoch unter Verdacht, ein noch nicht abschätzbares Gesundheitsrisiko darzustellen, welches laut OECD noch zu prüfen ist (OECD, 2010).

### **1.1.1. Titandioxid (TiO<sub>2</sub>)**

TiO<sub>2</sub> wurde schon seit Jahrzehnten als weißes Pigment in Farben, Tabletten, Zahnpasta und sogar in Lebensmitteln als Zusatzstoff E171 eingesetzt, wobei es sich nicht um nanoskaliges TiO<sub>2</sub> handelt (EPA, 2009). Aber auch nanoskalige Titandioxidpulver werden zusammen mit Zinkoxidpulvern bereits seit Jahren in kosmetischen Produkten wie Sonnenschutzmitteln eingesetzt. Durch Absorption der UV-Strahlung durch die nanoskaligen TiO<sub>2</sub>-NP wird die Haut vor der Strahlung geschützt, gleichzeitig erhält man eine farblose Creme, die die Verbraucher als ästhetischer empfinden (Bestak et al., 1995). Daneben besitzt nanoskaliges TiO<sub>2</sub> eine photokatalytische Wirkung, die für die Herstellung von selbstreinigenden und desinfizierenden Oberflächen eingesetzt wird, d.h. durch UV-Strahlen werden die TiO<sub>2</sub> NP angeregt und es entstehen reaktive Sauerstoffspezies, die zur Zersetzung von Schmutzpartikeln führen (Hashimoto et al., 2005). Andere Einsatzgebiete sind Beschichtungen von Fenstern oder Farben für Außenanstriche und Gebäudefassaden für selbstreinigende Oberflächen, von denen Schmutzpartikel leicht mit Wasser abgespült werden können. Allgemein werden zwei Kristallformen, Anatase und Rutil, verwendet, wobei die Kristallstruktur Anatase eine größere photokatalytische Aktivität besitzt als die Kristallstruktur Rutil (Augustynski, 1993).

### 1.1.2. Eisenoxid ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ )

Eisenoxid Nanopartikel können durch zwei Kristallstrukturen unterschieden werden, Magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) und Hämatit ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ). Nanoskaliges Eisenoxid wird in der medizinischen Diagnostik als Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie verwendet (Cho et al., 2010). Außerdem werden beschichtete Eisenoxid-Nanopartikel in der sogenannten Magnetfeld-Hyperthermietherapie (MHT), einer Tumorthherapie, die als erste nanobasierte Therapie europaweit zugelassen wurde, angewendet (Magforce, Jordan et al., 1999). Hierbei werden die Nanopartikel z.B. in einen Gehirntumor injiziert und anschließend durch ein äußeres Magnetwechselfeld in Bewegung versetzt, sodass es zur lokalen Erwärmung auf  $40^\circ\text{C}$  kommt und so die Tumorzellen abgetötet werden. Ein weiteres Anwendungsfeld ist die Trinkwasseraufbereitung, wobei die Eisenoxid-Nanopartikel z.B. zur Bindung und Entfernung von Arsenverbindungen aus dem Trinkwasser dienen (Yavuz et al., 2006).

### 1.1.3. Siliziumdioxid ( $\text{SiO}_2$ )

Siliziumdioxid kann in zwei Formen auftreten, kristallin und amorph. Kristallines  $\text{SiO}_2$  ist ein natürliches, in der Erdkruste sehr häufig vorkommendes Mineral, das  $\alpha$ -Quarz genannt wird und meist pulverförmig als Sand vorkommt. Es hat viele Anwendungsgebiete in der Keramik-, Glas- und Bauindustrie. Zum natürlich vorkommenden amorphen  $\text{SiO}_2$  gehören Kieselgur (Sediment aus fossilen Diatomeenschalen), der Opal und das Kieselglas (durch Blitzeinschläge geschmolzener Sand). Daneben gibt es das synthetisch hergestellte amorphe  $\text{SiO}_2$ , das in zahlreichen Einsatzgebieten in der Industrie vor allem als nanoskaliges  $\text{SiO}_2$  angewendet wird (Napierska et al., 2010). Es wird in Lacken, Druckertonern, Kosmetika, Tabletten und deklariert unter E551 in Lebensmitteln als Zusatzstoff zur Verbesserung der Rieselfähigkeit, durch seine Fähigkeit Feuchtigkeit zu binden, oder als Trägerstoff eingesetzt. Der Einsatz von nanoskaligem  $\text{SiO}_2$  soll zunehmend auch im biomedizinischen Bereich Anwendung finden, so z.B. in der Krebstherapie oder als Transportsystem für Arzneimittelwirkstoffe (engl. *drug-carrier*), die mit Hilfe von NP zielgerichtet in erkranktes Gewebe gebracht werden können (Hirsch et al., 2003, Moghimi et al., 2005). Außerdem wird nanoskaliges  $\text{SiO}_2$  als Transportsystem für DNA für die Gentherapie entwickelt (Ravi et al., 2004, Slowing et al., 2008).

## 1.2. Epidemiologische Studien zum gesundheitsgefährdendem Potenzial von inhalierbaren Partikeln

Trotz der vielversprechenden Anwendungsmöglichkeiten von Nanomaterialien, die bereits existieren oder noch entwickelt werden, ist das Verständnis über die Interaktionen von

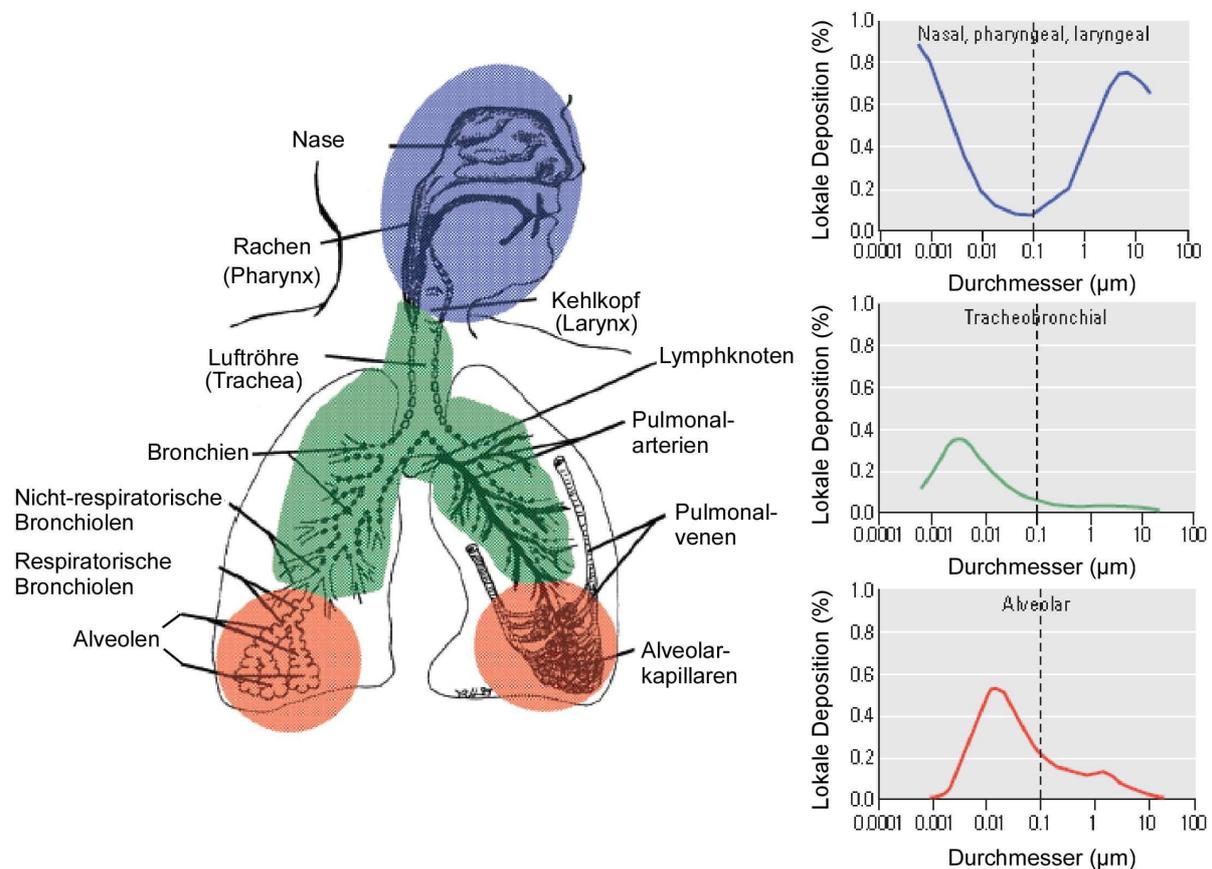
Nanoobjekten mit biologischen Systemen sehr lückenhaft und die Risikoabschätzung für eine eventuelle Gefährdung von Mensch und Umwelt noch nicht abgeschlossen. In vielen Anwendungsgebieten sind die Nanoobjekte in anderen Werkstoffen fest eingebunden und werden kaum freigesetzt. Jedoch kann es durch Abrieb oder bei der Herstellung der Nano-veredelten Werkstoffe zur ungewollten Freisetzung in die umgebende Atemluft kommen. Dies ist vor allem dadurch möglich, weil die meisten Nanoobjekte wie z.B. die Metalloxide in Pulverform hergestellt werden, um sie später weiterzuverarbeiten. Bei eben dieser Verarbeitung können insbesondere Arbeiter mit Nanopartikel Stäuben in Kontakt kommen und sie einatmen. Aus epidemiologischen Studien zu Feinstaub wurden erste Erkenntnisse über die gesundheitsgefährdende Wirkung von Stäuben gewonnen. Feinstaub ist im Gegensatz zu Nanopartikeln ein Gemisch aus unterschiedlich großen Partikeln, sowohl im Mikrometer- als auch im Nanometerbereich, und enthält viele andere Substanzen, wie Übergangsmetalle und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK). Feinstaub kann durch natürliche Verbrennungsprozesse wie Vulkanausbrüche oder Waldbrände in die Luft gelangen, zusätzlich aber gibt es einen zunehmend anthropogenen Ursprung durch Industrie, Straßenverkehr, Heizwerke, Zigarettenrauch, Abfallverbrennungsanlagen, Hausfeuerung und bei der Nahrungsmittelzubereitung.

### **1.2.1. Deposition von Partikeln im Organismus**

Feinstaub (engl. *Particulate Matter*, PM) wird in drei Fraktionen von inhalierbaren Partikeln eingeteilt, die unterschiedlich tief in die Lunge eindringen können. Die Eindringtiefe hängt von der Größe des aerodynamischen Durchmessers der Partikel und von der Anatomie des Atemtrakts ab, der je nach Gesundheitszustand und Alter verändert sein kann. In zahlreichen Studien wurde die Depositionswahrscheinlichkeit von Partikeln mit einem unterschiedlichen aerodynamischen Durchmesser und verschiedener Dichte empirisch ermittelt. Anhand dessen wurde 1994 durch die Internationale Strahlenschutzkommission (*International Commission on Radiological Protection*, ICRP) ein mathematisches Modell herausgegeben, das die Deposition von Partikeln im gesamten Respirationstrakt beschreibt (EPA, 1996). Das Modell sagt voraus, dass bei der Atmung eines gesunden Erwachsenen durch die Nase im Ruhezustand Partikel in Abhängigkeit ihrer Größe in den verschiedenen Bereichen des Respirationstraktes deponieren (Abb. 1). Partikel mit einem Durchmesser kleiner als 10 µm gehören zur PM<sub>10</sub>-Fraktion, die nach Inhalation hauptsächlich im Nasenrachenraum abgeschieden wird. Partikel die kleiner als 2,5 µm sind, gehören zur PM<sub>2,5</sub>-Fraktion und können bis in die Luftröhre und die Bronchien gelangen. Nanoskalige Partikel, die kleiner als 100 nm sind, gehören zur PM<sub>0,1</sub>-bzw. zur ultrafeinen Fraktion (engl. *Ultra Fine Particles*, UFP) und können sogar bis in die Alveolen eindringen, wo der Gasaustausch stattfindet. Für

nanoskalige Partikel muss jedoch noch zusätzlich bedacht werden, dass sie nicht nur in den Alveolen deponieren, sondern auch in den oberen Teilen des Respirationstrakts. Partikel von 1 nm Durchmesser z.B. adherieren sehr schnell an größere Partikel und setzen sich deshalb hauptsächlich im oberen Atemtrakt ab. Dagegen wurde die Wahrscheinlichkeit berechnet, dass 20 nm Partikel zu 50% in den Alveolen deponieren (Abb. 1, (Oberdorster et al., 2005). Es gibt verschiedene Mechanismen in der Lunge, welche die Entfernung der Partikel aus dem Respirationstrakt innerhalb kurzer Zeit ermöglichen. Die Partikel werden aus dem Nasen-Rachenraum durch Ausatmen, Aushusten, Niesen und Verschlucken entfernt. Die Bronchien und Bronchiolen sind mit einem sekretproduzierenden Flimmerepithel ausgekleidet, das mit Hilfe seines Zillenschlags Partikel in den Rachenraum transportiert, die durch Verschlucken und Aushusten des Bronchialsekrets eliminiert werden. Im Bereich der Alveolen hingegen werden die nanoskaligen Partikel kaum aus dem Körper beseitigt. Alveoläre Makrophagen (AM) können sie nur zum Teil aufnehmen und dem bronchialen Reinigungsmechanismus zuführen. Die NP werden deshalb von Lungenepithelzellen aufgenommen, wodurch sie in das Interstitium und anschließend in den Blutkreislauf gelangen können. Durch den Transport im Blutkreislauf können die Partikel im ganzen Körper verteilt werden und in den Organen akkumulieren. Bereits 1977 wurde bei einer Studie mit Ratten festgestellt, dass sich 30 nm Gold Partikel schon nach 30 minütiger Inhalation in den Blutplättchen der Lungenkapillaren befanden (Berry et al., 1977). Seither wurden viele Studien mit Partikeln unterschiedlicher Größe und Beschichtung veröffentlicht, wobei der Mechanismus der Translokation nicht komplett aufgeklärt wurde, es aber Hinweise gibt, dass neben der Aufnahme durch alveoläre Makrophagen die Transzytose von nanoskaligen Partikeln durch das Epithel und Endothel möglich ist. Kato et al. zeigten, dass alveoläre Lungenepithelzellen vom Typ I und II selektiv Lecithin-beschichtete Polystyren Partikel aufgenommen haben (Kato et al., 2003). Durch die Verwendung von unterschiedlichen Inhalationsmethoden und Partikeln wie radioaktiv-markierte Kohlenstoffpartikel ( $^{13}\text{C}$ ) in der Studie von Oberdörster oder radioaktive Iridiumpartikel (20 nm und 80 nm) und Carbon Black in den Studien von Kreyling wurden verschiedene Translokationseffizienzen und Verteilungen ermittelt (Kreyling et al., 2002, Oberdorster et al., 2002, Kreyling et al., 2009). Bei der Exposition von Ratten mit  $^{13}\text{C}$ -NP wurden die Partikel innerhalb von 24 h hauptsächlich in der Leber lokalisiert nach Inhalation und Aufnahme über den Magendarm-Trakt (Putzen des Fells). Iridiumpartikel wurden hingegen intratracheal appliziert, sodass die Aufnahme über den Darmtrakt ausgeschlossen werden konnte und anschließend innerhalb von 24 h in allen Organen wie Leber, Niere, Milz, Herz, Gehirn und sogar im Knochenmark gefunden. Die Translokationseffizienz war dabei sehr gering und lag bei unter 1 % (Kreyling et al., 2002, Kreyling et al., 2009). Auch in einer Langzeitexpositionsstudie wurde gezeigt, dass es zu keiner Akkumulation der Iridiumpartikel

nach einer einmaligen Gabe in den Organen kam (Semmler et al., 2004). Sogar die Aufnahme über den Riechnerv ins Gehirn wurde mit  $^{13}\text{C}$ -NP nach Inhalation gezeigt (Oberdorster et al., 2004).



**Abb. 1 Lokale Depositionswahrscheinlichkeiten im Atemtrakt für Partikel mit unterschiedlichen aerodynamischen Durchmessern (nach Oberdorster et al., 2005)**

Die Zunahme der Nanotechnologie wird dazu führen, dass Nanopartikel auch auf anderen Wegen als der Inhalation in den Körper gelangen können, wie z.B. durch Nahrungsmittel sowie durch das Verschlucken des Bronchialsekrets in den Gastrointestinaltrakt (GIT) (Hoet et al., 2004). Die Injektion von Kontrastmitteln oder Therapeutika bringt die Nanopartikel sogar direkt in den Blutkreislauf, sodass die Partikel im ganzen Körper verteilt werden und z.T. in der Leber akkumulieren (Lunov et al., 2010). Mögliche Folgen können noch nicht abgeschätzt werden. Aber bislang zeigte zumindest keine Studie, dass Nanopartikel aus Sonnencremes etc. durch die gesunde Haut des Menschen in den Körper gelangen können, was jedoch bei verletzter Haut nicht komplett ausgeschlossen werden kann (Pinheiro et al., 2007, EPA, 2009). Die Aufnahme von nanoskaligen Partikeln über den GIT ist noch nicht so gut untersucht. Eine Studie zeigte z.B., dass nanoskalige Kupferpartikel nach einmaliger oraler Gabe die Leber, die Milz und die Nieren stärker schädigen konnten als mikroskalige Kupferpartikel (Chen et al., 2007).

### 1.2.2. Mortalität, kardiovaskuläre und pulmonale Erkrankungen durch Partikel aus Verbrennungsprozessen

Seit den 1970er Jahren wurden zahlreiche epidemiologische Studien in den USA und Europa durchgeführt, um herauszufinden, ob es einen Zusammenhang zwischen Luftverschmutzung, z.B. wie Feinstaubemissionen, und dem Gesundheitszustand der exponierten Bevölkerung gibt. Dabei zeigte sich, dass eine kurzfristige Erhöhung der Werte für  $PM_{2,5}$  in der Luft um  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  eine Zunahme des Mortalitätsrisikos von ca. 1 % verursacht (zusammengefasst bei (Pope and Dockery, 2006)). Zusätzlich wurde eine Zunahme der Krankenhausaufenthalte durch Herz-Kreislaufkrankungen und chronischen Lungenerkrankungen bei Älteren und bereits vorerkrankten Menschen festgestellt (Samet et al., 2000, Zanobetti et al., 2000, Schwartz, 2001). Zudem wurde beobachtet, dass eine kurzzeitig erhöhte Exposition zu einer Erhöhung der Herzinfarktrate führen konnte (Peters et al., 2001, Schwartz et al., 2003). Bei erhöhten  $PM_{2,5}$  Konzentrationen in der Atemluft wurde eine Verkürzung der Lebenserwartung berechnet, insbesondere durch die Zunahme von Herzkreislauf-Erkrankungen und Lungenkrebs (Pope et al., 2002, Pope et al., 2004, Stolzel et al., 2007). Weitere Folgen können eine Verschlimmerung von Erkrankungen der unteren Atemwege (z.B. COPD – *chronic obstructive pulmonary disease*) (Sunyer et al., 2000, Pope et al., 2004) und eine verminderte Lungenfunktion sein (Dockery et al., 1996). Durch verschiedene Beobachtungen werden mögliche Mechanismen für die Partikel-induzierten Gesundheitseffekte postuliert. Partikel lösen nicht nur eine lokale Inflammation in der Lunge aus, sondern haben auch systemische Auswirkungen in Form einer Erhöhung von Zytokinen, Leukocyten und Blutplättchen im Blutkreislauf (van Eeden et al., 2001, van Eeden and Hogg, 2002). In Folgedessen nehmen typische Risikofaktoren, die mit Herz-Kreislaufkrankungen einhergehen, zu. Dazu zählen erhöhte Plasmapviskosität durch Fibrinogen-Aktivierung (Peters et al., 1997, Schwartz, 2001), Progression von Arteriosklerose (Kunzli et al., 2005, Kunzli et al., 2010) und Blut Hochdruck (Ibald-Mulli et al., 2001).

Aufgrund der negativen Gesundheitseffekte von Feinstaub gelten seit dem 01.01.2005 europaweit einheitliche Grenzwerte für  $PM_{10}$  (Feinstaub). Der Tagesgrenzwert beträgt  $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$  und darf nicht öfter als 35-mal im Jahr überschritten werden. Der Jahresmittelwert darf nicht über  $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$  liegen (Umweltbundesamt).

### 1.2.3. Studien zu biologischen Effekten von $TiO_2$ Nanopartikeln

Für  $TiO_2$  Nanopartikel sind bislang keine negativen Folgen für den Menschen bekannt, jedoch wurden zahlreiche *in vivo* und *in vitro* Studien veröffentlicht, die

Entzündungsreaktionen nach TiO<sub>2</sub>-NP Exposition zeigen. So konnte nach Partikelinstillation in Ratten beobachtet werden, dass nanoskalige TiO<sub>2</sub> Partikel (<100 nm) eine Infiltration der Lunge durch neutrophile Granulozyten und die Schädigung des Lungenepithels auslösen (Renwick et al., 2004) und sogar die Luft-Blutsschranke passieren können (Ferin et al., 1992). Außerdem wurde eine Verbindung zwischen der Freisetzung von ROS durch die photokatalytischen Eigenschaften der nanoskaligen TiO<sub>2</sub>-NP und der Induktion der Toxizität durch Zunahme von oxidativem Stress (Afaq et al., 1998, Jin et al., 2008) und der Induktion von Entzündungsmediatoren nachgewiesen (Kang et al., 2008, Park et al., 2008). Hierbei zeigte sich, dass die Kristallstruktur (Sayes et al., 2006, Wahrheit et al., 2007) und die Oberflächendosis (Sager et al., 2008) eine Rolle spielen. Ein genotoxisches Potenzial von nanoskaligem TiO<sub>2</sub> wurde hauptsächlich in *in vitro* Studien demonstriert und hängt vermutlich mit der photokatalytischen Aktivität (Dunford et al., 1997, Nakagawa et al., 1997, Gurr et al., 2005, Karlsson et al., 2008) und der inflammatorischen Wirkung (Driscoll et al., 1997) der NP zusammen. Trotz der vielen Studien konnte das Gesundheitsrisiko durch TiO<sub>2</sub>-NP bislang nicht abschließend beurteilt werden, da die Effekte in den Studien nicht gleichermaßen ausgeprägt waren. Außerdem waren die Effekte oft von den experimentellen Bedingungen wie der Zelllinie, Spezies, UV-Bestrahlung, Dosis und Aggregation abhängig (Johnston et al., 2009). Beispielsweise korrelierte nicht immer die Zytotoxizität mit der Generierung von ROS und DNA-Schädigung (Karlsson et al., 2008). In zwei Studien wurden Zytotoxizität bzw. DNA-Schädigung erst nach UV-Bestrahlung der Partikel beobachtet (Cai et al., 1992a, Nakagawa et al., 1997) in einem anderen Fall konnte erst die Applikation einer hohen Dosis Entzündungsreaktionen auslösen (Renwick et al., 2004).

#### **1.2.4. Studien zu biologischen Effekten von Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanopartikeln**

Generell ist aus Studien zu Feinstaub bekannt, dass Übergangsmetalle wie Eisen, Kupfer, Nickel, Vanadium und Kobalt dazu beitragen, dass es zu negativen gesundheitlichen Effekten kommt. Bei Eisenoxidnanopartikeln können freigesetzte Fe<sup>2+</sup>-Ionen die Bildung von Hydroxylradikalen durch die Fenton-Reaktion katalysieren, die wiederum mit zellulären Makromolekülen wie DNA und Proteinen interagieren und ihre Struktur zerstören können. Daraus ergeben sich mögliche Gefahren, die durch Hämatit- (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) und Magnetit- (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) Nanopartikel ausgelöst werden können. Bislang gibt es nicht sehr viele Studien, die sich mit der biologischen Aktivität von nanoskaligen Eisenoxidpartikeln beschäftigen. Die intravenöse Gabe von Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NP in Mäusen zeigte, dass die Partikel sich in verschiedenen Organen wie Leber und Nieren anreichern können (Lunov et al., 2010). Grundsätzlich wird die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) als Mechanismus für Toxizität, DNA Schädigung und

Inflammation diskutiert (Brunner et al., 2006, Apopa et al., 2009, Karlsson et al., 2009, Konczol et al., 2011).

### 1.2.5. Studien zu biologischen Effekten von SiO<sub>2</sub> Partikeln

Silikose ist eine seit Jahrzehnten bekannte Berufskrankheit von Arbeitern in den steinverarbeitenden Berufen und im Bergbau, die durch die langjährige Inhalation von kristallinem SiO<sub>2</sub> (Quarz und Kristoballit) verursacht wird. Dabei gelangen die inhalierbaren Partikel bis tief in die unteren Atemwege und akkumulieren dort. Hierbei kommt es zu einer persistierenden Entzündungsreaktion durch alveoläre Makrophagen, die sich dann zu einer Lungenfibrose ausweitet, d.h. zur Zerstörung des Lungenepithels. Es entstehen sogenannte Granulome, knotenartigen Vernarbungen, die aus kollagenhaltigem Bindegewebe bestehen, die konzentrisch um die staubhaltigen Makrophagen gebildet werden (Reiser et al., 1982). Außerdem wurde in einer Studie die Exposition von kristallinem SiO<sub>2</sub> mit der Entstehung von COPD, Tuberkulose und Lungenkrebs assoziiert (Calvert et al., 2003). Auch andere Lungenerkrankungen wie chronische Bronchitis, Bildung von Lungenemphysemen und Atemnot werden durch kristallines SiO<sub>2</sub> induziert (Hnizdo and Sluis-Cremer, 1993). In einigen epidemiologischen Studien wurde die kanzerogene Wirkung von kristallinem SiO<sub>2</sub> (Quarz und Kristoballit) bereits nachgewiesen (Goldsmith et al., 1982), weshalb Quarz und Kristoballit seit 1997 von der *International Agency for Research on Cancer* (IARC) als kanzerogen eingestuft werden (IARC, 1997).

Für die Wirkung von amorphen SiO<sub>2</sub> Partikel gibt es bislang kaum epidemiologische Studien. Diese Studien zeigen, dass amorphes SiO<sub>2</sub> nicht das gleiche toxische und kanzerogene Potential hat wie kristallines SiO<sub>2</sub>. Dennoch löste Staub aus amorphem SiO<sub>2</sub> bei Arbeitern fibrotische Veränderungen in der Lunge aus (Vitums et al., 1977). Jedoch sind die meisten anderen Studien wie z.B. bei Arbeitern im Kieselgurabbau nicht leicht zu beurteilen, da die Stäube oft Verunreinigung durch kristallines SiO<sub>2</sub> beinhalten, die die Effekte in der Lunge beeinflussen (Merget et al., 2002). Im Gegensatz zu kristallinem SiO<sub>2</sub> zeigten *in vivo* Studien, dass die Inhalation von amorphen SiO<sub>2</sub> Partikeln zu einer reversiblen Entzündungsreaktion in der Lunge führte (Johnston et al., 2000, Arts et al., 2007). Zwar wurde die Entstehung von Granulomen und Lungenemphysemen beobachtet, aber die Exposition führte nicht zur Entstehung von Lungenfibrose (Reuzel et al., 1991, Lee and Kelly, 1992). Deshalb liegen die Werte in Deutschland für die maximale Arbeitsplatzkonzentration bislang noch ziemlich hoch bei 4 mg/m<sup>3</sup>. Dennoch gibt es immer mehr Studien, die zytotoxische und pro-inflammatorische Wirkung *in vitro* nachweisen (Napierska et al., 2009, Rabolli et al., 2010, Sohaebuddin et al., 2010).

Ein Wirkmechanismus für die kanzerogene und fibrotische Aktivität von kristallinem SiO<sub>2</sub> ist die Bildung von ROS und oxidativer Stress (Fubini and Hubbard, 2003). Für amorphe

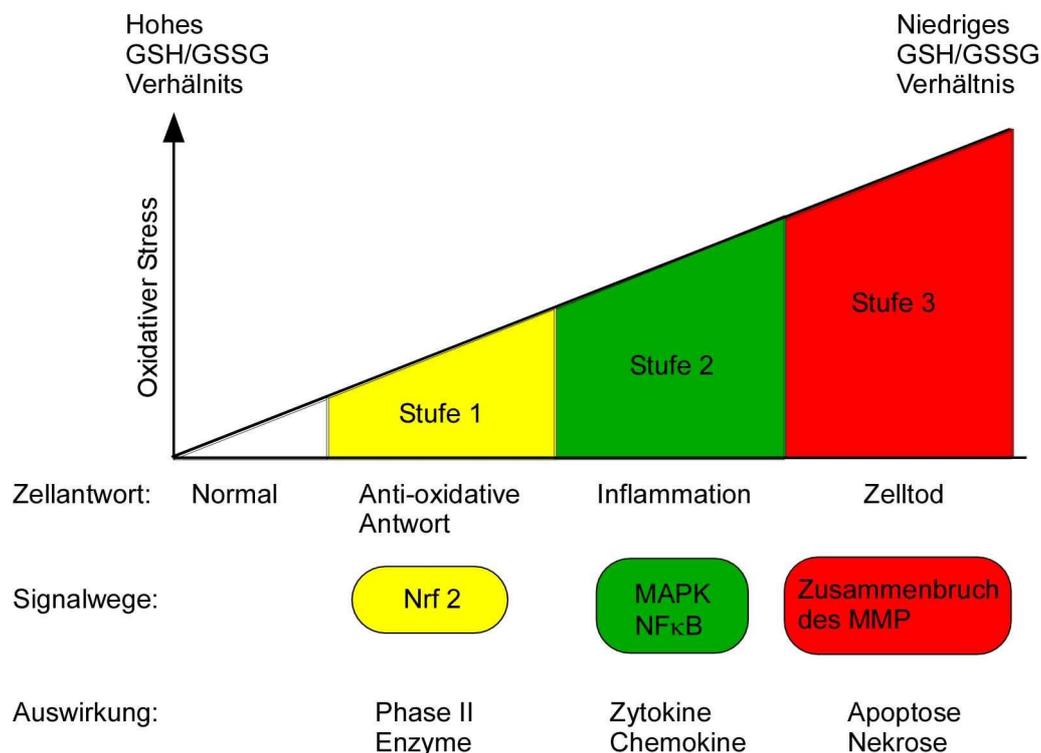
SiO<sub>2</sub>-NP ist der Wirkmechanismus jedoch noch nicht aufgeklärt. Bislang zeigten Studien, dass SiO<sub>2</sub>-NP einen hämolytischen Effekt bewirken, der auf einer Interaktion der Silanol-Gruppen auf der Oberfläche der SiO<sub>2</sub>-NP mit der Membran basiert (Pandurangi et al., 1990, Murashov et al., 2006). Diesen Effekt gibt es auch bei kristallinem SiO<sub>2</sub>, er ist jedoch schwächer ausgeprägt. Inwieweit die Porosität, die Oberflächenzusammensetzung oder die Löslichkeit eine Rolle für die Toxizität spielen, ist noch nicht hinreichend untersucht (Napierska et al., 2010).

### **1.3. Wirkung von Nanopartikeln auf zellulärer und molekularer Ebene**

Derzeit gibt es noch keine abschließende Risikoabschätzung für Nanomaterialien wie für Feinstaub oder Quarz. Für die meisten Nanomaterialien gibt es noch keine Daten aus epidemiologischen Studien, dennoch müssen Untersuchungen durchgeführt werden, die eventuelle gesundheitliche Folgen durch die Verwendung von Nanomaterialien im Vorfeld abschätzen. Dazu eignen sich am besten *in vivo* und *in vitro* Studien, da unter kontrollierten Bedingungen mit den einzelnen Substanzen gearbeitet werden kann, ohne dass der Einfluss von Lebensumständen oder Verunreinigungen eine Rolle spielt, was bei epidemiologischen Studien der Fall ist. Nur anhand dieser Studien können Wirkmechanismen der unterschiedlichen Nanoobjekte im Einzelnen untersucht und aufgeklärt werden. Insbesondere sind geeignete *in vitro* Methoden notwendig, um die Wirkung von Nanopartikeln auf zellulärer und molekularer Ebene zu untersuchen.

Die Lunge ist eines der wichtigsten Zielorgane für feine und nanoskalige Partikel, da sie einerseits als Barriere bzw. Eingangspforte dient und andererseits der erster Ort der Interaktion von Partikeln mit einem biologischen System ist. Alveolarmakrophagen und Lungenepithelzellen geraten dabei in den direkten Kontakt mit den Partikeln und lösen lokal Entzündungsreaktionen aus. Die alveolären Makrophagen gehören zur angeborenen (unspezifischen) Immunabwehr, d.h. sie können Fremdstoffe wie Bakterien, Zelltrümmer und Partikel erkennen, phagozytieren und eliminieren. Auch Lungenepithelzellen sind ein Teil der unspezifischen Immunabwehr, da sie eine physische Barriere gegenüber der Außenluft darstellen. Bei Kontakt mit Krankheitserregern oder Partikeln können beide Zelltypen Entzündungsmediatoren wie Prostaglandine und Zytokine freisetzen. Diese werden ins umliegende Gewebe sezerniert und im Gefäßsystem transportiert, um andere Immunzellen zum Entzündungsort zu rekrutieren und die Permeabilität der Gefäße sowie die Plasmaviskosität zu verändern. Dieser Abwehrmechanismus kann jedoch bei chronischer Aktivierung zur lokalen Schädigung des Gewebes (Emphysem, Fibrose) sowie zu systemischen Veränderungen des Herz-Kreislaufsystems führen. Dabei spielt vermutlich oxidativer Stress als möglicher Mechanismus bei der Entstehung der Partikel-induzierten

Inflammation eine wichtige Rolle. Dieser Zusammenhang konnte in einigen Studien für Feinstaub, Dieselrußpartikel (Li et al., 2002b, Riedl and Diaz-Sanchez, 2005), kristallines SiO<sub>2</sub>- und TiO<sub>2</sub>-Nanopartikel nachgewiesen werden, da diese Partikel in hohem Maße ROS und oxidativen Stress durch ihre reaktive Oberfläche induzieren können (s. Kap 1.2). Deshalb wurde von Nel und Kollegen die Hypothese aufgestellt, dass Nanopartikel-induzierter oxidativer Stress auf zellulärer Ebene einen mehrstufigen Prozess auslöst (Abb. 2, (Nel et al., 2006)). Um Schädigungen entgegenzuwirken, wird zunächst die anti-oxidative Antwort über den Nrf2-Signalweg induziert, wobei Phase II Enzyme gebildet werden und unter anderem der Glutathionlevel (GSH) erhöht wird (Stufe 1). Eine Zunahme des oxidativen Stresses induziert über MAPK- und NFκB-Signalwege eine pro-inflammatorische Antwort, die sich in der Induktion von Zytokinen und Chemokinen äußert (Stufe 2). Bei Überforderung der protektiven Schutzmechanismen (hoher Glutathion-disulfid-Level (GSSG)) durch eine zu starke Zunahme des oxidativen Stresses kann dies zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) und zum Zelltod (Apoptose und Nekrose) führen (Stufe 3).



**Abb. 2 Die Hierarchie der Partikel-induzierten Stressantworten**

Oxidativer Stress löst intrazelluläre Signalkaskaden aus, die zunächst die anti-oxidative Antwort zum Schutz der Zelle aktivieren (Stufe 1). Bei dauerhaftem oder zunehmenden oxidativem Stress werden weitere Signalkaskaden aktiviert, die die Bildung von Entzündungsmediatoren induzieren (Stufe 2). Falls die Exposition jedoch die zellulären Schutz- und Reparaturmechanismen übersteigt, führt dies zu irreversibler Schädigung der Zellbestandteile, was letztendlich zum Zelltod führt (Stufe 3). (GSH: Glutathion, GSSG: Glutathiondisulfid).

### 1.3.1. Anti-oxidative Antwort

Reaktive Sauerstoffspezies wie das Superoxidanion ( $\text{O}_2^-$ ), das Hydroxylradikal ( $\text{OH}^\cdot$ ), sowie reaktive Stickstoffspezies wie Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) besitzen eine sehr hohe chemische Reaktivität. Sie entstehen als Nebenprodukt beim Ablauf enzymatischer Prozesse (Xanthin-Oxidase, NO-Synthase) und während der Atmungskette in den Mitochondrien (NADH-Dehydrogenase, Cytochrom  $\text{bc}_1$ -Komplex) bei der Energiegewinnung in Form von ATP (Turrens and Boveris, 1980, Sugioka et al., 1988, Palmer et al., 1992, Berry and Hare, 2004). Außerdem können Immunzellen wie Makrophagen und neutrophile Granulozyten ROS zur Abwehr und Zerstörung von Bakterien produzieren (NADPH-Oxidase, NO-Synthase) (Forman and Torres, 2002).

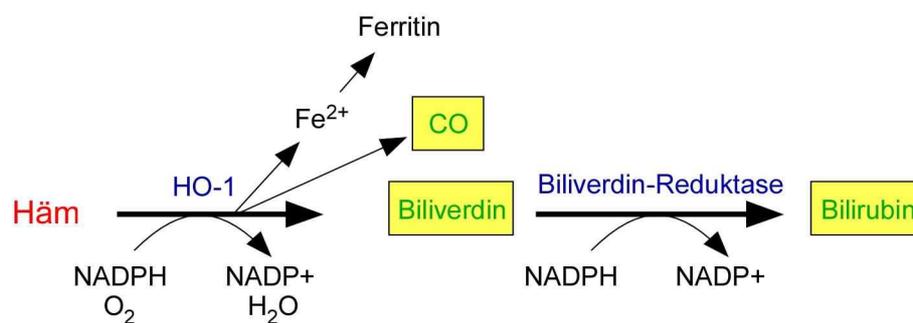
Um sich vor Schäden zu schützen, haben die Zellen als Schutz-mechanismus die anti-oxidative Antwort entwickelt. Dazu zählen Enzyme wie die Superoxid-dismutase, die das Superoxidanion ( $\text{O}_2^-$ ) zu Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) umwandelt. Des Weiteren gehören die Phase II Enzyme zur anti-oxidativen Antwort, wie die Hämoxxygenase I (HO-1), die NADPH-Oxidoreduktase (NQO1) und die  $\gamma$ -Glutamat-Cystein-Ligase ( $\gamma$ GCL). Zusätzlich bilden Zellen das Antioxidanz Glutathion, das die Radikale zur ersten Abwehr abfängt.

Die Bildung der Enzyme HO-1, NQO1 und  $\gamma$ GCL wird durch den Transkriptionsfaktor Nrf2 (*NF-E2 related factor*) reguliert. Nrf2 liegt im Zytoplasma in seiner inaktiven Form vor und transloziert erst nach Stimulation durch oxidativen Stress in den Nukleus. Inaktiviert wird Nrf2 durch die Bindung an den Inhibitor Keap-1 (*Kelch-like erythroid CNC homologue ECH-associated protein 1*), der am Zytoskelett gebunden ist (Itoh et al., 1999). Dadurch wird Nrf2 ubiquitinyliert und anschließend proteasomal degradiert (Kobayashi et al., 2004). Erst durch die Reduktion der Sulfhydrylgruppen an den Cysteinen von Keap-1 durch oxidativen Stress wird Nrf2 freigesetzt. Auf diese Weise ist der Keap-1/Nrf2 Komplex ein direkter Sensor für oxidativen Stress in der Zelle. Nrf2 dimerisiert und bindet zusammen mit weiteren Faktoren im Zellkern an die ARE-Sequenz (*antioxidant response element*) in der Promotor Region der Phase II Enzyme codierenden Gene (Dinkova-Kostova et al., 2002, Li et al., 2006).

#### Hämoxxygenase-1 (HO-1)

Es gibt drei verschiedene Hämoxxygenasen HO-1, -2 und -3. HO-2 und -3 werden konstitutiv in allen Geweben exprimiert. Dagegen muss die HO-1 Transkription erst durch verschiedene Stress-Stimuli induziert werden. Dazu zählen ROS, Häm, UV-Strahlung, Schwermetalle, Prostaglandine und Endotoxine (Otterbein and Choi, 2000). Die HO-1 ist für die Umsetzung des Häms verantwortlich, dessen Abbauprodukte, Biliverdin und Bilirubin, ROS neutralisieren

können. Dabei ist die Hämoxigenase am ersten Abbauschritt beteiligt (Abb. 3), wobei das Häm zu freiem Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ), Kohlenstoffmonooxid (CO) und Biliverdin umgesetzt wird. Die Eisen-Ionen werden sofort durch Ferritin gebunden. Biliverdin wird mittels der Biliverdin-Reduktase zu Bilirubin reduziert (Docherty et al., 1984, Itano and Hirota, 1985, Weng et al., 2003). Zusätzlich zur anti-oxidativen Funktion von Biliverdin und Bilirubin induziert die Freisetzung von CO protektive Mechanismen. Einerseits fördert CO in bestimmten physiologischen Mengen die Vasodilatation durch cGMP, andererseits hat es eine anti-inflammatorische Wirkung durch die Inhibition der MAP Kinase Signalwege (Morse et al., 2003).



**Abb. 3 Abbau des Häms durch die Hämoxigenase-1**

### $\gamma$ -Glutamat-Cystein-Ligase ( $\gamma$ GCL)

Die  $\gamma$ -Glutamat-Cystein-Ligase ist ein Heterodimer und besteht aus einer katalytischen ( $\gamma$ GCLC) und einer modulierenden ( $\gamma$ GCLM) Untereinheit. Die  $\gamma$ GCL katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Neusynthese von Glutathion, wobei Glutathion eines der wichtigsten Antioxidantien der Zelle darstellt (Anderson, 1998). Glutathion (GSH) ist ein Peptid aus den drei Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin. GSH schützt die Zelle nicht nur vor oxidativem Stress sondern ist auch an der Biotransformation von Xenobiotika beteiligt. Bei der Oxidation der Thiolgruppe (-SH) des Cysteins, z.B. durch ROS, entsteht aus zwei GSH das Glutathiondisulfid (GSSG). Dieses kann anschließend durch Reduktion wieder regeneriert werden (Thomas et al., 1995). Bei oxidativem Stress sinkt zunächst die GSH Menge, wodurch die Biosynthese von GSH mittels  $\gamma$ GCL wieder angekurbelt wird. Dies wird einerseits durch eine erhöhte Aktivität der  $\gamma$ GCL (Richman and Meister, 1975) und andererseits durch die Hochregulierung der  $\gamma$ GCL mRNA bewerkstelligt (Tian et al., 1997).

### NADPH-Chinon-Oxidoreduktase (NQO1)

Die NQO1 ist ein anti-oxidativ wirkendes Protein, das in allen Geweben, insbesondere im Epithel und Endothel, exprimiert wird (Siegel and Ross, 2000). Die Expression kann zusätzlich durch ionisierende und UV-Strahlung induziert werden (Boothman et al., 1993, Agrawal et al., 2001). NQO1 ist ein Homodimer und katalysiert NADPH-abhängig die Reduktion von extrazellulären Quinonen, z.B. aus Dieselruß (Xia et al., 2004), und intrazellulären Chinonen, die bei der Detoxifikation von ROS aus Vitamin E (Siegel et al., 2004) und Coenzym Q10 (Beyer et al., 1996) entstehen. Dabei werden die weniger reaktiven Hydrochinone generiert, die ausgeschieden werden können. Einerseits wird die zytoprotektive Wirkung von NQO1 direkt durch die Neutralisation von Chinonen und die Neutralisation des Superoxidanions vermittelt (Ross, 2004). Andererseits hat die NQO1 eine tumorhemmende Wirkung durch die Stabilisierung des Transkriptionsfaktors und Tumorsuppressors p53 (Asher et al., 2001).

## **1.3.2. Die angeborene (unspezifische) Immunabwehr**

### Regulation der Signaltransduktion

Die Elimination von Partikeln oder Krankheitserregern in der Lunge geschieht über die angeborene Immunabwehr. Dazu exprimieren alveoläre Makrophagen und Epithelzellen auf ihrer Oberfläche oder intrazellulär spezielle Rezeptoren, die konservierte mikrobielle und virale Strukturen, sogenannte PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) spezifisch erkennen. Zu diesen Rezeptoren gehören die sogenannten Toll-like Rezeptoren, NOD-like Rezeptoren und RIG-like Rezeptoren. Die Toll-like Rezeptor (TLR) Familie besteht aus 10 Rezeptoren. Dabei befinden sich TLR1, 2, 4-6 und 10 in der Zellmembran und TLR3 und 7-9 in der lysosomalen und endosomalen Membran. Sie bestehen aus einer zytoplasmatischen Domäne (TIR, Toll/IL1 Rezeptor Homolog), die für die Signalweitergabe zuständig ist, und aus einer Leucin-reichen Liganden-Bindedomäne.

Die Aktivierung dieser Rezeptoren erfolgt nach Bindung eines Liganden, die zur Dimerisierung mit anderen Rezeptoren der Toll-like Familie führt. TLR2 und TLR4 sind für die Erkennung von Zellwandkomponenten von Mikroorganismen zuständig. TLR2 erkennt z.B. Komponenten der Zellwand von Hefen oder gram-positiven Bakterien wie z.B. das Peptidoglykan. TLR4 erkennt das Lipopolysaccharid (LPS), den Hauptbestandteil der Zellwand von gram-negativen Bakterien. TLR3, TLR7/8 und TLR9 binden Nukleinsäuren von z.B. viraler Herkunft (Rohmann et al., 2011). NOD-like Rezeptoren (NLR) sind im Zytoplasma lokalisiert und auch für die Erkennung von bakteriellen Zellwandkomponenten wie LPS

verantwortlich. Sie wirken unabhängig von den Toll-like Rezeptoren und bestehen aus 3 Domänen. Die Erkennung erfolgt über die Leucin-reiche Liganden-Bindedomäne.

Nach Bindung des Liganden führt die Oligomerisierung des Rezeptors mittels der NACHT-Domäne unter ATP-Verbrauch zur Aktivierung. Anschließend erfolgt die Signal-transduktion mittels der Effektordomäne, die mit den Adaptorproteine wie der (Pro-) Caspase-1 und ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing CARD*) interagiert. Zusammengenommen wird dieser Multiproteinkomplex als das Inflammasom bezeichnet (Petrilli et al., 2007).

Die Signaltransduktion von Toll-like Rezeptoren erfolgt über die Rekrutierung mehrerer Adaptorproteine, unter anderem auch MyD88 (myeloid differentiation factor 88, nicht bei TLR3), die an die zytoplasmatische TIR-Domäne des Rezeptors binden. Daraufhin erfolgt die Aktivierung der Kinase IRAK4 (*IL-1 receptor associated kinase*), die eine Phosphorylierungskaskade der Kinasen IRAK1 und IRAK2 in Gang setzt. Dies führt zur Aktivierung von TRAF-6 (*TNF receptor-associated factor*), TAK-1 (*TGF- $\beta$ -activated kinase*) und IKK (*Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase*). IKK phosphoryliert den inhibitorischen Regulator I $\kappa$ B (*Inhibitor of nuclear factor kappa-B*), der am Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-B*) gebunden ist. Durch die Phosphorylierung löst sich I $\kappa$ B von NF $\kappa$ B ab und wird nach Polyubiquitinylierung im Proteasom abgebaut. NF $\kappa$ B transloziert dann in den Kern, wo es die Transkription von pro-inflammatorischen Genen aktiviert. Gleichzeitig wird auch eine andere Signalkaskade durch die Kinasen IRAK-4 und TAK-1 induziert.

Über eine weitere Phosphorylierungskaskade der MAP3 Kinasen werden die Mitogen-aktivierten Protein Kinasen p38 und JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) aktiviert. Diese aktivieren den Transkriptionsfaktor AP-1 (*activating protein-1*), der auch die Transkription der pro-inflammatorischen Gene induziert. Zudem unterstützen sie die NF $\kappa$ B induzierte Genexpression durch Phosphorylierung weiterer Kinasen, die die Stabilität und Translation dieser mRNAs fördern (Gaestel, 2006). Über die zytoplasmatischen NLR-Rezeptoren können die beiden Signalwege NF $\kappa$ B und MAPK ebenfalls induziert werden. Dies erfolgt über die Rekrutierung von RICK (*RIP-like interacting CLARP kinase*) an den Rezeptor.

Zu den pro-inflammatorischen Genen, die über NF $\kappa$ B und die MAPK Signalwege reguliert werden, gehören die Proteine Cyclooxygenase-2 (COX-2) und induzierbare NO Synthase (iNOS), die Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ ) sowie Zelladhäsionsmoleküle. Neben der Aktivierung durch mikrobielle und virale Bestandteile wurde in zahlreichen Studien bereits gezeigt, dass auch Feinstaub, nanoskalige Partikel, ROS, UV-Strahlung und Wachstumsfaktoren diese Signalkaskaden aktivieren können. Der Wirkmechanismus ist für Partikel jedoch noch nicht aufgeklärt. Es ist noch nicht bekannt, ob dabei Rezeptoren als

Sensor für die Partikel eine Rolle spielen oder nur die Generierung von ROS für die Initiierung der Signalkaskade notwendig ist.

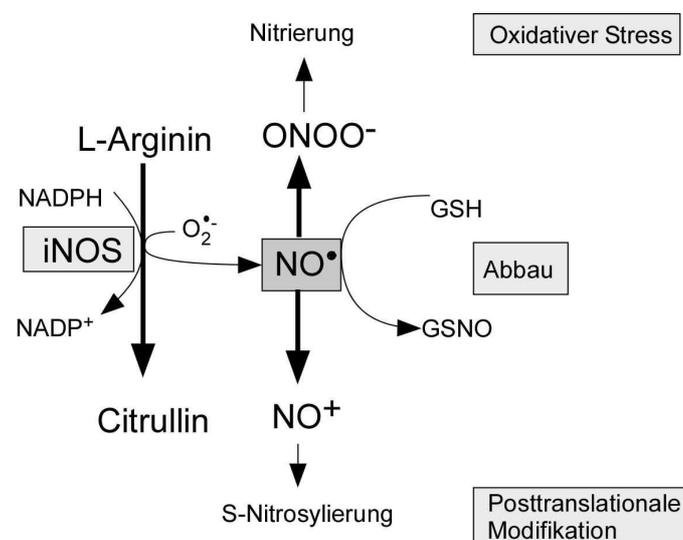
### Cyclooxygenasen

Es sind zwei Isoformen von Cyclooxygenasen bekannt: COX-1 und COX-2. Sie sind für den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Herstellung von Prostaglandinen zuständig. Sie katalysieren die Umwandlung von Arachidonsäure zu dem Prostaglandinvorläufer PGG<sub>2</sub> und PGH<sub>2</sub> (Rouzer and Marnett, 2008). Dabei werden zunächst zwei Sauerstoffatome auf die Arachidonsäure durch die Dioxygenaseaktivität übertragen, anschließend durch die Peroxidaseaktivität aus PGG<sub>2</sub> das PGH<sub>2</sub> gebildet. PGH<sub>2</sub> wird mittels weiterer Enzyme zu Prostaglandinen und Thromboxanen umgewandelt. Prostaglandine und Thromboxane aus der Arachidonsäure sind Mediatoren für die Entzündungsreaktion. Sie sind an der Entstehung von Schmerz, der Verengung von Gefäßen und Verstärkung der Blutgerinnung beteiligt. Die COX-1 wird konstitutiv in den meisten Geweben des Körpers exprimiert, dagegen ist die Expression von COX-2 eher transient und wird bei Stimulation während einer Entzündungsreaktion hochreguliert. Im Gehirn, der Niere und in den weiblichen Fortpflanzungsorganen wird die COX-2 auch konstitutiv exprimiert (Smith and Bell, 1978, Van Voorhis et al., 1990). Die Hemmung von COX-2 trägt dazu bei, dass die Entzündungsreaktion unterdrückt wird. Deshalb werden zur Behandlung von Schmerz, Fieber und Entzündungen die sogenannten nicht-steroidalen Antiphlogistika (*non-steroidal anti-inflammatory drugs*, NSAID) wie z.B. Aspirin eingesetzt, die die Hemmung der Cyclooxygenasen verursachen (Vane, 1971). Neben der physiologischen Wirkungsweise bei Entzündungen spielt die COX-2 eine besondere Rolle in Tumoren durch ihren Einfluss auf die Tumorigenese, Apoptose, Karzinogen-Aktivierung und Angiogenese (Ghosh et al., 2010). In epidemiologischen Studien wurde gezeigt, dass die regelmäßige Einnahme von Aspirin das Risiko, an verschiedenen Krebsarten zu erkranken, reduzieren konnte (Wolff et al., 1998, Abnet et al., 2009).

### NO-Synthasen

Die Biosynthese von Stickstoffmonoxid (NO) wird von der Enzym-Familie der NO-Synthasen (NOS) katalysiert. Es gibt drei Isoformen: die neuronale (nNOS), die induzierbare (iNOS) und die endotheliale NO-Synthase (eNOS). Die nNOS und eNOS werden konstitutiv jeweils in Neuronen bzw. in Endothelzellen exprimiert und produzieren nur wenig NO (pico/nanomolare Mengen). Die iNOS hingegen kann durch bakterielle Bestandteile wie Lipopolysaccharide

(LPS) in vielen unterschiedlichen Zelltypen, unter anderem in Makrophagen, induziert werden und ist im Stande, lokal mikromolare Mengen NO zu synthetisieren (Knowles and Moncada, 1994). Das Enzym katalysiert die NO Freisetzung aus der Aminosäure L-Arginin. NO hat viele Funktionen im Körper (Nathan and Xie, 1994). So bewirkt die Freisetzung aus Endothelzellen die Erhöhung des cGMP Spiegels in der Gefäßmuskultur, was zur Vasodilatation führt (Furchgott and Zawadzki, 1980, Shimekake et al., 1995, Denninger and Marletta, 1999), Im Gehirn wirkt es als Neurotransmitter (Southam and Garthwaite, 1993). Makrophagen generieren aus NO die reaktive Stickstoffspezies (Peroxynitrit, ONOO<sup>-</sup>), um damit Bakterien zu bekämpfen. Bei chronischer Aktivierung von eNOS und iNOS und einer Freisetzung von NO wurde in einigen Studien ein Zusammenhang mit Asthma (Hamid et al., 1993), COPD (Ichinose et al., 2000, Maestrelli et al., 2003), Herz-Kreislaufkrankungen (Dinerman et al., 1993), Rheuma (Kaur and Halliwell, 1994, Sakurai et al., 1995) und Sepsis (Petros et al., 1991, Szabo et al., 1994) festgestellt. Inhibitoren gegen iNOS werden auch zur Behandlung von Asthma und COPD eingesetzt (Hobbs et al., 1999, Hansel et al., 2003). In Abb. 4 wird die Bildung von NO durch iNOS und die biologischen Konsequenzen der NO Freisetzung dargestellt. NO ist membrangängig und benötigt keine Transportsysteme, kann somit durch seine relative Stabilität durch Zellen hindurch diffundieren. Deshalb kann es als „second messenger“ über Zellgrenzen hinweg wirken. Trotz seiner Stabilität kann es einerseits zur S-Nitrosylierung von Thiol-Gruppen von Proteinen durch NO kommen, was eine funktionelle posttranslationale Modifikation darstellt (Gow et al., 2002). Andererseits kann NO mit dem Superoxidanion reagieren, wobei das stark reaktive Peroxynitrit entsteht, das durch Nitrierung Biomoleküle schädigen kann (Wever et al., 1997). NO sowie auch Peroxynitrit können mit Glutathion reagieren und werden so abgebaut (Nakamura et al., 2000).



**Abb. 4 Biologische Konsequenzen der NO Synthese durch iNOS**

### Interleukin-8 (IL-8)

Interleukin-8 (IL-8) gehört zu den Chemokinen und wird auch als CXCL8 bezeichnet. Die Expression wird durch verschiedene Stimuli wie LPS, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und Chemotherapeutika induziert. Die IL-8 mRNA Expression wird hierbei über NF $\kappa$ B, ERK und JNK reguliert und die Translation über p38 Aktivierung (Li et al., 2002a). IL-8 wird von Epithelzellen, Endothelzellen, Monozyten und Fibroblasten freigesetzt, um bei Infektionen neutrophile Granulozyten an den Infektionsherd anzulocken. IL-8 bindet auf der Zelloberfläche an die beiden G-Protein-gekoppelten Rezeptoren CXCR1 und CXCR 2. Davon ausgehend werden verschiedene Signalkaskaden aktiviert, die das Überleben, die Proliferation, die Motilität und Angiogenese fördern (Waugh and Wilson, 2008). IL-8 ist auf diese Weise auch am Tumorwachstum und an der Bildung von Metastasen beteiligt. Die Anwesenheit von IL-8 im Blutserum wurde auch mit Lungenkrebs assoziiert (Pine et al., 2011).

### Interleukin-6 (IL-6)

IL-6 ist ein sekretorisches Glykoprotein, das durch viele unterschiedliche Zelltypen produziert wird. Dazu zählen T- und B-Zellen, Makrophagen, aktivierte Monozyten, Mastzellen, Neutrophile, Eosinophile, Glia-Zellen, Fibroblasten, Chondrozyten, Adipozyten, Osteoblasten und Endothelzellen. IL-6 hat einen Einfluss auf viele Vorgänge im Körper, wie den Knochenabbau und die spezifische Immunantwort, aber v.a. ist er ein wichtiger Mediator während der unspezifischen Inflammation. IL-6 ist für die Ausbildung der Akute-Phase Reaktion verantwortlich, die für die Begrenzung von Infektionen oder Schädigungen des Gewebes zuständig ist. Dabei werden verschiedene Proteine aus der Leber in den Blutkreislauf freigesetzt, wie das C-reaktive Protein (CRP), Bestandteile des Komplementsystems, Fibrinogen, Ferritin und Serum Amyloid A. Dafür werden andere Proteine wie Albumin, Apolipoprotein A und Transferrin im Blut reduziert (Assier et al., 2010). IL-6 ist außerdem für die Hemmung der TNF- $\alpha$  Freisetzung zuständig, sodass es auch eine anti-inflammatorische Wirkung besitzt (Igaz et al., 2000). Die Wirkungen von IL-6 werden über den IL-6 Rezeptor vermittelt, wobei die Janus Kinase JAK aktiviert wird. Dies führt zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3, der als Dimer in den Kern transloziert, um die Genexpression von Proteinen der Proliferation, der Differenzierung und von Zytokinen anzuschalten (Heinrich et al., 1998).

### Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

TNF- $\alpha$  wird von vielen verschiedenen Zelltypen unter anderem T-Zellen, Monozyten / Makrophagen, Mastzellen, Eosinophilen Granulozyten und Epithelzellen freigesetzt. Die TNF- $\alpha$  Synthese wird auf verschiedenen Ebenen reguliert. Die Transkription wird über AP1 und NF $\kappa$ B induziert und der nukleäre Transport sowie die mRNA Stabilität über die Bindung von Proteinen an die ARE (*adenine and uridine-rich element*) in der 3' nicht-translatierten Region der TNF- $\alpha$  mRNA. Hierbei sind der ERK Signalweg für den nukleären Transport und der p38-MK2 Signalweg für die Translation beteiligt (Anderson, 2008, Gaestel et al., 2009). Anschließend erfolgt die Translokation der prä-TNF- $\alpha$  Form an die Zelloberfläche, wo ein Teil über die Protease TACE (*TNF- $\alpha$  converting enzyme*) abgespalten wird. Die Phosphorylierung von TACE durch ERK ist für die Freisetzung verantwortlich (Rousseau et al., 2008). Die freie TNF- $\alpha$  Form kann im Blutkreislauf zirkulieren und systemisch Effekte auslösen. TNF- $\alpha$  kann an zwei verschiedene Rezeptoren (TNF-RI und TNF-RII) binden, die für die Signalvermittlung verantwortlich sind. Der TNF-RI besitzt die sogenannte Death (Todes)-Domäne, die nach Bindung von TNF- $\alpha$  eine pro-apoptotische Signalkaskade initiiert, wobei der *Death inducing signalling* Komplex zum Rezeptor rekrutiert wird (Wallach et al., 1999). Der TNF-RII ist indirekt am Apoptose-Signal beteiligt, indem er die Degradation des Inhibitors (*TNF Receptor associated factor*, TRAF2) des DISC Komplexes auslöst (Li et al., 2002c). Neben der Initiation der Apoptose ist TNF- $\alpha$  an der Inflammation über die Aktivierung des NF $\kappa$ B Signalweges beteiligt (Wallach et al., 1999). Eine weitere Auswirkung ist die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 auf Endothelzellen, wodurch die Neutrophilen aus dem Blutstrom an den Endothelzellen adhären und am Ort des Schadens akkumulieren. TNF- $\alpha$  stimuliert außerdem die Phagozytose in Makrophagen und induziert die IL-6 und IL-1 $\beta$  Freisetzung. Die Aktivierung durch TNF- $\alpha$  löst die Freisetzung von IL-8 und anderen Chemokinen durch Lungenepithelzellen aus (Jimenez et al., 2002).

### Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )

IL-1 $\beta$  wird von aktivierten Makrophagen und Monozyten nach LPS Stimulation produziert und sekretiert. Die Regulation dieses Zytokins erfolgt auf verschiedenen Ebenen. Zusätzlich zur Regulation der Transkription über NF $\kappa$ B und die MAP Kinasen, werden die posttranslationale Modifikation des Proteins und die Sekretion auf komplexe Weise reguliert. IL-1 $\beta$  wird zunächst als inaktives Vorläuferprotein, pro-IL-1 $\beta$ , transkribiert und translatiert und kann erst durch einen Caspase-1 abhängigen Schritt zu seiner aktiven Form (IL-1 $\beta$ ) prozessiert werden. Dieser Vorgang beinhaltet die Aktivierung des sogenannten NALP3 Inflammasoms,

das eine Plattform für die Prozessierung von pro-IL-1 $\beta$  durch Caspase-1 darstellt. Das NALP3 Polypeptid gehört zu den NOD-like Rezeptoren und mehrere NALP3 Peptide oligomerisieren nach Bindung eines Liganden zum Inflammasom (Petrilli et al., 2007). Die Caspase-1 gehört zu den Proteasen, die ein Cystein in ihrem katalytischen Zentrum tragen und ihr Substrat am Aspartat schneiden. Zusätzlich besitzt die Caspase-1 die CARD-Domäne mit der sie an das Inflammasom bindet und aktiviert wird. Caspase-1 schneidet pro-IL-1 $\beta$  am Aspartat 116 (33 kDa Protein) und es entsteht ein kürzeres Protein (17 kDa Protein), das die aktive Form IL-1 $\beta$  darstellt (Martinon et al., 2002). Im Anschluss an die Aktivierung des NALP3 Inflammasoms wird IL-1 $\beta$  sekretiert, doch Dauer und Menge werden streng reguliert.

Die Aktivierung des NALP3 Inflammasoms bedarf zusätzlicher Signale, um eine längeranhaltende Sekretion zu gewährleisten. Bekannte Stimuli dafür sind die Zunahme von extrazellulärem ATP (Mariathasan et al., 2006), Harnstoffkristalle (Martinon et al., 2006), Asbest (Dostert et al., 2008), kristallines SiO<sub>2</sub> (Cassel et al., 2008, Kuroda et al., 2011) und ROS (Dostert et al., 2008). Die Erkennung der Signale durch das Inflammasom ist noch nicht vollständig geklärt. Möglicherweise spielen die intrazelluläre Zunahme von Kalium-Ionen und Signale aus dem Mitochondrium, wie die Zunahme von ROS, eine Rolle (Petrilli et al., 2007, Zhou et al., 2010, Tschopp, 2011). Kürzlich wurde in einer Arbeit von Harris und Kollegen gezeigt, dass die Sekretionsdauer von IL-1 $\beta$  durch Degradation mittels Autophagosomen begrenzt wird (Harris et al., 2011). Die Funktion von IL-1 $\beta$  im Körper wird durch die Bindung an den IL-1-Rezeptor vermittelt, der zur Superfamilie der Toll-like Rezeptoren gehört und über die Signalwege NF $\kappa$ B und MAP Kinasen wirkt (Hatada et al., 2000). IL-1 $\beta$  löst Fieber aus, die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und triggert die Freisetzung von IL-6 und TNF- $\alpha$ , sodass die Akute-Phase-Reaktion eingeleitet wird. IL-1 $\beta$  induziert zudem die Expression der COX-2 und fördert so die Prostaglandinsynthese.

### 1.3.3. Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen

Um extrazelluläre Signale wie Stress (z.B. UV-Licht, Toxine) oder Signalmoleküle (z.B. Chemokine und Zytokine) zu verarbeiten, besitzen Zellen ein komplexes System aus Signalkaskaden. In dieser Arbeit wurde ein Fokus auf die Signalwege der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) und Stress-aktivierten Proteinkinasen (SAPK) gelegt, die eine Rolle bei der Signalweiterleitung von Partikel-induziertem Stress spielen können. Die Kinase ERK (*extracellular signal regulated kinase*) wird nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren, Hormonen und Neurotransmitter aktiviert, das die Aktivierung von Genen der Proliferation, Zellzyklus und Differenzierung bewirkt (Rubinfeld and Seger, 2005).

Die Kinasen p38 und JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) gehören zu den Stress-aktivierten Kinasen, da sie hauptsächlich durch Stress wie UV-Strahlung, Zytokine, DNA Schädigende Agenzien und oxidativen Stress aktiviert werden (Kyriakis and Avruch, 2001). In Kap. 1.3.2 wurde bereits beschrieben, wie extrazelluläre Signale über spezifische Rezeptoren erkannt werden. Im Anschluss an die Bindung eines Liganden an den Rezeptor erfolgt die Rekrutierung von Adaptorproteinen an den Rezeptor, wodurch intrazellulär Multiproteinkomplexe, bestehend aus weiteren Adaptorproteinen, einer Ubiquitin Ligase und MAPKK Proteinkinasen, zum Rezeptor rekrutiert werden. Diese Multiproteinkomplexe modulieren und amplifizieren das extrazelluläre Signal (Gaestel et al., 2009).

Im Falle der MAPK und SAPK erfolgt eine Phosphorylierungskaskade in drei Stufen. Zunächst phosphorylieren die MAP3K Kinasen (MEKK) weitere MAPKK Kinasen, die sogenannten MKK oder MEK an jeweils spezifischen Serin- oder Threonin-Resten, um diese zu aktivieren. Daraufhin erfolgt die Phosphorylierung und zugleich Aktivierung der MAPK und SAPK (ERK, p38 und JNK) durch die MAPKK Kinasen an jeweils einem spezifischen Threonin- und Tyrosin-Rest. Die MAPK/SAP Kinasen gehören selbst zu den Serin/Threonin-Kinasen und phosphorylieren insbesondere Transkriptionsfaktoren sowie MAPK-aktivierte Proteinkinasen MK2, 3 und 5, ATF-2 (*activating transcription-factor-2*) und Bestandteile des AP-1 Komplexes (Pearson et al., 2001). Insbesondere ist die p38 $\alpha$  Kinase über die Phosphorylierung von MK2 an der Regulation der Translation der Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$  beteiligt (Gaestel, 2006).

#### **1.3.4. Der Phosphatidylinositol-3-Kinase / AKT-Signalweg**

Ein zentraler Signalweg, der das Überleben von Zellen kontrolliert, ist der PI3K/AKT-Signalweg. Dabei sind die drei Serin-Threonin Kinasen AKT1/2/3 (Proteinkinase B ( $\alpha/\beta/\gamma$ )) zentrale Regulatoren dieses Signalweges. Der PI3K/AKT-Signalweg wird durch die Bindung von Wachstumsfaktoren an die membranständigen Rezeptor-Tyrosinkinasen initiiert. Daraufhin wird die PI3-Kinase zum Rezeptor rekrutiert, sodass sie die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol (Membranlipid) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP<sub>3</sub>) katalysiert. PIP<sub>3</sub> rekrutiert PDK1 (*phosphoinositide-dependent-kinase*) und AKT an die Plasmamembran, wodurch es zur Phosphorylierung und Aktivierung von AKT durch PDK1 kommt. Aktivierte AKT Kinase hat unterschiedliche Substrate, die v.a. anti-apoptotisch wirken. Die Phosphorylierung durch AKT inhibiert z.B. die pro-apoptotischen Proteine Bad und Caspase 9 (Datta et al., 1997). AKT reguliert und fördert den Metabolismus, die Proteinbiosynthese und das Wachstum von Zellen, indem es die Aktivität des mTOR (mammalian target of rapamycin) Komplexes indirekt positiv beeinflusst. AKT phosphoryliert und inhibiert den mTOR-Inhibitor Komplex TSC2 (*tuberous sclerosis complex*, (Inoki et al.,

2002, Potter et al., 2002). Außerdem gehören die AKT Kinasen zu den Onkogenen, die in vielen Tumoren verstärkt aktiviert werden und zu unkontrollierter Proliferation führen können. AKT hat einen direkten Einfluss auf den Zellzyklus und dessen Regulatoren, die Cyclin-abhängigen Proteinkinasen (CDK) (Shin et al., 2002). Die Aktivität der CDKs wird während des Zellzykluses streng reguliert, unter anderem durch die CDK-Inhibitoren p27<sup>KIP1</sup> und p21<sup>CIP1</sup>. Diese werden durch AKT phosphoryliert und akkumulieren im Zytoplasma (Shin et al., 2002, Liang and Slingerland, 2003). Eine Regulation und Inhibition des AKT-Signalwegs erfolgt hauptsächlich über die Phosphatase PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*), die durch die De-phosphorylierung von PIP<sub>3</sub> als Tumorsuppressor wirkt.

#### **1.4. Untersuchung der Wirkung von Nanopartikeln mit verschiedenen Expositionsverfahren**

Durch Zunahme der Verwendung von Nanomaterialien werden in der EU-Verordnung REACH (Registrierung, Evaluierung, Autorisierung von Chemikalien) *in vitro* Testsysteme gefordert, mit deren Hilfe viele neue Chemikalien sowie Nanoobjekte schnell, effektiv und kostengünstig getestet werden können. REACH verpflichtet alle Hersteller und Importeure von Chemikalien dazu, eine Bewertung der Auswirkungen für Mensch und Umwelt aller in der EU verwendeten Chemikalien abzugeben, auf deren Grundlage mögliche Zulassungsbeschränkungen vorgenommen werden können.

Die Wirkmechanismen von Nanoobjekten in der Lunge wurden bislang entweder *in vivo* in Ratten oder Mäusen in Inhalations- und Instillationsstudien oder *in vitro* in Zellkultursystemen unter submersen Bedingungen durchgeführt, d.h. die Partikel wurden im Zellkulturmedium dispergiert und auf die Zellen gebracht. *In vivo* Studien haben den Vorteil, dass sie Wechselwirkungen innerhalb des Körpers nach Exposition mit Partikeln über die Lunge zeigen können und auch Langzeitexpositionen möglich sind. Ein Nachteil hingegen sind speziesbedingte Unterschiede, wie z.B. in der Anatomie des Atemtrakts und des Immunsystems im Vergleich zum Menschen und die Schwierigkeit der Abschätzung der wirklichen in der Lunge deponierten Dosis (Paur et al., 2011).

*In vitro* Studien sind im Gegensatz zu *in vivo* Studien schneller durchführbar und erheblich kostengünstiger. Außerdem können dort direkt humane Zellen verwendet werden und speziesspezifische Unterschiede somit ausgeschlossen werden. Die Applikationsmethode in *in vitro* Zellsystemen wurde bislang für Chemikalien und Nanoobjekte gleichermaßen gehandhabt, indem die Substanzen einfach ins Medium zu den Zellen gegeben wurden. Auf diese Weise wurden Interaktionen zwischen den Zusätzen im Medium und den untersuchten Nanoobjekten ermöglicht, ohne Kenntnis dessen, was dies eventuell die biologische Wirkung

der Nanoobjekte verändern könnte. Hierbei ist die Adsorption von Proteinen von besonderer Bedeutung. Ein weiteres erhebliches Problem dieser *in vitro* Methode stellt die Abschätzung der wirklich deponierten Dosis dar. Die Angaben können bei der submersen Exposition entweder als Massendosis pro Volumen Kulturmedium oder als Massendosis pro Zelloberfläche erfolgen. Jedoch ist oft unklar, wie viele der im Kulturvolumen suspendierten NP tatsächlich auf der Zelloberfläche ankommen. Hierbei beeinflussen die größenabhängigen Unterschiede die Diffusion und Sedimentation von NP, was zusätzlich durch die häufig auftretende Agglomeration kompliziert wird. Letztendlich ist die zelluläre Dosis meist unbekannt, was dazu führt, dass die Dosis-Wirkungsbeziehung nicht richtig abgeschätzt werden kann. Die Angabe der Massendosis pro Zelloberfläche setzt sogar voraus, dass alle Nanoobjekte z.B. durch Sedimentation auf den Zellen deponieren können. Dies ist jedoch nicht für alle Nanoobjekte der Fall, insbesondere für monodispergierte Nanoobjekte, die hauptsächlich durch Diffusion in einer viel geringeren Dosis auf den Zellen deponieren.

Deshalb müssen Methoden entwickelt werden, durch die es ermöglicht wird, die deponierte Dosis direkt messen zu können. Gleichzeitig ist es wichtig, ein *in vitro* Testverfahren zu etablieren, das dem Expositionsszenario in der Lunge möglichst realitätsnah nachempfunden ist. In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere *in vitro* Testverfahren verwendet. Einerseits wurde unter submersen Bedingungen untersucht, welche Auswirkungen Serumproteine im Medium auf die Partikel-induzierten Effekte haben. Andererseits wurde die Exposition an der Luft-Flüssigkeitsgrenzschicht getestet, bei der es möglich ist, Partikel direkt mit den Zellen (ohne Interaktion mit dem Zellkulturmedium) in Kontakt zu bringen und außerdem die applizierte Dosis direkt zu bestimmen. Im Folgenden werden die Problematik der Proteinadsorption und die Exposition an der Luft-Flüssigkeitsgrenzschicht näher erläutert.

#### **1.4.1. Adsorption von Proteinen aus dem Medium an Nanopartikel**

Sobald Nanopartikel mit biologischen Systemen (Blut, Interstitielle Flüssigkeit) in Kontakt kommen, assoziieren sie mit Proteinen und bilden die sogenannte Proteinkorona aus. Dieser Effekt wird häufig bei der Untersuchung der biologischen Wirkung in der Zellkultur übersehen. Zytotoxizitätsassays werden in der Regel mit Medium, das mit fötalem Kälberserum supplementiert ist, durchgeführt. Hierbei kommt es zu Wechselwirkungen der Partikel mit den Proteinen aus dem Serum. Die Wechselwirkungen werden durch die Eigenschaften der Nanopartikel wie Hydrophobizität, Ladung, Form, Krümmung und Größe bestimmt (Agarwal et al., 2009). Die Zusammensetzung der Proteinkorona hängt von der Bindungsaffinität und Dissoziationsrate eines jeden Proteins zu einem Partikel ab, deshalb

kann man von einem dynamischen Interaktionsprozess sprechen, der sich mit der Zeit verändert.

Hierbei gibt es eine Aufteilung in die sogenannte „*hard corona*“ und die „*soft corona*“. Zur „*hard corona*“ gehören Proteinen, die über längere Zeit stabil an den Partikel adsorbiert sind, während zur „*soft corona*“ solche Proteine gehören, die schneller von der Oberfläche dissoziieren und/ oder eine geringere Affinität zum Partikel aufzeigen (Lynch and Dawson, 2008). Die Wirkung der Proteinkorona auf biologische Systeme wurde bislang kaum systematisch erforscht. Es wird postuliert, dass die Proteinkorona selbst und nicht die Oberfläche des Partikels von den Zellen „gesehen“ wird und mit den Rezeptoren und Signalwegen der Zellen interagiert (Lynch et al., 2007). Die bestimmenden Faktoren sind Strukturen der Proteine (Epitope), die von den Rezeptoren erkannt werden und dabei die Aufnahme, Lokalisation, Proliferation, Inflammation, den Zelltod und das Überleben beeinflussen. Außerdem kann es durch die Adsorption zu einer Konformationsänderung der Proteine kommen, was die Proteinaktivität beeinträchtigt kann (Vertegel et al., 2004). Des Weiteren kann die Proteinkorona das Agglomerationsverhalten und die Ladung der Nanopartikel verändern welche bei der Aufnahme und Toxizität eine Rolle spielen können. Um die Interaktion von Proteinen auf der Partikeloberfläche mit Zellen zu untersuchen wurde Bovines Serum Albumin als Hauptbestandteil des Serums verwendet, welches im Folgenden kurz beschrieben wird.

### Albumin

Albumin besteht aus 585 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 67 kDa. Es kommt als Monomer vor, dessen 3D-Struktur einem Prisma gleicht (Leggio et al., 2008). Albumin besteht aus drei Domänen, wobei die Domänen II und III hydrophobe Taschen mit positiv geladenen Aminosäureresten ausbilden, mittels der viele wasserunlösliche Substanzen binden können (Sugio et al., 1999). Es ist die mengenmäßig größte Proteinfraction im Blutserum und hat unter normalen Bedingungen eine Konzentration von 35-50 g/l im Serum. Die Synthese erfolgt ausschließlich in der Leber. Albumin hat verschiedene Funktionen im Körper. Aufgrund seiner guten Bindungsfähigkeit dient es hauptsächlich als Transportvehikel für wasserunlösliche Substanzen wie Metalle, Fettsäuren, Cholesterol, NO, Bilirubin und Biliverdin sowie Medikamente (Fasano et al., 2005). Außerdem ist es für die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks im Körper verantwortlich. Die Fähigkeit, viele Substanzen zu binden, führt dazu, dass Albumin auch anti-oxidative Eigenschaften besitzt. Es kann durch Bindung von Fe- und Cu-Ionen die Bildung von ROS reduzieren, indem die Hydroxylradikale aus der Fenton-Reaktion mit Albumin anstatt mit anderen Proteinen reagieren. Der Transport von Bilirubin schützt vor Peroxynitrit und Lipidperoxidation. Die Thiol-Gruppe des Cysteins 34 kann Radikale

ebenfalls ähnlich wie Glutathion direkt in einer Redoxreaktion neutralisieren. Außerdem besitzt Albumin 6 Methionin Reste, die ebenfalls als Radikalfänger wirken (Carballal et al., 2003, Roche et al., 2008).

#### **1.4.2. Untersuchung der Wirkung von Nanopartikeln an der Luft- / Flüssigkeitsgrenzschicht**

Die Exposition von Zellkultursystemen an der Luft- / Flüssigkeitsgrenzschicht (engl. *air-liquid interface*) stellt eine Methode dar, die besonders dafür geeignet erscheint, die Problematik der Dosisbestimmung zu lösen und die Exposition von Zellen auf eine möglichst realistische Art und Weise zu realisieren. Mit Hilfe dieses Systems werden Aerosole aus Luft und Partikeln erzeugt, wobei die Partikel aus dem Luftstrom direkt auf die Zellen (ohne Medium über den Zellen) deponiert werden, was der Situation in den Alveolen der Lunge ähnelt. Derzeit gibt es einige Expositionssysteme, die sich durch die Herstellung von Aerosolen, die Depositionsdauer, Depositionseffizienz und die verwendeten Zellsysteme unterscheiden. Bei Paur et al. 2011 werden die verschiedenen Systeme zusammengefasst. Die Erzeugung eines Aerosols kann am einfachsten mit Hilfe eines gängigen Inhalators, der z.B. für die Behandlung von Asthma verwendet wird, durchgeführt werden. Diese Methode wurde bei dem Expositionssystem ALICE angewendet (Lenz et al., 2009). Hierbei wurde ein Aerosol aus Trägerflüssigkeit und Partikeln erzeugt, das sich ähnlich einem Nebel innerhalb kurzer Zeit (10 min) auf den Zellen durch Sedimentation absetzt. Die Massendosis wurde mittels einer Quarzmikrowaage und die Agglomeratgröße der deponierten Partikel im Transmissionselektronenmikroskop ermittelt. Bei diesem System wurden z.B. Monokulturen aus einer humanen Lungenepithelzelllinie (A549) (Lenz et al., 2009) oder sogar Kokulturen bestehend aus Lungenepithelzellen, differenzierten Makrophagen und dendritischen Zellen verwendet (Brandenberger et al., 2010). Dieses System ist wegen seiner Einfachheit in der Handhabung, der kurzen Expositionsdauer und durch die hohe Depositionseffizienz von 57 % (auf Zellen deponierte Partikelmasse aus dem Luftstrom) eine gute Option, um die Wirkung von Nanoobjekten an der Luft-Flüssigkeitsgrenzschicht zu untersuchen. Dennoch besitzt es auch einen Nachteil, der die Aerosol Charakterisierung und die systematische Untersuchung von bestimmten Partikel-Eigenschaften betrifft. Die Erzeugung des Aerosols mittels des Inhalators führt lediglich dazu, dass Partikelagglomerate und nicht einzelne Partikel deponiert werden können, was noch zu sehr den submersen Bedingungen entspricht. Außerdem ist die Charakterisierung des Aerosols in Echtzeit nicht möglich. Um diesen Anforderungen zu entsprechen, gibt es andere Expositionssysteme, mit deren Hilfe die Qualität des Aerosols besser kontrolliert werden kann, wie z.B. das Elektrospray (Kim et al., 2010), sodass Untersuchungen zu Effekten von Einzelpartikeln möglich sind. Weiterhin wurden spezielle Expositionskammern entwickelt, bei denen der Aerosolstrom parallel zur

Deposition mittels eines DMA (*Differential Mobility Analyzer*) analysiert werden kann. Hierbei kann der mobilitätsäquivalente Durchmesser der Nanopartikel im Aerosol bestimmt werden. Bei solchen Kammern liegt jedoch die Depositionseffizienz bei nur 1 %, da die Partikel in den Lungenalveolen hauptsächlich aufgrund von Diffusion und Impaktion auf den Zellen deponieren (Muelhopt et al., 2008).

Um auch bei dieser Methode hohe Depositionseffizienzen zu erreichen und um die Wirkung unterschiedlicher Partikelmengen untersuchen zu können, wurde die Eigenschaft des Aerosols ausgenutzt, dass Partikel beim Versprühen bipolar aufgeladen werden und durch ein zusätzliches elektrisches Feld in der Expositions-kammer auf den Zellen verstärkt deponieren. Hierbei konnten Depositionseffizienzen von 35 % (Savi et al., 2008) bis 90 % (de Bruijne et al., 2009) erreicht werden.

### **1.4.3. Abschätzungen zur Dosimetrie in der Realität und *in vitro***

Sowohl für *in vivo* als auch für *in vitro* Studien ist die Abschätzung der Dosis für die Korrelation mit biologischen Effekten notwendig. Kreyling und Kollegen haben abgeschätzt, wie viele nanoskalige Partikel ein Mensch pro Tag im Mittel inhaliert. Bei einer Anzahl von  $3 \times 10^4$  Partikel/cm<sup>3</sup> Luft werden in der Lunge  $2,3 \times 10^{11}$  Partikel deponiert (Kreyling et al., 2003). Paur und Kollegen haben abgeschätzt, dass bei extrem hohen Partikelbelastungen, wie sie z.B. am Arbeitsplatz vorkommen, etwa maximal  $3,8 \times 10^{13}$  Nanopartikel am Tag in der Lunge deponiert werden können, wobei in diesem Wert ein Risikofaktor von 10 mit einberechnet wurde. Wenn man daraus die Partikelanzahl pro Zelle berechnet, würden bei durchschnittlicher Partikelbelastung 40 Nanopartikel am Tag mit einer Lungenzelle (Lungenepithelzellen Typ I, Typ II und alveoläre Makrophagen) in Kontakt kommen. Bei extremer Partikelbelastung würde eine Zelle mit bis zu 6700 Partikeln am Tag exponiert werden. Hochgerechnet auf das ganze Leben und bei einer permanenten 80 Jahre andauernden Exposition beläuft sich das auf  $3,5 \times 10^5$  Partikel pro Zelle bei durchschnittlicher Partikelbelastung und bei extremer Partikelbelastung auf  $5,9 \times 10^7$  Partikel pro Zelle (Paur et al., 2008). Die Partikelanzahl, die bei allen *in vitro* Expositionssystemen verwendet wird, kann zwar diesen Niedrigdosisbereich ( $0-10^7$  Partikel/cm<sup>3</sup>) problemlos erreichen, jedoch werden meistens 10-10<sup>7</sup>-fach höhere Werte ( $10^8-10^{14}$  Partikel/ml) angewendet, da oftmals Effekte erst dann messbar sind. Dennoch ist es notwendig, Untersuchungen anzustreben, die sich mit der Frage realistisch möglicher Dosen und ihrer Bestimmung auseinandersetzen, damit man ein besseres Verständnis über die Partikel-induzierten biologischen Effekte erlangen kann.

## 1.5. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, das toxische Potenzial von synthetisch hergestellten Nanopartikeln mittels verschiedener *in vitro* Testmethoden, die sich durch die Applikationsmethode unterscheiden, zu untersuchen. Hierbei wurde ein Fokus auf den Einfluss von Serumproteinen im Zellkulturmedium auf die Partikel-induzierten Effekte gelegt. Die Inkubation von Partikeln in serumfreiem Medium entspricht vermutlich eher den Bedingungen in der Lunge, im Gegensatz zu serumhaltigen Medium, welches jedoch standardmäßig für *in vitro* Zytotoxizitätsassays verwendet wird. Serumproteine können an Nanopartikel binden und ihre Oberfläche verändern. Die Ausbildung der sogenannten Proteinkorona kann unterschiedliche Folgen nach sich ziehen. Zum einen kann das Agglomerationsverhalten der Partikel maßgeblich verändert werden, zum anderen kann die Oberfläche maskiert und somit die Wirkung der Partikel beeinflusst werden. Außerdem kann es zu einer Interaktion mit Rezeptoren der Zelle über die adsorbierten Proteine kommen, wobei zelluläre Signalwege angeschaltet werden können. Um dieser Problematik nachzugehen, wurden verschiedene Metalloxid-Nano-partikeln ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2$ ) parallel in Zellkulturmedium mit und ohne Serum dispergiert und anschließend ihr Agglomerationsverhalten und die biologische Wirkung untersucht.

Als zelluläre Modellsysteme wurden die humane Lungenepithelzelllinie A549 und die Mausmakrophagen-Zelllinie RAW 264.7 verwendet. Da postuliert wird, dass die toxische Wirkung von Nanopartikeln auf der Induktion von oxidativem Stress basiert, wurden neben der Untersuchung der akuten Zytotoxizität auch die Generierung von intrazellulären ROS und die anti-oxidative Antwort nach Partikelexposition untersucht. Außerdem ist aus zahlreichen Studien bekannt, dass Partikel Entzündungsreaktionen auslösen, weshalb die Induktion verschiedener Entzündungsmediatoren auf mRNA- und Proteinebene überprüft wurde. Dazu wurde auch die Beteiligung der übergeordneten Signalwege, d.h. der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) untersucht. Um den Mechanismus, über den adsorbierte Serumproteine die biologische Wirkung beeinflussen können, zu untersuchen, wurden Partikel mit Proteinen beschichtet und verschiedene biologische Endpunkte analysiert.

Desweiteren wurden die Exposition von  $\text{SiO}_2$ -NP an der Luft-Flüssigkeitsgrenzschicht untersucht und mit der submersen Applikationsmethode in Abwesenheit von Serum verglichen. Diese Methode sollte ein realistischeres Expositionsszenario für die Lunge darstellen, wobei die Zellen direkt mit luftgetragenen Partikeln anstatt über das Zellkulturmedium in Kontakt gebracht wurden. Zum einen wurde dabei der mögliche Einfluss des Zellkulturmediums auf verschiedene Partikeleigenschaften wie z.B. die Agglomeration oder die Oberfläche verhindert. Zum anderen war es im Gegensatz zur submersen Exposition technisch möglich, die applizierte Dosis mit Hilfe von elektronenmikroskopischen

Aufnahmen exakt zu bestimmen. Um die Wirkung der Partikel nach Exposition mittels eines Aerosols zu bestimmen, wurden die bereits aus den submersen Versuchen etablierten biologischen Endpunkte untersucht. Dazu zählten die Membranintegrität, die pro-inflammatorische Antwort und der MAPK Signalweg.

Zusammengefasst sollten in dieser Arbeit folgende Fragestellungen beantwortet werden.

1. Wie reagieren Zellen unter submersen Bedingungen auf die Exposition mit den synthetisch hergestellten  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -,  $\text{TiO}_2$ - und  $\text{SiO}_2$ -Nanopartikeln?
  - Welche zellulären und molekularen Effekte werden durch Nanopartikel ausgelöst? (Zytotoxizität, Aufnahme, anti-oxidative und pro-inflammatorische Antwort)
  - Ist die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies für die Wirkung von Nanopartikeln verantwortlich?
  - Welchen Einfluss auf die Toxizität hat hierbei das Serum im Zellkulturmedium?
  - Wird das Agglomerationsverhalten von Nanopartikelsuspensionen durch Serum beeinflusst?
  - Adsorbieren Serumproteine an die Partikeloberfläche (Ausbildung einer Proteinkorona)?
  - Kann die Proteinkorona die toxischen Effekte beeinflussen?
  - Können Bestandteile der Proteinkorona direkt mit Signalwegen der Zellen interagieren?
2. Welche Rolle spielt die Applikationsmethode bei den Wirkungen von Nanopartikeln
  - Gibt es Unterschiede in der Wirkung von Nanopartikeln bei Applikation unter submersen Bedingungen im Vergleich zur Applikation an der Luft-Flüssigkeitsgrenzschicht?
  - Wie vergleichen sich die Dosis/ Wirkungsbeziehung in den beiden verschiedenen Systemen?

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
2',7'-Dichlordihydrofluorescein-diacetat (H <sub>2</sub> DCF-DA)	Invitrogen, Karlsruhe
2-Propanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Agarose, universal	PeqLab, Erlangen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Casyton®	Schärfe Systems, Reutlingen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
ECL PLUS Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, Freiburg
ECL-Lösung	Thermo Scientific, Rockford, USA
Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Entwickler und Fixierer	Kodak GmbH, Stuttgart
EPON 812 (Glycidether)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Glutaraldehyd	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
HBSS 10 x (Hank's Balanced Salt Solution)	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe
Kaliumferricyanid	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt

Osmiumtetroxid	Polysciences, Eppelheim
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
PBS (Phosphate Buffered Saline -Mg <sup>2+</sup> /-Ca <sup>2+</sup> )	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe
Pipes (Piperazin-N, N'-Bis (2-ethansulfonsäure))	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Polyvinylidendifluoridmembran (PVDF), 0,45 µm Porengröße	Millipore GmbH, Schwalbach
Propylenoxid	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Restore Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Tween®20	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Uranylacetat	Merck, Darmstadt
Whatman 3MM-Papier	Whatman GmbH, Dassel
Zellkulturmaterial und Plastikwaren	Greiner Bio-One, Frickenhausen

## 2.2. Partikel

Die Nanopartikel, die in dieser Arbeit verwendet wurden, waren die Metaloxide Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> und TiO<sub>2</sub> sowie das Halbmetalloxid SiO<sub>2</sub>. Sie wurden einerseits gekauft und andererseits an verschiedenen Instituten am Karlsruher Institut für Technologie hergestellt (s. Tab. 1). Zusätzlich wurden als Positivkontrolle Cadmiumoxid Partikel (Merck, Darmstadt) eingesetzt.

### 2.2.1. Herstellung

Die hier verwendeten Nanopartikel wurden mit Hilfe von drei verschiedenen Herstellungsprozessen synthetisiert. Die SiO<sub>2</sub>-25 NP wurden im Mikrowellenplasma und die SiO<sub>2</sub>-50 NP wurden durch die Stöber Synthese hergestellt. Alle weiteren Partikelsorten wurden mittels der Flammensynthese synthetisiert.

#### Flammensynthese

Die Herstellung von Nanopartikeln durch die Flammensynthese nutzt die thermische Energie einer Flamme bei sehr hohen Temperaturen aus, um aus einem gasförmigen Precursor (Ausgangssubstanz) durch Koagulations- und Sintervorgänge Partikel entstehen zu lassen. Diese Methode wurde erstmals 1984 von Ulrich für SiO<sub>2</sub> Nanopartikel beschrieben (Ulrich, 1984). Die Konzentration des Precursors, die Verweilzeit im Reaktor sowie die Temperatur

sind die bestimmenden Parameter für die Oberflächeneigenschaften und Größe der entstehenden Partikel. In der vorliegenden Arbeit wurden für die Herstellung von Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NP der Precursor Eisenpentacarbonyl (Fe(CO)<sub>5</sub>, IPC, Sigma Aldrich, Taufkirchen) sowie für TiO<sub>2</sub>-NP der Precursor Titan-Tetraisopropoxid (Ti[OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sub>4</sub>), TTIP, Sigma Aldrich, Taufkirchen) verwendet. Der Aufbau der Anlage und der Herstellungsprozess werden in der Arbeit von Nalcaci und Kollegen beschrieben (Nalcaci et al., 2011). Das Partikelpulver wurde auf einem Filter (GORE Polytetrafluoroethylene Felt Filter Bag, Gore GmbH, Feldkirchen Westerham) gesammelt und anschließend analysiert.

### Mikrowellenplasma

Aus Argon und Sauerstoff wird in einem Quarzröhrenreaktor mittels Mikrowellen ein nicht thermisches Plasma (<200 °C) erzeugt und für die Nanopartikelsynthese wird zusätzlich ein Precursor eingeleitet. Bei diesem Verfahren entsteht aus dem Precursor ein übersättigter Dampf welcher schließlich zu Nanopartikeln kondensiert. Für die Herstellung von SiO<sub>2</sub>-NP wurde das gasförmige Silan (SiH<sub>4</sub>, Air-Liquid, Düsseldorf) als Precursor verwendet. Die entstandenen SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel wurden mittels einer mit Aceton und Trockeneis gekühlten Kühlfalle abgeschieden und gesammelt (Vollath, 2008).

### Stöber-Synthese

Die Stöber-Synthese wurde 1968 von Stöber und Kollegen zur Herstellung von sphärischen monodispersen SiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln in der Flüssigphase entwickelt. Zunächst wird die Ausgangssubstanz Tetraethylorthosilikat (TEOS) in einer Lösung aus Ammoniak, Wasser und Alkohol zu Orthokieselsäure (Si(OH)<sub>4</sub>) hydrolysiert, anschließend kondensiert dieses Zwischenprodukt zu SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel Keimen (Stöber et al., 1968). Anschließend beginnt das Wachstum der Partikel aufgrund der hohen Konzentration an Kieselsäure. Bei diesem Verfahren können Partikel einheitlicher Größe von 5 nm bis zu 2 µm hergestellt werden (Green et al., 2003).

## **2.2.2. Charakterisierung**

Die Eigenschaften der Nanopartikel wurden einerseits den Herstellerangaben entnommen, andererseits wurden die am Engler-Bunte-Institut (EBI) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bockhorn sowie am Institut für Technische Chemie (ITC) in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Paur hergestellten Nanopartikel in den jeweiligen Arbeitsgruppen charakterisiert (Tab. 1). Die am EBI und ITC hergestellten NP werden im Folgenden als selbst hergestellte NP bezeichnet.

**Tab. 1: Zusammenfassung der verwendeten Nanopartikel und ihre Eigenschaften. Gekaufte NP(a), am EBI hergestellte NP (b), am ITC hergestellte NP (c)**

Bezeichnung (Markenname)	Hersteller	Nomineller Durchmesser (nm)	Kristallinität	Spezifische Oberfläche BET (m <sup>2</sup> /g)
SiO <sub>2</sub> 12 <sup>(a)</sup> (Aerosil®200)	Evonik, Frankfurt	12	amorph	200
SiO <sub>2</sub> 25 <sup>(c)</sup>	ITC (KIT), Karlsruhe	25	amorph	220
SiO <sub>2</sub> 50 <sup>(a)</sup>	Postnova Analytics, Landsberg	50	amorph	60 <sup>c</sup>
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 10 <sup>(b)</sup>	EBI (KIT), Karlsruhe	10	Hämatit / Magnetit	141
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 20-40 <sup>(a)</sup> (NanoArc)	Alfa Aesar, Karlsruhe	20-40	Magnetit	30-60
TiO <sub>2</sub> 5 <sup>(a)</sup>	Alfa Aesar, Karlsruhe	5	Anatase	200-220
TiO <sub>2</sub> 20 <sup>(b)</sup>	EBI (KIT), Karlsruhe	23	Anatase / Rutil	105
TiO <sub>2</sub> 32 <sup>(a)</sup>	Alfa Aesar, Karlsruhe	32	Anatase	45
TiO <sub>2</sub> 40 <sup>(b)</sup>	EBI (KIT), Karlsruhe	37	Anatase/ Rutil	62
CB14 <sup>(a)</sup> (Carbon Black)	Evonik, Frankfurt	14	amorph	300

<sup>c</sup> berechnete Oberfläche:

Bei sphärischen Partikeln aus der Stöbersynthese kann die Oberfläche pro Masseinheit (m<sup>2</sup>/g) aus der Oberfläche eines Partikels (A), der Massenkonzentration der Partikellösung (C = 25 mg/ml) und der Partikelanzahl pro mg (N) berechnet werden, dabei ist r der Radius des Partikels (25 nm), m<sub>p</sub> die Masse eines Partikels:

$$(1) \text{ Oberfläche (1/ mg): } A_N = A \times N$$

Dazu wird zunächst die Oberfläche eines Partikels berechnet:

$$(2) \text{ A: Kugeloberfläche: } A = 4 \times \pi \times r^2$$

Des Weiteren muss die Anzahl der Partikel pro ml (N) aus der Dichte berechnet werden:

$$(3) \text{ Volumen eines Partikels (V}_P\text{): } V_P = (4/3 \times \pi \times r^3)$$

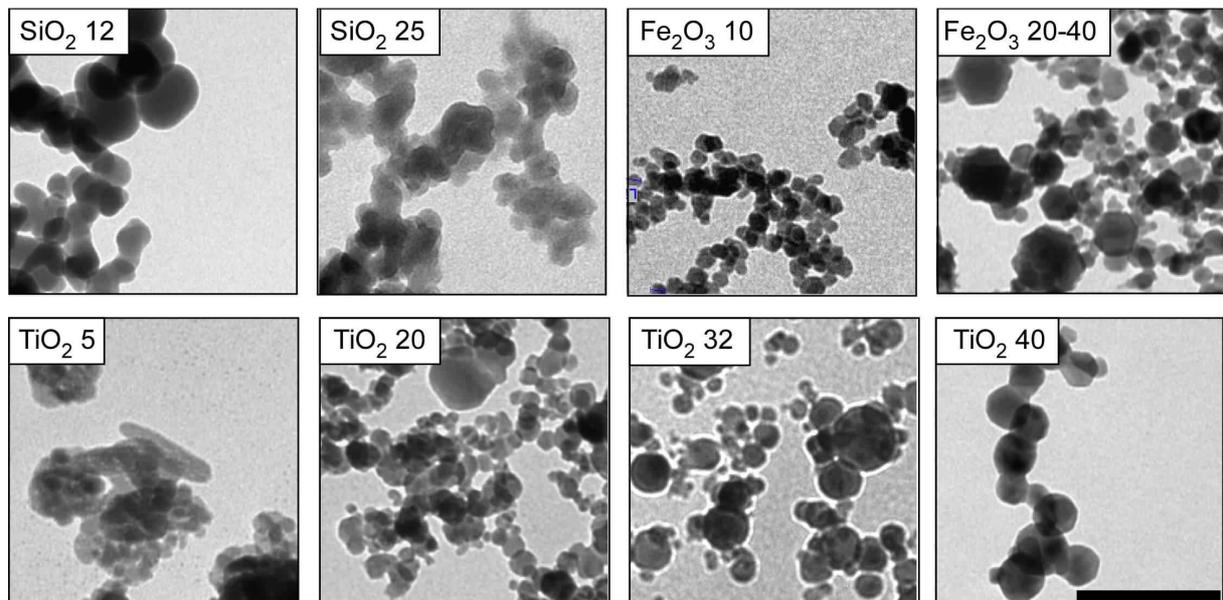
$$(4) \rho: \text{Dichte: } m_p / V_p \Rightarrow m_p = \rho \times V_p$$

$$(5) N = C/m_p$$

### Morphologie und Agglomeration

Zur Untersuchung der Morphologie und Agglomeration wurden die Nanopartikel in deionisiertem Wasser (0,1 mg/ml) verdünnt und auf 75-mesh Formvar® beschichtete Kupfer Netzen (Plano, Wetzlar) getropft. Anschließend wurden sie bei Raumtemperatur getrocknet und unter dem Zeiss EM 109T Transmissionselektronenmikroskop (Oberkochen) analysiert.

Die Partikel waren zum größten Teil sphärisch und stark agglomeriert und sind in Abb. 5 abgebildet.



**Abb. 5 TEM Aufnahmen der verwendeten Nanopartikel.**

Die NP wurden in entionisiertem Wasser resuspendiert und auf beschichtete TEM Netzen aufgetropft, anschließend an der Luft getrocknet und am TEM fotografiert (Maßstab entspricht 100 nm)

### Größe

Die Größe der im Mikrowellen-Plasma erzeugten SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel wurde mittels der Massenspektrometrie bestimmt (Paur et al., 2005). Für die Ermittlung der durchschnittlichen primären Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung der selbsthergestellten Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-10 nm, TiO<sub>2</sub>-20 nm NP und TiO<sub>2</sub>-40 nm NP wurde das hochauflösende Rasterelektronenmikroskop (*high-resolution-scanning electron microscope*, HR-SEM, LEO 1530 Gemini) verwendet. Die

mikroskopische Analyse wurde im Labor für Elektronenmikroskopie am KIT (bei Prof. Gerthsen) durchgeführt. Die Größenangaben der gekauften NP wurden nach Überprüfung am HR-SEM vom Hersteller übernommen. Der Durchmesser der Stöber Synthese Partikel wurde aus der Publikation von Al-Rawi et al. übernommen (Al-Rawi et al., 2011).

#### Spezifische Oberfläche (BET)

Die Bestimmung der spezifischen Oberfläche wurde durch BET (Brunauer, Emmett und Teller) Analyse mittels Stickstoffadsorption durchgeführt.

#### Kristallinität

Informationen über die Kristallinität der selbsthergestellten Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-10 nm NP wurden mit Hilfe des hochauflösenden Transmissionselektronenmikroskops (*high-resolution-transmission electron microscope*, HR-TEM, Philips CM200 FEG / ST) erhalten. Für die Analyse der Kristallstruktur der selbsthergestellten TiO<sub>2</sub>-20 nm und TiO<sub>2</sub>-40 nm Nanopartikel wurde zusätzlich die Feinbereichsbeugung (*selected area electron diffraction*, SAED) durchgeführt.

#### Agglomeration in Suspension

Durch die Dynamische Lichtstreuung (*dynamic light scattering*, DLS) kann der hydrodynamische Radius bzw. der Durchmesser von Partikeln in Suspensionen bestimmt werden. Dabei wird Laserlicht auf die Partikelsuspension gestrahlt, das von den Partikeln dynamisch gestreut wird. Aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung der Partikel in Suspension kommt es zu einer zeitlichen Verschiebung der Intensität des gestreuten Lichts. Diese Fluktuationen werden detektiert und daraus der sogenannte Diffusionskoeffizient D mit Hilfe der Autokorrelationsfunktion bestimmt. Der hydrodynamische Radius für sphärische Partikel oder der Äquivalentradius für nicht sphärische Partikel kann aus der Stokes-Einstein-Gleichung berechnet werden.

$$R = \frac{k \times T}{6 \pi \times \eta \times D}$$

D= Diffusionskoeffizient      k= Boltzmannkonstante      T= absolute Temperatur

η= dynamische Viskosität des Lösungsmittels      r= Partikelradius

Für die Bestimmung des hydrodynamischen Radius wurden Suspensionen in destilliertem Wasser, Medium mit und ohne FCS suspendiert. Alle Medien wurden zunächst mit einem 0,22 µm Spritzenfilter filtriert. Die Medien wurden mit den Partikeln gemischt und bei einer Konzentration von 10 mg/ml mit einem Ultraschallfänger (Branson Sonifier 250, Schwäbisch

Gmünd) für 50 s beschallt. Diese Suspension wurde anschließend weiter in einem Volumen von 5 ml auf 200 µg/ml verdünnt. Für die Messung im DLS Gerät Horiba LB 550 (HORIBA Scientific Instruments, USA) wurde die Suspension gevortext und 3 ml in eine Küvette gegeben. Um den Einfluss der Sedimentation auf die Partikelgröße zu bestimmen, wurde die Messung nach einer Stunde wiederholt ohne die Lösung nochmals zu durchmischen.

### **2.2.3. Vorbereitung der Partikelsuspensionen für Experimente unter submersen Bedingungen**

#### Herstellung der Verdünnungen

Für die Behandlung der Zellen mit Nanopartikelsuspensionen unter submersen Bedingungen wurden 10-30 mg Partikel, die als Pulver vorlagen, zunächst in sterile 15 ml Plastikgefäße eingewogen. Direkt vor der Behandlung wurde Medium mit oder ohne FCS zugegeben, um eine Stammlösung von 10 mg/ml herzustellen. Die Suspensionen wurden gevortext und 50 Sekunden lang mit einer Ultraschallsonde (Branson Sonifier, Schwäbisch Gmünd) mit den Einstellungen, 50 duty cycles und 5 output, beschallt. Danach wurde die Stammlösung auf eine 1 mg/ml Lösung verdünnt aus der alle weiteren Verdünnungen hergestellt wurden.

#### Positiv-Kontrollen

Für die Untersuchung der anti-oxidativen Antwort wurden Cadmiumoxid Partikel (Durchmesser <1 µm, CdO, Merck, Darmstadt) als Positiv-Kontrolle verwendet. Cadmium bzw. CdO Partikel, die Cadmium freisetzen, verursachen oxidativen Stress und führen zur Aktivierung der anti-oxidativen Stressantwort durch Erhöhung der Glutathion- und Hämoxigenase-1-Level (Buckley and Bassett, 1987, Liu et al., 2009). CdO wurde in PBS auf eine Konzentration von 1 mg/ml verdünnt und bei 4 °C gelagert.

Lipopolysaccharid (LPS) von *Pseudomonas aeruginosa* (Sigma, Taufkirchen) wurde als Positiv-Kontrolle für die pro-inflammatorische Antwort verwendet. LPS ist ein Bestandteil von gram-negativen Bakterienzellwänden und löst Entzündungsreaktionen aus (Sylvester et al., 1993, Christman et al., 1998). LPS wurde mit 0,9 % Kochsalzlösung auf 1 mg/ml verdünnt und bei -20 °C gelagert.

Für die Versuche wurden Verdünnungen in Medium mit oder ohne FCS hergestellt. A549 Zellen wurden mit einer Konzentration von 10 µg/ml und RAW264.7 Makrophagen mit 1 µg/ml CdO und LPS behandelt. Die A549 Zellen reagierten weniger sensitiv auf CdO und LPS als die Makrophagen, weshalb eine 10-fach höhere Konzentration verwendet wurde (Erklärung s. Ergebnisse).

### Endotoxin-Test (LAL)

Die Nanopartikel wurden auf Endotoxin-Verunreinigungen mit Hilfe des Limulus Amebocyte Lysate (LAL)-Tests (Lonza, Basel, Schweiz) getestet. Endotoxine, wie z.B. LPS, lösen bei eukaryotischen Zellen Entzündungsreaktionen aus und können das Ergebnis bei der Untersuchung von Nanopartikeln auf Zellen beeinflussen. Der LAL-Test nutzt den ersten Teil einer enzymatischen Reaktion von LAL mit Endotoxin aus und aktiviert ein Enzym, das wiederum p-Nitroanilin (pNA) aus einem synthetischen Substrat freisetzt, was eine gelbe Farbe erzeugt. Für die Bestimmung des Endotoxin Gehalts in den Nanopartikelpulvern wurden Suspensionen mit einer Konzentration von 1 mg/ml in sterilem, destilliertem Wasser hergestellt und bei 20.800xg für 10 min abzentrifugiert. Anschließend wurde der Farbstest durchgeführt. Der Endotoxin Gehalt betrug unter 0,1 Endotoxin units/ml für alle Partikel, weshalb eine Verunreinigung der Partikel durch Endotoxine ausgeschlossen werden konnte.

### **2.2.4. Beschichtung von Siliziumdioxid Partikeln mit Proteinen**

SiO<sub>2</sub>-12 NP Suspensionen von 150 µg/ml wurden in DMEM Medium mit 10 % FCS, 0,5 % oder 1 % BSA bei 37 °C für eine Stunde in 2 ml Eppendorfgläsern inkubiert. Unbeschichtete NP, die mit Medium ohne Proteine inkubiert wurden, dienten als Positiv-Kontrolle. Anschließend wurden die Suspensionen bei 12.000xg zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig abgenommen. Um ungebundene Proteine zu entfernen, wurden drei Waschschriffe mit destilliertem Wasser durchgeführt, indem die NP in 1 ml Wasser pro Waschschriff resuspendiert und bei 12.000xg zentrifugiert wurden. Für die Detektion der Bindung von Albumin an die Partikel wurden 10 µl einer 1:5 Verdünnung des 1.Überstands, 10 µl des 3.Waschschriffs und das Pellet mit den beschichteten Partikeln mit 10 µl des 2x Lyse-Puffers versetzt und auf ein Polyacrylamidgel für die Western Blot Analyse geladen (s. Kap. 2.9). Für die Behandlung von Zellen wurden die beschichteten und unbeschichteten NP auf 50 µg/ml in FCS freiem Medium verdünnt und zu den Zellen zugegeben.

## 2.3. Zellkultur

Die verwendeten Zelllinien stammen aus der Sammlung, der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA). Sie wurden in T75 cm<sup>2</sup> Flaschen in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) bis zu einer Dichte von 90 % im Inkubator (Heraeus, Christ, Fellbach) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchte kultiviert. Mittels des Venor™ GeM Mycoplasma PCR Detection Kits (Minerva biolabs GmbH, Berlin) wurde überprüft, dass die Zelllinien keine Mykoplasmen-Verunreinigung enthielten.

### 2.3.1. Murine Makrophagen Zelllinie RAW264.7

Die murine Makrophagen Zelllinie RAW264.7 stammt aus einem Tumor einer Balb/c Maus, der mittels des Abelson Leukämie Virus induziert wurde. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich passagiert, indem das alte Medium durch 10 ml frisches Medium ersetzt wurde und die Zellen mittels eines Zellschabers abgelöst wurden. Danach wurden jeweils 1-2 x 10<sup>6</sup> Zellen in 20 ml frischem Medium/T75 Flasche weiterkultiviert. Für die Experimente wurden ca. 1,6 x 10<sup>5</sup> Zellen /cm<sup>2</sup> in unterschiedliche Zellkultur Multiwell-Platten ausgesät.

**Tab. 2: Zusammensetzung des Kulturmediums der RAW264.7 Makrophagen**

Komponenten	Bezugsquelle	Volumen / Konzentration
DMEM (+ Natriumpyruvat, +Phenolrot)	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe	500 ml
Penicillin	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe	100 U/ml
Streptomycin	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe	100 mg/ml
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Cölbe	10 %

### 2.3.2. Humane Lungenepithel Zelllinie A549

Die humane Zelllinie A549 wurde 1972 aus dem Lungenkarzinom eines 58-jährigen Mannes isoliert. Dabei handelt es sich um alveoläre-Typ II Lungenepithelzellen, die adhärent wachsen und eine Verdopplungszeit von 24 h haben. Die Zellen wurden einmal wöchentlich passagiert. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 10 ml PBS (-Mg<sup>2+</sup> /-Ca<sup>2+</sup>) gewaschen und mit 2 ml Trypsin (EDTA) von der Zellkulturflasche abgelöst. Um die Enzymreaktion abubrechen, wurde die 5-fache Menge FCS-haltiges Medium zugegeben. Die Zellen wurden bei 200xg abzentrifugiert und nach Entfernen des Trypsin-haltigen Mediums in frischem Medium resuspendiert. 2 x 10<sup>5</sup> Zellen wurden in 20 ml Medium / T75 Flasche weiterkultiviert. Für die Experimente wurden in unterschiedliche Zellkultur Multiwell-Platten ca. 8 x 10<sup>4</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät.

**Tab. 3: Zusammensetzung des Kulturmediums für A549 Zellen**

Komponenten	Bezugsquelle	Volumen / Konzentration
DMEM (+ Natriumpyruvat, +Phenolrot)	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe	500 ml
Penicillin	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe	100 U/ml
Streptomycin	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe	100 mg/ml
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Cölbe	10 %
L-Glutamin	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe	2 mM

### 2.3.3. Einfrieren und Auftauen der Zellen

Die langfristige Lagerung der Zelllinien erfolgte in Flüssigstickstoff bei  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Dafür wurden die Zellen in Medium mit 10 % FCS und 10 % DMSO aufgenommen und jeweils 1 ml Zellsuspension ( $1 \times 10^6$  A549 Zellen oder  $3 \times 10^6$  RAW264.7) in ein Kryogefäß pipettiert. Die Zellen wurden zunächst in ein einem vorgekühltem Isopropanol Behälter bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  über Nacht schonend eingefroren. Anschließend konnten die Zellen in den Flüssigstickstofftank überführt werden. Um die Zellen möglichst schnell und schonend aufzutauen wurden die Kryogefäße auf Eis aus dem Stickstofftank entnommen und in einem Wasserbad bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  zügig aufgetaut. Die Zellen wurden in 10 ml vorgekühltem frischem Medium mit 10 % FCS resuspendiert. Um das DMSO zu entfernen wurden die Zellen bei  $150 \times g$  abzentrifugiert und das Medium abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml kaltem Medium aufgenommen. Für die Kultivierung wurde die Zellsuspension in eine T75 Flasche mit 10 ml bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  vorgewärmtem Medium gegeben.

### 2.3.4. Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl wurde mit Hilfe des CASY® Cell Counters durchgeführt, indem  $200\text{ }\mu\text{l}$  aus der Zellsuspension entnommen und im Verhältnis 1:1000 in der CASY®ton Lösung verdünnt wurden. Über eine Widerstandsmessung konnten die lebenden Zellen von den toten Zellen unterschieden und ausgezählt werden.

## 2.4. Elektronenmikroskopische Aufnahmestudien

Für die Untersuchung der Aufnahme von Nanopartikeln in Zellen wurde die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) verwendet. Der Vorteil der TEM-Analyse gegenüber der Lichtmikroskopie ist eine höhere Auflösung, die benötigt wird, um Strukturen wie Zellorganellen und Nanopartikel, die sich im Nanometerbereich befinden, untersuchen zu können. Die Verbesserung der Auflösung wird dadurch ermöglicht, dass die Wellenlänge von Elektronen kleiner ist, als die vom sichtbaren Licht. Das Prinzip der Bilderzeugung basiert darauf, dass Elektronen beschleunigt und mittels magnetischer Linsen auf eine sehr dünne Probe (nm) gebündelt werden. Die Elektronen gehen entweder direkt durch die Probe durch oder werden elastisch gestreut. Die gestreuten Elektronen werden durch eine Blende abgeschirmt, sodass nur die durchgehenden Elektronen das Bild erzeugen und auf einem Fluoreszenzbildschirm als eine stark vergrößerte Ansicht sichtbar werden.

### 2.4.1. Probenvorbereitung und Einbettung in Epoxidharz

Für die TEM-Analyse von Partikel-behandelten Zellen wurden  $1,5 \times 10^6$  RAW 264.7 Zellen oder  $3,5 \times 10^5$  A549 Zellen auf Transwell-Einsätze ausgesät (Corning Nr.3412, 24 mm Polycarbonat-Membranen mit  $0,4 \mu\text{m}$  Porendurchmesser). Nach der Behandlung mit Partikeln wurde das Medium entfernt und die Membran mit 0,1 M Piperazin-N, N'-Bis (2-ethansulfonsäure) (PIPES-Puffer, pH 7,0) gewaschen. Für die weitere Probenaufbereitung wurden zunächst kleine Membranstücke, auf dem sich der Zellrasen befand, mittels eines Biopsy Punches ausgestanzt und in 0,5 ml Eppendorf Gefäße zur Fixierung mit 1,25 % Glutaraldehyd, 2 % Paraformaldehyd, 0,1 %  $\text{NaN}_3$  in 0,1 M PIPES-Puffer für mindestens 24 h überführt. Nach einem weiteren Waschschrift mit PIPES-Puffer erfolgte die Kontrastierung und Nachfixierung für 1 h bei  $4^\circ\text{C}$  mit 0,5 % Osmiumtetroxid in 0,1 M PIPES-Puffer mit 0,8 % Kaliumferricyanid und ein erneuter Waschschrift mit PIPES-Puffer. Um die Kontrastierung der Membranen und der DNA zu erhöhen sowie zur Vermeidung des Nachkontrastierens der Ultradünnschnitte wurde die en bloc Färbung für 1-2 h mit 2 % Uranylacetat in 25 % Ethanol angewendet. Im Anschluss wurden die Proben mittels einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (50 %, 70 %, 90 %, 95 %) jeweils zweimal 10 min entwässert. Für die schrittweise Überführung der Proben in das Epoxidharz EPON 812 (Polysciences, Eppelheim) wurden die Proben zunächst viermal 15 min in getrocknetem Ethanol inkubiert. Anschließend folgte die Inkubation für 1 h in einem Gemisch aus 30 % EPON und 70 % Propylenoxid und über Nacht mit 70 % EPON und 30 % Propylenoxid. Im letzten Schritt wurden die Proben mit 100 % EPON 6 h lang inkubiert. Die im Epoxidharz eingebetteten Proben wurde nun drei Tage bei  $60^\circ\text{C}$  im Inkubator in speziellen Silikonförmchen ausgehärtet.

#### **2.4.2. Herstellung von Ultradünnschnitten und Mikroskopie**

Um die Analyse am TEM zu ermöglichen wurden die EPON Blöckchen mit den eingebetteten Zellen zunächst am Mikrotom getrimmt. Erst anschließend wurden 70 nm dicke Ultradünnschnitte mittels eines Ultramikrotoms (Leica EM UC6k, Solms) hergestellt. Diese Schnitte wurden auf Kupfer Grids gesammelt, sodass die Zellen am TEM (Zeiss, EM109T, Oberkochen) fotografiert werden konnten.

#### **2.5. AlamarBlue Assay - Zellvitalitätstest**

Die Bestimmung der Zellvitalität wurde in 24-Well-Platten durchgeführt, wobei  $1,6 \times 10^5$  A549 Zellen/Well bzw.  $3 \times 10^5$  RAW264 Makrophagen/Well einen Tag vor dem Experiment ausgesät wurden. Vor der Inkubation mit den Partikeln wurde das Medium abgenommen und die Zellen für die Behandlung in Medium ohne FCS mit PBS gewaschen. Die Partikel wurden einerseits in Medium mit 10 % FCS und andererseits in Medium ohne FCS suspendiert und entsprechend verdünnt. Die Behandlung mit den Partikeln im jeweiligen Medium erfolgte für 24 h. Um aus dem Überstand die Partikel zu entfernen, wurden danach die Platten bei 150xg für 5 min abzentrifugiert und das Medium für den LDH Assay abgenommen. Anschließend wurde das AlamarBlue Reagenz (AbD Serotec, Düsseldorf) auf die Zellen gegeben. Das AlamarBlue Reagenz wurde im Verhältnis 1:20 (v / v) mit HBSS verdünnt und für 1,5 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mit den Zellen inkubiert. Der Farbstoff Resazurin wird durch die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen zu dem fluoreszierenden Produkt Resorufin reduziert. Die Fluoreszenz wurde bei einer Anregungswellenlängen von 580 nm und einer Emissionswellenlänge von 620 nm mittels des Fluoreszenz-Readers Bio-Tec FL600 und der KC4 Software (MWG-Biotech AG, Ebersberg) gemessen bzw. ausgewertet. Von den Fluoreszenz-Intensitäten aller Proben wurde der Blindwert (nur AlamarBlue Reagenz) von allen Werten abgezogen und anschließend die Fluoreszenz-Intensitäten der Partikel-exponierten Zellen auf die der unbehandelten Zellen normiert.

#### **2.6. Bestimmung der Membranintegrität anhand des LDH Assays**

Der Überstand aus den Zellvitalitätstests wurde gesammelt, um darin die Freisetzung des zytoplasmatische Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) ins Medium zu bestimmen. Anhand der Aktivitätsmessung des Enzyms LDH wurde die Membrandurchlässigkeit d.h. die Schädigung der Membran bzw. der nekrotische Zelltod ermittelt. Dazu wurde das LDH Detection Kit (Roche, Mannheim) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Hierbei setzt das Enzym LDH das Tetrazolium Salz INT (Iodonitrotetrazoliumchlorid) in das rote Formazan um. Zur Detektion des Farbumschlags bei einer Absorption von 450 nm wurde

das Photometer VersaMax für die Auswertung die Software SoftmaxPro (Molecular Devices, Ismaning) verwendet. Die relative Menge des freigesetzten LDH wurde auf die LDH-Gesamtmenge, die von vollständig lysierten Zellen bestimmt wurde, normalisiert. Die Lyse der Zellen wurde für 1 h mit 1 % TritonX-100 durchgeführt.

## 2.7. DCF-Assay zur Ermittlung von reaktiven Sauerstoffspezies

Die intrazellulär gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies wurden nach Partikel Behandlung mittels des DCF-Assays bestimmt. Die Messung basiert auf der Oxidation des nicht-fluoreszierenden Farbstoffs H<sub>2</sub>DCF-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein Diacetat, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) zum fluoreszierendem Dichlorofluorescein (DCF) in Gegenwart verschiedener ROS und RNS. Zu den detektierbaren ROS gehören das Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), das Hydroxylradikal ( $\cdot$ OH), das Peroxylradikal ( $\cdot$ O<sub>2</sub>R), das Alkoxyradikal ( $\cdot$ OR), das Hypochlorit-Anion (OCl<sup>-</sup>) sowie das Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>), jedoch nicht das Superoxid-Anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Die Oxidation durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wird in Gegenwart einer Peroxidase aus dem Zytosol vermittelt. Der Farbstoff H<sub>2</sub>DCF-DA diffundiert durch die Zellmembran und wird durch Esterasen deacetyliert, sodass er nicht mehr aus den Zellen diffundieren kann. Dadurch wird gewährleistet, dass nur der Farbstoff innerhalb der Zellen bei der Messung hauptsächlich ins Gewicht fällt. Für die Analyse wurden zunächst einen Tag vor dem Experiment 2,5 x 10<sup>4</sup> A549 Zellen/Well und 5,0 x 10<sup>4</sup> RAW264.7 Makrophagen/Well in 96-Well-Platten ausgesät. Für die Behandlung wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit verschiedenen NP Suspensionen für 3 h und 24 h inkubiert. Danach wurden die Zellen mit HBSS gewaschen und mit 50 µM des DCF-Farbstoffs in HBSS für 40 min beladen. Anschließend wurden die Zellen erneut zweimal mit HBSS gewaschen, um Partikel und extrazelluläres DCF wegzuwaschen und in 100 µl/Well HBSS für 2 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die relative Fluoreszenz wurde bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm mit einem automatisierten Fluoreszenz-Reader (MWG-Biotech AG, Ebersberg) gemessen.

## 2.8. Expressionsanalyse der anti-oxidativen und pro-inflammatorischen Gene

### Prinzip der quantitativen RT-PCR

Die Untersuchung der Zielgene der anti-oxidativen und pro-inflammatorischen Antwort wurde mittels der quantitativen Real-time PCR (Polymerasenkettenreaktion) vorgenommen. Die Quantifizierung der Expression ausgewählter Zielgene beruht auf dem Prinzip der Messung

der Fluoreszenz in Echtzeit während einer PCR. Bei der PCR wird mittels spezifischer Primer (Oligonukleotide) nur die umgeschriebene mRNA der Zielgene als cDNA in mehreren Zyklen amplifiziert. Während der Amplifikation wird der Matrizen-Strang (Template) kopiert, wobei doppelsträngige DNA Stücke entstehen. Sobald an diese doppelsträngige DNA der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green bindet, wird bei entsprechender Anregung Fluoreszenzlicht emittiert. Die PCR verläuft hierbei in drei Phasen (exponentielle, lineare, und Plateauphase). Die Quantifizierung kann nur unter der Voraussetzung erfolgen, dass das Fluoreszenzsignal zur Menge der PCR Produkte proportional zunimmt. Während der exponentiellen Phase der PCR findet exakt in jedem Zyklus eine Verdopplung der DNA statt. Dagegen findet in der linearen Phase nicht mehr in jedem Zyklus eine Verdopplung statt und in der Plateauphase kommt die Reaktion, aufgrund des Verbrauchs der eingesetzten Komponenten komplett zum Erliegen. Für die Quantifizierung wird der sogenannte Schwellenwertzyklus (Ct) während der exponentiellen Phase der PCR für jedes Gen in einer Doppelbestimmung ermittelt. Dieser Wert gibt denjenigen Zyklus während der PCR an, bei dem das Fluoreszenzsignal über das Hintergrundsignal steigt. Je mehr DNA eines Gens in der Probe enthalten ist, desto niedriger ist der Schwellenwertzyklus. Anschließend wird in der Schmelzkurvenanalyse die Fluoreszenzabnahme während der Denaturierung der PCR-Produkte gemessen, um die Spezifität der PCR-Produkte zu bestätigen. Hierbei ergibt ein spezifisches PCR-Produkt bei einer bestimmten Temperatur einen Peak. Dagegen zeigen mehrere Peaks unspezifische Produkte an.

### Quantifizierungsmethode

Mit Hilfe eines sogenannten *House-keeping* Gens (Referenz-Gen), das unabhängig von der Behandlung konstitutiv exprimiert wird, kann die Expressionsstärke ausgewählter Zielgene quantifiziert werden. Hierbei werden zunächst die Ct-Werte der Zielgene auf den Ct-Wert des Referenzgens in jeder Probe normalisiert (Formel (1)), um die Effizienzunterschiede bei der Amplifikation zu korrigieren. Anschließend werden die Werte auf die unbehandelte Kontrollprobe normiert (Formel (2)) und aufgrund der Verdopplung der DNA in jedem Zyklus wird anhand der Formel (3) die Expressionsstärke berechnet.

Die Auswertung der Messungen wurde mit der delta-delta Ct Methode nach Pfaffl *et al.* durchgeführt (Pfaffl, 2001).

Formeln:

- 1)  $\Delta Ct = Ct_{(\text{Zielgen})} - Ct_{(\text{Referenzgen})}$
- 2)  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{Behandlung})} - \Delta Ct_{(\text{unbehandelte Kontrolle})}$
- 3)  $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$

Behandlungsprotokoll

7,5 x 10<sup>5</sup> A549 Zellen und 1,5 x 10<sup>6</sup> RAW264.7 Makrophagen wurden in 6-well Platten bzw. 3 cm Petri-Schalen ausplattiert und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Vor der Behandlung mit Nanopartikelsuspensionen wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. In jede Schale wurden 2 ml Medium mit oder ohne 10 % FCS vorgelegt und danach eine dreifach konzentrierte Partikelsuspension zugegeben. Im Anschluss wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert, die mRNA in cDNA umgeschrieben und die relative mRNA Expression der Zielgene anhand spezifischer Primer quantifiziert.

**2.8.1. Primer Sequenzen**

Alle Primer Sequenzen wurden mit Hilfe von NCBI-Primer Blast entworfen und bei Metabion (Martinsried) synthetisiert. Nur die Primer für die humane katalytische Untereinheit der  $\gamma$ -Glutamat-Cystein-Ligase ( $\gamma$ GCLC) wurden von Qiagen (Hilden) bezogen, weshalb keine Sequenz angegeben werden kann.

**Tab. 4: Primer Sequenzen**

Gene		human	murin
$\beta$ -Actin	Forward	ACAGAGCCTCGCCTTTGCCG	CCACCCGCGAGCACAGCTTC
	Reverse	TGGGCCTCGTCGCCACATA	TGCTCTGGCCTCGTCACCC
HO-1	Forward	TTCTCCGATGGGTCCTTACACT	GCCACCAAGGAGGTACACAT
	Reverse	GGCATAAAGCCCTACAGCAACT	GCTTGTTCGCTCTATCTCC
NQO1	Forward	GGGATCCACGGGGACATGAATG	TGAGCCCAGATATTGTGGCC
	Reverse	ATTTGAATTCGGGCGTCTGCTG	GCAGCATATGTGTAGGCAAATCC
$\gamma$ GCLC	Forward	Bei Qiagen, Hilden bezogen	GGATTCCGGATGGGCAAC
	Reverse	Bei Qiagen, Hilden bezogen	CTGACACGTAGCCTCGGTAAAAT
iNOS	Forward	Nicht getestet	GAGCAACTACTGCTGGTGGTGA
	Reverse	Nicht getestet	GAGGGTACATGCTGGAGCCA
COX-2	Forward	GGAACACAACAGAGTATGCCG	ACGAAGGAACTCAGCACTGCA
	Reverse	AAGGGGATGCCAGTGATAGA	ACATGGATTGGAACAGCAAGG
IL-6	Forward	TCTCCACAAGCGCCTTCG	TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC
	Reverse	CTCAGGGCTGAGATGCCG	GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG
IL-8	Forward	GAATGGGTTTGCTAGAATGTGATA	In Maus nicht vorhanden
	Reverse	CAGACTAGGGTTGCCAGATTTAAC	In Maus nicht vorhanden
IL-1 $\beta$	Forward	Nicht getestet	AAGTTGACGGACCCCAAAAGA
	Reverse	Nicht getestet	CACAGCTTCTCCACAGCCAC
TNF- $\alpha$	Forward	GAGCAGTGAAAGCATGATCC	GGTGCCTATGTCTCAGCCTCTT
	Reverse	CGAGAAGATGATCTGACTGCC	GTGAGGGTCTGGGCCATAGA

<b>GAPDH</b>	Forward		CTGAGGACCAGGTTGTCTCC
<b>Referenz</b>	Reverse		TGTGAGGGAGATGCTCAGTG
<b><math>\beta</math>-Actin</b>	Forward	CTCCTGAGCGCAAGTACTCC	
<b>Referenz</b>	Reverse	GTCACCTTCACCGTTCCAGT	

### 2.8.2. mRNA Aufreinigung

Nach der Behandlung mit den NP wurde der Überstand verworfen und die Zellen mit 1 ml PBS auf Eis gewaschen. Die Lyse der Zellen und die Aufreinigung der Gesamt-RNA wurde mit peqGold RNApure Reagenz (Peqlab, Erlangen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden die zellulären Proteine in einer Phenol-Chloroform Emulsion mit Guanidin-isothiocyanat denaturiert und anschließend RNA, DNA und Proteine nach ihrer Löslichkeit aufgetrennt. Durch das Vermischen von Phenol mit Chloroform wurden eine obere wässrige Phase, eine mittlere Interphase und eine untere organische Phase gebildet. Die RNA befand sich durch ihre Phosphatgruppen in der oberen wässrigen Phase. Die genomische DNA hingegen sammelte sich in der Interphase an und die wasserunlöslichen Proteine in der organischen unteren Phase. Die RNA in der oberen wässrigen Phase wurde mit Glykogen und Isopropanol gefällt. Das extrahierte RNA Pellet wurde mit 15-20  $\mu$ l DEPC Wasser (Merck, Darmstadt) bei 65 °C für 5 min gelöst. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde mittels des Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA) bei einer Absorption von 260 nm und 280 nm bestimmt. Die Lagerung der RNA-Lösung erfolgte bei -80 °C.

### 2.8.3. cDNA Herstellung

Zur Herstellung der cDNA wurden 2  $\mu$ g extrahierter RNA verwendet und mittels der Reversen Transkriptase in cDNA (copyDNA) umgeschrieben. Um Verunreinigungen durch ge-nomische DNA in den Proben auszuschließen, wurden gleichzeitig Ansätze mit 0,5  $\mu$ g RNA ohne Reverse Transkriptase durchgeführt. Die Synthese erfolgte in verschiedenen Schritten, wobei zunächst die Primer zusammen mit der RNA bei 70 °C denaturiert wurden und anschließend nach einem Kühlschritt die Zugabe der Reversen Transkriptase, des RNase Inhibitors und des dNTP-Mix erfolgte. Abschließend wurde die synthetisierte cDNA im Verhältnis 1:10 mit DEPC Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert. Durch die RNase H Aktivität der Reversen Transkriptase wurde die RNA vom neu synthetisierten cDNA Strang getrennt, sodass dieser für die folgende PCR frei lag.

**Tab. 5: Komponenten für einen 40 µl Ansatz für die Reverse Transkription**

Komponente	Volumen	Bezugsquelle
2 µg RNA	X µl	
dNTP-Mix (10 mM)	4 µl	Promega, Mannheim
Random Primer (100 pmol)	1 µl	Metabion, Martinsried
5x Puffer	8 µl	Fermentas, St.Leon-Rot
Reverse Transkriptase (200 u/ µl)	2 µl	Fermentas, St.Leon-Rot
RiboLock RNase-Inhibitor (40 u/ µl)	1 µl	Fermentas, St.Leon-Rot
DEPC H <sub>2</sub> O	X µl	Roth, Karlsruhe

**Tab. 6: Parameter für die Herstellung der cDNA durch Reverse Transkription**

Schritt	Zeit
1. Denaturierung bei 70 °C	5 min
2. Annealing bei 25 °C	10 min
3. Elongation bei 42 °C	60 min
4. Abstoppen bei 70 °C	10 min

#### 2.8.4. Qualitätsprüfung der cDNA

Um die Abwesenheit genomischer DNA in der aufgereinigten RNA (Proben ohne Reverse Transkriptase) und der daraus synthetisierten cDNA (Proben mit Reverser Transkriptase) sowie die Effizienz der Synthese zu überprüfen, wurde eine sogenannte Qualitäts-PCR mit spezifischen Primern gegen Referenzgene wie  $\beta$ -Actin bei A549 und GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) bei RAW264.7 Makrophagen durchgeführt. Die Amplifikation der DNA erfolgte mittels Taq-Polymerase (Promega, Mannheim) und wurde in der Eppendorf PCR-Maschine durchgeführt. Das PCR Produkt wurde auf ein 1,5 %-iges Agarosegel in 1x TBE Puffer, das Ethidiumbromid enthielt, geladen und bei 100 V 45 min elektrophoretisch aufgetrennt.

**Tab. 7: Komponenten für einen 25 µl Ansatz der Qualitäts-PCR**

Komponenten	Menge
Template DNA	5 µl
GoTaqReaction Puffer	5 µl
dNTP-Mix (10 mM)	0,5 µl
Forward Primer (10 pM)	1,25 µl
Reverse Primer (10 pM)	1,25 µl
Taq- Polymerase (5 u/ µl)	0,25 µl
DEPC H <sub>2</sub> O	11,75 µl

**Tab. 8: Ablauf der Qualitäts-PCR**

Schritte	Zeit
Denaturierung bei 94 °C	2 min
Denaturierung bei 94 °C	30 s
Annealing bei 56 °C	30 s
Elongation bei 72 °C	45 s
Elongation bei 72 °C	5 min
Pause bei 8 °C	∞


 24 Zyklen

**Tab. 9 Zusammensetzung des 5x TBE Puffers für das Agarosegel**

Komponenten	Konzentration
Tris	445 mM
Borsäure	445 mM
EDTA (pH 8,0)	10 mM

### 2.8.5. Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR)

Das Reagenz QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen, Hilden) wurde nach Herstellerangaben für die quantitative RTPCR verwendet. Das Reagenz enthielt eine DNA Polymerase (Hot-StarTaq DNA-Polymerase) und einen Nukleotid-Mix sowie den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green zur Detektion der Amplifikation. Die folgenden Komponenten wurden zusätzlich zugegeben.

**Tab. 10: RT-PCR Komponenten für einen 20 µl Ansatz**

Komponente	Volumen
DNA Template	5 µl
Forward Primer (10 pmol)	1 µl
Reverse Primer (10 pmol)	1 µl
SYBR Green Reagenz	13 µl

Die Messung erfolgte am ABI StepOne Plus (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) und die Auswertung mit der StepOne Plus Real Time PCR Software (Applied Biosystems, Carlsbad, USA). Im Anschluss an die PCR wurden die Schmelzkurven bestimmt, indem die Temperatur schrittweise um 0,5 °C von 60 °C auf 95 °C erhöht wurde. Zum einen wird auf diese Weise die Spezifität der entstandenen Genprodukte mittels eines schmalen Peaks bei einer bestimmten Temperatur festgestellt. Zum anderen können mögliche Verunreinigungen durch Primer Dimere detektiert werden, da diese aufgrund ihrer kurzen Länge schon bei 60 °C und die DNA Stücke der Zielgene erst ab 70 °C schmelzen.

**Tab. 11: Parameter der 2-Schritt-RT-PCR Reaktion**

Schritte	Zeit
Denaturierung bei 95 °C	15 min
Denaturierung bei 95 °C	15 s
Annealing und Extension bei 60 °C	30 s
Denaturierung bei 95 °C	15 s
Elongation bei 60 °C	1 min
Schmelzkurvenanalyse 60 °C – 95 °C, 0,5 °C	X min
Denaturierung bei 95 °C	15 s



40 Zyklen

## 2.9. Proteinanalyse

### 2.9.1. Antikörper

**Tab. 12: Verwendete Antikörper**

<b>Primär-Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Anti-phospho-Akt (Ser473)	1:1000	Cell Signaling, Frankfurt am Main
Anti-phospho-p38 (Thr180/Tyr182)	1:1000	Cell Signaling, Frankfurt am Main
Anti-phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	1:1000	Cell Signaling, Frankfurt am Main
Anti-Akt 1/2/3 (H136)	1:1000	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-p38 (C-20)	1:1000	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-JNK2 (D2)	1:1000	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-BSA (B-140)	1:1000	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-COX-2 (160126)	1:1000	Biozol, Eching
Anti-HO-1 (H105)	1:2000	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-PCNA (PC-10)	1:5000	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Lamin B (M-20)	1:1000	Santa Cruz, Heidelberg

<b>Sekundär-Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Anti-mouse-HRP	1:5000	DAKO, Hamburg
Anti-goat-HRP	1:5000	DAKO, Hamburg
Anti-rabbit-HRP	1:5000	DAKO, Hamburg
Anti-mouse-IRDye 800	1:5000	Biomol, Hamburg
Anti-rabbit-IRDye 680	1:5000	Biomol, Hamburg

### 2.9.2. Herstellung eines Gesamtzellextrakts

Für die Lyse der Zellen wurde ein denaturierender und reduzierender Lysepuffer verwendet. Das Medium über den Zellen wurde nach der Behandlung mit NP abgenommen und die Zellen in einer entsprechenden Menge Puffer aufgenommen. Daraufhin wurden die Lysate bei 95 °C für 5 min gekocht, um die Proteasen und alle weiteren Proteine zu denaturieren. Bevor die Proben auf das Polyacrylamidgel geladen werden konnten, wurden sie noch mit Ultraschallpulsen mit einem Ultraschallfinger (Branson Sonifier, USA) behandelt, um die DNA und Membranen zu zerkleinern.

**Tab. 13: Zusammensetzung des 4x Lysepuffers**

Komponenten	Menge
1 M Tris HCl (pH 6,8)	12,5 ml
H <sub>2</sub> O	17,5 ml
Glycerin	20 ml
SDS	4 g
Bromphenolblau	25 mg
β-Mercaptoethanol	10 %

### 2.9.3. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte mittels Elektrophorese im diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Dabei wandern die Proteine, die nach SDS Behandlung stark negativ geladen sind, im elektrischen Feld durch das Gel. Das Gel besteht aus einem 4 %-igen Sammelgel und einem 10 %-igen Trenngel. Die Proteine werden im grobporigen Sammelgel zunächst aufkonzentriert und anschließend im engporigen Trenngel nach ihrer Größe aufgetrennt, sodass ein Bandenmuster entsteht, wobei die kleinen Proteine schneller und die großen Proteine langsamer durch das Gel wandern. Für die Größenbestimmung wurde zusammen mit den Proben ein Proteinmarker (PAGERuler, Fermentas) geladen.

**Tab. 14: Zusammensetzung des 4 %-igen Sammelgels**

Komponenten	Menge
Rotiphorese (Acrylamid)	4 %
SDS	0,1 %
Tris HCl (pH 6,8)	125 mM
TEMED	0,01 %
APS	0,1 %

**Tab. 15: Zusammensetzung des 10 % igen Trenngels**

Komponenten	Menge
Rotiphorese (Acrylamid)	10 %
SDS	0,1 %
Tris HCl (pH 8,8)	375 mM
TEMED	0,01 %
APS	0,1 %

#### 2.9.4. Western Blot

Die Detektion der ausgewählten Proteine erfolgte mittels der immunologischen Nachweismethodik. Dafür wurden die Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine hydrophobe PVDF (Polyvinylidendifluorid) Membran im sogenannten Western-Blot Verfahren nach Herrmann und Wiche (1987) transferiert. Die Membran wurde für die Aktivierung der Proteinbindestellen mit Methanol kurz inkubiert. Die PVDF Membran und das Gel wurden zwischen zwei Whatman Papiere und zwei Schwämmchen gepresst und anschließend in einer Kassette justiert. Der Transfer fand im gekühlten Blot-Puffer bei 100 V und 200-400 mA für 1 h in einem Tank (Biorad, München, Deutschland) statt.

**Tab. 16: Zusammensetzung des Blot-Puffers**

Komponenten	Menge
Methanol (v/v)	10 %
Glycin	200 mM
Tris Base	25 mM

Nach dem Transfer wurde die Membran mit 5 % Milch in TBS-T Puffer (pH 7,6) für 1 h inkubiert, um unspezifische Bindestellen auf der Membran mit Milchproteinen zu blockieren. Für die Inkubation mit den Primärantikörpern gegen die phosphorylierte Proteinform wurde die Membran zweimal 10 min mit TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit anti-phospho-Antikörpern erfolgte in einer 3 %-igen BSA-TBS-T Lösung auf einem Schüttler über Nacht bei 8 °C. Die Inkubation mit allen anderen Primärantikörpern erfolgte direkt im Anschluss an den Blockierungsschritt in einer 5 %-igen Milch TBS-T Lösung auf einem Schüttler über Nacht bei 8 °C. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran erneut dreimal 10 min mit TBS-T gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Für die Detektion des spezifischen Primärantikörpers wurde die Membran mit einem Sekundärantikörper für 1 h bei

Raumtemperatur auf einem Schüttler in 5 % Milch in TBS-T inkubiert. Der Sekundärantikörper ist an die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt und gegen die entsprechende Spezies des Primärantikörpers gerichtet. Es folgten erneut drei Waschschrte à 10 min mit TBS-T, um ungebundenen Antikörper zu entfernen bevor das Detektionsverfahren durchgeführt wurde.

**Tab. 17: Zusammensetzung des 1x TBS-T Puffers (pH 7,6)**

Komponenten	Menge
NaCl	150 mM
TrisBase	20 mM
Tween	0,1 %

### 2.9.5. Detektion mittels ECL (enhanced chemiluminescence)

Mit Hilfe des Sekundärantikörpers, der an die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist, können die ausgewählten Proteine spezifisch nachgewiesen werden. Die Peroxidase oxidiert das ECL-Substrat Luminol / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unter Aussendung von Chemilumineszenz. Das Lichtsignal kann mit Hilfe von lichtempfindlichen Filmen detektiert werden. Deshalb wurde die Membran nach der Inkubation mit den Antikörpern mit dem ECL-Substrat nach Herstellerangaben für zwei Minuten inkubiert. Die überschüssige Lösung wurde mit einem Tuch aufgesaugt und das Lichtsignal im Dunkeln für eine Dauer von 30 s bis zu einer Stunde je nach Protein durch das Auflegen eines Films (GE Healthcare, Freiburg) detektiert. Der Film wurde im Anschluss bis zur Erkennung der Banden entwickelt und fixiert.

### 2.9.6. Detektion mittels des Odyssey Verfahrens

Das Odyssey Verfahren wurde nur für die Detektion von HO-1 (36 kDa) und PCNA (34 kDa) verwendet. Dieses Verfahren ermöglicht es zwei Proteine, die sich nur gering durch ihr Molekulargewicht unterscheiden, gleichzeitig auf einer Membran zu detektieren und zu quantifizieren. Dabei werden Sekundärantikörper verwendet, die an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind, die im Infrarot Bereich emittieren. Außerdem müssen die Primärantikörper in zwei unterschiedlichen Spezies hergestellt worden sein, damit es zu keiner Kreuzreaktion kommt. Um die Proteine auf einer Membran besser unterscheiden zu können, werden Sekundärantikörper mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen benutzt und mit einem Infrarot Scanner gescannt. Die Proben wurden nach der elektrophoretischen Auftrennung mittels SDS-PAGE auf eine spezielle Membran, die eine geringe Autofluoreszenz besitzt (Immobilon-FL™ PVDF Transfer Membranes, Millipore, Schwalbach) geblottet. Das Blocken der Membran und die Inkubation mit den Primär- und Sekundärantikörper wurde im Odyssey-

Blocking Puffer (LICOR, Biosciences, Bad Homburg) durchgeführt. Für die Waschschritte wurde das TBS-T verwendet. Der letzte Waschschritt vor dem Scannen wurde hingegen in TBS ohne Tween durchgeführt, da Tween die Hintergrundfluoreszenz erhöhen kann. Die Membranen wurden mit dem Odyssey® *Infrared Imager* und der Software Odyssey® Software (LICOR, Biosciences, Bad Homburg) gescannt und ausgewertet und danach in PBS im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

### 2.9.7. Strippen der Membranen nach ECL-Detektion

Für die Bestimmung der geladenen Proteinmenge wurden die nicht-phosphorylierten Formen der Zielproteine sowie unabhängig regulierte und konstitutiv exprimierte Proteine wie PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) und Lamin B nachgewiesen. Die sogenannten Ladekontrollen können auf den bereits verwendeten Membranen detektiert werden. Dazu werden die gebundenen Antikörper und die Peroxidase mittels der Strippingmethode entfernt. Das Strippen erfolgte nach ECL-Detektion und zwei Waschritten à 10 min in TBS-T mittels einer Stripping-Lösung für 20 min im Dunkeln nach Herstellerangaben (Restore Western Blot Stripping Buffer, Thermo Fisher Scientific, Dreieich).

### 2.9.8. Detektion der an SiO<sub>2</sub> NP gebundenen Proteine mittels Coomassie Färbung

Die Visualisierung aller an SiO<sub>2</sub>-NP gebundenen Proteine, die mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran geblottet wurden (0) erfolgte durch Coomassie Färbung. Dabei bindet der Farbstoff an die basischen Seitengruppen der Aminosäureketten und macht somit alle Proteine sichtbar. Im Anschluss an das Blotting Verfahren wurde die Membran mit einer Färbelösung mit Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) für 1 min gefärbt. Anschließend wurde die Membran 10 min in einer Entfärbelösung geschwenkt, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen, und mit Wasser gespült. Vor dem Scannen (EPSON, Meerbusch) wurde die Membran an der Luft getrocknet.

**Tab. 18: Zusammensetzung der Coomassie-Färbelösung**

Komponenten	Menge
Coomassie Brilliant Blue G-250	0,25 % (w/v)
Methanol	40 % (v/v)
Essigsäure	7,5 % (v/v)

**Tab. 19: Zusammensetzung der Entfärberlösung**

Komponenten	Menge
Methanol	40 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)

## 2.10. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Sekretion der Entzündungsmediatoren IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  wurde mittels des Enzym-Immunoassays (Sandwich-ELISA) im Medium nach Partikel Behandlung nachgewiesen und quantifiziert. Die Detektion der Proteine, die ins Medium freigesetzt werden, basiert auf der spezifischen Bindung der Zielproteine an einen immobilisierten Antikörper in einer 96-Well Platte. Zunächst wird eine 96-Well Platte (MaxiSorp™ Thermo Scientific, Dreieich) mit dem Capture-Antikörper, der spezifisch an das Antigen des Zielproteins bindet, beschichtet. Anschließend findet die Inkubation mit den Proben statt. Für die Erkennung der gebundenen Zielproteine wird ein Detektionsantikörper, d.h. ein Primärantikörper der an Biotin gebunden ist verwendet. Der Detektionsantikörper kann an verschiedene Antigene des Zielproteins binden und dient somit der Verstärkung des Signals. Im nächsten Schritt wird Avidin, gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase, zugegeben, das eine feste Verbindung mit dem Biotin eingeht. Durch Zugabe eines Substrats / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, das durch die Peroxidase oxidiert wird und seine Farbe ändert, kann die vom Zielprotein abhängige Farbstärke photometrisch detektiert werden. Für die Quantifizierung wird gleichzeitig mit den Proben eine Standardreihe mit bekannten Konzentrationen des Zielproteins auf der Platte inkubiert und anhand dessen kann die Menge des Proteins ermittelt werden.

Für die Untersuchung der freigesetzten Entzündungsmediatoren wurden  $1,6 \times 10^5$  A549 Zellen/Well bzw.  $3 \times 10^5$  RAW264 Makrophagen/Well mit NP in 24 Well-Platten für 24 h inkubiert. Danach wurden die Platten für 5 min bei 150xg abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser wurde entweder sofort analysiert oder bei -20 °C eingefroren. Die Analysen wurden mittels spezies-spezifischer OptEIA ELISA-Kits (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt.

## 2.11. Exposition von humanen Lungenepithelzellen an der Luft- / Flüssigkeitsgrenzschicht (ALIDA Experimente)

Um Veränderungen der Eigenschaften von Nanomaterialien aufgrund von Testmedien zu verhindern, wurde in dieser Arbeit eine neue Applikationsmethode für die Zellkultur verwendet und weiterentwickelt. Diese Methode soll die Exposition in der Lunge realistischer nachstellen und ermöglicht es zusätzlich die exakte Dosis der applizierten Nanomaterialien zu bestimmen. Dabei werden Nanomaterialien nicht in wässrigen Suspensionen auf die Zellen gegeben, sondern in einem Aerosol an der Luft-Flüssigkeitsgrenzschicht mit den Zellen in Kontakt gebracht (Aufderheide and Mohr, 2004). Dafür müssen zunächst gut charakterisierte und definierte Aerosole hergestellt werden. Für die Herstellung von definierten Aerosolen und die Bereitstellung der Expositions-kammer, sowie die Bestimmung der deponierten Dosis mittels TEM-Analyse waren das Institut für Meteorologie und Klimaforschung (IMK) sowie das Institut für Technische Chemie (ICT-TAB) am Karlsruher Institut für Technologie verantwortlich. Die Wirkmechanismen von zwei unterschiedlichen SiO<sub>2</sub>-NP Aerosolen wurden in A549 Zellen anhand ausgewählter biologischer Endpunkte untersucht. Hierbei wurden die 12 nm SiO<sub>2</sub>-NP (Aerosil®200) verwendet, da mit Hilfe der Untersuchungen unter submersen Bedingungen bereits geeignete biologische Endpunkte definiert werden konnten. Auf diese Weise wurde ein Vergleich der beiden Expositionsmethoden angestrebt. Zusätzlich wurden 50 nm SiO<sub>2</sub>-NP ausgewählt, die im Inneren den Fluoreszenz Farbstoff FITC (Fluorescein-isothiocyanat) enthielten, um eine zusätzliche Dosisbestimmung mittels Fluoreszenz Messung und zur Verifizierung der TEM Analyse durchzuführen (Comouth, 2012). Als geeignete biologische Endpunkte wurden die Zytotoxizität und die pro-inflammatorische Antwort sowie die Aktivierung des MAP Kinase Signalwegs untersucht.

### 2.11.1. ALIDA-Depositionsanlage

Die *Air-liquid-Interphase* Depositionsanlage (ALIDA) ermöglicht die Erzeugung von luftgetragenen Nanopartikeln (Aerosol) aus einer Nanopartikel-Suspension, deren Charakterisierung und die Deposition auf einem Zellrasen unter kontrollierten Bedingungen. Die ALIDA ist in vier Teilbereiche untergliedert (Abb. 6), die Aerosolherstellung, die Befeuchtung des Aerosols, sowie dessen Charakterisierung und die Exposition der Zellen mit Nanopartikeln. Das Aerosol wird in dieser Arbeit mit einem Atomizer aus einer NP-Suspension und einem Trägergas generiert. Die dabei entstehenden Tröpfchen verdampfen im Trägergas und hinterlassen die in ihnen suspendierten Nanopartikel. Anschließend wird das Aerosol durch eine temperierte und befeuchtete NAFION-Membran geleitet, wodurch relative Feuchten bis zur Sättigung erreicht werden und somit Bedingungen in der Lunge nachempfunden werden können. Danach wird das Aerosol auf die beiden Bereiche,

Charakterisierung und Deposition, verteilt. Die Größe und Größenverteilung der Partikel werden kontinuierlich gemessen und in Form des mobilitätsäquivalenten Durchmessers angegeben. Die Deposition der Nanopartikel aus dem Luftstrom auf die Zelloberfläche erfolgt in der Expositions-kammer, wobei der Aerosolstrom einerseits ungehindert auf die Zellen und andererseits durch einen Filter geleitet wird. Durch das Herausfiltern der Partikel wird ein Kontrollluftstrom erzeugt, bei dem die Zellen nicht mit Partikeln in Kontakt kommen, aber ansonsten unter den gleichen Bedingungen wie die Partikel-exponierten Zellen exponiert werden. Für die Deposition der Partikel im ungefilterten Aerosolstrom werden die Partikel mittels einer Elektrode elektrisch aufgeladen und deponieren mit einer größenabhängigen Depositionseffizienz auf den Zellen. Dabei werden die Temperatur und die Feuchtigkeit durchgehend konstant gehalten und mittels einer Steuerungssoftware überwacht. Gleichzeitig werden Partikel auf TEM Netzchen in der Expositions-kammer gesammelt, um mittels TEM Analyse die Eigenschaften wie Morphologie und Agglomeration sowie die Dosis der deponierten Partikel zu bestimmen. Eine exakte Beschreibung der ALIDA wird in der Arbeit von A. Comouth gegeben (Comouth, 2012).

## ALI-Depositionsanlage

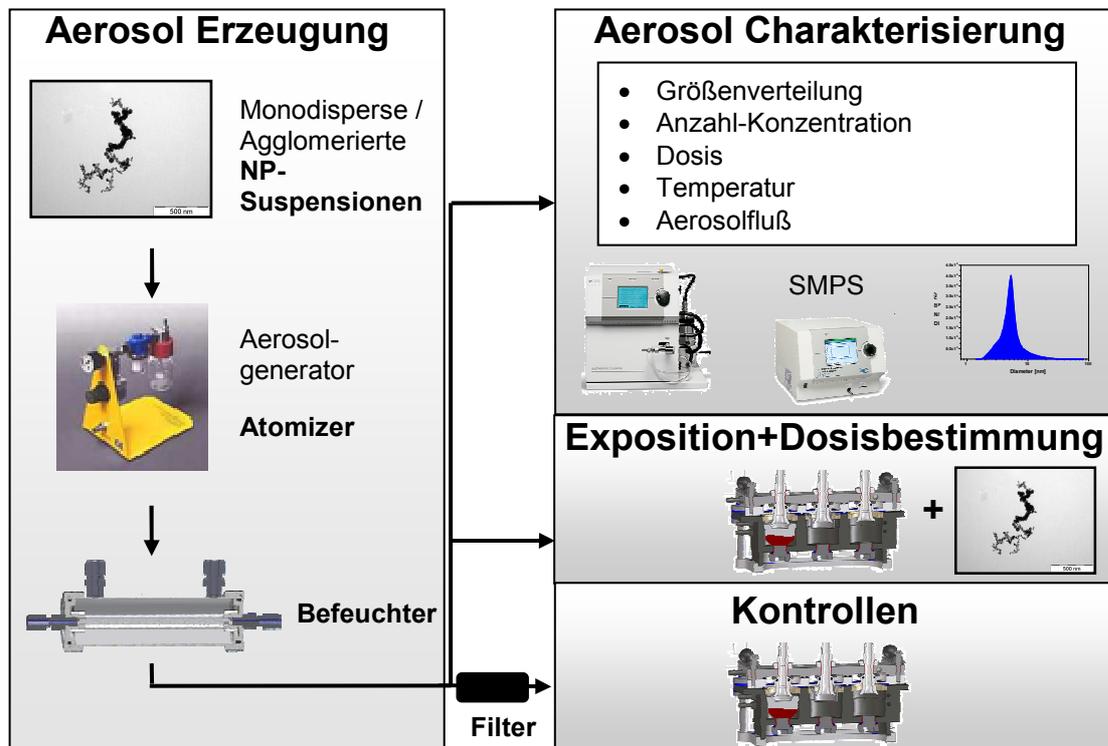
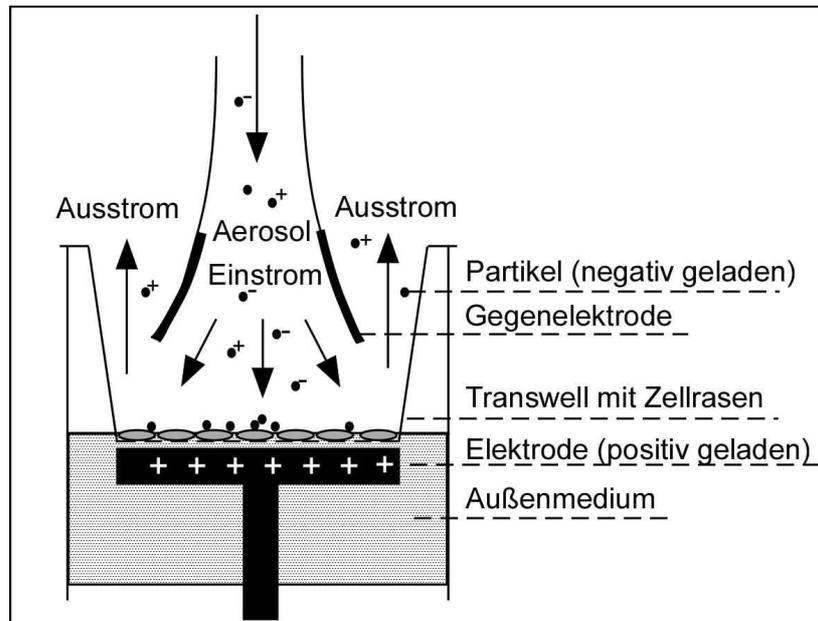


Abb. 6: Aufbau der Air-liquid-interphase Depositionsanlage (ALIDA)

## **2.11.2. Herstellung von Aerosolen und Charakterisierung für Experimente an der Luft-/Flüssigkeitsgrenzschicht**

Für die Herstellung der SiO<sub>2</sub> NP Aerosole wurden einerseits Suspensionen mit agglomerierten (SiO<sub>2</sub>-12) und andererseits mit monodispersen Partikeln (SiO<sub>2</sub>-50) in Nanopure Wasser zerstäubt. Zum Versprühen der Nanopartikel wurden der Atomizer (Topas GmbH, Dresden) und synthetische Luft als Trägergas (80 % Stickstoff, 20 % Sauerstoff) verwendet. Für die Befeuchtung des Aerosols wurde ein Befeuchter am IMK entwickelt. Für die Überwachung der Feuchtigkeit diente ein Feuchtesensor (Driesen und Kern, Bad Bramstedt), der sich im Luftstrom befand. Die Verteilung des Aerosols für die Charakterisierung und die Deposition erfolgte mittels eines 8-Kanal Verteilersystems, sodass zwei Kanäle für die Charakterisierung und 6 Kanäle für die Deposition zur Verfügung standen. Die Größe und Größenverteilung des Aerosols wurden in Echtzeit mittels SMPS (Scanning mobility particle sizer CPC3025 und DMA3085, TSI, Aachen) ermittelt. Um den Aerosolfluss zu steuern und zu kontrollieren wurden Massflowcontroller (Bronkhorst High Tech, Kamen) der Expositions-kammer vorgeschaltet. Die Deposition der Partikel erfolgte in zwei Expositions-kammern mit je drei Wells (VITROCELL® 6- Well Inserts/ PT-CF Stainless) von der Firma VITROCELL Systems GmbH, Waldkirch. In jede Vertiefung wurden spezielle Transwell-Einsätze (Corning Nr. 3450, 24 mm Polyester-membran mit 0,4 µm Porendurchmesser) mit Zellen gesetzt. Der Aerosolstrom wurde auf der apikalen Seite (oben) der Zellen eingeleitet und auf der basolateralen Seite wurden die Zellen mit warmem Medium versorgt. Der Aerosolstrom wurde in mindestens drei Wells ungehindert auf die Zellen geleitet. In zwei bis drei weiteren Wells wurde der Aerosolstrom jedoch zuvor durch einen HEPA-Luftfilter (HepaVent™ Y271, Whatman GmbH, Dassel) von den Partikeln gereinigt. Die Exposition der Zellen erfolgte unter physiologischen Bedingungen wie in der Lunge, d.h. bei einer Temperatur von 37,5 °C und einer Feuchtigkeit von 85-90 %. Um die Temperatur konstant zu halten, wurden die Expositions-kammern mit Wasser temperiert und in einem Wärmeschrank (Memmert, Schwabach) aufbewahrt. Die Temperatur wurde im Wärmeschrank, in der Expositions-kammer, sowie im Aerosolstrom am Feuchtesensor gemessen. Um eine möglichst hohe Depositionseffizienz der Partikel auf die Zelloberfläche zu erreichen, wurden Elektroden unterhalb der Transwell-Einsätze eingebaut. Die Position der Elektroden ist in Abb. 7 gezeigt, wobei sich die geerdete Gegenelektrode oberhalb der Zellen im Abstand von 2 mm befand. Die angelegte Gleichspannung betrug 1 kV. Da der größere Teil der Partikel eine negative Ladung trägt, wurde die Elektrode positiv gepolt.



**Abb. 7: Schematischer Aufbau der Elektrode mit dem Transwell-Einsatz**

### 2.11.3. Vorbereitung und Transport der Zellen

Für die Untersuchungen der Wirkung von  $\text{SiO}_2$  Aerosolen wurde das Transwell-System verwendet bestehend aus einer 6-Well-Platte mit Transwell-Einsätzen. Ein Transwell-Einsatz unterteilt die Zellkultur in eine obere (apikale) und eine untere (basolaterale) Seite, wobei sich dazwischen eine Polyestermembran mit Poren befindet. In die obere Kammer werden Zellen ausgesät und in die untere Kammer wird Medium gefüllt. Für die Exposition an der Luft-Flüssigkeitsgrenzschicht muss jedoch das Medium in der oberen Kammer abgenommen werden, damit die Zellen direkt mit den Partikeln aus dem Aerosol in Kontakt kommen. Aufgrund der Poren in der Membran des Transwell Einsatzes werden die Zellen von unten mit Medium versorgt und trocknen nicht so schnell aus. Für den Transport zur ALIDA-Expositionsanlage und für die Dauer der Exposition ist es notwendig ein spezielles RPMI Außenmedium zu verwenden. Dieses Medium (Tab. 20) enthält 10 mM HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-Ethansulfonsäure), um den pH-Wert während der Exposition konstant im neutralen Bereich (pH 7,2 - 7,4) zu halten, da keine  $\text{CO}_2$  Begasung stattfindet, die den pH Wert stabilisiert. Für die Experimente wurde in jedes Well 1 ml Medium mit  $3 \times 10^5$  A549 Zellen zwei Tage zuvor in den Transwell-Einsätzen (Corning Nr. 3450,  $0,4 \mu\text{m}$  Porendurchmesser) ausgesät. Hierbei wurde FCS haltiges RPMI-Medium verwendet (Tab. 20). Der untere Teil der Kammer wurde mit 2 ml Medium befüllt. Am Tag der Exposition wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit HBSS (Hank's buffered salt solution) oben und unten gewaschen, um das FCS zu entfernen. Für die Exposition mit den Aerosolen wurde das HBSS wieder abgesaugt und stattdessen 1,5 ml des RPMI-Außenmediums ohne

FCS in die untere Kammer und 100 µl HBSS auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen zur Expositionskammer gebracht und die Transwell Einsätze in die Vertiefungen der Expositionskammer gesetzt. Dabei waren die Wells mit warmem RPMI-Außenmedium befüllt. Für einen Vergleich mit der submersen Exposition wurden Zellen in weiteren Transwell-Einsätzen mit Partikeln in RPMI 1640 Medium ohne FCS behandelt. Dabei wurden auf die Zellen 1,459 ml NP-Suspension, entsprechend der Mediummenge im Submersversuch, gegeben und in den unteren Teil 1,5 ml Medium.

**Tab. 20: Zusammensetzung des RPMI Mediums für die Aussaat, Exposition und Nachinkubation für die ALI-Expositionsversuche**

Komponenten	Aussaat	Exposition	Nachinkubation
RPMI 1640	500 ml	500 ml	500 ml
Penicillin	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml
Streptomycin	100 mg/ml	100 mg/ml	100 mg/ml
L-Glutamin	3 mM		3 mM
FCS	10 %		
HEPES		10 mM	

#### 2.11.4. Nachbereitung der Zellen im Anschluss an die Exposition

Im Anschluss an die Exposition wurden die Zellen einerseits sofort mit 100 µl 2x Lysepuffer (Tab. 13) lysiert. Andererseits wurden die Transwell-Einsätze wieder in eine 6 well Platte gesetzt und zurück ins Zellkulturlabor im RPMI Außenmedium transportiert. Danach wurde das Medium unten auf der basolateralen Seite durch frisches RPMI 1640 Medium ohne FCS ersetzt und auf die apikale Seite der Zellen wurden 1,359 ml dieses Mediums gegeben. Es folgte eine Nachinkubation der Zellen für 24 h im Inkubator bei 37 °C. Nach der Lyse der Zellen wurden COX-2 und p38 Phosphorylierung mittels Western Blot analysiert. Durch die Nachinkubation der Zellen im Brutschrank war es möglich, die LDH Freisetzung im LDH-Assay, sowie die IL-6 und IL-8 Sekretion ins Medium mittels ELISA zu bestimmen.

#### 2.11.5. Bestimmung der Dosis mittels TEM-Analyse

Die Bestimmung der Dosis wurde durch A. Comouth durchgeführt und die Ergebnisse freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die applizierte Dosis wurde mit Hilfe der TEM Analyse bestimmt. Dazu wurde während der Exposition von Zellen in eine Vertiefung ein Transwell-Einsatz ohne Zellen eingesetzt, der mit drei TEM Netzchen (Formvar®-beschichtete Kupfer 75 mesh-Grids, Plano, Wetzlar) belegt war. Nach der Partikeldeposition

für eine bestimmte Zeit wurden die Netzchen wieder herausgenommen und mit dem TEM (Zeiss EM 109T, Oberkochen) 50 Bilder pro Versuch aufgenommen. Das Auszählen der deponierten Partikel bzw. Aggregate / Agglomerate wurde anhand der Bilder mittels Objekterkennung durch ein von A. Comouth entwickeltes Programm ausgewertet. Dabei wurden die deponierten Aggregate / Agglomerate in verschiedene Größenklassen eingeteilt und die Anzahl der Partikel in jeder Größenklasse über die Anzahl der Versuche gemittelt (Comouth, 2012).



### 3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit ist es, biologische Wirkmechanismen von technisch relevanten Nanomaterialien mit Hilfe von verschiedenen *in vitro* Zellkultursystemen zu identifizieren und diese Systeme im Hinblick auf die Relevanz für die Lunge miteinander zu vergleichen. Als Modellpartikel wurden gut charakterisierte Metalloxid-Nanopartikel aus der Flammensynthese verwendet, die von kommerziellen Herstellern bezogen wurden. Zum Vergleich und um Kontaminationen auszuschließen, wurden Nanomaterialien gleicher chemischer Zusammensetzung und ähnlicher Größenverteilung mittels Flammensynthese und Mikrowellenplasma durch Kooperationspartner synthetisiert. In dieser Arbeit wurden die zwei gängigsten Methoden zur Partikelbehandlung von *in vitro* Zellkultursystemen parallel getestet. Dabei handelt es sich einerseits um die Behandlung unter submersen Bedingungen, d.h. Dispersion und Applikation der Partikel in Flüssigkeit. Hierbei wurden Partikel sowohl in Zellkulturmedium mit Serum als auch ohne Serum dispergiert. Für die Identifizierung der biologischen Wirkmechanismen wurden diese Partikel in einem Screening Verfahren auf die biologischen Endpunkte wie Aufnahme, Zytotoxizität, Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in zellfreiem und zellulären System, sowie die Induktion von pro-inflammatorischen und anti-oxidativen Genen untersucht. Als zelluläres Modellsystem wurden die humane A549 Lungenepithelzelllinie und die RAW 264.7 Mausemakrophagen-Zelllinie verwendet.

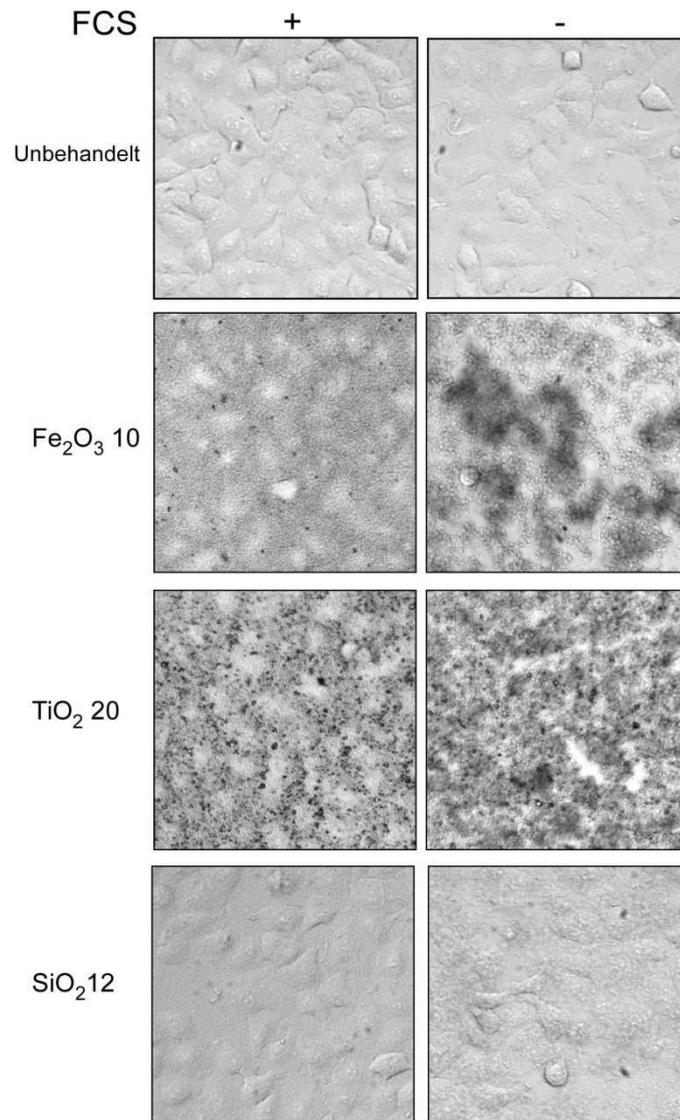
Bei der zweiten Methode handelt es sich um die Exposition an der Luft-/Flüssigkeitsschicht (ALI), da diese Applikationsmethode ein möglichst realistisches Expositionsszenario für die Lunge darstellt. Dazu wurde aus der Partikelsorte, die sich im Submersversuch am wirksamsten erwies, in Kooperation mit dem IMK ein genau definiertes und charakterisiertes Aerosol erzeugt und in direkten Kontakt mit den Lungenepithelzellen gebracht. Auf diese Weise wurde der Einfluss von Zellkulturmedien und ihren Zusätzen auf die Partikel-eigenschaften verhindert und außerdem war es technisch möglich, die applizierte Dosis mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu bestimmen. Bei der Exposition unter submersen Bedingungen können hingegen weder die Dosis leicht ermittelt noch gesteuert werden noch Wechselwirkungen von Nanopartikeln mit verschiedenen Zusätzen im Medium ausgeschlossen werden. Die Interaktionen der Mediumkomponenten mit den Partikeln können zu unterschiedlichen biologischen Effekten führen und das mögliche toxische Potential unerkannt lassen. Letztendlich sollten mögliche Unterschiede in den Wirkstärken der Nanopartikel in beiden Expositionssystemen verglichen und deren Ursache ermittelt werden.

### 3.1. Charakterisierung der Nanopartikel

Bereits in verschiedenen Publikationen wurden Unterschiede im Verhalten von NP und ihrer Wirkung durch die Zusätze in den Medien wie FCS, BSA und Surfactant festgestellt (Clift et al., 2010, Kittler, 2010). Deshalb wurde in dieser Arbeit zunächst das Verhalten der NP im Medium in An- und Abwesenheit von FCS untersucht. Dazu wurden die drei NP-Sorten,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  und  $\text{TiO}_2$  in verschiedenen Medien dispergiert, für 1 h auf A549 Zellen gegeben und im Lichtmikroskop analysiert.

Hierbei wurde festgestellt, dass die  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ - und  $\text{TiO}_2$ -NP sich in Medium mit FCS besser dispergieren ließen als in Medium ohne FCS. Die NP schienen in Abwesenheit von FCS im Medium größere Aggregate zu bilden und sedimentierten schneller auf die Zellen als bei Anwesenheit von FCS. In Abb. 8 kann man diesen Sachverhalt erkennen und auch, dass die Untersuchung der Agglomeration / Aggregation von  $\text{SiO}_2$ -NP im Lichtmikroskop nicht möglich war, da diese NP durchsichtig sind. Deshalb wurde die NP-Größe, d.h. der hydrodynamische Durchmesser von  $\text{SiO}_2$  zusätzlich mittels der Dynamischen Lichtstreuung (DLS) untersucht. Dafür wurden die  $\text{SiO}_2$ -NP in drei unterschiedlichen Testmedien dispergiert (deionisiertes Wasser, Medium mit und ohne 10% FCS). Die Messung wurde zuerst direkt nach dem Herstellen der Suspension durchgeführt und dann nach 1 h wiederholt, ohne die Suspension nochmals zu durchmischen. Auf diese Weise konnte eine eventuelle Veränderung der Größe durch verstärkte Agglomeration oder Sedimentation bestimmt werden.

Hierbei zeigten die DLS Messungen der  $\text{SiO}_2$ -12 nm NP ein unterschiedliches Agglomerationsverhalten in den drei Testmedien (Tab. 21). Direkt nach der Herstellung der Partikelsuspension war der hydrodynamische Durchmesser der  $\text{SiO}_2$  -12 nm NP in Wasser am geringsten (215 nm) und in DMEM ohne FCS nur wenig größer (243 nm). Während sich der hydrodynamische Durchmesser in Wasser nach einer Stunde Standzeit nur unwesentlich änderte, erhöhte er sich im Medium ohne FCS auf 322 nm möglicherweise durch Agglomerat-Bildung. In Anwesenheit von 10 % FCS im Medium war der Durchmesser mit 610 nm am größten, nahm aber nach einer Stunde wieder auf 428 nm ab, was entweder durch Deagglomeration oder Sedimentation der größeren Partikelagglomerate zu erklären ist. Die Zunahme des Durchmessers in Anwesenheit von FCS gibt einen Hinweis darauf, dass die  $\text{SiO}_2$ -NP in Medium mit FCS eher zur Bildung von Agglomeraten tendieren als ohne FCS. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zum Verhalten der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ - und  $\text{TiO}_2$ -NP, die eher in Abwesenheit von FCS stärker agglomerierten. Die Größe der Nanopartikel in verschiedenen Suspensionen ist demnach von vielen Faktoren abhängig und kann sich im Verlauf der Zeit durch Agglomeration und Deagglomeration verändern.



**Abb. 8 Agglomerationsverhalten von Metalloxid-NP in verschiedenen Medien**

A549 Zellen wurden für 1 h mit NP Suspensionen bei 200 µg/ml (62,5 µg/cm<sup>2</sup>) in Medium mit 10 % FCS und ohne FCS inkubiert. Anschließend wurden sie am Lichtmikroskop (Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg) bei einer 16-fachen Vergrößerung fotografiert.

**Tab. 21 Hydrodynamischer Durchmesser von SiO<sub>2</sub>-12 nm NP in verschiedenen Medien**

Die DLS-Analysen wurden direkt nach der Herstellung der Partikelsuspension und 1 h danach durchgeführt. Die Werte sind Mittelwerte ± S.E.M. aus drei Messungen.

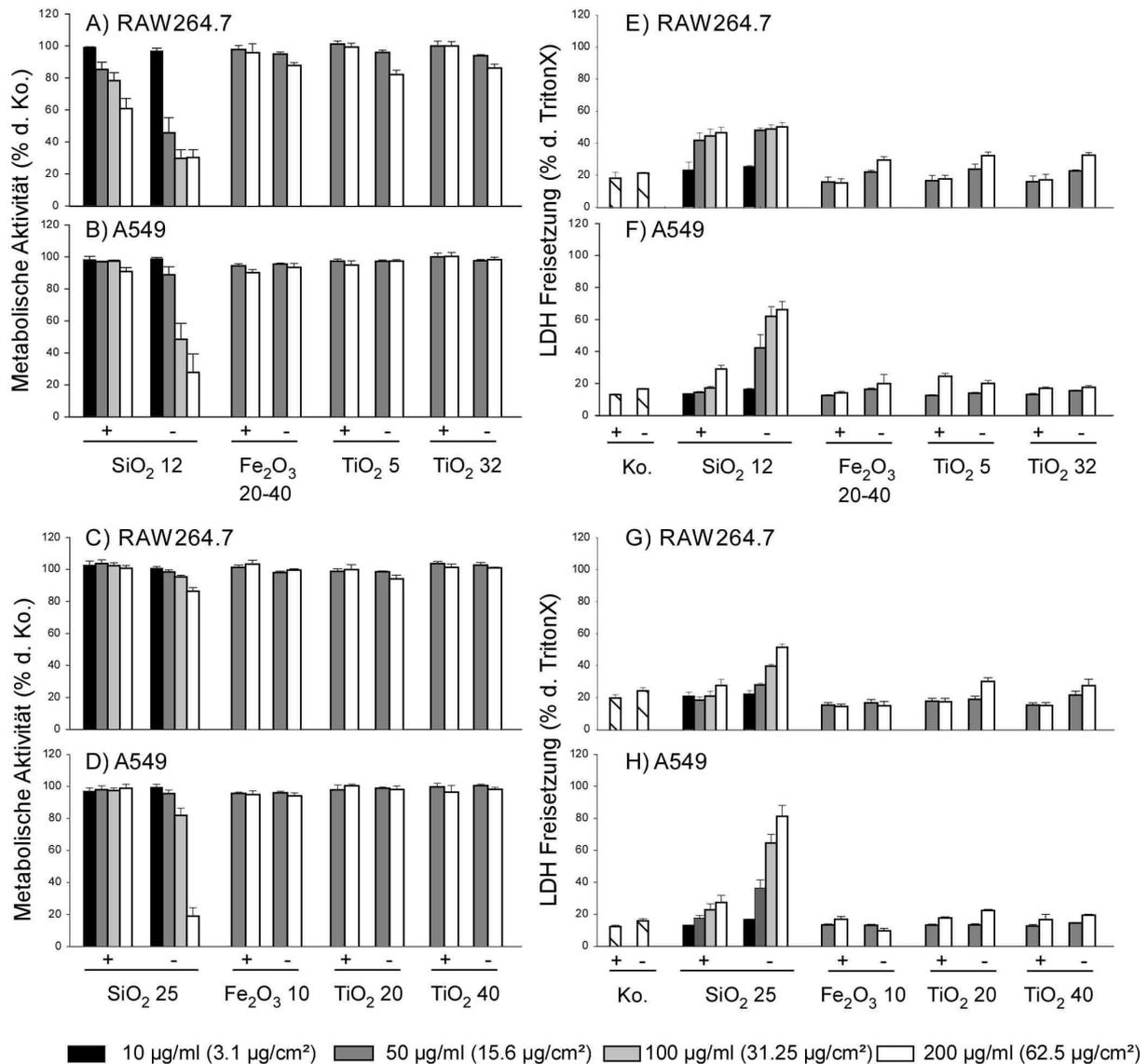
Zeit	Wasser (deionisiert)	DMEM + 10 % FCS	DMEM - FCS
0 h	215 ± 25 nm	610 ± 221 nm	243 ± 20 nm
1 h	194 ± 3 nm	428 ± 18 nm	322 ± 58 nm

### **3.2. Akute Toxizität der Nanopartikel**

Nachdem festgestellt wurde, dass sich NP in den verschiedenen Medien unterschiedlich verhalten, wurde als erster Schritt bei der Untersuchung der Wirkungsweise der NP auf ein zelluläres System die akute Toxizität in An- und Abwesenheit von FCS im Medium ermittelt. Für die Untersuchung der akuten Toxizität wurden die metabolische Aktivität mittels des Alamar Blue Assays sowie die Membranintegrität mittels des LDH-Assays nach NP Exposition bestimmt. Dafür wurden die Zelllinien A549 und RAW264.7 mit verschiedenen Konzentrationen von gekauften und selbsthergestellten  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  und  $\text{TiO}_2$  Partikeln mit ähnlichen Eigenschaften in Medium mit oder ohne FCS für 24 h behandelt.

#### **3.2.1. $\text{SiO}_2$ -NP sind selektiv zytotoxisch in Abwesenheit von FCS**

Nur  $\text{SiO}_2$ -NP reduzierten die metabolische Aktivität (A) sowie die Membranintegrität (B) in beiden Zelllinien (Abb. 9) besonders im Medium ohne FCS. Ab einer Schwellenkonzentration von  $15,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) nach 24 h Behandlung wirkten die Partikel toxisch. Dagegen waren alle  $\text{TiO}_2$ - und  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -NP sowohl in An- und Abwesenheit von FCS nicht toxisch. Jedoch gab es kleine Unterschiede in der Wirkung der  $\text{SiO}_2$ -NP in den verschiedenen Zelllinien. Die toxische Wirkung der  $\text{SiO}_2$ -NP wurde komplett in den A549 Lungenepithelzellen in Anwesenheit von FCS gehemmt, wohingegen in den RAW264.7 Makrophagen die gekauften  $\text{SiO}_2$ -12 nm NP auch in Medium mit FCS eine geringere jedoch messbare Toxizität aufwiesen.

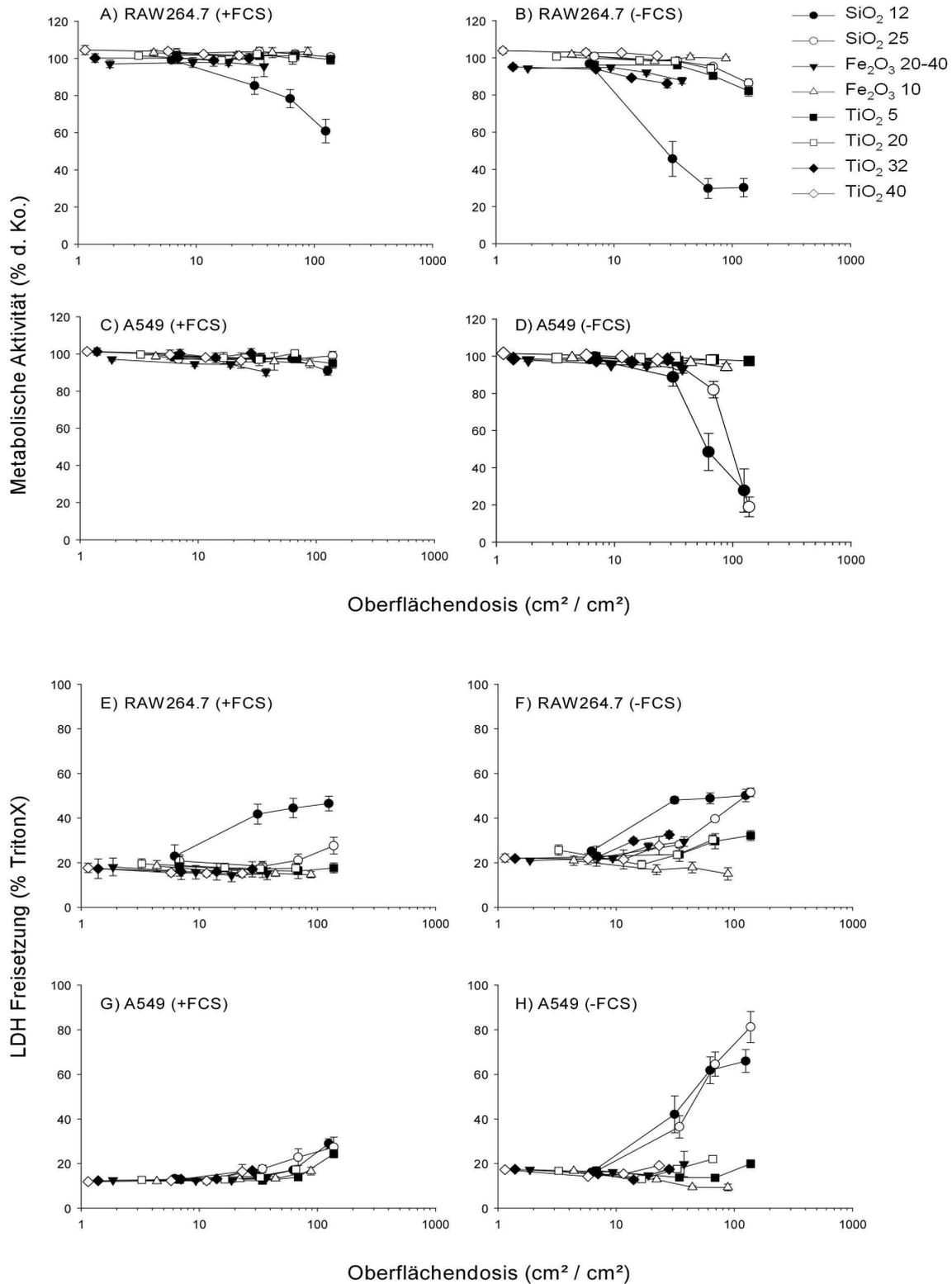


### Abb. 9 Effekte von NP auf die Viabilität von RAW264.7 Makrophagen und A549 Zellen

Die Zellen wurden mit verschiedenen NP (SiO<sub>2</sub>-12, -25 nm, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-10 nm, -20-40 nm, TiO<sub>2</sub>-5 nm, -20 nm, -32 nm und 40 nm) für 24 h mit den angegebenen Konzentration exponiert. Dazu wurden die Partikel in Medium mit 10 % FCS (+) und ohne FCS (-) suspendiert und zu den Zellen gegeben. Die Vitalität bzw. metabolische Aktivität wurde mittels des Alamar Blue Assays (A, B, C, D) und die Membranintegrität bzw. LDH Freisetzung mittels des LDH Assays bestimmt (E, F, G, H). Die angegebenen Werte für die metabolische Aktivität sind auf die Werte der unbehandelten Kontrollen und die Werte für die LDH-Freisetzung auf die Triton Kontrolle, die auf 100 % gesetzt wurden, normiert. Es werden die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten (±SEM) dargestellt. Zur Wahrung der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der 10 µg/ml und 100 µg/ml Konzentration bei den Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>- und TiO<sub>2</sub>-NP verzichtet.

### 3.2.2. Die Toxizität von SiO<sub>2</sub> NP ist abhängig von der spezifischen Oberfläche

Ein entscheidender Parameter, der die Toxizität von NP und insbesondere von SiO<sub>2</sub>-NP determiniert, sind die Partikelanzahl und die Partikeloberfläche. Bei gleicher Masse und gleichem Volumen besitzen kleinere Partikel eine größere Gesamtoberfläche im Vergleich zu größeren Partikeln. Bereits in einigen Studien wurde für monodisperse SiO<sub>2</sub>-NP aus der Stöber Synthese festgestellt, dass bei gleicher Masse- und Volumenkonzentration kleinere Partikel toxischer wirken, da die eingesetzte Oberflächendosis sowie die Anzahl der NP für kleinere Partikel größer ist (Napierska et al., 2009, Al-Rawi et al., 2011, Ali, 2011). Deshalb ist es wichtig, nicht nur die Massenkonzentrationen, sondern auch die eingesetzte Partikelanzahl oder die eingesetzte Oberflächendosis bezogen auf die Zelloberfläche zu betrachten. Die Partikelanzahl kann nur bei sphärischen Nanopartikeln aus der Stöber Synthese, jedoch nicht bei ungleichförmigen NP Aggregaten aus der Flammensynthese berechnet werden. Deshalb wurden im Folgenden für alle NP Sorten die Ergebnisse zur Zytotoxizität aus Abb. 9 in Abhängigkeit der berechneten Oberflächendosis (cm<sup>2</sup> Partikeloberfläche / cm<sup>2</sup> Zelloberfläche) aufgetragen (Abb. 10). Die maximale Oberflächendosis war für alle NP-Sorten unterschiedlich. Die größeren NP wie Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-20-40 nm, TiO<sub>2</sub>-32 nm und TiO<sub>2</sub>-40 nm erreichten trotz gleicher Masse (62,5 µg/cm<sup>2</sup>) nur Werte von 20-40 cm<sup>2</sup> / cm<sup>2</sup> Zelloberfläche. Der Einsatz von NP derselben Substanzen mit kleinerem Durchmesser (TiO<sub>2</sub>-5nm, -20nm und Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-10 nm) führte zur Exposition der Zellen mit einer 10-fach größeren Oberflächendosis von 200-440 cm<sup>2</sup> / cm<sup>2</sup> Zelloberfläche. Trotz der hohen Oberflächendosis wurde keine Zytotoxizität durch die beiden Substanzen Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> und TiO<sub>2</sub> verursacht. Für die gekauften als auch für die selbsthergestellten SiO<sub>2</sub>-NP wurde der sogenannte NOAEL-Wert (*No observed adverse effect level*) bestimmt, der angibt bei welcher Oberflächendosis gerade noch kein biologischer Effekt ausgelöst wird.



**Abb. 10 Effekte der NP auf die Viabilität bezogen auf die Oberflächendosis**

RAW264.7 Makrophagen und A549-Zellen wurden mit verschiedenen NPn für 24 h in Medium mit 10 % Serum (+) und in Medium ohne Serum (-) wie in Abb. 5 behandelt. Die metabolische Aktivität (A, B, C, D) wurde im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und die LDH-Freisetzung (E, F, G, H), bezogen auf die positive Kontrolle (Triton) bestimmt. Die resultierenden Werte wurden in Abhängigkeit von der Oberflächendosis (cm<sup>2</sup> Partikeloberfläche / cm<sup>2</sup> Zelloberfläche) aufgetragen. Die Ergebnisse sind die Mittelwerte ± S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimente, die jeweils im Triplikat durchgeführt wurden.

In Tab. 22 werden die NOAEL Werte für verschieden große SiO<sub>2</sub>-NP angegeben. Es konnte festgestellt werden, dass die Anwesenheit von FCS zu höheren NOAEL Werten der Oberflächendosis führte als die Abwesenheit von FCS. In Abwesenheit von FCS betrug der NOAEL nur 6 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup> Zelloberfläche, eine ca. 20-fach niedrigere Oberflächendosis als bei Anwesenheit von FCS (137 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>). Auch wenn die RAW264.7 Makrophagen allgemein zwar sensitiver auf die eingesetzte Oberfläche reagierten (NOAEL 6,2 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup> in Anwesenheit von FCS), sieht man in Abb. 10 dennoch, dass die metabolische Aktivität in Anwesenheit von FCS bei weitem nicht so stark reduziert wurde als ohne FCS.

**Tab. 22 NOAEL-Werte (*No observed adverse effect level*) von SiO<sub>2</sub> in A549 Zellen und RAW264.7 Makrophagen**

	NOAEL in Medium + FCS (cm <sup>2</sup> /cm <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>		NOAEL in Medium –FCS (cm <sup>2</sup> /cm <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	
	SiO <sub>2</sub> -12 nm	SiO <sub>2</sub> -25 nm	SiO <sub>2</sub> -12 nm	SiO <sub>2</sub> -25 nm
<b>A) Metabolische Aktivität</b>				
<b>RAW264.7</b>	6,2	137,5	6,2	34,3
<b>A549</b>	125	137,5	6,2	34,3

<b>B) LDH-Freisetzung</b>	SiO <sub>2</sub> -12 nm	SiO <sub>2</sub> -25 nm	SiO <sub>2</sub> -12 nm	SiO <sub>2</sub> -25 nm
	<b>RAW264.7</b>	6,2	137,5	6,2
<b>A549</b>	62,5	137,5	6,2	6,8

<sup>a</sup> Oberflächendosis = cm<sup>2</sup> Partikeloberfläche / cm<sup>2</sup> Zelloberfläche

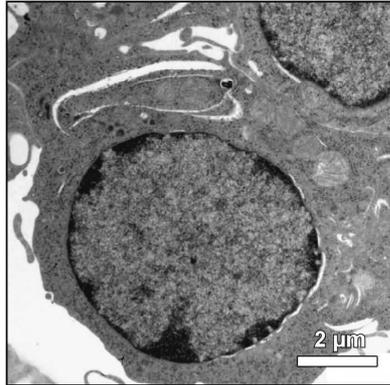
### 3.3. Aufnahme und Lokalisation von Nanopartikeln in Lungenepithelzellen und Makrophagen

Die Ergebnisse aus der Untersuchung zur akuten Toxizität ergaben, dass die  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ - und  $\text{TiO}_2$ -NP in An- und Abwesenheit von FCS im Medium keinerlei negative Einflüsse auf das Überleben zeigten. Hingegen führte die Exposition der RAW264.7 Makrophagen und A549 Zellen mit den gekauften  $\text{SiO}_2$ -12 nm und den selbsthergestellten  $\text{SiO}_2$ -25 nm NP vor allem im Medium ohne FCS zu einer erhöhten Toxizität. Eine mögliche Ursache dafür könnten Unterschiede in der Aufnahme der NP sein. Zum einen ist es möglich, dass in Gegenwart von FCS bzw. bei Abwesenheit von FCS die Aufnahme gefördert oder aber verlangsamt wird, was zu einer unterschiedlichen intrazellulären Dosis führen würde, die sich auf die Toxizität auswirkt.

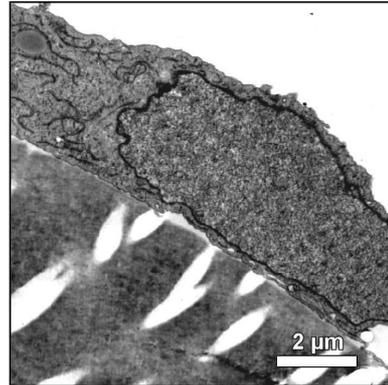
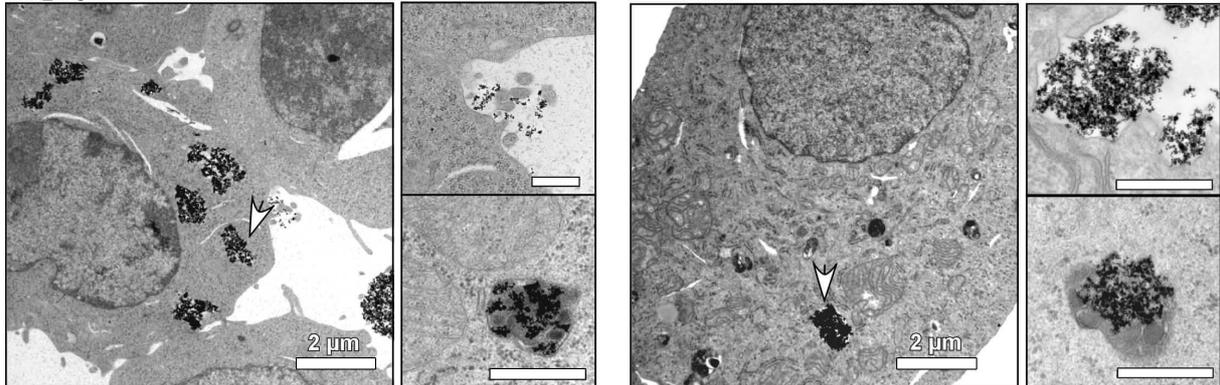
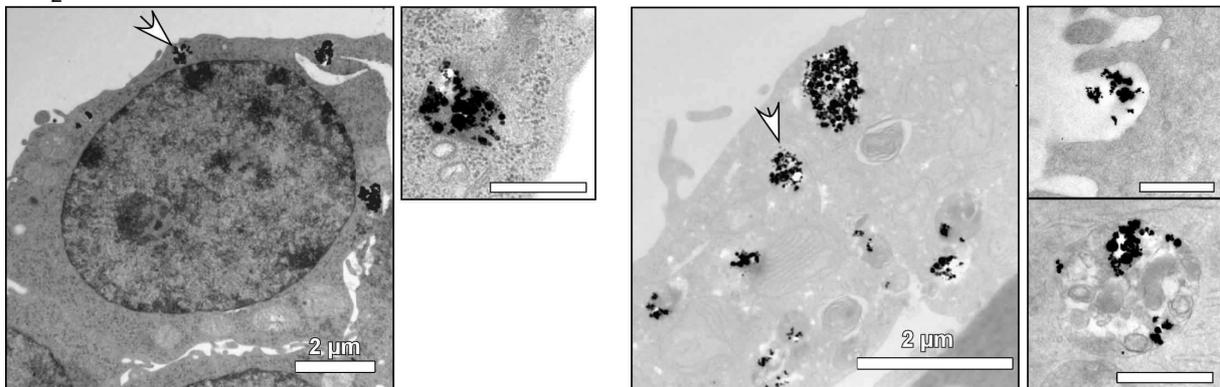
Um aufzuklären, ob die hier untersuchten NP in Anwesenheit von FCS aufgenommen werden, wurden die RAW264.7 Makrophagen und A549 Zellen mit  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ - und  $\text{TiO}_2$ -NP für 24 h im Medium mit 10 % FCS inkubiert, anschließend in Epoxidharz eingebettet und am TEM analysiert (Abb. 11 A). Weiterhin wurden die  $\text{SiO}_2$ -12 nm NP in An- und Abwesenheit von FCS analysiert, jedoch aufgrund ihrer starken toxischen Wirkung nur für 6 h inkubiert (Abb. 11 B).

Alle drei NP-Sorten wurden in beiden Zelllinien aufgenommen, auch die  $\text{SiO}_2$ -NP ohne FCS, und befanden sich agglomeriert und aggregiert in intrazellulären Vesikeln im Zytoplasma (Abb. 11 A, B). Die NP befanden sich weder in den Mitochondrien noch im Zellkern. Ob bei den  $\text{SiO}_2$ -NP dennoch quantitative Unterschiede in der Aufnahme und somit in der intrazellulären Dosis in den beiden Expositionsszenarios vorhanden waren, konnte mit Hilfe der TEM Analyse nicht geklärt werden. Die Bilder der TEM-Analyse zu den  $\text{SiO}_2$ -12 nm NP in RAW264.7 Makrophagen wurden freundlicherweise von C. Marquardt zur Verfügung gestellt (Marquardt, 2011). In ihrer Arbeit wurden Hinweise darauf gefunden, dass die  $\text{SiO}_2$ -12 nm NP Agglomerate nach Aufnahme in die Zellen bei Abwesenheit von FCS nicht immer von einer Membran umhüllt waren. Ähnliche Beobachtungen konnten auch in dieser Arbeit für die A549 Zellen gemacht werden, wurden jedoch nicht quantifiziert. Die Diffusion durch die Membran wäre hierbei eine mögliche Erklärung für das Auftreten von NP ohne Membranhüllung. Der Nachweis durch welchen Aufnahme Weg die Nanopartikel in die Zellen gelangt sind und ob einzelne Vesikel mit Nanopartikeln intrazellulär verschmelzen und sich so große Agglomerate bilden, kann durch die TEM-Analyse nicht ausreichend erbracht werden.

Unbehandelt: RAW264.7

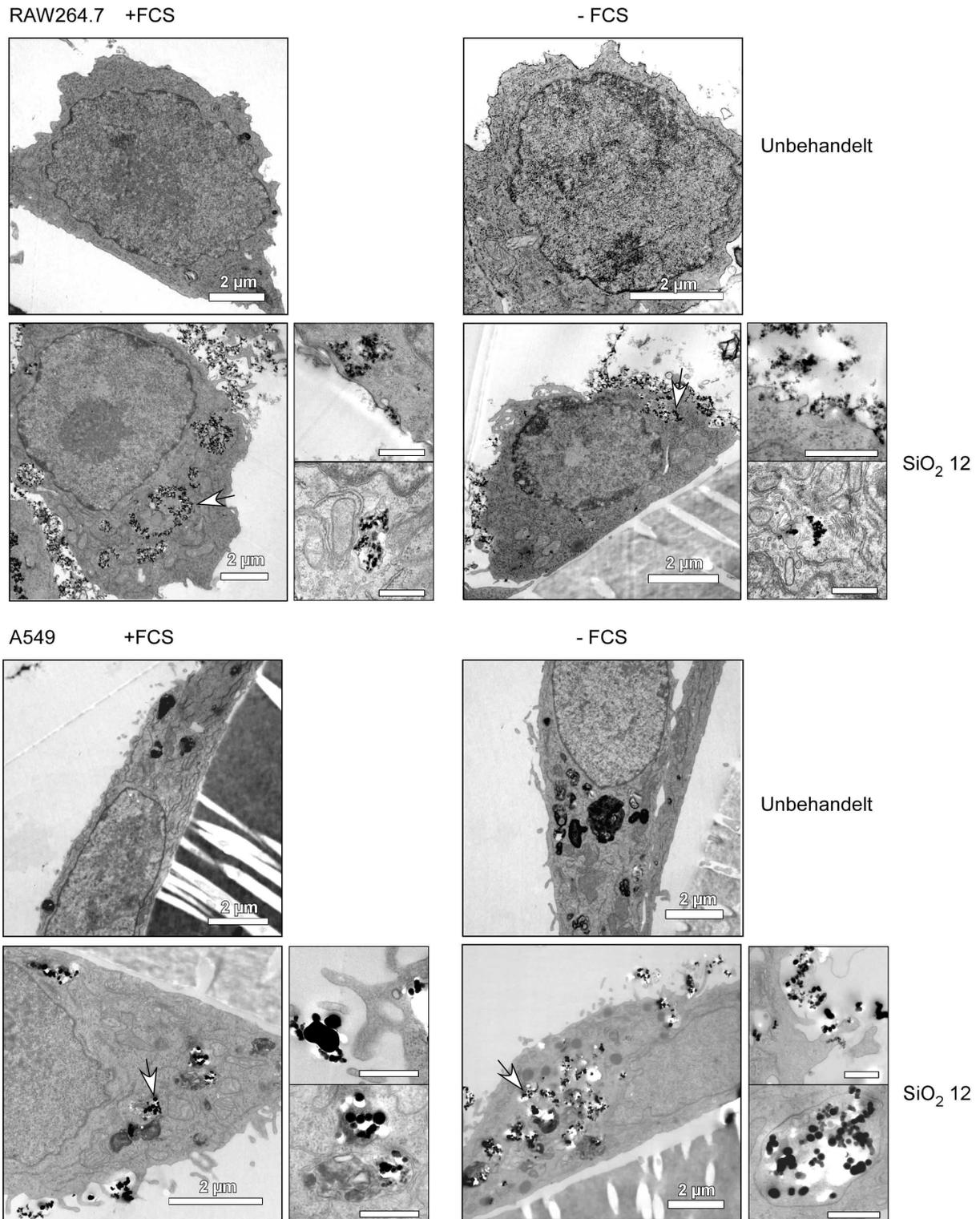


A549

Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 20-40:TiO<sub>2</sub> 32:

**Abb. 11A) TEM-Analyse von Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-10 nm und TiO<sub>2</sub>-32 nm NP behandelten RAW264.7 Makrophagen und A549 Zellen**

RAW264.7 Makrophagen und A549 Zellen wurden in Medium mit FCS belassen (obere Reihe) oder für 24 h mit 50 μg/ml (15,6 μg/cm<sup>2</sup>) Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-10 nm (mittlere Reihe) und TiO<sub>2</sub>-32 nm NP (untere Reihe) exponiert. Im Anschluss wurden die Zellen für die TEM-Analyse präpariert und am TEM fotografiert. Die weißen Pfeile markieren die aufgenommenen NP. Jeweils rechts wird die Lokalisation der NP an der Membran vor /während der Aufnahme und intrazellulär gezeigt (Maßstab = 500 nm).



**Abb.11B) TEM-Analyse von SiO<sub>2</sub>-12 nm NP behandelten RAW264.7 Makrophagen und A549 Zellen in An- und Abwesenheit von FCS**

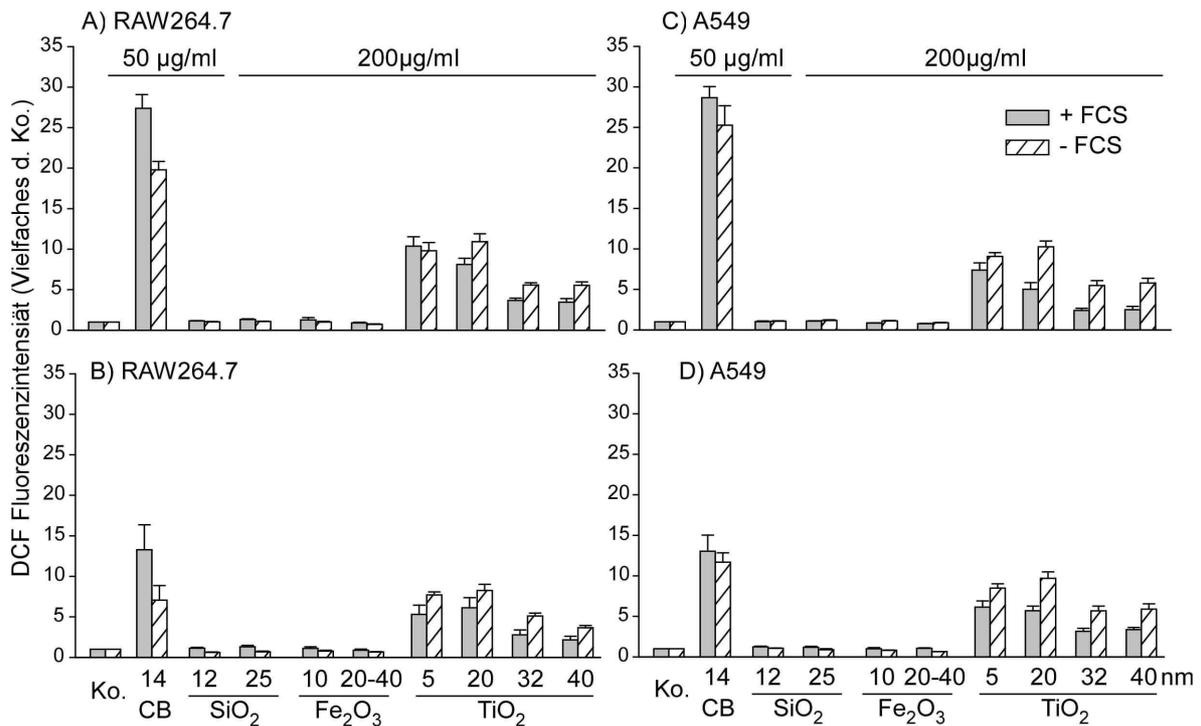
RAW264.7 Makrophagen und A549 Zellen wurden in Medium mit und ohne FCS (unbehandelt) belassen oder für 6 h mit 50 µg/ml (15,6 µg/cm<sup>2</sup>) SiO<sub>2</sub>-12 nm NP exponiert. Im Anschluss wurden die Zellen für die TEM-Analyse präpariert und am TEM fotografiert. Die weißen Pfeile markieren die aufgenommenen NP. Jeweils rechts wird die Lokalisation der NP an der Membran vor /während der Aufnahme und intrazellulär gezeigt (Maßstab = 500 nm).

### 3.4. Nanopartikel-induzierte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies

Um die Ursache für die Toxizität der SiO<sub>2</sub>-NP herauszufinden, wurden nach der Analyse der Aufnahme und Lokalisation der NP weitere Hypothesen überprüft. Ein bereits bekannter Mechanismus der NP induzierten Toxizität ist die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. ROS werden permanent im Körper gebildet z.B. während der Atmungskette in den Mitochondrien oder als Abwehrmechanismus der Makrophagen gegen Bakterien. ROS reagieren mit DNA, Proteinen und Lipiden und können ihre Struktur verändern, das zur Beeinträchtigung ihrer Funktionen und sogar zum Zelltod führen kann. Im Folgenden wurde die intrazelluläre Bildung von ROS mittels des DCF-Assays bestimmt. Dazu wurden RAW264.7 Makrophagen und A549 Zellen mit Partikeln in Medium mit und ohne FCS für 3 h und 24 h inkubiert und anschließend mit dem DCF-Farbstoff beladen. Intrazellulär vorhandene ROS führen zur Oxidation des nicht fluoreszierenden Dichlorodihydrofluoresceins (DCFH<sub>2</sub>), wodurch das Fluoro-chrom Dichlorofluorescein (DCF) entsteht, dieses kann mittels eines Fluoreszenzspektrometers quantifiziert werden (Hempel et al., 1999).

#### 3.4.1. Intrazelluläre ROS Bildung

Bei der Bestimmung der intrazellulär gebildeten ROS mit den hier verwendeten Nanopartikeln diente Carbon Black als Positivkontrolle, da bereits in einer vorhergehenden Arbeit von K. Pulskamp gezeigt worden ist, dass kohlenstoffhaltige Nanomaterialien ROS in hohem Maße generieren können (Pulskamp et al., 2007). Die Messungen ergaben, dass in An- und Abwesenheit von FCS keine Generierung von ROS nach einer Behandlung von 3 h und 24 h mit SiO<sub>2</sub>- und Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NP stattgefunden hat (Abb. 12). Alleine TiO<sub>2</sub>-NP konnten bei An- und Abwesenheit von FCS ROS intrazellulär generieren. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass auch durch SiO<sub>2</sub>- und Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NP ROS gebildet werden können, da mit Hilfe des DCF Tests das Superoxidationion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) nicht detektiert werden kann. Außerdem ist es möglich, dass die ROS Bildung durch TiO<sub>2</sub>-NP z.T. darauf zurückzuführen ist, dass die Partikel durch das Licht während der Durchführung des Versuchs beim Messen der 96 well Platte die Photokatalyse der TiO<sub>2</sub>-NP Partikel auslöst. In Vorversuchen im zellfreien System mit DCF als Fluoreszenzfarbstoff konnte gezeigt werden, dass unter Ausschluss von Licht während des Experiments es nicht zur Bildung von ROS durch TiO<sub>2</sub>-NP kommt (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 12 Intrazelluläre ROS Bildung nach NP Exposition**

RAW264.7 Makrophagen und A549 Zellen wurden mit den angegebenen NP in Medium mit und ohne FCS (+/-) für 3 h (A, C) und 24 h (B, D) inkubiert und mit 40 µM H<sub>2</sub>DCF-DA Farbstoff beladen. Nach mehreren Waschschritten wurden die Zellen für eine Stunde bei 37 °C im Dunkeln inkubiert und anschließend die Umwandlung des Farbstoffs am Fluoreszenzspektrometer bei 530 nm ermittelt. Als Positivkontrolle wurden 50 µg/ml (15,6 µg/cm<sup>2</sup>) CB14 verwendet. Die Inkubation mit SiO<sub>2</sub>-12 nm NP wurde ebenfalls nur bei einer Konzentration von 50 µg/ml aufgrund der starken Toxizität durchgeführt. Die Werte sind auf die unbehandelte Kontrolle normiert und stellen Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen dar (± SEM).

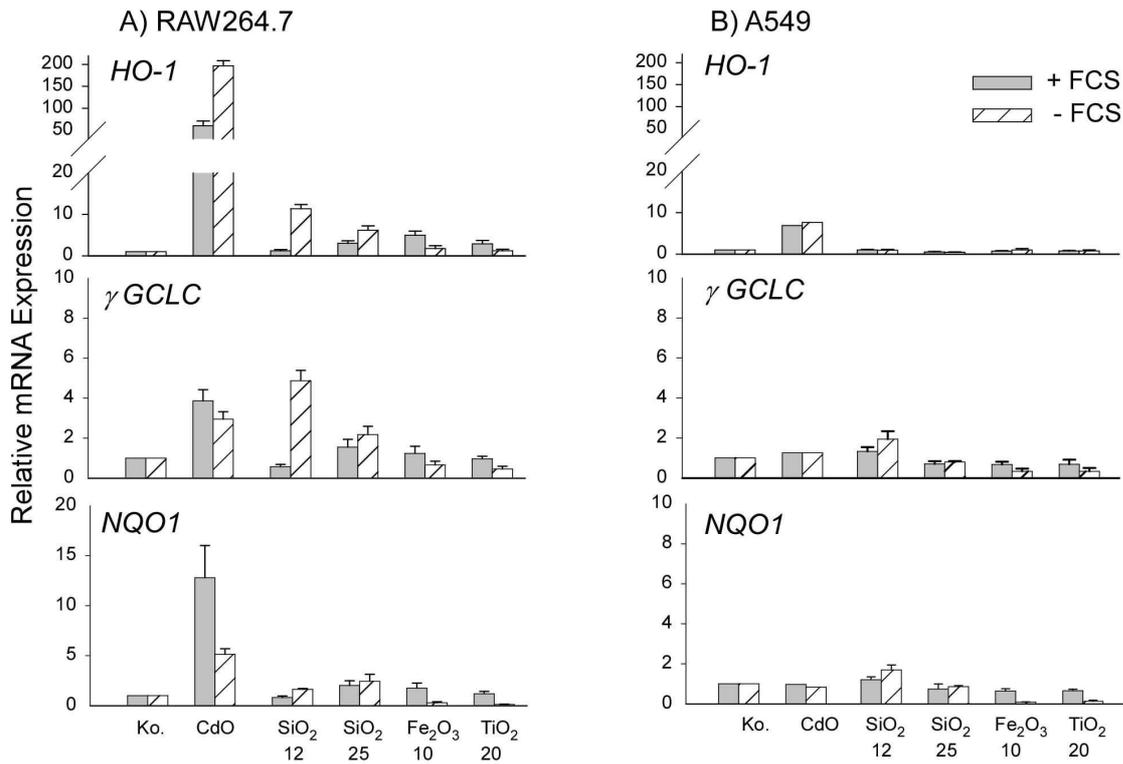
### 3.5. Untersuchung der anti-oxidativen Antwort

Ausgehend von der Hypothese von Nel und Kollegen, dass NP durch ROS oxidativen Stress induzieren, wurden Zielgene der anti-oxidativen Antwort auf mRNA Ebene mit Hilfe der quantitativen Real Time PCR (qRT-PCR) und auf Proteinebene mittels Western Blot untersucht (Nel et al., 2006). Die anti-oxidative Antwort ist ein spezieller Schutzmechanismus der Zellen, um übermäßig gebildete ROS abzufangen und somit Schädigungen entgegenzuwirken. Hierfür werden Antioxidanzien gebildet und ROS-abbauende Enzyme hochreguliert. Wichtige Zielgene der anti-oxidativen Antwort sind die Proteine Hämoxigenase-1 (HO-1), die NADPH-Chinon-Oxidoreduktase (NQO1) sowie die  $\gamma$ -Glutamat-Cystein-Ligase ( $\gamma$ GCLC). Die HO-1 ist an der Umsetzung des Häms verantwortlich, dessen Abbauprodukte, Biliverdin und Bilirubin, für das Abfangen von ROS verantwortlich sind. Die NQO1 reduziert Chinone und verhindert somit die Entstehung von weiteren Radikalen. Die  $\gamma$ GCLC ist die katalytische Untereinheit, die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der *de novo* Synthese von Glutathion katalysiert, wobei Glutathion eines der wichtigsten Antioxidantien der Zelle darstellt.

CdO Partikel wurden als Positivkontrolle für die Prüfung der Induzierbarkeit der Gene in beiden Zelllinien verwendet. CdO induziert durch Freisetzung von Cadmium-Ionen ( $\text{Cd}^{2+}$ ) indirekt den Anstieg von intrazellulär gebildeten ROS. Dabei spielen mehrere Mechanismen eine Rolle. Cadmium kann Eisenionen aus den katalytischen Zentren verdrängen und führt so zur Freisetzung von freiem Eisen, das durch die Fenton-Reaktion die Hydroxylbildung auslöst (Casalino et al., 1997, Watjen and Beyersmann, 2004). Weiterhin führt die Bindung von  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen an die Thiol-Gruppen zur Depletion von Glutathion (Kawata and Suzuki, 1983, Bagchi et al., 1996). Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Aktivität von Enzymen der anti-oxidativen Antwort (Katalase, Superoxid Dismutase, Glutathion Reduktase und Glutathion Peroxidase) durch Cadmium inhibiert wurde (Stohs et al., 2001, Valko et al., 2006). Durch den Anstieg von ROS können aber auch gleichzeitig die Gene der anti-oxidativen Antwort wie z.B. die HO-1 Expression über den Nrf2 (Nuclear factor erythroid-2 related factor 2) - Signalweg angeschaltet werden (Alam et al., 2000).

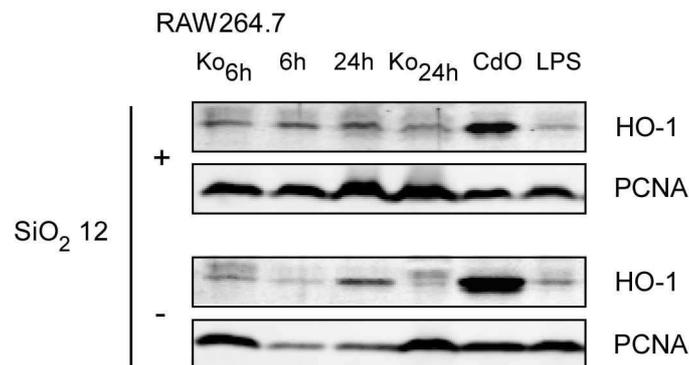
### **3.5.1. $\text{SiO}_2$ -NP induzieren HO-1 nur in RAW264.7 Makrophagen**

CdO Partikel, die als Positivkontrolle verwendet wurden, induzierten alle untersuchten Gene (HO-1, NQO1 und  $\gamma$ GCLC) in RAW264.7 Makrophagen nach 6 h in An- und Abwesenheit von FCS. In A549 Zellen konnte selbst eine 10-fach höhere Dosis von CdO nur die Genexpression der HO-1 leicht erhöhen. Die Behandlung mit  $\text{SiO}_2$ -NP führte nur in RAW264.7 Makrophagen und nur in Abwesenheit von FCS nach 6 h zu einer Induktion der HO-1 und  $\gamma$ GCLC Expression, jedoch nicht zur Erhöhung von NQO1 (Abb. 13). Die HO-1 Induktion konnte mittels Western Blot nach 24 h Inkubation auf Proteinebene verifiziert werden (Abb. 14). In Gegenwart von FCS wurden weder die HO-1 Genexpression noch die HO-1 Proteinbildung induziert, was darauf hinweist, dass die Oberfläche der  $\text{SiO}_2$  NP, die vermutlich keine nennenswerte ROS-Bildung verursacht, dennoch eine anti-oxidative Zellantwort in Abwesenheit von FCS induzieren kann. Keiner der Nanopartikel konnte in A549 Zellen eines der anti-oxidativen Gene induzieren. Vermutlich liegt dies an der permanenten Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2, dessen negativer Regulator Keap-1 in A549 Zellen mutiert ist. Dadurch kommt es zu einer konstitutiven Expression der Gene von HO-1, NQO1 und  $\gamma$ GCLC, die durch Behandlung mit Oxidantien nur wenig verstärkt werden kann, und somit einem dauerhaften Schutz gegen oxidativen Stress bewirkt (Singh et al., 2006). Eine weitere Folge der erhöhten  $\gamma$ GCLC Genexpression ist ein sehr hoher intrazellulärer Glutathionspiegel, wodurch die Cadmium-Ionen abgefangen werden können.



**Abb. 13 Die Regulation einiger Gene der anti-oxidativen Antwort nach NP Exposition.**

RAW264.7 Makrophagen und A549 Zellen wurden mit 50 µg/ml (15,6 µg/cm<sup>2</sup>) SiO<sub>2</sub>-12 nm und 200 µg/ml (62,5 µg/cm<sup>2</sup>) SiO<sub>2</sub> -25 nm, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-10 nm, TiO<sub>2</sub>-20 nm Nanopartikel für 6 h in Medium mit und ohne FCS (+/-) inkubiert. CdO (1 µg/ml für RAW264.7 und 10 µg/ml für A549) diente als Positivkontrollen. Die Analyse der mRNA erfolgte mittels RT-PCR, wobei die Werte auf die unbehandelte Kontrolle normiert und auf das Referenzgen β-Actin normalisiert wurden. Die Ergebnisse stammen aus zwei unabhängigen Versuchen, die in technischen Duplikaten erfolgten (±SEM).



**Abb. 14 Effekt von SiO<sub>2</sub>-12 nm NP auf die Bildung von HO-1**

RAW264.7 Makrophagen wurden mit 50 µg/ml (15,6 µg/cm<sup>2</sup>) in Medium mit und ohne FCS (+/-) für 6 h und 24 h exponiert. Die Detektion der HO-1 Expression wurde mittels Western Blot durchgeführt und als Ladekontrolle PCNA verwendet. Jeweils 1 µg/ml CdO und LPS dienen als Positivkontrollen. Gezeigt werden Western Blots aus zwei unabhängigen Versuchen.

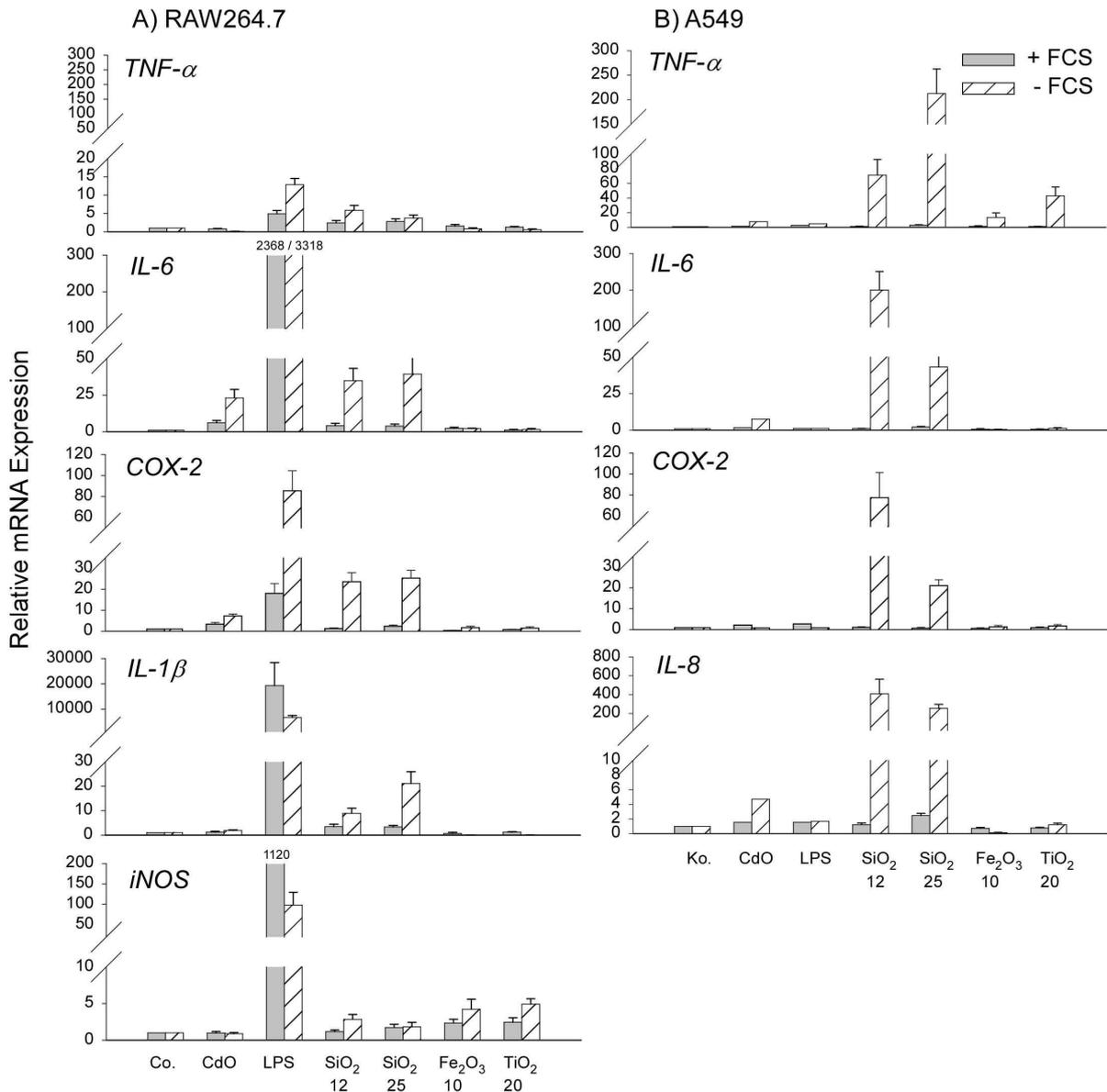
### 3.6. Untersuchung der Induktion von Entzündungsmediatoren

Die Entstehung von Entzündungsreaktionen durch Inhalation von Partikeln ist ein weiterer Effekt der Partikeltoxizität (Nel et al., 2006). Entzündungsreaktionen sind an sich genau wie die anti-oxidative Stressantwort ein Schutzmechanismus des Körpers, vornehmlich gegen Infektionskeime wie Viren und Bakterien. Jedoch kann dieser Schutzmechanismus bei chronischer Aktivierung zu negativen Folgen führen, wie Asthma, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und sogar Krebs. Aus diesem Grund wurden auf mRNA und Proteinebene die Bildung von Entzündungsmediatoren untersucht, die bereits für ihre Beteiligung an der Krebsentstehung bekannt sind. Eine Reihe von Genen der pro-inflammatorischen Antwort wurde dafür ausgewählt, darunter befanden sich die Zytokine Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , die Interleukine-6, -8, - $1\beta$  sowie die Enzyme Cyclooxygenase 2 und die induzierbare NO Synthase (iNOS), wobei IL- $1\beta$  und iNOS als zelltypspezifische Gene nur in Makrophagen und IL-8 nur in den Epithelzellen untersucht wurden. LPS, der Hauptbestandteil der Zellwand aus gram-negativen Bakterien, wurde als Positivkontrolle für die Induzierbarkeit der Gene in beiden Zelllinien verwendet. LPS induziert über die Bindung an den Toll-like Rezeptor (TLR4), die Signalwege NF $\kappa$ B und die MAP Kinasen, wodurch die Expression der hier untersuchten pro-inflammatorischen Gene angeschaltet wird.

#### 3.6.1. Gene der pro-inflammatorischen Antwort werden sowohl in RAW264.7 Makrophagen als auch A549 Zellen hauptsächlich nach SiO<sub>2</sub> Exposition induziert.

In den RAW264.7 Makrophagen bewirkte LPS bei einer Konzentration von 1  $\mu$ g/ml eine starke Induktion der untersuchten Gene in An- und Abwesenheit von FCS (Abb. 15). Jedoch erhöhte selbst eine 10-fach höhere Dosis LPS kaum die Genexpression in den A549 Zellen. Diese Unterschiede zwischen den Zelllinien könnten möglicherweise an einer unterschiedlich starken Bindungsaffinität des TLR-4 an das hier verwendete LPS aus *P.aeruginosa* bei den A549 Zellen liegen. So haben z.B. Hansen und Kollegen auch schon für A549 Zellen gezeigt, dass die Menge der LPS-induzierte IL-8 Freisetzung von der Bakterienspezies abhing (Hansen et al., 1997). Zusätzlich ist der TLR-4 bei unstimulierten A549 nicht auf der Membran, sondern intrazellulär lokalisiert und LPS muss zuerst aufgenommen werden, bevor es zur Interaktion mit dem TLR4 Rezeptor sowie der Aktivierung der Signalkaskade kommen kann (Guillot et al., 2004). Unabhängig oder als Folge davon könnte es zu einer transienten Aktivierung der Signalkaskade führen, wobei die Expression der pro-inflammatorischen Gene nur kurzfristig nach Stimulation mit LPS hochreguliert und bei dem hier untersuchten Zeitpunkt wieder herunterreguliert wurden.

Es konnte weiterhin beobachtet werden, dass in beiden Zelllinien eine Induktion der pro-inflammatorischen Zellantwort hauptsächlich nach Behandlung mit NP in FCS-freiem Medium auftrat. In beiden Zelllinien war die Genexpression aller untersuchten Gene hauptsächlich nach SiO<sub>2</sub>-NP Behandlung nach 6 h stark erhöht. TiO<sub>2</sub>- und Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NP Behandlung führte kaum zu einer Veränderung der Genexpression bis auf zwei Ausnahmen. Die mRNA Expression der iNOS in Makrophagen wurde durch TiO<sub>2</sub>- und Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NP leicht und die TNF- $\alpha$  mRNA Level in FCS-freiem Medium nur in A549 Lungenepithelzellen relativ stark induziert. Obwohl die Geneexpression durch SiO<sub>2</sub>-NP in Abwesenheit von FCS in beiden Zelllinien stärker als bei Abwesenheit von FCS war, waren Unterschiede in den relativen Leveln zwischen den Zelllinien zu beobachten. Besonders auffällig war die relativ schwache TNF- $\alpha$  Induktion in den RAW264.7 Makrophagen durch SiO<sub>2</sub>-NP im Vergleich zu den A549 Zellen. Dieser Unterschied lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass TNF- $\alpha$  in Makrophagen auch ohne einen Stimulus basal exprimiert wird. Es wurde bereits gezeigt, dass die p50 Untereinheit von NF $\kappa$ B sich auch bei unstimulierten Makrophagen bereits im Zellkern befindet und eine basale Aktivierung der Genexpression bewirkt (Collart et al., 1990). In Epithelzellen wird TNF- $\alpha$  jedoch basal fast überhaupt nicht exprimiert und erst durch einen Stimulus kommt es zu einer relativ starken Expression im Vergleich zu nicht-stimulierten Kontrollzellen. Dieser Unterschied liegt vermutlich daran, dass der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B erst nach Aktivierung in den Zellkern transloziert und die Genexpression aktiviert.



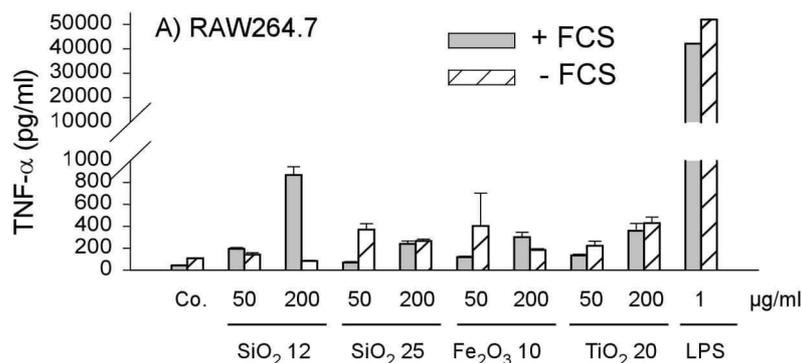
**Abb. 15 Die Genregulation der pro-inflammatorischen Antwort nach NP Exposition**

RAW264.7 Makrophagen und A549 Zellen wurden mit 50 µg/ml (15,6 µg/cm<sup>2</sup>) SiO<sub>2</sub>-12 nm und 200 µg/ml (62,5 µg/cm<sup>2</sup>) SiO<sub>2</sub>-25 nm, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-10 nm, TiO<sub>2</sub>-20 nm Nanopartikel für 6 h in Medium mit und ohne FCS (+/-) inkubiert. CdO und LPS dienten als Positivkontrollen. Die Analyse der mRNA erfolgte mittels qRT-PCR, wobei die Werte auf die unbehandelte Kontrolle normiert und auf das Referenzgen β-Actin normalisiert wurden. Die Ergebnisse stammen aus zwei unabhängigen Versuchen, die in technischen Duplikaten erfolgten (±SEM).

### 3.6.2. SiO<sub>2</sub>-NP induzierte Freisetzung von TNF- $\alpha$ erfolgt nur in RAW264.7 Makrophagen.

Um die Expressionsanalyse zu verifizieren, wurde die Freisetzung von TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-1 $\beta$  ins Medium mittels des ELISA nach 24 h Inkubation mit allen NP in beiden Zelllinien untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass TNF- $\alpha$  kaum in Abwesenheit von FCS freigesetzt wurde. Erstaunlicherweise wurde TNF- $\alpha$  in Gegenwart von FCS im Medium nach SiO<sub>2</sub>-12 nm NP Behandlung sekretiert (Abb. 16). Des Weiteren wurden IL-6 und IL-1 $\beta$  überhaupt nicht sezerniert (Daten nicht gezeigt), obwohl die Gene auf mRNA Ebene hochreguliert wurden. Dieser Unterschied zur Genexpression bei der in Abwesenheit von FCS sowohl TNF- $\alpha$ , IL-6 als auch IL-1 $\beta$  induziert wurden, legt nochmals nahe, dass die komplexe Regulation dieser Zytokine von vielen Faktoren abhängt und möglicherweise auf posttranslatonaler und/oder sekretorischer Ebene die Freisetzung der Proteine reguliert bzw. inhibiert wird. Außerdem gibt es mögliche Fehlerquellen bei der Bestimmung von Proteinen in serumfreien Medium. Das Fehlen von Serumproteinen im Überschuss kann einerseits dazu führen, dass die freigesetzten Proteine an die Plastikoberfläche der Zellkulturschalen binden. Andererseits adsorbieren Nanopartikel selbst in hohem Maße Proteine, wodurch die freigesetzten Proteine bei der Immunodetektion nicht mehr zur Verfügung stehen (Veranth et al., 2007).

Die COX-2 Bildung nach SiO<sub>2</sub>-NP Behandlung wurde mittels Western Blot untersucht, wobei sich auch für dieses Gen zeigte, dass trotz erhöhter Genexpression kein Protein gebildet wurde. Auch die Analyse der iNOS Aktivität bzw. der indirekten Messung der NO Freisetzung über den Nachweis von Nitrit mittels des Griess Reagenz, konnte keine Induktion dieses Enzyms zeigen (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 16 Effekte auf die TNF- $\alpha$  Freisetzung in RAW264.7 Makrophagen nach NP Exposition**

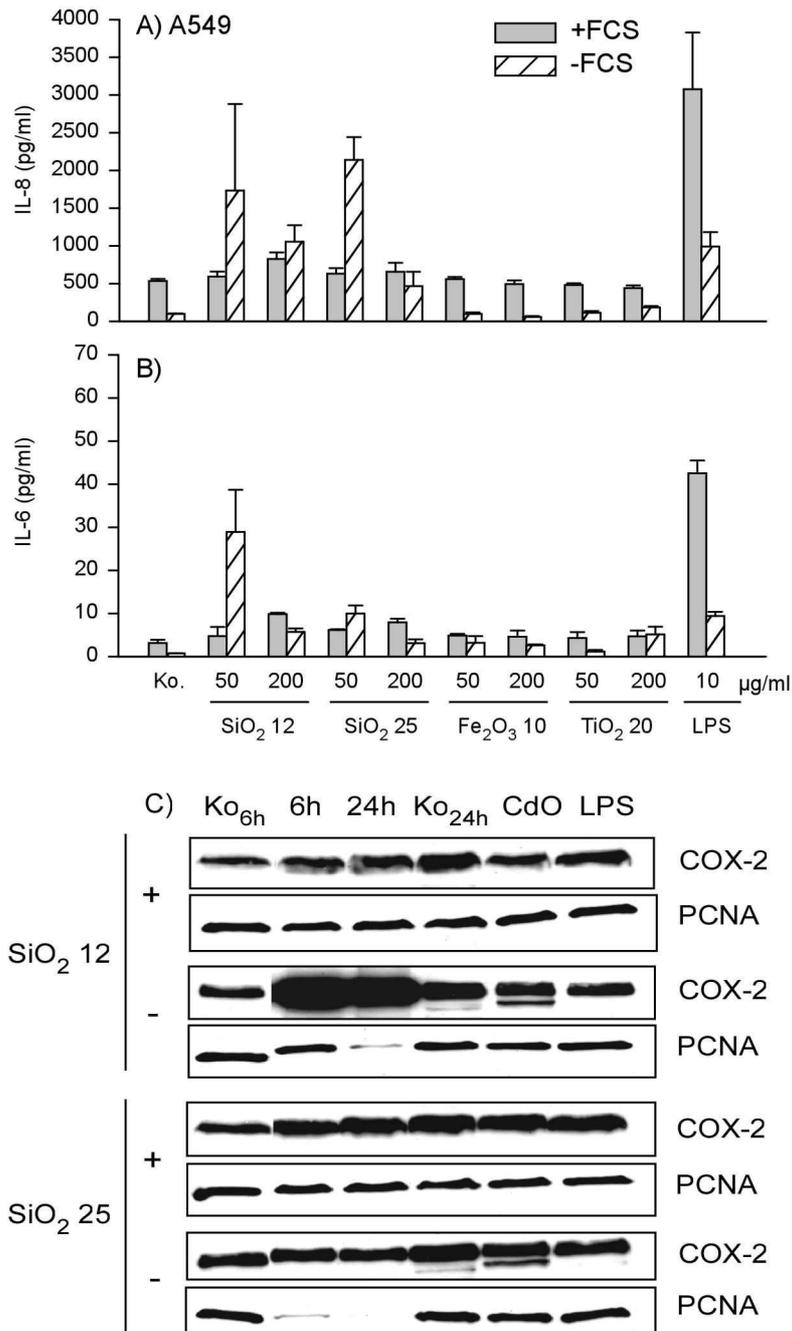
RAW 264.7 Makrophagen wurden mit 50  $\mu$ g/ml (15,6  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) und 200  $\mu$ g/ml (62,5  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) der angegebenen NP für 24 h in Medium mit und ohne FCS inkubiert. Als Positivkontrolle diente 1  $\mu$ g/ml LPS. Die Freisetzung des Zytokins (TNF- $\alpha$ ) ins Medium wurde immunologisch im ELISA detektiert. Die Werte wurden im Triplikat durchgeführt und stehen repräsentativ für drei unabhängige Versuche ( $\pm$ SD).

### **3.6.3. SiO<sub>2</sub>-NP induzieren die Freisetzung von IL-8, IL-6 und die Synthese von COX-2 in A549 Zellen in Abwesenheit von FCS.**

Auch die Freisetzung von IL-8, IL-6 und TNF- $\alpha$  durch A549 Zellen nach 24 h NP Behandlung wurde mittels ELISA überprüft. Hierbei konnte bestätigt werden, dass IL-8 v.a. in Abwesenheit von FCS nach SiO<sub>2</sub>-NP Behandlung freigesetzt wurde (Abb. 17-A). Sowohl für die gekauften 12 nm NP als auch für die selbsthergestellten 25 nm SiO<sub>2</sub>-NP waren die IL-8 Mengen ähnlich, was vergleichbar mit der relativen mRNA Expression war. In unbehandelten Kontrollzellen wurde in Gegenwart von FCS mehr IL-8 als ohne FCS freigesetzt, was darauf hinweist, dass FCS eine spontane Freisetzung von IL-8 in A549 Zellen bewirkte. Auch die Sekretion von IL-6 konnte nach SiO<sub>2</sub>-NP Behandlung nur in Abwesenheit von FCS gezeigt werden (Abb. 17-B). Hierbei war die IL-6 Menge für die gekauften SiO<sub>2</sub>-12 nm NP höher als für die 25 nm NP, dies war aber auch mit den mRNA Leveln vergleichbar. Das einzige Zytokin, das nicht freigesetzt wurde, war TNF- $\alpha$ , auch nicht nach Behandlung mit TiO<sub>2</sub>- und Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NP, obwohl TNF- $\alpha$  auf Genebene induziert wurde.

Weiterhin konnte die Induktion der COX-2 mittels Western Blot Analyse nach SiO<sub>2</sub>-NP Behandlung in Abwesenheit von FCS sowie eine zeitabhängige Zunahme beobachtet werden (Abb. 17-C). Die Reduktion des Proteingehalts der Ladekontrolle PCNA bei den SiO<sub>2</sub>-NP behandelten Zellen wurde durch das starke Absterben der Zellen innerhalb von 24 h verursacht. Trotzdem konnte immer noch eine beträchtliche Menge COX-2 detektiert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl die gekauften SiO<sub>2</sub>-12 nm NP als auch die selbsthergestellten SiO<sub>2</sub>-25 nm NP v.a. in Medium ohne FCS Gene der anti-oxidativen und pro-inflammatorischen Antwort induzierten. Jedoch sind die einzelnen Wirkungen stark von der Zelllinie abhängig. Die anti-oxidative Antwort wurde nur in RAW264.7 Makrophagen induziert, jedoch nicht in den A549 Lungenepithelzellen. Dafür war die pro-inflammatorische Antwort in beiden Zelllinien auf Genebene sehr stark ausgeprägt, doch auf Proteinebene wurden große Unterschiede zwischen den Zelllinien beobachtet. Im Gegensatz zu den A549 Zellen bildeten die RAW264.7 Makrophagen kaum Proteine der pro-inflammatorischen Antwort.



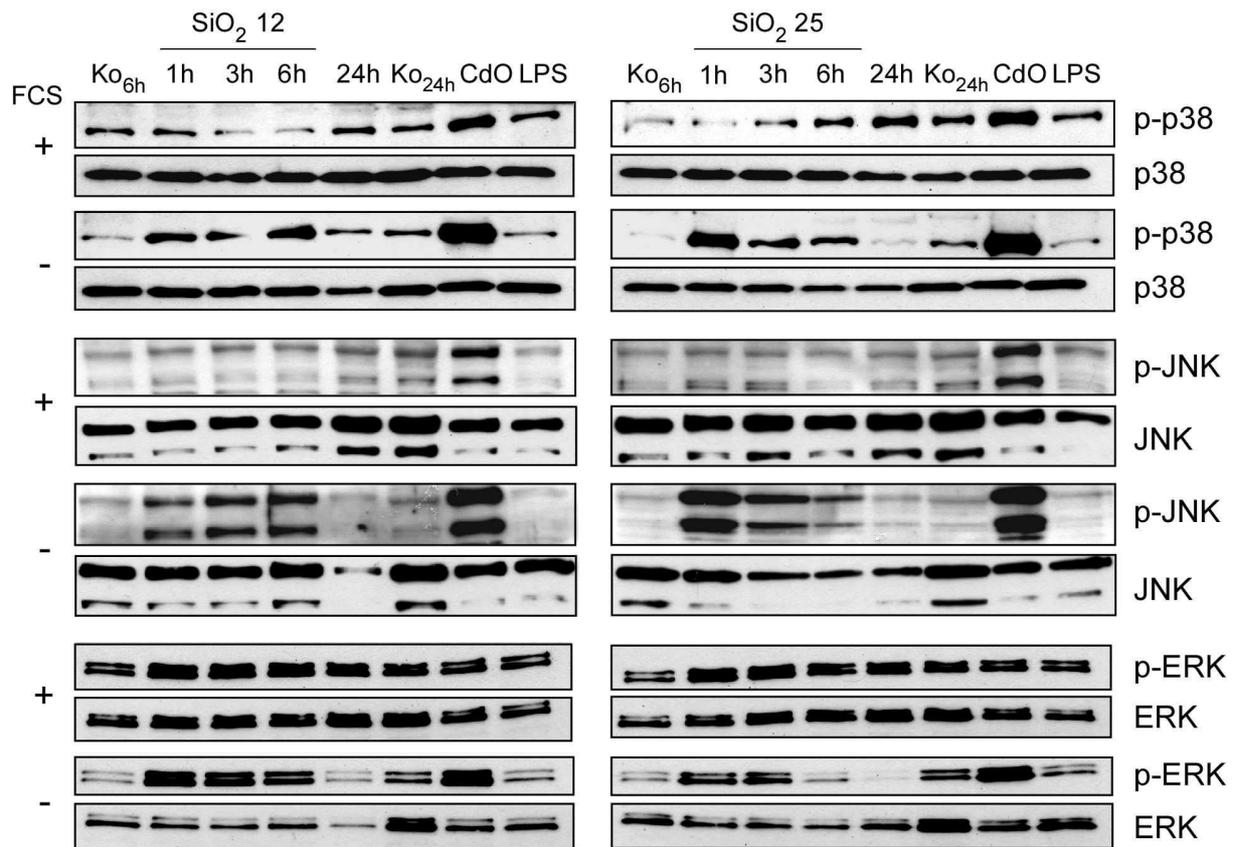
**Abb. 17 Effekte von NP auf die Freisetzung der Zytokine IL-8, IL-6 sowie die Synthese von COX-2 in A549 Zellen**

A549 Zellen wurden mit 50 µg/ml (15,6 µg/cm<sup>2</sup>) und 200 µg/ml (62,5 µg/cm<sup>2</sup>) der angegebenen NP für 24 h in Medium mit und ohne FCS inkubiert. Als Positivkontrolle diente 10 µg/ml LPS, das ebenfalls für 24 h mit den Zellen inkubiert wurde. Die Freisetzung der Zytokine IL-8 (A) und IL-6 (B) ins Medium wurde immunologisch im ELISA detektiert. Die Werte wurden im Triplikat durchgeführt und stehen repräsentativ für drei unabhängige Versuche (±SD). (C) Die Expression von COX-2 auf Proteinebene wurde nach Exposition mit SiO<sub>2</sub>-12 nm (50 µg/ml) und SiO<sub>2</sub> 25 nm (200 µg/ml) in Medium mit und ohne FCS (+/-) nach 6 h und 24 h mittels Western Blot detektiert. PCNA wurde als Ladekontrolle verwendet und jeweils 10 µg/ml LPS und CdO nach 6 h Inkubation dienten als Positivkontrollen. Dargestellt sind ein repräsentativer Western Blot aus drei unabhängigen Versuchen.

### 3.7. SiO<sub>2</sub>-NP induzieren die Aktivierung von Mitogen- und Stress-aktivierten Proteinkinasen.

In den vorhergehenden Experimenten wurde die Induktion der Genexpression von unterschiedlichen Entzündungsmediatoren gezeigt. Nun sollte im Folgenden untersucht werden, welche Signalwege an der Genregulation beteiligt sind. Deshalb wurden die drei MAP Kinase Signalwege untersucht, zu deren Regulatoren die Kinasen p38, JNK und ERK zählen. Ihre Aktivierung erfolgt durch Phosphorylierung an den Aminosäuren Tyrosin und Threonin, was im Western Blot mittels phospho-spezifischer Antikörper nachgewiesen werden kann. Bereits in der Arbeit von C.Marquardt konnte die Aktivierung der drei MAP Kinase Signalwege nach Exposition mit SiO<sub>2</sub>-12 nm NP in RAW264.7 zeitabhängig und ab einer Konzentration von 15,6 cm<sup>2</sup> (50 µg/ml) in Medium ohne FCS gezeigt werden (Marquardt, 2011).

Deshalb wurde in dieser Arbeit die Aktivierung der MAP-Kinase Signalwege nur in A549 Zellen analysiert. Hierbei zeigte sich, dass alle drei MAP-Kinasen p38, JNK und ERK nach SiO<sub>2</sub>-12 und -25 nm NP Exposition phosphoryliert wurden, jedoch nur in Abwesenheit von FCS. In Gegenwart von FCS konnten jedoch eine basale Phosphorylierung unabhängig von der Behandlung beobachtet werden (Abb. 18). CdO und LPS wurden als Positivkontrollen verwendet, da sie ebenfalls die MAP Kinasen aktivieren können. Jedoch führte nur die Exposition mit CdO zur Phosphorylierung von p38, JNK und ERK. Insbesondere war das Signal stärker in Abwesenheit von Serum im Medium. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Serumproteine, unter anderem Albumin, die Fähigkeit besitzen, Cd<sup>2+</sup>-Ionen abzufangen, indem die Cd<sup>2+</sup>-Ionen an die Thiol-Gruppen der Proteine binden (Scott and Bradwell, 1983, Lopez et al., 2006). Erstaunlicherweise zeigte LPS keine Aktivierung der MAP-Kinasen nach 6 h. Ein möglicher Grund könnte eine transiente Phosphorylierung sein, die bereits nach 6 h durch Phosphatasen rückgängig gemacht wurde.



**Abb. 18 Aktivierung der MAP Kinasen p38, JNK und ERK nach SiO<sub>2</sub>-12 nm und -25 nm NP Exposition in Medium ohne FCS**

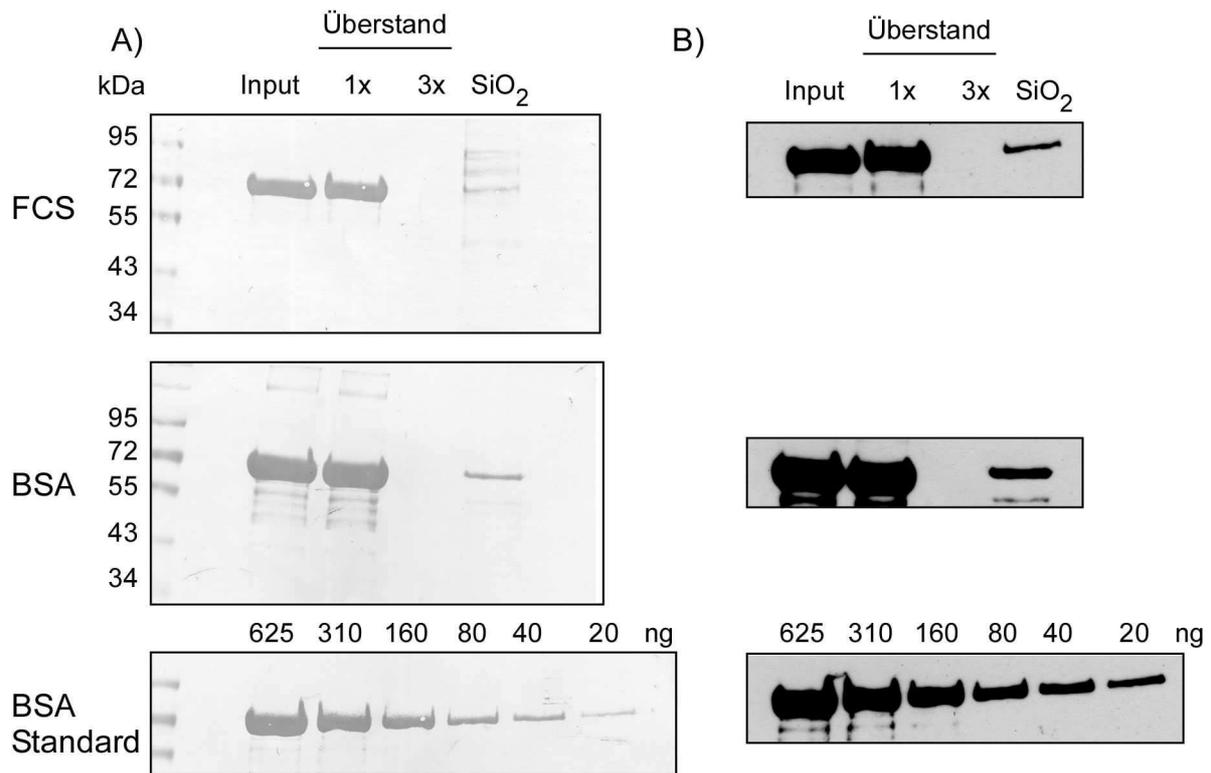
A549 Zellen wurden mit 50 µg/ml (15,6 µg/cm<sup>2</sup>) SiO<sub>2</sub>-12 nm NP und 200 µg/ml (62,5 µg/cm<sup>2</sup>) SiO<sub>2</sub>-25 nm NP für 1 h, 3 h, 6 h und 24 h in Medium mit und ohne FCS (+/-) inkubiert. Jeweils 10 µg/ml CdO und LPS wurden als Positivkontrolle für 6 h in den entsprechenden Medien auf die Zellen gegeben. Die Phosphorylierung der MAP Kinasen p38, JNK und ERK wurde im Western Blot mit phosphospezifischen Antikörpern detektiert. Die geladene Gesamtproteinmenge wurde mit Antikörpern gegen die nicht phosphorylierten Formen bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Western Blots aus zwei unabhängigen Versuchen.

### 3.8. Einfluss der Proteinkorona aus Bestandteilen des FCS auf die zelluläre Antwort nach SiO<sub>2</sub>-NP Exposition

Zusammenfassend demonstrierten alle bereits gezeigten Ergebnisse, dass die toxischen Effekte v.a. von SiO<sub>2</sub>-NP nur in Abwesenheit von FCS zu beobachten waren und dass FCS einen protektiven Effekt hatte. Dabei stellt sich die Frage, welche Bestandteile des FCS diesen protektiven Effekt bewirkten. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass FCS den kompletten Metabolismus der Zellen beeinflusst, wodurch diese eine höhere Resistenz gegenüber Stressoren aufzeigen würden. Eine weitere Möglichkeit ist die Bindung von FCS Proteinen an die SiO<sub>2</sub>-NP. Dadurch wäre die Oberfläche der Partikel abgeschirmt und der Kontakt mit den Zellbestandteilen reduziert. Da FCS aus einem Gemisch aus verschiedenen Proteinen besteht, wurde zunächst die Bindung von Albumin dem Hauptbestandteil des FCS an die Partikel untersucht.

#### 3.8.1. Adsorption von Serumproteinen an SiO<sub>2</sub>-NP

Um die Adsorption von Serumproteinen an die SiO<sub>2</sub>-12 nm NP zu untersuchen, wurden zwei Ansätze vorbereitet. Dazu wurden 200 µg/ml SiO<sub>2</sub>-12 nm NP mit 10 % FCS sowie mit 1 % BSA in Medium für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach mehreren Waschschritten (Entfernen von ungebundenem Protein) wurden die Partikel-assoziierten Proteine mit Lämmli-Puffer gelöst und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Im Western Blot konnte die Bindung von BSA mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Im Anschluss wurde die Membran mit Coomassie gefärbt und alle gebundenen Proteine sichtbar gemacht. In Abb. 19 (obere Reihe) wird gezeigt, dass nach Inkubation mit FCS hauptsächlich BSA an die SiO<sub>2</sub>-NP adsorbiert war und dass aber auch andere Proteine gebunden waren. In Abb. 19 (mittlere Reihe) wurde die Bindung von BSA nochmals mit reinem BSA bestätigt werden. Um die Menge des adsorbierten BSA zu quantifizieren, wurde eine Standardreihe mit bekannten BSA-Konzentrationen geladen (Abb. 19 (untere Reihe)). Daraus ergab sich, dass etwa 40 ng BSA an 200 µg SiO<sub>2</sub>-NP gebunden hatten. Um den prozentualen Anteil der Beschichtung zu berechnen, wurde angenommen, dass es sich um eine monomolekulare Schicht handelt, und dass die Fläche eines BSA-Moleküls, die mit der Partikel-oberfläche interagiert, einem gleichseitigen Dreieck mit einer Seitenlänge von 8 nm entspricht, was eine Oberfläche von 27,7 nm<sup>2</sup> ergeben würde (Rocker et al., 2009). Hierbei entsprechen bei einer molaren Masse von 67000 g/mol 40 ng BSA einer Anzahl von  $3,59 \times 10^{11}$  BSA-Molekülen. Die Gesamtfläche, die die BSA Moleküle abdecken, beträgt demnach  $1,01 \times 10^{-5}$  m<sup>2</sup>. Bei einer spezifischen Oberfläche von 200 m<sup>2</sup>/g entsprechen 200 µg SiO<sub>2</sub>-NP einer Oberfläche von 0,04 m<sup>2</sup>. Somit ergibt sich daraus eine Oberflächenbeschichtung von 0,025 %.



### Abb. 19 SiO<sub>2</sub> 12 nm NP binden hauptsächlich BSA nach Inkubation mit FCS

200 µg SiO<sub>2</sub>-12 nm NP wurden einerseits mit 10 % FCS und als Kontrolle mit 1 % BSA in Medium für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach mehreren Waschschrritten wurden die Partikel-gebundenen Proteine mit Lämmli-Puffer gelöst und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Beladung des Gels wurde wie folgt durchgeführt: Input = Medium mit 10 % FCS oder 1 % BSA, 1x = Überstand nach dem ersten Zentrifugationsschritt, 3x = Überstand nach dem dritten Zentrifugationsschritt, SiO<sub>2</sub> = an SiO<sub>2</sub>-12 nm NP gebundene Proteine. Zur Visualisierung der gesamten Proteinmenge wurde die Membran mit Coomassie gefärbt (A). Die Bindung von BSA an die SiO<sub>2</sub>-NP wurde im Western Blot mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen (B). Für den BSA Standard wurden die angegebenen Mengen BSA auf das Gel geladen, im Western Blot detektiert bzw. mit Coomassie sichtbar gemacht. Gezeigt sind repräsentative Gele bzw. Western Blots von drei unabhängigen Versuchen.

### 3.8.2. Die Adsorption von Serumproteinen reduziert die SiO<sub>2</sub>-NP induzierte Toxizität in A549 Zellen.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass BSA an SiO<sub>2</sub>-NP, adsorbiert, sollte untersucht werden, ob die Proteinbindung einen Einfluss auf die Toxizität hat. Dazu wurden die SiO<sub>2</sub>-12 nm NP wie oben beschrieben mit FCS, 0,5 % BSA und 1 % BSA beschichtet, und gewaschen, wobei 0,5 % BSA der Albuminkonzentration im FCS entsprechen. Die beschichteten NP wurden daraufhin in serumfreien Medium mit einer Konzentration von 50 µg/ml (15,6 µg/cm<sup>2</sup>) für 24 h mit A549 Zellen inkubiert und die Zytotoxizität mittels des LDH Assays bestimmt. Als Kontrollen dienten nicht-vorbehandelte SiO<sub>2</sub>-NP, die in FCS-haltigem und FCS-freiem Medium inkubiert wurden. Die Vorbehandlung der NP mit FCS sowie auch mit 0,5 % und 1 % BSA reduzierten die SiO<sub>2</sub>-NP-induzierte LDH-Freisetzung in serumfreiem Medium. Die Vorbehandlung mit FCS hatte den gleichen protektiven Einfluss auf die Zellen wie bei der Inkubation in FCS-haltigem Medium während der Schutzeffekt von

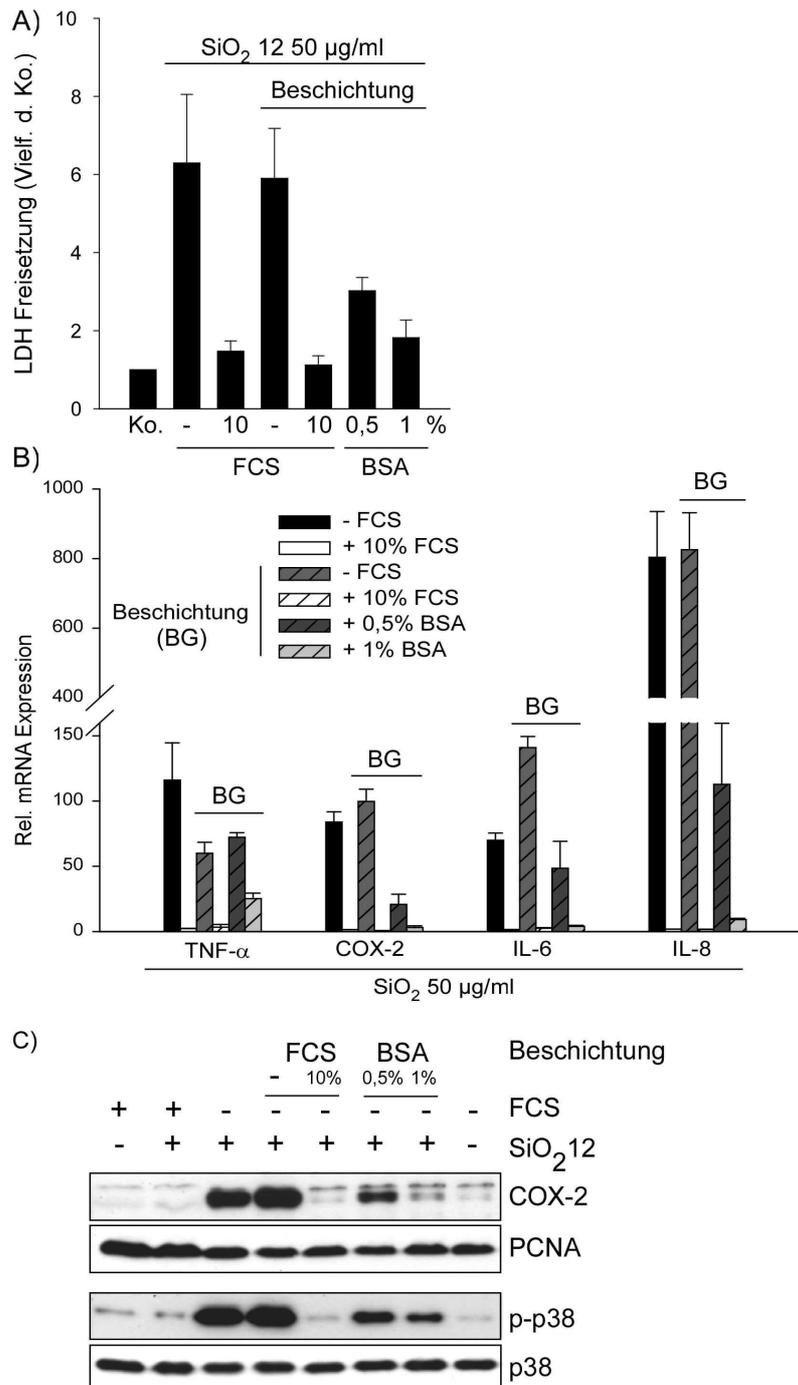
0,5 % BSA etwas geringer war. Das deutet darauf hin, dass Albumin zwar eine wichtige Rolle bei der Reduktion der SiO<sub>2</sub>-NP-induzierten Toxizität spielt, jedoch auch andere Proteine des FCS an der Schutzfunktion beteiligt sind. Nur die unbeschichteten NP führten zu einer hohen LDH Freisetzung und somit zum Verlust der Membranintegrität (Abb. 20-A).

### **3.8.3. Die Expression der Gene der pro-inflammatorischen Antwort wird durch die Proteinbeschichtung der SiO<sub>2</sub>-NP reduziert.**

Der Einfluss von FCS- und BSA-Beschichtung auf die pro-inflammatorische Antwort konnte mit dieser Methode ebenfalls untersucht werden. In Abb. 20-B ist die Abnahme der relativen Genexpression durch BSA und die Proteine im FCS dargestellt. Die Beschichtung mit FCS und mit 1 % BSA reduzierten die Genexpression fast auf den Level von FCS-haltigem Medium, wobei die Beschichtung mit der geringeren BSA Konzentration (0,5 %) nicht so effektiv war. Dieser Unterschied konnte auch in den folgenden Experimenten beobachtet werden.

### **3.8.4. Die Induktion der COX-2 und die Phosphorylierung der p38 MAP Kinase wird durch die Proteinbeschichtung inhibiert.**

Zusätzlich zur Genexpressionsanalyse wurden die Induktion der COX-2 auf Proteinebene und die Aktivierung des MAP Kinase Wegs p38 nach Exposition mit den beschichteten SiO<sub>2</sub> NPn mittels Western Blot analysiert (Abb. 20 C). Anhand dieser Experimente wurde nochmals bestätigt, dass sowohl die inflammatorische Antwort als auch die p38 Aktivierung durch die Beschichtung alleine komplett gehemmt werden.



### Abb. 20 An SiO<sub>2</sub>-12 NP gebundene Proteine hemmen die NP-induzierte Toxizität, Inflammation und p38 Phosphorylierung

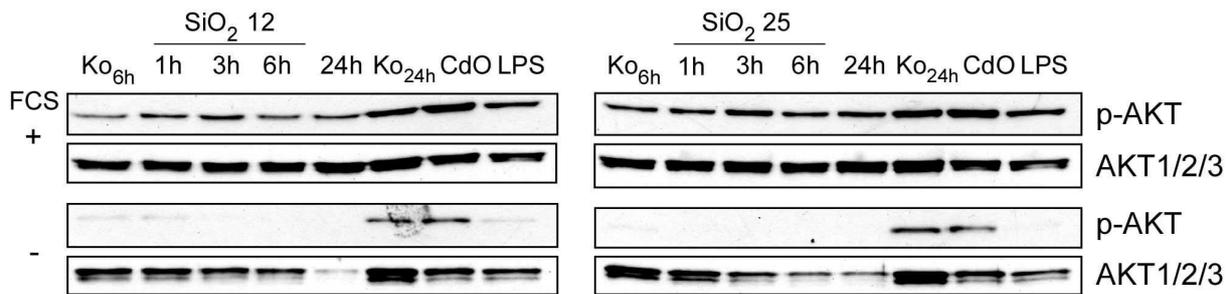
(A) Die Beschichtung der SiO<sub>2</sub>-12 nm NP erfolgte durch Vorinkubation mit Medium ohne FCS, mit 10 % FCS, 0,5 % und 1 % BSA für 1 h in Medium bei 37 °C. Nach mehreren Waschschritten wurden die NP in FCS-freiem Medium resuspendiert und für 24 h mit A549 Zellen inkubiert. Die LDH Freisetzung wurde im Überstand mit dem LDH-Assay gemessen und auf die unbehandelten Kontrollen normiert. Um auszuschließen, dass die Vorinkubation und ein NP Verlust durch die Waschschrritte die zelluläre Antwort beeinflusst, wurden SiO<sub>2</sub>-NP in Medium mit (+) und ohne (-) FCS wie in den vorhergehenden Experimenten inkubiert. (B) Die Genexpressionsanalyse der pro-inflammatorischen Antwort wurde nach 6 h Inkubation mit den wie in (A) beschichteten NP (BG) mittels qRT-PCR durchgeführt. (C) Die COX-2 Expression und die p38 Phosphorylierung wurden im Western Blot mit spezifischen Antikörpern detektiert, wobei A549 Zellen für 6 h mit den SiO<sub>2</sub>-NP wie in (A) inkubiert wurden. PCNA und die nicht-phosphorylierte Form von p38 dienten als Ladekontrollen. Gezeigt sind repräsentative Western Blots von drei unabhängigen Versuchen.

### 3.9. FCS Bestandteile aktivieren den PI3K/AKT Signalweg

In den vorhergehenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass FCS alle zytotoxischen Auswirkungen der SiO<sub>2</sub>-NP hemmen konnte. Deshalb stellte sich die Frage, auf welche Weise FCS zusätzlich zum Abschirmeffekt durch BSA die zelluläre Antwort nach NP Exposition verändern konnte. Ein wichtiger Bestandteil von FCS sind Wachstumsfaktoren wie der *Epidermal growth factor* (EGF), der *Vascular endothelial growth factor* (VEGF), der *Platelet derived growth factor* (PDGF) und viele andere. Durch diese Wachstumsfaktoren werden insbesondere Signalwege angeschaltet, die die Zellproliferation und das Überleben der Zellen fördern. Deshalb wurde im Folgenden ein besonders wichtiger und bekannter Signalweg untersucht, der möglicherweise bei der FCS-induzierten Resistenz gegenüber SiO<sub>2</sub>-NP eine Rolle spielt. Der PI3K/Akt-Signalweg ist neben dem ERK-Signalweg für das Überleben von Zellen verantwortlich. Der Hauptregulator dieses Signalweges ist die Serin/Threonin Kinase AKT, die an der Schaltstelle zwischen verschiedenen weiteren Signalwegen steht, die durch ihre Aktivierung anti-apoptotisch wirken. Die Aktivierung dieses Signalweges wurde durch die Detektion der phosphorylierten Form von AKT im Western Blot mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

#### 3.9.1. Die Anwesenheit von FCS führt zu konstanter AKT Phosphorylierung.

Um zu zeigen, dass nur FCS-haltiges Medium und nicht etwa die Partikel an der AKT-Aktivierung beteiligt sind, wurden A549 Zellen mit SiO<sub>2</sub>-12 nm und -25 nm NP in FCS-haltigem und FCS-freiem Medium für unterschiedliche Zeitpunkte inkubiert. In Abb. 21 wird dargestellt, dass unabhängig von der SiO<sub>2</sub>-NP Behandlung nur FCS-haltiges Medium zu allen Zeitpunkten die AKT-Phosphorylierung induzierte. Gleichzeitig wurde der AKT-Signalweg durch die Exposition der Zellen in FCS-freiem Medium innerhalb von 6 h inaktiviert. Auch durch Exposition mit SiO<sub>2</sub>-NP in FCS-freiem Medium wurde AKT zu keinem Zeitpunkt phosphoryliert. Interessanterweise führte die Inkubation der Zellen für 6 h mit 10 µg/ml CdO in FCS freiem Medium zu einer AKT-Phosphorylierung, genauso wie eine 24 h Inkubation nur mit FCS-freiem Medium.

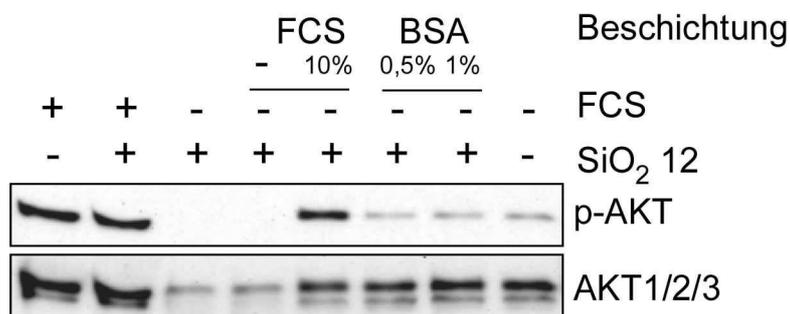


**Abb. 21 Die Anwesenheit von FCS führt zu konstanter AKT Phosphorylierung**

A549 Zellen wurden mit 50 µg/ml (15,6 µg/cm<sup>2</sup>) SiO<sub>2</sub>-12 NP und 200 µg/ml (62,5 µg/cm<sup>2</sup>) SiO<sub>2</sub>-25 nm NP für 1 h, 3 h, 6 h und 24 h in Medium mit und ohne FCS (+/-) inkubiert. Jeweils 10 µg/ml CdO und LPS wurden für 6 h in den entsprechenden Medien auf die Zellen gegeben. Die Phosphorylierung der AKT Kinase wurde im Western Blot mit einem phospho-spezifischen Antikörper detektiert. Die geladene Gesamtproteinmenge an AKT wurde mit einem Antikörper gegen die nicht phosphorylierte Form bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen.

**3.9.2. Nur die Beschichtung von SiO<sub>2</sub>-NPn mit dem Proteingemisch des FCS bewirkt eine Phosphorylierung von AKT.**

Da der Einfluss von FCS auf die Aktivierung des AKT-Signalweges gezeigt werden konnte, sollte nun untersucht werden, ob auch FCS- oder BSA-beschichtete SiO<sub>2</sub>-NP dazu in der Lage wären. Deshalb wurden die A549 Zellen zur Kontrolle mit den SiO<sub>2</sub> NP in An- und Abwesenheit von FCS im Medium sowie mit den beschichteten SiO<sub>2</sub> NP in Abwesenheit von FCS in Medium für 6 h inkubiert und anschließend die AKT-Phosphorylierung mit phospho-spezifischen Antikörpern detektiert. In Abb. 22 wird ersichtlich, dass FCS im Medium sowie nur mit FCS-beschichtete NP die Aktivierung von AKT induzieren konnten, was möglicherweise den Beitrag zur hemmenden Wirkung bei Zytotoxizität, Inflammation und p38 Phosphorylierung erklärt.



**Abb. 22 AKT-Phosphorylierung wird durch FCS-Beschichtung von NP bewirkt.**

A549 Zellen wurden mit beschichteten 50 µg/ml (15,6 µg/cm<sup>2</sup>) SiO<sub>2</sub>-12 nm NP für 6 h inkubiert. Die Beschichtung der SiO<sub>2</sub>-NP erfolgte durch Vorinkubation mit Medium ohne FCS, mit 10 % FCS, 0,5 % und 1 % BSA für 1 h in Medium bei 37 °C. Nach mehreren Waschschriffen wurden die NP in FCS-freiem Medium resuspendiert. Die Phosphorylierung der AKT Kinase wurde im Western Blot mit einem phospho-spezifischen Antikörper detektiert. Die geladene Gesamtproteinmenge wurde mit einem Antikörper gegen die nicht phosphorylierte Form bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen.

### 3.10. Exposition von A549 Zellen mit SiO<sub>2</sub>-NP an der Luft-/ Flüssigkeitsgrenzschicht im Vergleich zu submersen Bedingungen

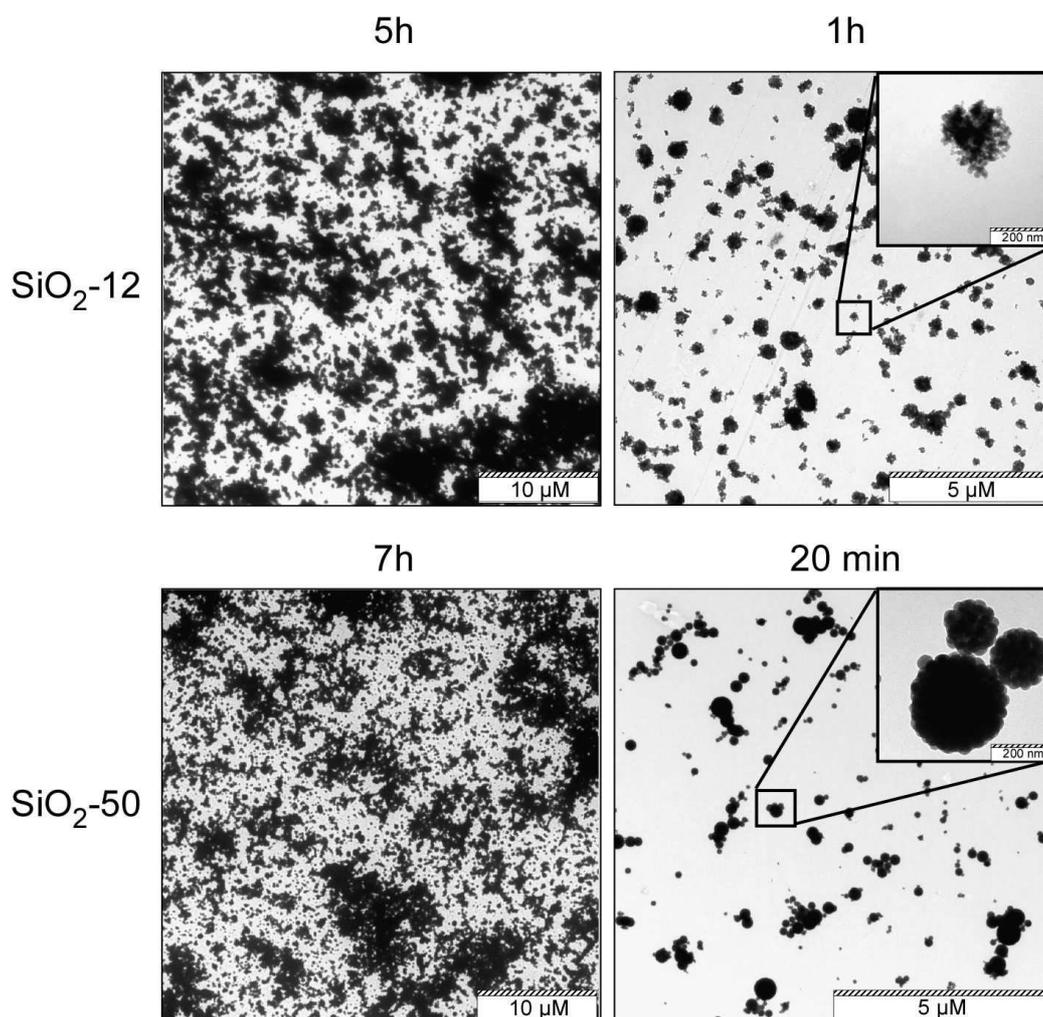
In dieser Arbeit wurde bisher gezeigt, dass die wirksamste Partikelsorte die SiO<sub>2</sub>-NP waren, insbesondere SiO<sub>2</sub>-12 nm NP. Diese NP lösten bei Abwesenheit von FCS unter submersen Bedingungen eine hohe Toxizität und eine pro-inflammatorische Wirkung in A549 Zellen aus. Davon ausgehend soll im Folgenden die Wirkung auch an der Luft-/Flüssigkeits-Grenzschicht (ALI) getestet werden. Diese Applikationsmethode soll ein möglichst realistisches *in vitro* Expositionsszenario für die Lunge darstellen. Dazu wurden in Kooperation mit dem Institut für Meteorologie und Klimaforschung genau definierte und charakterisierte Aerosole erzeugt und wie in Kapitel 2.11 beschrieben, in direkten Kontakt zu den A549 Zellen gebracht. Hierbei wurde die Interaktion von NP mit dem Zellkulturmedium und seinen Zusätzen verhindert. Zusätzlich war es technisch möglich, sowohl die applizierte Dosis und die Größenverteilung der NP im Aerosol mittels SMPS als auch nach Deposition mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu bestimmen. Die Bestimmung dieser Parameter stellt einen großen Vorteil gegenüber der Behandlung unter submersen Bedingungen dar, da es oft nicht möglich ist, die NP in Suspension zu charakterisieren und die deponierte Dosis zu bestimmen. Da SiO<sub>2</sub>-12 nm NP hauptsächlich aus Agglomeraten bestehen, wurde eine weitere Partikelsorte in diesem Zusammenhang untersucht. Dabei handelt es sich, um die SiO<sub>2</sub>-50 nm NP aus der Stöber Synthese, die in Suspension als sphärische Einzelpartikel vorliegen.

#### 3.10.1. Charakterisierung der SiO<sub>2</sub>-NP Aerosole

Die verwendeten Aerosole wurden am IMK von A. Comouth mittels SMPS und die deponierten NP am TEM mittels einer Objekterkennungssoftware analysiert. Die Aerosolerzeugung erfolgte ausgehend von einer Suspension der Konzentration 1 mg/ml für SiO<sub>2</sub>-12 nm NP und 2,27 mg/ml für SiO<sub>2</sub> -50 nm NP in Nanopure Wasser mittels eines Atomizers. Der Volumenstrom durch die Expositionsmodule betrug 100 ml/min. Die Ergebnisse dieser Analysen wurden von A. Comouth freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Aus den SMPS Messungen ergab sich für die Größenverteilung der SiO<sub>2</sub>-12 nm NP eine Lognormalverteilung mit einem Maximum bei 241 nm, einem Mittel von 278 nm und einer geometrischen Standardabweichung von 1,78. Die Größenverteilung der 50 nm SiO<sub>2</sub> Partikel ergab sich aus einer Überlagerung von 3 Moden und enthielt ein Maximum bei 194 nm mit einem Mittel von 230 nm und einer geometrischen Standardabweichung von 1,84 (Comouth, 2012).

Die Größenverteilung und Dosis der deponierten Partikel ergab sich aus TEM Bildern über die Projektionsfläche der deponierten Partikel. In Abb. 23 werden TEM-Aufnahmen der deponierten SiO<sub>2</sub>-12 nm und SiO<sub>2</sub>-50 nm NP dargestellt. Die deponierte Masse für die

SiO<sub>2</sub>-12 nm Partikel wurde ebenfalls aus der Projektionsfläche der deponierten Aggregate nach 5 h berechnet und betrug 79±31 µg/cm<sup>2</sup>, d.h. etwa 15,8 µg/cm<sup>2</sup>/h (Abb. 23 oben). Die Agglomeratoberfläche wurde aus der deponierten Masse berechnet und betrug 157±62 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>. Die Deposition der SiO<sub>2</sub>-50 nm NP erfolgte in Form von sphärischen Agglomeraten, wie in Abb. 23 (unten) dargestellt. Die deponierte Masse wurde sowohl mit der TEM-Analyse sowie mit Hilfe der Fluoreszenzmessung aus einer Konzentrationsreihe bestimmt. Sie betrug nach 7 h 117±46 µg/cm<sup>2</sup>, d.h. etwa 16,7 µg/cm<sup>2</sup>/h. Das entspricht einer Oberflächen Dosis von 17±6 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>. Hierbei kann die Agglomeration im Aerosol nicht ausgeschlossen werden, da es sich ansonsten in Suspension um monodisperse Partikel handelt (Cho et al., 2007b, Al-Rawi et al., 2011).



**Abb. 23 TEM-Analyse der deponierten SiO<sub>2</sub>-12 nm und SiO<sub>2</sub>-50 nm NP während der Exposition mit Zellen**

A549 Zellen wurden mit Aerosolen aus SiO<sub>2</sub>-12 nm oder SiO<sub>2</sub>-50 nm NP exponiert. Parallel dazu wurden die NP auf TEM Netzchen in einem Transwell-Einsatz ohne Zellen deponiert. Die Deposition der NP erfolgte sowohl auf den Zellen als auch auf den TEM-Netzchen mittels einer Elektrode. Für die Ermittlung der biologischen Effekte dauerte die Deposition für das Aerosol aus SiO<sub>2</sub>-12 nm NP 5 h und für das Aerosol aus SiO<sub>2</sub> 50 nm NP 7 h (links dargestellt). Für die Bestimmung der Dosis wurden die NP für einen entsprechend kürzeren Zeitraum auf den TEM Netzchen deponiert. Die Deposition

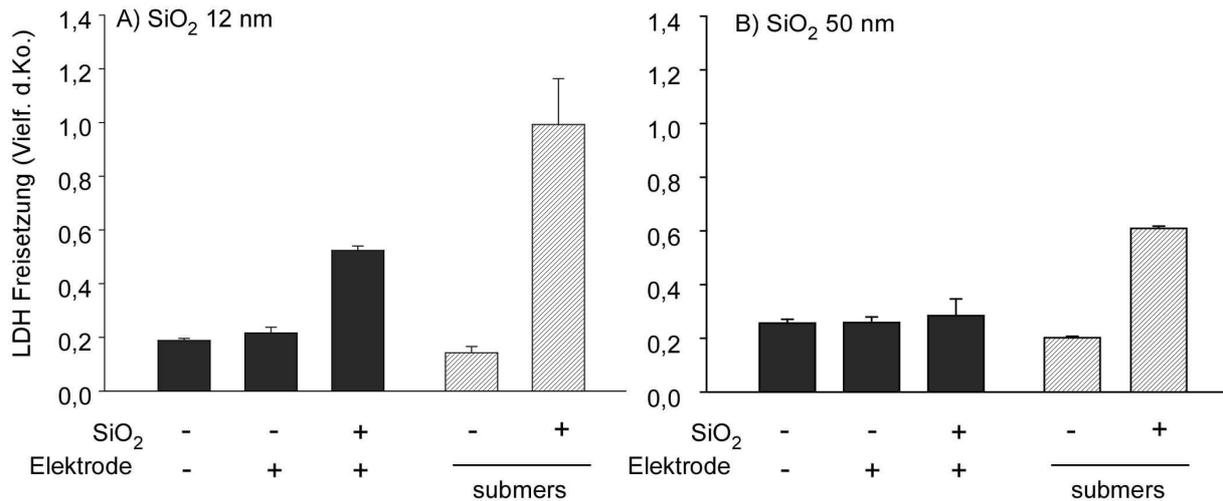
dauerte für das Aerosol aus SiO<sub>2</sub>-12 nm NP 1 h und für das Aerosol mit SiO<sub>2</sub>-50 nm NP 20 min (rechts dargestellt). Typische Aggregate/Agglomerate sind jeweils rechts oben vergrößert dargestellt.

### 3.10.2. Akute Toxizität

In einem direkten Vergleich von ALI-Exposition und Submersbehandlung wurde die akute Toxizität von SiO<sub>2</sub>-12 nm NP und SiO<sub>2</sub>-50 nm NP nach 24 h Exposition mittels des LDH Assays ermittelt. Dazu wurden A549 Zellen für beide Expositionsszenarien in der gleichen Zelldichte ausgesät und die Experimente parallel am gleichen Tag durchgeführt. Die Deposition der NP auf die A549 Zellen erfolgte an der ALI-Depositionsanlage unter Verwendung der elektrostatischen Aufladung der NP mittels Elektroden, die sich unterhalb der Zellen befanden. Die Zellen wurden für 5 h mit einem Aerosol aus SiO<sub>2</sub>-12 nm NP und für 7 h mit einem Aerosol aus SiO<sub>2</sub>-50 nm NP unter kontrollierten Bedingungen behandelt. Als Kontrolle wurde ein gefilterter Luftstrom ohne NP über die Zellen geleitet. Um auszuschließen, dass die elektrostatische Aufladung auf die Zellen eine Wirkung hat, war immer eine Probe dabei, bei der die Elektrode ausgeschaltet und die Zellen nur mit der gefilterten Luft beaufschlagt wurden. Im Anschluss an die Exposition wurden die Zellen mit Medium ohne FCS überschichtet, im Brutschrank nachinkubiert und die LDH Freisetzung ins Medium analysiert. Die Behandlung unter submersen Bedingungen wurde für beide SiO<sub>2</sub>-NP Sorten mit einer Dosis von 15,6 µg/cm<sup>2</sup> (50 µg/ml) in Medium ohne FCS durchgeführt, da bei dieser Dosis bereits toxische Effekte aufgetreten sind.

In Abb. 24 wird demonstriert, dass das elektrische Feld und die Behandlung mit gefilterter Luft keinen Einfluss auf die Zytotoxizität hatten, da die LDH Freisetzung fast genauso niedrig war, wie bei den unbehandelten Zellen unter submersen Bedingungen. Nur die Exposition mit SiO<sub>2</sub>-12 nm NP bewirkte in beiden Expositionssystemen die Freisetzung von LDH, wobei die Zellen im ALI-Expositionssystem weniger sensitiv auf die NP reagierten. Die SiO<sub>2</sub>-50 nm NP reduzierten die Membranintegrität der Zellen weitaus geringer als die SiO<sub>2</sub>-12 nm NP in beiden Expositionssystemen. In der ALI-Exposition zeigten die SiO<sub>2</sub>-50 nm NP sogar keine toxische Wirkung.

Eine mögliche Erklärung für das geringere toxische sowie das pro-inflammatorische Potenzial (s. folgende Ergebnisse) der SiO<sub>2</sub>-50 nm Partikel (spezifische Oberfläche 60 m<sup>2</sup>/g) könnte die 3,3-fach geringere Oberfläche im Vergleich zu den SiO<sub>2</sub>-12 nm NP (spezifische Oberfläche 200 m<sup>2</sup>/g) bei gleicher eingesetzter Masse sein.

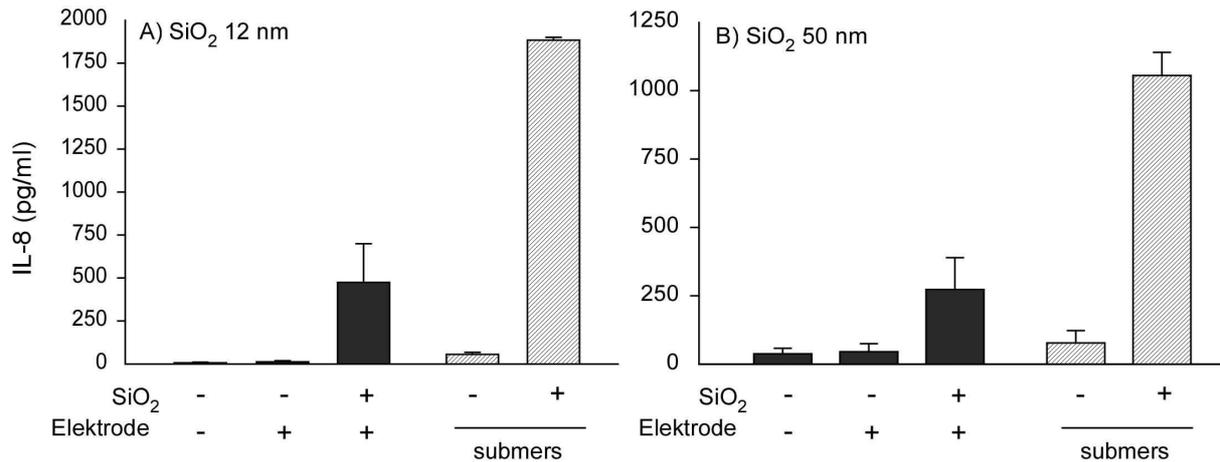


**Abb. 24 Effekt von SiO<sub>2</sub>-12 nm und -50 nm NP auf die Membranintegrität der A549 Zellen unter submersen Bedingungen und an der Luft-/Flüssigkeitsgrenzschicht**

(A) SiO<sub>2</sub>-12 nm und (B) SiO<sub>2</sub>-50 nm NP wurden in der ALI-Depositionsanlage für (A) 5 h und (B) 7 h direkt auf A549 Zellen deponiert. Anschließend wurden die Zellen wieder in FCS-freiem Medium für 24 h nachinkubiert (schwarze Balken). Es wurden Luftkontrollen ohne (-) und mit Elektrode (+) verwendet. Die deponierte Dosis betrug 79 +/- 31 µg/cm<sup>2</sup> (A) und 117 +/- 46 µg/cm<sup>2</sup> (B) für die ALI Exposition. Zum Vergleich wurde eine Dosis von 15,6 µg/cm<sup>2</sup> der NP in Medium ohne FCS auf die Zellen aufgebracht (gestreifte Balken). Die LDH Freisetzung wurde im Überstand mit dem LDH-Assay gemessen. Bei der ALI-Exposition wurden die angegebenen Werte auf die Luftkontrolle ohne Elektrode (-) und bei der submersen Exposition auf die unbehandelte Kontrolle normiert. Für (A) wurden drei und für (B) zwei unabhängige Experimente jeweils mit technischen Duplikaten durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwerte ± SD der jeweiligen Einzelwerte dargestellt.

### 3.10.3. Freisetzung des Entzündungsmediators IL-8

Aus den Experimenten zur akuten Toxizität (Abb. 24) konnten die Überstände auch auf die Freisetzung der Entzündungsmediatoren IL-8 und IL-6 untersucht werden. Die Detektion sowie Quantifizierung von IL-8 und IL-6 erfolgte mittels ELISA. Abb. 25 demonstriert, dass das elektrische Feld und die Behandlung mit gefilterter Luft keinen Einfluss auf die IL-8 Freisetzung hatten. Die IL-8 Freisetzung wurde nur durch die Exposition mit SiO<sub>2</sub>-12 nm NP bzw. SiO<sub>2</sub>-50 nm NP induziert. Jedoch waren die sezernierten IL-8 Mengen nach ALI-Exposition geringer als unter submersen Bedingungen. In beiden Expositionsszenarios bewirkten die SiO<sub>2</sub>-12 nm NP eine höhere IL-8 Sezernierung als die 50 nm NP. Es wurde keine IL-6 Freisetzung nach Exposition unter ALI-Bedingungen für beiden Partikelsorten festgestellt. Nur unter submers Bedingungen fand eine sehr geringe IL-6 Freisetzung statt. Dabei induzierten die SiO<sub>2</sub>-12 nm Partikel eine etwas höhere IL-6 Freisetzung als die SiO<sub>2</sub>-50 nm Partikel (Daten nicht gezeigt).

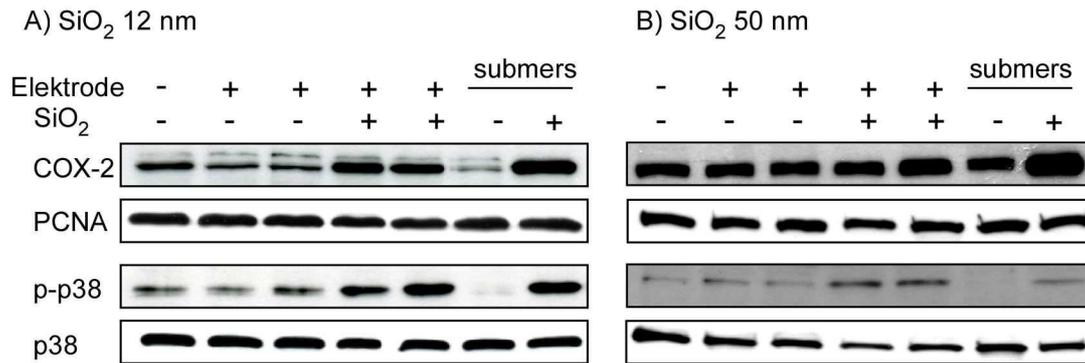


**Abb. 25 Induktion der Freisetzung von IL-8 durch SiO<sub>2</sub>-12 und -50 nm NP unter submersen Bedingungen und an der Luft-/Flüssigkeitsgrenzschicht**

(A) SiO<sub>2</sub>-12 nm und (B) SiO<sub>2</sub>-50 nm NP wurden in der ALI-Depositionsanlage für (A) 5 h und (B) 7h direkt auf A549 Zellen deponiert. Anschließend wurden die Zellen wieder in FCS-freiem Medium für 24 h nachinkubiert (schwarze Balken). Es wurden Luftkontrollen ohne (-) und mit Elektrode (+) verwendet. Die deponierte Dosis betrug 79+/-31 µg/cm<sup>2</sup> (A) und 117+/-46µg/cm<sup>2</sup> (B) für die ALI Exposition. Zum Vergleich wurde eine Dosis von 15,6 µg/cm<sup>2</sup> der NP in Medium ohne FCS auf die Zellen aufgebracht (gestreifte Balken). Die IL-8 Freisetzung wurde im Überstand mittels ELISA detektiert und quantifiziert. Für (A) wurden drei und für (B) zwei unabhängige Experimente jeweils mit technischen Duplikaten durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwerte ± SD der jeweiligen Einzelwerte dargestellt.

### 3.10.4. Induktion der COX-2 und p38 Phosphorylierung

Die bisherige Analyse der NP-Wirkung an der Luft-Flüssigkeitsgrenzschicht zeigte, dass die NP zwar qualitativ die gleichen Effekte auslösten wie unter submersen Bedingungen jedoch in einem viel geringeren Ausmaß. Um die Effekte zu früheren Zeitpunkten zu analysieren, wurden Experimente direkt nach Partikeldeposition durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen ohne Nachinkubation sofort im Anschluss an die Deposition in der ALI-Anlage mit 2x Lysepuffer lysiert und im Western Blot analysiert. Als frühe biologische Endpunkte hatten sich unter submersen Bedingungen die Induktion der COX-2 sowie die p38 Phosphorylierung herausgestellt. Bei der Untersuchung dieser Parameter konnte gezeigt werden, dass die SiO<sub>2</sub>-12 nm NP sowohl unter submersen als auch bei ALI-Bedingungen zu einer COX-2 Induktion und p38 Aktivierung führten (Abb. 26 A). Die SiO<sub>2</sub>-50 nm NP induzierten eindeutig die p38 Phosphorylierung, kaum jedoch die COX-2. Beide Endpunkte waren jedoch insgesamt schwächer induziert als nach Exposition mit SiO<sub>2</sub>-12 nm NP (Abb. 26 B).



**Abb. 26 Induktion der COX-2 und p38 Phosphorylierung nach SiO<sub>2</sub>-NP Behandlung unter submersen Bedingungen und an der Luft-/Flüssigkeitsgrenzschicht**

(A) SiO<sub>2</sub>-12 nm NP und (B) SiO<sub>2</sub>-50 nm NP wurden in der ALI-Depositionsanlage für (A) 5 h und (B) 7h direkt auf A549 Zellen deponiert und anschließend wurden die Zellen sofort lysiert. Es wurde eine Luftkontrolle ohne (-) und mit Elektrode (+) verwendet. Zum Vergleich wurde eine vergleichbare Dosis (15,6 µg/cm<sup>2</sup>) der NP in Suspension (Medium ohne FCS) auf die Zellen aufgebracht (submers). Die COX-2 Expression und die p38 Phosphorylierung wurden im Western Blot mit spezifischen Antikörpern detektiert, wobei A549 Zellen für 5 h mit den 12nm (A) NP und für 7 h mit den 50 nm NP (B) inkubiert wurden. Die Gesamtproteinmenge wurde durch den Nachweis von PCNA und die nicht phosphorylierte Form von p38 bestimmt. In (A) sind repräsentative Western Blots aus drei und in (B) aus zwei unabhängigen Experimenten dargestellt.



## 4. Diskussion

Technisch erzeugte Nanoobjekte besitzen neuartige Eigenschaften, die für die Verbesserung und Optimierung von Produkten in vielen Bereichen, wie der Automobilindustrie, Pharmazie, Medizin, Umwelttechnik, Kosmetik- und Lebensmittelindustrie, eingesetzt werden können. Schätzungen der US National Science Foundation zu Folge wird der Umsatz der Nanotechnologie weltweit bis zu einer Milliarde Dollar im Jahr 2015 betragen (Roco, 2011). Der Fortschritt in der Nanotechnologie und ihr zunehmender Einsatz machen eine Risikoabschätzung der Exposition für Mensch und Umwelt mit diesen neuartigen Materialien unumgänglich. Bislang wurden zwar einige Forschungsprojekte in der EU und in Deutschland (z.B. NanoCare, NanoSafe) zu diesem Thema durchgeführt, jedoch kann aufgrund der heutigen Datenlage immer noch keine endgültige Risikoabschätzung erfolgen.

Aus epidemiologischen Studien ist schon länger bekannt, dass es einen Zusammenhang zwischen der Belastung der Luft durch inhalierbare Partikel, deren Durchmesser kleiner als  $10\ \mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{10}$ ) ist, und einem Anstieg von Lungen-, Herz-Kreislaferkrankungen und sogar der Mortalität gibt (Pope et al., 2004, Pope and Dockery, 2006). Technisch erzeugte Nanoobjekte befinden sich ebenfalls in einer Größenordnung ( $<100\ \text{nm}$ ), die in den Körper durch Inhalation eindringen können, wobei sie das Potenzial besitzen, direkt mit zellulären und sogar molekularen Systemen zu interagieren und diese zu schädigen. Im Nanometerbereich nimmt die Oberfläche der Partikel im Verhältnis zum Volumen sehr stark zu und die Interaktion der Oberflächenatome mit der Umgebung ebenfalls. Dadurch ergeben sich neuartige physikalisch-chemische Eigenschaften, die insbesondere wegen der Größe unter Verdacht stehen, eine Gefährdung für die Gesundheit darzustellen und noch unbekannte Effekte auf die Umwelt zu haben. Derzeit sind keine speziellen Berufserkrankungen bedingt durch die Exposition mit Nanoobjekten im Rahmen der industriellen Herstellung und Verarbeitung von Nanoobjekten bekannt. Jedoch gibt es Hinweise aus Laboruntersuchungen, dass Nanoobjekte, dazu zählen Nanopartikel und Nanoröhren, das Potenzial haben, toxische Effekte auszulösen. Kohlenstoffnanoröhren können ähnliche strukturelle Eigenschaften wie Asbestfasern aufweisen, die zu einer erhöhten Biopersistenz im Gewebe und möglicherweise zu einer krebserzeugenden Wirkung in der Lunge führen (Poland et al., 2008, Shvedova et al., 2008). Weiterhin haben Studien gezeigt, dass nanoskalige  $\text{TiO}_2$  Partikel im Vergleich zu  $\text{TiO}_2$  Partikeln größer als  $150\ \text{nm}$  nach Inhalation verstärkt Entzündungsreaktion in der Lunge auslösen (Renwick et al., 2004, Chen et al., 2006). Derzeit sind die Wirkmechanismen immer noch nicht vollständig geklärt.

Für die Aufklärung dieser Mechanismen wurden Modellpartikel aus Verbrennungsprozessen, zu denen Dieselrußpartikel sowie auch Flugasche gehören, verwendet. Dieselrußpartikel bestehen aus einem Gemisch aus Kohlenstoffpartikeln, an denen viele potenziell toxische organische Verbindungen und Übergangsmetalle haften, während die Flugasche fast ausschließlich aus anorganischen Oxiden und Salzen besteht (Lighty et al., 2000). Zahlreiche Untersuchungen zeigten, dass Dieselrußpartikel und Flugaschepartikel oxidativen Stress auf Zellebene verursachen, was auf der Bildung von ROS beruhte (Xiao et al., 2003, Fritsch-Decker et al., 2011). Einerseits werden ROS während der Metabolisierung der organischen Substanzen andererseits durch die Kohlenstoffpartikel oder Metalle selbst generiert (Bonvallot et al., 2001, Stoeger et al., 2006). Die Bildung von ROS korrelierte mit der Induktion der anti-oxidativen Antwort, wobei der Nrf-2 Signalweg angeschaltet wurde und zur Hochregulierung von HO-1 führte. Desweiteren wurde in RAW264.7 Makrophagen gezeigt, dass die Inhibierung der ROS Bildung nach Partikelexposition durch den Radikalfänger N-Acetylcystein zur Hemmung der HO-1 Synthese führte (Xiao et al., 2003, Fritsch-Decker et al., 2011). Ein weiterer wichtiger Faktor der pathophysiologischen Wirkmechanismen ist die Entstehung von Entzündungsreaktionen nach Inhalation von Partikeln. Bereits in epidemiologischen Studien wurde vermutet, dass es eine Beteiligung von Entzündungsreaktionen durch Feinstaubexposition gibt. Dies konnte im Zellkultursystem aber auch *in vivo* nach Exposition mit den Modellpartikeln aus Verbrennungsprozessen belegt werden.

Bei der Inhalation von Nanopartikeln sind die ersten zellulären Systeme, die mit den Partikeln in Kontakt kommen, die Lungenepithelzellen und Alveolarmakrophagen. Deshalb wurde die Untersuchung der biologischen Wirkung der hier verwendeten Metalloxidnanopartikel in den Lungenepithelzellen A549 und den RAW264.7 Makrophagen durchgeführt. Da zahlreiche Studien gezeigt hatten, dass die Toxizität von Partikeln mit der Ausbildung von oxidativem Stress und Entzündungsreaktionen einhergehen, wurden für die Untersuchungen folgende biologische Endpunkte ausgewählt: Akute Toxizität, Bildung von ROS, anti-oxidative und pro-inflammatorische Antwort und intrazelluläre Aufnahme. Anhand dieser Parameter sollte das toxische Potenzial der Metalloxidnanopartikel ermittelt und Schlussfolgerungen bezüglich der verursachenden Partikeleigenschaften gezogen werden. Hierbei sollte auch untersucht werden, inwieweit es möglich ist, die Bildung von ROS als Indikator für die Vorhersage für das toxische Potenzial zu verwenden. Zusätzlich sollte bei der Untersuchung berücksichtigt werden, welchen Einfluss unterschiedliche Expositionssysteme auf die Ermittlung der biologischen Wirkmechanismen haben. Denn bereits aus anderen Studien war bekannt, dass z.B. Proteine aus dem Serum an die Partikel adsorbieren, eine Proteinkorona ausbilden und die Partikelwirkung beeinflussen können (Clift et al., 2010, Kittler, 2010). Die Vermutung lag nahe, dass auch die Oberfläche der in dieser

Arbeit verwendeten Partikel durch die Proteinkorona verändert und möglicherweise die biologische Wirkung beeinflusst wird. Dabei stellte sich die Frage, ob die Nanopartikeloberfläche nur durch die Adsorption maskiert, und so z.B. die Bildung von ROS verhindert wird oder ob bestimmte Interaktionen mit Proteinen, Rezeptoren, Membranen und zellulären Signalwegen die biologische Wirkung beeinflussen. Deshalb wurde die Wirkung der Metalloxide in der vorliegenden Arbeit in zwei verschiedenen Testmedien untersucht. Zum einen sollte die Behandlung nach Standardprozedur in FCS-haltigem und zum anderen in FCS-freiem Medium durchgeführt werden, was nicht mehr der Situation in der Lunge entspricht. Desweiteren sollte ein neues Applikationsverfahren verwendet werden, bei dem die Lungenzellen an der Luft-/Flüssigkeitsschicht mit Partikeln aus einem Aerosol exponiert werden. Diese Methode simuliert ein realistisches Expositionsszenario, das der Situation in der Lunge nachempfunden ist und bei dem die Partikel unabhängig von Testmedien und deren Bestandteilen (Serumproteine, Aminosäuren, Salze, Kohlenhydrate) direkt auf die Zellen aufgebracht werden. Zusätzlich sollte diese Methode es ermöglichen, die deponierte Dosis genauer zu bestimmen, was unter Suspensionsbedingungen technisch schwieriger ist.

#### **4.1. Charakterisierung von Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-, TiO<sub>2</sub>- und SiO<sub>2</sub>-NP**

Die Partikel der Metalloxide Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> und TiO<sub>2</sub> sowie des Halbmetalloxids SiO<sub>2</sub> wurden in dieser Studie mittels Flammensynthese und im Mikrowellenplasma hergestellt. Die Flammensynthese wird auch in der Industrie verwendet, um Partikel in großem Maßstab zu produzieren, während die Partikel-Herstellung im Mikrowellenplasma bisher nur zu Forschungszwecken eingesetzt wird. Bei diesen Herstellungsmethoden werden die Nanopartikel in Pulverform erzeugt, wobei es schon während der Herstellung zu Aggregat- und Agglomerat-Bildung kommt. Aggregate entstehen durch Versintern und Verschmelzen von Primärpartikeln, so dass es im Nachhinein nicht mehr möglich ist, diese starken Bindungen wieder aufzubrechen. Dagegen bestehen Agglomerate aus zusammengelagerten Einzelpartikeln und Aggregaten, die mittels schwacher Van-der-Waals Kräfte zusammengehalten werden und durch mechanische Verfahren wie Ultraschall oder Zermahlen zu Einzelpartikeln bzw. Aggregaten zerkleinert werden können. Deshalb kann man in dieser Studie davon ausgehen, dass die verwendeten Partikel aus einem Gemisch aus Primärpartikeln, Aggregaten und Agglomeraten bestanden, weshalb die Primärpartikelgröße nicht die tatsächlich vorliegende Partikelgrößenverteilung widerspiegelte. Somit war diese auch nicht aussagekräftig genug für die Beurteilung der toxischen Effekte. Deshalb wurden neben der Bestimmung der nominellen Primärpartikelgröße weitere Eigenschaften wie die Größe der Oberfläche und die Kristallinität analysiert (s. Material und Methoden).

Für die Untersuchung von NP im zellulären System wurde zusätzlich das Agglomerationsverhalten der NP in verschiedenen Zellkulturmedien nach Ultraschallbehandlung charakterisiert. Hierbei wurden die NP in Medium mit und ohne FCS sowie in Wasser suspendiert und das Agglomerationsverhalten innerhalb einer Stunde beobachtet. Dabei wurde festgestellt, dass das Agglomerationsverhalten durch das Vorhandensein von Proteinen im Zellkulturmedium beeinflusst wurde, und zwar unterschiedlich je nach Material. Dies ist darauf zurückzuführen, dass NP Proteine an ihre Oberfläche adsorbieren und die Oberfläche somit modifizieren. Das Agglomerationsverhalten von  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ - und  $\text{TiO}_2$ -NP unterschied sich im Vergleich zum Verhalten von  $\text{SiO}_2$ -NP. Für  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ - und  $\text{TiO}_2$ -NP hatte das im Medium vorhandenen FCS eine deagglomerierende und stabilisierende Wirkung. Dagegen nahm im Fall von  $\text{SiO}_2$ -NP die Agglomeratgröße in Medium mit FCS zu. Ähnliche Beobachtungen wurden für  $\text{TiO}_2$ - und  $\text{SiO}_2$ -NP in verschiedenen Studien beobachtet (Schulze et al., 2008, Drescher et al., 2011, Orts-Gil et al., 2011). Im FCS sind verschiedene Proteine, wie Albumin, Apolipoprotein, Immunglobuline und Bestandteile des Komplementsystems enthalten. Es wurde bereits gezeigt, dass die Bindungsaffinität der Proteine an die NP von den Oberflächeneigenschaften wie Ladung, Größe, Form, Aggregationsgrad und Hydrophobizität des Materials abhängen (Cedervall et al., 2007, Lynch et al., 2007, Patil et al., 2007, Lundqvist et al., 2008, Deng et al., 2011). Möglicherweise hat die Zusammensetzung der gebundenen Proteine einen Einfluss auf das Agglomerationsverhalten der NP im Medium. Hierbei wurde der Einfluss von BSA auf die Agglomeration untersucht, wobei die negative Oberflächenladung der  $\text{SiO}_2$ -NP in wässriger Lösung durch die Bindung von BSA neutralisiert und somit die elektrostatische Abstoßung vermindert wurde (Schulze et al., 2008, Orts-Gil et al., 2011). Die Deagglomeration von  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ - und  $\text{TiO}_2$ -NP durch BSA dagegen wird vermutlich durch sterische Stabilisierung vermittelt (Schulze et al., 2008). Aufgrund der adsorbierten Makromoleküle (Proteine) stoßen sich die Partikel gegenseitig ab. Denn die Annäherung der adsorbierten Makromoleküle zweier Partikel führt zur Behinderung der Beweglichkeit, was energetisch ungünstig ist und somit zur Abstoßung führt.

#### **4.2. Welche Rolle spielen ROS bei der Induktion von toxischen Effekten durch Nanopartikel?**

Um das toxische Potenzial der hier untersuchten Metalloxidnanopartikel zu bestimmen, wurden verschiedene biologische Endpunkte untersucht. Hierbei sollte überprüft werden, ob es einen Zusammenhang zwischen der intrazellulären Bildung von ROS und der Induktion akuter Toxizität, der anti-oxidativen und pro-inflammatorischen Antwort nach Partikelexposition gab. Diese Mechanismen werden durch Stress hochreguliert, um die Zelle bzw.

den Organismus zu schützen. Bei Überforderung dieser Mechanismen führt dies zum Absterben der Zellen (Nel et al., 2009). Zusätzlich wurde der Einfluss der Proteinkorona auf die biologische Wirkung von Nanopartikeln untersucht.

#### 4.2.1. TiO<sub>2</sub>-NP lösen keine akute Toxizität trotz Bildung von ROS aus

TiO<sub>2</sub>-NP sind die am häufigsten untersuchten NP und stehen unter Verdacht durch ihre stark reaktive Oberfläche und Bildung von ROS eine zytotoxische, pro-inflammatorische und genotoxische Wirkung zu haben. In mehreren Studien wurde berichtet, dass Anatase die photokatalytisch aktivere Kristallform ist und die Fähigkeit besitzt, ROS zu bilden, die mit der biologischen Wirkung korreliert (Sayes et al., 2006, Wahrheit et al., 2007). In dieser Studie wurden TiO<sub>2</sub>-NP verwendet, die ebenfalls aus Anatase als auch aus einem Anatase / Rutil Gemisch bestanden. Die Bildung von ROS wurde für alle verwendeten TiO<sub>2</sub>-NP im DCF Assay festgestellt, war jedoch unabhängig vom Serum (Abb. 12). Trotz der Bildung von ROS konnte keine akute Toxizität (Abb. 9) und keine Induktion der anti-oxidativen Antwort (Abb. 13) sowohl in A549 Zellen als auch in RAW264.7 Makrophagen beobachtet werden. Die Untersuchung von verschiedenen Entzündungsmediatoren auf mRNA- und Proteinebene ergab ebenfalls nur eine geringe Erhöhung der TNF- $\alpha$  Genexpression in den A549 Zellen und eine geringe Induktion der iNOS Genexpression in RAW264.7 Makrophagen in Abwesenheit von FCS (Abb. 15). Die Wirkung der hier verwendeten TiO<sub>2</sub>-NP fiel eher gering aus und war unabhängig von der ROS Bildung jedoch abhängig von Serum. Dies steht im Gegensatz zu den folgenden Studien. Sayes et al hatte in A549 Zellen festgestellt, dass die Zytotoxizität und Freisetzung des Entzündungsmediators IL-8 am stärksten durch die Anatase Form von TiO<sub>2</sub>-NP induziert wurde, und dass dies mit der Fähigkeit, ROS zu generieren, korrelierte (Sayes et al., 2006). Jedoch wurden diese Effekte erst ab einer hohen Konzentration von 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ausgelöst. Die Bildung von ROS wurde hierbei im zellfreiem System im Dunkeln mittels der Oxidation von Luminol und Congo Red gemessen. Eine andere Studie zeigte, dass die P25 TiO<sub>2</sub>-NP von Evonik in RAW264.7 Makrophagen die Freisetzung der Entzündungsmediatoren TNF- $\alpha$  und MIP-2 (*macrophage inflammatory protein-2*) in Korrelation mit ROS Bildung induzierten, jedoch ohne Zytotoxizität auszulösen (Kang et al., 2008). Desweiteren wurde in einer anderen Studie festgestellt, dass dieselben Partikel bereits bei einer Partikeloberflächendosis von 1-10  $\text{cm}^2/\text{cm}^2$  Zelloberfläche ebenfalls eine leichte IL-8 mRNA Expression und IL-8 Freisetzung in A549 Zellen unter serum-freien Bedingungen induzieren können (Monteiller et al., 2007). Im Vergleich dazu konnte in der vorliegenden Studie selbst mit einer höheren Oberflächendosis (200-440  $\text{cm}^2/\text{cm}^2$ ) nur eine schwache pro-inflammatorische Antwort induziert werden. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnten Unterschiede in der Aufnahme oder der ROS-Bildung sein. Die

Abhängigkeit vom Agglomerationsstatus sowie der Einfluss von Serumproteinen auf die biologischen Effekte wurden bisher nicht systematisch untersucht. In dieser Studie wurden zwar Unterschiede im Agglomerationsverhalten in An- und Abwesenheit von FCS im Medium beobachtet. Diese hatten jedoch weder einen Einfluss auf die biologische Wirkung noch die Generierung von ROS. Tendenziell zeigten viele Untersuchungen, dass TiO<sub>2</sub>-NP im Vergleich zu kristallinem SiO<sub>2</sub>, Kupferoxidnanopartikeln oder Silbernanopartikeln nur ein moderates zytotoxisches und pro-inflammatorisches Potenzial haben. Außerdem produzierten sie unter normalen Lichtbedingungen (sichtbares Licht) oder im Dunkeln relativ wenig ROS (Limbach et al., 2007, Monteiller et al., 2007, Karlsson et al., 2008, Berntsen et al., 2010, Rushton et al., 2010). Erst nach Aktivierung der Partikel mit UV-A Strahlen können starke ROS-abhängige zytotoxische und genotoxische Effekte durch TiO<sub>2</sub> induziert werden (Cai et al., 1992b, Nakagawa et al., 1997). Demnach wäre die photokatalytische Aktivität der Partikel ein wichtiger Faktor, der für die negativen Eigenschaften von TiO<sub>2</sub>-NP zumindest im Zellkulturmodell verantwortlich ist. Eine Studie fällt jedoch aus dem Rahmen. Dort wurde beobachtet, dass TiO<sub>2</sub>-NP dispergiert in DMSO bereits bei einer Konzentration von 5 µg/ml eine starke Abnahme der Viabilität von A549 Zellen verursacht hatten. Jedoch könnte das DMSO einen Einfluss auf die Aufnahme und somit eventuell auf die biologische Wirkung gehabt haben (Soto et al., 2007). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Bildung von ROS durch TiO<sub>2</sub>-NP von verschiedenen Faktoren abhängt, und erst wenn ein bestimmtes ROS Level überschritten ist, die toxische und pro-inflammatorische Wirkung von TiO<sub>2</sub> einsetzt. Hierbei spielt die Handhabung der Partikel, die vom Experimentator abhängig ist, eine entscheidende Rolle, was zu den unterschiedlichen Ergebnissen geführt haben könnte. Anders als die Studien in Monokulturzellsystemen müssen die Ergebnisse aus *in vivo* Studien beurteilt werden, da die Interaktion von alveolären Makrophagen und Lungenepithelzellen möglicherweise ein empfindlicheres System für die Untersuchung von moderaten Entzündungsreaktionen darstellen. So konnten unter anderem Wahrheit und Kollegen zeigen, dass nach Instillation von Rutil TiO<sub>2</sub>-NP und Anatase TiO<sub>2</sub>-NP in die Lungen von Ratten nur die aus Anatase bestehenden TiO<sub>2</sub>-NP eine temporäre Infiltration von Neutrophilen in die Lunge induzierten (Warheit et al., 2007). Andere Studien zeigten stärkere inflammatorische und sogar geno-toxische Effekte von TiO<sub>2</sub> NP, was aber auch an den sehr hohen verwendeten Dosen liegen könnte (Ferin et al., 1992, Bermudez et al., 2002). Des Weiteren wurde durch die Instillation in Ratten demonstriert, dass bei gleicher Masse aufgrund der höheren Oberflächendosis nanoskalige TiO<sub>2</sub>-NP (20 nm) im Gegensatz zu größeren Partikeln (250 nm) eine Entzündungsreaktion hervorriefen, die sich durch die verstärkte Infiltration von Neutrophilen in die Lunge kennzeichnete (Oberdorster, 2001). Eine Studie von Donaldson konnte jedoch die Vergleichbarkeit von Monokultursystemen und *in vivo* Exposition zeigen. Hierbei wurde festgestellt, dass die Inhalation von TiO<sub>2</sub>-NP *in vivo* in

Ratten ab einer Oberflächendosis von 1 cm/cm<sup>2</sup> Zelloberfläche bereits eine Infiltration von Neutrophilen ins Lungengewebe hervorrief. Mit einer vergleichbaren Oberflächendosis konnte ebenfalls *in vitro* in A549 Zellen eine moderate IL-8 Hochregulation beobachtet werden (Donaldson et al., 2008). Dennoch müssen weitere Parameter wie die Effizienz der Aufnahme neben der Oberflächendosis zusätzlich beachtet werden, die möglicherweise in *in vitro* Zellsystemen eine Rolle spielen, muss dennoch weiter untersucht werden, um mögliche Unterschiede zu verschiedenen Studien zu verstehen.

#### 4.2.2. Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NP lösen keine akute Toxizität aus.

Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NP werden bereits in der Tumorthherapie und als Kontrastmittel verwendet. Nachdem sie in den Tumor injiziert werden, verbleiben sie über eine längere Zeit im Körper und werden v.a. von Makrophagen phagozytiert (Lunov et al., 2011). In dieser Studie konnte für Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NP keine Bildung von ROS (Abb. 12), keine zytotoxische (Abb. 9) oder anti-oxidative Wirkung (Abb. 13) sowohl in Gegenwart als auch bei Abwesenheit von Serum festgestellt werden. Nur eine geringe Hochregulierung der TNF- $\alpha$  Genexpression in A549 Zellen und der iNOS in RAW264.7 Makrophagen wurde in serumfreiem Medium beobachtet (Abb. 15). Im Gegensatz dazu konnten Brunner und Kollegen eine Abnahme der Viabilität nach drei Tagen Exposition mit Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NP in Abhängigkeit von der Zelllinie feststellen (Brunner et al., 2006). Hierbei wurde vermutet, dass eine leichte Löslichkeit der Partikel bei niedrigem pH-Wert im Phagolysosom nach Akkumulation der Partikel in den Zellen die Toxizität verursachen. Generell können Fe<sup>2+</sup>-Ionen durch die Fenton-Reaktion oxidativen Stress auslösen. Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NP scheinen ähnlich wie in der Studie von Limbach eher ein sehr geringes oxidatives Potenzial zu haben, möglicherweise auf Grund der Tatsache, dass die Partikel schlechter löslich sind als andere Partikel wie z.B. Kobaltoxid oder Manganoxid (Limbach et al., 2007). Der Zusammenhang zwischen freigesetzten Fe-Ionen und oxidativem Stress konnte in einer Studie mit RAW264.7 Makrophagen gezeigt werden. Hierbei wurde die Lipidperoxidation nach Exposition mit einem Kontrastmittel aus Citrat-beschichteten Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NP durch einen Eisen-chelator reduziert (Stroh et al., 2004). Ein weiterer Faktor, der die Toxizität beeinflusst, ist die Expositionsdauer. In einigen Studien wurden zytotoxischen Effekte, die mit der Bildung von ROS einhergingen, erst nach drei Tagen beobachtet, wobei dies auch mit der langsamen Freisetzung von Fe-Ionen in den Zellen zusammenhängen könnte (Brunner et al., 2006, Lunov et al., 2010). Da in dieser Studie untersucht werden sollte, welchen Einfluss FCS bzw. die Abwesenheit von FCS im Medium auf die Zytotoxizität hat, konnten nur Kurzzeitexpositionen durchgeführt werden. Dies erklärt vermutlich, warum die hier untersuchten NP keine Toxizität aufwiesen. Um dies zu klären, müssten Versuche mit einer längeren Expositionsdauer und verschiedenen Serumkonzentrationen durchgeführt werden.

### 4.2.3. Die Zytotoxizität von SiO<sub>2</sub>-NP ist serumabhängig und korreliert nicht mit der Bildung von ROS.

Amorphes SiO<sub>2</sub> gilt im Vergleich zum kristallinen SiO<sub>2</sub> (Quarz) als relativ untoxisch. Deshalb wird es schon lange in Nahrungsmitteln, Kosmetika und in vielen anderen Produkten verwendet (Napierska et al., 2010). Zudem soll es als Transportvehikel für Medikamente in der Medizin eingesetzt werden. Erstaunlicherweise bewirkten in dieser Arbeit die amorphen SiO<sub>2</sub>-NP die stärkste Abnahme der Viabilität in den beiden Zelllinien A549 und RAW264.7 unter den hier untersuchten Bedingungen. Es stellte sich heraus, dass SiO<sub>2</sub>-NP selektiv in serumfreiem Medium einen starken zytotoxischen Effekt auslösten, der durch die Abnahme der metabolischen Aktivität sowie durch einen Verlust der Membranintegrität charakterisiert war (Abb. 9). Die Toxizität von SiO<sub>2</sub>-NP wurde bereits in zahlreichen Publikationen gezeigt, die Stärke der Toxizität war je nach Zelllinie unterschiedlich und stieg mit abnehmendem Durchmesser der Partikel an (Wottrich et al., 2004, Dutta et al., 2007, Gerloff et al., 2009, Napierska et al., 2009, Yu et al., 2009, Nabeshi et al., 2010, Sohaebuddin et al., 2010, Kasper et al., 2011). Der zugrunde liegende Mechanismus ist jedoch noch nicht geklärt. Um diesem Problem nachzugehen, wurde zunächst untersucht, ob oxidativer Stress durch SiO<sub>2</sub>-NP in Abhängigkeit vom Serum ausgelöst werden kann. Eine Beteiligung von ROS an der SiO<sub>2</sub>-NP induzierten Toxizität wurde in anderen Studien postuliert. So konnten Park und Park in RAW264.7 Makrophagen die intrazelluläre ROS Bildung mit Hilfe des DCF-Tests und der Abnahme der Glutathionmenge nach SiO<sub>2</sub> Exposition messen, wobei dies *in vivo* mit der Induktion der pro-inflammatorischen Antwort korrelierte (Park and Park, 2009). Ferner zeigten Studien in A549 Zellen eine moderate ROS Bildung im DCF Test und Lipidperoxidation nach SiO<sub>2</sub> Exposition (Lin et al., 2006, Akhtar et al., 2010). Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse aus dieser Arbeit und anderen Studien. Die Untersuchung ergab zum einen, dass SiO<sub>2</sub>-NP weder in Medium mit noch ohne Serum die Bildung von intrazellulären ROS induzierten (Abb. 12). Zum anderen wurden die Gene der anti-oxidativen Antwort (HO-1 und GCLC) nur in den Makrophagen, jedoch nicht in den Lungenepithelzellen, sehr schwach in serumfreiem Medium hochreguliert und die Synthese von HO-1 erfolgte erst spät nach 24 h Exposition. Passend zu diesem Ergebnis zeigte eine andere Studie in Keratinozyten, dass SiO<sub>2</sub>-NP keine ROS Bildung induzierten, aber dennoch eine leichte anti-oxidative Antwort in Form von GSH Depletion zu beobachten war (Yu et al., 2009). Weiterhin demonstrierte eine Untersuchung von C.Marquardt, dass durch den Einsatz des Radikalfängers N-Acetylcystein die zytotoxischen Effekte der SiO<sub>2</sub>-12 nm NP (Aerosil®200) in RAW264.7 Makrophagen in Abwesenheit von Serum nicht gehemmt werden konnten (Marquardt, 2011). Deshalb ist fraglich, inwieweit die ROS Generierung alleine für die zytotoxischen Effekte von amorphen SiO<sub>2</sub>-NP verantwortlich ist.

#### **4.2.4. SiO<sub>2</sub>-NP induzierte Wechselwirkungen mit inflammatorischen Signalwegen ist serumabhängig.**

Obwohl die SiO<sub>2</sub>-NP nur eine geringe anti-oxidative Antwort bewirkten, induzierten sie in beiden Zelllinien eine sehr starke Erhöhung der pro-inflammatorischen Antwort, die ebenfalls wie die Zytotoxizität nur unter serumfreien Bedingungen zu beobachten war. In A549 Zellen waren die mRNAs der Zytokine IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  und der COX-2 hochreguliert. Dies wurde auch auf Proteinebene für IL-6, IL-8 und COX-2 verifiziert, jedoch nicht für TNF- $\alpha$ . In RAW264.7 Makrophagen waren die mRNAs der Zytokine IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und ebenfalls die COX-2 hochreguliert. Es konnte jedoch nur eine Freisetzung von TNF- $\alpha$  festgestellt werden. Weiterhin war keine Induktion der iNOS in RAW264.7 Makrophagen nach SiO<sub>2</sub>-NP Exposition zu beobachten. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in anderen Studien gemacht. So demonstrierten *in vivo* Studien in Ratten, dass nach Instillation oder Inhalation von amorphen SiO<sub>2</sub>-NP eine kurzfristige Erhöhung der Entzündungsreaktion in der Lunge stattfindet (Johnston et al., 2000, Arts et al., 2007). Cho und Kollegen zeigten die Induktion von MIP-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  auf mRNA und Proteinebene nach SiO<sub>2</sub> Partikel Exposition (Cho et al., 2007a). Park und Park konnten ebenfalls nach Injektion von SiO<sub>2</sub>-NP in Mäusen erhöhte mRNA Mengen von TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL-6, COX-2 in den peritonealen Makrophagen und erhöhte Zytokin-Level (TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ ) im Blut messen (Park and Park, 2009). In einer humanen Lungenepithelzelllinie (H441) wurde die Freisetzung von IL-8 und IL-6 in Abwesenheit von Serum bei der Exposition mit SiO<sub>2</sub>-NP festgestellt (Kasper et al., 2011). Auf welche Weise die Entzündungsreaktion vermittelt wird, ist bislang nicht geklärt. Aufschluss darüber könnten Studien zur Regulation der IL-1 $\beta$  Freisetzung geben. Hierbei handelt es sich um einen mehrstufigen Prozessierungsvorgang, der auf mRNA- und posttranslationaler Ebene durch verschiedene Stimuli in Gang gesetzt werden muss. So konnte z.B. in dieser Studie gezeigt werden, dass SiO<sub>2</sub>-NP die mRNA von IL-1 $\beta$  hochregulierten, es kam jedoch nicht zur Freisetzung des Zytokins. Denn für die Freisetzung von IL-1 $\beta$  muss die Aktivierung des sogenannten NALP3 Inflammasoms über verschiedene Stimuli erfolgen, wodurch das inaktive Vorläuferprotein, pro-IL1 $\beta$  erst prozessiert und dann freigesetzt wird. Eine Vorstimulation durch LPS ist wahrscheinlich notwendig, um die Transkription und die Aktivierung des Inflammasoms zu induzieren, was in dieser Studie nicht durchgeführt wurde. Möglicherweise kann dadurch das Fehlen der IL-1 $\beta$  Sekretion erklärt werden. Yazdi und Kollegen demonstrierten, dass TiO<sub>2</sub>-und SiO<sub>2</sub>-NP die Aktivierung des Inflammasoms in Makrophagen *in vivo* auslösen konnten (Yazdi et al., 2010), wobei vermutlich *in vivo* bereits eine latente Stimulation durch Keime vorherrschte und somit die Freisetzung von IL-1 $\beta$  detektiert werden konnte. Für die Aktivierung des Inflammasomkomplexes wurden die lysosomale Ruptur nach Partikelaufnahme und die

Freisetzung von Cathepsin B nach Partikel-induzierter Bildung von ROS postuliert (Morishige et al., 2010).

#### **4.2.5. Die Aktivierung der Mitogen- und Stress-aktivierten Proteinkinasen ist serumabhängig.**

In den vorhergehenden Experimenten wurde die Erhöhung der mRNA Mengen von unterschiedlichen Entzündungsmediatoren nach SiO<sub>2</sub>-NP Exposition gezeigt. Um die Regulation dieser Entzündungsmediatoren zu untersuchen, sollten anschließend die beteiligten Signalwege identifiziert werden. Neben den Signalwegen NFκB und AP-1 zählen die drei MAP Kinasen p38, JNK und ERK zu den übergeordneten Regulationsmechanismen für die Expression der pro-inflammatorischen Entzündungsmediatoren. Bereits in der Arbeit von C.Marquardt konnte die Aktivierung der drei MAP Kinase Signalwege nach Exposition mit SiO<sub>2</sub>-12 nm NP in RAW264.7 zeitabhängig und ab einer Konzentration von 15,6 cm<sup>2</sup> (50 µg/ml) in Medium ohne FCS gezeigt werden (Marquardt, 2011). Deshalb wurde in dieser Arbeit die Aktivierung der MAP-Kinase Signalwege nur in A549 Zellen analysiert. Hierbei zeigte sich, dass alle drei MAP-Kinasen p38, JNK und ERK nach SiO<sub>2</sub>-12 (15,6 µg/cm<sup>2</sup>) und -25 nm NP (62,5 µg/cm<sup>2</sup>) Exposition ebenfalls in Abwesenheit von FCS phosphoryliert wurden. Die Aktivierung erfolgte bereits nach einer Stunde. In Gegenwart von FCS konnte eine basale Phosphorylierung unabhängig von der Behandlung beobachtet werden. Diese basale Aktivierung der ERK1/2 kann über die Bindung von Wachstumsfaktoren an die Oberflächenrezeptoren wie den EGF-Rezeptor (Wachstumsfaktorrezeptor) erklärt werden (Tari and Lopez-Berestein, 2000). In zahlreichen Studien konnte die Aktivierung von MAP Kinasen mit unterschiedlichen Partikeln beobachtet werden, wobei diese neben der Inflammation auch an Proliferation und Zelltod beteiligt sind. Die inflammatorische Antwort nach Exposition mit kristallinem SiO<sub>2</sub> wird durch die Aktivierung der MAP Kinasen p38 und ERK1/2 und den Transkriptionsfaktoren AP-1 und NFκB reguliert (Castranova, 2004). Desweiteren wurde in A549 Zellen demonstriert, dass nach Exposition mit kristallinem SiO<sub>2</sub> die Expression der COX-2 über die p38 Kinase reguliert wird (Tomaru and Matsuoka, 2011). Auch für die Exposition von A549 Zellen mit amorphen SiO<sub>2</sub>-NP wurde erst kürzlich gezeigt, dass die Kinasen p38 und JNK aktiviert wurden, was zur Translokation des Transkriptionsfaktors ATF-2 führte. Diese Beobachtung war abhängig von der Aufnahme der Partikel, aber unabhängig vom Zelltod, was darauf hinweist, dass die Stress-aktivierten Kinasen ein früher Marker für die biologische Wirkung sind (Mohamed et al., 2011). Auch die Exposition mit TiO<sub>2</sub>-NP in humanen Lymphozyten zeigte eine Aktivierung der p38 und JNK Kinasen, die mit der Induktion von Apoptose korrelierte (Kang et al., 2009). Dagegen konnte C.Marquardt durch Inhibitorstudien zeigen, dass die MAPK Signalwegen nicht an der SiO<sub>2</sub>-NP

induzierten Toxizität beteiligt sind, sondern nur an der Inflammation (Marquardt, 2011). Dies könnte ebenfalls für die A549 Zellen der Fall sein, wurde jedoch nicht untersucht. Für Carbon Black Partikel wurde gezeigt, dass sie die JNK1/2 aktivierten, was für die Einleitung der Apoptose verantwortlich war (Sydlik et al., 2006). Eine gleichzeitige Aktivierung des ERK1/2 Signalwegs über den EGF-Rezeptor und eine proliferationsfördernde Wirkung wurden ebenfalls beobachtet, ein solches Phänomen könnte durch die Interaktion der Proteinkorona mit diesem Signalweg erklärt werden (s. Kap.4.4.1). Da in der vorliegenden Arbeit die Aktivierung des MAP Kinase Signalwegs nach SiO<sub>2</sub> NPn in A549 Zellen demonstriert wurde, stellt sich die Frage welche übergeordneten Signalwege an der Signaltransduktion beteiligt sind. Diese Untersuchung wurde nicht durchgeführt. Jedoch wurde in der Arbeit von C.Marquardt festgestellt, dass die MAP2 Kinasen MKK1/2, MKK3/6 und MKK4 nach SiO<sub>2</sub>-NP Exposition in RAW264.7 Makrophagen phosphoryliert wurden (Marquardt, 2011). Weiterhin bleibt offen, welche Rezeptoren oberhalb des MAP-Kinase Signalweges beteiligt sind. Toll-like Rezeptoren, Scavenger Rezeptoren und Integrine können möglich Sensoren für Partikel sein. Die Vermittlung der Partikel-induzierten pro-inflammatorischen Antwort über Toll-like Rezeptoren wurde in einer Studie von Cui und Kollegen postuliert. Sie beobachteten, dass es nach täglicher oraler Verabreichung (60 Tage) von TiO<sub>2</sub>-NP es in Mäusen zu einer Schädigung der Leber, einer erhöhten TLR4- und TLR2-Synthese sowie einer Erhöhung, der Proteine, des NFκB Signalwegs und TNF-α Freisetzung kam (Cui et al., 2011). Weitere Beispiele für die Interaktion von Nanopartikeln mit Rezeptoren werden im folgenden Kapitel erläutert, da dies insbesondere bei der Aufnahme von Nanopartikeln untersucht wurde.

### **4.3. Aufnahme und Lokalisation von Nanopartikeln**

Die Untersuchung der verschiedenen Metalloxid Nanopartikel ergab unterschiedliche biologische Wirkungen, die nicht eindeutig über oxidativen Stress zu erklären waren. Deshalb war es zusätzlich notwendig, die Aufnahme der Partikel in die Zellen zu analysieren. Denn Unterschiede in der Aufnahme und Lokalisation könnten einen Hinweis darauf geben, warum manche Partikel eine geringere Zytotoxizität zeigen. Nach Exposition der Zellen wurde mittels TEM-Analyse die Lokalisation der Partikel an der Zellmembran und intrazellulär untersucht. Auf diese Weise konnte analysiert werden, ob die Partikel die Membran der Zelle passiert haben und welche Aufnahmewege möglicherweise daran beteiligt sein könnten. Weiterhin konnte bestimmt werden, in welchen Kompartimenten der Zelle die Partikel lokalisiert waren. Es konnte gezeigt werden, dass in Gegenwart von FCS alle Metalloxid-NP Sorten von beiden Zelllinien aufgenommen wurden. Es wurden intrazellulär hauptsächlich Aggregate und Agglomerate gefunden. Die aufgenommenen Partikel waren hauptsächlich Membran-umschlossen und befanden sich im Zytoplasma. Es

konnte keine Aufnahme in die Mitochondrien oder in den Zellkern beobachtet werden, was mit den Beobachtungen der meisten Publikationen überein stimmt (Singh et al., 2007, Stayton et al., 2009, Yu et al., 2009, Al-Rawi et al., 2011, Konczol et al., 2011). Da sich herausgestellt hatte, dass die SiO<sub>2</sub>-NP in Abwesenheit von FCS einen besonders starken zytotoxischen Effekt auslösten, wurde die Aufnahme unter diesen Bedingungen zusätzlich untersucht. Hierbei befanden sich die Partikel ebenfalls nur im Zytoplasma, jedoch z.T. ohne von einer Membran umschlossen zu sein. Für beide Expositionsszenarien konnte beobachtet werden, dass die Nanopartikel größtenteils über Einstülpungen der Membran in die Zellen aufgenommen wurden. Dies deutet auf eine Aufnahme über Endozytose und Phagozytose hin. Welche Mechanismen an der Aufnahme der Nanopartikel genau beteiligt sind, konnte mit dieser Methode jedoch nicht geklärt werden. Hierzu müssten durch spezifische Hemmung der Aufnahmewege mittels Inhibitoren und siRNA weitere Untersuchungen erfolgen.

Für die Internalisierung von Nanopartikeln gibt es verschiedene Wege. Zum einen können Rezeptor-vermittelte (Phagozytose, Clathrin und Caveolin-abhängig und unabhängige Aufnahme) und zum anderen Rezeptor-unabhängige (Makropinozytose) Aufnahmewege involviert sein. Über welchen Aufnahmeweg Partikel internalisiert werden, hängt von ihrer Größe, Ladung und der Zusammensetzung der Oberfläche ab. So wurden insbesondere 50 nm Gold NP über die Rezeptor-vermittelte Endozytose (*Clathrin coated pits*) in Zellen aufgenommen (Jiang et al., 2008). Diese Beobachtung wurde auch von anderen Gruppen bestätigt (Osaki et al., 2004, Chithrani, 2010). Größere Partikel im Mikrometerbereich, wie die Partikelagglomerate in der vorliegenden Arbeit, können dagegen durch Makropinozytose und Phagozytose aufgenommen werden (Conner and Schmid, 2003). Gleichzeitig spielt auch die Zusammensetzung der Partikeloberfläche eine entscheidende Rolle für die Rezeptor-vermittelte Aufnahme. So führt die Adsorption von Serumproteinen an die Partikel dazu, dass diese von Oberflächenrezeptoren erkannt werden und so die Aufnahme der Partikel induziert wird. Proteine, die sich im Serum befinden, sind unter anderem Albumin, Immunglobuline, Komponenten des Komplementsystems und Wachstumsfaktoren, die an die unterschiedliche Oberflächenrezeptoren wie den Mannose-, der Komplement-, der Immunglobulin-Rezeptor, die Scavenger Rezeptoren (Dobrovolskaia and McNeil, 2007) und den Albumin-Rezeptor (gp60) (Minshall et al., 2000) binden können. Bereits in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass die Partikel-Internalisierung über verschiedene Rezeptoren in Gegenwart von Serum vermittelt wird. So demonstrierten Lunov und Kollegen, dass die Phagozytose von funktionalisierten 100 nm Polystyrol Beads in Makrophagen in Gegenwart von Serum vom CD64 Rezeptor (Immunglobulin Rezeptor) abhängig ist (Lunov et al., 2011). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Kohlenstoffnanoröhren eine starke Bindungsaffinität zu BSA haben und die Aufnahme in RAW264.7 über den Scavenger

Rezeptor A einherging, wobei es möglicherweise bei der Adsorption zu einer Konformationsänderung des BSA kam und der Rezeptor sozusagen das geschädigte BSA erkannte (Dutta et al., 2007). Ebenfalls unter Serum-Bedingungen wurde die Aufnahme von Carboxydextran-gecoateten  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -NP, die als Kontrastmittel verwendet werden, untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Bindung der Partikel an den Scavenger Rezeptor A für die Aufnahme benötigt wird (Lunov et al., 2011). Für BSA beschichtete Nanopartikel wird die Aufnahme über die Bindung an den Albumin-Rezeptor und Caveolin-abhängige Endozytose vermutet (Wang et al., 2009). Aber auch „nackte“, nicht beschichtete Partikel können von Rezeptoren erkannt werden. So zeigte eine Studie, dass die Aufnahme von Polystyrol Beads in differenzierten Makrophagen-ähnlichen THP-1 Zellen in Abwesenheit von Serum über den Scavenger Rezeptor A, die Clathrin- und Dynamin-abhängige Endozytose vermittelt wurde (Lunov et al., 2011). Desweiteren wurde die Bindung von  $\text{TiO}_2$ -NP an den MARCO-Rezeptor (*macrophage receptor with collagenous structure*) gezeigt (Palecanda et al., 1999). Zusätzlich zu diesen Mechanismen könnten Nanopartikel über unspezifische Diffusion in die Zelle gelangen. Dies bietet eine Erklärungshypothese für die in der vorliegenden Arbeit gemachte Beobachtung, dass Nanopartikel nicht Membran-umschlossen im Zytoplasma vorlagen. In einer anderen Studie wurde dieser Effekt ebenfalls beobachtet. Hierbei wurden aus dem Schwein isolierte alveoläre Makrophagen mit nano- und mikroskaligen Polystyren Partikeln inkubiert. Die Partikel waren frei ohne Membranhüllung im Zytoplasma lokalisiert. Die Diffusion und adhäsive Interaktion der Partikel mit der Membran wurden als Erklärung vorgeschlagen (Geiser et al., 2005). Welche Konsequenzen allerdings durch freie Partikel ausgelöst werden, ist nicht bekannt, möglicherweise können Partikel direkt mit den Organellen und Proteinen interagieren und diese schädigen.

Ein weiterer Faktor, der entscheidend für die intrazelluläre Dosis ist, ist die Depositionseffizienz der Partikel auf den Zellen. Denn nur Partikel, die mit den Zellen überhaupt in Kontakt kommen, können aufgenommen werden. In Suspensionen wie dem Zellkulturmedium werden Partikel über Diffusion und Sedimentation auf den Zellen deponiert. Dies ist von der Größe der Partikel abhängig (Hinderliter et al., 2010). Limbach und Kollegen konnten mit Ceriumoxidnanopartikeln zeigen, dass insbesondere größere Partikel (250-500 nm) von humanen Lungenfibroblasten aufgenommen wurden, da sie über Sedimentation schnell mit den Zellen in Kontakt gekommen waren. Dagegen wurden Partikel kleiner 50 nm überhaupt nicht als einzelne Partikel auf den Zellen deponiert. Diese agglomerierten sofort im Zellkulturmedium und wurden auch nur als Agglomerate aufgenommen. Die NP gelangten vorwiegend über Diffusion auf die Zellen (Limbach et al., 2005). Eine andere Studie zeigte kürzlich, dass Aggregate zelltypspezifisch unterschiedlich effizient aufgenommen werden. Dabei nahmen über Rezeptor-vermittelte Endozytose A549 und Hela Zellen weniger Transferrin/BSA beschichtete Aggregate aus Gold NP (46 und 98 nm) auf als BSA-

beschichtete monodisperse Gold-NP (30, 45 und 100 nm). Im Gegensatz dazu wurde in einer humanen Brustkarzinomzelllinie (MDA-MB-435) kein Unterschied in der Aufnahme von Aggregaten und Einzelpartikeln beobachtet, was möglicherweise darauf hinweist, dass noch ein weiterer, Rezeptor-unabhängiger Aufnahmeweg wie die Makropinocytose beteiligt sein könnte. Aufgrund dessen wurde vermutet, dass es bei asymmetrischen Aggregaten im Vergleich zu sphärischen Partikeln zu komplexeren Interaktionen mit der Zellmembran kommt, die die Aufnahme verhindern (Albanese and Chan, 2011). Bislang zeigen Studien ein komplexes Bild für die Aufnahme von Aggregaten und Agglomeraten, wobei einerseits Agglomerate effizient (Limbach et al., 2005) andererseits schlechter aufgenommen wurden als sphärische Partikel (Skebo et al., 2007, Stayton et al., 2009).

Abschließend kann nicht beurteilt werden, wie effizient in der vorliegenden Studie Partikel aufgenommen wurden. Die applizierten Partikel bestanden in beiden Expositionsszenarien (+/-FCS) aus einer Palette unterschiedlich großer und asymmetrischer Aggregate und Agglomerate und auch mittels TEM Analyse konnte keine quantitative Aussage getroffen werden. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass Unterschiede in der intrazellulären Dosis in den beiden Expositionsszenarios auch einen Einfluss auf die Toxizität der NP hatten. Obwohl die TiO<sub>2</sub>- und Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NP sehr schnell auf die Zellen sedimentierten, kann daraus nicht geschlossen werden, wie effizient die deponierten Partikel aufgenommen wurden.

#### **4.3.1. Mechanismen der Zytotoxizität von SiO<sub>2</sub>-NP**

Da kein Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und toxischer Wirkung hergestellt werden konnte, werden im Folgenden weitere Erklärungshypothesen für die SiO<sub>2</sub>-NP induzierte Toxizität und pro-inflammatorische Wirkung diskutiert. In der Literatur wird ein weiterer Mechanismus beschrieben, der einen Zusammenhang zwischen Partikelinternalisierung und der biologischen Wirkung von SiO<sub>2</sub>-NP aufzeigt. Hierbei handelt es sich um die lysosomale Ruptur. Nach Internalisierung der Partikel über Endozytose oder Phagozytose akkumulieren diese in den Lysosomen, wo es zur Schädigung der Lysosomenmembran kommt. Dadurch werden die Partikel und die lysosomalen Enzyme ins Zytoplasma freigesetzt. Freigesetzte lysosomale Enzyme können Cathepsine und Hydrolasen sein, die Caspasen und damit den intrinsischen Apoptose-Signalweg im Zytosol über die Mitochondrien aktivieren und somit den Zelltod einleiten können (Boya and Kroemer, 2008). Ein Zusammenhang zwischen der lysosomalen Ruptur und der Toxizität von Partikeln wurde bereits in einer Studie mit amino-modifizierten-Polystyren Partikeln in RAW264.7 und BEAS-2B Zellen demonstriert (Xia et al., 2008). Hussain und Kollgegen zeigten, dass TiO<sub>2</sub>-NP Apoptose in bronchialen Epithelzellen durch lysosomale Ruptur

auslösen (Hussain et al., 2010). Wie bereits in Kap. 4.2.4 beschrieben wird postuliert, dass die lysosomale Ruptur nach Partikelaufnahme an der Aktivierung des NALP3 Inflammasoms beteiligt ist, welches für die Prozessierung und Freisetzung des Zytokins IL-1 $\beta$  verantwortlich ist (Morishige et al., 2010). Ein weiterer Mechanismus über den SiO<sub>2</sub>-NP toxisch wirken könnten, ist die Interaktion der Silanolgruppen auf der Oberfläche von SiO<sub>2</sub>-NP mit den Phospholipiden der Membranen. Diese Interaktion kann auf noch unbekannte Weise zur Destabilisierung der Membran führen (Slowing et al., 2009). Dieser Aspekt wurde schon in den 60er Jahren erkannt, als beobachtet wurde, dass amorphe SiO<sub>2</sub> Partikel die Hämolyse von Erythrozyten verursachten und dieser Effekt durch die Zugabe von Plasma vollständig gehemmt werden konnte (Harley and Margolis, 1961). Auch Pandurangani und Kollegen konnten demonstrieren, dass mittels der Reduktion der Anzahl der Silanolgruppen auf der Oberfläche durch Kalzinierung von SiO<sub>2</sub> Partikeln die hämolytische Aktivität vermindert werden konnte (Pandurangi et al., 1990). Diese Studien unterstützen die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung, dass die Oberfläche der SiO<sub>2</sub>-NP mit den biologischen Systemen auf eine noch unbestimmte Weise interagiert und verschiedene zelluläre Antworten auslöst, wobei die Proteinkorona die Wirkung komplett aufheben kann.

Welcher dieser Mechanismen bei der Auslösung des Zelltodes und der inflammatorischen Antwort letztendlich eine entscheidende Rolle spielt, ist momentan nicht zu beantworten. In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch zelltypspezifische Unterschiede unter serumhaltigen Bedingungen bei der Analyse des Zelltodes festgestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die RAW264.7 Makrophagen sensitiver auf die SiO<sub>2</sub>-12 nm NP in Medium mit FCS reagierten als die A549 Zellen und es bereits zur Freisetzung von LDH nach 24 h kam. Eine mögliche Ursache könnte eine effizientere Partikelaufnahme der Makrophagen im Vergleich zu den A549 Zellen sein. Hierbei könnte die Proteinkorona in den Lysosomen abgebaut werden und so die Partikeloberfläche intrazellulär freisetzen, die die lysosomale Ruptur verursacht und letztendlich den Zelltod auslöst. Dagegen würde eine geringere Aufnahme in die A549 Zellen auch das Auftreten der lysosomalen Ruptur und somit die Zellschädigung verringern. Diese Hypothese stimmt mit einer Studie überein, die eine geringere Aufnahme in A549 Zellen im Vergleich zu RAW264.7 Makrophagen ebenfalls im serum-haltigen Medium mit verschiedenförmigen und unterschiedlich großen (in einer Dimension ca. 200 nm) monodispersen SiO<sub>2</sub>-NP beobachtet haben, die mit einer geringeren LDH Freisetzung in den A549 Zellen korrelierte. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die RAW264.7 Makrophagen die Partikel z.T. über Rezeptor-vermittelte Endozytose aufnehmen können, die A549 Zellen dagegen nicht (Herd et al., 2011). Außerdem wurde demonstriert, dass die SiO<sub>2</sub>-NP die Autophagie in den Makrophagen stärker induzierten als in den A549 Zellen. Die Induktion der Autophagie in RAW264.7 Makrophagen unabhängig vom Serum wurde ebenfalls in der Arbeit von C.Marquardt festgestellt (Marquardt, 2011). In serum-freiem Medium könnte dagegen

weniger die lysosomale Ruptur als vielmehr die direkte Interaktion mit den Membranen und folglich die Membrandestabilisierung ein möglicher Mechanismus für die Partikel-induzierte Toxizität sein. Um die Beteiligung der lysosomalen Ruptur zu überprüfen, müssten noch weitere vergleichende Studien z.B. mit dem Fluoreszenz-Farbstoff für Lysosomen Acridine Orange erfolgen, bei dessen Freisetzung ins Zytoplasma es durch die pH Änderung zur Farbänderung kommt.

#### **4.4. Die Proteinkorona wirkt protektiv auf die SiO<sub>2</sub>-NP-induzierte Toxizität in Lungenepithelzellen.**

Der Einfluss der Proteinkorona wird zunehmend als wichtiger Faktor in der Nanotoxikologie erkannt, der zusätzlich zu den Partikeleigenschaften eine Rolle bei der Interaktion von Nanopartikeln mit biologischen Systemen spielt. Sobald Nanopartikel mit biologischen Systemen in Kontakt kommen, assoziieren sie mit Proteinen. Die Adsorption der Proteine an die Nanopartikel und ihre Wirkung auf biologische Systeme wurde bislang kaum systematisch erforscht. Es wird postuliert, dass die Proteinkorona selbst und nicht die Oberfläche des Partikels von den Zellen „gesehen“ wird und mit den Rezeptoren und Signalwegen der Zellen interagiert (Lynch et al., 2007). Die bestimmenden Faktoren sind Strukturen der Proteine (Epitope), die von den Rezeptoren erkannt werden und dabei die Aufnahme (s. Kap 4.3), die Proliferation, den Zelltod, die Inflammation und das Überleben beeinflussen. Zum einen kann die Proteinkorona wie bereits in Kap. 4.1 besprochen das Agglomerationsverhalten und die Ladung der Nanopartikel verändern und somit die Aufnahme beeinflussen. Zum anderen ist die Zusammensetzung der Proteinkorona ein wichtiger Faktor, der die Interaktion mit den Zellen entscheidend beeinflusst. Die wichtigste Bedeutung haben dabei die Serumproteine. Das Serum besteht aus verschiedenen Proteinen und die Bindungsaffinität und die Dissoziationsrate eines jeden Proteins zu den unterschiedlichen Partikeln bestimmen letztendlich die molekularen Interaktionen und folglich die zellulären Konsequenzen (Lynch et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde die Beobachtung gemacht, dass die Toxizität von SiO<sub>2</sub>-NP durch Serum gehemmt werden kann. Deshalb sollte überprüft werden, ob bestimmte Proteine aus dem Medium, insbesondere BSA, eine Proteinkorona auf der Oberfläche von SiO<sub>2</sub>-NP ausbilden und welche zellulären und molekularen Konsequenzen sich daraus ergeben. Nach Inkubation mit serumhaltigem Medium konnten durch mehrere Zentrifugations- und Waschschriffe Protein-beschichtete SiO<sub>2</sub>-NP gewonnen werden. Nach anschließender Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE und Detektion über spezifische Antikörper konnte gezeigt werden, dass Serumproteine, insbesondere BSA, an die SiO<sub>2</sub>-NP gebunden hatten. Diese Daten stimmen mit anderen Studien überein. Die Bindung von verschiedenen Proteinen aus dem humanem

Plasma wurde in einer Studie mit amino-, carboxy- und nicht modifizierten Polystyrenpartikeln unterschiedlicher Größe (50 nm und 100 nm) auch über die Zentrifugationsmethode gezeigt (Lundqvist et al., 2008). In einer Studie aus der eigenen Arbeitsgruppe wurde ebenfalls demonstriert, dass die gleichen SiO<sub>2</sub>-12 nm NP Plasmaproteine an ihre Oberfläche adsorbieren und dass neben BSA insbesondere Fibrinogen an diese Partikel verstärkt bindet (Ruh, 2010). Generell gelten die Hydrophobizität und Oberflächenladung als entscheidende Partikelcharakteristika, die die Bindung von Proteinen beeinflussen. So zeigen Copolymere und Carbon Black Partikel in vergleichenden Studien mit hydrophilen Partikeln eine größere Bindungsfähigkeit (Cedervall et al., 2007, Ruh, 2010). Außerdem kann es bei der Adsorption der Proteine an Nanopartikel zur Konformationsänderung der Proteine kommen, wobei einerseits die Funktionalität verloren gehen kann, andererseits können auch neue Epitope freigelegt werden die mit anderen Rezeptoren interagieren können als das ursprüngliche Protein (Dutta et al., 2007, Deng et al., 2011).

Desweiteren sollte überprüft werden, ob die Beschichtung der Partikel mit Serumproteinen und BSA ausreichte, um die protektive Wirkung auszulösen. Dabei konzentrierten sich die Untersuchungen auf die Lungenepithelzellen A549, da die serum-abhängigen Effekte in dieser Zelllinie am ausgeprägtesten waren. Hierbei konnte zum ersten Mal direkt gezeigt werden, dass die SiO<sub>2</sub>-NP induzierte Zytotoxizität und pro-inflammatorische Wirkung auf mRNA-, Protein- und sogar auf der übergeordneten Signalebene durch die Beschichtung mit FCS und sogar durch BSA alleine reduziert wurden. Welcher Mechanismus dahinter steckt ist, noch nicht aufgeklärt. Einen Hinweis darauf könnten genauere Untersuchungen der Proteinkorona geben. Ein erster Schritt war die Abschätzung der benötigten Oberflächenbeschichtung, die die Wirkung hemmen kann. Hierbei ergab die Quantifizierung der gebundenen BSA Proteine an die SiO<sub>2</sub>-NP, dass eine Beschichtung mit nur 0,025 % der Partikeloberfläche mit BSA genügte, um die Toxizität zu hemmen (Berechnung s. Kap. 3.8.1). Ein möglicher Mechanismus könnte demnach die Verhinderung der Interaktion der Silanolgruppen an der Partikeloberfläche mit zellulären Bestandteilen wie der Membran durch sterische Hinderung sein. Des Weiteren könnte eine verstärkte Agglomeration durch die Minderung der elektrostatischen Abstoßung eine geringere Internalisierung zur Folge haben. Es ist aber auch möglich, dass BSA oder andere Serumproteine an Rezeptoren (Albumin-, Komplement-, Immunglobulin-, Scavenger-Wachstumsfaktor-Rezeptor) auf der Zelloberfläche binden und die Aufnahme, die Überlebens- aber auch anti-inflammatorischen Signalwege modulieren. Bislang gibt es kaum vergleichbare Studien, die auf diese Weise die protektive Wirkung von adsorbierten Serumproteinen wie BSA zeigen. Eine Studie, in der mit BSA beschichteten Kohlenstoffnanoröhren gearbeitet wurde, konnte die anti-inflammatorische Wirkung von BSA in RAW264.7 Zellen zeigen. Hierbei wurde die durch LPS

induzierte COX-2 Synthese durch BSA-beschichtete Kohlenstoffnanoröhren gehemmt. Ein anderer Mechanismus wurde in der gleichen Studie für 10 nm amorphe SiO<sub>2</sub>-NP gezeigt. Ähnlich wie in der vorliegenden Studie waren amorphe SiO<sub>2</sub>-NP auch in serumhaltigem Medium in RAW264.7 Zellen zytotoxisch. Hierbei konnte Surfactant (Pleuronic F127) die Toxizität der Partikel unter serumhaltigen Bedingungen hemmen (Dutta et al., 2007). In vielen anderen Studien wurde hauptsächlich mit serum- oder BSA-haltigem Medium und nicht mit der Proteinkorona an sich gearbeitet. Eine Studie aus der eigenen Arbeitsgruppe zeigte, dass die Vitalität von Hela Zellen nach Inkubation mit monodispersen SiO<sub>2</sub>-NP (50 nm) in serumfreien Medium reduziert wurde, aber in Gegenwart von Serum nicht (Al-Rawi et al., 2011). Eine Studie von Kittler und Kollegen zeigte in humanen mesenchymalen Stammzellen, dass FCS und in einem geringeren Maße BSA die Toxizität von Silbernanopartikeln (50 nm) hemmen konnte (Kittler, 2010). Hierbei wurde vermutet, dass die freigesetzten Silberionen durch Albumin gebunden werden und dadurch die schädigende Wirkung gehemmt wird. Eine weitere Untersuchung stellte einen Zusammenhang zwischen unterschiedlichen Bestandteilen der Proteinkorona und der Aufnahme fest. Hierbei führten die Hitzeinaktivierung des Serums und die Zerstörung des Komplementsystems zu einer höheren Proteinadsorption an Polystyrol Partikeln und zu einer geringeren Aufnahme in A549 Zellen (Lesniak et al., 2010). Allerdings wurden Änderung der Partikeleigenschaften der Ladung oder eine Verstärkung der Agglomeration (s. Kap 4.1) nicht untersucht, die ebenfalls die Aufnahme hätten beeinflussen können.

#### **4.4.1. Die Proteinkorona aus Serumproteinen aktiviert den PI3K/AKT-Signalweg.**

Um der Frage nachzugehen, ob die Proteinkorona direkt mit einem zellulären Signalweg interagieren kann, wurde die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs untersucht. Unter der Annahme, dass auch Wachstumsfaktoren aus dem FCS an die Partikel binden können, wurde diese Möglichkeit untersucht. Hierbei konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass weder die „nackten“ SiO<sub>2</sub>-NP noch die mit BSA-beschichteten, sondern nur die mit FCS-beschichteten SiO<sub>2</sub>-NP eine Phosphorylierung von AKT verursachten. Diese Beobachtung unterstützt demnach die Hypothese, dass die Korona aus bestimmten Serumproteinen über Rezeptoren mit intrazellulären Signalwegen interagieren kann. Für einen direkten Beweis müssten allerdings noch Untersuchungen auf der Ebene des Rezeptors z.B. des EGF-Rezeptors über Inhibitorstudien durchgeführt werden. In der Literatur gibt es kaum Untersuchungen zu solchen Phänomenen. Es gibt eine Studie, die die Aktivierung von AKT über den EGF-Rezeptor und  $\beta$ -Integrin und dadurch eine proliferationsförderende Wirkung durch Partikelexposition demonstriert. Hierbei wurde

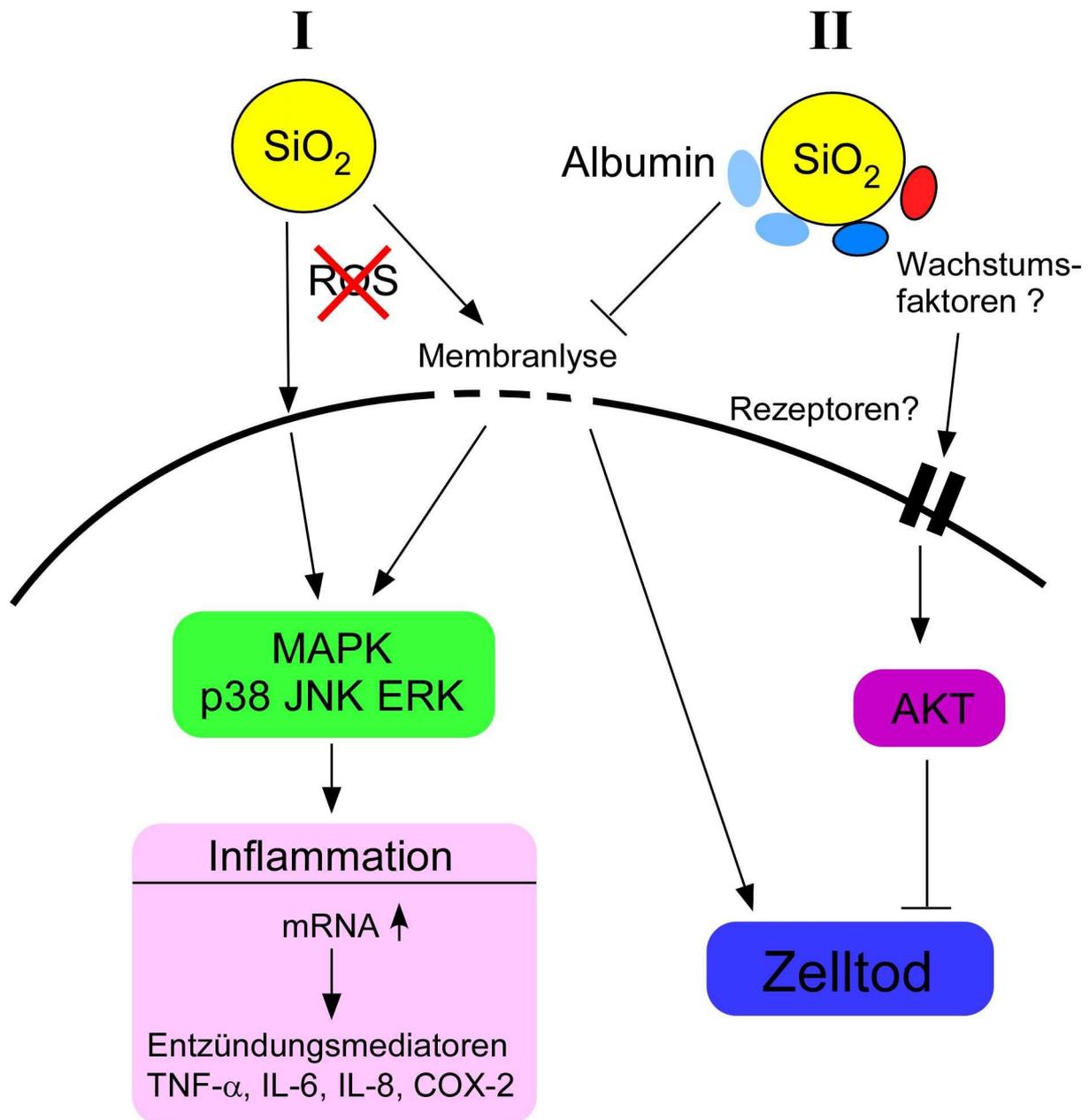
Carbon Black in 0,5 % FCS-haltigem Medium mit epithelialen Zelllinien (Ratte, human) inkubiert. Carbon Black hat aufgrund seiner Hydrophobizität eine hohe Bindungsaffinität zu Proteinen, deshalb kann in dieser Studie nicht ausgeschlossen werden, dass die proliferationsfördernden Effekte auf der Interaktion der Proteinkorona mit Membranrezeptoren beruhen (Unfried et al., 2008). Eine weitere Studie zur Aktivierung von Signalwegen durch die Proteinkorona zeigte, dass mit Fibrinogen beschichtete modifizierte Gold NP in THP-1 Zellen eine pro-inflammatorische Wirkung über die Aktivierung von NF $\kappa$ B induzierten, wodurch es zur Freisetzung der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-8 kam (Deng et al., 2011). Es wurde demonstriert, dass das adsorbierte Fibrinogen durch negativ geladene Partikel (modifizierte Gold-, SiO<sub>2</sub>-, TiO<sub>2</sub>-, ZnO-NP) aufgefaltete, und dass diese Form durch den Mac-1 Rezeptor (*macrophage-1 antigen*, Komplement-Rezeptor) erkannt wurde, wodurch die Signalkaskade ausgelöst wurde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Nanopartikeltoxizität auf verschiedenen Ebenen zu untersuchen ist. Es handelt sich dabei um ein multiparametrisches Problem, dessen Aufklärung noch viel Forschungsaufwand bedarf. Es reicht demnach nicht „nur“ aus, die Partikeleigenschaften wie Größe, Kristallinität, Ladung und Oberflächengröße zu kennen, sondern es ist auch noch notwendig, die Oberflächenzusammensetzung bei Funktionalisierung oder unbeabsichtigter Beschichtung z.B. durch Serumproteine zu ermitteln. Die auf diese Weise veränderten Oberflächeneigenschaften spielen zusätzlich eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung der Wirkung.

#### **4.5. Modell für die SiO<sub>2</sub>-NP induzierte Toxizität und den protektiven Effekt von Serumproteinen in Lungenepithelzellen**

In Abb. 27 sind die Interaktionen der amorphen SiO<sub>2</sub>-NP mit Lungenepithelzellen und deren molekularen und zellulären Konsequenzen zusammengefasst. Es konnte gezeigt werden, dass nicht-dekorierte SiO<sub>2</sub>-NP stark zytotoxisch waren und die MAPK Signalkaskade aktivierten. Infolgedessen wurden die mRNA Mengen der Entzündungsmediatoren TNF- $\alpha$ , IL6, IL-8 und COX-2 erhöht und deren Synthese und Freisetzung ausgelöst. Der Zelltod war v.a. durch die Freisetzung von LDH charakterisiert, was vermutlich auf die direkte Interaktion der Silanolgruppen mit der Membran zurückzuführen ist. Der Zelltod kann hierbei sowohl durch die Lyse der Zellmembran als auch durch die lysosomale Ruptur intrazellulär nach Aufnahme ausgelöst worden sein, was möglicherweise die Aktivierung der MAPK Signalwege zur Folge hatte. Hierbei kann vermutlich die Beteiligung der MAPK Signalwege an der Vermittlung des Zelltodes ausgeschlossen werden, da dies in der Arbeit von C.Marquardt bereits gezeigt werden konnte (Marquardt, 2011). Des Weiteren gab es keine

Korrelation mit der Bildung von ROS. Es wurde auch keine Induktion der anti-oxidativen Antwort beobachtet, was gegen eine Beteiligung von oxidativem Stress an der SiO<sub>2</sub>-NP induzierten Toxizität spricht (Teil I). Weiterhin konnte demonstriert werden, dass die Proteinkorona einen wesentlichen Einfluss auf die zellulären Konsequenzen hat (Teil II). Die Dekorierung der Partikel sowohl mit bovinem Serum Albumin als auch mit komplettem Serum schützten die Zellen vor der SiO<sub>2</sub>-NP induzierten Toxizität und inhibierte die Induktion der Entzündungsmediatoren. Mögliche Mechanismen werden in Kapitel 4.4 ausführlich diskutiert, z.B. dass eine direkte Interaktion der Partikeloberfläche mit zellulären Bestandteilen wie Membranen oder durch verstärkte Agglomeration die Aufnahme und somit die Membranlyse und lysosomale Ruptur verhindert wird. Es können aber auch andere Rezeptoren involviert sein, die Bestandteile des Serums erkennen und überlebensfördernde Signalwege induzieren. Hierbei konnte eine direkte Interaktion der Serumproteinkorona mit dem AKT-Signalweg gezeigt werden, die unabhängig von Albumin ist. Dies wäre eine Möglichkeit, wie die Proteinkorona einen Signalweg anschaltet, der das Überleben der Zellen trotz Stress Bedingungen fördert.



**Abb. 27 Zusammenfassendes Modell und Arbeitshypothese für die Interaktionen von SiO<sub>2</sub>-NP mit A549 Lungenepithelzellen und der Einfluss der Proteinkorona auf die NP-induzierten Effekte**

**Teil I:** Die direkte Interaktion der SiO<sub>2</sub>-NP mit der Membran führt zur Membranlyse (Zellmembran und / oder lysosomale Ruptur). Die Membranlyse führt zur Aktivierung der MAP Kinasen, infolgedessen werden Entzündungsmediatoren hochreguliert und freigesetzt, Gleichzeitig wird der Zelltod ausgelöst jedoch ohne Beteiligung der MAP Kinasen.

**Teil II:** An die SiO<sub>2</sub>-NP adsorbiertes Albumin verhindert die Membranlyse und somit die Aktivierung der MAP Kinasen und die Inflammation sowie den Zelltod. Auch adsorbierte Wachstumsfaktoren können einen hemmenden Einfluss auf den Zelltod haben, indem Überlebenssignalwege wie der PI3K/AKT-Signalweg angeschaltet werden.

#### **4.6. Neue *in vitro* Methoden verbessern die toxikologische Charakterisierung der NP und ermöglichen die Bestimmung der deponierten Dosis.**

Die Untersuchung der Nanopartikeltoxizität wurde bislang hauptsächlich unter submersen Bedingungen durchgeführt. Diese Applikationsmethode ist zumindest für die Exposition in der Lunge nicht realistisch. Zum einen entspricht die Zusammensetzung des Mediums nicht den Bedingungen in der Lunge. Die Lungenoberfläche ist mit einem dünnen Flüssigkeitsfilm, dem sogenannten Surfactant ausgekleidet, das die Lungenbläschen durch die reduzierte Oberflächenspannung offen hält. Die Proteinzusammensetzung der Lungenflüssigkeit ist anders als im Blutplasma; so ist Albumin z.B. in 10-fach geringerer Mengen im Surfactant vorhanden (Cross et al., 1994). Da sich bereits in der vorliegenden Arbeit gezeigt hat, dass die Opsonisierung der Partikel durch Serumproteine eine entscheidende Wirkung auf die Zellen hatte, muss angenommen werden, dass dies für die Situation in der Lunge ebenfalls eine Rolle spielt. Zum anderen ist das Verhalten von Nanopartikeln in Flüssigkeiten anders als im Aerosol. So können Nanopartikel in Medium stark agglomerieren, was zu einer anderen Größenverteilung führt als im Aerosol. Desweiteren ist die Depositionseffizienz, d.h. die effektive deponierte Dosis, in Flüssigkeiten von vielen Faktoren wie Diffusion und Sedimentation abhängig, die wiederum von der Zusammensetzung des Mediums, der Agglomeration, der Größe, der Dichte, der Form und Oberflächeneigenschaften der Partikel und letztendlich von der Expositionszeit abhängig sind (Teeguarden et al., 2007, Hinderliter et al., 2010). So werden sphärische Nanopartikel mit 100 nm Durchmesser in einer Flüssigkeit schlechter auf den Zellen deponiert als 10 nm oder 1000 nm Partikel. Dies beruht darauf, dass die Partikel mit einem Durchmesser von 10 nm in der Flüssigkeitssäule sich effektiv durch Diffusion und die 1000 nm sich durch Sedimentation über die Schwerkraft absetzen. Im Gegensatz dazu setzen sich die 100 nm Nanopartikel weder über die Diffusion noch über Sedimentation effektiv auf den Zellen ab. Theoretisch interagieren dann viel weniger 100 nm Partikel mit den Zellen, was die Wirkung vermindert. Deshalb werden Methoden gesucht, die es ermöglichen, die angebotene Dosis direkt zu kontrollieren und zu messen. Eine Möglichkeit hierbei bietet die Applikation der Partikel über ein Aerosol anstelle einer Suspension. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit A549 Lungenepithelzellen mit Aerosolen aus SiO<sub>2</sub>-NP an der Luft-/Flüssigkeitsschicht (ALI) behandelt. Dabei wurde die Größenverteilung und die deponierte Dosis der Partikel indirekt mittels TEM Analyse von Nanopartikeln ermittelt, die auf einer Membran ohne Zellen deponierten. Für einen Vergleich mit der Exposition in Medium wurden die Zellen gleichzeitig mit denselben Nanopartikeln unter submersen Bedingungen behandelt, unter der Annahme, dass alle im Medium vorhandenen Partikel auf den Zellen deponieren, was nicht direkt beobachtet werden kann da, die Partikel durchsichtig sind. Diese Studie zeigt zum ersten Mal die Wirkung von SiO<sub>2</sub>-NP unter ALI-Bedingungen. Die Verwendung eines elektrischen Feldes zur Steigerung der

Depositionseffizienz hatte keine Auswirkung auf die akute Toxizität und pro-inflammatorische Antwort. In anderen Studien konnten ebenfalls keine Auswirkungen des elektrischen Feldes festgestellt werden (Savi et al., 2008, de Bruijne et al., 2009). Desweiteren wurde beobachtet, dass die Zellen an der Luft-Flüssigkeitsgrenzschicht (ALI) weniger sensitiv auf die angebotenen Partikel reagierten als die Zellen unter submersen Bedingungen. Unter der Annahme, dass bei submersen Bedingungen alle Partikel auf den Zellen deponiert waren, wurden im Vergleich dazu bei der Exposition mit dem Aerosol 5-mal ( $\text{SiO}_2$ -12 nm) bis 7-mal ( $\text{SiO}_2$ -50 nm) mehr Partikel deponiert, dennoch reagierten die Zellen in geringerem Maße. Die LDH-Freisetzung war unter submersen Bedingungen für die  $\text{SiO}_2$ -12 nm Partikel doppelt so hoch wie bei der Aerosol Behandlung. Die IL-8 Freisetzung war sogar 4-mal höher unter submersen Bedingungen. Auch die Messung der pro-inflammatorischen Antwort über die COX-2 Synthese und die p38 Aktivierung direkt nach der Exposition zu einem frühen Zeitpunkt zeigte eine geringere Zunahme des Signals als nach submerser Behandlung. Sowohl die akute Toxizität als auch die pro-inflammatorische Antwort der  $\text{SiO}_2$ -50 nm NP war unter submersen Bedingungen deutlich geringer als die der  $\text{SiO}_2$ -12 nm NP, vermutlich aufgrund der Tatsache, dass die angebotene Oberfläche deutlich kleiner ist. Bei einem Vergleich der verschiedenen Oberflächendosen, die theoretisch auf den Zellen unter submersen Bedingungen und tatsächlich im Aerosol deponiert wurden, konnte man erkennen, dass die Oberflächendosis im Aerosol immer größer war (bei 12 nm NP 5-mal, bei 50 nm 2-mal) als im submersen System, dennoch war die biologische Wirkung geringer (Tab. 23). Eine mögliche Erklärung könnten Unterschiede in der angebotenen Agglomeratgröße in beiden Expositionszenarien sein, die die Aufnahme beeinflussen. So ist es nicht möglich vorrauszusagen, ob die applizierten Agglomerate aufgenommen werden oder nicht (Albanese and Chan, 2011). Eine andere Erklärung könnten metabolische Veränderungen durch die Exposition an der Luft oder sogar durch die Elektroden sein, wobei es zu einer schlechteren Aufnahme der Partikel kommen könnte. Außerdem wäre es möglich, dass die Zellen geringe Mengen von Surfactant bereits nach kurzer Zeit an der Luft sekretieren, sodass die Partikel opsonisiert werden und mit den Zellen eine andere Interaktion eingehen als die „nackten“ Partikel in serumfreiem Medium. Es könnte auch zur Hochregulierung von Glutathion und anderen anti-oxidativen Schutzmechanismen kommen, die vor dem oxidativem Stress durch die Luft schützen. Welche Veränderungen die A549 Zellen an der Luft durchmachen, sind bisher kaum erforscht. Die Charakterisierung der Zellen bei Luftexposition müsste demnach noch weitergeführt werden. Bisher wurde neben der Toxizität und pro-inflammatorischen Antwort nur die Sekretion von Surfactant durch die A549 Zellen nach Exposition an der Luft untersucht. In einer Studie wurde gezeigt, dass die A549 Zellen einen dünnen Surfactant-Film an der luftexponierten Seite ausbildeten. Es wurde berichtet, dass die Bildung dieses Films erst nach einiger Zeit (nach einem Tag an der

Luft) erfolgte, nachdem die Zellen vorher über 7 Tage kultiviert wurden bis sie sehr dicht waren (Blank et al., 2006). Dennoch kann in der hier vorliegenden Arbeit nicht ausgeschlossen werden, dass auch schon geringe Mengen an Surfactant sekretiert wurden und somit ein protektiver Effekt durch eine Opsonisierung der Partikel ausgelöst wurde. Eine Beeinträchtigung der Partikelaufnahme nach Exposition an der Luft oder durch das elektrische Feld konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden. Savi und Kollegen konnten für Makrophagen keine Beeinträchtigung der Phagozytose mit Polystyren Partikeln (200 nm) nach 2 h Exposition an der Luft und bei der Verwendung eines elektrischen Feldes feststellen (Savi et al., 2008). Brandenberger und Kollegen konnten ebenfalls die Aufnahme von Gold NP (15 nm) nach Exposition von A549 Zellen beobachten (Brandenberger et al., 2010). Die Effizienz der Aufnahme betrug 60 % bei der geringen Dosis (61 ng/cm<sup>2</sup>) und 20 % bei der höheren Dosis (561 ng/cm<sup>2</sup>). Generell ist es schwierig, die hier erhaltenen Daten mit den Daten aus der Literatur zu vergleichen, da es sich um unterschiedliche Expositionsmethoden handelt, die verschiedene Partikel, verschiedene Zellen, unterschiedliche Endpunkte und unterschiedliche deponierten Dosen verwendet haben. In einer Studie aus der eigenen Arbeitsgruppe konnte mit einer Kokultur aus BEAS-2B und differenzierten THP-1 Zellen nach Exposition mit 0,13 µg/cm<sup>2</sup> Flugasche eine erhöhte IL-8 Freisetzung ohne zytotoxische Effekte gemessen werden (Muelhopt et al., 2008). Brandenberger und Kollegen exponierten ein Tripelzellkulturmodell aus A549 Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen mit Gold NP (15 nm) mit dem ALICE Expositionssystem (s. Kap.1.4.2). Dabei konnte keine verstärkte Genexpression der Entzündungsmediatoren (TNF-α, IL-8 und iNOS) und der anti-oxidativen Enzyme HO-1 und SOD (Superoxiddismutase) sowie keine verstärkte Freisetzung der Zytokine TNF-α, IL-6, IL-8, IL-1β, GM-CSF, IL4, IL-10, IL-2, und IFN-γ festgestellt werden. Die deponierte Dosis lag bei 61 ng/cm<sup>2</sup> und 561 ng/cm<sup>2</sup>, was im Vergleich der deponierten Dosis aus der hier vorliegenden Arbeit um eine Größenordnung niedriger ist. Eine weitere Studie mit dem ALICE Expositionssystem verwendete agglomerierte ZnO Partikel (900 nm), die deutlich toxischer waren. Hierbei wurde mit A549 Zellen zum ersten Mal ein Vergleich zwischen submerser und ALI-Exposition mit einer vergleichbaren Dosis in beiden Systemen durchgeführt. Bei einer maximalen deponierten Dosis von 8 µg/cm<sup>2</sup> Zelloberfläche unter ALI Bedingungen konnte eine stärkere HO-1-Expression als mit 5 µg/cm<sup>2</sup> ZnO Partikeln in Suspension beobachtet werden. Dagegen war die IL-8 Expression nach Exposition mit der ZnO Suspension stärker als nach der ALI-Exposition (Lenz et al., 2009). Gründe für diese Unterschiede sind noch unbekannt. In der Studie von Brujni wurden A549 Zellen verwendet, die mit 4,5 µg/cm<sup>2</sup> Dieselrußpartikeln in einem Expositionssystem mit einem elektrischen Feld exponiert waren. Hierbei konnte eine erhöhte Freisetzung von IL-8 und LDH festgestellt werden (de Bruijne et al., 2009). In einer Studie bei der Lungenexplantate und primäre

alveoläre Makrophagen aus Schweinen und Menschen mit sekundären organischen Aerosole mittels einer Expositions-kammer im elektrischen Feld exponiert wurden, konnte zwar keine Zytotoxizität jedoch eine verstärkte Freisetzung von IL-8 und eine inhibierende Wirkung auf die Phagozytose der Makrophagen festgestellt werden. Diese Effekte konnten bereits nach einer einmaligen Exposition mit  $10^4$  Partikeln/cm<sup>3</sup> Luft für 2 h und 24 h Nachinkubation gemessen werden (Gaschen et al., 2010).

**Tab. 23 Angebotene Oberflächendosis unter submersen Bedingungen und an der Luft-Flüssigkeitsgrenzschicht von SiO<sub>2</sub>-12 und SiO<sub>2</sub>-50 nm NPn**

Nanopartikel	Submers (cm <sup>2</sup> /cm <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	Luft-/Flüssigkeit (ALI) (cm <sup>2</sup> /cm <sup>2</sup> ) <sup>a</sup> ,
SiO <sub>2</sub> -12 nm	31,2	157 ± 62
SiO <sub>2</sub> -50 nm	9,36	17 ± 6

<sup>a</sup> Oberflächendosis = cm<sup>2</sup> Partikeloberfläche / cm<sup>2</sup> Zelloberfläche

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es noch nicht viele Studien unter ALI-Bedingungen gibt, und dass es vor allem kaum Vergleiche zwischen submersen und ALI-Expositionssystemen durchgeführt wurden. Hierbei müsste systematisch mit Modellpartikeln gearbeitet werden, die zumindest unter submersen Bedingungen biologische Effekte induzieren. Es werden Studien benötigt, die reduziert auf wenige Parameter (Größe von monodispersen Partikeln und Dosis, verschiedene Agglomeratgrößen und Dosis, etc) in einem sehr gut charakterisierten zellulärem System auf die Endpunkte Aufnahme, Toxizität, pro-inflammatorische und anti-oxidative Antwort testen. Weiterhin ist es erforderlich, sowohl unter submersen als auch unter ALI-Bedingungen die Größenverteilung der Partikel miteinander zu vergleichen, denn dies könnte für die Aufnahme von Bedeutung sein. Diese Untersuchungen erfordern einen sehr hohen Aufwand und fehlen bislang komplett. Außerdem muss zusätzlich zur Massendosis auch die Partikelanzahldosis bestimmt werden, was bei der Exposition unter ALI-Bedingungen besser möglich ist als unter submersen Bedingungen. Die Angabe der Partikelanzahl stellt eine bessere Grundlage als die Angabe der Massendosis dar, weil damit auch Vergleiche zwischen verschiedenen Substanzen gemacht werden können. Außerdem zeigen Abschätzungen aus verschiedenen Studien, dass in der Lunge nur eine bestimmte Anzahl von Partikeln über die Jahre unabhängig von der angebotenen Partikelmenge überhaupt inhaliert werden kann (s. Kap 1.4.3). Deshalb wurde in dieser Arbeit auch die deponierte Agglomerat und Partikelanzahl bestimmt und mit diesen Werten verglichen (Tab. 24). Für beide Partikelsorten wurde die Agglomeratanzahl

hierbei aus den TEM Aufnahmen (siehe Kap 3.10.1) bestimmt. Zur Berechnung der Primärpartikelzahl wurden in dieser Arbeit monodispers verteilte Primärpartikel kugelförmiger Gestalt als Vereinfachung angenommen. Für die hier verwendeten SiO<sub>2</sub>-50 Partikel aus der Stöbersynthese ist diese Annahme gerechtfertigt (Comouth, 2012). Für die SiO<sub>2</sub>-12 nm NP aus der Flammensynthese beschreibt sie jedoch nicht die wahren Gegebenheiten. Da diese Partikel eine sehr breite und bimodale Monomerverteilung besitzen (Comouth, 2012) und sie einen beträchtlichen Anteil größerer Partikel enthalten, welche einen erheblichen Anteil an der deponierten Masse ausmachen, ist davon auszugehen, dass die tatsächliche Primärpartikelanzahl der SiO<sub>2</sub>-12 nm Partikel mit diesem Verfahren überschätzt wird. 12 nm große Partikel tragen möglicherweise nur zu einem sehr geringen Anteil zu der deponierten Masse bei. Dennoch muss davon ausgegangen werden, dass vor allem Partikel dieser Größenordnung einen Großteil der Primärpartikelanzahl ausmachen, und maßgeblich für die biologische Wirkung verantwortlich sein können. Mittels dieser Vereinfachung kann näherungsweise abgeschätzt werden Partikel im schlimmsten Fall deponiert wurden.

Unter realistischen Bedingungen werden 40 Partikel pro Tag bei durchschnittlicher Partikelbelastung und beim „Worst Case“ Szenario 6700 Partikel auf einer Lungenzelle deponiert. Im Vergleich dazu, sind die hier verwendeten Werte für die durchschnittliche Belastung um mehrere Größenordnungen ( $10\text{-}10^5$ ) höher, je nachdem ob man von der Primärpartikel- oder der Agglomeratanzahl ausgeht. Die in der vorliegenden Arbeit applizierte Partikelanzahl für die SiO<sub>2</sub>-50 nm Partikel war sogar um ein 1000-faches höher als die Tagesdosis beim „Worst Case“ Szenario. Unter der Annahme, dass die SiO<sub>2</sub>-12 NP nur aus 12 nm Partikeln bestehen, wurde in Tab. 24 die Anzahl der Primärpartikel berechnet. Hierbei zeigte sich, dass die Anzahl sogar um  $10^4$  Partikel größer war. Die Primärpartikelzahlen entsprechen eher einer Dauerexposition im „Worst Case“ Szenario von 80 Jahren ( $5,9 \times 10^7$ ). Unter der Annahme, dass ein Agglomerat einem größeren Partikel entspricht, wäre die Agglomeratanzahl auch um ein Vielfaches höher als die 40 Partikel (oder 40 Agglomerate) pro Tag. Da die akuten Effekte bei sehr hohen Partikelanzahlen, die selbst bei hohen Belastungsszenarien nicht erreicht werden, gemessen wurden, scheint die biologische Wirkung der amorphen SiO<sub>2</sub>-NP sehr gering zu sein und stellt vermutlich unter realen Bedingungen am Arbeitsplatz nur ein geringes Risiko dar. Allerdings müssen noch weitere Endpunkte wie Aufnahme und intrazelluläre Dosis untersucht werden. Die Verwendung von Kokulturen könnte eine weitere Sensitivitätssteigerung erreichen, die im Sinne der realitätsnahen Exposition ist. So konnten einige Studien zeigen, dass eine Kokultur aus Lungenepithelzellen und Makrophagen eine höhere Entzündungsreaktion als die entsprechenden Monokulturen aufweisen (Tao and Kobzik, 2002, Wottrich, 2003, Diabate et al., 2008, Fritsch-Decker, 2008).

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass die deponierte Partikelanzahl, Masse, und Oberfläche mit Hilfe der ALI-Depositionsanlage bestimmt werden können. Um verschiedene Partikelmengen zu deponieren, kann die Expositionsdauer variiert werden, sodass Dosis-Wirkungsbeziehungen mit subtoxischen und toxischen Dosen untersucht werden können. In dieser Arbeit wurden zwar agglomerierte Partikel auf den Zellen deponiert, es ist aber auch möglich, aus monodispersen Suspensionen über das Versprühen mit dem Elektrospray Einzelpartikel auf die Zellen aufzubringen (Daten nicht gezeigt). Durch Steigerung der Depositionseffizienz mittels der elektrostatischen Aufladung wurde es sogar möglich, Partikelmassen mit den Zellen in Kontakt zu bringen, die auch unter submersen Bedingungen in den meisten Studien verwendet werden ( $10\text{-}80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Es ist jetzt möglich, in einem weiten Bereich von wenigen Partikeln bis zu  $10^8$  Partikeln pro Zelle, die biologische Wirkung zu ermitteln.

**Tab. 24 Angaben zur gesamten deponierten Masse und Agglomerat-/Partikelanzahl bei der Exposition an der Luft-Flüssigkeitsgrenzschicht**

Nanopartikel	Deponierte Masse ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) <sup>(a)</sup>	Deposition (Anzahl / $\text{cm}^2$ ) <sup>(c)</sup>	Deposition (Anzahl /Zelle) <sup>(c)</sup>
SiO <sub>2</sub> 12 nm	79 ± 31	Agglomerate <sup>(a)</sup> $2 \times 10^8 \pm 8 \times 10^7$	Agglomerate $1,5 \times 10^3 \pm 6 \times 10^2$
		Primärpartikel $4,4 \times 10^{13} \pm 2 \times 10^{13}$ <sup>(b)</sup>	Primärpartikel $3,4 \times 10^8 \pm 1 \times 10^8$
SiO <sub>2</sub> 50 nm	117 ± 46	Agglomerate <sup>(a)</sup> $1,4 \times 10^9 \pm 3 \times 10^8$	Agglomerate $1,1 \times 10^4 \pm 2 \times 10^3$
		Primärpartikel $8 \times 10^{11} \pm 3 \times 10^{11}$ <sup>(b)</sup>	Primärpartikel $6,1 \times 10^6 \pm 2 \times 10^6$

<sup>(a)</sup> Angaben aus der Dissertation von A. Comouth wurden durch TEM Aufnahmen bestimmt. Die Größenverteilung der SiO<sub>2</sub>-12 nm Agglomerate betrug 50 nm bis 2  $\mu\text{m}$  und der SiO<sub>2</sub>-50 nm Agglomerate 40 nm bis 1  $\mu\text{m}$  (Comouth, 2012).

<sup>(b)</sup> Die Berechnung der Primärpartikelzahl bezieht sich auf die berechnete deponierte Masse und unter der Annahme, dass alle Partikel kugelförmig und einen 12 nm (bzw. 52 nm, ermittelt durch SMPS Messungen) Durchmesser (d) besitzen. Dies entspricht jedoch nicht der wahren Größenverteilung.

(1) Partikelanzahl  $N = \text{deponierte Masse} / \text{Masse eines Partikels}$

(2) Deponierte Masse =  $79 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $7,9 \times 10^{-5} \text{ g} / \text{cm}^2$  (bzw.  $117 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $1,17 \times 10^{-4} \text{ g} / \text{cm}^2$ )

Die Masse eines Partikels wurde aus dem Volumen des Partikels ( $V_p$ ) und der Dichte ( $\rho$ ) berechnet, und ist bereits in Kap.2.2.2 (Formel 4) beschrieben:

$$(3) \text{ Masse eines Partikels } m_p = V_p \times \rho$$

$$(4) V_p = 1/6 \times \pi \times (d)^3$$

$$(5) \rho = 2 \text{ g/cm}^3$$

$$(6) m_p = 1/6 \times \pi \times (1,2 \times 10^{-6} \text{ cm})^3 \times 2 \text{ g/cm}^3 \text{ (bzw. } 1/6 \times \pi \times (5,2 \times 10^{-6} \text{ cm})^3 \times 2 \text{ g/cm}^3)$$

$$(7) m_p = 1,8 \times 10^{-18} \text{ g (bzw. } 1,47 \times 10^{-16} \text{ g)}$$

$$(1) N = 7,9 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^2 / 1,8 \times 10^{-18} \text{ g} = \underline{4,4 \times 10^{13} / \text{cm}^2}$$

$$\text{(bzw. } 1,17 \times 10^{-4} \text{ g/cm}^2 / 1,47 \times 10^{-16} \text{ g} = \underline{8,0 \times 10^{11} / \text{cm}^2})$$

Bei 130000 Zellen /cm<sup>2</sup> entspricht die Partikelanzahl pro Zelle:  $N / \text{Zelle} = 3,4 \times 10^8$  (bzw.  $6,1 \times 10^6$ )

<sup>(c)</sup> Deposition der Primärpartikel sowie Agglomerate pro Zelle wurden aus der Partikel- bzw. Agglomeratanzahl / cm<sup>2</sup> (entnommen aus mittlerer Spalte der Tab. 24) berechnet, wobei ca. 130000 Zellen /cm<sup>2</sup> angenommen wurden.

## Literaturverzeichnis

- ABNET, C. C., FREEDMAN, N. D., KAMANGAR, F., LEITZMANN, M. F., HOLLENBECK, A. R. & SCHATZKIN, A. 2009. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of gastric and oesophageal adenocarcinomas: results from a cohort study and a meta-analysis. *Br J Cancer*, 100, 551-7.
- AFAQ, F., ABIDI, P., MATIN, R. & RAHMAN, Q. 1998. Cytotoxicity, pro-oxidant effects and antioxidant depletion in rat lung alveolar macrophages exposed to ultrafine titanium dioxide. *J Appl Toxicol*, 18, 307-12.
- AGARWAL, P., HALLA, J., MCLELANDA, C., DOBROVOLSKAIA, M. & MCNEIL, S. 2009. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv Drug Deliv Rev*, 61, 428-437.
- AGRAWAL, A., CHOUDHARY, D., UPRETI, M., RATH, P. C. & KALE, R. K. 2001. Radiation induced oxidative stress: I. Studies in Ehrlich solid tumor in mice. *Mol Cell Biochem*, 223, 71-80.
- AKHTAR, M. J., AHAMED, M., KUMAR, S., SIDDIQUI, H., PATIL, G., ASHQUIN, M. & AHMAD, I. 2010. Nanotoxicity of pure silica mediated through oxidant generation rather than glutathione depletion in human lung epithelial cells. *Toxicology*, 276, 95-102.
- AL-RAWI, M., DIABATE, S. & WEISS, C. 2011. Uptake and intracellular localization of submicron and nano-sized SiO<sub>2</sub> particles in HeLa cells. *Arch Toxicol*.
- ALAM, J., WICKS, C., STEWART, D., GONG, P., TOUCHARD, C., OTTERBEIN, S., CHOI, A. M., BUROW, M. E. & TOU, J. 2000. Mechanism of heme oxygenase-1 gene activation by cadmium in MCF-7 mammary epithelial cells. Role of p38 kinase and Nrf2 transcription factor. *J Biol Chem*, 275, 27694-702.
- ALBANESE, A. & CHAN, W. C. 2011. Effect of gold nanoparticle aggregation on cell uptake and toxicity. *ACS Nano*, 5, 5478-89.
- ALI, M. 2011. *Untersuchung von SiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln auf Toxizität und Aufnahme in Makrophagen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopie-basierten Screenings*. Diplomarbeit, Karlsruher Institut für Technologie.
- ANDERSON, M. E. 1998. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem Biol Interact*, 111-112, 1-14.
- ANDERSON, P. 2008. Post-transcriptional control of cytokine production. *Nat Immunol*, 9, 353-9.
- APOPA, P. L., QIAN, Y., SHAO, R., GUO, N. L., SCHWEGLER-BERRY, D., PACURARI, M., PORTER, D., SHI, X., VALLYATHAN, V., CASTRANOVA, V. & FLYNN, D. C. 2009. Iron oxide nanoparticles induce human microvascular endothelial cell permeability through reactive oxygen species production and microtubule remodeling. *Part Fibre Toxicol*, 6, 1.
- ARTS, J. H., MUIJSER, H., DUISTERMAAT, E., JUNKER, K. & KUPER, C. F. 2007. Five-day inhalation toxicity study of three types of synthetic amorphous silicas in Wistar rats and post-exposure evaluations for up to 3 months. *Food Chem Toxicol*, 45, 1856-67.
- ASHER, G., LOTEM, J., COHEN, B., SACHS, L. & SHAUL, Y. 2001. Regulation of p53 stability and p53-dependent apoptosis by NADH quinone oxidoreductase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 1188-93.

- ASSIER, E., BOISSIER, M. C. & DAYER, J. M. 2010. Interleukin-6: from identification of the cytokine to development of targeted treatments. *Joint Bone Spine*, 77, 532-6.
- AUFDERHEIDE, M. & MOHR, U. 2004. A modified CULTEX system for the direct exposure of bacteria to inhalable substances. *Exp Toxicol Pathol*, 55, 451-4.
- AUGUSTYNSKI, J. 1993. The role of the surface intermediates in the photoelectrochemical behaviour of anatase and rutile TiO<sub>2</sub>. *Electrochimica Acta*, 38, 43-46.
- BAGCHI, D., BAGCHI, M., HASSOUN, E. A. & STOHS, S. J. 1996. Cadmium-induced excretion of urinary lipid metabolites, DNA damage, glutathione depletion, and hepatic lipid peroxidation in Sprague-Dawley rats. *Biol Trace Elem Res*, 52, 143-54.
- BERMUDEZ, E., MANGUM, J. B., ASGHARIAN, B., WONG, B. A., REVERDY, E. E., JANSZEN, D. B., HEXT, P. M., WARHEIT, D. B. & EVERITT, J. I. 2002. Long-term pulmonary responses of three laboratory rodent species to subchronic inhalation of pigmentary titanium dioxide particles. *Toxicol Sci*, 70, 86-97.
- BERNTSEN, P., PARK, C. Y., ROTHEN-RUTISHAUSER, B., TSUDA, A., SAGER, T. M., MOLINA, R. M., DONAGHEY, T. C., ALENCAR, A. M., KASAHARA, D. I., ERICSSON, T., MILLET, E. J., SWENSON, J., TSCHUMPERLIN, D. J., BUTLER, J. P., BRAIN, J. D., FREDBERG, J. J., GEHR, P. & ZHOU, E. H. 2010. Biomechanical effects of environmental and engineered particles on human airway smooth muscle cells. *J R Soc Interface*, 7 Suppl 3, S331-40.
- BERRY, C. E. & HARE, J. M. 2004. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol*, 555, 589-606.
- BERRY, J. P., ARNOUX, B., STANISLAS, G., GALLE, P. & CHRETIEN, J. 1977. A microanalytic study of particles transport across the alveoli: role of blood platelets. *Biomedicine*, 27, 354-7.
- BESTAK, R., BARNETSON, R. S., NEARN, M. R. & HALLIDAY, G. M. 1995. Sunscreen protection of contact hypersensitivity responses from chronic solar-simulated ultraviolet irradiation correlates with the absorption spectrum of the sunscreen. *J Invest Dermatol*, 105, 345-51.
- BEYER, R. E., SEGURA-AGUILAR, J., DI BERNARDO, S., CAVAZZONI, M., FATO, R., FIORENTINI, D., GALLI, M. C., SETTI, M., LANDI, L. & LENA, G. 1996. The role of DT-diaphorase in the maintenance of the reduced antioxidant form of coenzyme Q in membrane systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 2528-32.
- BLANK, F., ROTHEN-RUTISHAUSER, B. M., SCHURCH, S. & GEHR, P. 2006. An optimized in vitro model of the respiratory tract wall to study particle cell interactions. *J Aerosol Med*, 19, 392-405.
- BMBF 2009. nanoDE.Report Status quo der Nanotechnologie in Deutschland. *Bundesministerium für Bildung und Forschung*.
- BONVALLOT, V., BAEZA-SQUIBAN, A., BAULIG, A., BRULANT, S., BOLAND, S., MUZEAU, F., BAROUKI, R. & MARANO, F. 2001. Organic compounds from diesel exhaust particles elicit a proinflammatory response in human airway epithelial cells and induce cytochrome p450 1A1 expression. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 25, 515-21.
- BOOTHMAN, D. A., MEYERS, M., FUKUNAGA, N. & LEE, S. W. 1993. Isolation of x-ray-inducible transcripts from radioresistant human melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 7200-4.
- BOYA, P. & KROEMER, G. 2008. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene*, 27, 6434-51.

- BRANDENBERGER, C., ROTHEN-RUTISHAUSER, B., MUHLFELD, C., SCHMID, O., FERRON, G. A., MAIER, K. L., GEHR, P. & LENZ, A. G. 2010. Effects and uptake of gold nanoparticles deposited at the air-liquid interface of a human epithelial airway model. *Toxicol Appl Pharmacol*, 242, 56-65.
- BRUNNER, T. J., WICK, P., MANSER, P., SPOHN, P., GRASS, R. N., LIMBACH, L. K., BRUININK, A. & STARK, W. J. 2006. In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environ Sci Technol*, 40, 4374-81.
- BUCKLEY, B. J. & BASSETT, D. J. 1987. Pulmonary cadmium oxide toxicity in the rat. *J Toxicol Environ Health*, 21, 233-50.
- CAI, R., KUBOATA, Y., SHUIN, T., HASHIMOTO, K. & FUJISHIMA, A. 1992a. Induction of Cytotoxicity by Photo-excited TiO<sub>2</sub> Particles. *Cancer Res*, 52.
- CAI, R., KUBOTA, Y., SHUIN, T., SAKAI, H., HASHIMOTO, K. & FUJISHIMA, A. 1992b. Induction of cytotoxicity by photoexcited TiO<sub>2</sub> particles. *Cancer Res*, 52, 2346-8.
- CALVERT, G. M., RICE, F. L., BOIANO, J. M., SHEEHY, J. W. & SANDERSON, W. T. 2003. Occupational silica exposure and risk of various diseases: an analysis using death certificates from 27 states of the United States. *Occup Environ Med*, 60, 122-9.
- CARBALLAL, S., RADI, R., KIRK, M. C., BARNES, S., FREEMAN, B. A. & ALVAREZ, B. 2003. Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Biochemistry*, 42, 9906-14.
- CASALINO, E., SBLANO, C. & LANDRISCINA, C. 1997. Enzyme activity alteration by cadmium administration to rats: the possibility of iron involvement in lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys*, 346, 171-9.
- CASSEL, S. L., EISENBARTH, S. C., IYER, S. S., SADLER, J. J., COLEGIO, O. R., TEPHLY, L. A., CARTER, A. B., ROTHMAN, P. B., FLAVELL, R. A. & SUTTERWALA, F. S. 2008. The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 9035-40.
- CASTRANOVA, V. 2004. Signaling pathways controlling the production of inflammatory mediators in response to crystalline silica exposure: role of reactive oxygen/nitrogen species. *Free Radic Biol Med*, 37, 916-25.
- CEDERVALL, T., LYNCH, I., FOY, M., BERGGARD, T., DONNELLY, S. C., CAGNEY, G., LINSE, S. & DAWSON, K. A. 2007. Detailed identification of plasma proteins adsorbed on copolymer nanoparticles. *Angew Chem Int Ed Engl*, 46, 5754-6.
- CHEN, H. W., SU, S. F., CHIEN, C. T., LIN, W. H., YU, S. L., CHOU, C. C., CHEN, J. J. & YANG, P. C. 2006. Titanium dioxide nanoparticles induce emphysema-like lung injury in mice. *FASEB J*, 20, 2393-5.
- CHEN, Z., MENG, H., HUI, Y., GENGMEI, X., CHUNYING, C., FENG, Z., YUN, W., CHENGCHENG, Z. & YULIANG, Z. 2007. Identification of target organs of copper nanoparticles with ICP-MS technique. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 272, 599-603.
- CHITHRANI, D. B. 2010. Intracellular uptake, transport, and processing of gold nanostructures. *Mol Membr Biol*, 27, 299-311.
- CHO, E. C., GLAUS, C., CHEN, J., WELCH, M. J. & XIA, Y. 2010. Inorganic nanoparticle-based contrast agents for molecular imaging. *Trends Mol Med*, 16, 561-73.
- CHO, W. S., CHOI, M., HAN, B. S., CHO, M., OH, J., PARK, K., KIM, S. J., KIM, S. H. & JEONG, J. 2007a. Inflammatory mediators induced by intratracheal instillation of ultrafine amorphous silica particles. *Toxicol Lett*, 175, 24-33.

- CHO, Y.-S., YI, G.-R., CHUNG, Y. S., PARK, S. B. & YANG, S.-M. 2007b. Complex colloidal microclusters from aerosol droplets. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 23, 12079-85.
- CHRISTMAN, J. W., LANCASTER, L. H. & BLACKWELL, T. S. 1998. Nuclear factor kappa B: a pivotal role in the systemic inflammatory response syndrome and new target for therapy. *Intensive Care Med*, 24, 1131-8.
- CLIFT, M. J., BHATTACHARJEE, S., BROWN, D. M. & STONE, V. 2010. The effects of serum on the toxicity of manufactured nanoparticles. *Toxicol Lett*, 198, 358-65.
- COLLART, M. A., BAEUERLE, P. & VASSALLI, P. 1990. Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B. *Mol Cell Biol*, 10, 1498-506.
- COMOUTH, A. 2012. *Toxikologische Untersuchungen synthetischer Nanopartikel auf Lungenzellen bei kontrollierter Deposition an der Luft-/ Flüssigkeitsgrenzschicht*. Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie.
- CONNER, S. & SCHMID, S. 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 422(6927), 37-44.
- CROSS, C. E., VAN DER VLIET, A., O'NEILL, C. A., LOUIE, S. & HALLIWELL, B. 1994. Oxidants, antioxidants, and respiratory tract lining fluids. *Environ Health Perspect*, 102 Suppl 10, 185-91.
- CUI, Y., LIU, H., ZHOU, M., DUAN, Y., LI, N., GONG, X., HU, R., HONG, M. & HONG, F. 2011. Signaling pathway of inflammatory responses in the mouse liver caused by TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *J Biomed Mater Res A*, 96, 221-9.
- DATTA, S. R., DUDEK, H., TAO, X., MASTERS, S., FU, H., GOTOH, Y. & GREENBERG, M. E. 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 91, 231-41.
- DE BRUIJNE, K., EBERSVILLER, S., SEXTON, K. G., LAKE, S., LEITH, D., GOODMAN, R., JETTERS, J., WALTERS, G. W., DOYLE-EISELE, M., WOODSIDE, R., JEFFRIES, H. E. & JASPERS, I. 2009. Design and testing of Electrostatic Aerosol in Vitro Exposure System (EAVES): an alternative exposure system for particles. *Inhal Toxicol*, 21, 91-101.
- DENG, Z. J., LIANG, M., MONTEIRO, M., TOTH, I. & MINCHIN, R. F. 2011. Nanoparticle-induced unfolding of fibrinogen promotes Mac-1 receptor activation and inflammation. *Nat Nanotechnol*, 6, 39-44.
- DENNINGER, J. W. & MARLETTA, M. A. 1999. Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta*, 1411, 334-50.
- DIABATE, S., MULHOPT, S., PAUR, H. R. & KRUG, H. F. 2008. The response of a co-culture lung model to fine and ultrafine particles of incinerator fly ash at the air-liquid interface. *Altern Lab Anim*, 36, 285-98.
- DINERMAN, J. L., LOWENSTEIN, C. J. & SNYDER, S. H. 1993. Molecular mechanisms of nitric oxide regulation. Potential relevance to cardiovascular disease. *Circ Res*, 73, 217-22.
- DINKOVA-KOSTOVA, A. T., HOLTZCLAW, W. D., COLE, R. N., ITOH, K., WAKABAYASHI, N., KATOH, Y., YAMAMOTO, M. & TALALAY, P. 2002. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 11908-13.
- DOBROVOLSKAIA, M. A. & MCNEIL, S. E. 2007. Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nat Nanotechnol*, 2, 469-78.

- DOCHERTY, J. C., SCHACTER, B. A., FIRNEISZ, G. D. & BROWN, S. B. 1984. Mechanism of action of heme oxygenase. A study of heme degradation to bile pigment by  $^{18}O$  labeling. *J Biol Chem*, 259, 13066-9.
- DOCKERY, D. W., CUNNINGHAM, J., DAMOKOSH, A. I., NEAS, L. M., SPENGLER, J. D., KOUTRAKIS, P., WARE, J. H., RAIZENNE, M. & SPEIZER, F. E. 1996. Health effects of acid aerosols on North American children: respiratory symptoms. *Environ Health Perspect*, 104, 500-5.
- DONALDSON, K., BORM, P. J., OBERDORSTER, G., PINKERTON, K. E., STONE, V. & TRAN, C. L. 2008. Concordance between in vitro and in vivo dosimetry in the proinflammatory effects of low-toxicity, low-solubility particles: the key role of the proximal alveolar region. *Inhal Toxicol*, 20, 53-62.
- DOSTERT, C., PETRILLI, V., VAN BRUGGEN, R., STEELE, C., MOSSMAN, B. T. & TSCHOPP, J. 2008. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science*, 320, 674-7.
- DRESCHER, D., ORTS-GIL, G., LAUBE, G., NATTE, K., VEH, R., ÖSTERLE, W. & KNEIPP, J. 2011. Toxicity of amorphous silica nanoparticles on eukaryotic cell model is determined by particle agglomeration and serum protein adsorption effects. *Anal Bioanal Chem*, 400, 1367-1373.
- DRISCOLL, K. E., DEYO, L. C., CARTER, J. M., HOWARD, B. W., HASSENBEIN, D. G. & BERTRAM, T. A. 1997. Effects of particle exposure and particle-elicited inflammatory cells on mutation in rat alveolar epithelial cells. *Carcinogenesis*, 18, 423-30.
- DUNFORD, R., SALINARO, A., CAI, L., SERPONE, N., HORIKOSHI, S., HIDAKA, H. & KNOWLAND, J. 1997. Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen ingredients. *FEBS Lett*, 418, 87-90.
- DUTTA, D., SUNDARAM, S. K., TEEGUARDEN, J. G., RILEY, B. J., FIFIELD, L. S., JACOBS, J. M., ADDLEMAN, S. R., KAYSEN, G. A., MOUDGIL, B. M. & WEBER, T. J. 2007. Adsorbed proteins influence the biological activity and molecular targeting of nanomaterials. *Toxicol Sci*, 100, 303-15.
- EPA 1996. Air quality criteria for particulate matter. *Office of Research and Development*, III.
- EPA 2009. Nanomaterial case studies: Nanoscale Titanium Dioxide in Water Treatment and in Topical Sunscreens. *United States Environmental Protection Agency*
- FASANO, M., CURRY, S., TERRENO, E., GALLIANO, M., FANALI, G., NARCISO, P., NOTARI, S. & ASCENZI, P. 2005. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB Life*, 57, 787-96.
- FERIN, J., OBERDORSTER, G. & PENNEY, D. P. 1992. Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 6, 535-42.
- FORMAN, H. J. & TORRES, M. 2002. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am J Respir Crit Care Med*, 166, S4-8.
- FRITSCH-DECKER, S. 2008. *Partikelexpositionen von Zellkulturen: Untersuchungen zur Rolle von Lipidmediatoren bei der inflammatorischen Antwort*. Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie.
- FRITSCH-DECKER, S., BOTH, T., MULHOPT, S., PAUR, H. R., WEISS, C. & DIABATE, S. 2011. Regulation of the arachidonic acid mobilization in macrophages by combustion-derived particles. *Part Fibre Toxicol*, 8, 23.
- FUBINI, B. & HUBBARD, A. 2003. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radic Biol Med*, 34, 1507-16.

- FURCHGOTT, R. F. & ZAWADZKI, J. V. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288, 373-6.
- GAESTEL, M. 2006. MAPKAP kinases - MKs - two's company, three's a crowd. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 120-30.
- GAESTEL, M., KOTLYAROV, A. & KRACHT, M. 2009. Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation. *Nat Rev Drug Discov*, 8, 480-99.
- GASCHEN, A., LANG, D., KALBERER, M., SAVI, M., GEISER, T., GAZDHAR, A., LEHR, C. M., BUR, M., DOMMEN, J., BALTENSBERGER, U. & GEISER, M. 2010. Cellular responses after exposure of lung cell cultures to secondary organic aerosol particles. *Environ Sci Technol*, 44, 1424-30.
- GEISER, M., ROTHEN-RUTISHAUSER, B., KAPP, N., SCHURCH, S., KREYLING, W., SCHULZ, H., SEMMLER, M., IM HOF, V., HEYDER, J. & GEHR, P. 2005. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect*, 113, 1555-60.
- GERLOFF, K., ALBRECHT, C., BOOTS, A., FOERSTER, I. & SCHINS, R. 2009. Cytotoxicity and oxidative DNA damage by nanoparticles in human intestinal Caco-2 cells. *Nanotoxicology* 3, 355-364.
- GHOSH, N., CHAKI, R., MANDAL, M. & MANDAL, S. C. 2010. COX-2 as a target for cancer chemotherapy. *Pharmacol Rep*, 62, 233-244.
- GOLDSMITH, D. F., GUIDOTTI, T. L. & JOHNSTON, D. R. 1982. Does occupational exposure to silica cause lung cancer? *Am J Ind Med*, 3, 423-40.
- GOW, A. J., CHEN, Q., HESS, D. T., DAY, B. J., ISCHIROPOULOS, H. & STAMLER, J. S. 2002. Basal and stimulated protein S-nitrosylation in multiple cell types and tissues. *J Biol Chem*, 277, 9637-40.
- GREEN, D. L., LIN, J. S., LAM, Y.-F., HU, M. Z. C., SCHAEFER, D. W. & HARRIS, M. T. 2003. Size, volume fraction, and nucleation of Stober silica nanoparticles. *Journal of colloid and interface science*, 266, 346-58.
- GUILLOT, L., MEDJANE, S., LE-BARILLEC, K., BALLOY, V., DANIEL, C., CHIGNARD, M. & SI-TAHAR, M. 2004. Response of human pulmonary epithelial cells to lipopolysaccharide involves Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent signaling pathways: evidence for an intracellular compartmentalization of TLR4. *J Biol Chem*, 279, 2712-8.
- GURR, J. R., WANG, A. S., CHEN, C. H. & JAN, K. Y. 2005. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology*, 213, 66-73.
- HAMID, Q., SPRINGALL, D. R., RIVEROS-MORENO, V., CHANEZ, P., HOWARTH, P., REDINGTON, A., BOUSQUET, J., GODARD, P., HOLGATE, S. & POLAK, J. M. 1993. Induction of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet*, 342, 1510-3.
- HANSEL, T. T., KHARITONOV, S. A., DONNELLY, L. E., ERIN, E. M., CURRIE, M. G., MOORE, W. M., MANNING, P. T., RECKER, D. P. & BARNES, P. J. 2003. A selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase inhibits exhaled breath nitric oxide in healthy volunteers and asthmatics. *FASEB J*, 17, 1298-300.
- HANSEN, L., POULSEN, O. & NEXØ, B. 1997. INFLAMMATORY POTENTIAL OF ORGANIC DUST COMPONENTS AND CHEMICALS MEASURED BY IL-8 SECRETION FROM HUMAN EPITHELIAL CELL LINE A549 IN VITRO. *Ann Agric Environ Med* 4, 27-33.
- HARLEY, J. D. & MARGOLIS, J. 1961. Haemolytic activity of colloidal silica. *Nature*, 189, 1010-1.

- HARRIS, J., HARTMAN, M., ROCHE, C., ZENG, S. G., O'SHEA, A., SHARP, F. A., LAMBE, E. M., CREAGH, E. M., GOLENBOCK, D. T., TSCHOPP, J., KORNFELD, H., FITZGERALD, K. A. & LAVELLE, E. C. 2011. Autophagy Controls IL-1 Secretion by Targeting Pro-IL-1 for Degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 9587-9597.
- HASHIMOTO, K., IRIE, H. & FUJISHIMA, A. 2005. TiO<sub>2</sub> Photocatalysis: A Historical Overview and Future Prospects. *Japanese Journal of Applied Physics*, 44 8269–8285.
- HATADA, E. N., KRAPPMANN, D. & SCHEIDEREIT, C. 2000. NF-kappaB and the innate immune response. *Curr Opin Immunol*, 12, 52-8.
- HEINRICH, P. C., BEHRMANN, I., MULLER-NEWEN, G., SCHAPER, F. & GRAEVE, L. 1998. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *The Biochemical journal*, 334 ( Pt 2), 297-314.
- HEMPEL, S. L., BUETTNER, G. R., O'MALLEY, Y. Q., WESSELS, D. A. & FLAHERTY, D. M. 1999. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med*, 27, 146-59.
- HERD, H. L., MALUGIN, A. & GHANDEHARI, H. 2011. Silica nanoconstruct cellular toleration threshold in vitro. *J Control Release*, 153, 40-8.
- HINDERLITER, P. M., MINARD, K. R., ORR, G., CHRISLER, W. B., THRALL, B. D., POUNDS, J. G. & TEEGUARDEN, J. G. 2010. ISDD: A computational model of particle sedimentation, diffusion and target cell dosimetry for in vitro toxicity studies. *Part Fibre Toxicol*, 7, 36.
- HIRSCH, L. R., STAFFORD, R. J., BANKSON, J. A., SERSHEN, S. R., RIVERA, B., PRICE, R. E., HAZLE, J. D., HALAS, N. J. & WEST, J. L. 2003. Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 13549–13554.
- HNIZDO, E. & SLUIS-CREMER, G. K. 1993. Risk of silicosis in a cohort of white South African gold miners. *Am J Ind Med*, 24, 447-57.
- HOBBS, A. J., HIGGS, A. & MONCADA, S. 1999. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 39, 191-220.
- HOET, P. H., BRUSKE-HOHLFELD, I. & SALATA, O. V. 2004. Nanoparticles - known and unknown health risks. *J Nanobiotechnology*, 2, 12.
- HUSSAIN, S., THOMASSEN, L. C., FERECATU, I., BOROT, M. C., ANDREAU, K., MARTENS, J. A., FLEURY, J., BAEZA-SQUIBAN, A., MARANO, F. & BOLAND, S. 2010. Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells. *Part Fibre Toxicol*, 7, 10.
- IARC 1997. Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Silica, some silicates, coal dust and para-aramid fibrils. 68, 1-475.
- IBALD-MULLI, A., STIEBER, J., WICHMANN, H. E., KOENIG, W. & PETERS, A. 2001. Effects of air pollution on blood pressure: a population-based approach. *Am J Public Health*, 91, 571-7.
- ICHINOSE, M., SUGIURA, H., YAMAGATA, S., KOARAI, A. & SHIRATO, K. 2000. Increase in reactive nitrogen species production in chronic obstructive pulmonary disease airways. *Am J Respir Crit Care Med*, 162, 701-6.

- IGAZ, P., HORVATH, A., HORVATH, B., SZALAI, C., PALLINGER, E., RAJNAVOLGYI, E., TOTH, S., ROSE-JOHN, S. & FALUS, A. 2000. Soluble interleukin-6 receptor (sIL-6R) makes IL-6R negative T cell line respond to IL-6; it inhibits TNF production. *Immunol Lett*, 71, 143-8.
- INOKI, K., LI, Y., ZHU, T., WU, J. & GUAN, K. L. 2002. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol*, 4, 648-57.
- ITANO, H. A. & HIROTA, T. 1985. A two-molecule mechanism of haem degradation. *Biochem J*, 226, 767-71.
- ITOH, K., WAKABAYASHI, N., KATOH, Y., ISHII, T., IGARASHI, K., ENGEL, J. D. & YAMAMOTO, M. 1999. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev*, 13, 76-86.
- JIANG, W., KIM, B. Y. S., RUTKA, J. T. & CHAN, W. C. W. 2008. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nature nanotechnology*, 3, 145-50.
- JIMENEZ, L. A., DROST, E. M., GILMOUR, P. S., RAHMAN, I., ANTONICELLI, F., RITCHIE, H., MACNEE, W. & DONALDSON, K. 2002. PM(10)-exposed macrophages stimulate a proinflammatory response in lung epithelial cells via TNF- $\alpha$ . *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 282, L237-48.
- JIN, C. Y., ZHU, B. S., WANG, X. F. & LU, Q. H. 2008. Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells. *Chem Res Toxicol*, 21, 1871-7.
- JOHNSTON, C. J., DRISCOLL, K. E., FINKELSTEIN, J. N., BAGGS, R., O'REILLY, M. A., CARTER, J., GELEIN, R. & OBERDORSTER, G. 2000. Pulmonary chemokine and mutagenic responses in rats after subchronic inhalation of amorphous and crystalline silica. *Toxicol Sci*, 56, 405-13.
- JOHNSTON, H., HUTCHISON, G., CHRISTENSEN, F., PETERS, S., HANKIN, S. & STONE, V. 2009. Identification of the mechanisms that drive the toxicity of TiO<sub>2</sub> particulates: the contribution of physicochemical characteristics. *Part Fibre Toxicol*, 6.
- JORDAN, A., SCHOLZ, R., WUST, P., FÄHLING, H. & FELIX, R. 1999. Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 201 413-419.
- KANG, J. L., MOON, C., LEE, H. S., LEE, H. W., PARK, E. M., KIM, H. S. & CASTRANOVA, V. 2008. Comparison of the biological activity between ultrafine and fine titanium dioxide particles in RAW 264.7 cells associated with oxidative stress. *J Toxicol Environ Health A*, 71, 478-85.
- KANG, S. J., KIM, B. M., LEE, Y. J., HONG, S. H. & CHUNG, H. W. 2009. Titanium dioxide nanoparticles induce apoptosis through the JNK/p38-caspase-8-Bid pathway in phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 386, 682-7.
- KARLSSON, H. L., CRONHOLM, P., GUSTAFSSON, J. & MOLLER, L. 2008. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem Res Toxicol*, 21, 1726-32.
- KARLSSON, H. L., GUSTAFSSON, J., CRONHOLM, P. & MOLLER, L. 2009. Size-dependent toxicity of metal oxide particles--a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol Lett*, 188, 112-8.
- KASPER, J., HERMANN, M. I., BANTZ, C., MASKOS, M., STAUBER, R., POHL, C., UNGER, R. E. & KIRKPATRICK, J. C. 2011. Inflammatory and cytotoxic responses of an alveolar-capillary coculture model to silica nanoparticles: comparison with conventional monocultures. *Part Fibre Toxicol*, 8, 6.

- KATO, T., YASHIRO, T., MURATA, Y., HERBERT, D. C., OSHIKAWA, K., BANDO, M., OHNO, S. & SUGIYAMA, Y. 2003. Evidence that exogenous substances can be phagocytized by alveolar epithelial cells and transported into blood capillaries. *Cell Tissue Res*, 311, 47-51.
- KAUR, H. & HALLIWELL, B. 1994. Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett*, 350, 9-12.
- KAWATA, M. & SUZUKI, K. T. 1983. Relation between metal and glutathione concentrations in mouse liver after cadmium, zinc or copper loading. *Toxicol Lett*, 15, 131-7.
- KIM, S. C., CHEN, D. R., QI, C., GELEIN, R. M., FINKELSTEIN, J. N., ELDER, A., BENTLEY, K., OBERDORSTER, G. & PUI, D. Y. 2010. A nanoparticle dispersion method for in vitro and in vivo nanotoxicity study. *Nanotoxicology*, 4, 42-51.
- KITTLER, S. 2010. The influence of proteins on the dispersability and cell-biological activity of silver nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry* 20.
- KNOWLES, R. G. & MONCADA, S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*, 298 ( Pt 2), 249-58.
- KOBAYASHI, A., KANG, M. I., OKAWA, H., OHTSUJI, M., ZENKE, Y., CHIBA, T., IGARASHI, K. & YAMAMOTO, M. 2004. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol*, 24, 7130-9.
- KONCZOL, M., EBELING, S., GOLDENBERG, E., TREUDE, F., GMINSKI, R., GIERE, R., GROBETY, B., ROTHEN-RUTISHAUSER, B., MERFORT, I. & MERSCH-SUNDERMANN, V. 2011. Cytotoxicity and Genotoxicity of Size-Fractionated Iron Oxide (Magnetite) in A549 Human Lung Epithelial Cells: Role of ROS, JNK, and NF- $\kappa$ B. *Chemical Research in Toxicology*.
- KREYLING, W., TUCH, T., PETERS, A., PITZ, M., HEINRICH, J., STOLZEL, M., CYRYS, J., HEYDERA, J. & WICHMANN, E. 2003. Diverging long-term trends in ambient urban particle mass and number concentrations associated with emission changes caused by the German unification. *Atmospheric Environment*, 37, 3841-3848.
- KREYLING, W. G., SEMMLER-BEHNKE, M., SEITZ, J., SCYMCZAK, W., WENK, A., MAYER, P., TAKENAKA, S. & OBERDORSTER, G. 2009. Size dependence of the translocation of inhaled iridium and carbon nanoparticle aggregates from the lung of rats to the blood and secondary target organs. *Inhal Toxicol*, 21 Suppl 1, 55-60.
- KREYLING, W. G., SEMMLER, M., ERBE, F., MAYER, P., TAKENAKA, S., SCHULZ, H., OBERDORSTER, G. & ZIESENIS, A. 2002. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *J Toxicol Environ Health A*, 65, 1513-30.
- KUNZLI, N., JERRETT, M., GARCIA-ESTEBAN, R., BASAGANA, X., BECKERMANN, B., GILLILAND, F., MEDINA, M., PETERS, J., HODIS, H. N. & MACK, W. J. 2010. Ambient air pollution and the progression of atherosclerosis in adults. *PLoS One*, 5, e9096.
- KUNZLI, N., JERRETT, M., MACK, W. J., BECKERMAN, B., LABREE, L., GILLILAND, F., THOMAS, D., PETERS, J. & HODIS, H. N. 2005. Ambient air pollution and atherosclerosis in Los Angeles. *Environ Health Perspect*, 113, 201-6.
- KURODA, E., ISHII, KEN J., UEMATSU, S., OHATA, K., COBAN, C., AKIRA, S., ARITAKE, K., URADE, Y. & MORIMOTO, Y. 2011. Silica Crystals and Aluminum Salts Regulate the Production of Prostaglandin in Macrophages via NALP3 Inflammasome-Independent Mechanisms. *Immunity*, 34, 514-526.

- KYRIAKIS, J. M. & AVRUCH, J. 2001. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*, 81, 807-69.
- LEE, K. P. & KELLY, D. P. 1992. The pulmonary response and clearance of Ludox colloidal silica after a 4-week inhalation exposure in rats. *Fundam Appl Toxicol*, 19, 399-410.
- LEGGIO, C., GALANTINI, L. & PAVEL, N. V. 2008. About the albumin structure in solution: cigar Expanded form versus heart Normal shape. *Phys Chem Chem Phys*, 10, 6741-50.
- LENZ, A. G., KARG, E., LENTNER, B., DITTRICH, V., BRANDENBERGER, C., ROTHEN-RUTISHAUSER, B., SCHULZ, H., FERRON, G. A. & SCHMID, O. 2009. A dose-controlled system for air-liquid interface cell exposure and application to zinc oxide nanoparticles. *Part Fibre Toxicol*, 6, 32.
- LESNIAK, A., CAMPBELL, A., MONOPOLI, M. P., LYNCH, I., SALVATI, A. & DAWSON, K. A. 2010. Serum heat inactivation affects protein corona composition and nanoparticle uptake. *Biomaterials*, 31, 9511-8.
- LI, J., KARTHA, S., IASVOVSKAIA, S., TAN, A., BHAT, R. K., MANALIGOD, J. M., PAGE, K., BRASIER, A. R. & HERSHENSON, M. B. 2002a. Regulation of human airway epithelial cell IL-8 expression by MAP kinases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 283, L690-9.
- LI, M., LIU, R. M., TIMBLIN, C. R., MEYER, S. G., MOSSMAN, B. T. & FUKAGAWA, N. K. 2006. Age affects ERK1/2 and NRF2 signaling in the regulation of GCLC expression. *J Cell Physiol*, 206, 518-25.
- LI, N., KIM, S., WANG, M., FROINES, J., SIOUTAS, C. & NEL, A. 2002b. Use of a stratified oxidative stress model to study the biological effects of ambient concentrated and diesel exhaust particulate matter. *Inhal Toxicol*, 14, 459-86.
- LI, X., YANG, Y. & ASHWELL, J. D. 2002c. TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. *Nature*, 416, 345-7.
- LIANG, J. & SLINGERLAND, J. M. 2003. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle*, 2, 339-45.
- LIGHTY, VERANTH & SAROFIM 2000. Combustion aerosols: factors governing their size and composition and implications to human health. *Journal of the Air & Waste Management Association* 50, 1565-1618.
- LIMBACH, L. K., LI, Y., GRASS, R. N., BRUNNER, T. J., HINTERMANN, M. A., MULLER, M., GUNTHER, D. & STARK, W. J. 2005. Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. *Environ Sci Technol*, 39, 9370-6.
- LIMBACH, L. K., WICK, P., MANSER, P., GRASS, R. N., BRUININK, A. & STARK, W. J. 2007. Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. *Environmental science & technology*, 41, 4158-63.
- LIN, W., HUANG, Y. W., ZHOU, X. D. & MA, Y. 2006. In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 217, 252-9.
- LIU, J., QU, W. & KADIISKA, M. B. 2009. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238, 209-214.
- LOPEZ, E., ARCE, C., OSET-GASQUE, M. J., CANADAS, S. & GONZALEZ, M. P. 2006. Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. *Free Radic Biol Med*, 40, 940-51.

- LUNDQVIST, M., STIGLER, J., ELIA, G., LYNCH, I., CEDERVALL, T. & DAWSON, K. A. 2008. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 14265-70.
- LUNOV, O., SYROVETS, T., LOOS, C., BEIL, J., DELACHER, M., TRON, K., NIENHAUS, G. U., MUSYANOVYCH, A., MAILANDER, V., LANDFESTER, K. & SIMMET, T. 2011. Differential uptake of functionalized polystyrene nanoparticles by human macrophages and a monocytic cell line. *ACS Nano*, 5, 1657-69.
- LUNOV, O., SYROVETS, T., ROCKER, C., TRON, K., NIENHAUS, G. U., RASCHE, V., MAILANDER, V., LANDFESTER, K. & SIMMET, T. 2010. Lysosomal degradation of the carboxydextran shell of coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles and the fate of professional phagocytes. *Biomaterials*, 31, 9015-22.
- LYNCH, I., CEDERVALL, T., LUNDQVIST, M., CABALEIRO-LAGO, C., LINSE, S. & DAWSON, K. A. 2007. The nanoparticle-protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science challenge for the 21st century. *Advances in Colloid and Interface Science* 134-135, 167-174.
- LYNCH, I. & DAWSON, K. A. 2008. Protein-nanoparticle interactions. *NanoToday*, 3.
- MAESTRELLI, P., PASKA, C., SAETTA, M., TURATO, G., NOWICKI, Y., MONTI, S., FORMICHI, B., MINIATI, M. & FABBRI, L. M. 2003. Decreased haem oxygenase-1 and increased inducible nitric oxide synthase in the lung of severe COPD patients. *Eur Respir J*, 21, 971-6.
- MAGFORCE [www.magforce.de](http://www.magforce.de).
- MARIATHASAN, S., WEISS, D. S., NEWTON, K., MCBRIDE, J., O'ROURKE, K., ROOSE-GIRMA, M., LEE, W. P., WEINRAUCH, Y., MONACK, D. M. & DIXIT, V. M. 2006. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*, 440, 228-32.
- MARQUARDT, C. 2011. *Regulation der anti-oxidativen, inflammatorischen und zytotoxischen Wirkungen nach SiO<sub>2</sub> Nanopartikel Exposition in Makrophagen*. Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie.
- MARTINON, F., BURNS, K. & TSCHOPP, J. 2002. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*, 10, 417-26.
- MARTINON, F., PETRILLI, V., MAYOR, A., TARDIVEL, A. & TSCHOPP, J. 2006. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*, 440, 237-41.
- MERGET, R., BAUER, T., KUPPER, H. U., PHILIPPOU, S., BAUER, H. D., BREITSTADT, R. & BRUENING, T. 2002. Health hazards due to the inhalation of amorphous silica. *Arch Toxicol*, 75, 625-34.
- MINSHALL, R. D., TIRUPPATHI, C., VOGEL, S. M., NILES, W. D., GILCHRIST, A., HAMM, H. E. & MALIK, A. B. 2000. Endothelial cell-surface gp60 activates vesicle formation and trafficking via G(i)-coupled Src kinase signaling pathway. *J Cell Biol*, 150, 1057-70.
- MOGHIMI, S. M., HUNTER, A. C. & MURRAY, J. C. 2005. Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB J*, 19, 311-30.
- MOHAMED, B. M., VERMA, N. K., PRINA-MELLO, A., WILLIAMS, Y., DAVIES, A. M., BAKOS, G., TORMEY, L., EDWARDS, C., HANRAHAN, J., SALVATI, A., LYNCH, I., DAWSON, K., KELLEHER, D. & VOLKOV, Y. 2011. Activation of stress-related signalling pathway in human cells upon SiO<sub>2</sub> nanoparticles exposure as an early indicator of cytotoxicity. *Journal of nanobiotechnology*, 9, 29.

- MONTEILLER, C., TRAN, L., MACNEE, W., FAUX, S., JONES, A., MILLER, B. & DONALDSON, K. 2007. The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: the role of surface area. *Occup Environ Med*, 64, 609-15.
- MORISHIGE, T., YOSHIOKA, Y., INAKURA, H., TANABE, A., YAO, X., NARIMATSU, S., MONOBE, Y., IMAZAWA, T., TSUNODA, S., TSUTSUMI, Y., MUKAI, Y., OKADA, N. & NAKAGAWA, S. 2010. The effect of surface modification of amorphous silica particles on NLRP3 inflammasome mediated IL-1beta production, ROS production and endosomal rupture. *Biomaterials*, 31, 6833-42.
- MORSE, D., PISCHKE, S. E., ZHOU, Z., DAVIS, R. J., FLAVELL, R. A., LOOP, T., OTTERBEIN, S. L., OTTERBEIN, L. E. & CHOI, A. M. 2003. Suppression of inflammatory cytokine production by carbon monoxide involves the JNK pathway and AP-1. *J Biol Chem*, 278, 36993-8.
- MUELHOPT, S., PAUR, H., DIABATÉ, S. & KRUG, H. 2008. In Vitro Testing of Inhalable Fly Ash at the Air Liquid Interface. *Advanced Environmental Monitoring*, 402-414.
- MURASHOV, V., HARPER, M. & DEMCHUK, E. 2006. Impact of silanol surface density on the toxicity of silica aerosols measured by erythrocyte haemolysis. *J Occup Environ Hyg*, 3, 718-23.
- NABESHI, H., YOSHIKAWA, T., MATSUYAMA, K., NAKAZATO, Y., ARIMORI, A., ISOBE, M., TOCHIGI, S., KONDOH, S., HIRAI, T., AKASE, T., YAMASHITA, T., YAMASHITA, K., YOSHIDA, T., NAGANO, K., ABE, Y., YOSHIOKA, Y., KAMADA, H., IMAZAWA, T., ITOH, N., TSUNODA, S. & TSUTSUMI, Y. 2010. Size-dependent cytotoxic effects of amorphous silica nanoparticles on Langerhans cells. *Pharmazie*, 65, 199-201.
- NAKAGAWA, Y., WAKURI, S., SAKAMOTO, K. & TANAKA, N. 1997. The photogenotoxicity of titanium dioxide particles. *Mutat Res*, 394, 125-32.
- NAKAMURA, M., THOURANI, V. H., RONSON, R. S., VELEZ, D. A., MA, X. L., KATZMARK, S., ROBINSON, J., SCHMARKEY, L. S., ZHAO, Z. Q., WANG, N. P., GUYTON, R. A. & VINTEN-JOHANSEN, J. 2000. Glutathione reverses endothelial damage from peroxynitrite, the byproduct of nitric oxide degradation, in crystalloid cardioplegia. *Circulation*, 102, III332-8.
- NALCACI, O., AKTEN, D., SCHMITT, M. & BOCKHORN, H. 2011. Effect of precursor concentration on iron oxide formation; an experimental and predictive modeling approach. *Journal of Nanoparticle Research*.
- NAPIERSKA, D., THOMASSEN, L. C., LISON, D., MARTENS, J. A. & HOET, P. H. 2010. The nanosilica hazard: another variable entity. *Part Fibre Toxicol*, 7, 39.
- NAPIERSKA, D., THOMASSEN, L. C., RABOLLI, V., LISON, D., GONZALEZ, L., KIRSCH-VOLDERS, M., MARTENS, J. A. & HOET, P. H. 2009. Size-dependent cytotoxicity of monodisperse silica nanoparticles in human endothelial cells. *Small*, 5, 846-53.
- NATHAN, C. & XIE, Q. W. 1994. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem*, 269, 13725-8.
- NEL, A., XIA, T., MADLER, L. & LI, N. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311, 622-7.
- NEL, A. E., MADLER, L., VELEGOL, D., XIA, T., HOEK, E. M., SOMASUNDARAN, P., KLAESSIG, F., CASTRANOVA, V. & THOMPSON, M. 2009. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater*, 8, 543-57.
- OBERDORSTER, G. 2001. Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int Arch Occup Environ Health*, 74, 1-8.

- OBERDORSTER, G., OBERDORSTER, E. & OBERDORSTER, J. 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*, 113, 823-39.
- OBERDORSTER, G., SHARP, Z., ATUDOREI, V., ELDER, A., GELEIN, R., KREYLING, W. & COX, C. 2004. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol*, 16, 437-45.
- OBERDORSTER, G., SHARP, Z., ATUDOREI, V., ELDER, A., GELEIN, R., LUNTS, A., KREYLING, W. & COX, C. 2002. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health A*, 65, 1531-43.
- OECD 2010. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials. *Environment Directorate, OECD*.
- ORTS-GIL, G., NATTE, K., DRESCHER, D., BRESCH, H., MANTION, A., KNEIPP, J. & ÖSTERLE, W. 2011. Characterisation of silica nanoparticles prior to in vitro studies: from primary particles to agglomerates. *J Nanopart Res*, 13, 1593-1604.
- OSAKI, F., KANAMORI, T., SANDO, S., SERA, T. & AOYAMA, Y. 2004. A quantum dot conjugated sugar ball and its cellular uptake. On the size effects of endocytosis in the subviral region. *J Am Chem Soc*, 126, 6520-1.
- OTTERBEIN, L. E. & CHOI, A. M. 2000. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279, L1029-37.
- PALECANDA, A., PAULASKIS, J., AL-MUTAIRI, E., IMRICH, A., QIN, G., SUZUKI, H., KODAMA, T., TRYGGVASON, K., KOZIEL, H. & KOBZIK, L. 1999. Role of the scavenger receptor MARCO in alveolar macrophage binding of unopsonized environmental particles. *J Exp Med*, 189, 1497-506.
- PALMER, R. M., BRIDGE, L., FOXWELL, N. A. & MONCADA, S. 1992. The role of nitric oxide in endothelial cell damage and its inhibition by glucocorticoids. *Br J Pharmacol*, 105, 11-2.
- PANDURANGI, R. S., SEEHRA, M. S., RAZZABONI, B. L. & BOLSAITIS, P. 1990. Surface and bulk infrared modes of crystalline and amorphous silica particles: a study of the relation of surface structure to cytotoxicity of respirable silica. *Environ Health Perspect*, 86, 327-36.
- PARK, E. J. & PARK, K. 2009. Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro. *Toxicol Lett*, 184, 18-25.
- PARK, E. J., YI, J., CHUNG, K. H., RYU, D. Y., CHOI, J. & PARK, K. 2008. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicol Lett*, 180, 222-9.
- PATIL, S., SANDBERG, A., HECKERT, E., SELF, W. & SEAL, S. 2007. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. *Biomaterials*, 28, 4600-7.
- PAUR, H. R., BAUMANN, W., MATZING, H. & SEIFERT, H. 2005. Formation of nanoparticles in flames; measurement by particle mass spectrometry and numerical simulation. *Nanotechnology*, 16, S354-S361.
- PAUR, H. R., CASSEE, F., TEEGUARDEN, J., FISSAND, H., DIABATE, S., AUFDERHEIDE, M., KREYLING, W., HÄNNINEN, O., KASPERI, G., RIEDIKER, M., ROTHEN-RUTISHAUSER, B. & SCHMID, O. 2011. In-vitro Cell Exposure Studies for the Assessment of Nanoparticle Toxicity in the Lung - A Dialogue between Aerosol Science and Biology. *Journal of Aerosol Science*, 42, 668-692
- PAUR, H. R., MÜLHOPT, S., WEISS, C. & DIABATÉ, S. 2008. In Vitro Exposure Systems and Bioassays for the Assessment of Toxicity of Nanoparticles to the Human Lung. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 3, 319-329.

- PEARSON, G., ROBINSON, F., BEERS GIBSON, T., XU, B. E., KARANDIKAR, M., BERMAN, K. & COBB, M. H. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*, 22, 153-83.
- PETERS, A., DOCKERY, D. W., MULLER, J. E. & MITTLEMAN, M. A. 2001. Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction. *Circulation*, 103, 2810-5.
- PETERS, A., DORING, A., WICHMANN, H. E. & KOENIG, W. 1997. Increased plasma viscosity during an air pollution episode: a link to mortality? *Lancet*, 349, 1582-7.
- PETRILLI, V., DOSTERT, C., MURUVE, D. A. & TSCHOPP, J. 2007. The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr Opin Immunol*, 19, 615-22.
- PETROS, A., BENNETT, D. & VALLANCE, P. 1991. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet*, 338, 1557-8.
- PFÄFFL, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29, e45.
- PINE, S. R., MECHANIC, L. E., ENEWOLD, L., CHATURVEDI, A. K., KATKI, H. A., ZHENG, Y. L., BOWMAN, E. D., ENGELS, E. A., CAPORASO, N. E. & HARRIS, C. C. 2011. Increased levels of circulating interleukin 6, interleukin 8, C-reactive protein, and risk of lung cancer. *J Natl Cancer Inst*, 103, 1112-22.
- PINHEIRO, T., PALLON, J., ALVES, L., VERISSIMO, A., FILIPE, P., SILVA, J. & SILVA, R. 2007. The influence of corneocyte structure on the interpretation of permeation profiles of nanoparticles across skin. *Nucl Instrum Methods Phys Res B*, 260, 119-123.
- POLAND, C. A., DUFFIN, R., KINLOCH, I., MAYNARD, A., WALLACE, W. A. H., SEATON, A., STONE, V., BROWN, S., MACNEE, W. & DONALDSON, K. 2008. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nature nanotechnology*, 3, 423-8.
- POPE, C. A., 3RD, BURNETT, R. T., THUN, M. J., CALLE, E. E., KREWSKI, D., ITO, K. & THURSTON, G. D. 2002. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA*, 287, 1132-41.
- POPE, C. A., 3RD, BURNETT, R. T., THURSTON, G. D., THUN, M. J., CALLE, E. E., KREWSKI, D. & GODLESKI, J. J. 2004. Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation*, 109, 71-7.
- POPE, C. A., 3RD & DOCKERY, D. W. 2006. Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect. *J Air Waste Manag Assoc*, 56, 709-42.
- POTTER, C. J., PEDRAZA, L. G. & XU, T. 2002. Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nature Cell Biology*, 4, 658-665.
- PULSKAMP, K., DIABATE, S. & KRUG, H. F. 2007. Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. *Toxicol Lett*, 168, 58-74.
- RABOLLI, V., THOMASSEN, L. C., PRINCEN, C., NAPIERSKA, D., GONZALEZ, L., KIRSCH-VOLDERS, M., HOET, P. H., HUAUX, F., KIRSCHHOCK, C. E., MARTENS, J. A. & LISON, D. 2010. Influence of size, surface area and microporosity on the in vitro cytotoxic activity of amorphous silica nanoparticles in different cell types. *Nanotoxicology*, 4, 307-18.

- RAVI, M., SAMETI, M., MOHAPATRA, S., KONG, X., LOCKEY, R., BAKOWSKY, U., LINDENBLATT, G., SCHMIDT, C. & LEHR, M. 2004. Cationic Silica Nanoparticles as Gene Carriers: Synthesis, Characterization and Transfection Efficiency In vitro and In vivo. . *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 4, 876-881.
- REISER, K. M., HESTERBERG, T. W., HASCHEK, W. M. & LAST, J. A. 1982. Experimental silicosis. I. Acute effects of intratracheally instilled quartz on collagen metabolism and morphologic characteristics of rat lungs. *Am J Pathol*, 107, 176-85.
- RENWICK, L. C., BROWN, D., CLOUTER, A. & DONALDSON, K. 2004. Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types. *Occup Environ Med*, 61, 442-7.
- REUZEL, P. G., BRUIJNTJES, J. P., FERON, V. J. & WOUTERSEN, R. A. 1991. Subchronic inhalation toxicity of amorphous silicas and quartz dust in rats. *Food Chem Toxicol*, 29, 341-54.
- RICHMAN, P. G. & MEISTER, A. 1975. Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J Biol Chem*, 250, 1422-6.
- RIEDL, M. & DIAZ-SANCHEZ, D. 2005. Biology of diesel exhaust effects on respiratory function. *J Allergy Clin Immunol*, 115, 221-8; quiz 229.
- ROCHE, M., RONDEAU, P., SINGH, N. R., TARNUS, E. & BOURDON, E. 2008. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett*, 582, 1783-7.
- ROCKER, C., POTZL, M., ZHANG, F., PARAK, W. J. & NIENHAUS, G. U. 2009. A quantitative fluorescence study of protein monolayer formation on colloidal nanoparticles. *Nat Nanotechnol*, 4, 577-80.
- ROCO, M. 2011. The long view of nanotechnology development: the National Nanotechnology Initiative at 10 years. *J Nanopart Res* 13, 427-445.
- ROHMANN, K., TSCHERNIG, T., PABST, R., GOLDMANN, T. & DROMANN, D. 2011. Innate immunity in the human lung: pathogen recognition and lung disease. *Cell Tissue Res*, 343, 167-74.
- ROSS, D. 2004. Quinone reductases multitasking in the metabolic world. *Drug Metab Rev*, 36, 639-54.
- ROUSSEAU, S., PAPOUTSOPOULOU, M., SYMONS, A., COOK, D., LUCOCQ, J. M., PRESCOTT, A. R., O'GARRA, A., LEY, S. C. & COHEN, P. 2008. TPL2-mediated activation of ERK1 and ERK2 regulates the processing of pre-TNF alpha in LPS-stimulated macrophages. *J Cell Sci*, 121, 149-54.
- ROUZER, C. A. & MARNETT, L. J. 2008. Cyclooxygenases: structural and functional insights. *The Journal of Lipid Research*, 50, S29-S34.
- RUBINFELD, H. & SEGER, R. 2005. The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. *Mol Biotechnol*, 31, 151-74.
- RUH, H. 2010. *Charakterisierung von Wechselwirkungen zwischen Nanopartikeln und Proteinen*. Bachelorarbeit, Hochschule Mannheim.
- RUSHTON, E. K., JIANG, J., LEONARD, S. S., EBERLY, S., CASTRANOVA, V., BISWAS, P., ELDER, A., HAN, X., GELEIN, R., FINKELSTEIN, J. & OBERDORSTER, G. 2010. Concept of assessing nanoparticle hazards considering nanoparticle dosimetric and chemical/biological response metrics. *J Toxicol Environ Health A*, 73, 445-61.

- SAGER, T. M., KOMMINENI, C. & CASTRANOVA, V. 2008. Pulmonary response to intratracheal instillation of ultrafine versus fine titanium dioxide: role of particle surface area. *Part Fibre Toxicol*, 5, 17.
- SAKURAI, H., KOHSAKA, H., LIU, M. F., HIGASHIYAMA, H., HIRATA, Y., KANNO, K., SAITO, I. & MIYASAKA, N. 1995. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. *J Clin Invest*, 96, 2357-63.
- SAMET, J. M., ZEGER, S. L., DOMINICI, F., CURRIERO, F., COURSAK, I., DOCKERY, D. W., SCHWARTZ, J. & ZANOBETTI, A. 2000. The National Morbidity, Mortality, and Air Pollution Study. Part II: Morbidity and mortality from air pollution in the United States. *Res Rep Health Eff Inst*, 94, 5-70; discussion 71-9.
- SAVI, M., KALBERER, M., LANG, D., RYSER, M., FIERZ, M., GASCHEN, A., RICKA, J. & GEISER, M. 2008. A novel exposure system for the efficient and controlled deposition of aerosol particles onto cell cultures. *Environ Sci Technol*, 42, 5667-74.
- SAYES, C. M., WAHI, R., KURIAN, P. A., LIU, Y., WEST, J. L., AUSMAN, K. D., WARHEIT, D. B. & COLVIN, V. L. 2006. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol Sci*, 92, 174-85.
- SCHULZE, C., KROLL, A., LEHR, C., SCHÄFER, U., BECKER, K., SCHNECKENBURGER, J., SCHULZEISFORT, C., LANDSIEDEL, R. & WOHLLEBEN, W. 2008. Not ready to use-overcoming pitfalls when dispersing nanoparticles in physiological media. *Nanotoxicology*, 2, 51-61.
- SCHWARTZ, J. 2001. Air pollution and blood markers of cardiovascular risk. *Environ Health Perspect*, 109 Suppl 3, 405-9.
- SCHWARTZ, J., ZANOBETTI, A. & BATESON, T. 2003. Morbidity and Mortality Among Elderly Residents of Cities with Daily PM Measurements. In Revised Analyses of Time-Series Studies of Air Pollution and Health. Special Report. *Health Effects Institute: Boston, MA* 25-58.
- SCOTT, B. J. & BRADWELL, A. R. 1983. Identification of the serum binding proteins for iron, zinc, cadmium, nickel, and calcium. *Clin Chem*, 29, 629-33.
- SEMLER, M., SEITZ, J., ERBE, F., MAYER, P., HEYDER, J., OBERDORSTER, G. & KREYLING, W. G. 2004. Long-term clearance kinetics of inhaled ultrafine insoluble iridium particles from the rat lung, including transient translocation into secondary organs. *Inhal Toxicol*, 16, 453-9.
- SHIMEKAKE, Y., NAGATA, K., OHTA, S., KAMBAYASHI, Y., TERAOKA, H., KITAMURA, K., ETO, T., KANGAWA, K. & MATSUO, H. 1995. Adrenomedullin stimulates two signal transduction pathways, cAMP accumulation and Ca<sup>2+</sup> mobilization, in bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem*, 270, 4412-7.
- SHIN, I., YAKES, F. M., ROJO, F., SHIN, N. Y., BAKIN, A. V., BASELGA, J. & ARTEAGA, C. L. 2002. PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med*, 8, 1145-52.
- SHVEDOVA, A. A., KISIN, E., MURRAY, A. R., JOHNSON, V. J., GORELIK, O., AREPALLI, S., HUBBS, A. F., MERCER, R. R., KEOHAVONG, P., SUSSMAN, N., JIN, J., YIN, J., STONE, S., CHEN, B. T., DEYE, G., MAYNARD, A., CASTRANOVA, V., BARON, P. A. & KAGAN, V. E. 2008. Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 295, L552-65.
- SIEGEL, D., GUSTAFSON, D. L., DEHN, D. L., HAN, J. Y., BOONCHOONG, P., BERLINER, L. J. & ROSS, D. 2004. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1: role as a superoxide scavenger. *Mol Pharmacol*, 65, 1238-47.

- SIEGEL, D. & ROSS, D. 2000. Immunodetection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in human tissues. *Free Radic Biol Med*, 29, 246-53.
- SINGH, A., MISRA, V., THIMMULAPPA, R. K., LEE, H., AMES, S., HOQUE, M. O., HERMAN, J. G., BAYLIN, S. B., SIDRANSKY, D., GABRIELSON, E., BROCK, M. V. & BISWAL, S. 2006. Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. *PLoS Med*, 3, e420.
- SINGH, S., SHI, T., DUFFIN, R., ALBRECHT, C., VAN BERLO, D., HOHR, D., FUBINI, B., MARTRA, G., FENOGLIO, I., BORM, P. J. A. & SCHINS, R. P. F. 2007. Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO<sub>2</sub>: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 222, 141-51.
- SKEBO, J. E., GRABINSKI, C. M., SCHRAND, A. M., SCHLAGER, J. J. & HUSSAIN, S. M. 2007. Assessment of metal nanoparticle agglomeration, uptake, and interaction using high-illuminating system. *Int J Toxicol*, 26, 135-41.
- SLOWING, II, VIVERO-ESCOTO, J. L., WU, C. W. & LIN, V. S. 2008. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Adv Drug Deliv Rev*, 60, 1278-88.
- SLOWING, II, WU, C. W., VIVERO-ESCOTO, J. L. & LIN, V. S. 2009. Mesoporous silica nanoparticles for reducing hemolytic activity towards mammalian red blood cells. *Small*, 5, 57-62.
- SMITH, W. L. & BELL, T. G. 1978. Immunohistochemical localization of the prostaglandin-forming cyclooxygenase in renal cortex. *Am J Physiol*, 235, F451-7.
- SOHAEBUDDIN, S. K., THEVENOT, P. T., BAKER, D., EATON, J. W. & TANG, L. 2010. Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Part Fibre Toxicol*, 7, 22.
- SOTO, K., GARZA, K. M. & MURR, L. E. 2007. Cytotoxic effects of aggregated nanomaterials. *Acta Biomater*, 3, 351-8.
- SOUTHAM, E. & GARTHWAITE, J. 1993. The nitric oxide-cyclic GMP signalling pathway in rat brain. *Neuropharmacology*, 32, 1267-77.
- STAYTON, I., WINIARZ, J., SHANNON, K. & MA, Y. 2009. Study of uptake and loss of silica nanoparticles in living human lung epithelial cells at single cell level. *Anal Bioanal Chem*, 394, 1595-608.
- STÖBER, W., FINK, A. & BOHN, E. 1968. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J. Colloid Interface Sci*, 26, 62.
- STOEGER, T., REINHARD, C., TAKENAKA, S., SCHROEPEL, A., KARG, E., RITTER, B., HEYDER, J. & SCHULZ, H. 2006. Instillation of six different ultrafine carbon particles indicates a surface area threshold dose for acute lung inflammation in mice. *Environ Health Perspect*, 114, 328-33.
- STOHS, S. J., BAGCHI, D., HASSOUN, E. & BAGCHI, M. 2001. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 20, 77-88.
- STOLZEL, M., BREITNER, S., CYRYS, J., PITZ, M., WOLKE, G., KREYLING, W., HEINRICH, J., WICHMANN, H. E. & PETERS, A. 2007. Daily mortality and particulate matter in different size classes in Erfurt, Germany. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, 17, 458-67.

- STROH, A., ZIMMER, C., GUTZEIT, C., JAKSTADT, M., MARSCHINKE, F., JUNG, T., PILGRIMM, H. & GRUNE, T. 2004. Iron oxide particles for molecular magnetic resonance imaging cause transient oxidative stress in rat macrophages. *Free Radic Biol Med*, 36, 976-84.
- SUGIO, S., KASHIMA, A., MOCHIZUKI, S., NODA, M. & KOBAYASHI, K. 1999. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Eng*, 12, 439-46.
- SUGIOKA, K., NAKANO, M., TOTSUNE-NAKANO, H., MINAKAMI, H., TERO-KUBOTA, S. & IKEGAMI, Y. 1988. Mechanism of O<sub>2</sub>- generation in reduction and oxidation cycle of ubiquinones in a model of mitochondrial electron transport systems. *Biochim Biophys Acta*, 936, 377-85.
- SUNYER, J., SCHWARTZ, J., TOBIAS, A., MACFARIANE, D., GARCIA, J. & JOSEP, M. 2000. Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease Are at Increased Risk of Death Associated with Urban Particle Air Pollution: A Case-Crossover Analysis. *American Journal of Epidemiology*, 151.
- SYDLIK, U., BIERHALS, K., SOUFI, M., ABEL, J., SCHINS, R. P. & UNFRIED, K. 2006. Ultrafine carbon particles induce apoptosis and proliferation in rat lung epithelial cells via specific signaling pathways both using EGF-R. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 291, L725-33.
- SYLVESTER, I., SUFFREDINI, A. F., BOUJOUKOS, A. J., MARTICH, G. D., DANNER, R. L., YOSHIMURA, T. & LEONARD, E. J. 1993. Neutrophil attractant protein-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in human serum. Effects of intravenous lipopolysaccharide on free attractants, specific IgG autoantibodies and immune complexes. *J Immunol*, 151, 3292-8.
- SZABO, C., SOUTHAN, G. J. & THIEMERMANN, C. 1994. Beneficial effects and improved survival in rodent models of septic shock with S-methylisothiourea sulfate, a potent and selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 12472-6.
- TAO, F. & KOBZIK, L. 2002. Lung macrophage-epithelial cell interactions amplify particle-mediated cytokine release. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 26, 499-505.
- TARI, A. M. & LOPEZ-BERESTEIN, G. 2000. Serum predominantly activates MAPK and akt kinases in EGFR- and ErbB2-over-expressing cells, respectively. *Int J Cancer*, 86, 295-7.
- TEEGUARDEN, J. G., HINDERLITER, P. M., ORR, G., THRALL, B. D. & POUNDS, J. G. 2007. Particokinetics in vitro: dosimetry considerations for in vitro nanoparticle toxicity assessments. *Toxicol Sci*, 95, 300-12.
- THOMAS, J. A., POLAND, B. & HONZATKO, R. 1995. Protein sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation. *Arch Biochem Biophys*, 319, 1-9.
- TIAN, L., SHI, M. M. & FORMAN, H. J. 1997. Increased transcription of the regulatory subunit of gamma-glutamylcysteine synthetase in rat lung epithelial L2 cells exposed to oxidative stress or glutathione depletion. *Arch Biochem Biophys*, 342, 126-33.
- TOMARU, M. & MATSUOKA, M. 2011. The role of mitogen-activated protein kinases in crystalline silica-induced cyclooxygenase-2 expression in A549 human lung epithelial cells. *Toxicol Mech Methods*, 21, 513-9.
- TSCHOPP, J. 2011. Mitochondria: Sovereign of inflammation? *European Journal of Immunology*, 41, 1196-1202.
- TURRENS, J. F. & BOVERIS, A. 1980. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J*, 191, 421-7.
- ULRICH, G. 1984. Flame synthesis of fine particles. *Chem. Eng. News*, 62, 22-29.

UMWELTBUNDESAMT [www.umwelbundesamt.de/luft/schadstoffe/feinstaub.htm](http://www.umwelbundesamt.de/luft/schadstoffe/feinstaub.htm).

- UNFRIED, K., SYDLIK, U., BIERHALS, K., WEISSENBERG, A. & ABEL, J. 2008. Carbon nanoparticle-induced lung epithelial cell proliferation is mediated by receptor-dependent Akt activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 294, L358-67.
- VALKO, M., RHODES, C. J., MONCOL, J., IZAKOVIC, M. & MAZUR, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 160, 1-40.
- VAN EEDEN, S. F. & HOGG, J. C. 2002. Systemic inflammatory response induced by particulate matter air pollution: the importance of bone-marrow stimulation. *J Toxicol Environ Health A*, 65, 1597-613.
- VAN EEDEN, S. F., TAN, W. C., SUWA, T., MUKAE, H., TERASHIMA, T., FUJII, T., QUI, D., VINCENT, R. & HOGG, J. C. 2001. Cytokines involved in the systemic inflammatory response induced by exposure to particulate matter air pollutants (PM(10)). *Am J Respir Crit Care Med*, 164, 826-30.
- VAN VOORHIS, B., HUETTNER, P., CLARK, M. & HILL, J. 1990. Immunohistochemical localization of prostaglandin H synthase in the female reproductive tract and endometriosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 163, 57-62.
- VANE, J. R. 1971. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*, 231, 232-5.
- VERANTH, J. M., KASER, E. G., VERANTH, M. M., KOCH, M. & YOST, G. S. 2007. Cytokine responses of human lung cells (BEAS-2B) treated with micron-sized and nanoparticles of metal oxides compared to soil dusts. *Part Fibre Toxicol*, 4, 2.
- VERTEGEL, A. A., SIEGEL, R. W. & DORDICK, J. S. 2004. Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme. *Langmuir*, 20, 6800-7.
- VITUMS, V. C., EDWARDS, M. J., NILES, N. R., BORMAN, J. O. & LOWRY, R. D. 1977. Pulmonary fibrosis from amorphous silica dust, a product of silica vapor. *Arch Environ Health*, 32, 62-8.
- VOLLATH 2008. Plasma synthesis of nanopowders. *J Nanopart Res* 10, 39-57.
- WALLACH, D., VARFOLOMEEV, E. E., MALININ, N. L., GOLTSEV, Y. V., KOVALENKO, A. V. & BOLDIN, M. P. 1999. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol*, 17, 331-67.
- WANG, Z., TIRUPPATHI, C., MINSHALL, R. D. & MALIK, A. B. 2009. Size and dynamics of caveolae studied using nanoparticles in living endothelial cells. *ACS Nano*, 3, 4110-6.
- WARHEIT, D. B., WEBB, T. R., REED, K. L., FRERICHS, S. & SAYES, C. M. 2007. Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO<sub>2</sub> particles: differential responses related to surface properties. *Toxicology*, 230, 90-104.
- WATJEN, W. & BEYERSMANN, D. 2004. Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress. *Biometals*, 17, 65-78.
- WAUGH, D. J. & WILSON, C. 2008. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*, 14, 6735-41.
- WENG, Y. H., YANG, G., WEISS, S. & DENNERY, P. A. 2003. Interaction between heme oxygenase-1 and -2 proteins. *J Biol Chem*, 278, 50999-1005.

- WEVER, R. M., VAN DAM, T., VAN RIJN, H. J., DE GROOT, F. & RABELINK, T. J. 1997. Tetrahydrobiopterin regulates superoxide and nitric oxide generation by recombinant endothelial nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun*, 237, 340-4.
- WOLFF, H., SAUKKONEN, K., ANTTILA, S., KARJALAINEN, A., VAINIO, H. & RISTIMAKI, A. 1998. Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Res*, 58, 4997-5001.
- WOTTRICH, R. 2003. *Zur toxikologischen Untersuchung ultrafeiner Partikel: Entwicklung und Einsatz eines realitätsnahen in vitro Lungenmodells*. Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie.
- WOTTRICH, R., DIABATE, S. & KRUG, H. F. 2004. Biological effects of ultrafine model particles in human macrophages and epithelial cells in mono- and co-culture. *Int J Hyg Environ Health*, 207, 353-61.
- XIA, T., KORGE, P., WEISS, J. N., LI, N., VENKATESEN, M. I., SIOUTAS, C. & NEL, A. 2004. Quinones and aromatic chemical compounds in particulate matter induce mitochondrial dysfunction: implications for ultrafine particle toxicity. *Environ Health Perspect*, 112, 1347-58.
- XIA, T., KOVOCHICH, M., LIONG, M., ZINK, J. I. & NEL, A. E. 2008. Cationic polystyrene nanosphere toxicity depends on cell-specific endocytic and mitochondrial injury pathways. *ACS Nano*, 2, 85-96.
- XIAO, G. G., WANG, M., LI, N., LOO, J. A. & NEL, A. E. 2003. Use of proteomics to demonstrate a hierarchical oxidative stress response to diesel exhaust particle chemicals in a macrophage cell line. *The Journal of biological chemistry*, 278, 50781-90.
- YAVUZ, C. T., MAYO, J. T., YU, W. W., PRAKASH, A., FALKNER, J. C., YEAN, S., CONG, L., SHIPLEY, H. J., KAN, A., TOMSON, M., NATELSON, D. & COLVIN, V. L. 2006. Low-field magnetic separation of monodisperse Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocrystals. *Science*, 314, 964-7.
- YAZDI, A. S., GUARDA, G., RITEAU, N., DREXLER, S. K., TARDIVEL, A., COUILLIN, I. & TSCHOPP, J. 2010. Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 and IL-1β. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 19449-19454.
- YU, K., GRABINSKI, C., SCHRAND, A., MURDOCK, R., WANG, W., GU, B., SCHLAGER, J. & HUSSAIN, S. 2009. Toxicity of amorphous silica nanoparticles in mouse keratinocytes. *J Nanopart Res* 11, 15-24.
- ZANOBETTI, A., SCHWARTZ, J. & DOCKERY, D. W. 2000. Airborne particles are a risk factor for hospital admissions for heart and lung disease. *Environ Health Perspect*, 108, 1071-7.
- ZHOU, R., YAZDI, A. S., MENU, P. & TSCHOPP, J. 2010. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*, 469, 221-225.

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALI	<i>Air-liquid interphase</i>
AP-1	Aktivator-Protein-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
et al.	und andere ( <i>et alii</i> )
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Eisenoxid
FCS	Fötales Kälberserum
GSH	Glutathion
h	Stunde ( <i>hour</i> )
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
JNK	c-Jun-N-terminale Proteinkinase
kDa	Kilodalton
µg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
cm	Zentimeter

M, mM	Mol pro Liter; Millimol pro Liter
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	MAPK-Kinase
MEKK	<i>mammalian mitogen activated kinase kinase kinase</i>
MK2	MAPK-aktivierte Proteinkinase-2
NO	Stickstoffmonoxid
NP	Nanopartikel
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies ("reactive oxygen species")
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase(n) ( <i>stress-activated protein kinase</i> )
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SiO <sub>2</sub>	Siliziumdioxid
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
TEM	Transmissionenelektronenmikroskopie
TiO <sub>2</sub>	Titandioxid
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween20	Polyoxyethen-sorbitan-monolaurat
U	Enzymeinheit ( <i>unit</i> )
UV	Ultraviolette Strahlung
v/v	<i>Volume to Volume</i>
w/v	Weight per Volume
z.B.	zum Beispiel

## Abbildungsverzeichnis

Abb.1 Lokale Depositionswahrscheinlichkeiten im Atemtrakt für Partikel mit unterschiedlichen aerodynamischen Durchmessern (nach Oberdörster et al., 2005).....	6
Abb. 2 Die Hierarchie der Partikel-induzierten Stressantworten.....	11
Abb. 3 Abbau des Häms durch die Hämoxygenase-1 .....	13
Abb. 4 Biologische Konsequenzen der NO Synthese durch iNOS.....	17
Abb. 5 TEM Aufnahmen der verwendeten Nanopartikel. ....	33
Abb. 6: Aufbau der <i>Air-liquid-interphase</i> Depositionsanlage (ALIDA).....	55
Abb. 7: Schematischer Aufbau der Elektrode mit dem Transwell-Einsatz.....	57
Abb. 8 Agglomerationsverhalten von Metalloxid-NP in verschiedenen Medien.....	63
Abb. 9 Effekte von NP auf die Viabilität von RAW264.7 Makrophagen und A549 Zellen .....	65
Abb. 10 Effekte der NP auf die Viabilität bezogen auf die Oberflächendosis .....	67
Abb. 11A) TEM-Analyse von Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -10 nm und TiO <sub>2</sub> -32 nm NP behandelten RAW264.7 Makrophagen und A549 Zellen.....	70
Abb. 12 Intrazelluläre ROS Bildung nach NP Exposition .....	73
Abb. 13 Die Regulation einiger Gene der anti-oxidativen Antwort nach NP Exposition. ....	75
Abb. 14 Effekt von SiO <sub>2</sub> -12 nm NP auf die Bildung von HO-1.....	75
Abb. 15 Die Genregulation der pro-inflammatorischen Antwort nach NP Exposition.....	78
Abb. 16 Effekte auf die TNF- $\alpha$ Freisetzung in RAW264.7 Makrophagen nach NP Exposition .....	79
Abb. 17 Effekte von NP auf die Freisetzung der Zytokine IL-8, IL-6 sowie die Synthese von COX-2 in A549 Zellen .....	81
Abb. 18 Aktivierung der MAP Kinasen p38, JNK und ERK nach SiO <sub>2</sub> -12 nm und -25 nm NP Exposition in Medium ohne FCS .....	83
Abb. 19 SiO <sub>2</sub> 12 nm NP binden hauptsächlich BSA nach Inkubation mit FCS .....	85
Abb. 20 An SiO <sub>2</sub> -12 NP gebundene Proteine hemmen die NP-induzierte Toxizität, Inflammation und p38 Phosphorylierung .....	87
Abb. 21 Die Anwesenheit von FCS führt zu konstanter AKT Phosphorylierung.....	89
Abb. 22 AKT-Phosphorylierung wird durch FCS-Beschichtung von NP bewirkt.....	89
Abb. 23 TEM-Analyse der deponierten SiO <sub>2</sub> -12 nm und SiO <sub>2</sub> -50 nm NP während der Exposition mit Zellen .....	91
Abb. 24 Effekt von SiO <sub>2</sub> -12 nm und -50 nm NP auf die Membranintegrität der A549 Zellen unter submersen Bedingungen und an der Luft-/Flüssigkeitsgrenzschicht .....	93
Abb. 25 Induktion der Freisetzung von IL-8 durch SiO <sub>2</sub> -12 und -50 nm NP unter submersen Bedingungen und an der Luft-/Flüssigkeitsgrenzschicht.....	94

Abb. 26 Induktion der COX-2 und p38 Phosphorylierung nach SiO<sub>2</sub>-NP Behandlung unter submersen Bedingungen und an der Luft-/Flüssigkeitsgrenzschicht.....95

Abb. 27 Zusammenfassendes Modell und Arbeitshypothese für die Interaktionen von SiO<sub>2</sub>-NP mit A549 Lungenepithelzellen und der Einfluss der Proteinkorona auf die NP-induzierten Effekte.....117

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zusammenfassung der verwendeten Nanopartikel und ihre Eigenschaften. Gekaufte NP(a), am EBI hergestellte NP (b), am ITC hergestellte NP (c).....	32
Tab. 2: Zusammensetzung des Kulturmediums der RAW264.7 Makrophagen .....	37
Tab. 3: Zusammensetzung des Kulturmediums für A549 Zellen.....	38
Tab. 4: Primer Sequenzen.....	43
Tab. 5: Komponenten für einen 40 µl Ansatz für die Reverse Transkription .....	45
Tab. 6: Parameter für die Herstellung der cDNA durch Reverse Transkription .....	45
Tab. 7: Komponenten für einen 25 µl Ansatz der Qualitäts-PCR .....	46
Tab. 8: Ablauf der Qualitäts-PCR .....	46
Tab. 9 Zusammensetzung des 5x TBE Puffers für das Agarosegel.....	46
Tab. 10: RT-PCR Komponenten für einen 20 µl Ansatz .....	47
Tab. 11: Parameter der 2-Schritt-RT-PCR Reaktion.....	47
Tab. 12: Verwendete Antikörper .....	48
Tab. 13: Zusammensetzung des 4x Lysepuffers .....	49
Tab. 14: Zusammensetzung des 4 %-igen Sammelgels.....	49
Tab. 15: Zusammensetzung des 10 % igen Trenngels.....	50
Tab. 16: Zusammensetzung des Blot-Puffers.....	50
Tab. 17: Zusammensetzung des 1x TBS-T Puffers (pH 7,6).....	51
Tab. 18: Zusammensetzung der Coomassie-Färbelösung .....	52
Tab. 19: Zusammensetzung der Entfärbelösung .....	53
Tab. 20: Zusammensetzung des RPMI Mediums für die Aussaat, Exposition und Nachinkubation für die ALI-Expositionsversuche .....	58
Tab. 21 Hydrodynamischer Durchmesser von SiO <sub>2</sub> -12 nm NP in verschiedenen Medien.....	63
Tab. 22 NOAEL-Werte ( <i>No observed adverse effect level</i> ) von SiO <sub>2</sub> in A549 Zellen und RAW264.7 Makrophagen .....	68
Tab. 23 Angebotene Oberflächendosis unter submersen Bedingungen und an der Luft-Flüssigkeitsschicht von SiO <sub>2</sub> -12 und SiO <sub>2</sub> -50 nm NPn.....	121
Tab. 24 Angaben zur gesamten deponierten Masse und Agglomerat-/Partikelanzahl bei der Exposition an der Luft-Flüssigkeitsschicht .....	123

## **Danksagung**

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit, die im Rahmen des Schwerpunktprogramms SPP1313 „Biological Responses to Nanoscale Particles“ angefertigt wurde (Projektnummer: WE 291816-1).