

# **Toxizität und Beeinflussung der DNA-Reparatur durch partikuläre Nickelverbindungen im Vergleich mit löslichem Nickel**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN  
(Dr. rer. nat.)

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

DISSERTATION

von  
Elena Maser  
staatlich geprüfte Diplom-Lebensmittelchemikerin

aus  
Glasow

Dekan: Prof. Dr. Willem Klopper  
Referent: Prof. Dr. Andrea Hartwig  
Korreferent: Prof. Dr. Holger Puchta  
Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2015



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Nanotechnologie .....</b>	<b>3</b>
2.1.1 Definition und Anwendungsbereich .....	3
2.1.2 Exposition und Risiken der Nanomaterialien.....	4
<b>2.2 Nickel und seine Verbindungen .....</b>	<b>5</b>
2.2.1 Vorkommen, Eigenschaften und Verwendung .....	5
2.2.2 Exposition und Toxikokinetik .....	6
2.2.3 Bioverfügbarkeit von Nickel und seinen Verbindungen.....	8
2.2.4 Kanzerogene Wirkung von Nickel und seinen Verbindungen .....	11
2.2.5 Tierexperimentelle Befunde.....	12
2.2.6 Toxische und genotoxische Wirkung.....	13
<b>2.3 Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP-1) .....</b>	<b>15</b>
2.3.1 Biologische Bedeutung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung.....	16
<b>3. Fragestellung.....</b>	<b>18</b>
<b>4. Material und Methoden .....</b>	<b>20</b>
<b>4.1 Charakterisierung der Partikel.....</b>	<b>20</b>
4.1.1 Partikuläre und lösliche Nickelverbindungen.....	20
4.1.2 Herstellung von Partikelsuspensionen .....	20
4.1.3 Verdünnungslinearität der Partikelsuspensionen .....	21
4.1.4 Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	21
4.1.5 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) .....	22
4.1.6 BET-Adsorptionsisotherme.....	22
4.1.7 Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX) .....	23
4.1.8 Reinheitsbestimmung mit ICP-MS.....	23
4.1.9 Sauerstoffanalyse mittels Trägergasheißextraktion (TGHE).....	23
4.1.10 Dynamische Lichtstreuung (DLS).....	23
4.1.11 Zetapotential .....	24
4.1.12 Löslichkeit der Partikel.....	25
4.1.13 Endotoxine.....	26
<b>4.2 Kultivierung und Behandlung der Zellen .....</b>	<b>26</b>
4.2.1 Zelllinien.....	26
4.2.2 Bedingungen in der Zellkultur.....	27
4.2.3 Auftauen und Kryokonservieren der Zellen .....	28
4.2.4 Inkubation der Zellen .....	28
<b>4.3 Zytotoxizität .....</b>	<b>28</b>
4.3.1 Zellzahl und Membranintegrität .....	28
4.3.2 WST-Test.....	29
<b>4.4 Genexpressionsanalyse .....</b>	<b>30</b>
<b>4.5 Quantifizierung von DNA-Strangbrüchen.....</b>	<b>33</b>

4.5.1	PM2-Assay.....	33
4.5.2	Alkalische Entwindung (AU) .....	34
<b>4.6</b>	<b>Zellzyklusverteilung.....</b>	<b>35</b>
<b>4.7</b>	<b>Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....</b>	<b>36</b>
<b>4.8</b>	<b>Einfluss auf die Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 .....</b>	<b>37</b>
<b>4.9</b>	<b>Quantifizierung der zellulären Poly(ADP-Ribosyl)ierung.....</b>	<b>37</b>
<b>4.10</b>	<b>Intrazelluläre Aufnahme mittels Graphitrohr-AAS .....</b>	<b>38</b>
<b>4.11</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>40</b>
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>41</b>
<b>5.1</b>	<b>Partikelcharakterisierung .....</b>	<b>41</b>
5.1.1	Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie.....	41
5.1.2	Spezifische Oberfläche mittels BET-Analyse .....	43
5.1.3	Dynamische Lichtstreuung (DLS) .....	44
5.1.4	Zetapotential .....	46
5.1.5	Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX) .....	46
5.1.6	Reinheit der Partikel.....	47
5.1.7	Bestimmung des Sauerstoffgehalts mittels Trägergasheißextraktion .....	48
5.1.8	Endotoxine .....	49
5.1.9	Linearität der Partikelverdünnungen.....	49
5.1.10	Löslichkeit der Nickelverbindungen .....	51
<b>5.2</b>	<b>Zytotoxizität von partikulären und löslichen Nickelverbindungen.....</b>	<b>52</b>
<b>5.3</b>	<b>Einfluss der verschiedenen Nickelverbindungen auf die Genregulation in BEAS-2B und A549 Zellen.....</b>	<b>56</b>
5.3.1	Anti-oxidative und pro-inflammatorische Gene.....	62
5.3.2	Metallhomöostase regulierende Gene.....	65
5.3.3	Einfluss auf Gene des Zellzyklusses .....	67
5.3.4	DNA-Reparatur-assoziierte Gene.....	69
5.3.5	Regulation der mit Apoptose-assoziierten Gene .....	69
5.3.6	Redox-sensitive Transkriptionsfaktoren.....	71
<b>5.4</b>	<b>Einfluss von Nickelverbindungen auf die Zellzyklusverteilung.....</b>	<b>74</b>
<b>5.5</b>	<b>Aktivierung der Caspasen 3/7 .....</b>	<b>76</b>
<b>5.6</b>	<b>Erhöhte Freisetzung der Entzündungsmediatoren IL-8 und IL-6 nach der Behandlung mit Nickelverbindungen.....</b>	<b>78</b>
<b>5.7</b>	<b>Genotoxisches Potential der partikulären und löslichen Nickelver- bindungen .....</b>	<b>81</b>
5.7.1	Geringe Induktion von DNA-Strangbrüchen in subzellulären und zellulären Testsystemen.....	81
5.7.2	Konzentrationsabhängige Zunahme der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induzierten DNA-Strangbrüche durch Fenton-ähnliche Reaktionen.....	84
<b>5.8</b>	<b>Einfluss von Nickelverbindungen auf die Einzelstrangbruchreparatur .....</b>	<b>88</b>
5.8.1	Inhibition der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induzierten Poly(ADP-Ribosyl)ierung durch Nickelverbindungen .....	88
5.8.2	Reparatur von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induzierten DNA-Strangbrüchen.....	93
<b>5.9</b>	<b>Bioverfügbarkeit der Nickelionen .....</b>	<b>95</b>
5.9.1	Intrazelluläre Nickelkonzentration.....	95
5.9.2	Einfluss von Endozytoseinhibitoren auf die Aufnahme der partikulären Nickelver- bindungen .....	97

<b>6. Zusammenfassende Diskussion .....</b>	<b>100</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>107</b>
<b>8. Anhang.....</b>	<b>123</b>



# 1. Zusammenfassung

Die Nanotechnologie gilt als eine der aktuell vielversprechendsten Technologien mit einem sehr hohen Innovationspotential in vielen industriellen Anwendungsgebieten. Gleichzeitig ist aber noch sehr wenig über die Wirkungen der Nanomaterialien auf Mensch und Umwelt bekannt. Um den sicheren Umgang mit Nanomaterialien zu gewährleisten, ist die Nanotoxikologie bestrebt frühzeitig das Risikopotential zu erkennen und Maßnahmen einzuleiten (Oberdörster et al. 2005b; Donaldson et al. 2004).

Partikuläre Nickelverbindungen im Nanometerbereich werden derzeit aufgrund der verbesserten Materialeigenschaften im Vergleich zu mikroskaligen Partikeln verstärkt in technischen Anwendungsbereichen wie zum Beispiel Elektrotechnik, Batterien oder Katalysatoren eingesetzt (Siddiqui et al. 2012; Zhang et al. 2003). Mit steigender Produktion und Verwendung erhöht sich allerdings für den Menschen das Risiko am Arbeitsplatz oder infolge einer Freisetzung in die Umwelt den Nickelverbindungen ausgesetzt zu sein.

Nickel und Nickelverbindungen wurden von der MAK-Kommission als krebserregend für den Menschen eingestuft (MAK 2001). Die IARC dagegen bewertete Nickelverbindungen als Humankarzinogen (Kategorie 1), wohingegen metallisches Nickel aufgrund unzureichender Daten bislang als möglicherweise karzinogen für den Menschen klassifiziert wurde (Kategorie 2B) (IARC 2011). Eine Risikobewertung von partikulären nanoskaligen Nickelverbindungen wurde bislang noch nicht herausgegeben. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob partikuläre nanoskalige Nickelverbindungen getrennt von anderen Nickelverbindungen zu bewerten sind, oder ob aufgrund ähnlicher Wirkmechanismen, innerhalb dieser Stoffgruppe extrapoliert werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das toxische Potential von partikulären nanoskaligen Nickelverbindungen in der alveolären Lungenepithelzelllinie A549 und der Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B mit verschiedenen *in vitro* Testmethoden untersucht. Im Fokus stand dabei die Frage, inwiefern die Auswirkungen der nanoskaligen Nickelverbindungen mit den bereits besser untersuchten Wirkmechanismen von gelöstem Nickel vergleichbar sind, oder ob hier aufgrund der veränderten Materialeigenschaften neue toxikologische Mechanismen auftreten, die bislang bei mikroskaligen und wasserlöslichen Nickelverbindungen keine Rolle gespielt haben.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden zunächst zeit- und konzentrationsabhängige Genexpressionsprofile von Nickel- (NiNP) und Nickeloxid Nanopartikeln (NiONP), sowie löslichem NiCl<sub>2</sub> erstellt. Dabei stellte sich heraus, dass die Substanzen in den Zelllinien A549 und BEAS-2B ein qualitativ vergleichbares Expressionsmuster aufwiesen, die Stärke der Genregula-

tion aber abhängig von der Zelllinie Unterschiede zeigte. Hierbei wurde vor allem die Expression von anti-oxidativen und pro-inflammatorischen Genen moduliert. Zudem wurde die Transkriptmenge von Apoptose- und Zellzyklusarrest-assoziierten Genen induziert. Aufbauend auf diesen Untersuchungsergebnissen wurden zum Vergleich der Verbindungen verschiedene biologische Endpunkte zur Zyto- und Genotoxizität herangezogen. Hierbei wirkten die Nickelverbindungen in BEAS-2B nicht nur pro-inflammatorisch, sondern auch zytotoxisch und proapoptotisch. In A549 Zellen konnten hingegen nur schwache Effekte nachgewiesen werden. Bei gleichen eingesetzten Nickelkonzentrationen zeigte NiCl<sub>2</sub> in den meisten Endpunkten die stärkste Wirkung, während die partikulären Verbindungen etwas schwächer, aber untereinander vergleichbar waren. Des Weiteren wurde in beiden Zelllinien ein Zellzyklusarrest beobachtet, der allerdings nicht durch genotoxischen Stress in Form von DNA-Einzelstrangbrüchen erklärt werden kann. Im Gegensatz dazu induzierten die Nickelverbindungen unter pro-oxidativen Bedingungen eine erhöhte DNA-Strangbruchrate, welche mit einer verminderten Poly(ADP-Ribosyl)ierung einherging. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Nickelverbindungen indirekt genotoxisch wirken, wobei die Katalyse von Fenton-ähnlichen Reaktionen sowie die Beeinflussung von DNA-Reparaturprozessen als beteiligte Wirkmechanismen identifiziert werden konnten.

Um der Frage nachzugehen, ob die nachgewiesenen biologischen Effekte mit der zellulären Aufnahme der Verbindungen korrelieren, wurde die Bioverfügbarkeit der Nickelverbindungen mittels GF-AAS untersucht. Obwohl in den meisten untersuchten biologischen Endpunkten die Wirkung von partikulären Nickelverbindungen schwächer ausgeprägt war, konnte in den Aufnahmestudien eine deutlich höhere intrazelluläre Nickelkonzentration im Vergleich zu löslichem NiCl<sub>2</sub> quantifiziert werden. Somit scheint die Bioverfügbarkeit des zellulär lokalisierten Nickels nach Behandlung mit den Partikeln einer anderen Kinetik zu folgen als bei Behandlung mit löslichen Verbindungen. Ebenso deuten die Ergebnisse daraufhin, dass letztlich die Nickelionen das toxische Agens darstellen. Wird die längere Retention von partikulären Nickelverbindungen in der Lunge im Vergleich zu löslichen Verbindungen berücksichtigt (Dunnick et al. 1995; Benson et al. 1994; Hirano et al. 1994), liefern die vorgestellten Ergebnisse Indizien dafür, dass auch nanoskalige partikuläre Nickelverbindungen ein hohes Risiko für den Menschen darstellen und deshalb ein dringender Bedarf für eine Risikobewertung besteht.

## 2. Einleitung

### 2.1 Nanotechnologie

#### 2.1.1 Definition und Anwendungsbereich

Im Jahr 1959 stellte der Physiker Richard Feynman auf dem Jahrestreffen der Amerikanischen Physikalischen Gesellschaft in seinem Vortrag mit dem Titel „There’s plenty of room at the bottom“ erstmals die zahlreichen Möglichkeiten der Nutzung nanoskaliger Materialien vor (Feynman 1992). Seitdem gewann die Nanotechnologie zunehmend an Bedeutung und die damals noch visionären Ideen Feynmans sind heute weitgehend Realität geworden.

Das heute als „Nanotechnologie“ bekannte Arbeitsfeld befasst sich mit der Herstellung, Untersuchung und Anwendung von Strukturen im Nanometerbereich (Oberdörster et al. 2005b). Üblicherweise werden unter „Nanomaterialien“ Objekte mit einer oder mehreren Dimensionen im Größenbereich von 1 – 100 nm verstanden (ISO 2008). Darüber hinaus wurde von der Europäischen Kommission im Jahr 2011 eine Empfehlung zur Definition von Nanomaterialien herausgegeben, die neben dem Größenbereich zusätzliche Merkmale zur Herkunft und Partikelgrößenverteilungen der Nanomaterialien berücksichtigt (EU-Kommission 2011).

Das Spektrum der Anwendungsgebiete für Nanomaterialien ist sehr breit und reicht vom Einsatz in der Elektronik- und Optikbranche über die Nutzung in der Medizin bis zum Gebrauch bei Kosmetika, Textilien und in der Lebensmittelindustrie (Buzea et al. 2007). Derzeit werden weltweit mehr als 1800 Konsumgüter vertrieben, die laut Hersteller mit Hilfe der Nanotechnologie hergestellt wurden oder Nanomaterialien enthalten (Vance et al. 2015).

Die zahlreichen neuen Anwendungsmöglichkeiten für nanoskalige Materialien basieren vor allem auf den veränderten Eigenschaften im Vergleich zu makroskalierten Materialien. Diese Eigenschaften werden im Wesentlichen durch das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen bestimmt. Dabei nimmt mit kleiner werdender Partikelgröße der Anteil der Oberflächenatome exponentiell zu. Dies resultiert in einer erhöhten Oberflächenreaktivität der Nanomaterialien, die für viele technische Anwendungen erwünscht ist (Kreyling et al. 2006).

## 2.1.2 Exposition und Risiken der Nanomaterialien

Die veränderten Materialeigenschaften im Nanobereich sind aber nicht nur für den gezielten technischen Einsatz von Bedeutung, sondern können nach Freisetzung in die Umwelt oder Exposition am Arbeitsplatz mit biologischem System interagieren und adverse Effekte hervorrufen (Nel et al. 2006). Als eine junge Wissenschaftsdisziplin hat es sich die Nanotoxikologie zur Aufgabe gemacht, die toxikologische Wirkung der Nanopartikel zu erforschen, um letztendlich den sicheren Umgang mit Nanopartikeln zu gewährleisten (Donaldson et al. 2004). Dabei müssen vor allem die physikochemischen Eigenschaften der Nanomaterialien wie die Größe, chemische Zusammensetzung und Ladung berücksichtigt werden, die zuvor bei makroskaligen Verbindungen keine Rolle gespielt haben (Boverhof & David 2010; Jiang et al. 2008).

Die Exposition des Menschen gegenüber Nanopartikeln kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Zum einen kann die Exposition über Produkte erfolgen, die technisch hergestellte Nanopartikel enthalten, wie beispielsweise Verpackungs- und Funktionsmaterialien, Medikamente, Lebensmittel oder Kosmetika. Zum anderen könnten Nanomaterialien beim Herstellen und Verarbeiten unbeabsichtigt freigesetzt werden (Borm et al. 2006).

Der Respirationstrakt, der Gastrointestinaltrakt (GIT) und die Haut stellen dabei die Haupteintrittspforten dar. Studien kommen zum Ergebnis, dass Nanomaterialien mit abnehmender Größe besser von den Atemwegen und dem Gastrointestinaltrakt resorbiert werden, in die Blutkapillaren oder Lymphe gelangen und von dort aus im Körper verteilt werden (Oberdörster et al. 2005). Zudem wurde beschrieben, dass Nanopartikel nach dem Einatmen von der Nasenschleimhaut über den Riechnerv direkt ins Gehirn gelangen können (Oberdörster et al. 2004). Ein weitere mögliche Aufnahme von Nanopartikeln kann über die Haut erfolgen, wobei dieser Weg eine untergeordnete Rolle spielt (Borm et al. 2006).

Die Verteilung auf periphere Gewebe kann nach dem als "differential protein adsorption" bekannten Konzept von Müller und Keck erfolgen. Dabei absorbieren die Nanopartikel nach der Inkorporation an ihrer Oberfläche Proteine oder Lipide, die den Partikeln eine biologische Identität verleihen und so die Aufnahme in Zellen bestimmen. Dieser Vorgang erfolgt in Abhängigkeit von den physikochemischen Eigenschaften der Partikeln (Müller & Keck 2004).

---

## 2.2 Nickel und seine Verbindungen

### 2.2.1 Vorkommen, Eigenschaften und Verwendung

Nickel ist mit einem Gewichtsanteil von 0,01% das 25. häufigste Element der Erdkruste. Es kommt selten rein vor, sondern ist in der Regel mit Eisen und Kupfer vergesellschaftet (Schaumlöffel 2012; Lide 2009). Industriell wird Nickel hauptsächlich aus den Erzen Garnierit und Magnetkies gewonnen (Hollemann & Wiberg 2002). Die wichtigsten Vorkommen finden sich in Kanada, Russland, Australien, Kuba und der französischen Inselgruppe Neukaledonien (Denkhaus & Salnikow 2002).

Das reine Nickel ist ein silbrig-weißes Übergangsmetall (kubisch-dichteste Packung) mit der Ordnungszahl 28, das der Gruppe 10 des Periodensystems angehört. Es verfügt über eine relativ hohe thermische und elektrische Leitfähigkeit. Es ist relativ beständig gegenüber nicht-oxidierenden Säuren, löst sich aber gut in verdünnter Salpetersäure. Der häufigste Oxidationszustand ist +II, in seltenen Fällen kann es auch die Oxidationstufe -I, 0, +I, +III und +IV annehmen (Hollemann & Wiberg 2002).

Nickelverbindungen lassen sich im Allgemeinen in leichte und schwerlösliche Verbindungen einteilen.  $\text{NiCl}_2$  zählt zu den leicht wasserlöslichen Verbindungen und liegt mit einer Koordinationszahl von sechs in der  $\text{CdCl}_2$ -Struktur vor. Bei Nickelmonoxid ( $\text{NiO}$ ) hingegen handelt sich um eine schwerlösliche Nickelverbindung, welche in der  $\text{NaCl}$ -Kristallstruktur vorliegt. Es löst sich leicht in Säuren. Reines  $\text{NiO}$  hat eine grüne bis graugrüne Färbung.  $\text{NiO}$  kann außerdem in Gegenwart von Sauerstoff und hohen Temperaturen zu höheren Oxiden weiteroxidiert werden. Dabei entstehen grau bis schwarz gefärbte Produkte (Mazinanian et al. 2013; Hollemann & Wiberg 2002).

Nickel wird wegen seiner Widerstandsfähigkeit gegenüber Luft und Wasser sowie der Zugfestigkeit, Härte und Duktilität zur Herstellung von Edelstahl, Nickellegierungen und Gusseisen verwendet. Nickelhaltige Legierungen werden in zahlreichen Alltagsgegenständen, wie Münzen, elektrischen Geräten, Batterien und Werkzeugen eingesetzt. Nickeloxid wird in der Galvanotechnik, bei der Herstellung von Emaille sowie als Nickelkatalysator bei chemischen Reaktion eingesetzt (IARC 2011).

Nickel und seine Verbindungen finden ebenfalls vermehrt Anwendung in Form von Nanopartikeln. Nickel Nanopartikel ( $\text{NiNP}$ ) werden zur Herstellung von Magnetbändern zur Datenspeicherung, in der chemischen Katalyse, Wärmeleitpasten, Mikrofiltern, Verbrennungsförderern, beim Niedertemperatur-Sintern und in der Lichtabsorption eingesetzt (Zhang et al. 2003). Nickeloxid Nanopartikel ( $\text{NiONP}$ ) zeichnen sich durch anti-ferromagnetische Eigenschaften aus und finden vermehrt als Kathodenmaterial in Batterien, Gasensoren und in Brennstoff-

zellen Anwendung (Siddiqui et al. 2012). Ferner finden die nanoskalige Verbindungen Einsatz als Katalysator bei der Herstellung von Carbon Nanotubes (CNT), welche herstellungsbedingt zu nicht vernachlässigbaren Teilen mit Nickel kontaminiert sein können (Liu et al. 2007).

## 2.2.2 Exposition und Toxikokinetik

Nickel gehört zu den essentiellen Spurenelementen. Für Pflanzen, Bakterien und Pilze ist Nickel essentiell und stellt einen wichtigen Bestandteil von vielen Enzymen dar. Diese Enzyme katalysieren eine Vielfalt von Reaktionen, welche dem Organismus ermöglichen sich an seine Umwelt anzupassen, z.B. durch Regulation des Stickstoffhaushalts (Li & Zamble 2009). Im Tierversuch zeigten sich bei Nickel-Mangel Wachstumseinschränkungen, eine Beeinflussung des Glucose-Stoffwechsels und der Methionin-Synthese, beim Menschen wurden bislang jedoch noch keine Nickel abhängigen Prozesse identifiziert (Hartwig 2010; Denkhaus & Salnikow 2002).

In der Allgemeinbevölkerung erfolgt die Hauptaufnahme von Nickel über die Nahrung. Abhängig von den Ernährungsgewohnheiten wird die tägliche Aufnahme von Nickel auf durchschnittlich 0,1 bis 0,3 mg Nickel pro Tag geschätzt (Schaumlöffel 2012). Dabei liegt die Resorptionsrate aus dem Gastrointestinaltrakt in Mittelwert bei  $0,7 \pm 0,4\%$  und hängt in erster Linie von der Zusammensetzung der Nahrung ab (Cempel & Nickel 2006). Rund ein Viertel der Nickelaufnahme erfolgt über das Trinkwasser, woraus Nickel bis zu 40-fach besser resorbiert wird als aus der Nahrung (Cempel & Nickel 2006; Denkhaus & Salnikow 2002). In Deutschland liegt der Nickelgehalt in Trinkwasser zwischen 5 und 23  $\mu\text{g/L}$  (Umweltbundesamt 2001). Daher lässt sich eine permanente, geringe Aufnahme durch den Menschen nicht verhindern und es befindet sich immer eine gewisse Menge (Durchschnittlich 7,3  $\mu\text{g/kg}$  Körpergewicht) an Nickel im Organismus (Denkhaus & Salnikow 2002).

Die dermale Aufnahme der Nickelverbindungen ist gering. Durch Hautkontakt mit Edelstahl, Schmuck, Münzen und anderen nickelhaltigen Gegenständen können Nickelionen durch Schweiß, Speichel oder andere Körperflüssigkeiten gelöst und als Haptene eine Sensibilisierung induzieren. Daraus können Nickel-induzierte allergische Erkrankungen der Haut wie die allergische Kontaktdermatitis entstehen (zusammengefasst in Thyssen et al. 2013; Roediger & Weninger 2011; Cempel & Nickel 2006).

Nach derzeitigen Schätzungen ist Nickel das mit Abstand häufigste Kontaktallergen. Die durchschnittliche Prävalenz durch Nickel sensibilisiert zu werden liegt bei etwa 8,6% der Allgemeinbevölkerung, wobei deutlich mehr Frauen als Männer betroffen sind (Thyssen et al. 2007).

Die Inhalation stellt ebenfalls einen Aufnahmeweg von Nickel dar. Als natürlicher Bestandteil der Erdkruste gelangt Nickel durch Vulkaneruption, Verwitterung und Erosion der Gesteine in

die Umwelt, die natürlichen Quellen tragen jedoch im Vergleich zur anthropogenen Emission nur geringfügig zur Gesamtfreisetzung von Nickel bei. Vor allem in der Nähe von Müllverbrennungsanlagen, Metallhütten und bei der Verbrennung von fossilen Rohstoffen werden hohe Konzentrationen an Nickel freigesetzt (IARC 2011).

In ländlichen oder städtischen Gebieten liegt die Nickelkonzentration der Luft in der Regel zwischen 0,005 und 0,03  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (IARC 2011). In der nickelproduzierenden und -verarbeiteten Industrie konnten am Arbeitsplatz deutlich höhere Konzentrationen von 0,03 – 0,7  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  gemessen werden (IARC 2011; Cempel & Nickel 2006). Insgesamt trägt die inhalative Nickelaufnahme (0,2 – 1  $\mu\text{g}/\text{Tag}$ ) von nicht-rauchenden Stadtbewohnern aber nur 0,1 bis 1% zur Gesamtaufnahme an Nickel bei (Umweltbundesamt 2001). Die Arbeiter in der nickelproduzierenden und -verarbeitenden Industrie sind berufsbedingt höheren Nickelkonzentrationen ausgesetzt als die Allgemeinbevölkerung, daher stellt für diesen Teil der Bevölkerung die Inhalation den Hauptexpositionsweg dar (Schaumlöffel 2012).

Abhängig von ihrer Größe, der individuellen Atmung sowie eventuellen pathophysiologischen Veränderungen der Lunge gelangen die Partikel bis in die unteren Teile des Respirationstraktes. Mit abnehmendem aerodynamischem Durchmesser steigt die Wahrscheinlichkeit, dass die Partikel tiefer in die Lunge vordringen. In der Modellrechnung von Kreyling et al. (2006) werden inhalierbare Partikel mit einem Durchmesser von 10  $\mu\text{m}$  zu 80% im Nasen-Rachen-Kehlkopfbereich abgeschieden. Mit abnehmender Größe gelangen die Partikel in tiefere Lungenregionen. Ab 0,1  $\mu\text{m}$  nimmt die Depositionsmenge in den Alveolen deutlich zu und erreicht bei einem Durchmesser von 20 nm ihr Maximum. Noch kleinere Partikel werden hingegen wieder vermehrt aufgrund des größeren Diffusionsvermögens im Tracheo-Bronchialbaum und den oberen Atemwegen deponiert. Die Halbwertszeit der Partikel im Atemtrakt hängt von der natürlichen Clearance, Größe, Oberfläche sowie Löslichkeit der Partikel ab (Kreyling et al. 2006).

So können im Nasen-Rachen-Kehlkopfbereich die Partikel durch Niesen, Ausatmen oder Aus husten aus dem Körper entfernt werden. In diesem Bereich der Atemwege ist die Clearance spätestens nach wenigen Stunden abgeschlossen. Im Tracheo-Bronchialbereich werden die Partikel gemeinsam mit dem Mukus durch die Bewegung der Zilien über die sogenannte respiratorische Leiter zum Rachenraum transportiert und durch Verschlucken in den GIT aufgenommen. Im Alveolarbereich findet keine mukoziliäre Reinigung statt. Makrophagen können die aufgenommenen Partikel aber prinzipiell in Richtung des mukoziliären Reinigungssystems der oberen Atemwege transportieren und dadurch dem GIT zuführen. Die verbleibenden Partikel können von den alveolären Epithelzellen aufgenommen und direkt über das Interstitium oder indirekt über das Lymphsystem in den Blutkreislauf übertreten (zusammengefasst in Oberdörster et al. 2005; Kreyling et al. 2006).

Nach der größenabhängigen Deposition entscheidet die Löslichkeit der Partikel maßgeblich die Resorption und Halbwertszeit in der Lunge (Schaumlöffel 2012). Hirano et al. (1994) konnte in Instillationsstudien an Wistar Ratten zeigen, dass die Halbwertszeit von Nickelsulfat in der Lunge nach einmaliger Applikation 32 h betrug (Hirano et al. 1994). In Inhalationstudien von schwerlöslichen Nickelverbindungen hingegen verlängerte sich die Halbwertszeit und betrug bei Exposition mit Nickelsubdisulfid 4 – 6 Tage und durch Applikation von grünem Nickeloxid sogar 120 Tage (Benson et al. 1994).

Nach der Resorption wird Nickel vor allem an Albumin, daneben aber auch an L-Histidin und  $\alpha$ 2-Makroglobulin gebunden und über das Blut gleichmäßig im Körper verteilt (Sunderman 1993). Die Elimination des aufgenommenen Nickels über den Atemtrakt erfolgt hauptsächlich renal, während intestinal resorbierte Nickelverbindungen vor allem über den Fäzes und nur in geringem Umfang über den Urin ausgeschieden werden (Patriarca et al. 1997; Angerer & Lehnert 1990; Christensen & Lagesson 1988).

### **2.2.3 Bioverfügbarkeit von Nickel und seinen Verbindungen**

Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse aus den vergangenen Jahrzehnten lässt sich die kanzergene Wirkung von Nickel und seinen Verbindungen auf die Freisetzung von Nickelionen zurückführen (Hartwig 2010; Kasprzak 2003). Dabei wird die substanzspezifische Wirkung der löslichen und schwerlöslichen Verbindungen in der Literatur mit der unterschiedlichen Bioverfügbarkeit und längerer Persistenz von partikulären Verbindungen begründet (Muñoz & Costa 2012; Ke et al. 2007). Nickelionen aus leichtlöslichen Nickelsalzen werden über Ionenkanäle aufgenommen (Davidson et al. 2005; Denkhaus & Salnikow 2002; Funakoshi et al. 1997), schwerlösliche Metallverbindungen hingegen werden phagozytiert und aufgrund des in den Lysosomen vorherrschenden sauren pH-Wertes erst in der Zelle gelöst (Studer et al. 2010; Limbach et al. 2007). Nach derzeitigen Modellen erfolgt die Aufnahme der unlöslichen Verbindungen hauptsächlich über Phagozytose bzw. Makropinozytose und/oder Clathrin-vermittelte Endozytose (Muñoz & Costa 2012). Im nachfolgenden Abschnitt werden die einzelnen Aufnahmemechanismen erläutert und die Einflussfaktoren diskutiert.

### 2.2.3.1 Endozytosemechanismen

Die Endozytose wird grundsätzlich in zwei Formen unterteilt. Die Phagozytose ist spezialisierten Zellen wie Makrophagen und Zellen des Immunsystems, wie neutrophilen Granulozyten oder dendritischen Zellen, vorbehalten und dient der Aufnahme von Mikroorganismen und apoptotischen Zellen, aber auch festen Partikeln (Flannagan et al. 2012). Die Pinozytose kann hingegen in nahezu allen Zellen stattfinden. Dieser Prozess lässt sich weiter in die Makropinozytose, die Clathrin- und Caveolae-abhängige sowie die Clathrin- und Caveolae-unabhängige Endozytose unterteilen (Mayor & Pagano 2007).

Bei der Phagozytose wird nach Aktivierung von Membranrezeptoren durch Polymerisierung das Aktin-Zytoskelett reorganisiert. Dies führt zu Membranausstülpungen, welche das gebundene Substrat in Form eines Phagosoms in die Zelle einschleusen (Flannagan et al. 2012). Im weiteren Prozess der Endozytose reifen diese Vesikel zu späten Endosomen und verschmelzen letztendlich mit primären Lysosomen zu sekundären Endolysosomen. Letztere weisen einen niedrigen pH-Wert von 4,5 – 5,0 auf, der durch die Aktivität der V-Typ-ATPase Protonenpumpe aufrechterhalten wird (Flannagan et al. 2012). Durch das saure Milieu in den Lysosomen wird das internalisierte Material degradiert, was bei der Aufnahme von Metallpartikeln eine wichtige Rolle spielt (Studer et al. 2010). Phagosomen können einen Durchmesser bis zu 10 µm erreichen (Mercer & Helenius 2009).

Im Gegensatz dazu werden bei der Makropinozytose wesentlich kleinere Vesikel, zwischen 0,5 bis 10 µm, internalisiert (Ivanov 2008; Conner & Schmid 2003).

Ähnlich wie bei der Phagozytose, verläuft die Internalisierung in einem Aktin-abhängigen Prozess, wobei sich Zellmembranausstülpungen infolge Aktivierung von Rho-GTPasen ausbilden. Anders als bei der Phagozytose wird der Fremdkörper jedoch nicht von mehreren Seiten von der Membran umhüllt, sondern wird durch eine einseitige Membranausstülpung umschlossen, die schließlich über dem Fremdkörper kollabiert und nach Fusion mit der Plasmamembran als Makropinosom internalisiert wird. Der Mechanismus konnte bislang jedoch nicht im Detail aufgeklärt werden. Intrazelluläre Vesikel der Makropinosomen stehen wie die Phagosomen in Kontakt mit dem endosomalen System und verschmelzen letztlich mit lysosomalen Kompartimenten (zusammengefasst in Conner & Schmid 2003).

Eine Form der Pinozytose stellt die Clathrin-abhängige Endozytose dar. Dabei werden nach der Bindung des Substrats an die Zelloberflächenrezeptoren die Clathrin-Moleküle aus dem Zytosol an die Plasmamembran rekrutiert und der Ligand-Rezeptor-Komplex vollständig umhüllt. Durch eine Konformationsänderung werden in Abhängigkeit von sogenannten Dynamin-Proteinen die „clathrin-coated vesicles“ von der Zellmembran abgeschnürt. Das Hitzeschockprotein (HSC70) baut unter Verbrauch von ATP die Clathrin-Hülle ab, worauf das Vesikel zu einem späten Endosom reift. Während die Rezeptoren wieder verwertet werden, verschmilzt das verbleibende

Vesikel mitsamt seiner Fracht mit lysosomalen Kompartimenten (zusammengefasst in McMahon & Boucrot 2011).

Bei der Caveolae-vermittelten Endozytose wird im Bereich der Lipid Rafts durch Polymerisierung von Caveolin-1 und Caveolin-2 intrazellulär die Oberfläche der Plasmamembranvertiefung umhüllt. Danach wird unter Beteiligung von Dynamin das Vesikel von der Plasmamembran abgeschnürt und in die Zelle internalisiert. In Gegensatz zur Clathrin abhängigen Endozytose reift das Vesikel nicht ausschließlich zum Lysosom heran, sondern kann als Caveosom im Zytosol verbleiben oder mit dem Golgi-Apparat oder dem endoplasmatischen Retikulum verschmelzen (zusammengefasst in Pelkmans & Helenius 2002).

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Endozytosemechanismen existiert aber noch eine Vielzahl weiterer Aufnahmeprozesse, welche Clathrin- und Caveolae- unabhängig verlaufen (Johannes et al. 2015; Bishop et al. 2007; Nichols & Lippincott-Schwartz 2001). Für die Internalisierung von Nanomaterialien lässt sich kein universell gültiger Aufnahmemechanismus feststellen. Vielmehr konnten in einer Vielzahl von Studien sämtliche vorherig beschriebenen Formen der Endozytose, aber auch unspezifische Aufnahmemechanismen beobachtet werden (Unfried et al. 2007). Welcher der genannten Mechanismen im einzelnen Fall auftritt, ist dabei von mehreren Faktoren abhängig und wird in den nachfolgenden Abschnitt diskutiert.

### **2.2.3.2 Einfluss von Parametern auf die Endozytose von Nanopartikeln**

Die Aufnahme von Partikeln wird maßgeblich durch die physikochemischen Eigenschaften wie Größe, Form und Oberflächeneigenschaften bestimmt (Jiang et al. 2008; Limbach et al. 2007). So konnten Aufnahmestudien zeigen, dass die Aufnahmen von Partikel über Clathrin-vermittelte Endozytose auf eine obere Grenze von 200 nm limitiert sind (McMahon & Boucrot 2011). Über den Caveolae-vermittelten Mechanismus können Partikel von bis zu 500 nm aufgenommen werden (Rejman et al. 2004) und bei der Makropinozytose werden Partikel mit einer Größe bis zu 10 µm internalisiert (Mercer & Helenius 2009). Auch über die Phagozytose werden große Partikel aufgenommen, wobei hier das Zellvolumen den limitierenden Faktor darstellt (Champion & Mitragotri 2006). Es scheint ein Größenoptimum bei den Aufnahmen zu geben (Chithrani & Chan 2007), weshalb nicht per sé gesagt werden kann „je kleiner desto besser die Aufnahme“. Neben der Größe bestimmt auch die Form der Partikel den Aufnahmeweg und dessen Effizienz. So haben Untersuchungen von Chithrani und Chan (2007) gezeigt, dass sphärische Partikel um ein Vielfaches besser aufgenommen werden als Stäbchen, denn sie besitzen einen viel größere Kontaktfläche zur Membran und werden deshalb schneller internalisiert (Chithrani & Chan 2007). Ebenso ist in der Literatur beschrieben, dass die Orientierung von Partikeln zu der Membranoberfläche einen erheblichen Einfluss auf die Form der

Endozytose ausübt (Herd et al. 2013; Champion & Mitragotri 2006). Die Oberflächenladung der Partikel kann die Effizienz der Internalisierung ebenfalls erheblich beeinflussen. Positiv geladene Partikel können mit polaren Gruppen der Lipiddoppelschicht interagieren und dadurch besser aufgenommen werden. Entsprechend verläuft die Aufnahme von negativ geladenen Partikel langsamer (Verma & Stellacci 2010). Partikel können in Abhängigkeit von Ladung, Größe und chemischer Zusammensetzung, Proteine aus dem Zellkulturmedium an der Oberfläche adsorbieren, wodurch es zur Ausbildung einer Proteinkorona kommt (Monopoli et al. 2012; Lundqvist et al. 2008). Diese wiederum kann einen Einfluss nicht nur auf die Endozytose, sondern auch auf die biologische Wirkung der Partikel haben (Lesniak et al. 2012; Panas et al. 2012). Darüber hinaus können Proteine auch die Agglomeration der Partikel beeinflussen, die wiederum Einfluss auf die Sedimentation der Partikel hat, wodurch die Proteine indirekt zu veränderten Endozytoseeffizienzen führen können (Nienhaus et al. 2013; Hinderliter et al. 2010). Der verwendete Zelltyp kann ebenfalls einen großen Einfluss auf die Aufnahmen haben (Kettler et al. 2014).

#### **2.2.4 Kanzerogene Wirkung von Nickel und seinen Verbindungen**

Studien über einen möglichen Zusammenhang zwischen der Nickelexposition der Allgemeinbevölkerung und Entstehung von Krebs stehen nicht zur Verfügung (Schaumlöffel 2012). Jedoch konnte anhand epidemiologischer Studien für Arbeiter in der Nickel-verarbeitenden Industrie im Vergleich zu der Allgemeinbevölkerung ein erhöhtes Lungenkrebsrisiko in den oberen Atemwegen festgestellt werden. Dies geht aus dem Bericht des International Committee on Nickel Carcinogenesis in Man (ICNCM) aus dem Jahr 1990 hervor (IARC 2011; IARC 1990). Dabei wurde eine umfassende epidemiologische Analyse mit 80.000 berufsbedingt exponierten Arbeitern an verschiedenen Standorten und mit unterschiedlichen Tätigkeiten durchgeführt (Schaumlöffel 2012). Unter der Berücksichtigung des Raucherstatus konnte für einige Betriebe eine Korrelation zwischen der kumulativen Exposition gegenüber wasserlöslichen sowie partikulären Nickelverbindungen und dem Auftreten von Lungenkrebs festgestellt werden (Grimsrud et al. 2002; Andersen et al. 1996). Durch Untersuchung einzelner Subkohorten wurde sogar eine unterschiedliche Inzidenz von Lungenkrebs an verschiedenen Standorten beobachtet, wodurch Rückschlüsse auf die Potenz der dort vorherrschenden Nickelverbindungen in der Luft gezogen werden konnten (IARC 2011; MAK 2001). Die Assoziation der Krebsentstehung mit löslichen Nickelverbindungen geht auf Beobachtungen von einer Raffinerie in Kristiansand, Norwegen zurück. Hier waren die Kohorten in der elektrolytischen Raffination stark gegenüber löslichen Verbindungen und vergleichsweise geringfügig gegenüber schwerlöslichen Verbindungen exponiert. In dieser Gruppe traten gehäuft Lungen- und Nasenhöhlelntumore auf

(Grimsrud & Andersen 2012). Keine starke Evidenz lag für die Krebsentstehung nach beruflicher Exposition gegenüber metallischem Nickel vor. Bei Beschäftigten der Raffinerie in Clydach, Großbritannien wurden Krebsfälle insbesondere beim Verarbeiten von Nickel-Kupfer-Material zu Nickeloxid beobachtet (IARC 2011; MAK 2001).

Jedoch muss bei der Interpretation der epidemiologischen Befunde berücksichtigt werden, dass an Arbeitsplätzen selten eine Exposition gegenüber nur einer einzelnen Nickelverbindung vorliegt, sondern die Arbeiter in der Regel einer Mischung aus verschiedenen Nickelverbindungen und zum Teil anderer anorganischer Verbindungen (z. B. Kupfer und Arsen) ausgesetzt waren (Grimsrud et al. 2005). Darüber hinaus fehlen in den überwiegenden Fällen Daten über die Größe der Partikel, sowie Angaben zum Lebensstil der exponierten Personen (Oller et al. 1997). Um substanzspezifische Effekte zu charakterisieren wird die Wirkung der einzelnen Nickelverbindungen in *in vivo* Experimenten untersucht. Hierbei wurden sowohl Inhalationsstudien als auch intratracheale Instillation und intraperitoneale, subkutane und intramuskuläre Injektion durchgeführt (IARC 2011; MAK 2001). Im Folgenden werden nur Studien mit Inhalation und intratrachealer Instillation berücksichtigt.

## 2.2.5 Tierexperimentelle Befunde

Bei einer systematischen Untersuchung von Nickelspezies wurden im Rahmen des United States National Toxicology Program die Verbindungen Nickelsulfat, grünes Nickeloxid und Nickelsubdisulfid in zweijährigen Inhalationsstudien an Mäusen und Ratten getestet. Im untersuchten Zeitraum führte Nickelsulfat in keinem der Tiere zu einer erhöhten Anzahl an Lungentumoren. Nach der Behandlung mit partikulären Verbindungen nahm die Anzahl an Lungentumoren dagegen zu (IARC 2011; MAK 2001).

Anhand weiterer *in vivo* Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass über einen Zeitraum von bis zu 6 Monaten nanoskalige NiO Partikel eine stärkere biologische Wirkung aufwiesen als die mikroskaligen NiO Partikel. Histologische Untersuchungen belegen, dass nach intratrachealer Instillation von NiONP deutliche Anzeichen für Lungenentzündung und Lungenfibrose bei den Tieren auftraten. Die toxische Wirkung von mikroskaligen NiO Partikeln fiel im Vergleich zu den kleineren Partikeln jedoch gering aus (Kadoya et al. 2012; Ogami et al. 2009).

Zhang et al. (1998a) testeten nanoskalige Nickelpartikel (< 20 nm) an Wistarratten auf ihr toxisches Potential. Dabei wurden NiNP in einer Konzentration von 1 mg/mL intratracheal appliziert und die Tiere nach verschiedenen Expositionszeiten untersucht. Die behandelten Tiere wiesen ein erhöhtes Lungengewicht auf und in der bronchoalveolären Lavage konnte eine höhere extrazelluläre LDH-Aktivität sowie eine erhöhte Zahl an Neutrophilen und Makrophagen festgestellt werden. Des Weiteren wurde in den Lungen eine erhöhte Lipidperoxidation detektiert.

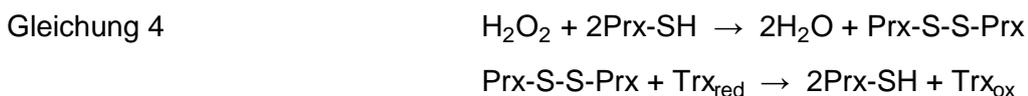
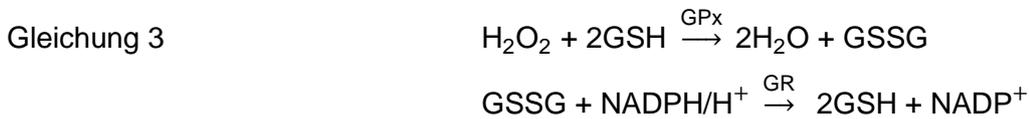
Die Toxizitätsmarker waren direkt nach der einmaligen Instillation mit Partikeln am stärksten ausgeprägt und nahmen mit zunehmender Zeit stetig ab, erreichten jedoch auch noch nach 30 Tagen nicht das Niveau der Kontrolltiere. Die Autoren vermuten die Bildung von ROS als Ursache der toxischen Wirkung (Zhang et al. 1998a). In anschließenden Studien durch Zhang et al. (2003) und Dick et al. (2003) wurden die gleichen NiNP sowie zusätzlich mikroskalige Nickelpartikel ( $< 5 \mu\text{m}$ ) in einem größeren Konzentrationsbereich untersucht. Die Ergebnisse von NiNP unterschieden sich nicht von den zuvor publizierten Daten und sind zum Teil durch weitere getestete Parameter bestätigt worden. Zusätzlich wurden Entzündungsreaktionen als Folge der NiNP-Applikation beobachtet. Durch Vergleich mit ebenfalls getesteten mikroskaligen Nickelpartikel, die weniger starke Effekte hervorriefen, wurde darauf geschlossen, dass die Größe der Oberfläche der getesteten Partikel eine wichtige Rolle spielen muss (Dick et al. 2003; Zhang et al. 2003).

## 2.2.6 Toxische und genotoxische Wirkung

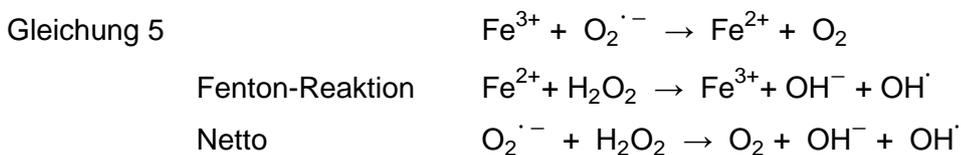
Zu den postulierten toxischen Wirkmechanismen der Nickelverbindungen gehört neben der Generierung von ROS sowie der Inaktivierung von Schutzenzymen ebenfalls die Beeinflussung von DNA-Reparatursystemen (Kasprzak 2003; Hartwig & Schwerdtle 2002). Die Bildung von ROS verläuft in erster Linie indirekt, durch die Inaktivierung von Abwehrmechanismen gegenüber ROS. Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass sowohl die Aktivität als auch die Genexpression von detoxifizierenden Enzymen nach der Verabreichung von löslichen und partikulären Nickelverbindungen *in vivo* und *in vitro* verringert wurde (Guo et al. 2014; Tang et al. 2014; Wu et al. 2013; Rodriguez et al. 1990). Zu den detoxifizierenden Enzymen gehört unter anderem Superoxiddismutase (SOD), Katalase (CAT), Glutathionperoxidase (GPx), Peroxiredoxin (Prx) (Hartwig 2013). Die SOD katalysiert die Umsetzung von Superoxidradikalanionen ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) zu Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), das in der Zelle weiter zu Wasser detoxifiziert wird (Gleichung 1) (Afonso et al. 2007). Die ausschließlich in Peroxisomen vorkommende Katalase katalysiert die Dismutation von Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser (Gleichung 2) (Rhee et al. 2005).



Die GPx benötigt zusätzlich GSH als Kofaktor, welches dabei zu GSSG oxidiert wird (Gleichung 3). In einer NADPH/H<sup>+</sup>-abhängigen Reaktion wird es in Gegenwart von Glutathionreduktase (GR) wieder zu GSH reduziert (Rhee et al. 2005). Die Prx-katalysierte Reaktion ist hingegen an den Thio-redoxinzyklus gekoppelt (Gleichung 4) (Arnér & Holmgren 2000).



Bei einer unzureichenden Detoxifizierung kann das Wasserstoffperoxid in Anwesenheit von Übergangsmetallionen wie Kupfer, Eisen und Nickel durch Fenton- und Fenton-ähnliche Reaktionen in das hochreaktive Hydroxylradikal zerfallen (Gleichung 5). Wird das bei der Fenton-Reaktion oxidierte Metallion in Anwesenheit von Superoxidradikalanionen wieder reduziert, entsteht ein Reaktionszyklus, die sogenannte Haber-Weiss Reaktion, die in einer verstärkten Schädigung von zellulären Strukturen resultiert (zusammengefasst in Halliwell 1996)



Das Hydroxylradikal zählt zu den reaktivsten ROS und reagiert aufgrund des hohen Reaktionspotentials mit fast jeder Art von Molekülen. Deshalb ist die Halbwertszeit der Hydroxylradikale sehr kurz und Diffusionsstrecke vergleichsweise gering (Saran & Bors 1989). Zahlreiche Untersuchungen konnten im subzellulären als auch im zellulären System zeigen, dass Nickelverbindungen eine erhöhte Anzahl an oxidativen DNA-Schäden in Form von 7,8-Dihydro-8-oxoguanin (8-oxoG) induzieren (Schwerdtle & Hartwig 2006; Kawanishi et al. 2002; Kasprzak et al. 1992). Jedoch scheint neben der ROS-vermittelten Induktion von oxidativen DNA-Schäden auch eine indirekte Schädigung der DNA über eine Reparaturhemmung, und somit eine Anreicherung der induzierten oxidativen DNA-Schäden durch Nickelionen, möglich (Hartwig & Schwerdtle 2002). Untersuchungen von Dally und Hartwig (1997) belegen, dass die Reparatur von lichtinduzierten oxidativen DNA-Schäden in Gegenwart von NiCl<sub>2</sub> verlangsamt abläuft und auf eine Beeinträchtigung der DNA-Exzisions-Reparatur hinweist. Eine verlangsamte DNA-Reparatur in Gegenwart von Nickel konnte ebenfalls nach Behandlung mit anderen geno-

toxischen Agenzien wie UV-Strahlung, Benzo[ $\alpha$ ]pyren-7,7-diol-9,10-epoxid und methylierenden Agenzien detektiert werden (Schwerdtle et al. 2002; Takahashi et al. 2000; Krueger et al. 1999; Hartwig et al. 1994; Lee-Chen et al. 1993). Mechanistische Untersuchungen zum Einfluss von Nickelverbindungen auf die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) belegen, dass durch Nickelionen die Schadenerkennung beeinträchtigt wird (Hartmann & Hartwig 1998) und die DNA-Bindungs-fähigkeit von isoliertem Xeroderma Pigmentosum A (XPA) in Gegenwart von Nickelionen vermindert wurde (Asmuss et al. 2000). Zinkfinger-Strukturen (ZnF) stellen dabei einen potentiellen Angriffspunkt für Nickelionen dar. So haben die Untersuchungen von Bal et al. (2003) gezeigt, dass die Zinkionen im XPA-ZnF-Peptid in Anwesenheit von Nickelionen substituiert werden und der Funktionsverlust auf eine Konformationsänderung der ZnF zurückzuführen ist. Ebenso konnten die Autoren belegen, dass die Thiolgruppen in Gegenwart von Nickelionen oxidiert wurden, was ebenfalls zu einer Zink-Freisetzung und dem Funktionsverlust des Proteins führt (Bal et al. 2003).

Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass in Gegenwart von Nickelverbindungen die redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 aktiviert werden (Capasso et al. 2014; Xu et al. 2011; Schmidt et al. 2010; Cruz et al. 2004). NF- $\kappa$ B und AP-1 regulieren zahlreiche Zielgene und spielen bei unterschiedlichen biologischen Prozessen, wie u.a. bei der Regulation von Entzündungsprozessen oder der Zellproliferation, eine zentrale Rolle (Sen & Packer 1996). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sowohl lösliche als auch partikuläre Nickelverbindungen *in vitro* den Transkriptionsfaktor HIF-1 (hypoxia inducible transcription factor) aktivieren (Pietruska et al. 2011). HIF-1 besteht aus der konstitutiv exprimierten  $\beta$ -Untereinheit und einer  $\alpha$ -Untereinheit, die nach ihrer Bildung schnell hydroxyliert und über das Von Hippel-Landau Tumorsuppressor Protein ubiquitiniert wird (Manalo et al. 2005; Schofield & Ratcliffe 2005).

Untersuchungen haben gezeigt, dass durch Nickelionen die Funktion der Prolyl-Hydroxylase, welche an der Hydroxylierung der  $\alpha$ -Untereinheit beteiligt ist, gestört wird. Es wird angenommen, dass die Eisenionen aus dem aktiven Zentrum der Prolyl-Hydroxylase durch Nickelionen verdrängt werden. Aufgrund der geringeren Redoxaktivität von Nickelionen wird die Funktion des Proteins beeinträchtigt, was eine verringerte HIF-1 $\alpha$  Degradation zur Folge hat. Die resultierende Stabilisierung des HIF-1 Komplex führt zur verstärkten Expression von Genen, die die Zelltransformation und Tumorprogression fördern (zusammengefasst in Maxwell & Salnikow 2004).

## 2.3 Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP-1)

Bei Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1) handelt es sich um ein kernlokalisiertes 113 kDa Zinkfingerprotein, das eine wichtige Rolle bei der DNA-Reparatur spielt. PARP-1 besteht aus

der N-terminalen DNA-bindenden Domäne, der zentralen Automodifikationsdomäne und der carboxyterminalen NAD<sup>+</sup>-bindenden Domäne, die auch als katalytische Domäne bezeichnet wird (D'Amours et al. 1999).

Die 46 kDa große DNA-bindende Domäne verfügt über eine Kernlokalisationssequenz, eine Bindungsstelle für Caspasen und drei Zinkfingerstrukturen (ZnF I-III). Bei ZnF I und ZnF II handelt es sich um homologe Cys<sub>3</sub>His<sub>1</sub>-Zinkfinger, welche für die Bindung an die geschädigte DNA unentbehrlich sind (zusammengefasst in D'Amours et al. 1999; Schreiber et al. 1992). In ZnF III wird Zink durch vier Cysteinreste koordiniert. Dieser ZnF spielt bei Protein-Protein-Interaktionen und bei der Aktivierung der PARP-1 eine wichtige Rolle (Langelier et al. 2010).

Mit Hilfe der Automodifikationsdomäne ist PARP-1 in der Lage mit anderen Proteinen zu interagieren und DNA-Reparaturproteine zu rekrutieren. Weiterhin ist diese Domäne für die Automodifikation der PARP-1 essentiell (zusammengefasst in Langelier & Pascal 2013; Hassa & Hottiger 2008).

Die katalytische Domäne ist hoch konserviert und im carboxy-terminalen Bereich lokalisiert. Bei der katalysierten Reaktion wird unter Spaltung des Kofaktors NAD<sup>+</sup> ein ADP-Ribose-Monomer auf Glutamat- und Aspartat-Reste der Akzeptorproteine übertragen. Infolge der Addition von weiteren ADP-Ribose-Einheiten entsteht ein bis zu 200 Einheiten langes Poly(ADP-Ribose)-Polymer, das an jeder zwanzigsten bis fünfzigsten Einheit verzweigt sein kann (D'Amours et al. 1999).

Das Polymer besitzt nur eine geringe Halbwertszeit und wird nach nur wenigen Minuten wieder zu ADP-Ribose-Monomeren degradiert. Dieser Prozess wird durch die Poly(ADP-Ribose)-Glykohydrolase (PARG) katalysiert (Davidovic et al. 2001). PARG kann auf Grund seiner Endo- und Exoglykosidase-Aktivität die glykosidischen Bindungen zwischen Mono(ADP-Ribose)-Einheiten sowohl innerhalb der linearen Kette als auch an dessen Verzweigungspunkten spalten. Die Entfernung des initialen Monomers vom Substrat wird von der ADP-Ribose-Protein-Lyase katalysiert (D'Amours et al. 1999).

### **2.3.1 Biologische Bedeutung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung**

PARP trägt durch Beteiligung an verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen entscheidend zur genomischen Stabilität bei (Kim et al. 2005). Dabei zählt die Einzelstrangbruchreparatur zu den am besten untersuchten Prozessen. Nach der Induktion eines direkten DNA-Einzelstrangbruchs erfolgt durch PARP zunächst die Schadenserkenkung (Beneke & Bürkle 2007).

Die anschließende Automodifizierung rekrutiert XRCC1 (X-ray repair cross-complementing protein 1) und DNA-Ligase III $\alpha$  (Lig III $\alpha$ ), welche die PARP-1 verdrängen und als Plattform für die Anlagerung weiterer Proteine dienen. Unter Beteiligung der Enzyme Polynukleotid-Kinase/

Phosphatase (PNKP), APE1 (Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1) sowie DNA-Polymerase  $\beta$  (Pol $\beta$ ) erfolgt die Prozessierung des Einzelstrangbruches und die anschliessende Ligation (zusammengefasst in Caldecott 2003; Caldecott 2001; Whitehouse et al. 2001).

PARP spielt nicht nur in der Reparatur von Einzelstrangbrüchen, sondern auch in der DNA-Doppelstrangbruchreparatur sowie der Reparatur von UV-induzierten Schäden eine Rolle (Rouleau et al. 2010). Ebenso wird durch die Poly(ADP-Ribosyl)ierung von Histonen eine Relaxation des Chromatins induziert und ermöglicht somit einen besseren Zugang von anderen DNA Reparaturfaktoren an den Schaden (Beneke 2012; Caldecott 2007). PARP-1 kann ebenfalls die Replikation und korrekte Verteilung der genetischen Erbinformation regulieren, indem es mit Proteinen des Replikationskomplexes sowie Proteinen im Zentrosom wechselwirkt (Beneke & Bürkle 2007; Kim et al. 2005).

### 3. Fragestellung

Partikuläre nanoskalige Nickelverbindungen verfügen über neuartige Materialeigenschaften von großer industrieller Bedeutung und werden daher in zunehmendem Maße produziert und verarbeitet. Mit steigender Produktion und Verwendung erhöht sich allerdings für den Menschen das Risiko, am Arbeitsplatz oder in Folge einer Freisetzung in die Umwelt den Nickelverbindungen ausgesetzt zu sein. Zudem könnten die neuartigen Materialeigenschaften auch zu toxikologischen Wirkungen führen, die bislang bei mikroskaligen und wasserlöslichen Nickelverbindungen keine Rolle gespielt haben. Die derzeit verfügbaren toxikologischen Daten für partikuläre nanoskalige Nickelverbindungen sind aber bei weitem noch nicht ausreichend und die verwendeten Partikel sind zudem häufig unzureichend charakterisiert. Deshalb kann aus den bisher publizierten Studien die toxikologische Wirkung nanoskaliger Nickelverbindungen nicht zufriedenstellend eingeschätzt werden.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Fragestellung, ob die Auswirkungen der nanoskaligen Nickelverbindungen mit den bereits besser untersuchten Wirkmechanismen von gelöstem Nickel vergleichbar sind, oder ob aufgrund der sich ändernden Materialeigenschaften im nanoskaligen Bereich neue toxikologische Mechanismen auftreten.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung soll das toxische Potential von partikulären Nickel Nanopartikeln (NiNP) und Nickeloxid Nanopartikeln (NiONP) sowie von löslichem  $\text{NiCl}_2$  in der alveolären Lungenepithelzelllinie A549 und der Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B mit verschiedenen *in vitro* Testmethoden untersucht und verglichen werden. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass die biologische Aktivität nanoskaliger Substanzen maßgeblich durch ihre physikochemischen Eigenschaften bestimmt wird (Jiang et al. 2008; Limbach et al. 2007). Deshalb wird eine umfassende Charakterisierung des Testmaterials den biologischen Untersuchungen vorangestellt. Hierzu steht ein Spektrum an physikalischen bzw. analytischen Methoden zur Verfügung, welche u.a. die Erfassung relevanter Eigenschaften wie Größenverteilung, Agglomerationsverhalten und Reinheitsgrad ermöglichen.

Um ein möglichst umfangreiches Bild über die Art der Wirkung der untersuchten Substanzen zu gewinnen, wird ein Genexpressionsprofil der verschiedenen Verbindungen mittels RT-qPCR erstellt. Zur Bestimmung der zytotoxischen Wirkung der Nickelverbindungen sollen verschiedene Testverfahren herangezogen werden. Die ausgewählten Tests sollen die Unterscheidung zwischen wachstumsbeeinflussenden Effekten und Veränderungen der mitochondrialen Aktivität ermöglichen. Außerdem soll durch die Verwendung verschiedener Tests eine Fehleinschätzung durch falsch positive bzw. negative Ergebnisse, die durch Interferenzen zwischen den

Testsubstanzen und den Untersuchungsmaterialien entstehen können, möglichst minimiert werden (Semisch & Hartwig 2014; Kroll et al. 2012; Schulze et al. 2008).

Abhängig von den Ergebnissen der Genexpressionsanalyse schließen sich weitere Analysen an. Hierfür kommen zum Beispiel Untersuchungen der Apoptose als auch der Einfluss der Substanzen auf die Zellzyklusverteilung der Zellen in Frage. Aufgrund der gut dokumentierten DNA-schädigenden Eigenschaften von Nickelverbindungen soll ebenfalls das genotoxische Potential von Nickel in nanopartikulärer Form in subzellulären, als auch in zellulären Testsystemen ermittelt werden. Hierfür wird die Induktion von DNA-Einzelstrangbrüchen in Gegenwart der Nickelverbindungen sowie unter pro-oxidativen Bedingungen mittels Alkalischer Entwindung und PM2-Assay untersucht. Es besteht Grund zur Annahme, dass partikuläre Nickelverbindungen in der Lage sind, DNA-Reparatursysteme zu beeinflussen (Beyersmann & Hartwig 2008). Dabei stellen die sogenannten „Zinkfinger“-Proteine, wie zum Beispiel die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1), einen potentiellen Angriffspunkt für Nickelionen dar (Hartwig et al. 2002). Deshalb soll in dieser Arbeit auch der Einfluss der verschiedenen Nickelverbindungen auf die Poly(ADP-Ribosyl)ierung überprüft werden.

Bei der sogenannten „Trojanisches-Pferd-Hypothese“ geht man davon aus, dass partikuläre Metallverbindungen über Endozytose aufgenommen werden und nach intrazellulärer Lyse höhere Metallkonzentrationen in den Zellen auftreten, als bei löslichen Verbindungen (Cronholm et al. 2013; Studer et al. 2010; Limbach et al. 2007). Um diesen Aspekt zu untersuchen, wird die intrazelluläre Nickelkonzentration mittels GF-AAS bestimmt und unter Verwendung von spezifischen Inhibitoren die Aufnahmemechanismen der Nanopartikel näher betrachtet.

## 4. Material und Methoden

Eine Aufstellung der verwendeten Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte befindet sich im Anhang.

### 4.1 Charakterisierung der Partikel

#### 4.1.1 Partikuläre und lösliche Nickelverbindungen

Nickelnanopartikel (NiNP; Art. Nr. 577995; Lot. MKBF4305), Nickeloxidnanopartikel (NiONP; Art. Nr. 637130; Lot. MKBC7217V) und Nickel(II)chlorid ( $\text{NiCl}_2$ ; Art. Nr. 203866; Lot. MKBF7699V) wurden von Sigma-Aldrich erworben. Laut Hersteller besitzen die NiNP eine Reinheit von  $\geq 99\%$ , NiONP von 99,8% und  $\text{NiCl}_2$  von 99,9%. Die Partikelgröße der NiNP liegt laut Hersteller unterhalb von 100 nm, die der NiONP  $< 50$  nm.

#### 4.1.2 Herstellung von Partikelsuspensionen

Die Partikel wurden durch Differenzwägung in Eppendorf Reaktionsgefäße eingewogen und trocken aufbewahrt. Zum Ansetzen einer Stammsuspension wurde das Dispergens, bis auf 3 mL in ein steriles Rollrandglas vorgelegt und die Partikel anschließend sequentiell mit 3 x 1 mL Dispergens vollständig aus dem Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Danach wurde die Stammlösung 15 s gevortext, 15 s sonifiziert (50% Amplitude, Timer-Modus 1 s, Sonifier® D-250 von Branson), wieder 15 s im Vortex geschüttelt und daraus ohne Zeitverzug die Verdünnungen hergestellt. Bei jedem Versuch wurden die verdünnten Partikelsuspensionen, unmittelbar vor Applikation auf die Zellen, erneut gevortext. Für jeden Versuch wurden frische Stammsuspensionen hergestellt. Um Ergebnisse der verschiedenen Nickelverbindungen besser miteinander vergleichen zu können, wurden die verwendeten Konzentrationen in der Regel so gewählt, dass bei den Behandlungen der Gesamtgehalt an Nickel ( $\mu\text{g Ni/mL}$ ) identisch war. Die entsprechenden Konzentrationen der Ausgangssubstanzen, die eingesetzt wurden um den gleichen Nickelgehalt zu erreichen, befinden sich in Tabelle 1. Weitere Dosisumrechnungen (Masse und Partikeloberfläche pro Zellkulturfläche) sind im Anhang zu finden.

Tabelle 1: Anpassung der eingesetzten Arbeitskonzentrationen der untersuchten Nickelverbindungen auf einen identischen Gesamtgehalt an Nickel.

<b>Sollkonzentrationen</b>	<b>Ni (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>10</b>	<b>30</b>	<b>50</b>
<b>eingesetzte Arbeitskonzentrationen</b>	NiNP ( $\mu\text{g/mL}$ )	10	30	50
	NiONP ( $\mu\text{g/mL}$ )	13	38	64
	NiCl <sub>2</sub> ( $\mu\text{M}$ )	170	511	852

### 4.1.3 Verdünnungslinearität der Partikelsuspensionen

Zur experimentellen Überprüfung der tatsächlich eingesetzten Nickelkonzentrationen und der Reproduzierbarkeit des Verdünnungsverfahrens, wurde der Nickelgehalt der Partikelsuspensionen photometrisch mit dem Küvettentest Nanocolor® von Macherey-Nagel untersucht. Dabei reagiert das Nickel mit Dimethylglyoxim in alkalischer Lösung zu dem farbigen Bis(dimethylglyoximato)nickel(II)-Komplex, dessen Absorption bei 436 nm gemessen werden kann. Die Untersuchungen waren Teil der Diplomarbeiten von Marco Dilger und Julia Polley.

Für den Test wurden Partikelsuspensionen in Wasser hergestellt und davon jeweils 1 mL in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Durch eine stufenweise Erhöhung der Temperatur auf 95°C bei einer gleichbleibenden Rotationsgeschwindigkeit von 350 rpm wurden die Proben auf einem Schüttler bis zur Trockne eingedampft und mit 500  $\mu\text{L}$  salpetersaurer Wasserstoffperoxid-Lösung (69% HNO<sub>3</sub> und 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Verhältnis 1:1) aufgeschlossen. Danach wurden die Proben in 1 mL 0,2% HNO<sub>3</sub> aufgenommen und bis zur Analyse im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

#### Messung und Auswertung

Die Messung erfolgte nach Angaben des Herstellers und wurde anhand einer mitgeführten Standardreihe quantifiziert. Um Verluste während des Aufschlusses erfassen zu können, wurde bei jedem Versuch ein interner Nickel-Standard mitgeführt.

### 4.1.4 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Bildgebende Analyseverfahren, wie die REM, wurden verwendet um Informationen über die Größenverteilung und Form der Partikel zu erhalten. Dabei wird die Oberfläche der Partikel mit einem Elektronenstrahl abgerastert und anhand der Sekundärelektronen- und Rückstreuung ein Bild generiert (Goldstein et al. 2003).

Hierzu wurden die Partikel in Wasser resuspendiert, auf einen Siliziumwafer aufgetragen und getrocknet. Um die Leitfähigkeit der Proben zu verbessern, wurden die Präparate mit Platin überzogen. Die Analyse erfolgte am Rasterelektronenmikroskop LEO Gemini 1530 der Firma Carl Zeiss AG in Kombination mit energiedispersiver Röntgenspektrometrie (EDX) bei einer Beschleunigungsspannung von 10 keV. Die Untersuchung wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dipl.-Ing. Volker Zibat im Laboratorium für Elektronenmikroskopie am KIT durchgeführt.

#### 4.1.5 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Bei der TEM-Analyse werden die Elektronen beschleunigt und durch ein Kondensorlinsensystem auf die Präparatebene fokussiert. Durch unterschiedlich starke Ablenkung des Elektronenstrahls wird eine Abbildung der Probe erstellt (Williams & Carter 2009).

Hierzu wurde eine Partikelsuspension in Wasser hergestellt, auf ein Kupfergrid aufgebracht und getrocknet. Die Analyse erfolgte am Philips CM 200 FEG/ST. Die TEM-Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Heike Störmer im Laboratorium für Elektronenmikroskopie am KIT durchgeführt.

#### 4.1.6 BET-Adsorptionsisotherme

Die spezifische Oberfläche von Stoffen lässt sich mit Hilfe der BET-Adsorptionsisotherme ermitteln (Brunauer et al. 1938). Hierzu wurden die Proben unter Vakuum getrocknet und die BET-Adsorptionsisotherme am BELSORP-mini II der Firma BEL Japan aufgenommen. Anhand der Adsorptionsisotherme lässt sich die spezifische Oberfläche der Probe berechnen und unter der Annahme ideal sphärischer, monodisperser Partikel die mittlere Partikelgröße ermitteln (Gleichung 6). Die BET-Adsorptionsisothermen wurden von Frau Angela Beilmann am Institut für Technische Chemie und Polymerchemie (KIT) gemessen.

Gleichung 6

$$d_{\text{Partikel}} = \frac{6}{a_S \cdot \rho}$$

$d_{\text{Partikel}}$  = mittlerer Partikeldurchmesser (nm)

$\rho$  = Dichte (g/cm<sup>3</sup>)

$a_S$  = spezifische Oberfläche aus der BET-Messung (m<sup>2</sup>/g)

#### **4.1.7 Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)**

Die EDX (energy-dispersive X-ray analysis) liefert Aufschluss über die chemische Zusammensetzung einer Probe und kann simultan am Rasterelektronenmikroskop LEO 1530 Gemini der Firma Carl Zeiss AG mit EDX-Detektor durchgeführt werden. Hierbei werden durch den einfallenden Elektronenstrahl kernnahe Elektronen aus den Atomen herausgeschlagen und die entstandenen Lücken durch Elektronen aus einem höheren Energieniveau besetzt. Die Energiedifferenz wird in Form von Röntgenstrahlung freigesetzt und hat ein elementspezifisches Spektrum (Goldstein et al. 2003). Die Untersuchung wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dipl.-Ing. Volker Zibat im Laboratorium für Elektronenmikroskopie am KIT durchgeführt.

#### **4.1.8 Reinheitsbestimmung mit ICP-MS**

Zur Bestimmung der Reinheit wurden die Partikel, wie in Abschnitt 4.1.2 beschrieben, direkt aufgeschlossen. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (inductively coupled plasma mass spectrometry; ICP-MS) auf Verunreinigung mit anderen Metallen überprüft. Die Messungen wurden von Dr. Thomas Bergfeldt am Institut für Angewandte Materialien – Angewandte Werkstoffphysik (KIT) mit dem Gerät Agilent 7500ce ICP-MS durchgeführt.

#### **4.1.9 Sauerstoffanalyse mittels Trägergasheißextraktion (TGHE)**

Bei diesem Verfahren wird eine definierte Menge Probe in einen Graphittiegel ausgeglüht. Dabei reagiert der Sauerstoff aus der Probe mit dem Kohlenstoff des Tiegels zu CO bzw. CO<sub>2</sub>, welche mittels Infrarotspektrometrie quantifiziert werden können (Gruner 1999). Die Sauerstoffanalyse wurde von Dr. Christel Adelhelm am Institut für Angewandte Materialien – Angewandte Werkstoffphysik (KIT) mit dem Gerät TC(H) 600 der Firma LECO durchgeführt.

#### **4.1.10 Dynamische Lichtstreuung (DLS)**

Zur Ermittlung der Größenverteilung von Partikeln in Suspensionen wird der sogenannte hydrodynamische Radius mittels DLS-Analyse (dynamic light scattering) herangezogen. Dabei trifft kohärentes, monochromatisches Laserlicht auf die Partikelsuspension und wird in alle Richtungen gestreut. Die unterschiedlich starke Brown'sche Molekularbewegung der verschiedenen großen Partikel führt zu Fluktuationen in der gemessenen Streuintensität. Anhand der zeit-

lich veränderten Streuintensität kann die Diffusionsgeschwindigkeit der Partikel berechnet werden. Daraus wird mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung der hydrodynamische Radius ermittelt (Berne & Pecora 2000).

Zusätzlich kann anhand DLS-Messung der Polydispersitätsindex (PDI) abgeleitet werden. Der PDI beschreibt die Größenverteilung von Partikeln und beträgt 0 bei ideal monodispersen Verteilungen bzw. 1 bei maximal polydispersen Suspensionen.

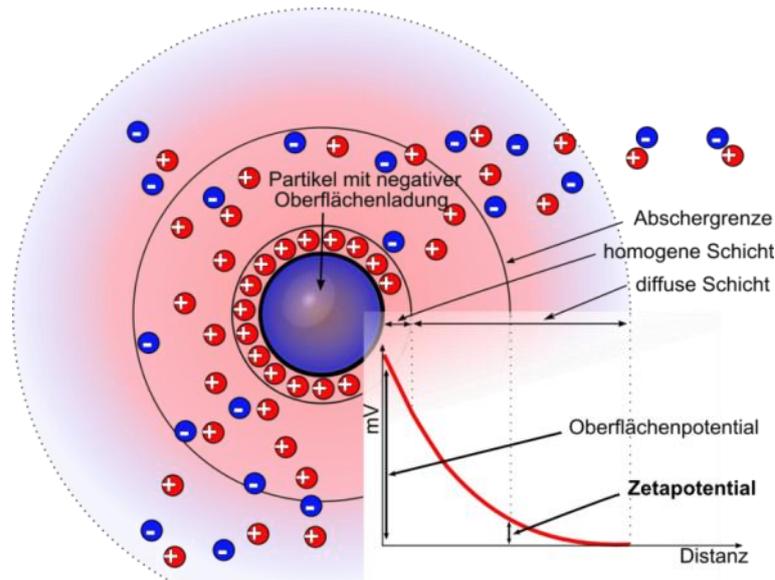
Für die Bestimmung wurde die Partikelsuspension, wie in Abschnitt 4.1.2 beschrieben, frisch hergestellt und unmittelbar vor der Messung in Polystyrolküvetten überführt. Die Messungen wurden am Zetasizer Nano ZS der Firma Malvern vorgenommen. Die Funktion des Gerätes wurde vor jeder Nutzung mit einem Standard überprüft. Weitere Angaben zu gerätespezifischen Einstellungen befinden sich im Anhang.

#### **4.1.11 Zetapotential**

Das Zetapotential wird verwendet, um eine Aussage über die Stabilität einer Partikelsuspension treffen zu können. Nach der Theorie der elektrochemischen Doppelschicht lagern sich an den Partikeln einer Suspension, Emulsion oder eines Kolloids gegensinnig geladene Ionen aus der umgebenden Flüssigkeit an. Innerhalb dieser Schicht herrscht wegen der Ladungsdifferenz relativ zur restlichen Lösung ein Potential. Durch weitere Anlagerung von geladenen Teilchen entsteht eine diffuse Schicht, in der das Potential exponentiell abfällt und gegen Null strebt. So erscheint das Partikel nach außen hin elektrisch neutral, weil alle Ladungen durch Ionen des Suspensionsmediums kompensiert werden. Durch das Anlegen eines äußeren elektrischen Feldes und der daraus resultierenden Bewegung der diffusen Schicht bildet sich eine Abschergrenze mit einer messbaren Potentialdifferenz, welches als das Zetapotential ( $\zeta$ ) bezeichnet wird (Müller 1996).

Das Zetapotential wird mit der Smoluchowski-Näherung anhand der ermittelten Partikelgeschwindigkeit in einem externen elektrischen Feld (elektrophoretische Mobilität) und unter der Berücksichtigung der Dielektrizitätskonstante und Viskosität des Mediums ermittelt. Je größer das Zetapotential, desto stabiler ist die kolloidale Lösung. Ein Zetapotential nahe Null bedeutet dagegen eine rasche Agglomeration der Partikel (Malvern Instruments 2012).

Zur Bestimmung des Zetapotentials wurde der Zetasizer Nano ZS der Firma Malvern verwendet. Die Messungen wurden in einer Kapillarzelle des Herstellers (DTS 1061C) durchgeführt. Die Funktion des Gerätes wurde vor jeder Nutzung mit einem Standard überprüft. Weitere Angaben zu gerätespezifischen Einstellungen befinden sich im Anhang.



**Abbildung 1: Veranschaulichung der elektrochemischen Doppelschicht und des Zetapotentials modifiziert nach Dilger (2011).**

#### 4.1.12 Löslichkeit der Partikel

Zur Bestimmung der Löslichkeit der Partikel in verschiedenen physiologischen und Zellkultur-relevanten Medien (Zusammensetzungen siehe Anhang) wurden die Partikelsuspensionen in der entsprechenden Lösung hergestellt (Abschnitt 4.1.2) und in Zellkulturschalen für 6 h oder 24 h unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Im Anschluss wurden 2 mL der Suspension in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und bei 16.000 g für 60 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. 500 µL des Überstandes wurden in ein neues 1,5 mL Eppendorf Reaktionsgefäß pipettiert und einem sauren Aufschluss, wie bereits in Abschnitt 4.1.3 beschrieben, unterzogen. Der Rückstand wurde in 0,2% HNO<sub>3</sub> aufgenommen und bis zur Analyse bei 4°C aufbewahrt.

##### Messung und Auswertung

Die Quantifizierung erfolgte mittels Graphitrohr-Atomabsorptionsspektroskopie (GF-AAS) anhand einer externen Kalibriergerade im Bereich von 4 – 12 µg/L Nickel. Um Verluste während des Aufschlusses erfassen zu können, wurde bei jedem Versuch ein interner Nickel-Standard mitgeführt. Weitere Angaben zum AAS-Analysenprogramm sowie gerätespezifische Einstellungen befinden sich im Anhang.

### 4.1.13 Endotoxine

Bei den Endotoxinen (Lipopolysaccharide; LPS) handelt es sich um biologisch aktive Zellwandbestandteile gram-negativer Bakterien, die als Kontaminationen in Zellkulturen zu Artefakten und Fehlinterpretationen von Ergebnissen führen könnten (Gorbet & Sefton 2005). Um die Partikel auf Verunreinigung mit Endotoxinen zu überprüfen, wurde das ToxinSensor™ Chromogenic LAL Endotoxin Kit von Genscript basierend auf Limulus-Amöbocyten-Lysat (LAL) verwendet. Hierzu wurden Partikelsuspensionen, wie bereits in Abschnitt 4.1.2 beschrieben, in Endotoxin-freiem Wasser hergestellt und der Test nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte anhand einer mitgeführten Standardreihe im Bereich von 0,1 – 1 EU/mL.

## 4.2 Kultivierung und Behandlung der Zellen

### 4.2.1 Zelllinien

#### A549-Zelllinie

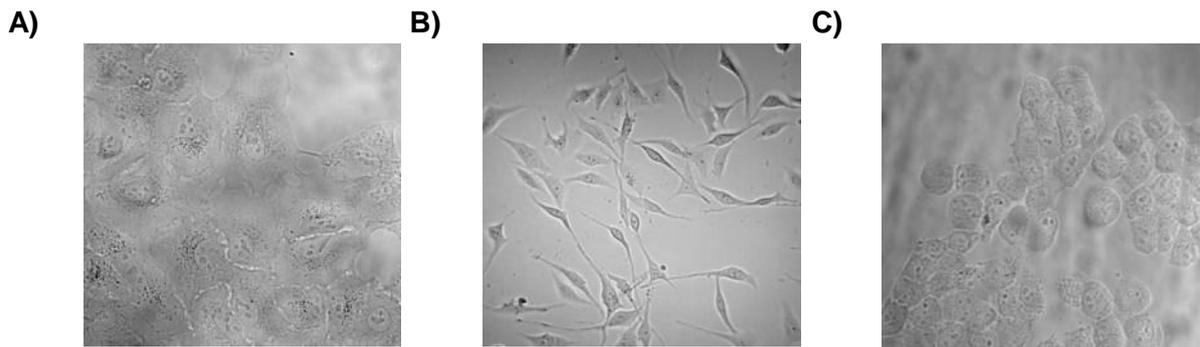
Die humane Lungenadenokarzinom-Zelllinie A549 (ATCC CCL-185) wurde 1972 einem männlichen Probanden kaukasischer Abstammung im Alter von 58 Jahren entnommen und als adhärent wachsende Epithelzellen Typ II etabliert (Giard et al. 1973). Diese permanente Zelllinie bildet ein Monolayer aus und wurde für die hier beschriebenen Untersuchungen von Passage 12 bis 30 verwendet (Abbildung 2A).

#### BEAS-2B Zelllinie

Bei dieser Zelllinie (ATCC CRL-9609, zur Verfügung gestellt von Dr. Carsten Weiss, Institut für Toxikologie und Genetik, KIT, Karlsruhe) handelt es sich um adhärent wachsende humane Bronchialepithelzellen, die mit einem Adenovirus12-Simian Virus 40 (Ad12-SV40) transformiert wurde (Reddel et al. 1995). BEAS-2B Zellen wachsen als Monolayer und wurden nach dem Auftauen bis zu 10 Passagen subkultiviert (Abbildung 2B).

#### HeLa S3 Zelllinie

HeLa Zellen wurden 1952 aus einem Gebärmutterhalstumour isoliert und als erste kontinuierliche menschliche Epithelzelllinie etabliert. Die verwendete Zelllinie HeLa S3 (ATCC CCL-2.2) ist ein Abkömmling der HeLa Zellen und wurde 1956 von Puck und Kollegen isoliert (Puck et al. 1956). Diese Zellen wachsen als Monolayer mit einer Generationszeit von etwa 22 h. Für die Versuche wurden diese Zellen maximal 25 Passagen lang kultiviert (Abbildung 2C).



**Abbildung 2: Lichtmikroskopische Aufnahmen von A) A549, B) BEAS-2B und C) HeLa S3 Zellen.** Aufgenommen mit dem Fluoreszenzmikroskop Axio Imager und Axio Observer von Firma Carl Zeiss AG.

### 4.2.2 Bedingungen in der Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Inkubator bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und 100% Luftfeuchtigkeit. A549 und HeLa S3 Zellen wurden in Dulbecco's Modied Eagle Medium (DMEM) mit Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FKS), 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin kultiviert. Für BEAS-2B Zellen wurde LHC-9 Medium mit 0,25 µg/mL Amphotericin B verwendet. Vor Erreichen vollständiger Konfluenz wurden die Zellen subkultiviert. Hierfür wurde das alte Medium entfernt und der Zellrasen zweimal mit 0,25% Trypsin-Lösung in PBS-EDTA gewaschen. Das Ablösen der Zellen erfolgte für 2 – 3 min im Inkubator. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und ein Teil der Suspension als neue Passage weiterkultiviert.

Zur Kultivierung der BEAS-2B Zellen wurde, anstelle von FKS-haltigem Medium, zum Abstoppen der Trypsinwirkung eine SBTI (Soybean Trypsin Inhibitor)-Lösung in LHC-9 Medium (Endkonzentration 1 mg/mL) verwendet. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt und bei 250 g für 5 min bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde, wie bereits oben beschrieben, in frischem LHC-9 Medium subkultiviert. Zur Verbesserung der Adhäsion der BEAS-2B Zellen an der Wachstumsoberfläche wurden alle verwendeten Zellkulturgefäße zuvor mit einer Proteinlösung aus Fibronectin (10 µg/mL), Kollagen (30 µg/mL) und BSA (10 µg/mL) in PBS behandelt (Lechner & LaVeck 1985). Hierzu wurde die Proteinlösung auf der Grundfläche verteilt und mindestens 30 min im Inkubator bei 37°C belassen. Anschließend wurde die Proteinlösung abgesaugt und die Grundfläche mit PBS gespült, bevor die Zellsuspension eingefüllt wurde. Alle Zelllinien wurden regelmäßig mittels PCR (LookOut Mycoplasma® PCR Detection Kit von Sigma-Aldrich) auf Mycoplasmenkontamination getestet.

### 4.2.3 Auftauen und Kryokonservieren der Zellen

Die Zellen wurden aus dem Stickstofftank genommen, im Wasserbad bei 37°C erwärmt und die aufgetaute Zellsuspension zu frischem Medium in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der Zentrifugation (250 g, 5 min) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt und unter den in Abschnitt 4.2.2 beschriebenen Bedingungen kultiviert. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel, um die Reste des Einfriermediums zu entfernen.

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese wie im Abschnitt 4.2.2 beschrieben trypsinisiert, in Medium resuspendiert und eine definierte Zellzahl pelletiert. Anschließend wurde das Zellpellet in Einfriermedium (90% FKS und 10% DMSO) resuspendiert und  $1 \times 10^6$  bis  $2 \times 10^6$  Zellen in Kryoröhrchen aliquotiert. Vor der Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff bei -196°C wurden die Zellen einem schonenden Einfrierprozess (-20°C/d) unterzogen.

### 4.2.4 Inkubation der Zellen

Die Inkubation der A549 und HeLa S3 Zellen erfolgte jeweils 23 – 25 h nach dem Ausstreuen in die entsprechenden Zellkulturgefäße, BEAS-2B Zellen wurden erst 71 – 73 h nach der Aussaat inkubiert. Sofern nicht anders beschrieben, wurde für die Inkubation das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen für die Dauer der Inkubation mit den Testsubstanzen (Abschnitt 4.2.2) in frischem Kulturmedium behandelt. Dabei wurde das Inkubationsvolumen, sowie die eingesetzte Zellzahl, so gewählt, dass das Verhältnis von Volumen zur Grundfläche der verwendeten Zellkulturgefäße, sowie zur Zellzahl in allen durchgeführten Versuchen annähernd konstant war. Eine Übersicht der verwendeten Inkubationsvolumina und Zelldichten ist im Anhang zu finden.

## 4.3 Zytotoxizität

### 4.3.1 Zellzahl und Membranintegrität

Zur Bewertung der akuten Toxizität der untersuchten Verbindungen wurden die Zellzahl sowie die Membranintegrität bestimmt. Hierzu wurde das CASY System (CASY® Model TT) verwendet, welches auf dem Prinzip der Widerstandsmessung beruht. Hierzu werden die Zellen in einer isotonen Elektrolytlösung resuspendiert und durch eine Kapillare geleitet. Zellen mit intakter Zellmembran wirken wie elektrische Isolatoren und werden anhand des resultierenden Widerstandes, der vom Zellvolumen abhängig ist, erfasst. Ebenfalls kann der Anteil toter Zellen mit intaktem Kern und Zelldebris ermittelt werden, da sie über einen geringeren Widerstand

verfügen (Glauner 2012; Lindl et al. 2005). Die Untersuchungen waren Teil der Diplomarbeiten von Christiane Ernst und Julia Polley.

Für diese Untersuchungen wurden in 22 cm<sup>2</sup> Zellkulturschalen je 3,68 x 10<sup>5</sup> Zellen ausgestreut und nach der Anwachsphase mit den Testsubstanzen inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Zellen abtrysiniert, im jeweiligen Medium resuspendiert und die Zellzahl mittels CASY® Modell TT bestimmt.

#### Auswertung

Zur Bestimmung der akuten Zytotoxizität wurde die Anzahl der lebenden Zellen relativ zum Mittelwert der unbehandelten Kontrolle gesetzt.

### **4.3.2 WST-Test**

Zur Ermittlung der Zytotoxizität wurde das Cell Counting Kit-8 der Firma Sigma-Aldrich verwendet. Dabei wird das Tetrazoliumsalz WST-8 (2(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3(4-nitrophenyl)-5(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium-Mononatriumsalz) in Anwesenheit des Elektronenüberträgers mPMS (1-methoxy-5-methyl phenazonium-methylsulfat) von vitalen Zellen extrazellulär zu seinem löslichen Formazan reduziert und photometrisch bestimmt (Berridge et al. 2005). Die Farbintensität ist proportional zur metabolischen Aktivität der Zellen und stellt somit ein Maß der Zellvitalität dar.

Wie in Abschnitt 4.2.2 beschrieben, wurden 5,5 x 10<sup>4</sup> Zellen pro Well einer 96-Wellplatte ausgesät und nach der Anwachsphase mit Partikelsuspensionen inkubiert. Nach Beendigung des Inkubationszeitraums wurden pro Well 10 µL WST-Reagenz zugegeben und nach kurzem Schütteln die Extinktion bei 460 nm in Intervallen von 30 min am Mikroplattenlesegerät (Infinite® 200 PRO von Tecan) gemessen. Um direkte Wechselwirkungen der Partikel mit der Reagenzlösung beurteilen zu können, wurde zusätzlich bei jeder Messung, unter zellfreien Bedingungen, die Absorption des WST-Reagenz in Gegenwart der untersuchten Substanzen bestimmt. Ebenso wurde für jede getestete Konzentration ein Blindwert unter Abwesenheit der Zellen, sowie mit 10 µL Wasser anstelle von WST-Reagenz mitgeführt.

#### Auswertung

Zur Auswertung wurde der jeweilige Blindwert von den umgesetzten Proben mit WST-Reagenz abgezogen und relativ zum Mittelwert der unbehandelten Kontrolle gesetzt.

## 4.4 Genexpressionsanalyse

Hochdurchsatz-Genexpressionsanalysen stellen ein wichtiges Werkzeug der molekularen Biologie und Medizin dar und ermöglichen es, substanzspezifische Wirkprofile zu erstellen. In der vorliegenden Arbeit wurde das Biomark HD System von Fluidigm verwendet, womit eine quantitative Expressionsanalyse eines individuell zusammengestellten Gen-Sets durchgeführt werden kann. Die Funktionsweise beruht auf der Mikrofluidik-Technologie und ermöglicht es, qPCR-Reaktionen im Nanolitermaßstab in separaten Kammern auf einem 96 x 96 Chip durchzuführen (Spurgeon et al. 2008).

### RNA-Isolierung und -Quantifizierung

Für die Genexpressionsanalyse wurden in 22 cm<sup>2</sup> Zellkulturschalen jeweils 3,68 x 10<sup>5</sup> Zellen ausgestreut und mit den Testsubstanzen behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen trypsiniert, in FKS-haltigem PBS aufgenommen und in 2 mL Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Nach Zentrifugation bei 250 g und 4°C für 5 min wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet bis zur Analyse bei -80°C im Biofreezer gelagert.

Zur RNA-Isolierung wurde ein modifiziertes Protokoll des Nucleospin RNA II Kits von Macherey-Nagel verwendet. Sämtliche Arbeits- und Zentrifugationsschritte wurden, sofern nicht anders beschrieben, bei 4°C oder auf Eis durchgeführt. Zur Lyse wurden die Zellpellets in 100 µL sterilem PBS resuspendiert und anschließend mit 350 µL Lysepuffer (RA1) sowie 3,5 µL Mercaptoethanol versetzt. Nach gründlichem Vortexen wurden die Proben zusätzlich durch 5-maliges Aufziehen in einer Kanüle (ø 0,4 mm) lysiert. Im Anschluss wurden 350 µL 70% Ethanol hinzugefügt, gevortext und die komplette Probe in 2 mL Reaktionsgefäße mit Filtereinsatz überführt. Die Proben wurden bei 9.000 rpm für 30 s zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Zur Entsalzung wurden 350 µL MDB-Puffer (Membrane Desalting Buffer) auf die Säule gegeben und diese erneut bei 11.000 rpm für 30 s zentrifugiert. Ein DNA-Verdau wurde, durch Zugabe von je 95 µL DNase Reaction Mixture (10 µL DNase + 90 µL DNase reaction buffer), auf der Säule durchgeführt. Nach 15 minütiger Inkubation bei RT erfolgten mehrere Waschschrte mit RA2 und RA3-Puffer gemäß dem Protokoll des Herstellers. Im Anschluss wurde die RNA mit 40 µL DNase-freiem Wasser in ein frisches 1,5 mL Eppendorf Reaktionsgefäß eluiert und bis zur Verwendung bei -80°C im Biofreezer gelagert. Der RNA-Gehalt wurde am Spektralphotometer (Infinite® 200 PRO von Tecan) durch Absorptionsmessung bei 260 nm quantifiziert und die Reinheit der Proben anhand des Absorptionsquotienten von 260/280 nm überprüft.

### cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit dem qScript™ cDNA Synthese Kit von BioRad nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierzu wurde pro Reaktionsansatz in Doppelbestimmung je 1 µg RNA mit reverser Transkriptase, Oligonukleotiden und Nuklease-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 20 µL verdünnt. Nach dem Umschreiben wurde die cDNA bis zur Prä-Amplifikation bei -20°C gelagert. Angaben zum Pipettierschema und Temperaturprogramm am Thermocycler befinden sich im Anhang.

### Prä-Amplifikation (Specific Target Amplifikation)

Um eine ausreichende Menge cDNA der untersuchten Zielgene zu gewährleisten, wurde eine Prä-Amplifikation der Proben durchgeführt. Hierzu wurde eine Reaktionsmischung, bestehend aus TaqMan® PreAmp Master Mix (2-fach) von Thermo Fisher und 500 nM Mischung aller bei der RT-qPCR verwendeten Forward- und Reverse-Primer, in PCR-Streifen vorgelegt. Anschließend wurde die cDNA zugegeben und im Thermocycler prä-amplifiziert. Zusätzlich wurden zur Überprüfung von Verunreinigungen mit DNA oder unspezifischen Reaktionen eine Probe mit nicht umgeschriebener RNA bzw. eine „No Template Control“ (NTC) in Form von reinem Wasser mitgeführt. Das Pipettierschema und die Einstellungen des Thermocyclers sind im Anhang zusammengefasst. Im Anschluss an die Prä-Amplifikation wurden die Proben zentrifugiert und einem Exonukleaseverdau unterzogen, um die Primer-Oligonukleotide aus der Prä-Amplifikation zu entfernen.

### Exonukleaseverdau

Zu jedem Reaktionsansatz wurden 20 U/µL Exonuklease hinzugefügt und die Primer für 40 min bei 37°C im Thermocycler verdaut. Die Exonukleaseaktivität führt unter diesen Bedingungen zu einer ausreichenden Reduktion der Primer-Oligonukleotide, lässt aber noch genügend vervielfältigte cDNA intakt. Zur Inaktivierung der Exonuklease wurden die Proben 15 min auf 85°C erhitzt. Nach dem Verdünnen der Proben mit TE-Puffer (1:5), wurden diese bis zur RT-qPCR bei -20°C gelagert. Das Pipettierschema ist im Anhang dargestellt.

### Primer und Probenvorbereitung

Die prä-amplifizierten Proben wurden mit SsoFast™ EvaGreen® Supermix mit dem Farbstoff ROX (2-fach) und DNA Binding Dye Sample Loading Reagenz (20-fach) von Bio-Rad versetzt und wie unten beschrieben auf den Fluidigm PCR Chip aufgetragen. Um Verunreinigen durch Fremd-DNA ausschließen zu können, wurden auch hier NTC-Kontrollen in Form von Wasser mitgeführt. Die Primer-Paare wurden mit DNA Suspension Puffer und Assay Loading Reagenz (2-fach) auf eine Endkonzentration von 5 µM verdünnt. Diese Primer-Mischung reicht für 10

Analysen und wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Vor Verwendung wurde die Primer-Mischung bei RT aufgetaut, gevortext, für 30 s zentrifugiert und auf den Fluidigm PCR Chip aufgetragen. Zusätzlich wurde eine Kontrolle ohne Primer-Mischung mitgeführt, um den Verdau der Primer nach der Prä-Amplifikation zu überprüfen. Das Pipettierschema und eine Liste der verwendeten Primer-Paar-Sequenzen befinden sich im Anhang.

#### qPCR (quantitative real-time PCR)

Die qPCR-Analyse wurde an einem Hochdurchsatz-PCR-Gerät von Fluidigm durchgeführt. Zur Vorbereitung des Chips wird die „controlline“ Flüssigkeit in die Reservoirs gefüllt und im Integrated Fluidic Circuit (IFC)-Controller das Fluid durch die Mikrofluidik-Kanäle des Chips geleitet. Im Anschluss wurden die entsprechenden Kavitäten für Primer und Proben mit je  $5\ \mu\text{L}$  der jeweiligen Mischung beladen und die Reaktionskammern mit dem IFC-Controller mit je einer Probe und einem Primer-Paar befüllt. Die Einstellungen und das verwendete Temperaturprogramm für die qPCR befinden sich im Anhang.

#### Auswertung

Die Rohdatenprozessierung erfolgte mit der Herstellersoftware von Fluidigm, anhand des passiven Referenzfarbstoffes ROX und des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs EvaGreen. Der ROX Farbstoff wurde verwendet, um die vollständige Beladung der Reaktionskammern zu überprüfen. Mit EvaGreen wurden die Amplifikate quantifiziert, woraus die Ct-Werte ermittelt wurden. Ebenfalls wurde die Effizienz der PCR-Reaktion überprüft. Die Effizienz der PCR-Reaktion ist unter anderem abhängig von der Länge und dem GC-Gehalt des Amplifikates sowie von gegebenenfalls im Amplifikat vorhandenen Sekundärstrukturen (Wiedemann et al. 2004). In der Regel werden bei optimierten Reaktionsbedingungen Effizienzen von 0,7 - 0,9 erreicht (Pfaffl 2004). Unter Verwendung einer Standard-cDNA wurde mit Verdünnungsreihen von jedem Primerpaar die Effizienz bestimmt, die bei allen untersuchten Genen zwischen 0,8 und 1,0 lag (Daten nicht gezeigt). Über die Schmelzkurve wurde die Spezifität der PCR überprüft. Außerdem wurde anhand der mitgeführten NTC- und RT-Kontrollen auf Kontaminationen getestet. Die weitere Analyse der Ct-Werte wurde mit der Software GenEx (MultiD Analyses) durchgeführt. Die Referenzgene (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *GUSB* und *HPRT1*) wurden anhand der integrierten Programme NormFinder und geNorm identifiziert. Die Genexpression der untersuchten Gene wurde mit der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode ausgewertet (Bustin et al. 2009). Da einige Gene in den verwendeten BEAS-2B (*ABCB1*, *ADH*, *ALDH1A1*, *AXIN2*, *BBC3*, *CYP1A1*, *DDIT3*, *GPX2*, *SEPP1*, *UGT1*) und A549 (*ABCB1*, *ALDH1A1*, *AXIN2*, *BBC3*, *CDKN2B*, *CYP1A1*, *DDIT3*, *SEPP1*) Zellen nur auf einem sehr niedrigen Niveau exprimiert wurden, konnten diese nicht zur Auswertung herangezogen werden.

## 4.5 Quantifizierung von DNA-Strangbrüchen

### 4.5.1 PM2-Assay

Zur Erfassung der DNA-schädigenden Wirkung der Nickelverbindungen wurde die Relaxierung von superspiralierter, isolierter DNA mittels PM2-Assay untersucht. Als Substrat wurde die DNA der Bakteriophage PM2 verwendet, welche nach Salditt et al. (1972) aus dem Bakterium *Alteromonas espeijana* isoliert wurde. Das Wirtsbakterium *Alteromonas* sowie die PM2-Phagen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. B. Epe (Institut für Pharmazie, Johannes Gutenberg Universität, Mainz) zur Verfügung gestellt. Durch Einzelstrangbrüche wird die zirkuläre, superspiralisierte, etwa 10.000 Basenpaare lange doppelsträngige DNA in eine relaxierte, ringoffene Form überführt. Bei der Entstehung von Doppelstrangbrüchen werden lineare DNA Fragmente gebildet (Häring et al. 1994). Die so erhaltenen PM2-DNA-Typen (superspiralisiert, relaxiert und linear) können mittels einer Agarose-Gelelektrophorese voneinander getrennt und quantifiziert werden.

Für die Untersuchungen wurde 300 ng PM2-DNA in Enzypuffer suspendiert und in Gegenwart der Testsubstanzen in einem 20 µL Ansatz bei 37°C für 30 min behandelt. Nach der Inkubation wurde die Reaktion mit Stoppreagenz beendet und die Proben auf ein 1%iges Agarose-Gel mit GelRed™, ein fluoreszierender Nukleinsäuren-Farbstoff, aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 90 V über 2,5 h. Im Anschluss wurden mit Hilfe eines Geldokumentationsgerätes (LAS-3000 von Fujifilm) die DNA-Banden bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert und mit dem Programm AIDA von Fujifilm ausgewertet. Um die Induktion von Strangbrüchen unter prooxidativen Bedingungen zu untersuchen, wurde die PM2-DNA in Gegenwart von Nickelverbindungen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 1 h bei 37°C inkubiert und ebenfalls wie oben beschrieben aufgearbeitet.

#### Auswertung

Aus dem Verhältnis der Intensität der Banden lässt sich die Strangbruchrate nach Müller et al. (1990) berechnen (Gleichung 7). Hierzu wurde zunächst der relative Anteil an superspiralierter und ringoffener Form im Verhältnis zur Gesamtfluoreszenz ermittelt. Unter Berücksichtigung des Korrekturfaktors, welcher die stärkere Interkalation des Farbstoffes in die ringoffene, gegenüber der superspiralisierten, Form erfasst, wird die Strangbruchrate pro 10<sup>3</sup> Basenpaare angegeben.

Gleichung 7

$$\text{Strangbruchrate pro } 10^3 \text{ Basenpaare} = - \ln \frac{1,4 \cdot F_{\text{superspiralisiert}}}{1,4 \cdot F_{\text{superspiralisiert}} + F_{\text{relaxiert}}}$$

$F_{\text{supercoiled}}$  = % der superspiralisierten Form

$F_{\text{open circular}}$  = % der relaxierten Form

Korrekturfaktor = 1,4

## 4.5.2 Alkalische Entwindung (AU)

Die Methode der Alkalischen Entwindung (Hartwig et al. 1993) wurde zur Quantifizierung von DNA-Strangbrüchen im zellulären System angewandt. Hierbei wird durch Zugabe einer alkalischen Lösung die DNA an Strangbrüchen entwunden und chromatographisch in einzelsträngige DNA (ssDNA) und doppelsträngige DNA (dsDNA) aufgetrennt. Durch Zugabe eines interkalierenden DNA-Farbstoffes kann der Gehalt an ssDNA und dsDNA quantifiziert werden.  $1,53 \times 10^5$  Zellen wurden in  $9 \text{ cm}^2$  Zellkulturschalen ausgestreut. Nach der Anwachszeit erfolgte die Inkubation mit den Testsubstanzen für 24 h. Im Anschluss wurde das Medium abgesaugt und die Proben in kaltem PBS auf Eis belassen. Durch Zugabe der alkalischen Lösung wurde unter Lichtausschluss die DNA für 30 min entwunden. Nach dem Neutralisieren mit 0,1 M HCl auf pH 6,8 wurden die Proben 15 s lang sonifiziert (10% Amplitude, Timer-Modus 1 s, Sonifier® D-250 von Branson) und zur Stabilisierung der DNA mit SDS-Lösung versetzt. Bis zur chromatographischen Auftrennung wurden die Proben bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Um unter pro-oxidativen Bedingungen die Induktion von Strangbrüchen in Gegenwart von Nickelverbindungen zu untersuchen, wurden zusätzlich Proben nach der Inkubation für 5 min mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  kokubiert und ebenfalls, wie oben beschrieben, aufgearbeitet. Die genaue Zusammensetzung aller verwendeten Puffer und Lösungen befindet sich im Anhang.

### Säulenchromatographische Trennung und fluorimetrische Quantifizierung

Sämtliche Lösungen und Arbeitsschritte wurden, sofern nicht anders beschrieben, bei  $60^\circ\text{C}$  durchgeführt. Für die chromatographische Trennung der einzel- und doppelsträngigen DNA-Fragmente wurde zunächst eine Hydroxylapatit-Säule vorbereitet. Hierzu wurde Hydroxylapatit 30 min in NaP-Puffer ( $c = 0,1 \text{ g/mL}$ ) aufgeschlämmt und als stationäre Phase zwischen Glasfaserfilter in die Säule eingebracht. Nach dem Waschen (0,5 M KP-Puffer) wurde mit 0,01 M NaP-Puffer vorkonditioniert. Die vortemperierten Proben wurden komplett auf die Säulen aufgegeben. Im Anschluss wurde mit 0,01 M NaP-Puffer gespült und nacheinander mit 0,15 M KP-Puffer zuerst die ssDNA und dann mit 0,35 M KP-Puffer die dsDNA in 24-Loch Platten eluiert. Zur Quantifizierung wurden die Eluate mit Höchst-Farbstoff 33258 (Endkonzentration  $7,5 \times 10^{-7} \text{ M}$ ) versetzt und nach 20 min die Fluoreszenz ( $E_m = 360 \text{ nm}$ ;  $E_x = 455 \text{ nm}$ ) am Mikroplatten-

lesegerät gemessen. Die genaue Zusammensetzung aller verwendeten Puffer und Lösungen befindet sich im Anhang.

### Berechnung der induzierten DNA-Strangbrüche

Um die Häufigkeit der induzierten DNA-Schäden im Vergleich zur Kontrolle berechnen zu können, wurde zunächst die Extinktion der Blindwerte von allen Proben abgezogen (Gleichung 8). Bei der Berechnung des relativen Anteils an dsDNA wurde ein Korrekturfaktor verwendet (Gleichung 9), welcher die stärkere Interkalation des Höchstfarbstoffes in dsDNA gegenüber ssDNA korrigiert (Hartwig et al. 1993). Anschließend wurde der relative Anteil der dsDNA der behandelten Proben ins Verhältnis zur Kontrolle gesetzt und die Strangbruchrate pro DNA-Basenpaare mittels einer Kalibrierung ermittelt (Gleichung 10), wobei  $10^3$  induzierte Strangbrüche pro Zelle nach der Schadensinduktion mit 1 Gy zugrunde gelegt wurden. Die Steigung der Kalibriergeraden (0,06) wurde aus früheren Ergebnissen unter vergleichbaren Bedingungen übernommen (Hartwig 1996). Ferner werden die berechneten Schäden in dieser Arbeit pro  $10^6$  Basenpaare angegeben (Gleichung 11) unter der Annahme von  $6 \times 10^9$  Basenpaaren im menschlichen Genom (Venter et al. 2001).

Gleichung 8  $F = F_{\text{Probe}} - F_{\text{Puffer}}$

Gleichung 9  $\text{Anteil dsDNA} = \frac{F_{\text{dsDNA}}}{F_{\text{dsDNA}} + 2,1 \cdot F_{\text{ssDNA}}}$

Gleichung 10  $\text{Strangbrüche pro Zelle} = -\ln \frac{\text{Anteil dsDNA}_{\text{Probe}}}{\text{Anteil dsDNA}_{\text{Kontrolle}}} \cdot \frac{10^3}{0,06}$

Gleichung 11  $\text{Strangbrüche pro } 10^6 \text{ Basenpaare} = \text{Strangbrüche pro Zelle} \cdot \frac{10^6}{6 \cdot 10^9}$

F = Fluoreszenz

ssDNA = einzelsträngige DNA

dsDNA = doppelsträngige DNA

Korrekturfaktor = 2,1

## 4.6 Zellzyklusverteilung

Die Zellzyklusverteilung wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Durch das Anfärben der DNA mit dem interkalierenden Farbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) erhält man eine charakteristische Zellzyklusverteilung in  $G_0/G_1$ -, S- und  $G_2/M$ -Phase. Die Proben wurden unter meiner Anleitung von Christiane Ernst präpariert und analysiert.

Für die Zellzyklus-Untersuchungen wurden je  $3,68 \times 10^6$  Zellen in  $22 \text{ cm}^2$  Schalen ausgesät und für 24 h mit den Testsubstanzen behandelt. Nach dem Entfernen des Inkubationsmediums wurden die Zellen gewaschen, trypsinisiert und in 10% FKS-haltiger PBS Lösung aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension in FACS-Röhrchen überführt und bei 250 g und  $4^\circ\text{C}$  für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in  $100 \mu\text{L}$  PBS suspendiert. Durch tropfenweise Zugabe von eiskaltem 70% Ethanol wurden die Zellen unter Vortexen fixiert und für mindestens 24 h bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Zum Anfärben der DNA wurden die Zellen bei 250 g und  $4^\circ\text{C}$  für 5 min pelletiert und nach dem Entfernen des Überstandes mit  $500 \mu\text{L}$  CyStain® DNA/Protein-Lösung mit DAPI (Partec) versetzt. Anschließend wurden die Zellen für mindestens 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert und bis zur Messung am Durchflusszytometer auf Eis gelagert.

#### Messung und Auswertung

Die Analyse der Zellzyklusverteilung erfolgte am Durchflusszytometer LSR Fortessa™ (BD Biosciences). Aus jeder Probe wurden 20.000 Zellen analysiert. Die Auswertung wurde mit der Software BD FACS Diva™ durchgeführt. Zelltrümmer und Doubletten wurden ausgeschlossen und im Histogramm die Zellpopulation einer Probe in  $G_0/G_1$ -, S- bzw.  $G_2/M$ -Phase eingeteilt. Zur Darstellung der Ergebnisse wurden die Zellen in einer Zellzyklusphase auf die Gesamtzahl der detektierten Zellen in allen Zellzyklusphasen bezogen.

## **4.7 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Zur Quantifizierung der freigesetzten Entzündungsmediatoren IL-6 und IL-8 wurde die ELISA-Technik angewendet. Hierzu wurden  $3,68 \times 10^5$  Zellen in  $22 \text{ cm}^2$  Schalen ausgestreut und für 24 h mit den Substanzen behandelt. Nach Ende der Inkubation wurde  $1,5 \text{ mL}$  Überstand in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 250 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und bis zur Analyse bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Die Analysen wurden mittels OptEIA™ ELISA-Kits von BD Biosciences nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierzu wurde zunächst der erste Antikörper (capture antibody), welcher spezifisch das Zielprotein bindet, in einer 96-Well Platte (MaxiSorp™) immobilisiert. Nach dem Blockieren der Platten mit 0,5% BSA-Lösung erfolgte die Beladung mit den Proben. Die ungebundenen Probenbestandteile wurden durch Waschen entfernt und der biotinylierte Detektionsantikörper (detection antibody) zusammen mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltem Avidin zugegeben. Durch erneutes Waschen der Platten wurde der überschüssige Detektionsantikörper entfernt. Anschließend wurden die Proben mit Substratlösung versetzt und bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm photometrisch analysiert.

### Messung und Auswertung

Die Quantifizierung erfolgte anhand einer mitgeführten Standardreihe im Bereich von 16,9 - 1085 pg/mL IL-8 bzw. 12,5 - 800 pg/mL IL-6. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die ermittelten Gehalte auf den Mittelwert der Kontrolle normiert.

## **4.8 Einfluss auf die Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7**

Caspasen (Cysteinyl-Aspartatspezifische Proteasen) sind Cysteinproteasen, welche eine entscheidende Rolle beim Einleiten der Apoptose spielen. Die Caspasen werden in drei Gruppen (Proinflammatorische-, Initiator- und Effektor- Caspasen) eingeteilt. Caspase 3 und 7 gehören zu den Effektor-Caspasen, welche durch die Initiator-Caspasen prozessiert und damit aktiviert werden. Es folgt die gezielte Spaltung ihrer Substrate und somit das Einleiten der Apoptose (Slee et al. 1999).

Die verwendete Methode basiert auf der Messung der Lumineszenz, welche infolge der proteolytischen Aktivität von Caspase 3 und 7 freigesetzt wird. Dabei wird das zugesetzte Aminoluciferin-gebundene Tetrapeptid mit der Sequenz Z-DEVD-AMC durch die aktivierten Caspasen gespalten und das Aminoluciferin freigelegt. Das gebildete Substrat wird anschließend unter Lichtemission von dem Enzym Luciferase zu Luciferin oxidiert. Die Lumineszenz ist proportional zur Caspase-3/7-Aktivität.

Für diese Untersuchungen wurden  $5,5 \times 10^4$  Zellen pro Well einer weißen 96-Wellplatte (BRAND® plates) ausgesät und nach der Anwachsphase für 24 h mit den Testsubstanzen inkubiert. Anschliessend wurde das Kit CaspaseGlo® 3/7 von Promega gemäß den Herstellerangaben verwendet.

### Auswertung

Zur Ermittlung der Hintergrundlumineszenz wurden zellfreie Blindwerte mitgeführt und von den Proben abgezogen. Die Ergebnisse wurden relativ zum Mittelwert der unbehandelten Kontrolle angegeben.

## **4.9 Quantifizierung der zellulären Poly(ADP-Ribosyl)ierung**

Bei der Poly(ADP-Ribosyl)ierung handelt es sich um eine posttranslationale Modifikation von Proteinen, die bei der Regulation vieler zellulärer Prozesse, darunter auch die Initialisierung der Einzelstrangbruchreparatur beteiligt ist (Fisher et al. 2007). Um das Ausmaß der Poly(ADP-

Ribosyl)ierung in HeLa S3 Zellen zu ermitteln, wurde die Bildung von PAR-Ketten unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers 10H, gewonnen aus Maushybridomazellen (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. A. Bürkle, Molekulare Toxikologie, Universität Konstanz), untersucht. Zur Quantifizierung wurde die Fluoreszenz-Intensität des FITC-gekoppelten Sekundärantikörpers detektiert. Die Proben wurden unter meiner Anleitung von Eva Lotter präpariert und analysiert.

In 9 cm<sup>2</sup> Zellkulturschalen, mit jeweils einem Deckgläschen (ø 12 mm), wurden je 1,53 x 10<sup>5</sup> HeLa S3 Zellen ausgesät und nach der Anwachsphase für 24 h mit den Testsubstanzen inkubiert. Zur Induktion der Poly(ADP-Ribosyl)ierung wurde danach 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung in das Inkubationsmedium pipettiert und für 5 min bei 37°C belassen. Anschließend wurden die Deckgläschen mit PBS gewaschen und für mindestens 10 min in 10% Trichloressigsäure (w/v in H<sub>2</sub>O) auf Eis fixiert. Die fixierten Präparate wurden schrittweise für jeweils 5 min mit 70%, 90% und 96% eiskaltem Ethanol entwässert und im Anschluss bei RT getrocknet. Im nächsten Arbeitsschritt wurden die Deckgläschen mit PBS benetzt und bei 37°C für 30 min in einer feuchten Kammer mit dem PAR 10H-Antikörper inkubiert. Nach dem Entfernen der überschüssigen Primärantikörper erfolgte die Inkubation mit dem FITC-gekoppeltem Sekundärantikörper. Nach wiederholten Waschschritten mit PBS wurden die Proben mit Vectashield Mounting Medium mit DAPI auf Objektträger eingedeckt, mit klarem Nagellack versiegelt und bis zur Auswertung bei 4°C aufbewahrt.

#### Messungen und Auswertung

Die Aufnahmen und Auswertung der Proben erfolgten am Fluoreszenzmikroskop Axio Imager und der dazugehörigen Software ZEN pro2011 bzw. AxioVision der Firma Carl Zeiss AG. Pro Deckgläschen wurden mit einem 63er-Objektiv mindestens 100 Zellen aufgenommen und über das Gesamtfluoreszenzsignal in der Kernfläche quantifiziert. Tote und mitotische Zellen wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

## **4.10 Intrazelluläre Aufnahme mittels Graphitrohr-AAS**

Zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit wurde der intrazelluläre Nickelgehalt mit Hilfe der Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) quantifiziert. Die Methode basiert auf der Fähigkeit von Atomen, elektromagnetische Strahlung bestimmter Wellenlänge zu absorbieren. Für die quantitative Analyse wird das Lambert-Beersche-Gesetz herangezogen, welches einen linearen Zusammenhang zwischen der Extinktion  $A$  und der Anzahl an absorbierenden Atome  $N$  unter Einbeziehung des Absorptionskoeffizienten beschreibt. Die Anzahl der absorbierenden Atome steht allerdings meist nicht in einfacher Beziehung zum Gehalt des Analyten in der Probe

(Gleichung 12). Deshalb wird bei der AAS der Analytgehalt anhand einer Kalibrierung ermittelt (Welz & Sperling 1998). Diese Untersuchung war Teil der Diplomarbeit von Julia Polley.

Gleichung 12 
$$A = \lg \frac{I}{I_0} = \kappa_\lambda \cdot N \cdot d$$

A = Extinktion

I = Intensität nach der Absorption

$I_0$  = Intensität vor der Absorption

$\kappa_\lambda$  = spektraler Atomabsorptionskoeffizient

d = Länge der absorbierenden Schicht

N = Gesamtanzahl an freien, absorbierenden Atomen im Atomisator

Je  $1 \times 10^6$  Zellen wurden in  $60 \text{ cm}^2$  Zellkulturschalen ausgesät und mit Testsubstanzen inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit FKS-haltigem DMEM gewaschen um anhaftende Partikel möglichst gut zu entfernen. Danach wurden die Zellen mit Trypsin-Lösung abgelöst und in 5 mL FKS-haltigem DMEM resuspendiert. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden  $2,5 \times 10^6$  A549 bzw.  $3 \times 10^6$  BEAS-2B Zellen in 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt und bis zur Aufarbeitung auf Eis gestellt. Danach wurde die Zellsuspension 10 min bei 350 g und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet in 500  $\mu\text{L}$  RIPA-Puffer suspendiert. Daraufhin erfolgte eine 30-minütige Zellyse bei RT und ein anschließender Zentrifugationsschritt bei 16.000 g für 60 min. Von dem Überstand, in dem sich das intrazellulär gelöste Nickel befindet, wurden 300  $\mu\text{L}$  in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und, wie im Abschnitt 4.1.3 beschrieben, mit einem sauren Aufschluss aufgearbeitet. Die Analyse der Proben erfolgte mittels Graphitrohr (GF)-AAS. Weitere Angaben zum AAS-Analysenprogramm sowie gerätespezifische Einstellungen befinden sich im Anhang.

Die Bioverfügbarkeit der Nickelverbindungen wurde ebenfalls in Gegenwart mehrerer Endozytoseinhibitoren getestet. Hierfür wurden die Zellen mit den jeweiligen Inhibitoren 30 min vorinkubiert und danach für einen bestimmten Zeitraum mit Testsubstanzen kokubiert. Die Aufarbeitung erfolgte analog dem oben beschriebenen Versuchsansatz.

#### Berechnung der Nickelkonzentration

Die Quantifizierung erfolgte anhand einer externen Kalibriergeraden im Bereich von 4 – 12  $\mu\text{g/L}$  Nickel. Um Verluste während des Aufschlusses erfassen zu können, wurde bei jedem Versuch ein interner Nickel-Standard mitgeführt. Unter Einbeziehung des mittleren Zellvolumens (V) aus der Zellzahlbestimmung für BEAS-2B ( $1,7 \times 10^{-12}$  L) und A549 ( $2,9 \times 10^{-12}$  L), der Zellzahl (N) und der molaren Masse (M) von Nickel wurden die ermittelten Ergebnisse anhand der nachstehenden Gleichung in die intrazelluläre Konzentration ( $c_{\text{Ni}}$ ) umgerechnet.

Gleichung 13 
$$c_{Ni} = \frac{c_{Messung}}{M_{Ni} \cdot N \cdot V}$$

$c_{Ni}$  = Konzentration ( $\mu\text{M}$ )

$c_{Messung}$  = Konzentration ( $\mu\text{g/L}$ )

$M_{Ni}$  = molare Masse ( $\text{g/mol}$ )

$V$  = Zellvolumen (L)

$N$  = Zellzahl (pro mL)

## 4.11 Statistik

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Mittelwerte aus den Einzelwerten der unabhängigen Versuche mit der zugehörigen Standardabweichung (SD). Die erhobenen Daten wurden mit Signifikanzniveau 5% auf Normalverteilung getestet und einem Ausreißertest unterworfen. Anschließend wurden die Daten auf Varianzhomogenität geprüft und einer einfaktoriellen ANOVA Varianzanalyse unterzogen. Bei Varianzhomogenität wurde Dunnett's Post-Hoc Test, und bei Datengruppen ohne Varianzhomogenität Dunnett's T3-Test angewendet. Bei nicht normalverteilten Daten wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test ein nicht-parametrisches Testverfahren angewandt.

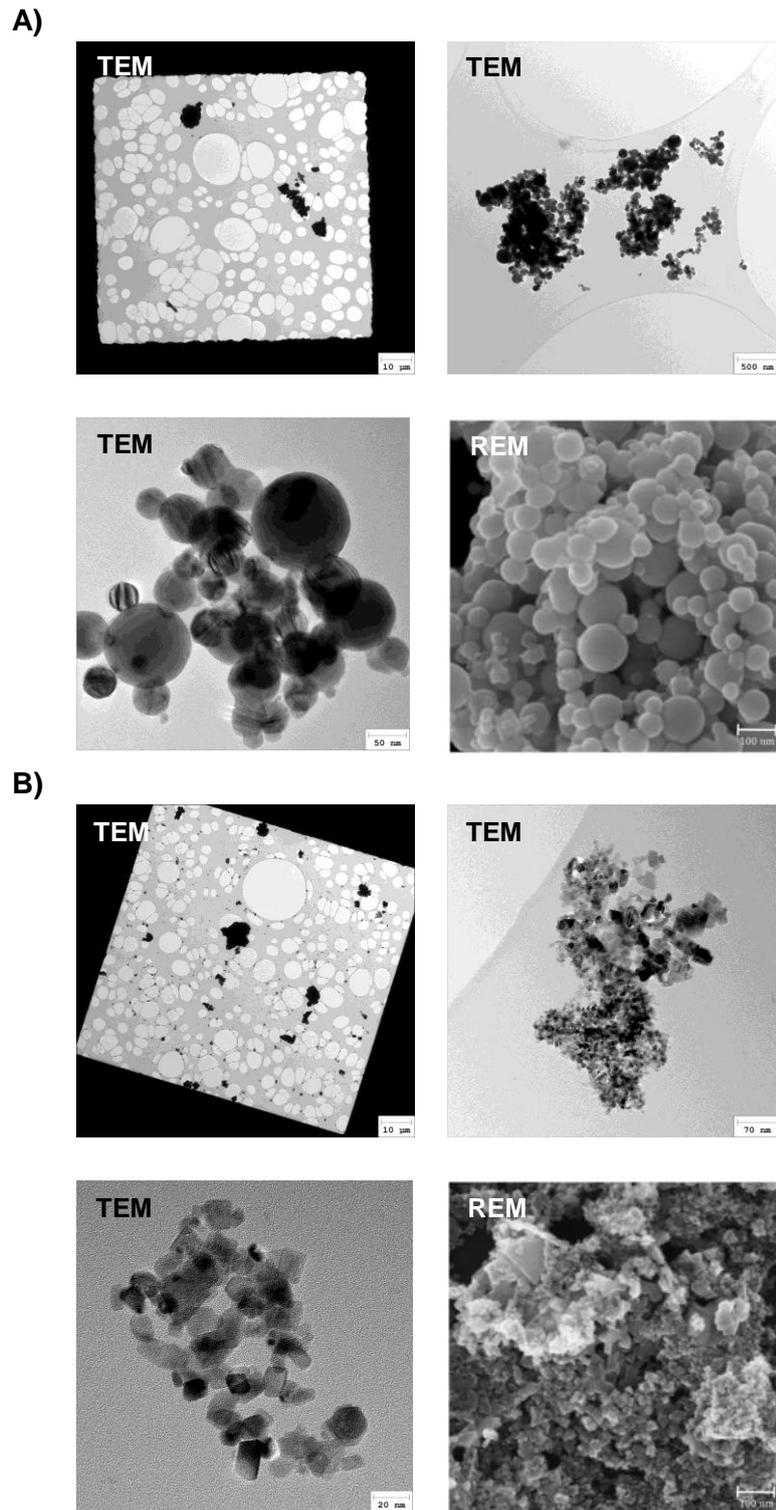
## 5. Ergebnisse und Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, inwieweit die toxikologische Wirkung der nanoskaligen partikulären Nickelverbindungen mit den bereits besser untersuchten Wirkmechanismen von gelöstem Nickel vergleichbar sind, oder ob aufgrund der veränderten physikochemischen Materialeigenschaften im nanoskaligen Bereich neue toxikologische Wirkmechanismen auftreten. Als Modellpartikel wurden kommerziell erhältliche Nickelnanopartikel (NiNP) und Nickeloxid Nanopartikel (NiONP) verwendet und mit löslichem Nickelchlorid ( $\text{NiCl}_2$ ) verglichen. Die physikochemischen Eigenschaften von Partikeln können das toxische Potential entscheidend beeinflussen (Jiang et al. 2008; Limbach et al. 2007), weshalb die Partikel zuerst umfassend charakterisiert wurden. Zum Vergleich der biologischen Wirkmechanismen wurden als zelluläres Modellsystem die humane Lungenepithelzelllinie A549 und Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B herangezogen. Anhand verschiedener biologischer Endpunkte wie Zytotoxizität, Genotoxizität, Genexpression und Bioverfügbarkeit der Nickelverbindungen wurden die Wirkmechanismen identifiziert und verglichen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im Folgenden vorgestellt und diskutiert.

### 5.1 Partikelcharakterisierung

#### 5.1.1 Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der NiNP haben gezeigt, dass die Partikel überwiegend sphärisch geformt sind und eine glatte Oberfläche aufweisen (Abbildung 3A). Die Partikel besitzen eine breite Partikelgrößenverteilung zwischen 20 und 300 nm, wobei der Großteil der Partikel in dem vom Hersteller angegebenen Bereich von  $< 100$  nm liegt. Im Gegensatz zu den metallischen Nickelpartikeln sind NiONP unregelmäßig geformt und die Größenverteilung der Primärpartikel bewegte sich zwischen 5 und 70 nm (Abbildung 3B). Der größte Anteil der Partikel liegt jedoch deutlich unterhalb des vom Hersteller angegebenen Größenbereichs von  $< 50$  nm. Des Weiteren sind auf den Aufnahmen nicht nur einzelne NiNP und NiONP zu erkennen, sondern es sind auch zusammengelagerte Partikel in Form von Agglomeraten bzw. Aggregaten eines Durchmessers bis zu  $10 \mu\text{m}$  erkennbar.



**Abbildung 3: TEM und REM-Aufnahmen der A) NiNP und B) NiONP.** Die Partikel wurden in Wasser resuspendiert und auf das Trägermaterial aufgetragen und an der Luft getrocknet. In den Übersichtsaufnahmen der NiNP und NiONP sind Agglomerate bis zu 10 µm erkennbar. Bei höherer Vergrößerung ist ersichtlich, dass NiNP überwiegend sphärisch, NiONP hingegen unregelmäßig geformt sind.

Elektronenmikroskopische Methoden eignen sich gut zur Charakterisierung von trockenen Proben. Jedoch entspricht dies nicht dem Zustand der Partikel in zellkulturbasierten Untersuchungen. Durch das Resuspendieren der Partikel in Zellkulturmedien agglomerieren die Partikel möglicherweise stärker, wodurch sich die Partikelgrößenverteilung, und dadurch auch die Sedimentation in Untersuchungen mit Zellkulturen, verändert (Hinderliter et al. 2010). Deshalb wurde zusätzlich mittels der Dynamischen Lichtstreuung (DLS) die Partikelgröße in den Zellkulturmedien untersucht (Abschnitt 5.1.3).

### **5.1.2 Spezifische Oberfläche mittels BET-Analyse**

Um eine Aussage über die spezifische Oberfläche der Partikel treffen zu können, wurde die BET-Analyse durchgeführt (Brunauer et al. 1938). Die ermittelte spezifische Oberfläche der NiNP betrug  $9,2 \text{ m}^2/\text{g}$  Probe. Bei NiONP konnte hingegen eine spezifische Oberfläche von  $157,1 \text{ m}^2/\text{g}$  Probe bestimmt werden, welche die Angaben des Herstellers ( $80 \text{ m}^2/\text{g}$ ) deutlich überschreitet. Unter Berücksichtigung der Dichte, und der Annahme, dass die untersuchten partikulären Verbindungen ideal sphärisch geformt sind und monodispers vorliegen, wurde ein mittlerer Partikeldurchmesser von  $74 \text{ nm}$  für NiNP ermittelt (Tabelle 2). Der errechnete Wert stimmt gut mit Herstellerangaben und den Beobachtungen aus der TEM-Analyse überein. Die NiONP hingegen wiesen, aufgrund der sehr großen spezifischen Oberfläche, einen kleineren mittleren Partikeldurchmesser von  $6 \text{ nm}$  auf. Jedoch muss bei der Betrachtung der Ergebnisse berücksichtigt werden, dass es sich bei den Partikeln um keine monodispersen, sphärischen Gebilde handelt und deshalb die Berechnungen mit Fehlern behaftet sind (Riley 2003). Beim Vergleich der Ergebnisse mit bereits publizierten Charakterisierungen der gleichen Partikel (Capasso et al. 2014; Pietruska et al. 2011) fällt auf, dass die Werte stark variieren, was die Schlussfolgerungen anderer Forschergruppen bestätigt, wonach eine eigene Charakterisierung des Probenmaterials und die Überprüfung der Herstellerangaben zwingend erforderlich ist (Schulze et al. 2008).

Tabelle 2: Spezifische Oberfläche der partikulären Nickelverbindungen nach der BET-Methode und die errechneten Partikelgrößen unter Berücksichtigung der Dichte und der Annahme, dass die untersuchten partikulären Verbindungen ideal sphärisch geformt sind und monodispers vorliegen.

	<b>BET</b> <b>(m<sup>2</sup>/g)</b>	<b>Dichte</b> <b>(g/cm<sup>3</sup>)</b>	<b>Partikeldurchmesser</b> <b>(nm)</b>
<b>NiNP</b>	9,2	8,90	74
<b>NiONP</b>	157,1	6,67	6

### 5.1.3 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Zur Bestimmung der hydrodynamischen Radien der NiNP und NiONP wurden diese in den verwendeten Zellkulturmedien suspendiert und mit dem Zetasizer Nano ZS von Malvern untersucht. In reinem Medium konnten Signale im Bereich zwischen 3 und 100 nm detektiert werden, welche vermutlich von den Proteinen aus dem Zellkulturmedium stammen (Daten nicht gezeigt). Diese könnten bei der Bestimmung der Partikelgrößenverteilung, vor allem im niedrigen Konzentrationsbereich, stören. Deshalb wurden in nachfolgenden Untersuchungen Konzentrationen gewählt, welche über dem verwendeten Konzentrationsbereich der eigentlichen *in vitro* Untersuchungen liegen. Hierdurch lässt sich der Einfluss von den Bestandteilen des Mediums auf das Streulicht diskriminieren (Berne & Pecora 2000). Wie man Tabelle 3 entnehmen kann, lagen die gemessenen hydrodynamischen Radien der Partikel um ein vielfaches höher als bei den REM-, TEM- und BET-Analysen und deuten auf eine starke Agglomeration der Partikel in den Dispergenzen hin. Beim Vergleich der Substanzen untereinander fällt auf, dass die NiONP im Vergleich zu NiNP einen kleineren Radius aufweisen. Zwischen den verschiedenen Medien konnten keine Unterschiede detektiert werden. Bei höheren Konzentrationen verschiebt sich die Verteilung in Richtung größerer Agglomerate. Dies könnte mit der unzureichenden sterischen oder elektrostatischen Abschirmung der Partikel durch Ionen oder Proteine und dem daraus resultierenden verstärkten Einfluss von Van-der-Waals-Kräften zusammenhängen, wodurch die Agglomeration begünstigt wird (Lim et al. 2013; Jiang et al. 2008).

Tabelle 3: Hydrodynamischer Radius von NiNP und NiONP in FKS-haltigem DMEM bzw. LHC-9 Medium ermittelt mit DLS. Hierzu wurden die Partikelsuspensionen wie in Abschnitt 4.1.2 beschrieben vorbereitet und nach kurzem vortexen unverzüglich die Messungen in Polystyrolküvetten durchgeführt. Der mittlere hydrodynamische Partikelradius  $\pm$  SD wurde aus mindestens 10 Einzelmessungen ermittelt.

	Konzentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Hydrodynamischer Radius (nm) $\pm$ SD	
		NiNP	NiONP
<b>DMEM mit 10% FKS</b>	500	533 $\pm$ 132	166 $\pm$ 59
	1000	698 $\pm$ 153	156 $\pm$ 30
<b>LHC-9</b>	500	348 $\pm$ 158	123 $\pm$ 89
	1000	509 $\pm$ 173	160 $\pm$ 65

Der Polydispersitätsindex lag sowohl bei NiNP als auch bei NiONP, unabhängig von der Konzentration, bei rund 0,5. Dies bedeutet, dass die Partikel polydispers vorlagen und eine breite Größenverteilung aufwiesen. Für polydisperse Proben sind die beim DLS-Verfahren verwendeten mathematischen Näherungsverfahren grundsätzlich schlecht geeignet und können zu falschen Ergebnissen führen (Lim et al. 2013). Deshalb wäre hier zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilung eine Separierung der Partikel aufgrund ihrer Dichte mittels der analytischen Ultrazentrifugation (AUZ) besser geeignet (Wohlleben 2012).

Es existieren nur wenige Studien, die ähnliche Partikel in vergleichbaren Medien mittels DLS charakterisierten. Aufgrund der vielen verschiedenen Einflussfaktoren ist es aber selbst dann schwierig, publizierte Daten mit den hier vorliegenden Ergebnissen zu vergleichen. Bei Untersuchungen von Capasso et al. (2014) wurde eine multimodale Größenverteilung der NiONP des gleichen Herstellers in FKS-haltigem DMEM (100  $\mu\text{g/mL}$ ) mit einem mittleren Durchmesser von 80 nm bzw. 450 nm gemessen, was die Daten aus der vorliegenden Studie bestätigt. DLS-Untersuchungen von Pietruska et al. (2011) zeigten, dass sich die Größenverteilung der gleichen NiNP wie in der vorliegenden Arbeit in verschiedenen Medien zwischen 300 und 1000 nm bewegte. Ahamed (2011) ermittelte für NiNP in FKS-haltigem DMEM einen mittleren hydrodynamischen Radius von 176 nm. Der Unterschied zu der hier ermittelten Partikelgröße von 533 – 698 nm könnte in der unterschiedlichen Präparation der Partikelsuspension begründet liegen, weshalb die Ergebnisse nur bedingt miteinander verglichen werden können.

Zusammenfassend konnte mit der DLS-Analyse gezeigt werden, dass die getesteten Partikel stark agglomerieren und die ermittelten Partikelgrößen sich deutlich von den Werten aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen unterscheiden. Des Weiteren zeigten die Ergebnisse, dass die NiONP im Vergleich zu NiNP in Suspension einen geringeren hydrodynamischen Radius aufweisen.

### 5.1.4 Zetapotential

Mit Hilfe des Zetapotentials kann eine Aussage über die Stabilität der Partikel in wässrigen Lösungen getroffen werden. In stabilen Suspensionen ist ein Zetapotential von  $\pm 30$  mV zu erwarten. Bei einer instabilen Suspension strebt das Zetapotential gegen 0 mV (Malvern Instruments 2012). Die Messwerte der untersuchten Suspensionen sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Nur geringe Unterschiede konnten zwischen den Partikeln und verwendeten Suspensionsmedien detektiert werden. Ebenso deuten die negativen Werte daraufhin, dass es sich bei den hergestellten Partikelinkubationslösungen um keine stabilen Suspensionen handelt. Negative Zetapotentiale der NiNP und NiONP in Zellkulturmedien wurden bereits publiziert und korrelieren mit den Daten aus der vorliegenden Arbeit (Capasso et al. 2014; Cho et al. 2012; Pietruska et al. 2011).

Tabelle 4: Zetapotentiale der partikulären Nickelverbindungen in verschiedenen Zellkulturmedien. Die Partikelsuspension wurde wie in Abschnitt 4.1.2 beschrieben vorbereitet und nach kurzem vortexen unverzüglich die Messungen in der Kapillarzelle des Herstellers (DTS 1061C) durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD aus mindestens drei Einzelmessungen.

	Konzentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Zetapotential (mV) $\pm$ SD	
		NiNP	NiONP
<b>DMEM mit 10% FKS</b>	0	-11,4 $\pm$ 0,6	
	50	-16,5 $\pm$ 0,4	-16,4 $\pm$ 1,0
	500	-16,8 $\pm$ 0,6	-16,8 $\pm$ 0,5
	1000	-16,6 $\pm$ 1,2	-16,1 $\pm$ 0,4
<b>LHC-9</b>	0	-14,1 $\pm$ 1,0	
	50	-18,2 $\pm$ 0,2	-17,8 $\pm$ 0,5
	500	-18,5 $\pm$ 0,8	-18,3 $\pm$ 0,3
	1000	-18,0 $\pm$ 1,2	-18,1 $\pm$ 0,5

### 5.1.5 Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)

Die chemische Zusammensetzung der Proben wurde mittels EDX untersucht. Die EDX-Spektren der NiNP weisen die charakteristischen Nickelpeaks auf (siehe Anhang). Wie erwartet, konnte bei den NiONP zusätzlich ein Sauerstoffpeak detektiert werden. Überraschenderweise konnte in NiNP ebenfalls ein geringer Anteil an Sauerstoff nachgewiesen werden, was sich vermutlich auf Oxidation der Partikeloberfläche zurückführen lässt (Allen et al. 1979). Des Weiteren waren Signale von Silizium (Si) und Platin (Pt) nachweisbar, welche jedoch aus dem verwendeten Trägermaterial (Siliziumwafer) bzw. der Probenpräparation (Aufdampfen von Pt zur Erhöhung der Leitfähigkeit) stammen. Bei dem Kohlenstoffpeak handelt es sich um ein

Artefakt des Gerätes, das bei jeder Messung miterfasst wird. Das Fehlen weiterer element-spezifischer Signale deutet auf eine hohe Reinheit der untersuchten Proben hin. Jedoch werden, aufgrund der geringen Empfindlichkeit dieses Verfahrens, Verunreinigungen im Spurenbereich nicht erfasst (Suzuki 2006), weshalb zur Bestimmung der Reinheit weitere Methoden herangezogen wurden.

### **5.1.6 Reinheit der Partikel**

Um Verunreinigungen im Spurenbereich auszuschließen, wurden die Nickelverbindungen zusätzlich mittels ICP-MS untersucht. Die Analyseergebnisse der überprüften Elemente und die Herstellerangaben aus dem Analysenzertifikat sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Die NiNP weisen eine hohe Reinheit auf. Der Gehalt der Verunreinigungen liegt, mit Ausnahme von Mangan, unterhalb der im Analysenzertifikat des Herstellers angegebenen Konzentrationen. NiONP enthalten einen höheren Anteil an Fremdmetallen, die jedoch einen Gewichtsanteil von 0,2% nicht überschreiten und somit die Reinheitskriterien des Herstellers erfüllen. Insgesamt bestätigten die Ergebnisse die bereits mit der EDX-Analyse gezeigte Reinheit der Partikel und es kann davon ausgegangen werden, dass die Metallverunreinigungen in dem später verwendeten Arbeitsbereich ( $\mu\text{g Ni/mL}$ ) aufgrund der sehr geringen Konzentrationen ( $\text{pg Metall/mL}$ ) keine Auswirkungen auf das biologische Testsystem haben.

Tabelle 5: Der Gehalt an Verunreinigungen in NiNP und NiONP (ppm). Die Partikel wurden, wie im Abschnitt 4.1.3 beschrieben, einem sauren Aufschluss unterzogen und mittels ICP-MS analysiert. Zum Vergleich ist der Gehalt an Verunreinigungen aus dem Reinheitszertifikat des Herstellers aufgeführt. Bei einigen Elementen lag der Gehalt unterhalb der Bestimmungsgrenze (BG) und konnte deshalb nicht quantifiziert werden. Elemente, die die Herstellerangaben überschreiten, wurden grau hinterlegt.

Elemente	NiNP		NiONP	
	(ppm)	Hersteller (ppm)	(ppm)	Hersteller (ppm)
<b>Aluminium</b>	322,5	922,2	35,0	31,3
<b>Antimon</b>	< BG	–	< BG	6,8
<b>Arsen</b>	< BG	–	–	–
<b>Barium</b>	< BG	0,1	< BG	0,7
<b>Blei</b>	3,1	446,6	2,5	88,6
<b>Bor</b>	< BG	3,8	< BG	3,1
<b>Calcium</b>	–	–	< BG	5,9
<b>Chrom</b>	51,6	182,2	< BG	4,5
<b>Eisen</b>	134,3	721	25,9	26,8
<b>Kobalt</b>	46,8	41,8	71,7	69,3
<b>Kupfer</b>	54,0	108,3	10,5	9,0
<b>Magnesium</b>	–	–	< BG	0,5
<b>Mangan</b>	297,4	277,3	< BG	0,4
<b>Natrium</b>	–	–	16,7	2,3
<b>Platin</b>	–	–	< BG	–
<b>Quecksilber</b>	< BG	–	–	–
<b>Silicium</b>	< BG	–	–	–
<b>Titan</b>	134,3	778,8	10,7	85,4
<b>Vanadium</b>	< BG	11,4	< BG	6,3
<b>Zink</b>	2,6	89,7	–	–
<b>Zinn</b>	13,2	86,3	< BG	6,5

### 5.1.7 Bestimmung des Sauerstoffgehalts mittels Trärgasheiextraktion

Die Ergebnisse aus der EDX-Analyse suggerierten, dass eine Oxidschicht an der Oberfläche der NiNP vorhanden sein könnte. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde zusätzlich eine Trrgasheiextraktion (TGHE) durchgeführt. Bei der TGHE handelt es sich um ein sehr empfindliches thermisches Messverfahren zur Bestimmung des Sauerstoffgehaltes in Feststoffen und Flüssigkeiten (Gruner 1999).

Im Einklang mit den EDX-Messungen zeigte die TGHE-Analyse tatsächlich einen geringen Sauerstoffanteil in den metallischen NiNP. Das Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen von Pietruska et al. (2011) überein, die ebenfalls eine Oxidschicht auf der Oberfläche der gleichen NiNP identifizierten. Die NiONP hatten einen geringfügig höheren Sauerstoffgehalt als stöchiometrisch zu erwarten gewesen wäre (Tabelle 6). Da die NiONP eine grün-schwarze Färbung aufweisen, sind sie möglicherweise mit höheren Oxiden verunreinigt, was den erhöhten Sauerstoffgehalt erklären würde (Holleman & Wiberg 2002). Dies müsste allerdings mit weiteren Untersuchungen, z.B. einer Kristallgitteranalyse bestätigt werden.

Tabelle 6: Überprüfung des Sauerstoffgehalts in partikulären Nickelverbindungen mittels TGHE. Zum Vergleich ist der theoretische Sauerstoffgehalt der jeweiligen Verbindung angegeben. Dabei wurde angenommen, dass die NiONP in reiner Form vorliegen.

<b>partikuläre Nickelverbindungen</b>	<b>Sauerstoffgehalt ± SD (Masse in %)</b>	<b>theor. Sauerstoffgehalt (Masse in %)</b>
<b>NiNP</b>	3,13 ± 0,1	–
<b>NiONP</b>	26,4 ± 5,4	21,4

### 5.1.8 Endotoxine

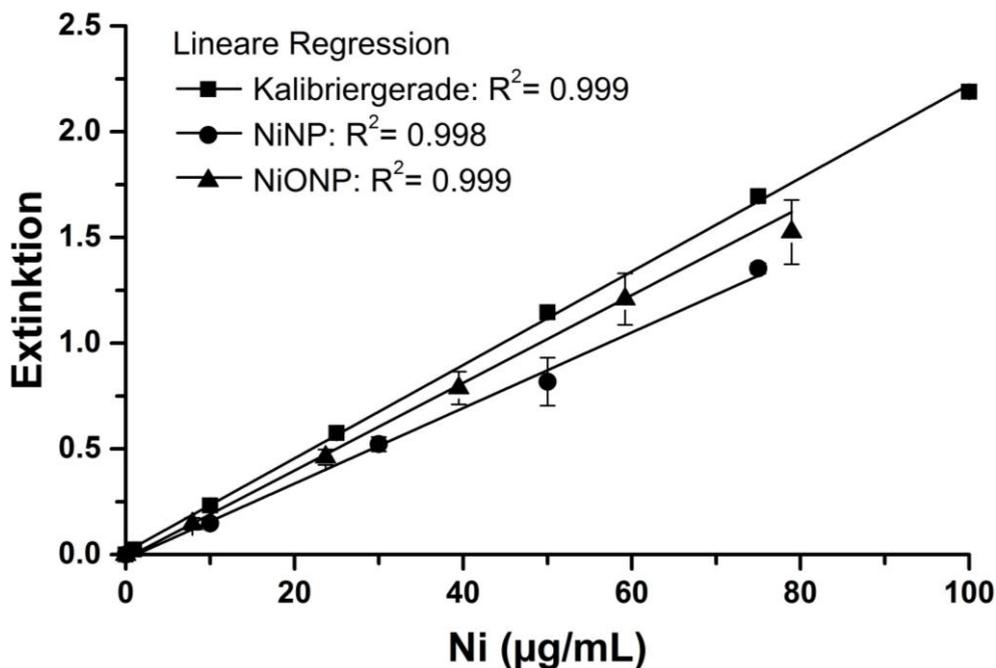
Neben elementaren Verunreinigungen können auch bakterielle Kontaminationen, z.B. durch Endotoxine, die Versuchsergebnisse beeinflussen (Schulze et al. 2008). Bei Endotoxinen handelt es sich um bioaktive Stoffe, welche in der äußeren Membran gram-negativer Bakterien lokalisiert sind. Freigesetzte Endotoxine können in Säugerzellen Entzündungsreaktionen auslösen und dadurch zu Artefakten führen (Smulders et al. 2012; Liebers et al. 2008). Um eine Verunreinigung mit Endotoxinen ausschließen zu können, wurden Partikelsuspensionen in Endotoxin-freiem Wasser, wie im Abschnitt 4.1.2 beschrieben, hergestellt und mit Hilfe des ToxinSensor™ Chromogenic LAL Endotoxin Kits der Endotoxingehalt quantifiziert. Es konnten keine Spuren von Endotoxinen nachgewiesen werden.

### 5.1.9 Linearität der Partikelverdünnungen

Das reproduzierbare Arbeiten mit Nanopartikeln stellt eine große Herausforderung dar. Je nach Herstellungsverfahren der Partikelsuspension und der verwendeten Medien variiert die Partikelgrößenverteilung. Zur Überprüfung des in Abschnitt 4.1.2 beschriebenen Standardprotokolls zur Herstellung der unterschiedlich konzentrierten Partikelsuspensionen, wurde der Nickelgehalt der Partikelsuspensionen photometrisch untersucht. Voruntersuchungen haben gezeigt, dass

die Bildung des Nickel-Dimethylglyoxim-Komplexes durch Bestandteile des Mediums beeinträchtigt wird. Deshalb wurden die Partikel für diese Analyse in Wasser dispergiert, aufgearbeitet und anhand einer mitgeführten Kalibriergerade der Nickelgehalt quantifiziert.

Bei allen untersuchten Partikeln konnte eine lineare Abhängigkeit zwischen der gemessenen Extinktion und der hergestellten Verdünnungsreihe detektiert werden (Abbildung 4). Jedoch stimmen die ermittelten Nickelkonzentrationen aus den Verdünnungen nicht mit den theoretisch zu erwartenden Gehalten überein. Hier lag die Wiederfindung von Nickel aus NiNP bei  $72 \pm 8,4\%$  und aus NiONP bei  $85 \pm 5,5\%$ . Aufgrund der guten Wiederfindung des externen Nickelstandards von  $97 \pm 3,7\%$  und der guten linearen Regression ( $R^2 \geq 0,998$ ) können Probenverluste durch das Aufschlussverfahren sowie beim Herstellen der Verdünnungsreihen ausgeschlossen werden. In Frage kommen dagegen systematische Wägefehler und vor allem die Adsorption der Partikel an den verwendeten Verbrauchsmaterialien. Dieser Verlust bei partikulären Nickelverbindungen muss berücksichtigt werden, wenn dosisabhängige Effekte der Partikel und der löslichen Verbindungen miteinander verglichen werden.

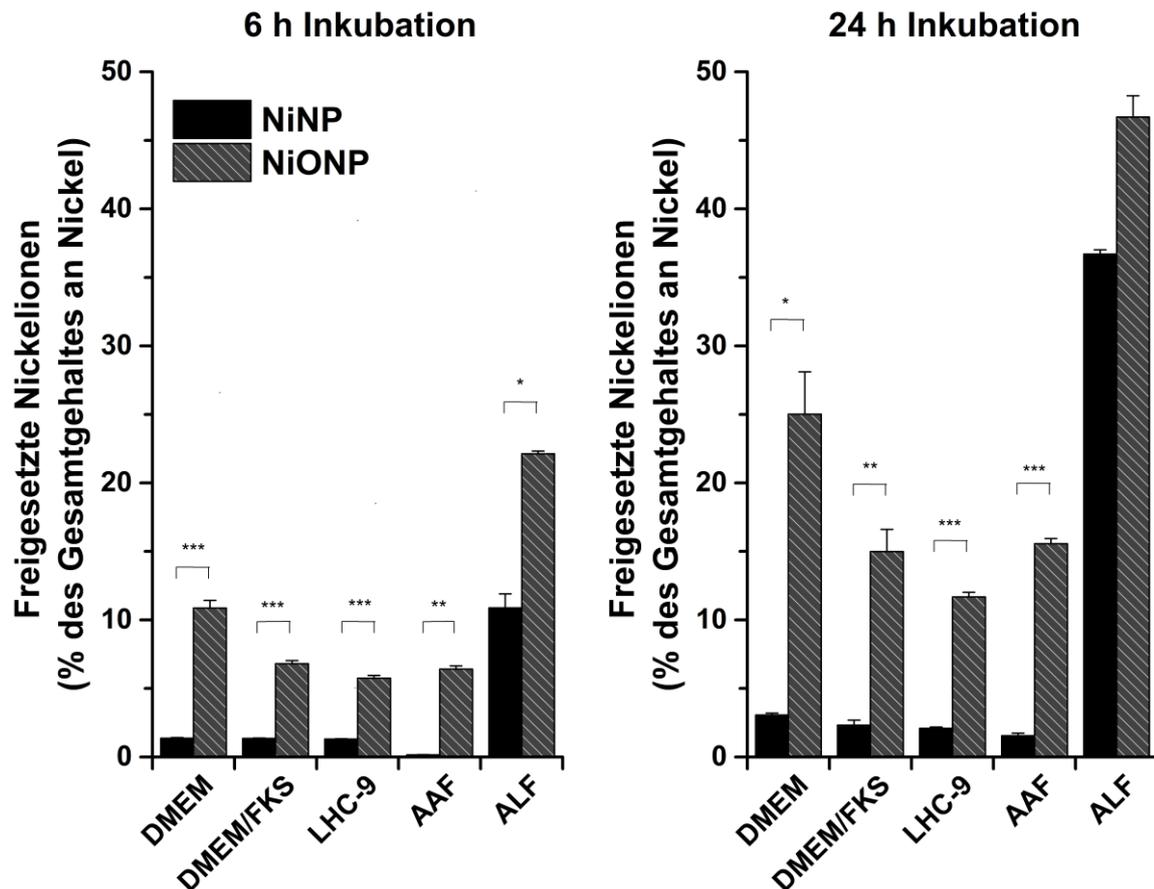


**Abbildung 4: Linearer Zusammenhang zwischen der eingesetzten Konzentration der hergestellten Partikelsuspension von NiNP und NiONP.** Die Partikel wurden wie in Abschnitt 4.1.2 beschrieben in Wasser resuspendiert, aufgearbeitet und der Nickelgehalt anhand der mitgeführten Kalibriergerade quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen und das aus der linearen Regression ermittelte Bestimmtheitsmaß  $R^2$ .

### 5.1.10 Löslichkeit der Nickelverbindungen

Zur Ermittlung der Löslichkeit der partikulären Nickelverbindungen in verschiedenen physiologischen und Zellkultur-relevanten Flüssigkeiten wurde zeitabhängig die Konzentration der freigesetzten Nickelionen mittels GF-AAS quantifiziert. Die untersuchten Nickelverbindungen zeigten in allen untersuchten Medien eine zeitabhängige Löslichkeit (Abbildung 5). Bei den NiONP wurde im Vergleich zu NiNP eine signifikant höhere Nickelionenkonzentration in den untersuchten Medien und Puffern detektiert. Diese Ergebnisse stehen mit den physikochemischen Eigenschaften der Partikel im Einklang. Metallisches Nickel verfügt im Vergleich zu NiO über eine hohe chemische Stabilität (Holleman & Wiberg 2002; Barceloux 1999). Das deutlich höhere Oberflächen- zu Volumenverhältnis der NiONP (Abschnitt 5.1.2) könnte ebenfalls zu der besseren Löslichkeit beitragen. Der pH-Wert der untersuchten Medien hatte einen wesentlichen Einfluss auf die Löslichkeit der Partikel. So lösten sich die partikulären Nickelverbindungen nur geringfügig in neutralen Zellkulturmedien sowie in künstlicher alveolärer Flüssigkeit (AAF), welche das physiologische Milieu der Lunge simuliert (Stopford et al. 2003). Im Vergleich dazu wurden in künstlicher lysosomaler Flüssigkeit (ALF), welche das Milieu in den Lysosomen mit einem sauren pH-Wert von 4,5 – 5 simulieren soll (Midander et al. 2007), hohe Mengen an Nickelionen aus den partikulären Verbindungen herausgelöst. Diese Ergebnisse spiegeln die chemischen Eigenschaften von Nickelverbindungen wieder. Sie erweisen sich in wässrigen Medien als sehr beständig, lösen sich jedoch leicht in Säuren (Holleman & Wiberg 2002; Barceloux 1999). Darüber hinaus wird aus den Daten ersichtlich, dass in Anwesenheit von FKS in den Medien die Löslichkeit herabgesetzt wird. Dieser Sachverhalt könnte durch die Ausbildung einer Proteinkorona erklärt werden (Monopoli et al. 2012; Ruh et al. 2012; Walkey & Chan 2012). Hierbei werden die Proteine an der Partikeloberfläche adsorbiert und dadurch die Löslichkeit vermindert (Semisch et al. 2014).

In der Studie von Mazinianian et al. (2013) wurde die Löslichkeit verschiedener Nickelverbindungen ebenfalls in physiologischen Lösungen untersucht. Die Autoren konnten zeigen, dass NiNP mit einer spezifischen Oberfläche von  $1,05 \text{ m}^2/\text{g}$  in ALF eine höhere Löslichkeit besitzen als NiONP mit einer kleineren spezifischen Oberfläche ( $0,25 \text{ m}^2/\text{g}$ ). Dabei lag die Löslichkeit der NiONP in ALF nach 24 h Inkubation unter 1%. Von den NiNP waren nach 24 h hingegen über 80% gelöst. Die Autoren schlussfolgern, dass die Löslichkeit der partikulären Nickelverbindungen sowohl durch die chemische Zusammensetzung, als auch durch das Oberflächen- zu Volumenverhältnis maßgeblich bestimmt wird (Mazinianian et al. 2013). Diese Schlussfolgerungen korrelieren gut mit den Beobachtungen aus der vorliegenden Arbeit. Ebenso verdeutlichen die Daten, dass die Freisetzung der Nickelionen von Faktoren wie pH-Wert und Zusammensetzung des Mediums abhängt.



**Abbildung 5: Zeitabhängige Löslichkeit der NiNP und NiONP in verschiedenen physiologischen und Zellkultur-relevanten Medien.** Die Partikel wurden wie im Abschnitt 4.1.2 beschrieben in verschiedenen Medien resuspendiert (50 µg Ni/mL) und unter Zellkulturbedingungen für 6 und 24 h inkubiert. Nach Zentrifugation (16.000 g, 60 min) wurde im Überstand der Gehalt an freigesetzten Nickelionen mittels GF-AAS bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD der freigesetzten Nickelmenge relativ zu dem Gesamtnickelgehalt aus drei unabhängigen Versuchen (n = 3). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Verbindungen wurden mit ANOVA und Dunnett's T3 Post-Hoc Test bestimmt: \* p ≤ 0.05; \*\* p ≤ 0.01; \*\*\* p ≤ 0.001.

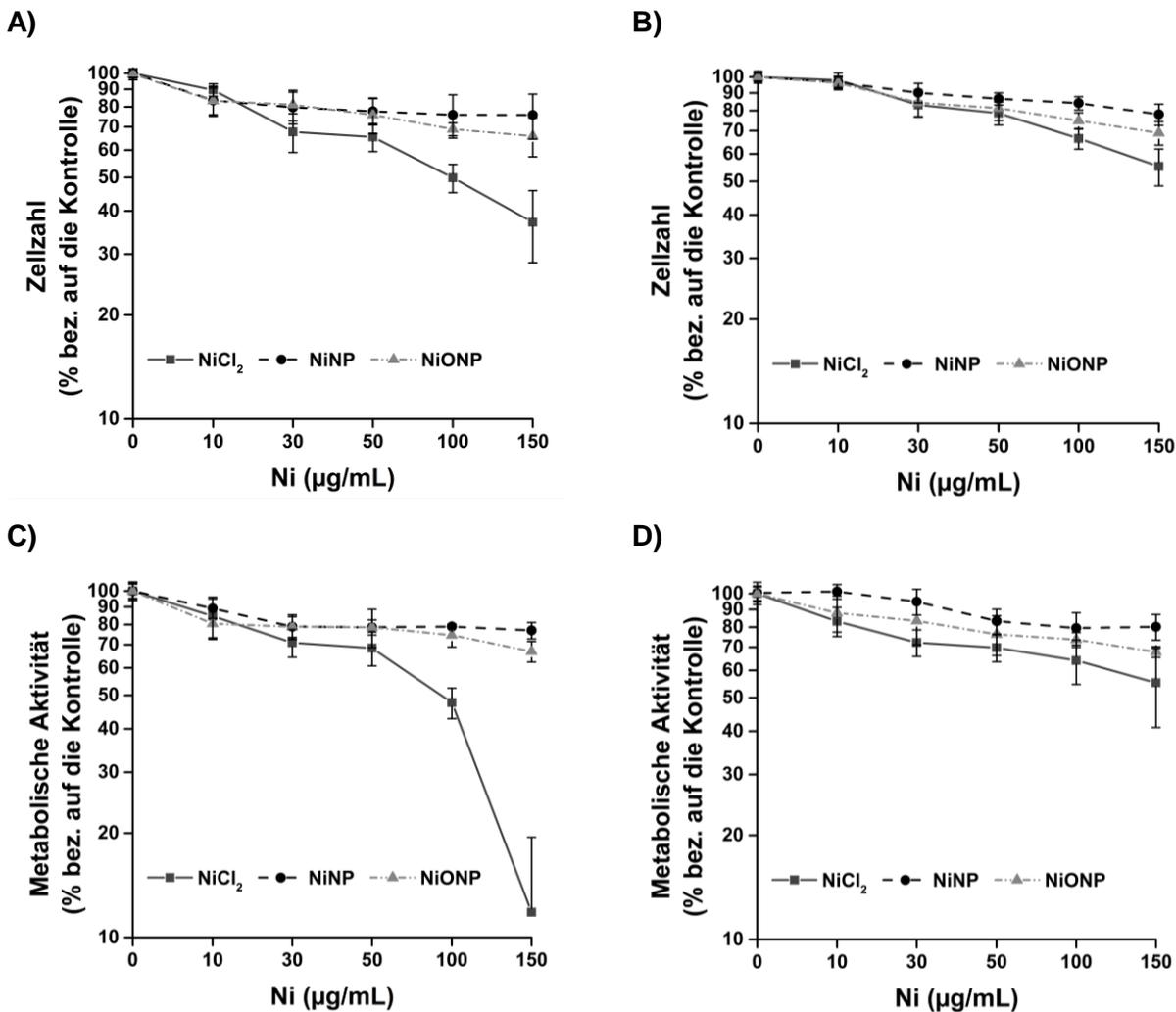
## 5.2 Zytotoxizität von partikulären und löslichen Nickelverbindungen

Um die Wirkung der partikulären nanoskaligen Nickelverbindungen besser einschätzen zu können und den Arbeitsbereich für weiterführende Untersuchungen festzulegen, wurde die akute Toxizität der Nickelverbindungen mittels Zellzahl und metabolischer Aktivität (WST-8) untersucht. Auf Farbstoffen basierende Viabilitätsassays wie der WST-Test stehen wegen möglichen Wechselwirkungen zwischen Partikeln und Farbstoff oft in der Kritik (Semisch & Hartwig 2014; Guadagnini et al. 2013; Kroll et al. 2012). Dies wurde bei der Versuchsplanung mit-

berücksichtigt und konnte durch die mitgeführten Blindwerte und Kontrollen ausgeschlossen werden.

Nach 24 h Inkubation war bei allen untersuchten Nickelverbindungen eine Abnahme der Zellzahl und der metabolischen Aktivität nachweisbar. In BEAS-2B Zellen wurde nach der Behandlung mit NiNP bereits ab der niedrigsten Konzentration von 10 µg/mL eine verminderte Viabilität gemessen, welche jedoch im gesamten Konzentrationsbereich annähernd gleich blieb (Abbildung 6A und C). In A549 Zellen konnten erst ab 50 µg/mL schwache zytotoxische Effekte detektiert werden (Abbildung 6B und D). Die Ergebnisse nach der Behandlung mit NiONP zeigten eine konzentrationsabhängige Abnahme der metabolischen Aktivität sowie der Zellzahl und lagen bei der höchsten eingesetzten Konzentration in beiden Zelllinien bei rund 70% der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 6A – D). Im Vergleich zu den partikulären Verbindungen war die zytotoxische Wirkung von NiCl<sub>2</sub> stärker ausgeprägt (Abbildung 6A – D). Hierbei konnte ebenfalls eine konzentrationsabhängige Reduktion der Zellzahl und der metabolischen Aktivität, sowohl in BEAS-2B, als auch in A549 Zellen, ermittelt werden. Bei keiner der untersuchten Verbindungen konnten Veränderungen in der Membranintegrität festgestellt werden, so dass die Verminderung der Zellzahl nicht auf ein Absterben der Zellen durch erhöhte Membranpermeabilität zurückgeführt werden kann (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für weitere Versuche der Konzentrationsbereich von 10 bis 50 µg Ni/mL gewählt, um unspezifische molekulare Reaktionen infolge von Zelltod zu vermeiden.

In der Literatur wurde wiederholt die zytotoxische Wirkung der partikulären und löslichen Nickelverbindungen in verschiedenen Zelllinien beschrieben. Untersuchungen von Pietruska et al. (2011) haben gezeigt, dass nach der Behandlung mit NiCl<sub>2</sub> und NiONP die Zellzahl von H460 Zellen (humane Lungenepithelzellen) bei gleicher Inkubationszeit in vergleichbarem Maße reduziert wurde. NiNP des gleichen Herstellers zeigten hingegen bis zu einer Konzentration von umgerechnet 100 µg/mL NiNP keinen Einfluss auf die Zellzahl. Ahamed (2011) zeigte dagegen mittels MTT-Test, dass unter Verwendung der gleichen NiNP wie in der vorliegenden Arbeit in A549 Zellen bereits ab einer Konzentration von 2 µg/mL NiNP eine zytotoxische Wirkung auftrat. Die divergierenden Ergebnisse könnten in der unterschiedlichen Herstellungsweise der Partikelsuspension begründet liegen. In den Untersuchungen von Ahamed (2011) wurden die NiNP vor der Inkubation sehr intensiv mit Ultraschall behandelt. In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde bewusst auf eine intensive Ultraschallbehandlung verzichtet, um falsch positive Artefakte zu vermeiden. Studien haben bereits belegt, dass durch längere Sonifizierung zwar die Partikel feiner dispergiert vorliegen, aber auch die Löslichkeit und die Toxizität erhöht wird (Cronholm et al. 2011; Taurozzi et al. 2011).



**Abbildung 6: Konzentrationsabhängige Zytotoxizität der verschiedenen Nickelverbindungen.** Die Zellen wurden 24 h mit verschiedenen Nickelverbindungen behandelt und anhand der Zellzahl in A) BEAS-2B und B) A549 Zellen und des WST-Assays in C) BEAS-2B und D) A549 Zellen die Zytotoxizität bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus mindestens drei unabhängigen Versuchen relativ zur der unbehandelten Kontrolle ( $n \geq 3$ ).

In BEAS-2B und A549 Zellen haben Capasso et al. (2014) die zytotoxische Wirkung der gleichen NiONP mittels MTT-Test untersucht. Die metabolische Aktivität war nach 24 h Inkubation mit 100 µg/mL NiONP auf rund 70% in A549 und auf ungefähr 80% in BEAS-2B in Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle reduziert, was gut mit den Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit korreliert. Beim Vergleich der beiden Zelllinien wird deutlich, dass die Zellen offensichtlich unterschiedlich auf die Inkubation mit den Nickelverbindungen reagieren. So betrug die metabolische Aktivität nach 24-stündiger Behandlung mit NiCl<sub>2</sub> bei der höchsten eingesetzten Konzentration in BEAS-2B nur noch 10 – 20%. In A549 Zellen hingegen lag die metabolische Aktivität noch bei 50 – 70% der unbehandelten Kontrolle. Die erhöhte Empfindlichkeit der BEAS-2B Zellen gegenüber den Nickelverbindungen kann durch den niedrigeren GSH-Status

im Vergleich zu A549 Zellen erklärt werden. So liegt der GSH-Gehalt in BEAS-2B Zellen bei etwa 30 nmol/mg Protein, in A549 Zellen hingegen bei 60 nmol/mg Protein. Dieser Unterschied lässt sich auf eine Fehlregulation des Transkriptionsfaktors Nrf2, der die Expression antioxidativer Gene reguliert, zurückführen (Singh et al. 2006). Durch die erhöhte Konzentration an GSH können die Nickelionen in A549 Zellen besser detoxifiziert und damit die toxische Wirkung gemindert werden.

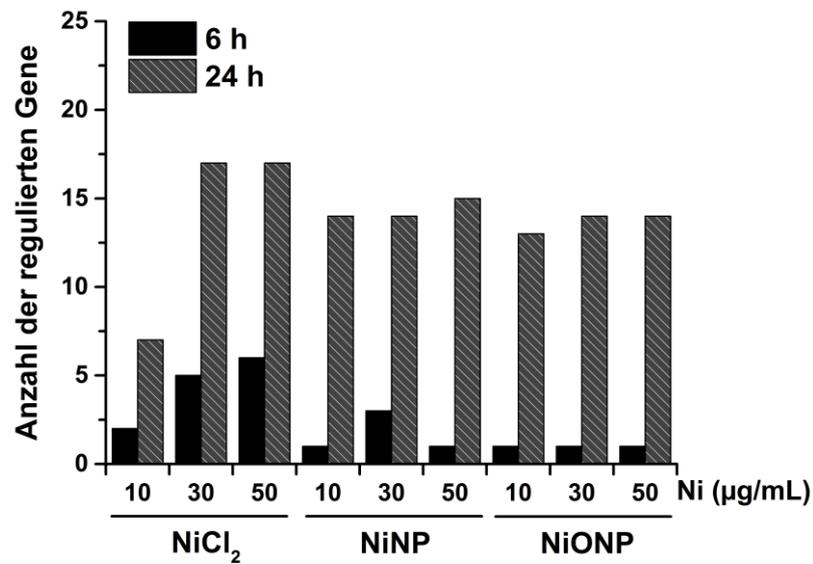
Bei der Betrachtung der Ergebnisse müssen auch andere Faktoren wie die Zusammensetzung des Mediums oder die Löslichkeit der Verbindungen in den Zellkulturmedien berücksichtigt werden. Wie bereits in Abschnitt 5.1.10 dargestellt, lösen sich NiONP im Vergleich zu NiNP deutlich stärker in den verwendeten Zellkulturmedien und könnten durchaus extrazellulär zu Nickelionenkonzentrationen führen, die bereits gering zytotoxisch wirken (siehe Anhang). Bei NiNP hingegen würde der Gehalt an gelösten Nickelionen im Medium selbst bei der höchsten untersuchten Konzentration (siehe Anhang) deutlich unterhalb der Konzentrationen liegen, bei denen sich mittels WST-Test und Zellzahl toxische Wirkungen beobachten ließen.

Des Weiteren belegen die Untersuchungen von Haase et al. (2015), dass der Gehalt an Serum einen erheblichen Einfluss auf die zytotoxische Wirkung der löslichen Ionen ausübt. Dabei gehen die Autoren davon aus, dass die Proteine im FKS die metallischen Ionen binden können, wodurch sie für die Zellen schlechter bioverfügbar werden (Haase et al. 2015). Auch in der vorliegenden Arbeit korreliert die Verwendung des proteinreichen Mediums der A549 Zellen mit schwächeren zytotoxischen Effekten. Jedoch kann in Hinblick auf die partikulären Verbindungen keine pauschale Aussage getroffen werden. Die Interpretation der Ergebnisse wird vor allem durch die Adsorption der Proteine an der Partikeloberfläche erschwert. Untersuchungen haben bereits belegt, dass in Anwesenheit von Proteinen die Aufnahme von partikulären Verbindungen sowie die Toxizität beeinflusst wird (Nienhaus et al. 2013; Panas et al. 2012). Deshalb wurde in weiterführenden Untersuchungen, die Bioverfügbarkeit der verschiedenen Nickelverbindungen näher betrachtet (Abschnitt 5.9).

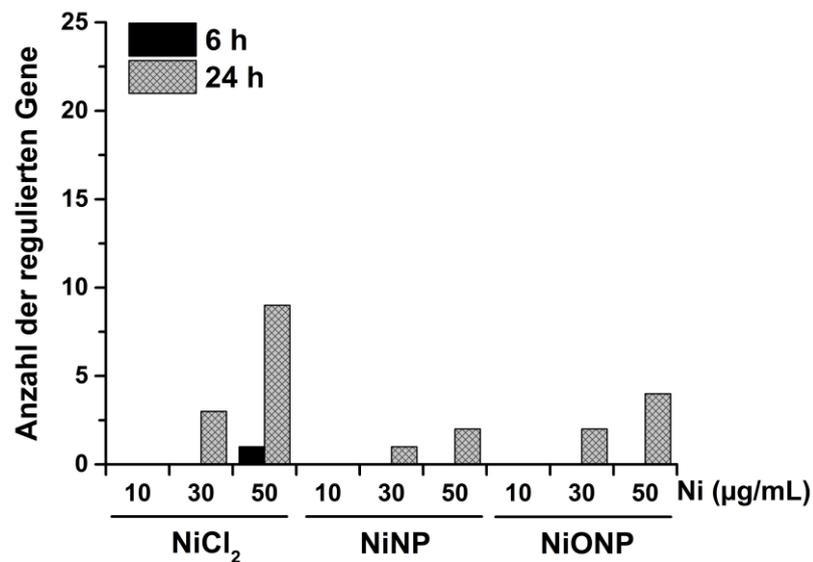
### 5.3 Einfluss der verschiedenen Nickelverbindungen auf die Genregulation in BEAS-2B und A549 Zellen

Um einen Überblick der Wirkung von partikulären Nickelverbindungen auf verschiedene zelluläre Prozesse zu bekommen, wurden mittels RT-qPCR konzentrations- und zeitabhängige Genexpressionsprofile der Testsubstanzen erstellt. Hierzu wurde ein Set, bestehend aus 95 ausgewählten Genen verschiedener Signalwege wie Zellzyklus, Apoptose, Fremdstoffmetabolismus, DNA-Reparatur und verschiedene redox-regulierte Transkriptionsfaktoren zur Analyse herangezogen. Des Weiteren wurden Gene ausgesucht, deren Expression infolge von oxidativem Stress verändert wird. Eine Auflistung der untersuchten Gene sowie ihrer kodierten Proteine befindet sich im Anhang. Signifikant modulierte Gene wurden nur dann als biologisch relevant angesehen, wenn diese mehr als 2-fach im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle differenziell exprimiert wurden. Schwächer regulierte Gene wurden bei der Interpretation der Ergebnisse nicht berücksichtigt. Die kompletten Genexpressionsdaten sind im Anhang aufgeführt. Zur Darstellung der Konzentrations- und Zeitabhängigkeit wurde die Anzahl der signifikant induzierten (Abbildung 7) bzw. reprimierten Gene (siehe Anhang) in einem Balkendiagramm abgebildet. Wie man anhand der Abbildung 7 erkennen kann, wurde die Genexpression nach der Substanzbehandlung sowohl in BEAS-2B als auch in A549 Zellen zeitabhängig moduliert. Bei allen untersuchten Bedingungen wurde nach 24 h Inkubation mit den Nickelverbindungen im Vergleich zu der Kurzzeitbehandlung von 6 h eine größere Anzahl an differenziell exprimierten Genen ermittelt. In BEAS-2B Zellen konnten nach der Behandlung mit partikulären Verbindungen innerhalb eines Zeitpunktes nur geringe konzentrationsabhängige Veränderungen der Genregulation nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu nahm bei  $\text{NiCl}_2$  die Anzahl der induzierten Gene konzentrationsabhängig zu, wobei nach 24-stündiger Inkubation bereits bei 30  $\mu\text{g/mL}$  die maximale Anzahl an induzierten Genen erreicht wurde. Die zeitabhängige Veränderung der Genexpression in BEAS-2B hängt wahrscheinlich in erster Linie von zellulären Aufnahmen und Bioverfügbarkeit der löslichen und partikulären Nickelverbindungen ab. Deshalb wurden umfassende Untersuchungen zur Aufnahme von den Testsubstanzen durchgeführt, die ausführlicher in Abschnitt 5.9 diskutiert werden.

A)



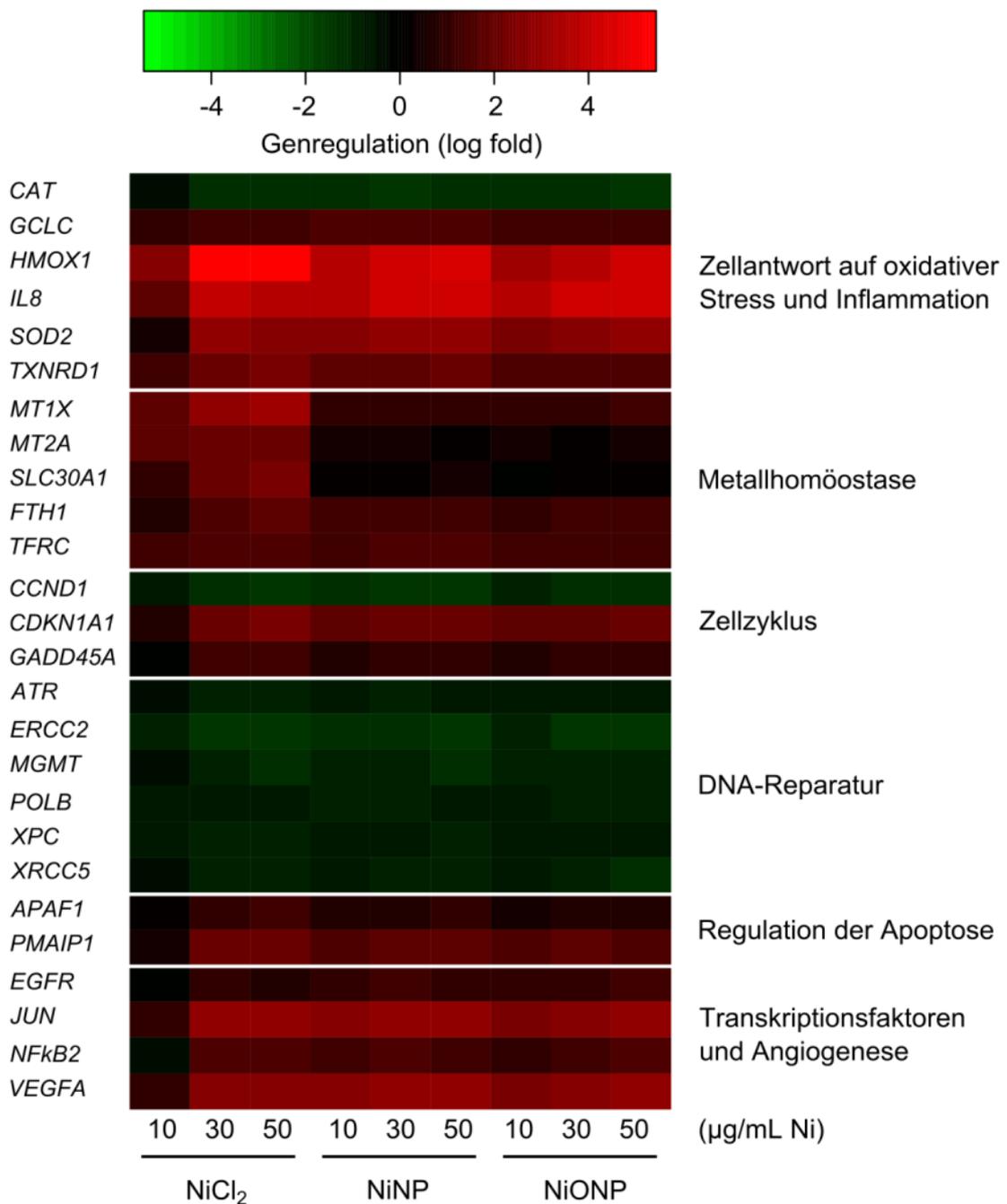
B)



**Abbildung 7: Zeit- und konzentrationsabhängige Induktion von Genen nach Behandlung mit verschiedenen Nickelverbindungen in A) BEAS-2B und B) A549 Zellen.** Die Zellen wurden mit verschiedenen Nickelverbindungen für 6 und 24 h inkubiert. Die Analyse der mRNA erfolgte mittels RT-qPCR, wobei die Werte auf die unbehandelte Kontrolle normiert und auf die Referenzgene *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *GUSB*, *HPRT1* normalisiert wurden. Dargestellt ist die Anzahl der signifikant mehr als 2-fach induzierten Gene pro Zeitpunkt und Konzentration aus vier Bestimmungen von zwei unabhängigen Versuchen ( $n = 4$ ;  $p \leq 0,05$ ). Statistisch signifikante Abweichungen zur Kontrolle wurden mit ANOVA und Dunnett's Post-Hoc Test bestimmt.

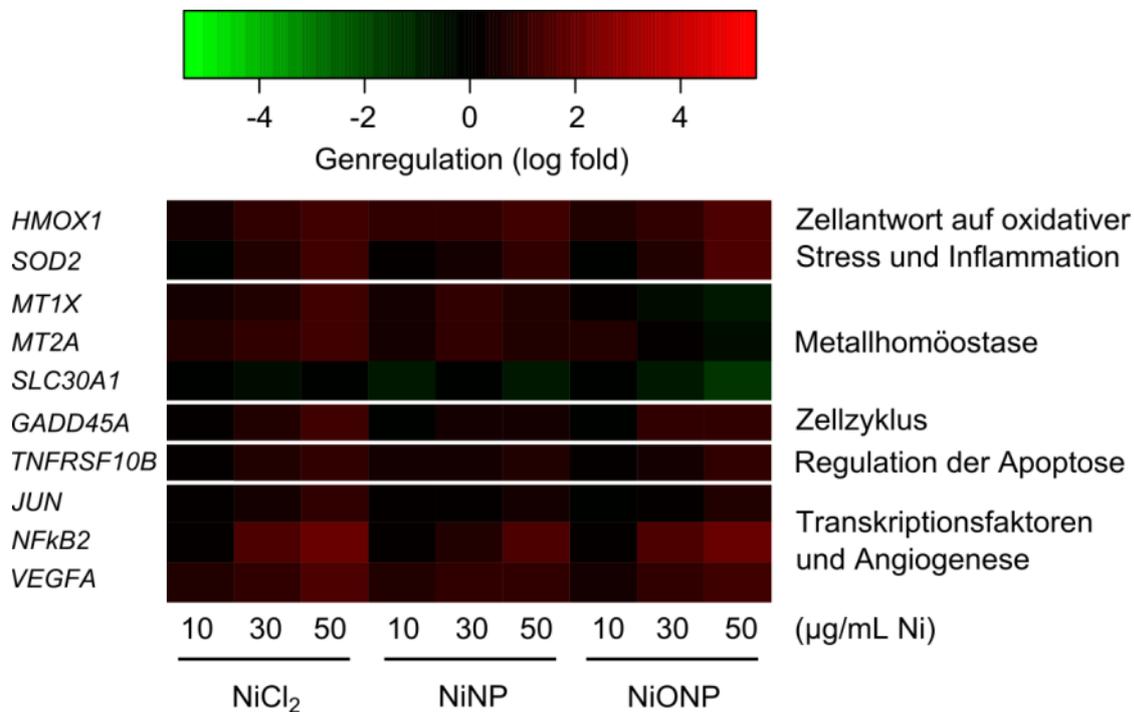
Die Daten aus A549 Zellen zeigen ein etwas anderes Bild (Abbildung 7B). Nach 6 h Behandlung war lediglich bei der höchsten getesteten NiCl<sub>2</sub> Konzentration die Transkriptmenge von *IL8* signifikant mehr als 2-fach im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle erhöht. Bei allen anderen Bedingungen waren nach 6 h Inkubation, bei guter Reproduzierbarkeit, keine Veränderungen in der Genexpression nachweisbar. Nach längerer Behandlung stieg die Anzahl der differenziell regulierten Gene bei allen untersuchten Substanzen konzentrationsabhängig an. Ähnlich wie in BEAS-2B Zellen, wurde nach 24 h Inkubation mit NiCl<sub>2</sub> die Transkription von mehr Genen moduliert als bei den beiden anderen Verbindungen. Die detaillierten Ergebnisse aller getesteten Gene befinden sich im Anhang.

Um die Stärke der Genregulation konzentrationsabhängig zu analysieren, wurden, aufgrund der geringen Anzahl an differenziell exprimierten Genen nach Kurzzeitinkubation, aus beiden Zelllinien nur die Daten aus den 24 h Versuchen verwendet. Dafür wurden zunächst die regulierten Gene ihrer biochemischen Funktion zugeordnet und in Form einer Heatmap dargestellt. Aufgrund der ausgeprägten Vernetzung der Signalwege untereinander ist eine eindeutige Zuordnung der Gene zu den jeweiligen Signalwegen jedoch nicht immer möglich. Die Visualisierung der Daten erfolgte durch eine Farbcodierung, wobei jedes farbige Rechteck für einen individuellen Datenpunkt steht. Eine rote bzw. grüne Farbcodierung zeigt an, ob eine erhöhte bzw. erniedrigte Expression im Vergleich zu der Kontrolle vorliegt. Die Farbschattierung gibt das Ausmaß der Genregulation wieder. Mit dieser Darstellung lassen sich leicht Wirkmechanismen anhand der Transkriptionsprofile visualisieren.



**Abbildung 8: Heatmap der Genexpressionsergebnisse aus BEAS-2B Zellen nach der 24-stündigen Behandlung mit den Nickelverbindungen.** Die BEAS-2B Zellen wurden mit verschiedenen Nickelverbindungen für 24 h inkubiert. Die Analyse der mRNA erfolgte mittels RT-qPCR, wobei die Werte auf die unbehandelte Kontrolle normiert und auf die Referenzgene *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *GUSB*, *HPRT1* normalisiert wurden. Dargestellt ist der Mittelwert der logarithmischen Genregulation (log fold), basierend auf vier Bestimmungen aus zwei unabhängigen Versuchen ( $n = 4$ ). Induzierte Gene sind in Rot, reprimierte Gene in Grün dargestellt.

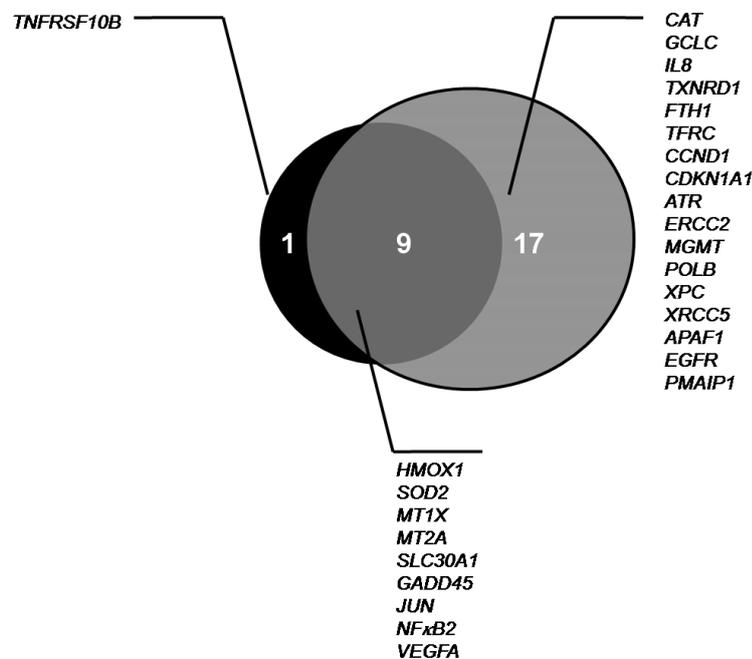
Bei der Betrachtung der einzelnen Signalwege ist deutlich zu erkennen, dass der Großteil der differenziell exprimierten Gene nach der Inkubation mit Nickelverbindungen induziert und nur ein Bruchteil der Gene, vor allem die mit der DNA-Reparatur in Zusammenhang stehen, reprimiert wurden (Abbildung 8). Bei dem Vergleich der Testsubstanzen untereinander fällt außerdem auf, dass bei höheren Konzentrationen zwischen 30 und 50  $\mu\text{g Ni/mL}$  nur geringe Veränderung in der Genexpression auftraten. Die Transkriptionsprofile der partikulären Nickelverbindungen stimmen weitgehend überein. Diese Beobachtung wird durch die Korrelationsanalyse nach Spearman bestätigt. Dabei konnte zwischen NiNP und NiONP bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 50  $\mu\text{g Ni/mL}$  ein Korrelationsfaktor von 0,96 ermittelt werden. Des Weiteren sind deutliche Unterschiede vor allem in der Expression von Metall-Homöostase-assoziierten Genen zwischen  $\text{NiCl}_2$  und partikulären Nickelverbindungen zu erkennen, welche auf substanzspezifische Effekte hinweisen.



**Abbildung 9: Heatmap der Genexpressionsergebnisse aus A549 Zellen nach der 24-stündigen Behandlung mit den Nickelverbindungen.** A549 Zellen wurden mit verschiedenen Nickelverbindungen für 24 h inkubiert. Die Analyse der mRNA erfolgte mittels RT-qPCR, wobei die Werte auf die unbehandelte Kontrolle normiert und auf die Referenzgene *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *GUSB*, *HPRT1* normalisiert wurden. Dargestellt ist der Mittelwert der logarithmischen Genregulation (log fold), basierend auf vier Bestimmungen aus zwei unabhängigen Versuchen ( $n = 4$ ). Induzierte Gene sind in Rot, reprimierte Gene in Grün dargestellt.

Beim Vergleich der NiNP bzw. NiONP mit NiCl<sub>2</sub> wurden Korrelationskoeffizienten von 0,91 bzw. 0,90 errechnet, wodurch bestätigt wird, dass die lösliche Verbindung bei der Konzentration von 50 µg Ni/mL sich in der Stärke der Genregulation deutlich von den partikulären Verbindungen unterscheidet. Die detaillierten Ergebnisse der Korrelationsanalyse von allen getesteten Konzentrationen der Nickelverbindungen befinden sich im Anhang.

Wie man der Abbildung 9 entnehmen kann, ist die Anzahl an modulierten Genen und die Stärke der Genexpression in A549 Zellen niedriger als in BEAS-2B Zellen. Hierbei wurde, wie bereits bei BEAS-2B Zellen, vor allem die Transkription von Genen der oxidativen Stressantwort induziert. Anhand der Spearman-Korrelationsanalyse konnte allerdings kein Zusammenhang zwischen den untersuchten Substanzen festgestellt werden, vermutlich aufgrund der generell geringen Beeinflussung der Genexpression. Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse der getesteten Konzentrationen befinden sich im Anhang.



**Abbildung 10: Vergleich des Genexpressionsmusters der regulierten Gene in BEAS-2B und A549 Zellen.** Dargestellt sind Gene, die nach der 24-stündigen Behandlung mit Nickelverbindungen in A549 (schwarz) oder BEAS-2B (grau) Zellen signifikant und mehr als 2-fach reguliert waren. Die Schnittmenge (dunkelgrau) stellt die Anzahl der Gene dar, welche in beiden Zelllinien differenziell exprimiert wurden.

Ein Vergleich der Genexpressionsprofile nach der 24 h Inkubation hat ergeben, dass nach Behandlung mit den Nickelverbindungen die meisten differenziell exprimierten Gene in A549 Zellen ebenfalls auch in BEAS-2B moduliert wurden und nur die Expression von *TNFRSF10B* in A549 Zellen geringfügig erhöht war (Abbildung 10). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass der Wirkmechanismus der Nickelverbindungen und die zellulären Angriffspunkte in beiden Zelllinien weitgehend übereinstimmen und nur die Transkriptmenge der Gene zellspezifisch nach der Behandlung mit den Testsubstanzen unterschiedlich stark reguliert wurde. Vermutlich resultiert die stärkere Genregulation in BEAS-2B Zellen aus einer erhöhten Aufnahme der Nickelverbindungen. Hierzu wurden umfassende Untersuchungen durchgeführt, deren Ergebnisse im Abschnitt 5.9 vorgestellt werden.

Die aus den Genexpressionsuntersuchungen erhaltenen Kenntnisse über das Wirkprofil der Nickelverbindungen dienten als Grundlage für weitere Experimente zur Bestätigung der beeinträchtigten Signalwege. Aufbauend auf diesen Daten wurden verschiedene biologische Endpunkte nach 24 h Behandlung in beiden Zelllinien untersucht. In den nachfolgenden Abschnitten werden zunächst die gewonnenen Daten aus der Genexpressionsanalyse genauer erläutert und danach die detaillierteren Untersuchungen der ausgewählten biologischen Endpunkte dargestellt. Aufgrund der enormen Datenmenge wurde der Übersicht halber nur die Genregulation der höchsten getesteten Konzentrationen der eingesetzten Nickelverbindungen zum Vergleich herangezogen.

### 5.3.1 Anti-oxidative und pro-inflammatorische Gene

In Abbildung 11 ist der Einfluss der Nickelverbindungen auf die Expression von Genen, die mit der zellulären Redox-Regulation assoziiert sind, dargestellt. Nach der Behandlung von A549 Zellen war die Transkriptmenge von *HMOX1* und *SOD2* erhöht. In BEAS-2B Zellen dagegen konnten nach 24-stündiger Inkubation mit den Nickelverbindungen mehr Veränderungen in der Expression anti-oxidativer und anti-inflammatorischer Gene detektiert werden. Dabei unterscheidet sich die Genexpression nach der Behandlung mit nanoskaligen Verbindungen im Vergleich mit der löslichen Verbindung  $\text{NiCl}_2$  nur geringfügig voneinander. Der mRNA Gehalt von *HMOX1* war nach Inkubation mit Nickelverbindungen im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle deutlich erhöht.

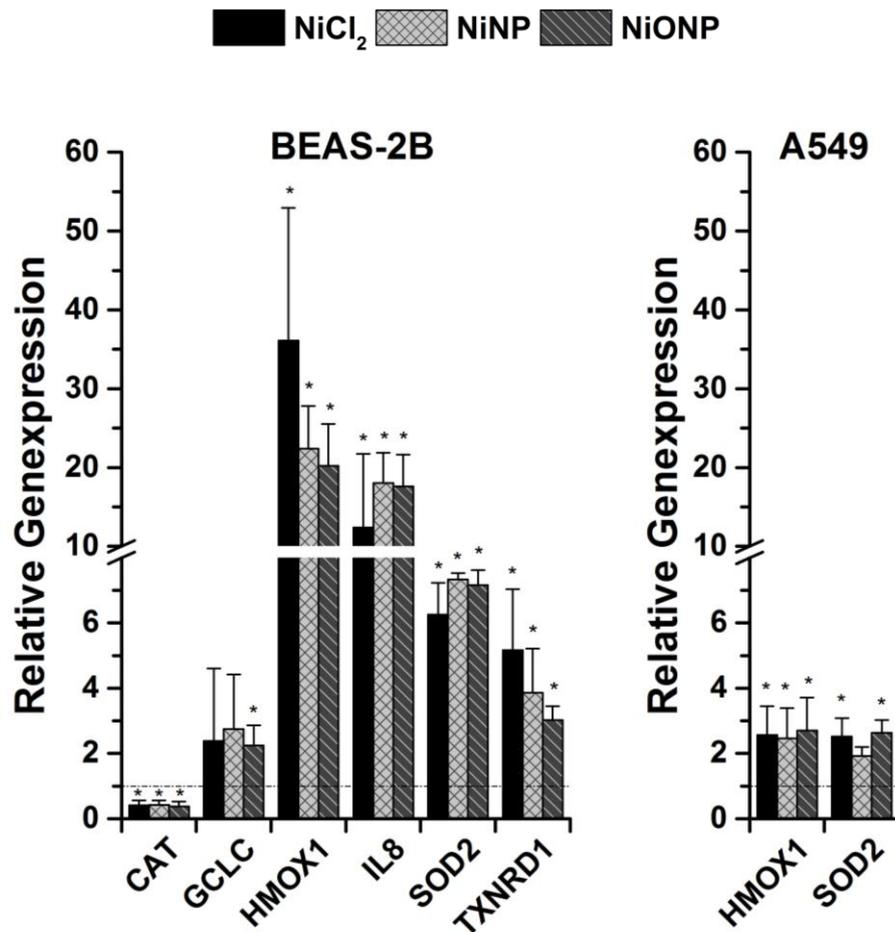
*HMOX1* kodiert das Enzym Hämoxygenase (HO-1) und stellt einen wichtigen Sensor in der Stressantwort der Zelle dar. Die Expression von *HMOX-1* wird unmittelbar infolge von verschiedenen Stressoren, wie z.B.  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Hypoxie oder Metallen, moduliert (zusammengefasst in Gozzelino et al. 2010; Barañano et al. 2002).

Ebenfalls konnte nach Nickelbehandlung eine erhöhte Expression von *SOD2*, *GCLC* und *TXNRD1* nachgewiesen werden. *GCLC* kodiert die  $\gamma$ -Glutamat-Cystein-Ligase (GCL), die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Glutathion-Synthese katalysiert und bei einem verringerten zellulären GSH-Level induziert wird (Dickinson & Forman 2002).

*SOD2* kodiert die im Zytosol lokalisierte Mangan-Superoxiddismutase und Thioredoxin Reduktase 1 ist das Genprodukt des *TXNRD1* Gens. Beide Proteine gehören dem detoxifizierenden Enzymsystem der Zelle an. Ihre Genexpression wird durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie z.B. NF- $\kappa$ B und AP-1 reguliert (zusammengefasst in Afonso et al. 2007; Arnér & Holmgren 2000).

Des Weiteren konnte nach 24 h Inkubation in BEAS-2B Zellen eine signifikante Reprimierung von *CAT* bei allen getesteten Substanzen detektiert werden. *CAT* kodiert die ausschließlich in Peroxisomen vorkommende Katalase. Dieses Enzym disproportioniert Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff und entfernt es somit aus der Zelle (Rhee et al. 2005). Wie auch bei den anderen detoxifizierenden Enzymen wird seine Genexpression über redox-sensitive Transkriptionsfaktoren moduliert (Allen & Tresini 2000).

Diese Ergebnisse stimmen mit bereits publizierten Studien gut überein. Dabei wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nach der Inkubation mit löslichen und partikulären Nickelverbindungen eine erhöhte Genexpression an *HMOX1* beobachtet (Forti et al. 2011; Horie et al. 2011). Gleichzeitig wurde eine Depletion des GSH-Gehaltes nachgewiesen, welche mit einem erhöhten intrazelluläre ROS-Level einherging (Capasso et al. 2014; Ahamed 2011; Horie et al. 2011). Weiterhin konnte anhand von *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen gezeigt werden, dass Nickelverbindungen nicht nur die Genexpression von detoxifizierenden Enzymen modulieren, sondern auch ihre Aktivität beeinträchtigen können (Tang et al. 2014; Wu et al. 2013; Rodriguez et al. 1990). Dadurch kann die Disproportionierungsreaktion nicht mehr vollständig ablaufen, was letztendlich zu einer Akkumulation der ROS führt.



**Abbildung 11: Einfluss der Nickelverbindungen auf die relative Genexpression von antioxidativen und pro-inflammatorischen Genen.** Die Zellen wurden mit verschiedenen Nickelverbindungen (50 µg Ni/mL) für 24 h inkubiert. Die Analyse der mRNA erfolgte mittels RT-qPCR und wurde auf die Referenzgene *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *GUSB*, *HPRT1* normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Genexpression zur unbehandelten Kontrolle aus vier Bestimmungen von zwei unabhängigen Versuchen und die dazugehörige SD (n = 4). Statistisch signifikante Unterschiede der mehr als 2-fach regulierten Gene wurden mit ANOVA und Dunnett's Post-Hoc Test bestimmt: \* p ≤ 0,05.

Zusammenfassend geben die Ergebnisse aus der Genexpressionsanalyse, wie auch publizierte Daten, Grund zur Annahme, dass in Anwesenheit von Nickelverbindungen oxidativer Stress in Zellen induziert und durch die Reprimierung detoxifizierender Enzyme möglicherweise akkumuliert wird. Infolge von oxidativem Stress könnte vermehrte DNA Schädigung auftreten (Kastan & Bartek 2004; Shackelford et al. 1999), deshalb wurde in weiterführenden Untersuchungen die genotoxische Wirkung der Nickelverbindungen in verschiedenen Testsystemen und Bedingungen analysiert.

Weiterhin konnte nach Inkubation mit Nickelverbindungen in BEAS-2B eine erhöhte Transkriptmenge an *IL8* detektiert werden. IL-8 gehört zu den pro-inflammatorischen Zytokinen. Zu seinen Funktionen zählen vor allem chemotaktische Effekte auf T-Lymphozyten und neutrophile Granulozyten, die Aktivierung von Leukozyten sowie die Vermittlung ihrer Adhäsion an das

Endothel (Koch et al. 1992). IL-8 wird von vielen verschiedenen Zelltypen gebildet und vorwiegend auf der transkriptionellen Ebene reguliert (Hoffmann et al. 2002; Hoch et al. 1996). In der Promotorsequenz des *IL8*-Gens sind unter anderem Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B, AP-1, C/EBR, NF-IL-6 und HIF-1 enthalten (Barchowsky et al. 2002). Die Expression von *IL-8* kann nicht nur durch pro-inflammatorische Stimuli wie z.B. TNF, IL-1 $\beta$ , LPS, sondern auch durch oxidativen Stress und Hypoxie induziert werden (Vaugh & Wilson 2008; Xie 2001).

Untersuchungen haben gezeigt, dass lösliche Nickelverbindungen den Toll-like Rezeptor 4 aktivieren und über NF- $\kappa$ B und MAP-Kinasen Entzündungsreaktion induzieren (Xu et al. 2011; Schmidt et al. 2010). Des Weiteren belegen Untersuchungen von Capasso et al. (2014), dass auch nach Behandlung mit den gleichen NiONP, wie in dieser Arbeit, der NF- $\kappa$ B und MAPK-Signalweg infolge von ROS aktiviert und pro-inflammatorische Zytokine freigesetzt wurden. Um zu untersuchen, ob die auf transkriptioneller Ebene beobachtete Induktion von *IL8* tatsächlich zur Sekretion des Zytokins führt, wurde mittels ELISA der Gehalt an IL-8 und IL-6 in Medium analysiert (Abschnitt 5.6).

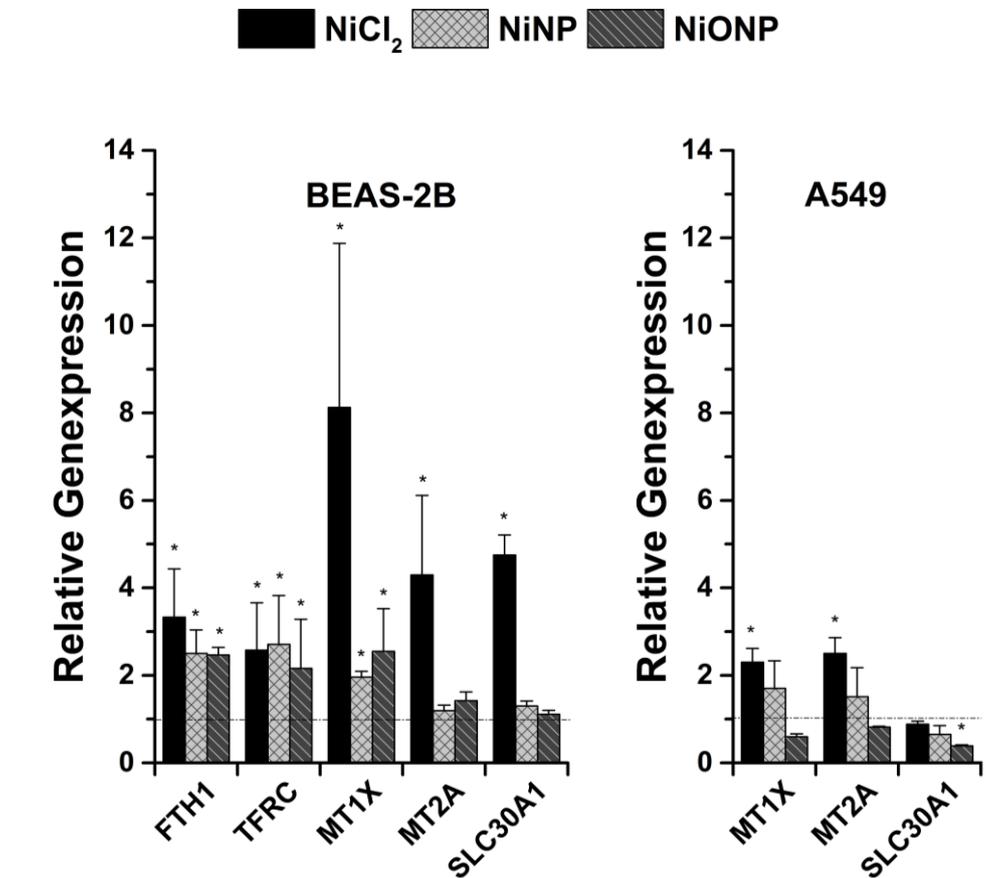
### 5.3.2 Metallhomöostase regulierende Gene

Nach 24-stündiger Inkubation mit 50  $\mu$ g/mL Nickelverbindungen konnte in BEAS-2B eine erhöhte Genexpression von *FTH1* und *TFRC* detektiert werden (Abbildung 12). *FTH1* kodiert das intrazelluläre Eisenspeicherprotein Ferritin H, *TFRC* den membranständigen Transferrin-Rezeptor. Untersuchungen haben gezeigt, dass bei einer gesteigerten Hämoxygenase-Aktivität (Abschnitt 5.3.1) Eisenionen bei der Spaltung des Hämrings freigesetzt werden. Die freigesetzten Eisenionen können durch Fenton-Reaktionen in Zellen oxidativen Stress induzieren. Um die Zellen vor diesem zu schützen, wird die Expression von *FTH1* erhöht, während die Transkription von *TFRC* reprimiert wird (zusammengefasst in Gozzelino et al. 2010).

In den vorliegenden Untersuchungen wurde keine reziproke Regulation von *FTH1* und *TFRC* Transkripten beobachtet, vielmehr waren die Transkriptmengen von beiden Genen geringfügig erhöht. Nickelionen können mit Metalloenzymen interferieren, Eisenionen substituieren und dadurch die Eisen-Hömoostase beeinträchtigen (Kasprzak 2003; Oshiro et al. 2002). Daraus könnte eine Fehlregulation von an der Eisen-Hömoostase beteiligten Proteinen erfolgen, die sich möglicherweise unterschiedlich stark auf die Genexpression einzelner beteiligter Proteine auswirkt.

Interessanterweise war die Expression von *MT1X*, *MT2A* und *SLC30A1* sowohl in BEAS-2B als auch in A549 Zellen nur nach Behandlung mit NiCl<sub>2</sub> erhöht, was auf einen substanzspezifischen Effekt hindeutet (Abbildung 12). *MT1X* und *MT2A* kodieren zwei Metallothionein (MT)-

Isoformen, die vor allem an der Aufnahme, Verteilung, Speicherung und Freisetzung von Zink beteiligt sind (Coyle et al. 2002). *SLC30A1* kodiert ein Zink-Exportprotein, das in der Zellmembran vieler Zelltypen lokalisiert ist und den Efflux von Zink in den extrazellulären Raum bzw. in intrazelluläre Vesikel fördert (Palmiter & Huang 2004).



**Abbildung 12: Einfluss der verschiedenen Nickelverbindungen auf die relative Genexpression von Metallhomöostase-assoziierten Genen.** Die Zellen wurden mit verschiedenen Nickelverbindungen (50 µg Ni/mL) für 24 h inkubiert. Die Analyse der mRNA erfolgte mittels RT-qPCR und wurde auf die Referenzgene *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *GUSB*, *HPRT-1* normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Genexpression zur unbehandelten Kontrolle aus vier Bestimmungen von zwei unabhängigen Versuchen und die dazugehörige SD (n = 4). Statistisch signifikante Unterschiede der mehr als 2-fach regulierten Gene wurden mit ANOVA und Dunnett's Post-Hoc Test bestimmt: \* p ≤ 0,05.

Die Expression dieser Gene kann durch Einwirkung von Glucocorticoiden, oxidativem Stress und pro-inflammatorischen Stimuli induziert werden. Jedoch stellt die Aktivierung des Transkriptionsfaktor MTF-1 (metal-response element-binding transcription factor-1) durch Metallionen wohl den wichtigsten Wirkmechanismus dar (zusammengefasst in Palmiter & Huang 2004; Coyle et al. 2002; Heuchel et al. 1994).

Nemec et al. (2009) untersuchten den Einfluss von Nickel auf die Zinkhomöostase. Die Autoren konnten zeigen, dass Nickel zwar zur Aktivierung von MTF-1 führt, allerdings nicht direkt mit

MTF-1 interagiert. Stattdessen erfolgt die Aktivierung von MTF-1 aufgrund einer erhöhten intrazellulären Zinkkonzentration, welche vermutlich infolge der Verdrängung von Zinkionen durch Nickelionen aus Metalloenzymen ausgelöst wurde (Nemec et al. 2009).

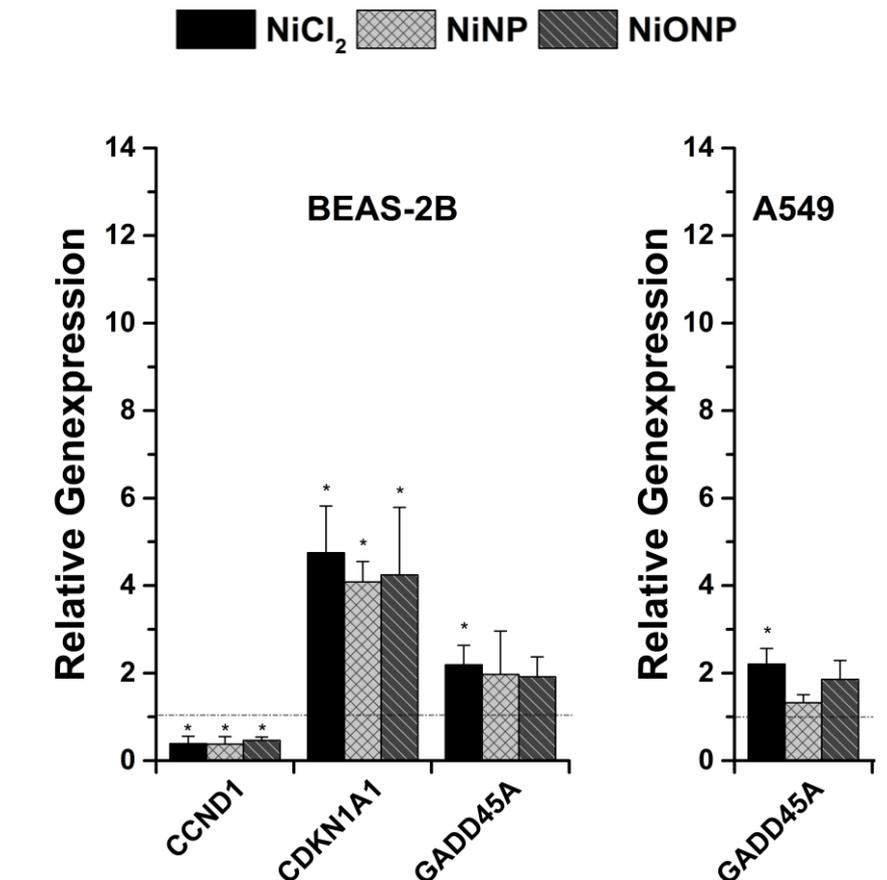
Eine mögliche Begründung für die in BEAS-2B und A549 Zellen substanzspezifische Induktion von *MT1X*, *MT2A* und *SLC30A1* nur nach Behandlung mit  $\text{NiCl}_2$  könnte eine unterschiedliche Aufnahmekinetik der Nickelverbindungen sein. Partikuläre Verbindungen werden über Endozytose internalisiert und in Abhängigkeit ihrer physikochemischen Eigenschaften langsam im physiologischen Milieu gelöst (Muñoz & Costa 2012). Lösliche Verbindungen hingegen werden über Ionenkanäle aufgenommen und können direkt mit den zellulären Enzymen interagieren (Ke et al. 2007; Denkhaus & Salnikow 2002). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Aufnahmestudien durchgeführt, die in Abschnitt 5.9 diskutiert werden.

### 5.3.3 Einfluss auf Gene des Zellzyklusses

Im Rahmen der durchgeführten Genexpressionsuntersuchungen wurde des Weiteren der Einfluss von Nickelverbindungen auf die Expression wichtiger Zellzykluskontrollgene analysiert. Die Ergebnisse nach 24 h Inkubation der BEAS-2B und A549 Zellen sind in Abbildung 13 dargestellt.

Nach 24-stündiger Inkubation induzierten die Nickelverbindungen in BEAS-2B Zellen die Expression von *CDKN1A* und reprimierten *CCND1*. Die Modulation der Cyclin-abhängigen Kinasen sowie Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren nach Behandlung mit löslichen und partikulären Verbindungen wurde bereits in verschiedenen Zelllinien untersucht und die Ergebnisse stimmten mit den hier durchgeführten Untersuchungen weitgehend überein (Wong et al. 2013; Ding et al. 2009; Ouyang et al. 2009).

*CDKN1A* kodiert den CDK (Cyclin-abhängige Kinase)-Inhibitor p21 und Cyclin D1 ist das Genprodukt des *CCND1* Gens. Cyclin D1 reguliert den CDK-abhängigen Übergang von  $G_1$  in die S-Phase (Fu et al. 2004). Bei p21 handelt es sich um ein multifunktionales Protein, welches an der Regulation der Zellzyklusprogression, aber auch der Apoptose und DNA-Reparaturprozessen beteiligt ist (Gartel & Tyner 2002). Infolge von genotoxischem Stress kann die Expression von p21 sowohl p53-abhängig als auch -unabhängig induziert werden (O'Reilly 2005; Bunz et al. 1998). Dadurch wird die Aktivierung des Cyclin-CDK-Komplexes inhibiert und ein Arrest in der  $G_1$ -Phase eingeleitet. Allerdings kann die Induktion von p21 auch in einem S-Phase Arrest resultieren, indem durch Bindung an PCNA die DNA-Replikation inhibiert wird (Abbas & Dutta 2009).



**Abbildung 13: Einfluss der verschiedenen Nickelverbindungen auf die relative Genexpression der Zellzyklus-assoziierten Gene.** Zellen wurden mit verschiedenen Nickelverbindungen (50 µg Ni/mL) für 24 h inkubiert. Die Analyse der mRNA erfolgte mittels RT-qPCR und wurde auf die Referenzgene *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *GUSB*, *HPRT-1* normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Genexpression zur unbehandelten Kontrolle aus vier Bestimmungen von zwei unabhängigen Versuchen und die dazugehörige SD (n = 4). Statistisch signifikante Unterschiede der mehr als 2-fach regulierten Gene wurden mit ANOVA und Dunnett's Post-Hoc Test bestimmt: \* p ≤ 0,05.

Ebenso konnte in A549, wie auch in BEAS-2B Zellen, ein marginaler Anstieg der Transkriptmenge von *GADD45A* nachgewiesen werden. Die *GADD45* (growth arrest and DNA damage inducible gene)-Proteine fungieren als Stresssensoren, welche unter anderem durch genotoxische Agenzien und Zytokine induziert werden können. Diese Proteine beeinflussen, ebenfalls wie p21, sowohl die Zellzyklusprogression als auch den Ablauf der Apoptose (Liebermann & Hoffman 2008).

Die erhöhte Expression von *GADD45* und *CDKN1A1* bzw. Reprimierung von *CCND1* deutet daraufhin, dass genotoxischer Stress in den Zellen induziert und infolge der DNA-Schäden möglicherweise ein Zellzyklusarrest oder auch Apoptose eingeleitet wurde. Deshalb wurde in weiterführenden Experimenten der Einfluss von Nickelverbindungen auf die Zellzyklusverteilung und die Aktivierung der Apoptose untersucht (Abschnitt 5.4 und 5.5).

### 5.3.4 DNA-Reparatur-assoziierte Gene

Bei der Betrachtung der relativen Genexpression der mit DNA-Reparatur-assoziierten Gene fällt auf, dass in dem verwendeten Genset nahezu alle Gene herunterreguliert wurden. Ähnliche Ergebnisse wurden in der Studie von Arita et al. (2013) erzielt. Hierbei wurden Genexpressionsprofile in peripheren mononukleären Blutzellen von Arbeitern aus der Nickelraffinerie mittels Mikroarray erstellt und mit denen der Allgemeinbevölkerung verglichen. In Nickel-exponierten Probanden beobachteten die Autoren eine Herunterregulation von DNA-Reparaturgenen, welche sie auf epigenetischen Veränderungen durch Nickel zurückführen (Arita et al. 2013). Darüber hinaus liegen nur wenige Studien zum Einfluss von Nickelionen auf die Genexpression von DNA-Reparaturproteinen vor. Untersuchungen von Ji et al. (2008) konnten zeigen, dass Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) in 16HBE Zellen nach Behandlung mit NiS reprimiert und durch eine Hypermethylierung der CpG-Inseln die Bindung von Transkriptionsfaktoren in der Promotorregion blockiert war (Ji et al. 2008). Es ist denkbar, dass die Effekte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls auf lösliches Nickel zurückzuführen sind und hier der gleiche Wirkmechanismus zugrunde liegt.

### 5.3.5 Regulation der mit Apoptose-assoziierten Gene

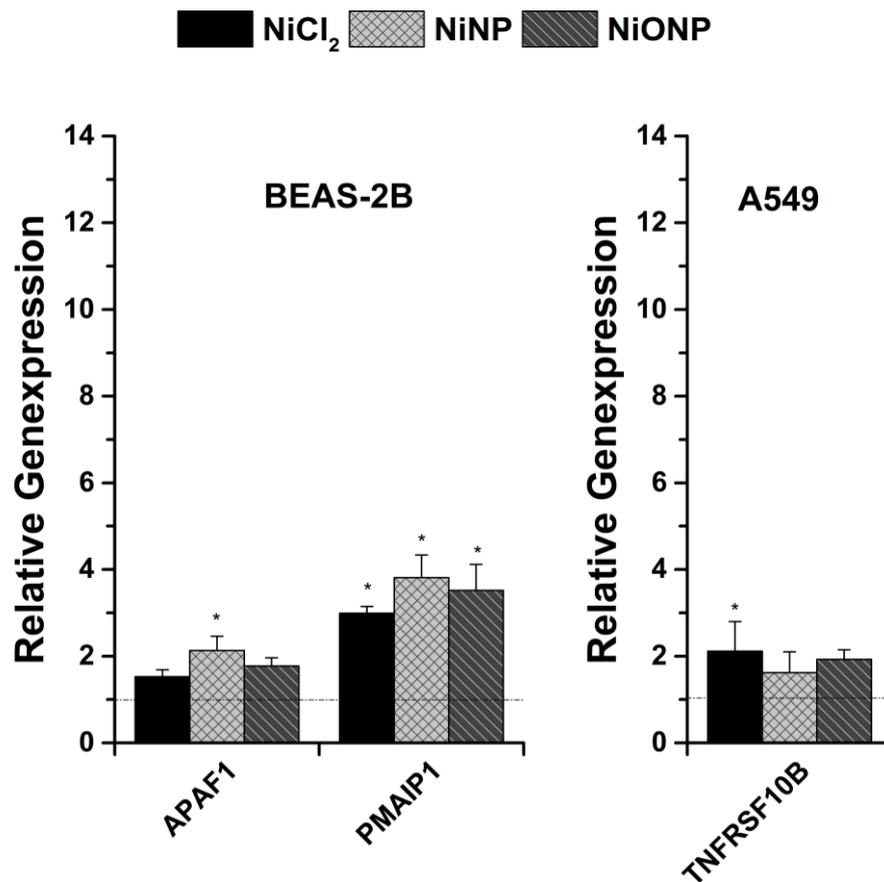
Eine erhöhte Transkriptmenge an *PMAIP1* konnte nach Behandlung mit Nickelverbindungen in BEAS-2B detektiert werden. Ebenfalls war die Expression von *APAF-1* geringfügig erhöht. In A549 Zellen wurde nur die Expression von *TNFRSF10B* induziert (Abbildung 14).

*PMAIP1* kodiert das pro-apoptotische Protein Noxa. Bei diesem Protein handelt es sich um einen Sensor, welcher auf der transkriptionellen Ebene reguliert wird, z.B. infolge von DNA-Schädigungen durch den Transkriptionsfaktor p53. Die Aktivierung von Noxa führt über eine Inhibierung von anti-apoptotischen Proteinen zur Freisetzung von Cytochrom C ins Zytosol. Das freigesetzte Cytochrom C bindet an das zytosolische Adapterprotein Apaf-1, was letztendlich die Caspasenkaskade aktiviert und zum apoptotischen Zelltod führt (zusammengefasst in Vousden & Lu 2002; Oda et al. 2000).

Jedoch muss bei der Betrachtung der Ergebnisse beachtet werden, dass es sich bei BEAS-2B Zellen um eine Adenovirus-12 SV40 transformierte Zelllinie handelt und p53 dadurch wahrscheinlich inaktiv ist (Reddel et al. 1995; Lehman et al. 1993). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die Genregulation unabhängig von p53 erfolgte. In der Literatur ist beschrieben, dass Transkriptionsfaktoren wie HIF-1 und E2F (E2-Promotor Binding Factor) unabhängig von p53 die Transkription von *NOXA* und *APAF-1* induzieren und damit die Apoptose einleiten können (Kim et al. 2004; Moroni et al. 2001). Darüber hinaus könnte in A549

Zellen aufgrund der erhöhten Transkriptmenge an *TNFRSF10B*, das den Todesrezeptor DR5 kodiert, die Einleitung der Apoptose über den extrinsischen Weg erfolgen (Zhang & Fang 2005; Sheikh et al. 1998).

Wong et al. (2013) untersuchten die Aktivierung der Apoptose durch Nickelverbindungen in Abhängigkeit vom p53-Status. Die Autoren konnten zeigen, dass in p53-profizienten H460-Zellen die Apoptose p53-abhängig aktiviert wurde. Nach 24-stündiger Behandlung mit NiCl<sub>2</sub> waren die klassischen p53-Zielgene wie *CDKN1A*, *NOXA* und *PUMA* hochreguliert, sowie auf der Proteinebene Caspase 9 und 3 aktiviert. In den p53-defizienten Zellen konnte dagegen ein ähnliches Expressionsmuster wie in der vorliegenden Arbeit ermittelt werden. Hierbei wurde nach der Inkubation mit NiCl<sub>2</sub> eine stark erhöhte Induktion von *NOXA*, jedoch keine Veränderung in der Genregulation von weiteren pro-apoptotischen Genen identifiziert (Wong et al. 2013). Über welche Mechanismen die Expression von *NOXA* induziert wird, ist noch nicht vollständig aufgeklärt.



**Abbildung 14: Einfluss der verschiedenen Nickelverbindungen auf die relative Genexpression der mit Apoptose-assoziierten Gene.** Zellen wurden mit verschiedenen Nickelverbindungen (50 µg/mL Ni) für 24 h inkubiert. Die Analyse der mRNA erfolgte mittels RT-qPCR und wurde auf die Referenzgene *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *GUSB*, *HPRT-1* normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Genexpression zur unbehandelten Kontrolle aus vier Bestimmungen von zwei unabhängigen Versuchen und die dazugehörige SD (n = 4). Statistisch signifikante Unterschiede der mehr als 2-fach regulierten Gene wurden mit ANOVA und Dunnett's Post-Hoc Test bestimmt: \* p ≤ 0,05.

### 5.3.6 Redox-sensitive Transkriptionsfaktoren

Im Rahmen der durchgeführten Genexpressionsanalysen wurden Änderungen in der Expression von *EGFR*, *JUN*, *NFκB2* und *VEGFA* beobachtet (Abbildung 15). Die Expression von *EGFR* und *NFκB2* war in beiden Zelllinien nur geringfügig verändert. Der mRNA Gehalt an *JUN* und *VEGFA* war in BEAS-2B Zellen im Vergleich zu A549 Zellen deutlich erhöht und deutet auf einen zellspezifischen Effekt hin.

*VEGFA* (vascular endothelial growth factor A) gehört der VEGF-Genfamilie an (Neufeld et al. 1999). Es stimuliert die Gefäßneubildung, indem es die Migration und Proliferation der Endothelzellen aktiviert und gleichzeitig anti-apoptotisch wirkt. Des Weiteren kann VEGF z.B. die

Surfactantproduktion in Alveolarepithelzellen Typ II stimulieren und die Chemotaxis von Monozyten fördern (Ferrara et al. 2003).

Eine Schlüsselrolle bei der Regulation der VEGF-Bildung spielt die Induktion der Transkription durch Hypoxie, welche über die Stabilisierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor 1) vermittelt wird (Manalo et al. 2005; Shweiki et al. 1992). Untersuchungen haben gezeigt, dass in Anwesenheit von Nickelionen die Hydroxylierung von HIF-1 $\alpha$  durch Prolylhydroxylasen, welche normalerweise die Degradation von HIF-1 $\alpha$  vermitteln, gestört wird. Dies hat zur Folge, dass HIF-1 $\alpha$  in der Zelle akkumuliert und die Transaktivierung von HIF-1 Zielgenen erfolgt (Salnikow et al. 2003). Als möglicher Wirkmechanismus wird diskutiert, dass Nickelionen mit dem zweiwertigen Eisen im aktiven Zentrum konkurrieren und aufgrund der geringeren Redoxaktivität von Nickel die Funktion des Proteins beeinträchtigen (Salnikow & Kasprzak 2005).

Wie bereits oben beschrieben, war nach Behandlung mit Nickelverbindungen die Transkriptmenge von *JUN* in beiden Zelllinien erhöht. *JUN* kodiert das Protein c-Jun, welches der Jun-Familie angehört und ein wichtiger Bestandteil des AP-1 (activating protein 1)-Komplexes darstellt. Der Transkriptionsfaktor AP-1 ist ein Proteinkomplex, der sich aus Homo- bzw. Heterodimeren der Mitglieder der Jun-, Fos- und ATF-Familie zusammensetzt (Shaulian & Karin 2001). Die Aktivität des Transkriptionsfaktors lässt sich durch diverse Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Zytokine oder genotoxischer Stress induzieren (Shaulian & Karin 2002). Mittlerweile ist eine Vielzahl verschiedener Zielgene bekannt, deren Transkription durch AP-1 reguliert wird. Neben Zielgenen, welche zelluläre Prozesse wie Zellwachstum, Differenzierung, Zelltod, Migration und Tumorentstehung regulieren, wird durch AP-1 auch die Expression von c-Jun induziert (Shaulian & Karin 2002). Studien konnten bereits zeigen, dass auch Nickelverbindungen diesen Transkriptionsfaktor aktivieren und so die Expression von *JUN* induzieren (Lu et al. 2005).

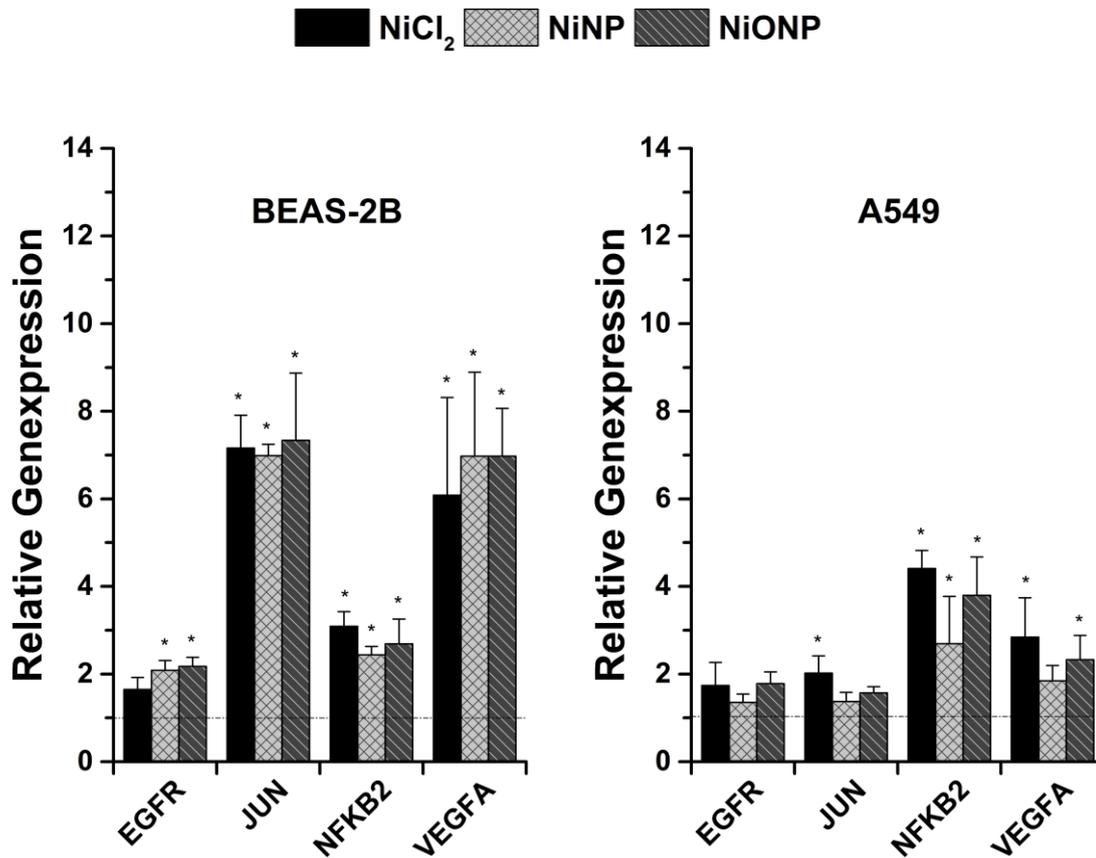
Ebenso ist in der Literatur beschrieben, dass in Gegenwart von löslichen und partikulären Verbindungen der NF- $\kappa$ B Signalweg aktiviert wird (Denkhaus & Salnikow 2002).

Hierbei handelt es sich ebenfalls um einen redox-sensitiven Transkriptionsfaktor, welcher posttranskriptionell aktiviert wird. Dabei kann die Aktivierung durch pro-inflammatorische Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1), Wachstumsfaktoren sowie oxidativen Stress erfolgen. Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B ist ein zeitlich limitierter Prozess, der insbesondere durch einen negativen Feedback-Mechanismus reguliert wird. Dabei induziert das aktivierte NF- $\kappa$ B die Expression seines eigenen Inhibitors I $\kappa$ B, der die Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern verhindert (zusammengefasst in Hoffmann et al. 2006; Chen & Greene 2004).

In den vorliegenden Untersuchungen wurden erhöhte Transkriptmengen von *NF $\kappa$ B2* detektiert. *NF $\kappa$ B2* kodiert die NF- $\kappa$ B Untereinheit p100, die aber zunächst inhibitorisch wirkt und erst nach Prozessierung in p52 einen aktivierten NF- $\kappa$ B Komplex ermöglicht. In der Literatur ist be-

schrieben, dass die Genexpression von *NFκB2* durch NF-κB selbst induziert wird (zusammengefasst in Hoffmann et al. 2006; Chen & Greene 2004).

Somit deuten die Ergebnisse daraufhin, dass der NF-κB Signalweg in BEAS-2B und A549 Zellen aktiviert wurde und bestätigen somit die bereits publizierten Daten (Capasso et al. 2014; Xu et al. 2011).

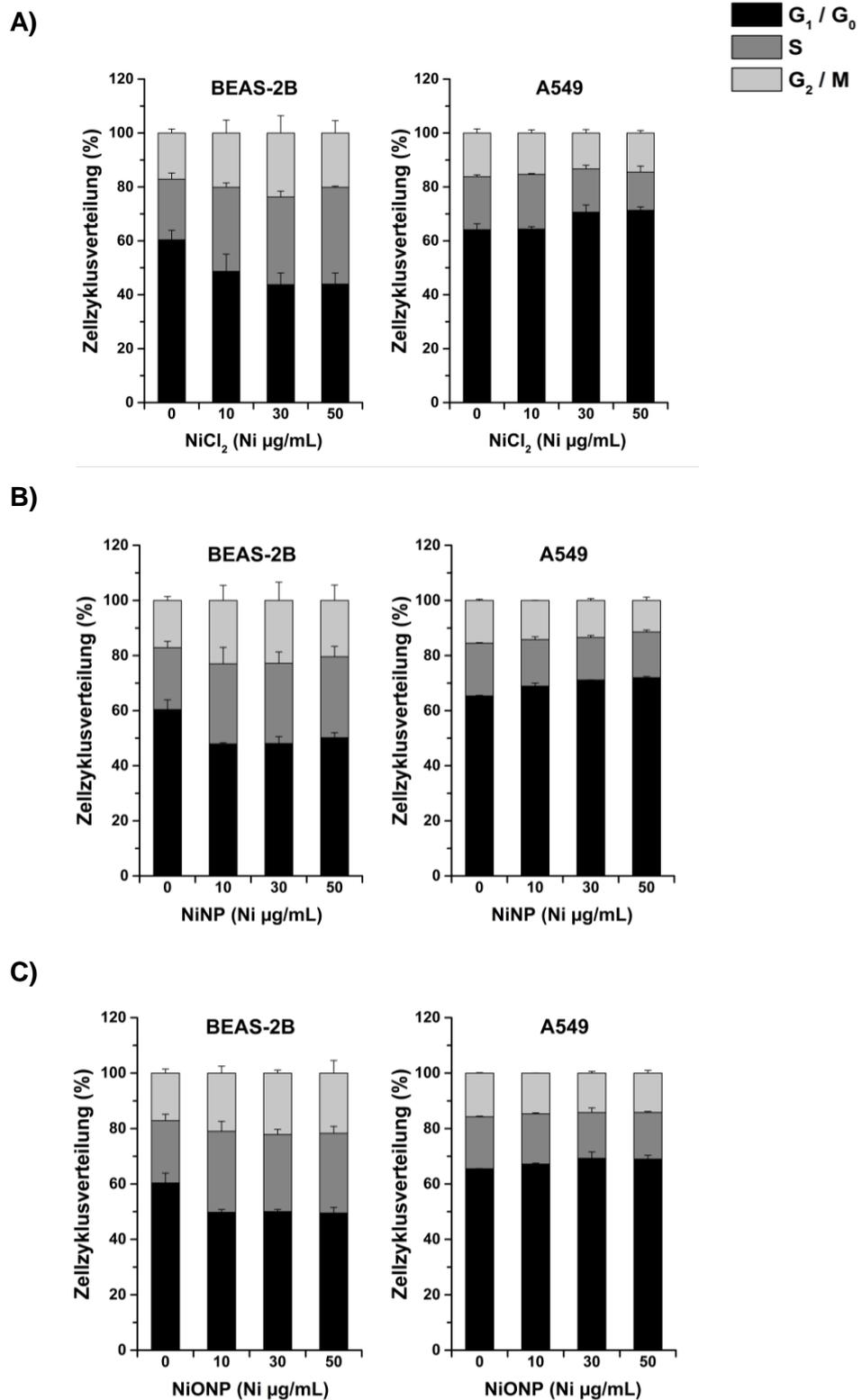


**Abbildung 15: Einfluss der verschiedenen Nickelverbindungen auf die relative Genexpression von Transkriptionsfaktoren und Genen mit Relevanz für die Angiogenese.** Zellen wurden mit verschiedenen Nickelverbindungen (50 µg/mL Ni) für 24 h inkubiert. Die Analyse der mRNA erfolgte mittels RT-qPCR, wobei die Werte auf die unbehandelte Kontrolle normiert und wurde auf die Referenzgene *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *GUSB*, *HPRT-1* normalisiert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Genexpression aus vier Bestimmungen von zwei unabhängigen Versuchen (n = 4). Statistisch signifikante Unterschiede der mehr als 2-fach regulierten Gene wurden mit ANOVA und Dunnett's Post-Hoc Test bestimmt: \* p ≤ 0,05.

## 5.4 Einfluss von Nickelverbindungen auf die Zellzyklusverteilung

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass nach der Behandlung mit Nickelverbindungen die Zellzahl vermindert wurde. Neben apoptotischen und nekrotischen Prozessen könnte eine verringerte Proliferation aufgrund einer Zellzyklusarretierung im Zusammenhang mit einer erniedrigten Zellzahl stehen. Um die zytotoxische Wirkung der Nickelverbindungen näher einzugrenzen, wurde nach 24-stündiger Inkubation mit den Nickelverbindungen in BEAS-2B und A549 Zellen die Zellzyklusphasenverteilung am Durchflusszytometer untersucht (Abbildung 16). In BEAS-2B Zellen konnte nach 24 h Behandlung mit NiCl<sub>2</sub>, NiNP und NiONP ein Arrest in der S-Phase detektiert werden. Dabei erhöhte sich der Anteil der Zellen in der S-Phase von 22% auf 30%. Gleichzeitig sank der Anteil der Zellen in der G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-Phase von 60% auf etwa 50% und die G<sub>2</sub>/M-Phase nahm von 18% auf rund 23% zu. Es konnten keine konzentrationsabhängigen Effekte im getesteten Konzentrationsbereich von 10 – 50 µg Ni/mL beobachtet werden. Lediglich nach der Behandlung mit 10 µg/mL NiCl<sub>2</sub> war ein geringfügig schwächerer S-Phasen Arrest als bei den höheren Konzentrationen nachweisbar. In A549 Zellen konnte nur eine geringfügige Arretierung der Zellen in der G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-Phase beobachtet werden, die bei NiCl<sub>2</sub> noch am deutlichsten ausgeprägt war. Hier stieg der Anteil der Zellen in der G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-Phase im Vergleich zur Kontrolle von 64% auf etwa 71%.

In verschiedenen publizierten Studien wurde ein Einfluss von Nickelverbindungen auf die Zellzyklusprogression beobachtet, bezüglich des Ausmaßes und den betroffenen Zellzyklusphasen der Arretierung zeichnet sich aber kein klares Bild ab. In Untersuchungen von Ding et al. (2009) konnte nach einer 24-stündigen Inkubation mit NiCl<sub>2</sub> in BEAS-2B Zellen ein geringfügig erhöhter Anteil der S-Phase und ein signifikanter G<sub>2</sub>/M-Arrest detektiert werden (Ding et al. 2009). Studien von Ouyang et al. (2009) belegen, dass NiCl<sub>2</sub> nach 24 h Inkubation in A549 Zellen einen G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-Arrest induzierte, der mit erniedrigten Cyclin D1 Mengen einherging (Ouyang et al. 2009). Die Beobachtungen aus den beiden Studien decken sich weitgehend mit der hier festgestellten Zellzyklusverteilung in BEAS-2B und A549 nach Behandlung mit NiCl<sub>2</sub>.



**Abbildung 16:** Durch die Behandlung mit Nickelverbindungen wurde ein Zellzyklusarrest in BEAS-2B in der S-Phase und in A549 in der  $G_0/G_1$ -Phase induziert. Die Zellen wurden für 24 h mit A)  $NiCl_2$ , B) NiNP und C) NiONP inkubiert, fixiert und anschließend die Zellzyklusverteilung am Durchflussszytometer untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte der prozentualen Zellzyklusphasenanteile + SD aus zwei unabhängigen Versuchen ( $n = 2$ ).

Untersuchungen von Capasso et al. (2014), die mit NiONP in A549 und BEAS-2B Zellen durchgeführt wurden, stehen allerdings im Gegensatz zu den hier beschriebenen Ergebnissen. Die Autoren konnten zeigen, dass nach der 24 h Inkubation mit NiONP die A549 Zellen konzentrationsabhängig in der G<sub>2</sub>/M-Phase, in BEAS-2B Zellen hingegen in der G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-Phase arretierten (Capasso et al. 2014).

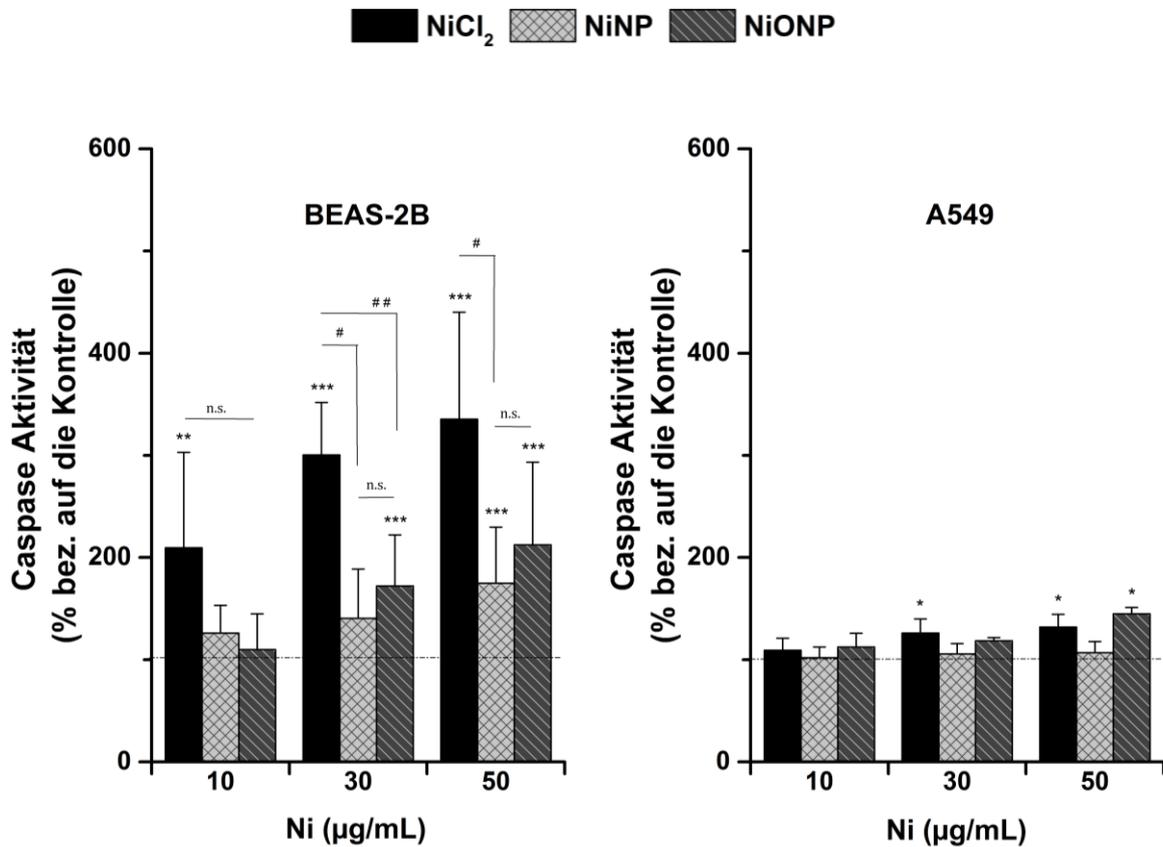
Insgesamt bestätigen die Zellzyklusuntersuchungen die Annahme aus der Genexpressionsanalyse (Abschnitt 5.3.3), dass die Induktion von *CDKN1A1* und *GADD45* sowie die Herunterregulation von *CCND1* in BEAS-2B Zellen in Zusammenhang mit einem Zellzyklusarrest stehen. In A549 konnte auf der Genexpressionsebene keine Veränderung detektiert werden. Eine mögliche Ursache der Zellzyklusarretierung durch Nickel ist die vermehrte Bildung von ROS und die Störung der zellulären Redox-Homöostase. Diese können zu genotoxischem Stress führen, welcher den eingeleiteten Zellzyklusarrest erklären würde. Mit weiteren Experimenten wurde überprüft, inwieweit Nickelverbindungen in der Lage sind, genotoxischen Stress in den Zellen zu induzieren und damit einen Einfluss auf den Zellzyklus auszuüben (Abschnitt 5.7).

## 5.5 Aktivierung der Caspasen 3/7

Die Ergebnisse aus der Genexpressionsanalyse in BEAS-2B Zellen deuten daraufhin, dass die getesteten Nickelverbindungen apoptotische Signalwege aktivieren. Um zu überprüfen, ob die erhöhte Genexpression auch tatsächlich zur Apoptose führt, wurde die Aktivierung von Caspase 3/7 nach 24 h Inkubation in BEAS-2B und A549 Zellen untersucht.

Caspase 3/7 gehört zu den sogenannten Effektorcaspasen, die durch Spaltung aktiviert werden und die Degradation der zellulären Komponenten einleiten (Slee et al. 1999). Zur Untersuchung der Caspase-Aktivität wurde das Caspase Glo 3/7 Kit von Promega verwendet und anhand der Lumineszenz quantifiziert. Nach 24 h Inkubation mit den Nickelverbindungen konnte in BEAS-2B eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Caspase-Aktivität detektiert werden (Abbildung 17). Die Aktivierung der Caspasen 3/7 war nach der Inkubation mit NiCl<sub>2</sub> im Vergleich zu der Kontrolle bereits ab der niedrigsten getesteten Konzentration von 10 µg/mL signifikant erhöht. Bei NiONP konnte erst ab 30 µg/mL und bei NiNP ab 50 µg/mL eine signifikante Aktivierung ermittelt werden. In A549 Zellen war die Aktivierung der Caspasen 3/7 deutlich schwächer ausgeprägt. Hierbei wurden signifikante Veränderungen nach der Inkubation mit NiCl<sub>2</sub> ab 30 µg/mL und NiONP bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 50 µg/mL detektiert. In bereits publizierten Untersuchungen konnte in verschiedenen *in vitro* Zellsystemen die proapoptotische Wirkung von partikulären und löslichen Nickelverbindungen nachgewiesen werden. Dabei konnte mehrfach ein Zusammenhang zwischen der eingesetzten Konzentration

und der Caspasenaktivität aufgestellt werden (Capasso et al. 2014; Ahamed 2011; Pietruska et al. 2011; Ding et al. 2006).



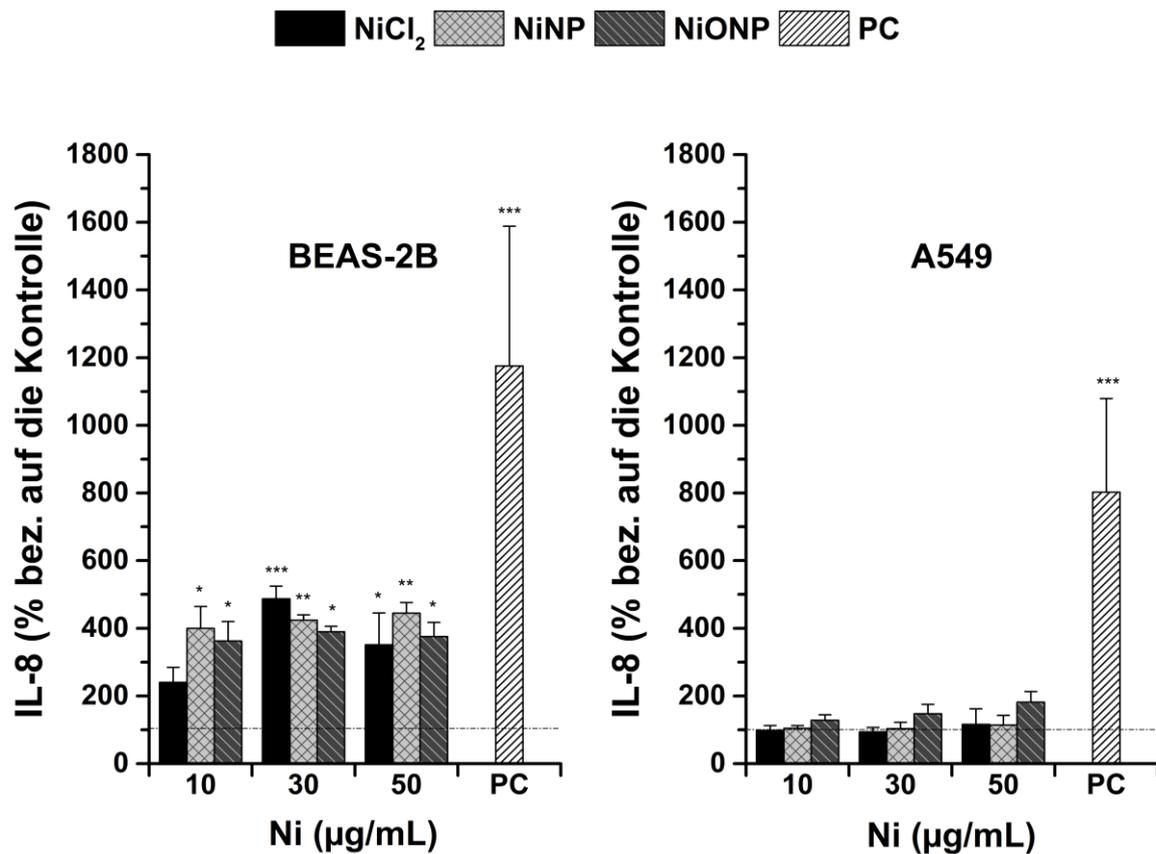
**Abbildung 17: Nickelverbindungen aktivieren Caspase 3/7 in BEAS-2B Zellen.** Nach der 24-stündigen Inkubation von BEAS-2B und A549 Zellen mit den Nickelverbindungen wurde die Caspase-Aktivität mittels Caspase Glo 3/7 Kit von Promega quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von mindestens vier Bestimmungen aus zwei unabhängigen Versuchen ( $n \geq 4$ ). Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit dem Kruskal-Wallis Test bestimmt: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  im Vergleich zur Kontrolle; #  $p \leq 0,05$ ; ##  $p \leq 0,01$ ; ###  $p \leq 0,001$  signifikante Unterschiede zwischen den Verbindungen; n.s. = statistisch nicht signifikant unterschiedlich.

Insgesamt bekräftigen die Untersuchungen zur Caspase-Aktivität die Annahme aus der Genexpressionsanalyse und den Zytotoxizitätsuntersuchungen, dass die beobachtete verminderte Zellzahl und die Reduktion der metabolischen Aktivität nicht nur auf einen Zellzyklusarrest, sondern auch auf apoptotische Prozesse, zurückzuführen sind. Die Wirkung von NiCl<sub>2</sub> war hierbei deutlich stärker ausgeprägt als die partikulären Verbindungen.

## 5.6 Erhöhte Freisetzung der Entzündungsmediatoren IL-8 und IL-6 nach der Behandlung mit Nickelverbindungen

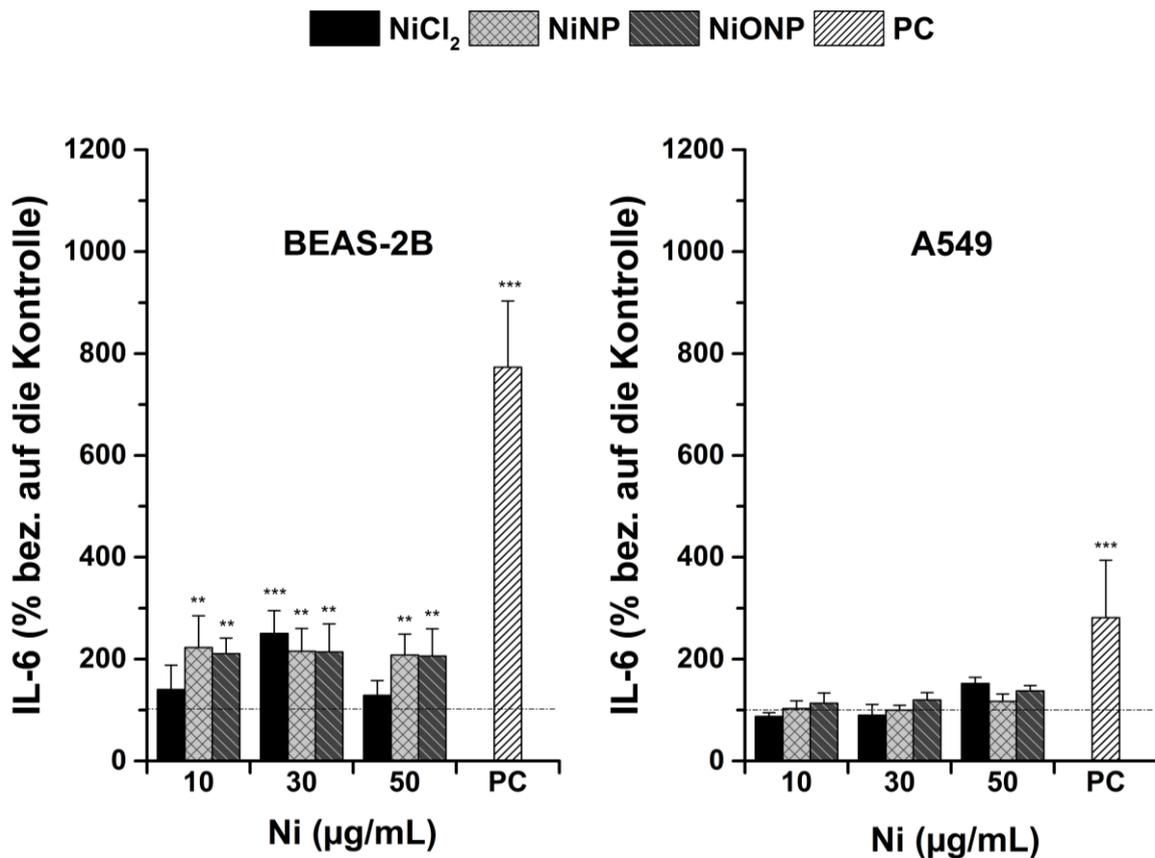
Bei Entzündungsreaktionen handelt es sich um einen Schutzmechanismus des Körpers, der bei chronischer Inflammation jedoch negative Folgen wie Asthma und sogar Krebs nach sich ziehen kann (Yamamoto & Gaynor 2001). Die Aktivierung der inflammatorischen Signalwege stellt einen klassischen Wirkmechanismus von Nanopartikeln dar, weshalb die Freisetzung von Entzündungsmediatoren häufig zur toxikologischen Beurteilung herangezogen wird (Nel et al. 2006).

Die Daten aus der Genexpressionanalyse deuten daraufhin, dass die Nickelnanopartikel zur Aktivierung von Entzündungsprozessen führen könnten, deshalb wurde in weiterführenden Untersuchungen die Sekretion von IL-8 und IL-6 mittels ELISA quantifiziert. Nach 24-stündiger Behandlung der A549 Zellen mit den Testsubstanzen wurden erst bei der höchsten getesteten Konzentration von 50 µg Ni/mL nur eine geringe Menge an IL-8 und IL-6 sezerniert (Abbildung 18 und 19). NiONP und NiCl<sub>2</sub> zeigten dabei die stärksten Effekte. Nach der Behandlung mit NiNP konnte hingegen im Vergleich zu der Kontrolle keine erhöhte Freisetzung der Zytokine detektiert werden. Im Gegensatz dazu, war bei BEAS-2B Zellen die IL-8 und IL-6 Sekretion um ein Vielfaches erhöht. Die Freisetzung von IL-8 und IL-6 blieb bei den partikulären Nickelverbindungen im gesamten Konzentrationsbereich annähernd gleich. Bei NiCl<sub>2</sub> hingegen erreichte die Zytokinfreisetzung bei der mittleren Konzentration das Maximum und nahm mit höherer Konzentration wieder ab. Die Abnahme korreliert mit der verminderten Viabilität der BEAS-2B Zellen nach der Inkubation mit 50 µg/mL NiCl<sub>2</sub> und steht im Einklang mit Ergebnissen anderer Studien von partikulären Metalloxiden (Hsiao & Huang 2011).



**Abbildung 18: Erhöhte Freisetzung von IL-8 nach 24 h Inkubation mit verschiedenen Nickelverbindungen in BEAS-2B und A549 Zellen.** Die Zellen wurden mit den Nickelverbindungen für 24 h inkubiert und der Gehalt an IL-8 aus dem Medium wurde mittels ELISA quantifiziert. Als Positivkontrolle diente LPS (10 µg/mL). Dargestellt sind die Mittelwerte + SD aus mindestens drei unabhängigen Versuchen (n ≥ 3). Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden mit ANOVA und Dunnett's Post-Hoc Test bestimmt: \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01; \*\*\* p ≤ 0,001.

Untersuchungen von Veranth et al. (2007) in BEAS-2B Zellen haben gezeigt, dass nach 24 h Inkubation mit NiONP (BET 145 m<sup>2</sup>/g) nur geringe Mengen an IL-8 und IL-6 freigesetzt werden (Veranth et al. 2007). Die divergierenden Ergebnisse könnten in der unterschiedlichen Zusammensetzung des verwendeten Mediums begründet liegen. In den Untersuchungen von Veranth et al. (2007) wurde das LHC-9 Medium zusätzlich mit 0,1% BSA versetzt. Bei der vorliegenden Arbeit wurde bewusst auf den Zusatz von Proteinen verzichtet, um die Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Partikel ausschließen zu können (Nienhaus et al. 2013; Panas et al. 2012). In der Studie von Capasso et al. (2014) konnte hingegen sowohl in BEAS-2B, als auch in A549 Zellen, eine erhöhte Sezernierung an IL-8 und IL-6 nach 24 h Inkubation mit NiONP (BET 61,2 m<sup>2</sup>/g) detektiert werden. Hierbei war die inflammatorische Antwort, wie auch in der vorliegenden Arbeit, in BEAS-2B Zellen deutlich stärker ausgeprägt als in A549 Zellen (Capasso et al. 2014).



**Abbildung 19: Geringe Freisetzung von IL-6 nach 24 h Inkubation mit verschiedenen Nickelverbindungen in BEAS-2B und A549 Zellen.** Die Zellen wurden mit den Nickelverbindungen für 24 h inkubiert und der Gehalt an IL-6 aus dem Medium wurde mittels ELISA quantifiziert. Als Positivkontrolle diente LPS (10 µg/mL). Dargestellt sind die Mittelwerte + SD aus mindestens drei unabhängigen Versuchen ( $n \geq 3$ ). Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden mit ANOVA und Dunnett's Post-Hoc Test bestimmt: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Untersuchungen *in vivo* zeigten ebenfalls inflammatorische Effekte durch partikuläre Nickelverbindungen, die durch starke Infiltration von Neutrophilen in die Lunge, sowie erhöhter mRNA-Level von Zytokinen (IL-1 $\beta$ , MIP-2) gekennzeichnet waren (Cho et al. 2012).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl die löslichen als auch partikulären Nickelverbindungen auf der Transkriptions- und der Proteinebene eine pro-inflammatorische Antwort aktivierten. Das Ausmaß der Wirkung war jedoch stark von der Zelllinie abhängig. Ebenfalls konnten Unterschiede zwischen den löslichen und partikulären Verbindungen ermittelt werden, wobei die Wirkung von NiCl<sub>2</sub> im Vergleich zu den Partikeln in BEAS-2B Zellen etwas stärker ausgeprägt war. Zwischen den partikulären Substanzen konnten hingegen keine signifikanten Unterschiede detektiert werden.

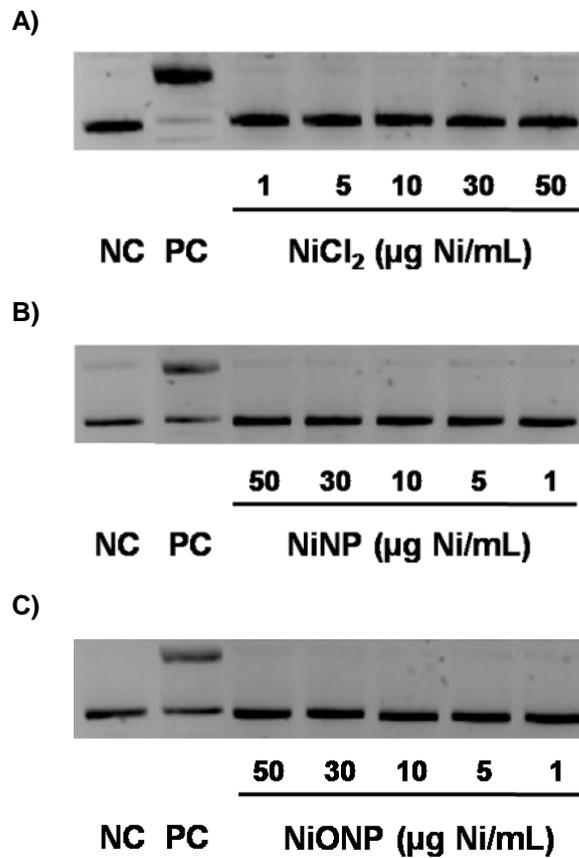
## 5.7 Genotoxisches Potential der partikulären und löslichen Nickelverbindungen

Zur Beurteilung des genotoxischen Potentials der Nickelverbindungen, wurden diese auf ihre DNA-schädigende Wirkung in subzellulären sowie zellulären Testsystemen untersucht. Um den indirekten Einfluss der Nickelverbindungen besser einschätzen zu können, wurde zusätzlich die Induktion von DNA-Strangbrüchen unter pro-oxidativen Bedingungen betrachtet.

### 5.7.1 Geringe Induktion von DNA-Strangbrüchen in subzellulären und zellulären Testsystemen

Zur Erfassung der DNA-schädigenden Wirkung unter subzellulären Bedingungen wurde der PM2-Assay verwendet. Hierfür wurde isolierte PM2-Phagen-DNA direkt mit den Nickelverbindungen inkubiert. Nach einer anschließenden elektrophoretischen Trennung von intakter superspiralisierter und geschädigter relaxierter DNA, wurde die Anzahl der Strangbrüche pro PM2-Molekül über die Bandenintensität bestimmt. Als Positivkontrolle wurde Eisensulfat ( $\text{FeSO}_4$ ) verwendet. Die Ergebnisse sollten vor allem Rückschlüsse geben, inwiefern partikuläre Verbindungen in der Lage sind, mit DNA zu interagieren und Strangbrüche durch Generierung von ROS zu induzieren. In diesem Testsystem konnte nach Inkubation mit verschiedenen Nickelverbindungen keine erhöhte DNA-Strangbruchrate an der isolierten PM2-Phagen-DNA detektiert werden (Abbildung 20). Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl die partikulären Nickelverbindungen, als auch die löslichen Nickelionen, keine Einzelstrangbrüche durch direkte Interaktion mit der DNA induzieren. Die postulierte Induktion von ROS durch partikuläre Nickelverbindungen im zellfreien System (Neubauer et al. 2015; Veranth et al. 2007) konnte mit dem PM2-Assay nicht bestätigt werden. Vergleichende Studien wurden unter der Verwendung von isolierten DNA-Fragmenten und Plasmid-DNA mit wasserlöslichen Nickelverbindungen durchgeführt. Weder bei Kurz-, noch bei Langzeitinkubation konnte eine DNA-schädigende Wirkung von Nickelionen detektiert werden (Liang et al. 1999; Kasprzak & Hernandez 1989; Kawanishi et al. 1989). In der Arbeit von Zhang et al. (1998) nahm nach Behandlung mit NiNP (BET 47,9  $\text{m}^2/\text{g}$ ) der Anteil an superspiralisierter Plasmid-DNA ab. Die Autoren schlussfolgerten, dass die induzierten Strangbrüche in der Plasmid-DNA auf die Bildung von ROS durch NiNP zurückzuführen sind (Zhang et al. 1998b). Möglicherweise könnten die Unterschiede zu den hier gezeigten Ergebnissen in der unterschiedlichen Herstellungsweise der Partikelsuspension begründet liegen, wie bereits zuvor diskutiert (Abschnitt 5.2). Des Weiteren wurde in den Untersuchungen von Zhang et al. (1998b) eine Inkubationsdauer von 8 h gewählt. Bei der vorliegen-

den Arbeit wurde bewusst auf die lange Inkubationszeit verzichtet, um eine Freisetzung der Nickelionen aus den Partikeln auszuschließen und möglichst spezifisch die partikulären Effekte zu erfassen.

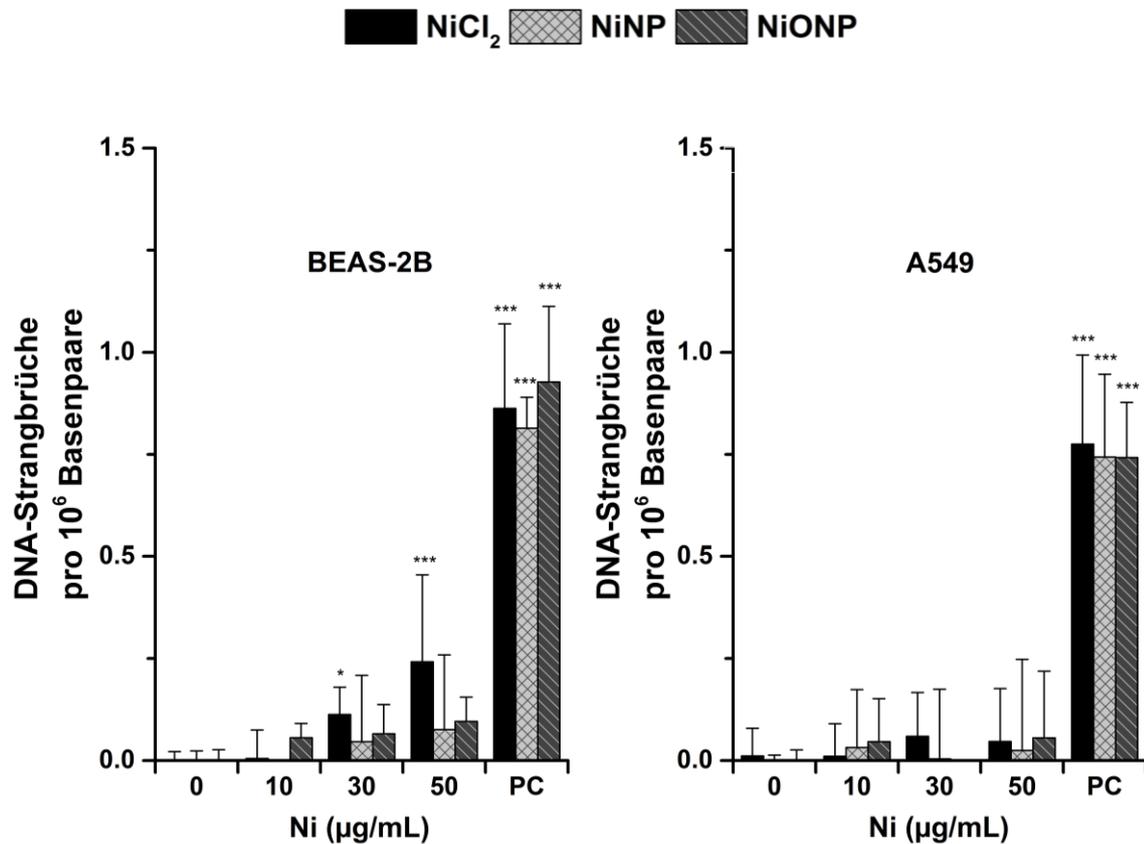


**Abbildung 20: Keine Induktion von Strangbrüchen in PM2-DNA durch Nickelverbindungen.** Nach 30 min Inkubation mit A) NiCl<sub>2</sub>, B) NiNP und C) NiONP wurden die PM2-DNA Modifikationen mittels Gelelektrophorese analysiert. Die obere Bande stellt die relaxierte und die untere Bande die superspiralisierte Form der PM2-DNA dar. Eine unbehandelte Kontrolle (NC) und eine Positivkontrolle (PC: FeSO<sub>4</sub> 10 µM) wurde mitgeführt. Dargestellt sind repräsentative Agarosegele aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen (n ≥ 2).

Das genotoxische Potential der Nickelverbindungen wurde ebenfalls in BEAS-2B und A549 Zellen mittels alkalischer Entwindung untersucht (Abbildung 21). Durch die Behandlung der BEAS-2B Zellen mit NiCl<sub>2</sub> konnte bei der höchsten getesteten Konzentration eine geringfügig erhöhte Anzahl an Einzelstrangbrüchen detektiert werden. Dieser Effekt könnte jedoch auch mit der erhöhten zytotoxischen Wirkung von NiCl<sub>2</sub> im Zusammenhang stehen (Abschnitt 5.2). Partikuläre Verbindungen induzierten hingegen keine DNA-Schäden. In A549 Zellen führte keine der untersuchten Nickelverbindungen zu einer vermehrten Induktion an DNA-Einzelstrangbrüchen. Die mitgeführte Positivkontrolle Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) führte bei allen

durchgeführten Versuchen zu vergleichbaren Ergebnissen, was für die gute Reproduzierbarkeit dieser Methode spricht. Ähnliche Ergebnisse konnten bereits in früheren Studien von Schwerdtle und Hartwig (2006) mit mikropartikulärem Nickeloxid und löslichem  $\text{NiCl}_2$  in A549 erzielt werden. Hier wurden mit Hilfe der alkalischen Entwindung unter nicht zytotoxischen Bedingungen lediglich Fpg-sensitive Stellen, jedoch keine DNA-Strangbrüche detektiert (Schwerdtle & Hartwig 2006).

In der Literatur wird postuliert, dass die kanzerogene Wirkung von Nickelverbindungen vorwiegend auf indirekte Wirkmechanismen zurückzuführen ist. Hierbei nimmt die Katalyse Fenton-ähnlicher Reaktionen mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch Nickelionen, sowie die Inaktivierung von Schutzmechanismen gegenüber ROS eine zentrale Rolle ein (Hartwig 2013; Kasprzak 2003). Inwiefern die partikulären Nickelverbindungen in der Lage sind, mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu interagieren und auf diese Weise ROS zu generieren, wird im folgenden Abschnitt diskutiert.



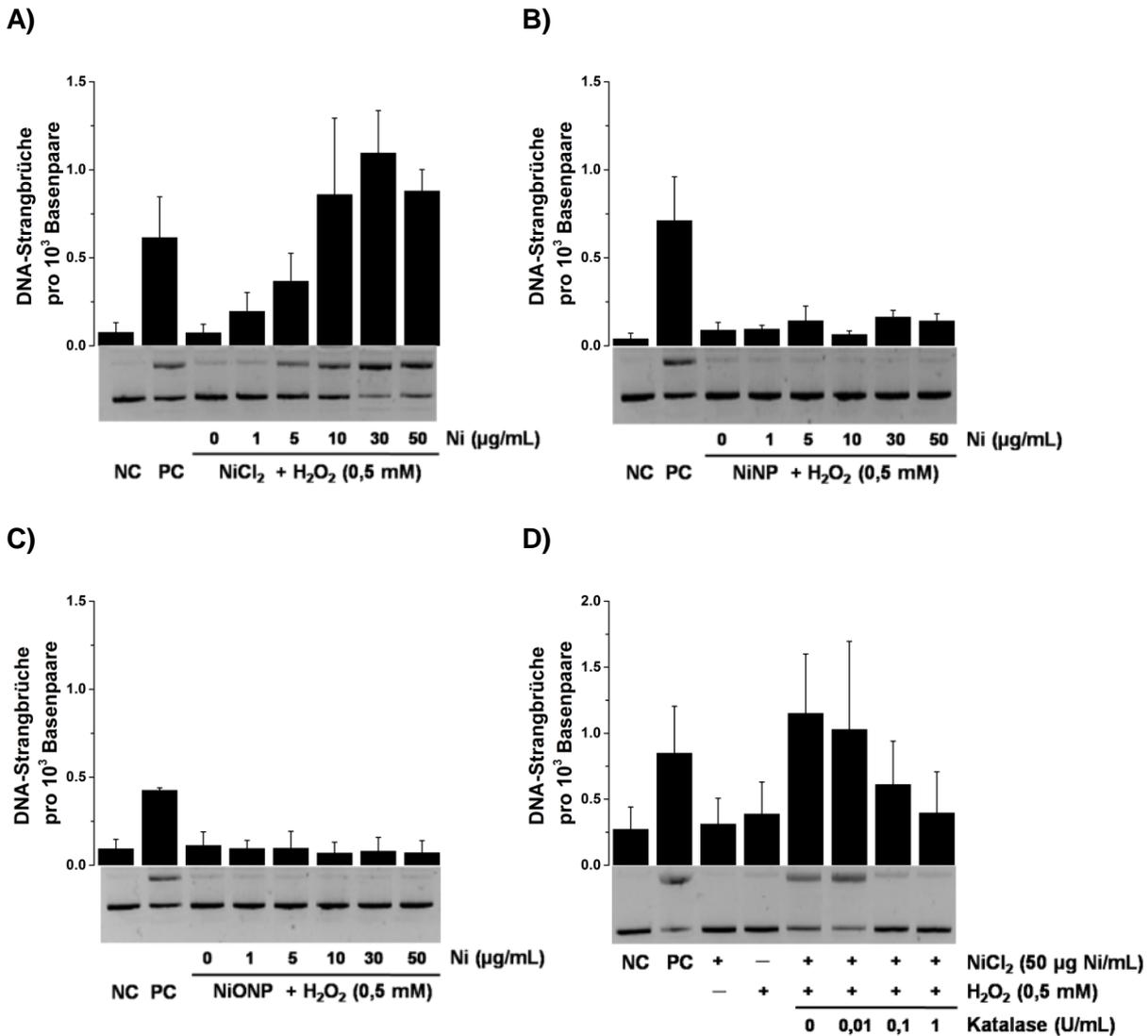
**Abbildung 21: Geringe Induktion von DNA-Einzelstrangbrüchen nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenen Nickelverbindungen in BEAS-2B und A549 Zellen.** Die Zellen wurden 24 h mit verschiedenen Nickelverbindungen behandelt und mittels Alkalischer Entwindung die DNA-Strangbruchrate ermittelt. Als Positivkontrolle (PC) wurde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (BEAS-2B: 50 µM; A549: 65 µM) verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von mindestens fünf Bestimmungen aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen (n ≥ 5). Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden mit ANOVA und Dunnett's Post-Hoc Test bestimmt: \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01; \*\*\* p ≤ 0,001.

### 5.7.2 Konzentrationsabhängige Zunahme der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüche durch Fenton-ähnliche Reaktionen

In den nachfolgenden Untersuchungen wurde die Bildung von DNA-Strangbrüchen durch die verschiedenen Nickelverbindungen in subzellulären und zellulären Testsystemen in Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durchgeführt. Nach Behandlung von PM<sub>2</sub>-DNA mit NiCl<sub>2</sub> unter pro-oxidativen Bedingungen konnte ein erhöhter Anteil an Strangbrüchen detektiert werden (Abbildung 22A). Dabei nahm der Anteil der eingeschnittenen, relaxierten PM<sub>2</sub>-DNA konzentrationsabhängig zu und gleichzeitig der Anteil an der superspiralisierten DNA-Form ab. Durch Zugabe von Katalase konnte die Bildung der induzierten Strangbrüche in Gegenwart von NiCl<sub>2</sub> konzentrationsabhängig verhindert werden (Abbildung 22D). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Nickelionen die Bildung von Radikalen aus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> über Fenton-ähnliche Reaktionen katalysieren und dadurch

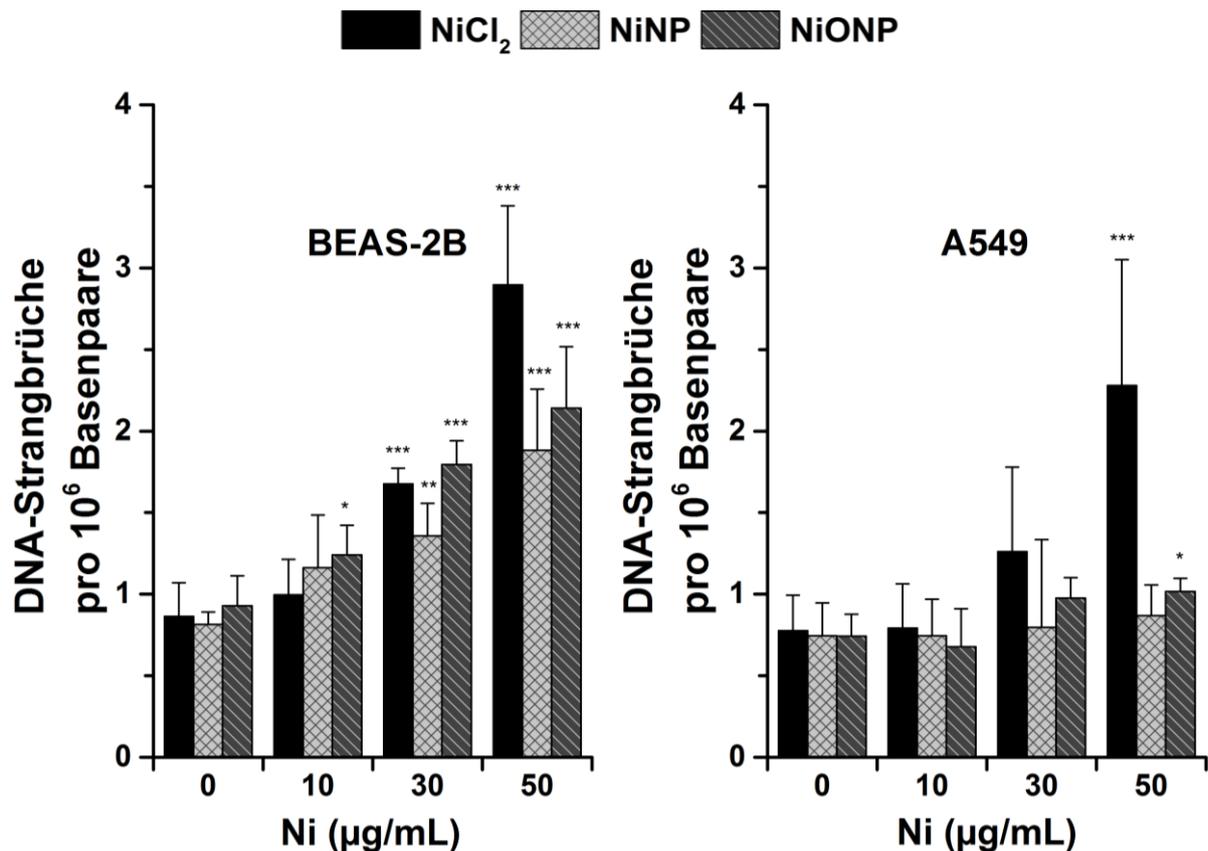
DNA-Einzelstrangbrüche induzieren. Dieser Wirkmechanismus der Nickelionen wurde in der Vergangenheit bereits mehrfach beschrieben (Liang et al. 1999; Kasprzak & Hernandez 1989; Kawanishi et al. 1989). Nach Inkubation mit partikulären Nickelverbindungen konnte dagegen keine erhöhte DNA-Strangbruchrate in Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  detektiert werden (Abbildung 22B und C). Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass die Oberfläche der partikulären Nickelverbindungen nicht reaktiv genug ist, um die Spaltung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu den reaktiven Radikalen zu katalysieren, sondern die gelösten Nickelionen für diese Wirkung verantwortlich sind.

Um den Einfluss löslicher und partikulärer Nickelverbindungen auf die Entstehung von DNA-Strangbrüchen unter pro-oxidativen Bedingungen auch im zellulären System zu untersuchen, wurden die Zellen in Anwesenheit der Nickelverbindungen mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  koinkubiert und nach 5 min mittels Alkalischer Entwindung analysiert. Wie bereits im subzellulären Testsystem, war die Häufigkeit an  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten DNA-Strangbrüchen nach der Inkubation mit  $\text{NiCl}_2$  signifikant erhöht, sowohl in BEAS-2B als auch in A549 Zellen (Abbildung 23). Die Anzahl an DNA-Strangbrüchen war in A549 allerdings niedriger als in BEAS-2B Zellen. Unter Berücksichtigung der eingesetzten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration wird auch bei diesen Versuchen die geringere Empfindlichkeit der A549 Zellen gegenüber oxidativen Schädigungen, verglichen mit BEAS-2B Zellen, deutlich. Vermutlich ist dies auf den höheren GSH-Gehalt in A549 Zellen zurückzuführen (Singh et al. 2006). Nach der Behandlung mit den partikulären Verbindungen, NiONP und NiNP, konnte in BEAS-2B Zellen ebenfalls eine konzentrationsabhängige Zunahme an  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten DNA-Strangbrüchen ermittelt werden. In A549 Zellen wurden hingegen keine Unterschiede zu der mit Wasserstoffperoxid behandelten Kontrolle beobachtet.



**Abbildung 22: Induktion von Strangbrüchen in PM2-DNA durch Nickelverbindungen in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Nach 1 h Inkubation mit A) NiCl<sub>2</sub>, B) NiNP, C) NiONP und D) NiCl<sub>2</sub> / Katalase in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 mM) wurden die PM2-DNA Modifikationen mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert. Die obere Bande stellt die relaxierte, die untere Bande die superspiralisierte Form der PM2-DNA dar. Eine unbehandelte Kontrolle (NC) und eine Positivkontrolle (PC: FeSO<sub>4</sub> 10 µM) wurden mitgeführt. Die DNA-Strangbruchrate wurde aus der Intensität der Banden ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte + SD aus mindestens drei unabhängigen Versuchen und die dazugehörigen repräsentativen Agarosegele (n ≥ 3).

Zusammenfassend belegen die Daten, dass unter pro-oxidativen Bedingungen in Anwesenheit von Nickelionen die DNA-schädigende Wirkung von  $H_2O_2$  verstärkt wird, vermutlich aufgrund der Bildung von Hydroxylradikalen durch Fenton-ähnliche Reaktionen, die mit DNA-Basen oder Zuckerresten reagieren. Außerdem zeigen die durchgeführten Untersuchungen, dass die genotoxische Wirkung, auch bei den partikulären Verbindungen, höchstwahrscheinlich von Nickelionen ausgeht. Hierbei spielt die Bioverfügbarkeit und Freisetzung der Nickelionen aus partikulären Verbindungen eine wichtige Rolle, worauf in Abschnitt 5.9 näher eingegangen wird.



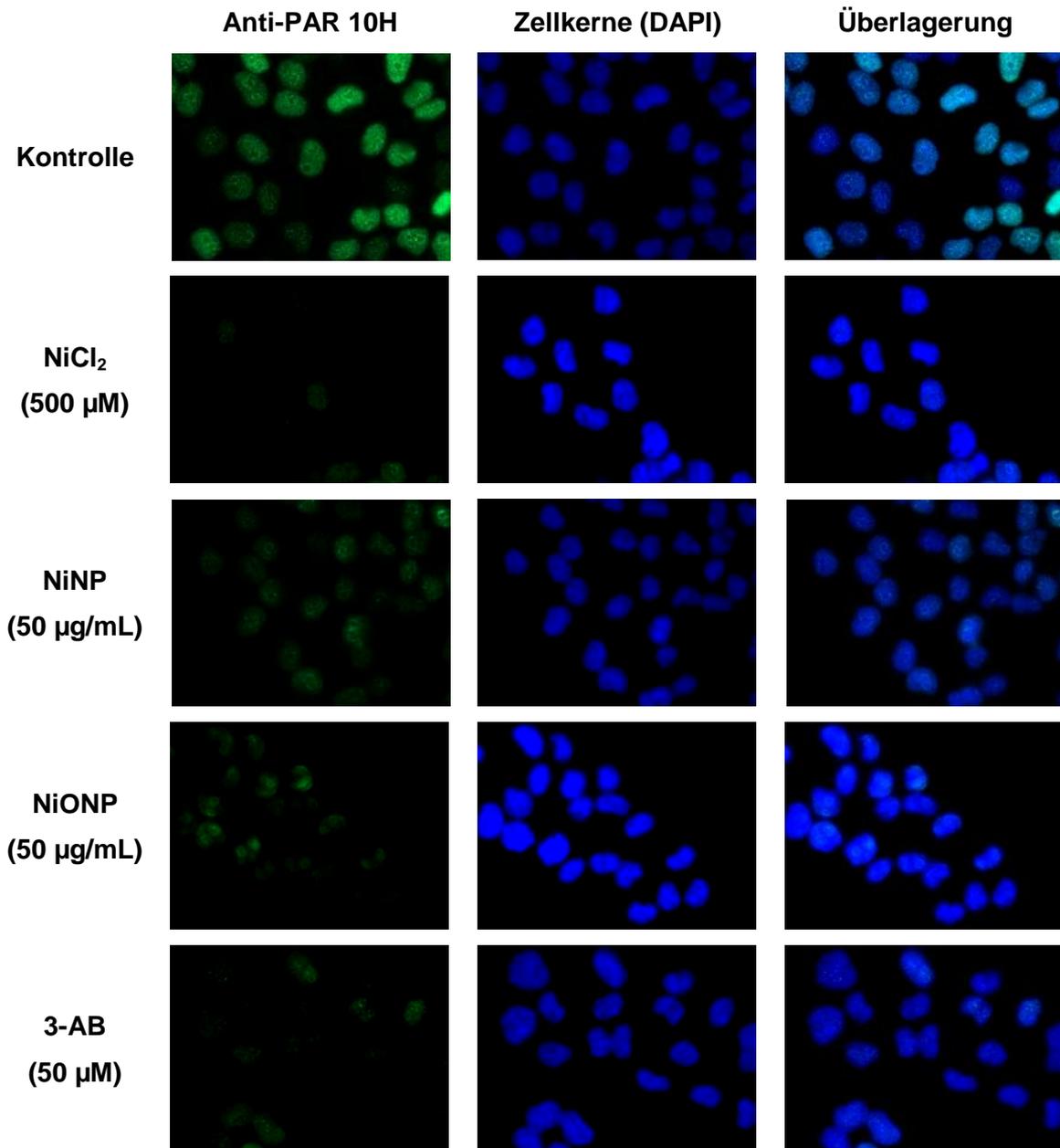
**Abbildung 23: Erhöhte Anzahl an  $H_2O_2$ -induzierten DNA-Strangbrüchen nach 24-stündiger Inkubation mit Nickelverbindungen in BEAS-2B und A549 Zellen.** Die Zellen wurden 24 h mit verschiedenen Nickelverbindungen behandelt. Die Schadensinduktion erfolgte mit  $H_2O_2$  (BEAS-2B: 50  $\mu$ M; A549: 65  $\mu$ M) für 5 min in Anwesenheit der Nickelverbindungen. Danach wurde mittels Alkalischer Entwindung die DNA-Strangbruchrate ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von mindestens fünf Bestimmungen aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen ( $n \geq 5$ ). Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden nach ANOVA mit Dunnett's Post Hoc Test bestimmt: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

## 5.8 Einfluss von Nickelverbindungen auf die Einzelstrangbruchreparatur

Zu den postulierten Wirkmechanismen der Nickelverbindungen gehört neben der Generierung von Radikalen und Inaktivierung von detoxifizierenden Enzymen auch die Beeinflussung von DNA-Reparaturprozessen (Schwerdtle et al. 2002; Dally & Hartwig 1997). Als potentielle Angriffspunkte in der DNA-Reparatur wurden Zinkfinger-Proteine identifiziert (Asmuss et al. 2000). Ein solches Zinkfingerprotein ist Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1). PARP-1 ist ein kernlokalisiertes Protein, das eine zentrale Rolle in der DNA-Reparatur einnimmt (Jagtap & Szabó 2005). Die DNA-Schadenserkennung sowie die schadensinduzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung verschiedener Akzeptorproteine durch PARP-1 stellt den initialen Schritt in der DNA-Einzelstrangbruchreparatur dar (Fisher et al. 2007). Um zu überprüfen, ob partikuläre Nickelverbindungen in der Lage sind Reparaturprozesse zu beeinflussen, wurde die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung in HeLa S3 Zellen untersucht.

### 5.8.1 Inhibition der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Poly(ADP-Ribosyl)ierung durch Nickelverbindungen

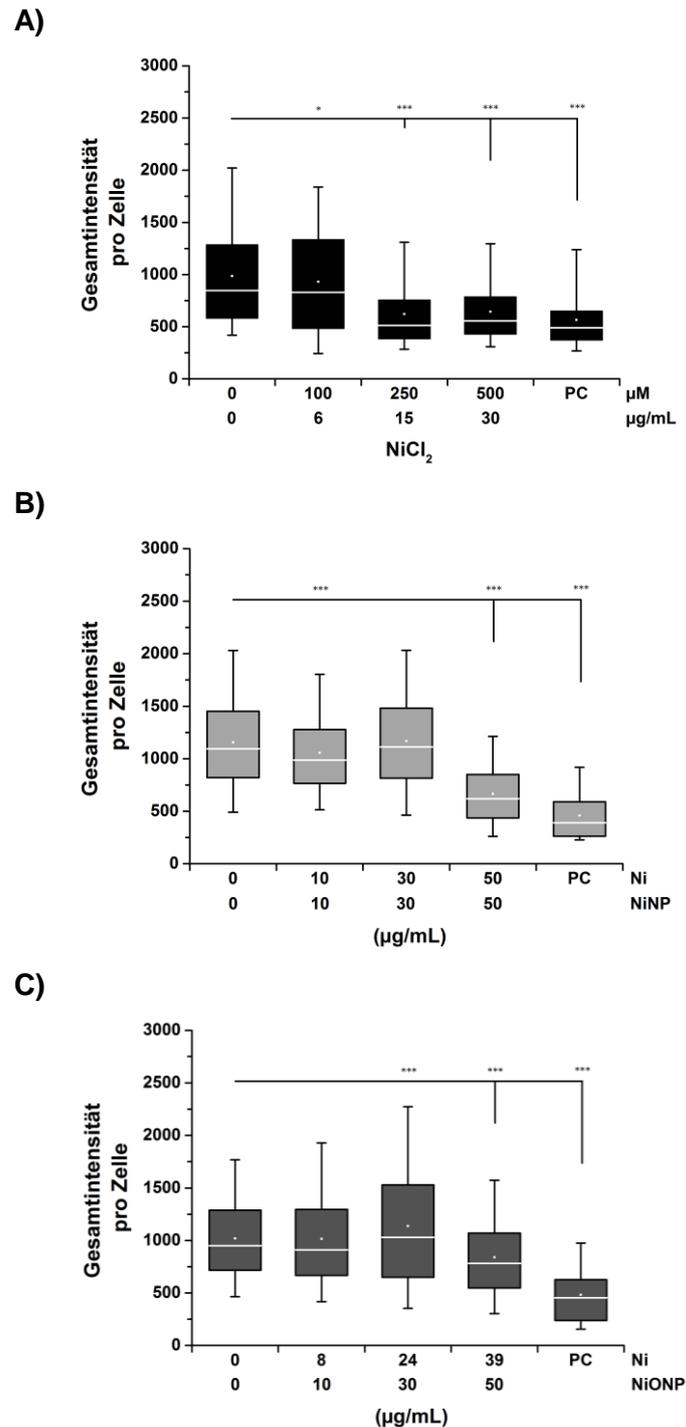
Um das Ausmaß der Poly(ADP-Ribosyl)ierung in HeLa S3 Zellen zu ermitteln, wurde die Bildung von PAR-Ketten immunfluorimetrisch untersucht. Hierfür wurden HeLa S3 Zellen mit den Nickelverbindungen vorinkubiert und die Poly(ADP-Ribosyl)ierung durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generierte DNA-Einzelstrangbrüche induziert. Angelehnt an bereits publizierte Studien, erfolgte die Schadensinduktion mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µM) für 5 Minuten in Gegenwart der Testsubstanzen (Schwerdtle et al. 2007; Hartwig et al. 2003). Unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers (10H) und Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugierten Sekundärantikörpers wurden die gebildeten PAR-Polymere mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Abbildung 24).



**Abbildung 24:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Poly(ADP-Ribosyl)ierung nach Behandlung mit Nickelverbindungen in HeLa S3 Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit Nickelverbindungen behandelt und anschließend für 5 min in Anwesenheit der Verbindungen mit 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koinkubiert. Als Positivkontrolle (PC) wurde 3-AB (50 μM) verwendet. Die PAR-Polymere wurden mit dem Anti-PAR 10H Antikörper detektiert. Abgebildet sind repräsentative Aufnahmen der Zellkerne (DAPI) und PAR-Polymere mit dem jeweiligen Überlagerungsbild.

Nach der Behandlung mit  $\text{NiCl}_2$  konnte eine deutliche Abnahme der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten Poly(ADP-Ribosyl)ierung detektiert werden (Abbildung 25). Hierbei lagen bereits ab der niedrigsten Konzentration statistisch signifikante Unterschiede zu der nur mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ -behandelten Kontrolle vor. NiONP zeigten bei 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  zunächst eine erhöhte Menge an PAR-Polymeren, bei höheren Konzentrationen war die Poly(ADP-Ribosyl)ierung wiederum inhibiert. NiNP hingegen hemmten erst bei der höchsten eingesetzten Konzentration signifikant die Bildung der PAR-Ketten. Eine Spaltung der PARP-1 im Zuge einer Nickel-vermittelten Apoptose könnte ebenfalls zu einer erniedrigten Poly(ADP-Ribosyl)ierung führen, welche jedoch aufgrund der gewählten nicht-zytotoxischen Konzentrationen unwahrscheinlich ist (siehe Anhang). Um die Spaltung der PARP-1 im Zuge der Apoptose dennoch auszuschließen, könnte eine Western Blot Analyse zur Überprüfung der Bildung der Spaltprodukte durchgeführt werden. In Abwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$  konnten weder in den Kontrollen, noch in den mit Testsubstanzen behandelten HeLa S3 Zellen, PAR-Polymere detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dies bestätigt nochmals die Ergebnisse der Alkalischen Entwindung, welche ebenfalls keine erhöhte DNA-Einzelstrangbruchrate in A549 und BEAS-2B Zellen zeigte (Abschnitt 5.7.1).

Der verwendete Primärantikörper 10H bindet vorwiegend an linear aufgebaute langkettige PAR-Polymere, kurzkettige PAR-Polymere werden hingegen nicht erfasst. Da auch kurzkettige PAR-Polymere regulatorische Funktionen erfüllen, könnte dies zu Unterbefunden führen (Martello et al. 2013). Deshalb wurde zur Überprüfung der Ergebnisse eine massenspektrometrische Methode nach Martello et al. (2013) etabliert und zur Quantifizierung von zellulärem PAR herangezogen. Hierzu wurde, wie bei der immunfluorimetrischen Methode, in Gegenwart von Nickel die Poly(ADP-Ribosyl)ierung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  induziert und nach der enzymatischen Verdauung der fixierten HeLa S3 Zellen die ADP-Ribose-Monomere mittels LC-MS/MS analysiert. Vorläufige Ergebnisse nach 24 h Behandlung mit  $\text{NiCl}_2$  (500  $\mu\text{M}$ ) zeigen, dass durch Nickelionen die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung ebenfalls beeinträchtigt wurde (Daten nicht gezeigt). Damit stimmt das Ergebnis aus der LC-MS/MS-Analyse gut mit den Daten aus der Immunofluoreszenz Analyse überein. Widersprüchliche Daten wurden hingegen von Zhuang et al. (1996) publiziert. So wurde eine Akkumulation von DNA-Schäden in MRC-5 Lungenfibroblasten nach Behandlung mit  $\alpha\text{-Ni}_3\text{S}_2$  beobachtet, welche mit einer gesteigerten Aktivität der PARP einherging (Zhuang et al. 1996).



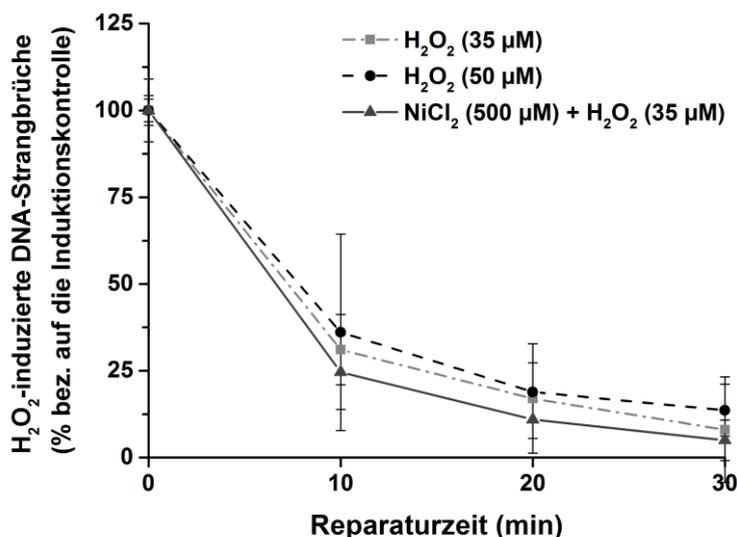
**Abbildung 25: Nickelverbindungen inhibieren die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung in HeLa S3 Zellen.** HeLa S3 Zellen wurden für 24 h mit A) NiCl<sub>2</sub>, B) NiNP und C) NiONP behandelt. Die Schadensinduktion erfolgte mit 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 5 min in Anwesenheit der Verbindungen. Als Positivkontrolle (PC) wurde 3-AB (50 μM) verwendet. Die PAR-Polymere wurden mit dem 10H Antikörper detektiert und die Intensität anhand mikroskopischer Aufnahmen bestimmt (analysiert mit der Software AxioVision) Die Darstellung basiert auf der Intensität einzelner Zellen aus drei unabhängigen Versuchen (n = 3). Pro Bedingung wurden durchschnittlich 200 Zellkerne ausgewertet. Statistisch signifikante Abweichungen zur Kontrolle wurden mit ANOVA und Dunnett's Post-Hoc Test bestimmt: \* p ≥ 0,05; \*\* p ≥ 0,01; \*\*\* p ≥ 0,001.

Eine Inhibierung der schadensinduzierten Poly(ADP-Ribosyl)ierung durch die Nickelverbindungen könnte auf verschiedene Wege erfolgen. Als Mechanismus kommt eine Verdrängung der Zinkionen aus den Zinkfingerstrukturen oder die irreversible Oxidation der kritischen Thiolgruppen in Frage, welche zum Funktionsverlust des Proteins führen (Bossak et al. 2015; Hartwig et al. 2002). Des Weiteren könnte eine Veränderung des Energiestoffwechsels durch Nickelionen und die daraus resultierende Depletion von zellulärem ATP und NAD<sup>+</sup> ebenfalls zu einer verminderten Poly(ADP-Ribosyl)ierung führen (Kim et al. 2005). Untersuchungen aus dem eigenen Arbeitskreis belegen jedoch, dass durch die Behandlung mit NiCl<sub>2</sub> die zellulären Konzentrationen an ATP und NAD<sup>+</sup> in HeLa S3 Zellen unverändert blieben. Ebenso konnte eine dosisabhängige Hemmung der <sup>32</sup>P-ADP-Ribose-Inkorporation in HeLa S3 Zellkernextrakten beobachtet werden und die inhibierende Wirkung von NiCl<sub>2</sub> konnte durch Vorinkubation mit GSH oder DTT in den Zellkernextrakten aufgehoben werden (Daten nicht veröffentlicht). Untersuchungen von Bossak et al. (2015) zeigten ferner, dass synthetisch hergestellte Zinkfinger (ZnF I und ZnF II) von PARP-1 in Anwesenheit von NiCl<sub>2</sub> rasch oxidiert werden. Die Ergebnisse stützen die Annahme, dass die kritischen Thiolgruppen der Zinkfingerstrukturen potentielle Angriffspunkte für Nickelionen darstellen. Ebenso ist es denkbar, dass auch SH-Gruppen aus der Automodifikations- oder der katalytischen Domäne der PARP-1 durch Nickel oxidiert werden, wodurch die Funktion des Proteins ebenfalls beeinträchtigt wird. Weiterhin haben Untersuchungen von Bossak et al. (2015) gezeigt, dass Nickel- und Zinkionen für das ZnF I-Peptid ähnliche Bindungskonstanten aufweisen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine Substitution des zentralen Zinkions durch überschüssige Nickelionen erfolgen könnte. Dadurch würde die Funktion des Zinkfingers beeinträchtigt werden, wie bereits für ein XPA-ZnF-Peptid beschrieben (Bossak et al. 2015; Bal et al. 2003).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle untersuchten Nickelverbindungen die Poly(ADP-Ribosyl)ierung inhibierten, wobei das lösliche NiCl<sub>2</sub> wieder den stärksten Effekt zeigte. Welche Auswirkungen die verminderte Poly(ADP-Ribosyl)ierung letztendlich auf die genomische Stabilität hat, soll mit Hilfe von DNA-Reparaturuntersuchungen im nächsten Abschnitt näher betrachtet werden.

## 5.8.2 Reparatur von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüchen

Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass eine Depletion der PARP-1 zu einer reduzierten Kapazität der DNA-Einzelstrangbruchreparatur-Kapazität führt (Fisher et al. 2007; Ding et al. 1992). Um den Einfluss von Nickelverbindungen auf die DNA-Einzelstrangbruchreparatur in HeLa S3 Zellen zu untersuchen, wurden diese mit NiCl<sub>2</sub> vorinkubiert und zur Induktion von DNA-Einzelstrangbrüchen für 5 min mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koinkubiert. Anschließend wurde die Reparatur, in Abwesenheit von Nickel, über einen Zeitraum von 30 min verfolgt und die verbleibenden DNA-Strangbrüche mittels Alkalischer Entwindung quantifiziert. Wie bereits im Abschnitt 5.7.2 beschrieben, konnte in mit Nickel behandelten A549 und BEAS-2B Zellen in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine höhere DNA-Einzelstrangbruchrate als ohne Nickelbehandlung detektiert werden. Um in der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten Kontrolle eine vergleichbare Menge an DNA-Einzelstrangbrüchen zu erreichen, wurde zusätzlich eine Kontrolle mit einer höheren H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration mitgeführt. Zur Darstellung wurden die Messwerte auf die jeweilige Induktionskontrolle normiert. Damit soll sichergestellt werden, dass unabhängig von der Schadensinduktion, nur die Beeinflussung der Reparaturgeschwindigkeit wiedergegeben wird. Nach 24-stündiger Vorinkubation mit NiCl<sub>2</sub> konnte in HeLa S3 Zellen keine Verlangsamung der DNA-Einzelstrangbruchreparatur beobachtet werden (Abbildung 26). Diese Ergebnisse sind nicht überraschend, denn aus den vorhergehenden Untersuchungen konnte keine vollständige Inhibierung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung detektiert werden. Jedoch zeigten Untersuchungen aus unserem Arbeitskreis an der isolierten PARP-1, dass in Anwesenheit von NiCl<sub>2</sub>, die synthetisierten PAR-Polymere eine verkürzte Kettenlänge aufweisen (Daten nicht veröffentlicht).



**Abbildung 26: Kein Einfluss auf die Reparatur von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüchen durch NiCl<sub>2</sub> in HeLa S3 Zellen.** HeLa S3 Zellen wurden für 24 h mit NiCl<sub>2</sub> behandelt und für die Schadensinduktion für 5 min mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Anwesenheit der Verbindungen kokubiert. Danach wurde die Reaktion abgestoppt und in Abwesenheit der Substanzen bis 30 min nachinkubiert. Die DNA-Strangbruchrate wurde mittels Alkalischer Entwindung ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von mindestens vier Bestimmungen aus zwei unabhängigen Versuchen (n ≥ 4).

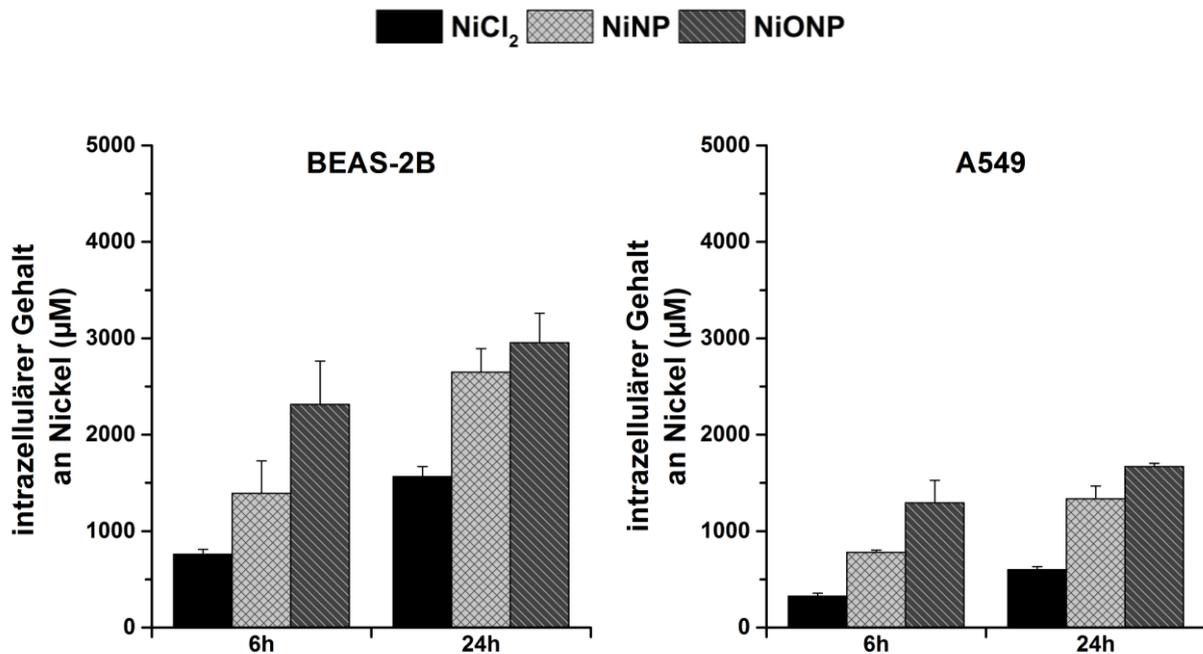
Interessanterweise spielt die PAR-Kettenlänge bei der Rekrutierung von Reparaturfaktoren eine wichtige Rolle. So konnte gezeigt werden, dass DNA-Reparaturfaktoren wie XPA eine starke Präferenz zu langen PAR-Ketten aufweisen (Fahrer et al. 2007). Dagegen binden andere DNA-Reparaturproteine wie XRCC1 bereits effizient an kurze Polymere (Kim et al. 2015). XRCC1 wird eine besondere Rolle in der DNA-Einzelstrangbruchreparatur zugesprochen. Das Protein kann über Protein-Interaktionsdomänen mit anderen DNA-Reparaturfaktoren wechselwirken und so die Abläufe der DNA-Einzelstrangbruchreparatur koordinieren (Caldecott 2003). Dabei wird XRCC1 durch die negativ geladenen PAR-Polymere an den DNA-Schaden rekrutiert und bildet die Reparaturplattform für weitere Reparaturproteine aus (Wei et al. 2013; El-Khamisy et al. 2003). Im Zusammenhang mit den vorliegenden Daten ist es denkbar, dass bereits die kurzkettigen PAR-Polymere ausreichen, um XRCC1 zu rekrutieren und die Reparatur der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüchen einzuleiten. Um beurteilen zu können, inwieweit andere Reparaturmechanismen unter Beteiligung von PARP-1 betroffen sind, bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen.

## 5.9 Bioverfügbarkeit der Nickelionen

### 5.9.1 Intrazelluläre Nickelkonzentration

Die Wirkung von partikulären Nickelverbindungen wird in der Literatur vor allem auf die intrazelluläre Freisetzung von Nickelionen zurückgeführt (Muñoz & Costa 2012). Daher wurde nach Inkubation mit partikulären und löslichen Nickelverbindungen zu verschiedenen Zeitpunkten die intrazelluläre Nickelionenkonzentration mittels GF-AAS quantifiziert. Hierzu wurden die Zellen nach der Behandlung mit den Substanzen lysiert, zentrifugiert und der Überstand auf den Nickelgehalt untersucht. Bei allen untersuchten Bedingungen konnte ein zeitabhängiger, intrazellulärer Anstieg der Nickelkonzentration detektiert werden (Abbildung 27), wobei der intrazelluläre Nickelgehalt nach der Inkubation mit partikulären Verbindungen im Vergleich zu  $\text{NiCl}_2$  in beiden Zelllinien deutlich erhöht war. Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass NiONP im Vergleich zu NiNP rascher aufgenommen werden, obwohl die Zellen mit der gleichen Nickelkonzentration behandelt wurden. Eine Erklärung für die gesteigerte Aufnahme der NiONP könnte in dem unterschiedlichen Agglomerationsverhalten gegenüber NiNP begründet liegen. Mit DLS-Analysen wurde gezeigt, dass die NiONP in Zellkulturmedien einen deutlich kleineren mittleren hydrodynamischen Radius aufweisen und deshalb möglicherweise schneller internalisiert werden können (Abschnitt 5.1.3). Ebenfalls könnte der im Zellkulturmedium gelöste Anteil an Nickelionen aus NiONP zu dem höheren intrazellulären Nickelgehalt führen. Bei den wesentlich schlechter löslichen NiNP kann dagegen angenommen werden, dass der gemessene intrazelluläre Nickelgehalt ausschließlich von internalisierten Partikeln stammt (Abschnitt 5.1.10). Ebenso muss berücksichtigt werden, dass während der Präparation der Partikelsuspension ein Probenverlust festgestellt wurde (Abschnitt 5.1.9), der bei Herstellung von NiNP-Suspensionen rund 10% stärker ausfiel als bei NiONP Suspensionen. Ferner können aufgrund des starken Anhaftens der Partikel an der Außenseite der Zellmembran Überbefunde nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die anhaftenden Partikel werden zwar mit den Membranfragmenten abzentrifugiert, es ist jedoch denkbar, dass sich die Partikel während der Probenaufbereitung von den Zellmembranfragmenten lösen und dann aufgrund ihrer geringen Größe nicht mehr vollständig abzentrifugiert werden können. Des Weiteren lag bei allen getesteten Bedingungen in BEAS-2B Zellen ein höherer intrazellulärer Nickelgehalt als in A549 Zellen vor. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Capasso et al (2014) überein, welche die Aufnahmen von NiONP in BEAS-2B und A549 Zellen untersuchten. Eine Abhängigkeit der Partikelaufnahme von der Zelllinie wurde bereits in Untersuchungen gezeigt (zusammengefasst in Kettler et al. 2014). Ebenso könnte die unterschiedliche Zusammensetzung des Mediums zu unterschiedlicher Partikeldeposition oder Endozytoserate führen (Kettler et al. 2014; Lesniak et al. 2012), denn im Medium der A549 Zellen war durch die

Verwendung von FKS ein höherer Proteingehalt vorhanden als im Medium der BEAS-2B Zellen. Tatsächlich korrelierte die Verwendung des proteinreichen Mediums für A549 Zellen mit einem geringeren intrazellulären Nickelgehalt. Inwieweit der unterschiedliche Proteingehalt im Medium wirklich der Grund für den Unterschied zwischen den Zelllinien ist, ist schwer zu beurteilen. Hierzu müssten Untersuchungen in An- und Abwesenheit von FKS oder definierten Proteinsupplementen durchgeführt werden.



**Abbildung 27: Zeitabhängige Zunahme der intrazellulären Nickelionenkonzentration nach Behandlung mit partikulären NiNP, NiONP und löslichem NiCl<sub>2</sub>.** BEAS-2B und A549 Zellen wurden mit 50 µg/mL Ni inkubiert und nach verschiedenen Zeitpunkten aufgearbeitet. Der Gehalt an Nickelionen wurde mittels GF-AAS quantifiziert und auf das mittlere Zellvolumen (BEAS-2B  $1,7 \times 10^{-12}$  L und A549  $2,9 \times 10^{-12}$  L) bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD aus mindestens drei unabhängigen Versuchen (n = 3).

Es existieren nur wenige Studien, in denen quantitativ die intrazelluläre Nickelkonzentration bestimmt wurde. Aufgrund der vielen Einflussfaktoren unter Verwendung von verschiedenen Zellkultursystemen, sowie der unterschiedlichen Größe der Partikel, ist es außerdem schwierig, publizierte Daten mit den hier vorliegenden Ergebnissen zu vergleichen. Untersuchungen von Harnett et al. (1982) haben gezeigt, dass schwerlösliche NiS Partikel im Vergleich zu löslichem NiCl<sub>2</sub> stärker intrazellulär akkumulieren. Durch Zellfraktionierung konnten die Autoren belegen, dass nach Behandlung von CHO Zellen mit NiS (10 µg/mL) 300- bis 2000-mal mehr Nickelionen an RNA oder DNA gebunden vorliegen als nach der Inkubation mit gleichen Konzentrationen an löslichem Nickel (Harnett et al. 1982). Untersuchungen von Schwerdtle und Hartwig (2006) zur

intrazellulären Verteilung von Nickelionen in A549 Zellen korrelieren mit den Daten aus der vorliegenden Studie. Hierbei lag nach Inkubation mit mikropartikulärem NiO eine höhere Nickelkonzentrationen im Zytoplasma und Zellkern vor, als nach Inkubation mit NiCl<sub>2</sub> (Schwerdtle & Hartwig 2006). Pietruska et al. (2011) veröffentlichten dagegen dem widersprechende Ergebnisse. Die Autoren untersuchten die Bioverfügbarkeit der gleichen Verbindungen wie in dieser Arbeit in H460 Zellen mittels eines nickelspezifischen Fluoreszenzfarbstoffes und konnten zeigen, dass nach 24-stündiger Inkubation mit NiCl<sub>2</sub>, wie auch NiONP, intrazellulär erhöhte Nickelkonzentrationen auftraten. Bei NiNP hingegen konnte erst nach 48 h Inkubation ein deutliches Signal detektiert werden (Pietruska et al. 2011). Ähnliche Ergebnisse wurden in der Studie von Forti et al. (2011) erzielt. Die Verwendung einer anderen Methode als in der vorliegenden Arbeit könnte der Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse sein. Der von Pietruska et al. (2011) und Forti et al. (2011) verwendete Fluoreszenzfarbstoff erfasst nur die gelösten Nickelionen, nicht jedoch endozytierte Partikel, die noch in partikulärer Form vorliegen. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Versuchsprotokoll werden die Endosomen aufgrund ihrer geringen Größe von 0,05 - 0,3 µm nicht abzentrifugiert und somit die bereits endozytierten, aber noch nicht gelösten Partikel, ebenfalls als intrazellulär verfügbares Nickel miterfasst.

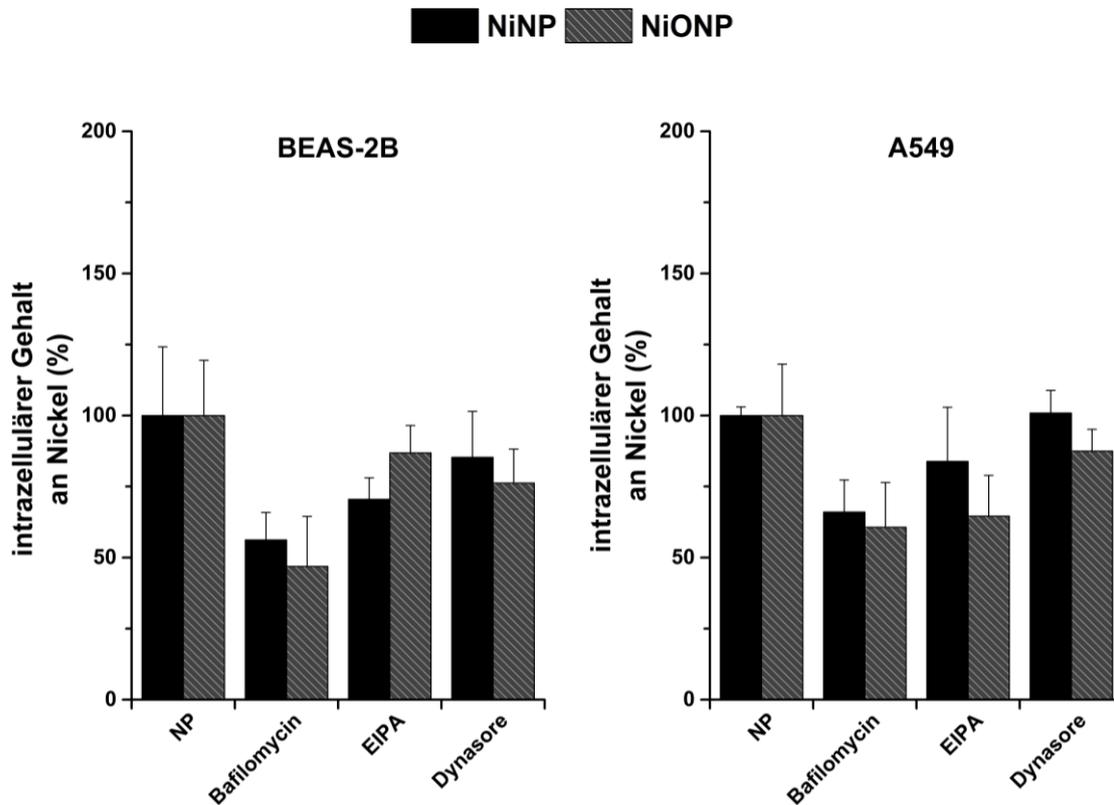
### **5.9.2 Einfluss von Endozytoseinhibitoren auf die Aufnahme der partikulären Nickelverbindungen**

Um die Aufnahmemechanismen der Partikel genauer zu untersuchen, wurde der intrazelluläre Nickelgehalt in BEAS-2B und A549 Zellen in Gegenwart verschiedener Endozytoseinhibitoren untersucht. Als Inhibitoren wurden EIPA (5-(N-Ethyl-N-isopropyl)amilorid), Dynasore und Bafilomycin A1 verwendet. EIPA hemmt Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher, indem es direkt an die Natrium-Bindungsstellen bindet, die Reorganisation von F-Aktin hemmt und dadurch die Makropinozytose beeinträchtigt (Ivanov 2008). Dynasore gilt als spezifischer Inhibitor der Dynamin-abhängigen Endozytose. Hierbei wird in Gegenwart von Dynasore das Abschnüren der Transportvesikel während der Clathrin- und Caveolin-vermittelten Endozytose unterbunden (Macia et al. 2006). Bei Bafilomycin A1 handelt es sich um einen ATPase-Inhibitor, welcher die Ansäuerung der Lysosomen verhindert. In Vorversuchen wurde anhand der Zellzahl der nicht-zytotoxische Konzentrationsbereich der Inhibitoren festgelegt (Daten nicht gezeigt) und der intrazelluläre Nickelgehalt nach 6-stündiger Inkubation mit partikulären Nickelverbindungen in Gegenwart der Inhibitoren bestimmt. In Gegenwart der Inhibitoren konnte in beiden Zelllinien eine Reduktion der intrazellulären Nickelionenkonzentration nach der Behandlung mit NiNP und NiONP detektiert werden (Abbildung 28). Der ATPase Inhibitor Bafilomycin A1 bewirkte nach der Behandlung mit partikulären Testsubstanzen in beiden Zelllinien eine deutliche Reduktion

von rund 40 - 50% der intrazellulären Nickelkonzentration. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die Partikel über Endozytose internalisiert und in den Lysosomen gelöst werden. In Anwesenheit von EIPA und Dynasore waren in BEAS-2B Zellen die Aufnahmen der NiNP signifikant reduziert, wobei die inhibierende Wirkung von EIPA etwas stärker ausgeprägt war.

In A549 Zellen konnte unter Berücksichtigung der Schwankungen nur ein geringer Einfluss beobachtet werden. Im Fall der NiONP senkten EIPA und Dynasore in BEAS-2B Zellen ebenfalls den intrazellulären Nickelgehalt, wobei hier die Clathrin und Caveolin-vermittelte Endozytose (gehemmt durch Dynasore) scheinbar den Hauptaufnahmemechanismus darstellt.

In A549 Zellen konnte nach NiONP Behandlung unter Einsatz von EIPA eine starke Reduktion der intrazellulären Nickelkonzentration von rund 40% beobachtet werden, während Dynasore die Partikelaufnahme nur geringfügig inhibierte. Selbst wenn man die Effekte von EIPA und Dynasore aufsummiert, konnte keine vollständige Inhibierung der Aufnahme von NiNP und NiONP erzielt werden.



**Abbildung 28: Unter Einsatz von Inhibitoren nimmt die intrazelluläre Nickelionen Konzentration ab.** BEAS-2B und A549 Zellen wurden mit 50 µg Ni/mL in Gegenwart von EIPA, Dynasore und Bafilomycin A1 inkubiert und nach 6 h aufgearbeitet. Der intrazelluläre Nickelgehalt wurde mittel GF-AAS quantifiziert und auf das mittlere Zellvolumen (BEAS-2B  $1,7 \times 10^{-12}$  L und A549  $2,9 \times 10^{-12}$  L) normiert. Anschließend wurden die Werte auf die mit nur den Partikel behandelten Proben (NP) bezogen und prozentual aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD aus mindestens drei unabhängigen Versuchen (n = 3).

Unter der Annahme einer idealen Spezifität und Effizienz der Inhibitoren, verdeutlichen diese Ergebnisse, dass der verbleibende Anteil an intrazellulären Nickelionen über andere Aufnahme-mechanismen, wie Diffusion oder Dynamin-unabhängige Endozytose, in die Zellen gelangen muss, wie es bereits für andere Nanomaterialien beschrieben wurde (Huang et al. 2012; Zhao & Wang 2011; Vercauteren et al. 2010). Eine entsprechend hohe Spezifität und Effizienz lässt sich allerdings weder mit den hier durchgeführten Versuchen noch durch publizierte Studien belegen. Nichtsdestotrotz ist dieser Versuch, gerade im Hinblick auf die unter Abschnitt 5.9.1 diskutierten Überbefunde, sehr wertvoll für die Interpretation der Aufnahmeversuche der partikulären Verbindungen, denn die Ergebnisse verdeutlichen, dass mindestens der reduzierte Nickelgehalt nach Verwendung der einzelnen Inhibitoren nicht von methodischen Artefakten, sondern vielmehr von internalisierten Partikeln stammt.

## 6. Zusammenfassende Diskussion

Partikuläre Nickelverbindungen im Nanometerbereich kommen aufgrund der verbesserten Materialeigenschaften im Vergleich zu mikroskaligen Partikeln in steigendem Maße in technischen Anwendungsbereichen zum Einsatz (Siddiqui et al. 2012; Zhang et al. 2003). Gleichzeitig nimmt, aufgrund der zunehmenden Exposition am Arbeitsplatz in der Herstellungs- und Verarbeitungsindustrie, sowie infolge einer Freisetzung in die Umwelt, die Notwendigkeit einer Risikobewertung dieser Nanomaterialien zu. Jedoch sind die derzeit verfügbaren toxikologischen Daten für nanoskalige Nickelverbindungen bei weitem noch nicht ausreichend. Dabei kann nach dem gegenwärtigen Stand der Nanotoxikologie eine toxikologische Bewertung von Nanomaterialien nicht allein auf der Grundlage ihrer chemischen Identität erfolgen. Stattdessen müssen physikochemische Eigenschaften wie Partikelgröße oder Oberflächenbeschaffenheit, die in der bisherigen Metalltoxikologie keine Rolle gespielt haben, mitberücksichtigt werden (Jiang et al. 2008; Limbach et al. 2007).

In dieser Arbeit sollte daher der Frage nachgegangen werden, ob partikuläre nanoskalige Nickelverbindungen getrennt von anderen Nickelverbindungen zu bewerten sind, oder ob aufgrund des ähnlichen Wirkmechanismus innerhalb dieser Stoffgruppe extrapoliert werden kann („read-across“). Nach dem derzeitigen Wissensstand ist es denkbar, dass aufgrund der veränderten Materialeigenschaften der nanoskaligen Nickelpartikel neue toxikologische Wirkmechanismen auftreten könnten, die bislang bei mikroskaligen und wasserlöslichen Nickelverbindungen keine Rolle gespielt haben.

Um diese Hypothese zu überprüfen wurden nanoskalige Nickel (NiNP) und Nickeloxid (NiONP) Partikel physikalisch-chemisch charakterisiert und die toxische Wirkung in der alveolären Lungenepithelzelllinie A549 und der Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B anhand ausgewählter biologischer Endpunkte verglichen. Zusätzlich wurde mit  $\text{NiCl}_2$  eine lösliche Verbindung verwendet, um eine Aussage über die partikulären Eigenschaften im Vergleich zu gelösten Nickelionen treffen zu können.

Zur Identifizierung der Wirkmechanismen der löslichen und partikulären Nickelverbindungen wurden konzentrations- und zeitabhängige Genexpressionsprofile erstellt. Hierzu wurden 95 ausgewählte Genen verschiedener Signalwege wie Zellzyklus, Apoptose, Fremdstoffmetabolismus und DNA-Reparatur herangezogen. Zudem wurden verschiedene redox-regulierte Transkriptionsfaktoren und Gene, deren Expression in Folge von oxidativem Stress verändert werden, ausgewählt. Ein Vergleich des Genexpressionsmusters hat ergeben, dass die Wirkung der Nickelverbindungen in den beiden Zelllinien qualitativ weitgehend übereinstimmt, wobei die Genexpression in BEAS-2B deutlich stärker moduliert wurde. Eine mögliche Erklärung für diese

Unterschiede könnte in einer unterschiedlichen Bioverfügbarkeit der Nickelverbindungen begründet liegen. Deshalb wurden umfassende Untersuchungen zur Aufnahme von partikulären und löslichen Nickelverbindungen durchgeführt, die nachfolgend ausführlicher diskutiert werden. Ebenso verdeutlichen die Ergebnisse, dass die verschiedenen getesteten Nickelverbindungen die gleichen molekularen Wirkmechanismen und zellulären Angriffspunkte aufwiesen. Nur wenige Gene wurden substanzspezifisch moduliert. Nach Inkubation mit  $\text{NiCl}_2$  konnte eine ausgeprägte Induktion von Metallhomöostase-regulierenden Genen (*MT1X*, *MT2A* und *SLC30A1*) in BEAS-2B Zellen detektiert werden. Bei Betrachtung der Signalwege, welche mit oxidativem Stress in Zusammenhang stehen, wurde nach der Behandlung mit Nickelverbindungen eine starke Induktion von *HMOX1*, *SOD2*, *TXNRD1* und *GCLC* Genen beobachtet. Die Expression von *HMOX1* kann als Marker für eine übermäßige ROS-Generierung und *GCLC* als Antwort auf die Verringerung des zellulären Glutathiongehaltes angesehen werden (Gozzelino et al. 2010; Dickinson & Forman 2002). Die Induktion dieser sogenannten „early response“ Gene deutet daraufhin, dass in Anwesenheit von Nickelverbindungen eine gesteigerte ROS-Produktion erfolgte. Diese Ergebnisse stimmen mit bereits publizierten Studien gut überein, welche nach der Inkubation mit löslichen und partikulären Verbindungen sowohl erhöhte intrazelluläre ROS-, als auch eine Depletion der intrazellulären GSH-Level ermittelten (Capasso et al. 2014; Ahamed 2011). Zudem geben die Ergebnisse aus der Genexpressionsanalyse, wie auch bereits publizierte Daten, Grund zur Annahme, dass durch Reprimierung der detoxifizierenden Enzyme und der Inhibierung ihrer Aktivität verstärkt oxidativer Stress in den Zellen auftritt (Tang et al. 2014; Wu et al. 2013; Rodriguez et al. 1990). Infolge der Akkumulation von ROS können vermehrt DNA-Schäden entstehen, welche im Stande sind, Kontrollpunkte im Zellzyklus zu aktivieren (Kastan & Bartek 2004; Shackelford et al. 1999). Dass dieser Mechanismus bei den untersuchten Substanzen tatsächlich eine Rolle spielt, wurde durch eine erhöhte Expression der Zellzyklus-assoziierten Gene *GADD45A* und *CDKN1A* gestützt. Außerdem wurde dieser Befund durch eine veränderte Zellzyklusverteilung, festgestellt mittels Durchflusszytometrie, bestätigt. Nach Behandlung mit den Nickelverbindungen wurde in BEAS-2B Zellen ein S-Phasen Arrest eingeleitet. In A549 Zellen hingegen wurde ein Arrest in der  $G_1/G_0$ -Phase nur in Anwesenheit von  $\text{NiCl}_2$  induziert. Jedoch konnte nach der Behandlung mit den Substanzen, sowohl im subzellulären System als auch in den beiden Zelllinien, keine erhöhte DNA-Strangbruchrate detektiert werden. Der beobachtete Zellzyklusarrest scheint also nicht durch genotoxischen Stress in Form von unmittelbar hervorgerufenen Strangbrüchen induziert worden zu sein.

Allerdings muss berücksichtigt werden, dass nur ein Bruchteil aller gebildeten Hydroxylradikale zu Schäden am Zucker-Phosphat-Gerüst führen, aus denen letztendlich direkte DNA Einzel- und Doppelstrangbrüche, sowie alkali-labile Stellen entstehen können. Stattdessen stellen modifizierte DNA-Basen den Großteil der oxidativen DNA-Schäden dar. 8-oxoG ist die promi-

nenteste oxidative Basenmodifikation und wird als Marker für diesen Typ von DNA-Schäden verwendet (zusammengefasst in Aruoma 1998; Halliwell 1996).

Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Untersuchungen haben gezeigt, dass nach Behandlung mit Nickelverbindungen vermehrt 8-oxoG gebildet wird (Schwerdtle & Hartwig 2006; Dally & Hartwig 1997; Kasprzak et al. 1992). Um zu überprüfen, ob auch die hier getesteten Nickelverbindungen zur Bildung von oxidativen DNA-Schäden führen, müssten noch weitere vergleichende Studien, z.B. unter Verwendung des Enzyms FPG (Formamidopyrimidin DNA Glycosylase), erfolgen (Hartwig 1996).

Eine Akkumulation von ROS kann durch Metalle indirekt, über die Inaktivierung der detoxifizierenden Enzyme, oder durch Katalyse von Fenton-ähnlichen Reaktionen hervorgerufen werden (Hartwig 2013). Um zu überprüfen, ob partikuläre Nickelverbindungen auf diese Weise zum vermehrten Auftreten von DNA-Schäden führen, wurde die Bildung von DNA-Einzelstrangbrüchen unter pro-oxidativen Bedingungen in verschiedenen Testsystemen untersucht. Im subzellulären System, mit isolierter PM2-Phagen-DNA, konnte in Gegenwart von Wasserstoffperoxid nur nach Inkubation mit löslichem Nickel eine erhöhte DNA-Einzelstrangbruchrate detektiert werden. Partikuläre Verbindungen hingegen induzierten bei gleichen Bedingungen keine DNA-Strangbrüche. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass unter den gewählten Bedingungen die katalytische Aktivität an der Partikeloberfläche nicht ausreicht, um vermehrt Radikale zu bilden und stattdessen Nickelionen benötigt werden, um eine erhöhte DNA-Strangbruchrate zu induzieren. Die Untersuchungen im zellulären System belegen, dass in Gegenwart von NiONP und NiNP in BEAS-2B Zellen die Anzahl an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüchen erhöht wurde, welche jedoch etwas schwächer ausgeprägt waren als nach der Behandlung mit NiCl<sub>2</sub>. In A549 Zellen konnte nur nach der Inkubation mit löslichem Nickel eine erhöhte DNA-Strangbruchrate detektiert werden. Die erhöhte Empfindlichkeit der BEAS-2B Zellen könnte verschiedene Ursachen haben. Zum einen zeigten die folgend beschriebenen Untersuchungen zur intrazellulären Nickelfreisetzung, dass BEAS-2B Zellen im Vergleich zu A549 Zellen die Nickelverbindungen besser aufnehmen konnten und dadurch mehr Nickelionen intrazellulär freigesetzt wurden. Im Falle des löslichen NiCl<sub>2</sub> würde dieser Effekt aber weniger ins Gewicht fallen, da Nickelionen über Ionenkanäle aufgenommen werden (Muñoz & Costa 2012; Denkhaus & Salnikow 2002). Ebenso könnte der erhöhte GSH-Gehalt in A549 Zellen eine wichtige Rolle spielen und erklären, weshalb in A549 eine niedrigere Strangbruchrate vorlag. In Untersuchungen von Singh et al. (2006) wurde in BEAS-2B Zellen ein GSH-Gehalt von rund 30 nmol/mg Protein und in A549 Zellen hingegen 60 nmol/mg Protein ermittelt. Weiterhin wurde im subzellulären Testsystem eine hohe Affinität von Nickelionen zu GSH demonstriert (Krezel & Bal 2004). Daher könnten Nickelionen in A549 Zellen, zu größeren Anteilen als in BEAS-2B, bereits im Zytoplasma detoxifiziert werden.

Zu den postulierten Wirkmechanismen der Nickelverbindungen wird neben der Generierung von Radikalen und Inaktivierung von detoxifizierenden Enzymen auch die Beeinflussung von DNA-Reparaturprozessen diskutiert (Schwerdtle et al. 2002; Dally & Hartwig 1997). Um zu überprüfen, ob partikuläre Nickelverbindungen auch in der Lage sind, Reparaturprozesse zu beeinflussen, wurde der Einfluss der partikulären und löslichen Nickelverbindungen auf die Poly(ADP-Ribosyl)ierung in HeLa S3 Zellen untersucht. Als Modellläsionen wurden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte DNA-Einzelstrangbrüche herangezogen. Obwohl im zellulären System nach der Inkubation mit Nickelverbindungen eine vermehrte Anzahl an DNA-Einzelstrangbrüchen vorlag, war die Poly(ADP-Ribosyl)ierung bei allen untersuchten Testsubstanzen signifikant vermindert. Eine Inhibierung der schadensinduzierten Poly(ADP-Ribosyl)ierung, welche hauptsächlich durch PARP-1 katalysiert wird (Beneke & Bürkle 2007), könnte auf einer Verdrängung der Zinkionen aus den Zinkfingerstrukturen oder auf Oxidation von kritischen Thiolgruppen beruhen, was einen Funktionsverlust des Proteins bewirken könnte (Bossak et al. 2015; Hartwig et al. 2002). Dennoch scheint die Inhibierung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung durch Nickelionen keine schwerwiegenden Konsequenzen für die Reparatur der Einzelstrangbrüche zu haben, denn nach Inkubation mit NiCl<sub>2</sub> konnte keine verlangsamte Ligation der Einzelstrangbrüche detektiert werden. Im untersuchten Konzentrationsbereich war die Poly(ADP-Ribosyl)ierung nicht vollständig inhibiert, weshalb diese Ergebnisse nicht in Widerspruch stehen. Trotzdem kann auch eine partielle Inhibierung der PARP-1 zu genomischer Instabilität führen. Die Daten liefern Hinweise, dass zinkbindende Proteine, die an wichtigen DNA-Reparaturwegen beteiligt sind, sensitive Angriffspunkte für Nickelverbindungen darstellen. Damit tragen die Ergebnisse dieser Arbeit zum Verständnis der Nickel-induzierten Genotoxizität und Kanzerogenese bei.

Eine weitere mögliche Konsequenz der Akkumulation von ROS stellt die Aktivierung inflammatorischer Signalkaskaden dar. In zahlreichen Untersuchungen wurde gezeigt, dass durch die Aktivierung der redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 die Expression von pro-inflammatorischen Genen induziert wird (zusammengefasst in Fubini & Hubbard 2003; Guha & Mackman 2001; Tak et al. 2001). In BEAS-2B Zellen war nach Behandlung mit Nickelverbindungen die Transkriptmenge von *IL8* sowie *NF $\kappa$ B2* und *JUN* hochreguliert. Ebenfalls konnte eine erhöhte Sezernierung an IL-8 und IL-6 Zytokinen in Gegenwart von Nickelverbindungen beobachtet werden. In A549 Zellen blieben diese Reaktionen allerdings aus. Die bereits diskutierten Wirkungen von Nickelverbindungen können zytotoxische Folgen für die Zellen haben. Um den Zelltod nach Behandlung mit den Nickelverbindungen näher zu überprüfen, wurde die Zytotoxizität der Verbindungen mittels WST-Assay und Zellzahl bestimmt. Nickelverbindungen bewirkten in BEAS-2B Zellen starke zytotoxische Effekte, die sich in einer Abnahme der metabolischen Aktivität sowie einer verminderten Zellzahl äußerten. In A549 Zellen war die Abnahme der Viabilität nach Behandlung mit Nickelverbindungen deutlich weniger stark ausgeprägt. Mittels RT-qPCR Analyse konnten Veränderungen in der

Genexpression der Apoptose-assoziierten Gene detektiert werden. Hierbei war die Transkriptmenge von *NOXA* nach der Inkubation mit Nickelverbindungen in BEAS-2B signifikant erhöht, während andere pro- und anti-apoptische Gene keine Veränderungen aufwiesen. Jedoch muss hierbei beachtet werden, dass es sich bei BEAS-2B Zellen um eine Adenovirus-12 SV40 transformierte Zelllinie handelt und das Protein p53 wahrscheinlich inaktiviert vorliegt (Reddel et al. 1995; Lehman et al. 1993). In der Literatur ist beschrieben, dass die Expression von *NOXA* auch p53-unabhängig durch die Transkriptionsfaktoren HIF-1, p73 und E2F induziert werden kann (Dengler et al. 2014; Kim et al. 2004). Die Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren durch Nickelverbindungen wurde ebenfalls bereits wiederholt beschrieben, was eine plausible Erklärung für die Induktion von *NOXA* in BEAS-2B Zellen darstellt (Kasprzak 2003; Salnikow et al. 2003). Um die Ergebnisse aus der Genexpressionsanalyse zu verifizieren, wurde die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 untersucht. Nach Behandlung mit Nickelverbindungen war die Aktivität der Caspasen in BEAS-2B deutlich erhöht. In A549 Zellen konnten dagegen keine Veränderungen detektiert werden. Ob die eingeleitete Apoptose durch die Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 tatsächlich auf die erhöhte Expression von *NOXA* zurückzuführen ist, kann anhand der vorliegenden Daten nicht geklärt werden und benötigt weitere Untersuchungen.

Um der zu Beginn der Arbeit aufgestellten Frage nachzugehen, ob die zelluläre Aufnahme der Partikel im Vergleich zum wasserlöslichen  $\text{NiCl}_2$  zu einer höheren intrazellulären Nickelkonzentration führt, wurde mittels GF-AAS die Bioverfügbarkeit der Testsubstanzen untersucht. Obwohl in den meisten untersuchten biologischen Endpunkten die Wirkung von partikulären Nickelverbindungen schwächer ausgeprägt war, konnte in den Aufnahmestudien eine deutlich höhere intrazelluläre Nickelkonzentration im Vergleich zu löslichem  $\text{NiCl}_2$  detektiert werden. Ähnliche Effekte wurden auch in anderen humanen Zelllinien beobachtet (Schwerdtle & Hartwig 2006; Costa et al. 2001; Harnett et al. 1982). Wie in Abschnitt 5.1.10 beschrieben, wird das Löslichkeitsverhalten der partikulären Nickelverbindungen maßgeblich durch die physikochemischen Eigenschaften bestimmt. In Untersuchungen zur zeitabhängigen Löslichkeit der Partikel in künstlicher lysosomaler Flüssigkeit mit einem sauren pH-Wert von 4,5 - 5 (Midander et al. 2007) lagen im untersuchten Zeitraum von 24 h lediglich maximal 50% des Nickels gelöst vor. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Löslichkeit der Partikel in den Lysosomen den limitierenden Faktor für die intrazelluläre Konzentration von Nickelionen darstellt. Vermutlich müssten daher längere Inkubationszeiträume als 24 h getestet werden um die Konsequenzen der partikulären Nickelaufnahme in A549 und BEAS-2B Zellen in vollem Maße beobachten zu können.

Die Internalisierung von partikulären Verbindungen kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Über welchen Aufnahmeweg die Partikel aufgenommen werden, hängt von ihrer Größe und Ladung, aber auch von der verwendeten Zelllinie ab (Kettler et al. 2014; Limbach et al. 2005).

Durch den Einsatz von Endozytose Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass NiNP und NiONP sowohl über Makropinozytose als auch Clathrin- und Caveolea-vermittelte Endozytose aufgenommen und in den Lysosomen langsam gelöst werden, was mit dem postulierten Mechanismus von Muñoz und Costa (2012) übereinstimmt. Allerdings konnte die Nickelaufnahme durch die Inhibitoren nicht vollständig verhindert werden. Diese Befunde könnten entweder in einer mangelnden Effizienz der Inhibitoren oder in anderen Aufnahmemechanismen, die hier jedoch nicht untersucht wurden, begründet liegen. TEM Analysen könnten durchgeführt werden um beurteilen zu können, ob die Aufnahme von Partikeln mit den Inhibitoren vollständig verhindert werden konnte. Zwischen den Zelllinien konnten deutliche Unterschiede bei der Aufnahme der Nickelverbindungen beobachtet werden, die eventuell auf die unterschiedlich starke Degeneration von BEAS-2B und A549 Zellen zurückzuführen sind. Krebszellen, wie die A549 Zelllinie, verändern sich im Zuge der Kanzerogenese und weisen in vielen Prozessen nicht mehr die Eigenschaften von gesunden Zellen auf. Dabei kann die Zusammensetzung der Zellmembran sowie die Menge der verfügbaren Oberflächenrezeptoren, welche bei der Aufnahme von Partikeln eine wichtige Rolle spielen, stark variieren und die Partikelaufnahme beeinflussen (Kettler et al. 2014). In den verwendeten Zellkulturmedien waren unterschiedliche Mengen an Serumproteinen vorhanden. Diese könnten zusätzlich durch Adsorption an die Oberfläche der Partikel, Rezeptor-vermittelte Aufnahmemechanismen beeinträchtigen (Lesniak et al. 2012). Inwieweit diese Effekte bei der vorliegenden Arbeit eine Rolle gespielt haben, ist schwer zu beurteilen. Hierzu müssten Untersuchungen in An- und Abwesenheit von FKS oder definierten Proteinsupplementen durchgeführt werden.

In Hinblick auf die Relevanz der Daten für die toxikologische Bewertung der partikulären Nickelverbindungen müssen die *in vitro* Untersuchungen kritisch bewertet werden und können nicht ohne weiteres auf einen intakten Organismus mit viel höherer Komplexität übertragen werden. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass das verwendete Expositionsmodell in dieser Arbeit nicht die tatsächliche Exposition der Lunge reflektiert. Die eingesetzten Konzentrationen von 10 - 50 µg Ni/mL sind um ein Vielfaches höher als die tägliche Dosis einer beruflich exponierten Person. Ebenso stimmt die Proteinzusammensetzung der Lungenflüssigkeit (Surfactant) nicht mit dem Zellkulturmedium überein (Ruge et al. 2011; Schulze et al. 2011; Whitsett & Weaver 2002). Da sich in der vorliegenden Arbeit gezeigt hat, dass die Wirkung der Nickelverbindungen auch vom Proteinanteil im Zellkulturmedium abhängt, kann angenommen werden, dass die Interaktion der Partikel mit den Epithelzellen der Lunge unterschiedlich verläuft. Zudem wird das Agglomerationsverhalten von Nanopartikeln durch das Resuspendieren im Medium verändert, woraus eine andere Größenverteilung und somit eine unterschiedliche Depositions- und Aufnahmekinetik resultiert (Hinderliter et al. 2010). Um das Expositionsszenario *in vitro* möglichst an die Lunge anzupassen und Einflussfaktoren des Mediums zu vermindern, könnten in weiterführenden Studien Expositionen von Lungenzellen an der Luft-

Flüssigkeitsgrenzschicht erfolgen (Paur et al. 2011). Trotz der diskutierten Limitierungen demonstrieren die vorliegenden Untersuchungen, dass alle hier getesteten Verbindungen die gleichen molekularen Wirkmechanismen und zellulären Angriffspunkte aufweisen. Unter Berücksichtigung der Daten aus tierexperimentellen Inhalationsstudien, welche belegen, dass partikuläre Verbindungen eine bis zu 500-fach längere Retentionszeit in der Lunge aufweisen als lösliche Verbindungen (Dunnick et al. 1995), wird die Relevanz der Daten aus der vorliegenden Arbeit deutlich.

Um Arbeitnehmer vor Gesundheitsrisiken am Arbeitsplatz zu schützen, werden für krebserzeugende Stoffe entsprechend der Gefahrstoffverordnung (GefStoffV) Schutzmaßnahmen und Arbeitsplatzgrenzwerte (AGW) festgelegt. Derzeit werden Nickel und seine Verbindungen, ausgenommen metallisches Nickel, in die Kategorie 1: „Beim Menschen Krebs erzeugend“ eingestuft und unterliegen somit gemäß § 10 der GefStoffV besonderen Schutzmaßnahmen und AGW. Metallisches Nickel hingegen steht bislang nur unter dem Verdacht, krebserzeugend zu wirken (Kategorie 3) und unterliegt daher anderen Regularien. Eine Risikobewertung und AGW wurden bislang vom Ausschuss für Gefahrstoffe (AGS) für Nickel und seine Verbindungen noch nicht herausgegeben. Die vorliegenden Ergebnisse liefern starke Indizien dafür, dass nanoskalige partikuläre Nickelverbindungen, sowohl aus metallischem Nickel als auch aus Nickeloxid, ein hohes Risiko für den Menschen darstellen und daher ein dringender Bedarf für eine Risikobewertung vorliegt.

## 7. Literaturverzeichnis

- Abbas T. & Dutta A. (2009). P21 in Cancer: Intricate Networks and Multiple Activities. *Nature Reviews Cancer*, 9: 400–414.
- Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P. & Lomri A. (2007). Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases. *Joint Bone Spine*, 74: 324–329.
- Ahamed M. (2011). Toxic response of nickel nanoparticles in human lung epithelial A549 cells. *Toxicology in Vitro*, 25: 930–936.
- Allen G.C., Tucker P.M. & Wild R.K. (1979). Surface oxidation of nickel metal as studied by X-Ray photoelectron spectroscopy. *Oxidation of Metals*, 13: 223–236.
- Allen R.G. & Tresini M. (2000). Oxidative stress and gene regulation. *Free Radical Biology & Medicine*, 28: 463–499.
- Andersen A., Berge S.R., Engeland A. & Norseth T. (1996). Exposure to nickel compounds and smoking in relation to incidence of lung and nasal cancer among nickel refinery workers. *Occupational and Environmental Medicine*, 53: 708–713.
- Angerer J. & Lehnert G. (1990). Occupational chronic exposure to metals II. Nickel exposure of stainless steel welders - biological monitoring. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 62: 7–10.
- Arita A., Muñoz A., Chervona Y., Niu J., Qu Q., Zhao N., Ruan Y., Kiok K., Kluz T., Sun H., Clancy H.A., Shamy M. & Costa M. (2013). Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells of chinese nickel refinery workers with high exposures to nickel and control subjects. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 22: 261–269.
- Arnér E.S.J. & Holmgren A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry*, 267: 6102–6109.
- Aruoma O.I. (1998). Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75: 199–212.
- Asmuss M., Mullenders L.H., Eker A. & Hartwig A. (2000). Differential effects of toxic metal compounds on the activities of Fpg and XPA, two zinc finger proteins involved in DNA repair. *Carcinogenesis*, 21: 2097–2104.
- Bal W., Schwerdtle T. & Hartwig A. (2003). Mechanism of nickel assault on the zinc finger of DNA repair protein XPA. *Chemical Research in Toxicology*, 16: 242–248.
- Barañano D.E., Rao M., Ferris C.D. & Snyder S.H. (2002). Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *PNAS*, 99: 16093–16098.
- Barceloux D.G. (1999). Nickel. *Clinical Toxicology*, 37: 239–258.
- Barchowsky A., Soucy N. V., O'Hara K.A., Hwa J., Noreault T.L. & Andrew A.S. (2002). A novel pathway for nickel-induced interleukin-8 expression. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 24225–24231.
- Beneke S. (2012). Regulation of chromatin structure by poly(ADP-ribosyl)ation. *Frontiers in Genetics*, 3: 1–16.
- Beneke S. & Bürkle A. (2007). Poly-ADP-Ribosylierung. *BioSpektrum*, 5: 476–480.
- Benson J.M., Barr E.B., Bechtold W.E., Cheng Yung S., Dunnick J.K., Eastin W.E., Hobbs C.H.,

- Kennedy C.H. & Maples K.R. (1994). Fate of inhaled nickel oxide and nickel subsulfide in F344/N rats. *Inhalation Toxicology*, 6: 167–183.
- Berne B.J. & Pecora R. (2000). Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics. 3 edn., Dover Publications, New York.
- Berridge M. V, Herst P.M. & Tan A.S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11: 127–152.
- Beyersmann D. & Hartwig A. (2008). Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Archives of Toxicology*, 82: 493–512.
- Bishop G.M., Dringen R. & Robinson S.R. (2007). Zinc stimulates the production of toxic reactive oxygen species (ROS) and inhibits glutathione reductase in astrocytes. *Free Radical Biology & Medicine*, 42: 1222–1230.
- Borm P.J.A., Robbins D., Haubold S., Kuhlbusch T., Fissan H., Donaldson K., Schins R., Stone V., Kreyling W., Lademann J., Krutmann J., Warheit D. & Oberdorster E. (2006). The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Particle and Fibre Toxicology*, 3: 1–35.
- Bossak K., Goch W., Piątek K., Frączyk T., Poznański J., Bonna A., Keil C., Hartwig A. & Bal W. (2015). Unusual Zn(II) Affinities of Zinc Fingers of Poly(ADP-ribose) Polymerase 1 (PARP-1) Nuclear Protein. *Chemical Research in Toxicology*, 28: 191–201.
- Boverhof D.R. & David R.M. (2010). Nanomaterial characterization: considerations and needs for hazard assessment and safety evaluation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396: 953–961.
- Brunauer S., Emmett P.H. & Teller E. (1938). Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *Journal of the American Chemical Society*, 60: 309–319.
- Bunz F., Dutriaux A., Lengauer C., Waldman T., Zhou S., Brown J.P., Sedivy J.M., Kinzler K.W. & Vogelstein B. (1998). Requirement for p53 and p21 to Sustain G2 Arrest After DNA Damage. *Science*, 282: 1497–1501.
- Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J. & Wittwer C.T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum Information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55: 611–622.
- Buzea C., Pacheco I.I. & Robbie K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*, 2: MR17-R71.
- Caldecott K.W. (2003). XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair*, 2: 955–969.
- Caldecott K.W. (2007). Mammalian single-strand break repair: Mechanisms and links with chromatin. *DNA Repair*, 6: 443–453.
- Caldecott K.W. (2001). Mammalian DNA single-strand break repair: an X-ra(y)ted affair. *BioEssays*, 23: 447–455.
- Capasso L., Camatini M. & Gualtieri M. (2014). Nickel oxide nanoparticles induce inflammation and genotoxic effect in lung epithelial cells. *Toxicology Letters*, 226: 28–34.
- Cempel M. & Nikel G. (2006). Nickel: A review of its sources and environmental toxicology. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15: 375–382.
- Champion J.A. & Mitragotri S. (2006). Role of target geometry in phagocytosis. *PNAS*, 103: 4930–4934.
- Chen L.-F. & Greene W.C. (2004). Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5: 392–401.

- Chithrani B.D. & Chan W.C.W. (2007). Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Letters*, 7: 1542–1550.
- Cho W.-S., Duffin R., Poland C.A., Duschl A., Oostingh G.J., Macnee W., Bradley M., Megson I.L. & Donaldson K. (2012). Differential pro-inflammatory effects of metal oxide nanoparticles and their soluble ions in vitro and in vivo; zinc and copper nanoparticles, but not their ions, recruit eosinophils to the lungs. *Nanotoxicology*, 6: 22–35.
- Christensen O.B. & Lagesson V. (1988). Nickel Concentration of Blood and Urine After Oral Administration. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 11: 119–125.
- Conner S.D. & Schmid S.L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 422: 37–44.
- Costa M., Sutherland J.E., Peng W., Salnikow K., Broday L. & Kluz T. (2001). Molecular biology of nickel carcinogenesis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 222: 205–211.
- Coyle P., Philcox J.C., Carey L.C. & Rofe A.M. (2002). Metallothionein: The multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59: 627–647.
- Cronholm P., Karlsson H.L., Hedberg J., Lowe T.A., Winnberg L., Elihn K., Wallinder I.O. & Möller L. (2013). Intracellular Uptake and Toxicity of Ag and CuO Nanoparticles: A Comparison Between Nanoparticles and their Corresponding Metal Ions. *Small*, 9: 970–982.
- Cronholm P., Midander K., Karlsson H.L., Elihn K., Wallinder I.O. & Möller L. (2011). Effect of sonication and serum proteins on copper release from copper nanoparticles and the toxicity towards lung epithelial cells. *Nanotoxicology*, 5: 269–281.
- Cruz M.T., Gonçalo M., Figueiredo A., Carvalho A.P., Duarte C.B. & Lopes M.C. (2004). The contact sensitizer nickel sulphate activates the transcription factor NF- $\kappa$ B and AP-1 and induces the expression of nitric oxide in a skin dendritic cell line. *Experimental Dermatology*, 13: 18–26.
- D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva I. & Poirier G.G. (1999). Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *The Biochemical Journal*, 342: 249–268.
- Dally H. & Hartwig A. (1997). Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells. *Carcinogenesis*, 18: 1021–1026.
- Davidovic L., Vodenicharov M., Affar E.B. & Poirier G.G. (2001). Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism. *Experimental Cell Research*, 268: 7–13.
- Davidson T., Chen H., Garrick M.D., Angelo G.D. & Costa M. (2005). Soluble nickel interferes with cellular iron homeostasis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 279: 157–162.
- Dengler M.A., Weilbacher A., Gutekunst M., Staiger A.M., Vöhringer M.C., Horn H., Ott G., Aulitzky W.E. & van der Kuip H. (2014). Discrepant NOXA (PMAIP1) transcript and NOXA protein levels: a potential Achilles' heel in mantle cell lymphoma. *Cell Death and Disease*, 5: 1–10.
- Denkhaus E. & Salnikow K. (2002). Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 42: 35–56.
- Dick C.A.J., Brown D.M., Donaldson K. & Stone V. (2003). The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types. *Inhalation Toxicology*, 15: 39–52.
- Dickinson D.A. & Forman H.J. (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical Pharmacology*, 64: 1019–1026.

- Dilger M. (2011). Charakterisierung, Zytotoxizität und Genotoxizität von nanopartikulärem Nickel. Diplomarbeit, KIT.
- Ding J., He G., Gong W., Wen W., Sun W., Ning B.B., Huang S.S., Wu K., Huang C., Wu M., Xie W., Wang H., Hongyang & Wang H. (2009). Effects of nickel on cyclin expression, cell cycle progression and cell proliferation in human pulmonary cells. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 18: 1720–1729.
- Ding J., Zhang X., Li J., Song L., Ouyang W., Zhang D., Xue C., Costa M., Meléndez J.A. & Huang C. (2006). Nickel compounds render anti-apoptotic effect to human bronchial epithelial Beas-2B cells by induction of cyclooxygenase-2 through an IKKbeta/p65-dependent and IKKalpha- and p50-independent pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 281: 39022–39032.
- Ding R., Pommier Y., Kang V.H. & Smulson M. (1992). Depletion of poly(ADP-ribose) polymerase by antisense RNA expression results in a delay in DNA strand break rejoining. *Journal of Biological Chemistry*, 267: 12804–12812.
- Donaldson K., Stone V., Tran C.L., Kreyling W. & Borm P.J.A. (2004). Nanotoxicology. *Occupational and Environmental Medicine*, 61: 727–728.
- Dunnick J.K., Elwell M.R., Radovsky A.E., Benson J.M., Hahn F.F., Nikula K.J., Barr E.B. & Hobbs C.H. (1995). Comparative carcinogenic effects of nickel subsulfide, nickel oxide, or nickel sulfate hexahydrate chronic exposures in the lung. *Cancer Research*, 55: 5251–5256.
- El-Khamisy S.F., Masutani M., Suzuki H. & Caldecott K.W. (2003). A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Research*, 31: 5526–5533.
- EU-Kommission (2011). Empfehlung der Kommission v. 18. Okt. 2011 zur Definition von Nanomaterialien (Abl. L 275/38 v. 20.10.2011).
- Fahrer J., Kranaster R., Altmeyer M., Marx A. & Bürkle A. (2007). Quantitative analysis of the binding affinity of poly(ADP-ribose) to specific binding proteins as a function of chain length. *Nucleic Acids Research*, 35: 1–9.
- Ferrara N., Gerber H.-P. & LeCouter J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*, 9: 669–676.
- Feynman R.P. (1992). There's Plenty of Room at the Bottom. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 1: 60–66.
- Fisher A.E.O., Hochegger H., Takeda S. & Caldecott K.W. (2007). Poly(ADP-ribose) polymerase 1 accelerates single-strand break repair in concert with poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Molecular and Cellular Biology*, 27: 5597–5605.
- Flanagan R.S., Jaumouillé V. & Grinstein S. (2012). The Cell Biology of Phagocytosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 7: 61–98.
- Forti E., Salovaara S., Cetin Y., Bulgheroni A., Tessadri R., Jennings P., Pfaller W. & Prieto P. (2011). In vitro evaluation of the toxicity induced by nickel soluble and particulate forms in human airway epithelial cells. *Toxicology in Vitro*, 25: 454–461.
- Fu M., Wang C., Li Z., Sakamaki T. & Pestell R.G. (2004). Minireview: Cyclin D1: Normal and abnormal functions. *Endocrinology*, 145: 5439–5447.
- Fubini B. & Hubbard A. (2003). Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 34: 1507–1516.
- Funakoshi T., Inoue T., Shimada H. & Kojima S. (1997). The mechanisms of nickel uptake by

- rat primary hepatocyte cultures: role of calcium channels. *Toxicology*, 124: 21–26.
- Gartel A.L. & Tyner A.L. (2002). The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1: 639–649.
- Giard D.J., Aaronson S.A., Todaro G.J., Arnstein P., Kersey J.H., Dosik H. & Parks W.P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, 51: 1417–1423.
- Glauner B. (2012). Stromausschlussverfahren: Standardisierung der Vitalitätsbestimmung. *Biospektrum*, 4: 394–395.
- Goldstein J., Newbury D.E., Joy D.C., Lyman C.E., Echlin P., Lifshin E., Sawyer L. & Michael J.R. (2003). Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis. 3 end., Springer Science+Business Media, New York.
- Gorbet M.B. & Sefton M. V. (2005). Endotoxin: The uninvited guest. *Biomaterials*, 26: 6811–6817.
- Gozzelino R., Jeney V. & Soares M.P. (2010). Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 50: 323–354.
- Grimsrud T.K. & Andersen A. (2012). Unrecognized risks of nickel-related respiratory cancer among Canadian electrolysis workers. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 38: 503–515.
- Grimsrud T.K., Berge S.R., Haldorsen T. & Andersen A. (2005). Can Lung Cancer Risk Among Nickel Refinery Workers Be Explained by Occupational Exposures Other Than Nickel? *Epidemiology*, 16: 146–154.
- Grimsrud T.K., Berge S.R., Haldorsen T. & Andersen A. (2002). Exposure to Different Forms of Nickel and Risk of Lung Cancer. *American Journal of Epidemiology*, 156: 1123–1132.
- Gruner W. (1999). Determination of oxygen in oxides by carrier gas hot extraction analysis with simultaneous CO<sub>x</sub> detection. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 365: 597–603.
- Guadagnini R., Halamoda Kenzaoui B., Cartwright L., Pojana G., Magdolenova Z., Bilanicova D., Saunders M., Juillerat L., Marcomini A., Huk A., Dusinska M., Fjellsbø L.M., Marano F. & Boland S. (2013). Toxicity screenings of nanomaterials: challenges due to interference with assay processes and components of classic in vitro tests. *Nanotoxicology*, 9: 13–24.
- Guha M. & Mackman N. (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular Signalling*, 13: 85–94.
- Guo H., Wu B., Cui H., Peng X., Fang J., Zuo Z., Deng J., Wang X., Deng J., Yin S., Li J. & Tang K. (2014). NiCl<sub>2</sub>-Down-Regulated Antioxidant Enzyme mRNA Expression Causes Oxidative Damage in the Broiler's Kidney. *Biological Trace Element Research*, 162: 288–295.
- Haase H., Hebel S., Engelhardt G. & Rink L. (2015). The biochemical effects of extracellular Zn<sup>2+</sup> and other metal ions are severely affected by their speciation in cell culture media. *Metallomics*, 7: 102–111.
- Halliwell B. (1996). Antioxidants in Human Health and Disease. *Annual Reviews Nutrition*, 16: 33–50.
- Häring M., Rüdiger H., Demple B., Boiteux S. & Epe B. (1994). Recognition of oxidized abasic sites by repair endonucleases. *Nucleic Acids Research*, 22: 2010–2015.
- Harnett P.B., Robison S.H., Swartzendruber D.E. & Costa M. (1982). Comparison of protein, RNA, and DNA binding and cell-cycle-specific growth inhibitory effects of nickel compounds in cultured cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 64: 20–30.

- Hartmann M. & Hartwig A. (1998). Disturbance of DNA damage recognition after UV-irradiation by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells. *Carcinogenesis*, 19: 617–621.
- Hartwig A. (2010). Metalle. In: Toxikologie: Toxikologie der Stoffe - Band 2. Vohr H.-W. (ed), Wiley-VCH Verlag, Weinheim, pp 22–23.
- Hartwig A. (1996). Sensitive analysis of oxidative DNA damage in mammalian cells: use of the bacterial Fpg protein in combination with alkaline unwinding. *Toxicology Letters*, 88: 85–90.
- Hartwig A. (2013). Metal interaction with redox regulation: an integrating concept in metal carcinogenesis? *Free Radical Biology & Medicine*, 55: 63–72.
- Hartwig A., Asmuss M., Blessing H., Hoffmann S., Jahnke G., Khandelwal S., Pelzer A. & Bürkle A. (2002). Interference by toxic metal ions with zinc-dependent proteins involved in maintaining genomic stability. *Food and Chemical Toxicology*, 40: 1179–1184.
- Hartwig A., Klyszcz-Nasko H., Schlepegrell R. & Beyersmann D. (1993). Cellular damage by ferric nitrilotriacetate and ferric citrate in V79 cells: interrelationship between lipid peroxidation, DNA strand breaks and sister chromatid exchanges. *Carcinogenesis*, 14: 107–112.
- Hartwig A., Mullenders L.H.F., Schlepegrell R., Kasten U. & Detmar Beyersmann (1994). Nickel (II) Interferes with the Incision Step in Nucleotide Excision Repair in Mammalian Cells. *Cancer Research*, 54: 4045–4051.
- Hartwig A., Pelzer A., Asmuss M. & Bürkle A. (2003). Very low concentrations of arsenite suppress poly(ADP-ribosyl)ation in mammalian cells. *International Journal of Cancer*, 104: 1–6.
- Hartwig A. & Schwerdtle T. (2002). Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicology Letters*, 127: 47–54.
- Hassa P.O. & Hottiger M.O. (2008). The diverse biological roles of mammalian PARPs, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases. *Frontiers in Bioscience*, 13: 3046–3082.
- Herd H., Daum N., Jones A.T., Huwer H., Ghandehari H. & Lehr C.M. (2013). Nanoparticle geometry and surface orientation influence mode of cellular uptake. *ACS Nano*, 7: 1961–1973.
- Heuchel R., Radtke F., Georgiev O., Stark G., Aguet M. & Schaffner W. (1994). The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression. *EMBO Journal*, 13: 2870–2875.
- 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. *Particle and Fibre Toxicology*, 7: 1–20.
- Hirano S., Asamil T., Kodama N. & Suzuki K.T. (1994). Correlation between inflammatory cellular responses and chemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid following intratracheal instillation of nickel sulfate in rats Seishiro. *Archives of Toxicology*, 68: 444–449.
- Hoch R.C., Schraufstatter I.U. & Cochrane C.G. (1996). In vivo, in vitro, and molecular aspects of interleukin-8 and the interleukin-8 receptors. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 128: 134–145.
- Hoffmann A., Natoli G. & Ghosh G. (2006). Transcriptional regulation via the NF- $\kappa$ B signaling module. *Oncogene*, 25: 6706–6716.
- Hoffmann E., Dittrich-Breiholz O., Holtmann H. & Kracht M. (2002). Multiple control of interleukin-8 gene expression. *Journal of Leukocyte Biology*, 72: 847–855.

- Holleman A.F. & Wiberg N. (2002). Lehrbuch der Anorganischen Chemie. 102 edn., Walter de Gruyter, Berlin.
- Horie M., Fukui H., Nishio K., Endoh S., Kato H., Fujita K., Miyauchi A., Nakamura A., Shichiri M., Ishida N., Kinugasa S., Morimoto Y., Niki E., Yoshida Y. & Iwahashi H. (2011). Evaluation of acute oxidative stress induced by NiO nanoparticles in vivo and in vitro. *Journal of Occupational Health*, 53: 64–74.
- Hsiao I.-L. & Huang Y.-J. (2011). Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO nanoparticles toward human lung epithelial cells. *The Science of the Total Environment*, 409: 1219–1228.
- Huang K., Ma H., Liu J., Huo S., Kumar A., Wei T., Zhang X., Jin S., Gan Y., Wang P.C., He S., Zhang X. & Liang X.J. (2012). Size-dependent localization and penetration of ultrasmall gold nanoparticles in cancer cells, multicellular spheroids, and tumors in vivo. *ACS Nano*, 6: 4483–4493.
- IARC (1990). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Chromium, Nickel and Welding. IARC, Lyon, 49, pp 257–445.
- IARC (2011). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Nickel and Nickel Compounds. IARC, Lyon, 100C, pp 169–218.
- ISO (2008). ISO/TS 27687:2008 Nanotechnologien - Terminologie und Begriffe für Nanoobjekte - Nanopartikel, Nanofaser und Nanoplättchen.
- Ivanov A.I. (2008). Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful? In: Exocytosis and Endocytosis. Ivano A.I. (ed), Humana Press, Totowa, NJ, 440, pp 15–33.
- Jagtap P. & Szabó C. (2005). Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4: 421–440.
- Ji W., Yang L., Yu L., Yuan J., Hu D., Zhang W., Yang J., Pang Y., Li W., Lu J., Fu J., Chen J., Lin Z., Chen W. & Zhuang Z. (2008). Epigenetic silencing of O6-methylguanine DNA methyltransferase gene in NiS-transformed cells. *Carcinogenesis*, 29: 1267–1275.
- Jiang J., Oberdörster G. & Biswas P. (2008). Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research*, 11: 77–89.
- Johannes L., Parton R.G., Bassereau P. & Mayor S. (2015). Building endocytic pits without clathrin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 42: 311–321.
- Kadoya C., Ogami A., Morimoto Y., Myojo T., Oyabu T., Nishi K., Yamamoto M., Todoroki M. & Tanaka I. (2012). Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid Adhering to Lung Surfactant. *Industrial Health*, 50: 31–36.
- Kasprzak K. (2003). Nickel carcinogenesis. *Mutation Research*, 533: 67–97.
- Kasprzak K.S., Diwan B. a, Rice J.M., Misra M., Riggs C.W., Olinski R. & Dizdaroglu M. (1992). Nickel(II)-mediated oxidative DNA base damage in renal and hepatic chromatin of pregnant rats and their fetuses. Possible relevance to carcinogenesis. *Chemical Research in Toxicology*, 5: 809–815.
- Kasprzak K.S. & Hernandez L. (1989). Enhancement of hydroxylation and deglycosylation of 2'-deoxyguanosine by carcinogenic nickel compounds. *Cancer Research*, 49: 5964–5968.
- Kastan M.B. & Bartek J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 432: 316–323.
- Kawanishi S., Inoue S. & Yamamoto K. (1989). Site-specific DNA damage induced by nickel(II) ion in the presence of hydrogen peroxide. *Carcinogenesis*, 10: 2231–2235.

- Kawanishi S., Oikawa S., Inoue S. & Nishino K. (2002). Distinct mechanisms of oxidative DNA damage induced by carcinogenic nickel subsulfide and nickel oxides. *Environmental Health Perspectives*, 110: 789–791.
- Ke Q., Davidson T., Kluz T., Oller A. & Costa M. (2007). Fluorescent tracking of nickel ions in human cultured cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 219: 18–23.
- Kettler K., Veltman K., Meent D., Wezel A. & Hendriks A.J. (2014). Cellular uptake of nanoparticles as determined by particle properties, experimental conditions, and cell type. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33: 481–492.
- Kim I.-K., Stegeman R.A., Brosey C.A. & Ellenberger T. (2015). A Quantitative Assay Reveals Ligand Specificity of the DNA Scaffold Repair Protein XRCC1 and Efficient Disassembly of Complexes of XRCC1 and the Poly(ADP-ribose) Polymerase 1 by Poly(ADP-ribose) Glycohydrolase. *Journal of Biological Chemistry*, 290: 3775–3783.
- Kim J.-Y., Ahn H.-J., Ryu J.-H., Suk K. & Park J.-H. (2004). BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *The Journal of Experimental Medicine*, 199: 113–124.
- Kim M.Y., Zhang T. & Kraus W.L. (2005). Poly(ADP-ribosylation) by PARP-1: “PAR-laying” NAD<sup>+</sup> into a nuclear signal. *Genes & Development*, 19: 1951–1967.
- Koch A.E., Polverini P.J., Kunkel S.L., Harlow L.A., DiPietro L.A., Elnor V.M., Elnor S.G. & Strieter R.M. (1992). Interleukin-8 as a Macrophage-Derived Mediator of Angiogenesis. *Science*, 258: 1798.
- Kreyling W.G., Semmler-Behnke M. & Möller W. (2006). Health implications of nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 8: 543–562.
- Krezel A. & Bal W. (2004). Studies of zinc(II) and nickel(II) complexes of GSH, GSSG and their analogs shed more light on their biological relevance. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2: 293–305.
- Kroll A., Pillukat M.H., Hahn D. & Schnekenburger J. (2012). Interference of engineered nanoparticles with in vitro toxicity assays. *Archives of Toxicology*, 86: 1123–1136.
- Krueger I., Mullenders L.H.F. & Hartwig A. (1999). Nickel(II) increases the sensitivity of V79 Chinese hamster cells towards cisplatin and transplatin by interference with distinct steps of DNA repair. *Carcinogenesis*, 20: 1177–1184.
- Langelier M.-F. & Pascal J.M. (2013). PARP-1 mechanism for coupling DNA damage detection to poly(ADP-ribose) synthesis. *Current Opinion in Structural Biology*, 23: 134–143.
- Langelier M.F., Ruhl D.D., Planck J.L., Kraus W.L. & Pascal J.M. (2010). The Zn<sup>3</sup> domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) functions in both DNA-dependent poly(ADP-ribose) synthesis activity and chromatin compaction. *Journal of Biological Chemistry*, 285: 18877–18887.
- Lechner J.F. & LaVeck M.A. (1985). A serum-free method for culturing normal human bronchial epithelial cells at clonal density. *Journal of Tissue Culture Methods*, 9: 43–48.
- Lee-Chen S.F., Wang M.C., Yu C.T., Wu D.R. & Jan K.Y. (1993). Nickel chloride inhibits the DNA repair of UV-treated but not methyl methanesulfonate-treated Chinese hamster ovary cells. *Biological Trace Element Research*, 37: 39–50.
- Lehman T.A., Modali R., Boukamp P., Stanek J., Bennett W.P., Welsh J. a, Metcalf R.A., Stampfer M.R., Fusenig N. & Rogan E.M. (1993). P53 Mutations in Human Immortalized Epithelial Cell Lines. *Carcinogenesis*, 14: 833–839.
- Lesniak A., Fenaroli F., Monopoli M.P., Åberg C., Dawson K. a. & Salvati A. (2012). Effects of the presence or absence of a protein corona on silica nanoparticle uptake and impact on

- cells. *ACS Nano*, 6: 5845–5857.
- Li Y. & Zamble D.B. (2009). Nickel homeostasis and nickel regulation: an overview. *Chemical Reviews*, 109: 4617–4643.
- Liang R., Senturker S., Shi X., Bal W., Dizdaroglu M. & Kasprzak K.S. (1999). Effects of Ni(II) and Cu(II) on DNA interaction with the N-terminal sequence of human protamine P2: enhancement of binding and mediation of oxidative DNA strand scission and base damage. *Carcinogenesis*, 20: 893–898.
- Lide D.R. (2009). CRC Handbook of Chemistry and Physics. Lide D.R. (ed), CRC Press, Boca Raton.
- Liebermann D.A. & Hoffman B. (2008). Gadd45 in stress signaling. *Journal of Molecular Signaling*, 3: 1–8.
- Liebers V., Raulf-Heimsoth M. & Brüning T. (2008). Health effects due to endotoxin inhalation (review). *Archives of Toxicology*, 82: 203–210.
- Lim J., Yeap S.P., Che H.X. & Low S.C. (2013). Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. *Nanoscale Research Letters*, 8: 381–395.
- 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. *Environmental Science & Technology*, 39: 9370–9376.
- 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: 4158–4163.
- Lindl T., Lewandowski B., Schreyögg S. & Stäudte A. (2005). An evaluation of the in vitro cytotoxicities of 50 chemicals by using an electrical current exclusion method versus the neutral red uptake and MTT assays. *Alternatives to Laboratory Animals*, 33: 1–11.
- Liu X., Gurel V., Morris D., Murray D.W., Zhitkovich A., Kane A.B. & Hurt R.H. (2007). Bioavailability of Nickel in Single-Wall Carbon Nanotubes. *Advanced Materials*, 19: 2790–2796.
- Lu H., Shi X., Costa M. & Huang C. (2005). Carcinogenic effect of nickel compounds. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 279: 45–67.
- 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. *PNAS*, 105: 14265–14270.
- Macia E., Ehrlich M., Massol R., Boucrot E., Brunner C. & Kirchhausen T. (2006). Dynasore, a Cell-Permeable Inhibitor of Dynamamin. *Developmental Cell*, 10: 839–850.
- MAK (2001). Nickel and nickel compounds. In: The MAK Collection of Occupational Health and Safety. Deutsche Forschungsgemeinschaft (ed), vol 32, Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- Malvern Instruments (2012). Zetapotenzial - theoretische Grundlagen. Wissensdatenbank, Malvern Instruments Ltd.
- Manalo D.J., Rowan A., Lavoie T., Natarajan L., Kelly B.D., Ye S.Q., Garcia J.G.N., Semenza G.L. & Hif- H. (2005). Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Regulation*, 105: 659–669.
- Martello R., Mangerich A., Sass S., Dedon P.C. & Bürkle A. (2013). Quantification of Cellular Poly(ADP-ribosyl)ation by Stable Isotope Dilution Mass Spectrometry Reveals Tissue- and

- Drug-Dependent Stress Response Dynamics. *ACS Chemical Biology*, 8: 1567–1576.
- Maxwell P. & Salnikow K. (2004). HIF-1: An oxygen and metal responsive transcription factor. *Cancer Biology and Therapy*, 3: 29–35.
- Mayor S. & Pagano R.E. (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8: 603–612.
- Mazinanian N., Hedberg Y. & Wallinder I.O. (2013). Nickel release and surface characteristics of fine powders of nickel metal and nickel oxide in media of relevance for inhalation and dermal contact. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 65: 135–146.
- McMahon H.T. & Boucrot E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12: 517–533.
- Mercer J. & Helenius A. (2009). Virus entry by macropinocytosis. *Nature Cell Biology*, 11: 510–520.
- Midander K., Pan J., Wallinder I.O., Heim K. & Leygraf C. (2007a). Nickel release from nickel particles in artificial sweat. *Contact Dermatitis*, 56: 325–330.
- Midander K., Pan J., Wallinder I.O. & Leygraf C. (2007b). Metal release from stainless steel particles in vitro-influence of particle size. *Journal of Environmental Monitoring*, 9: 74–81.
- Monopoli M.P., Aberg C., Salvati A. & Dawson K.A. (2012). Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nature Nanotechnology*, 7: 779–786.
- Moroni M.C., Hickman E.S., Lazzerini Denchi E., Caprara G., Colli E., Cecconi F., Müller H. & Helin K. (2001). Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nature Cell Biology*, 3: 552–558.
- Müller E., Boiteux S., Cunningham R.P. & Epe B. (1990). Enzymatic recognition of DNA modifications induced by singlet oxygen and photosensitizers. *Nucleic Acids Research*, 18: 5969–5973.
- Müller R.H. (1996). Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Müller R.H. & Keck C.M. (2004). Drug Delivery to the Brain - Realization by Novel Drug Carriers. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 4: 471–483.
- Muñoz A. & Costa M. (2012). Elucidating the mechanisms of nickel compound uptake: a review of particulate and nano-nickel endocytosis and toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 260: 1–16.
- Nel A., Xia T., Mädler L. & Li N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311: 622–627.
- Nemec A.A., Leikauf G.D., Pitt B.R., Wasserloos K.J. & Barchowsky A. (2009). Nickel mobilizes intracellular zinc to induce metallothionein in human airway epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 41: 69–75.
- Neubauer N., Palomaeki J., Karisola P., Alenius H. & Kasper G. (2015). Size-dependent ROS production by palladium and nickel nanoparticles in cellular and acellular environments – An indication for the catalytic nature of their interactions. *Nanotoxicology*, 9: 1059–1066.
- Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch S. & Poltorak Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB Journal*, 13: 9–22.
- Nichols B.J. & Lippincott-Schwartz J. (2001). Endocytosis without clathrin coats. *Trends in Cell Biology*, 11: 406–412.
- Nienhaus G.U., Maffre P. & Nienhaus K. (2013). Studying the protein corona on nanoparticles

- by FCS. In: *Methods in Enzymology*. Abelson J.N. and Simon M.I. (eds), vol 519, Elsevier Inc., Amsterdam, pp 115–137.
- O'Reilly M.A. (2005). Redox Activation of p21Cip1/WAF1/Sdi1: A Multifunctional Regulator of Cell Survival and Death. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7: 108–118.
- Oberdörster G., Maynard A., Donaldson K., Castranova V., Fitzpatrick J., Ausman K., Carter J., Karn B., Kreyling W., Lai D., Olin S., Monteiro-Riviere N., Warheit D. & Yang H. (2005a). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and Fibre Toxicology*, 2: 1–35.
- Oberdörster G., Oberdörster E. & Oberdörster J. (2005b). Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environmental Health Perspectives*, 113: 823–839.
- Oberdörster G., Sharp Z., Atudorei V., Elder A., Gelein R., Kreyling W. & Cox C. (2004). Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhalation Toxicology*, 16: 437–445.
- Oda E., Ohki R., Murasawa H., Nemoto J., Shibue T., Yamashita T., Tokino T., Taniguchi T. & Tanaka N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, 288: 1053–1058.
- Ogami A., Morimoto Y., Myojo T., Oyabu T., Murakami M., Todoroki M., Nishi K., Kadoya C., Yamamoto M. & Tanaka I. (2009). Pathological features of different sizes of nickel oxide following intratracheal instillation in rats. *Inhalation Toxicology*, 21: 812–818.
- Oller A.R., Costa M. & Oberdörster G. (1997). Carcinogenicity assessment of selected nickel compounds. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 143: 152–166.
- Oshiro S., Nozawa K., Hori M., Zhang C., Hashimoto Y., Kitajima S. & Kawamura K. (2002). Modulation of iron regulatory protein-1 by various metals. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290: 213–218.
- Ouyang W., Zhang D., Li J., Verma U.N., Costa M. & Huang C. (2009). Soluble and insoluble nickel compounds exert a differential inhibitory effect on cell growth through IKK $\alpha$ -dependent cyclin D1 down-regulation. *Journal of Cellular Physiology*, 218: 205–214.
- Palmiter R.D. & Huang L. (2004). Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 447: 744–751.
- Panas A., Marquardt C., Nalcaci O., Bockhorn H., Baumann W., Paur H.-R., Mülhopt S., Diabaté S. & Weiss C. (2012). Screening of different metal oxide nanoparticles reveals selective toxicity and inflammatory potential of silica nanoparticles in lung epithelial cells and macrophages. *Nanotoxicology*, 7: 259–273.
- Patriarca M., Lyon T.D.B. & Fell G.S. (1997). Nickel metabolism in humans investigated with an oral stable isotope. *American Society for Clinical Nutrition*, 66: 616–621.
- Paur H.-R., Cassee F.R., Teeguarden J., Fissan H., Diabate S., Aufderheide M., Kreyling W.G., Hänninen O., Kasper G., Riediker M., Rothen-Rutishauser B. & Schmid O. (2011). In-vitro cell exposure studies for the assessment of nanoparticle toxicity in the lung—A dialog between aerosol science and biology. *Journal of Aerosol Science*, 42: 668–692.
- Pelkmans L. & Helenius A. (2002). Endocytosis via caveolae. *Traffic*, 3: 311–320.
- Pfaffl M.W. (2004). Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum*, 1: 92–95.
- Pietruska J.R., Liu X., Smith A., McNeil K., Weston P., Zhitkovich A., Hurt R. & Kane A.B. (2011). Bioavailability, intracellular mobilization of nickel, and HIF-1 $\alpha$  activation in human lung epithelial cells exposed to metallic nickel and nickel oxide nanoparticles.

---

*Toxicological Sciences*, 124: 138–148.

- Puck T.T., Marcus P.I. & Cieciura S.J. (1956). Clonal growth of mammalian cells in vitro; growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a feeder layer. *The Journal of Experimental Medicine*, 103: 273–283.
- Reddel R.R., De Silva R., Duncan E.L., Rogan E.M., Whitaker N.J., Zahra D.G., Ke Y., McMenamin M.G., Gerwin B.I. & Harris C.C. (1995). SV-40-induced immortalization and ras-transformation of human bronchial epithelial cells. *International Journal of Cancer*, 61: 199–205.
- Rejman J., Oberle V., Zuhorn I.S. & Hoekstra D. (2004). Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *The Biochemical Journal*, 377: 159–169.
- Rhee S.G., Yang K.-S., Kang S.W., Woo H.A. & Chang T.-S. (2005). Controlled Elimination of Intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Regulation of Peroxiredoxin, Catalase, and Glutathione Peroxidase via Post-translational Modification. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7: 619–626.
- Riley C.M. (2003). Quantitative shape measurements of distal volcanic ash. *Journal of Geophysical Research*, 108: 1–15.
- Rodriguez R.E., Misra M. & Kasprzak K.S. (1990). Effects of nickel on catalase activity in vitro and in vivo. *Toxicology*, 63: 45–52.
- Roediger B. & Weninger W. (2011). How nickel turns on innate immune cells. *Immunology and Cell Biology*, 89: 1–6.
- Rouleau M., Patel A., Hendzel M.J., Kaufmann S.H. & Poirier G.G. (2010). PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nature Reviews Cancer*, 10: 293–301.
- Ruge C.A., Kirch J., Cañadas O., Schneider M., Perez-Gil J., Schaefer U.F., Casals C. & Lehr C.-M. (2011). Uptake of nanoparticles by alveolar macrophages is triggered by surfactant protein A. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 7: 690–693.
- Ruh H., Kühl B., Brenner-Weiss G., Hopf C., Diabaté S. & Weiss C. (2012). Identification of serum proteins bound to industrial nanomaterials. *Toxicology Letters*, 208: 41–50.
- Salditt M., Braunstein S.N., Camerini-Otero R.D. & Franklin R.M. (1972). Structure and synthesis of a lipid-containing bacteriophage; X. Improved techniques for the purification of bacteriophage PM2. *Virology*, 48: 259–262.
- Salnikow K., Davidson T., Zhang Q., Chen L.C., Su W. & Costa M. (2003). The involvement of hypoxia-inducible transcription factor-1-dependent pathway in nickel carcinogenesis. *Cancer Research*, 63: 3524–3530.
- Salnikow K. & Kasprzak K.S. (2005). Ascorbate Depletion: A Critical Step in Nickel Carcinogenesis? *Environmental Health Perspectives*, 113: 577–584.
- Saran M. & Bors W. (1989). Oxygen radicals acting as chemical messengers: a hypothesis. *Free Radical Research Communications*, 7: 213–220.
- Schaumlöffel D. (2012). Nickel species: analysis and toxic effects. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 26: 1–6.
- Schmidt M., Raghavan B., Müller V., Vogl T., Fejer G., Tchaptchet S., Keck S., Kalis C., Nielsen P.J., Galanos C., Roth J., Skerra A., Martin S.F., Freudenberg M.A. & Goebeler M. (2010). Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nature Immunology*, 11: 814–819.
- Schofield C.J. & Ratcliffe P.J. (2005). Signalling hypoxia by HIF hydroxylases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338: 617–626.

- Schreiber V., Molinete M., Boeuf H., de Murcia G. & Ménissier-de Murcia J. (1992). The human poly(ADP-ribose) polymerase nuclear localization signal is a bipartite element functionally separate from DNA binding and catalytic activity. *EMBO Journal*, 11: 3263–3269.
- Schulze C., Kroll A., Lehr C.-M., Schäfer U.F., Becker K., Schnekenburger J., Schulze Isfort C., Landsiedel R. & Wohlleben W. (2008). Not ready to use - overcoming pitfalls when dispersing nanoparticles in physiological media. *Nanotoxicology*, 2: 51–61.
- Schulze C., Schaefer U.F., Ruge C.A., Wohlleben W. & Lehr C.M. (2011). Interaction of metal oxide nanoparticles with lung surfactant protein A. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 77: 376–383.
- Schwerdtle T., Hamann I., Jahnke G., Walter I., Richter C., Parsons J.L., Dianov G.L. & Hartwig A. (2007). Impact of copper on the induction and repair of oxidative DNA damage, poly(ADP-ribosylation) and PARP-1 activity. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51: 201–210.
- Schwerdtle T. & Hartwig A. (2006). Bioavailability and genotoxicity of soluble and particulate nickel compounds in cultured human lung cells. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, 37: 521–525.
- Schwerdtle T., Seidel A. & Hartwig A. (2002). Effect of soluble and particulate nickel compounds on the formation and repair of stable benzo[a]pyrene DNA adducts in human lung cells. *Carcinogenesis*, 23: 47–53.
- Semisch A. & Hartwig A. (2014). Copper Ions Interfere with the Reduction of the Water-Soluble Tetrazolium Salt-8. *Chemical Research in Toxicology*, 27: 169–171.
- Semisch A., Ohle J., Witt B. & Hartwig A. (2014). Cytotoxicity and genotoxicity of nano - and microparticulate copper oxide: role of solubility and intracellular bioavailability. *Particle and Fibre Toxicology*, 11: 1–16.
- Sen C.K. & Packer L. (1996). Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB Journal*, 10: 709–720.
- Shackelford R.E., Kaufmann W.K. & Paules R.S. (1999). Cell Cycle Control, Checkpoint Mechanisms, and Genotoxic Stress. *Environmental Health Perspectives*, 107: 5–24.
- Shaulian E. & Karin M. (2001). AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*, 20: 2390–2400.
- Shaulian E. & Karin M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nature Cell Biology*, 4: E131–E136.
- Sheikh M.S., Burns T.F., Huang Y., Wu G.S., Amundson S., Brooks K.S., Fornace A.J. & El-Deiry W.S. (1998). p53-dependent and -independent regulation of the death receptor KILLER/DR5 gene expression in response to genotoxic stress and tumor necrosis factor alpha. *Cancer Research*, 58: 1593–1598.
- Shweiki D., Itin A., Soffer D. & Keshet E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 359: 843–845.
- Siddiqui M.A., Ahamed M., Ahmad J., Majeed Khan M.A., Musarrat J., Al-Khedhairy A.A. & Alrokayan S.A. (2012). Nickel oxide nanoparticles induce cytotoxicity, oxidative stress and apoptosis in cultured human cells that is abrogated by the dietary antioxidant curcumin. *Food and Chemical Toxicology*, 50: 641–647.
- 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 Medicine*, 3: 1865–1876.
- Slee E.A., Adrain C. & Martin S.J. (1999). Serial killers: ordering caspase activation events in

- apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 6: 1067–1074.
- Smulders S., Kaiser J.-P., Zuin S., Van Landuyt K.L., Golanski L., Vanoirbeek J., Wick P. & Hoet P.H. (2012). Contamination of nanoparticles by endotoxin: evaluation of different test methods. *Particle and Fibre Toxicology*, 9: 41.
- Spurgeon S.L., Jones R.C. & Ramakrishnan R. (2008). High throughput gene expression measurement with real time PCR in a microfluidic dynamic array. *PLoS ONE*, 3: 1–7.
- Stopford W., Turner J., Cappellini D. & Brock T. (2003). Bioaccessibility testing of cobalt compounds. *Journal of Environmental Monitoring*, 5: 675–680.
- Studer A.M., Limbach L.K., Van Duc L., Krumeich F., Athanassiou E.K., Gerber L.C., Moch H. & Stark W.J. (2010). Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles. *Toxicology Letters*, 197: 169–174.
- Sunderman F.W. (1993). Biological monitoring of nickel in humans. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 19: 34–38.
- Suzuki K. (2006). Characterisation of airborne particulates and associated trace metals deposited on tree bark by ICP-OES, ICP-MS, SEM-EDX and laser ablation ICP-MS. *Atmospheric Environment*, 40: 2626–2634.
- Tak P.P., Firestein G.S., Tak P.P. & Firestein G.S. (2001). NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, 107: 7–11.
- Takahashi S., Takeda E., Kubota Y. & Okayasu R. (2000). Inhibition of Repair of Radiation-Induced DNA Double-Strand Breaks by Nickel and Arsenite. *Radiation Research*, 154: 686–691.
- Tang K., Li J., Yin S., Guo H., Deng J. & Cui H. (2014). Effects of Nickel Chloride on Histopathological Lesions and Oxidative Damage in the Thymus. *Health*, 6: 2875–2882.
- Taurozzi J.S., Hackley V.A. & Wiesner M.R. (2011). Ultrasonic dispersion of nanoparticles for environmental, health and safety assessment-issues and recommendations. *Nanotoxicology*, 5: 711–29.
- Thyssen J.P., Gawkrödger D.J., White I.R., Julander A., Menne T. & Liden C. (2013). Coin exposure may cause allergic nickel dermatitis: a review. *Contact Dermatitis*, 68: 3–14.
- Umweltbundesamt (2001). Nickel. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz 44:1243–1248.
- Unfried K., Albrecht C., Klotz L.-O., Von Mikecz A., Grether-Beck S. & Schins R.P.F. (2007). Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms. *Nanotoxicology*, 1: 52–71.
- Vance M.E., Kuiken T., Vejerano E.P., McGinnis S.P., Hochella M.F., Rejeski D. & Hull M.S. (2015). Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 6: 1769–1780.
- Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W., Li P.W., Mural R.J., Sutton G.G., Smith H.O., Zhu X. et al. (2001). The Sequence of the Human Genome. *Science*, 291: 1304–1351.
- 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. *Particle and Fibre Toxicology*, 4: 1–18.
- Vercauteren D., Vandenbroucke R.E., Jones A.T., Rejman J., Demeester J., De Smedt S.C., Sanders N.N. & Braeckmans K. (2010). The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: optimization and pitfalls. *American Society of Gene Therapy & Cell*

- Therapy*, 18: 561–569.
- Verma A. & Stellacci F. (2010). Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small*, 6: 12–21.
- Vousden K.H. & Lu X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Reviews Cancer*, 2: 594–604.
- Walkey C.D. & Chan W.C.W. (2012). Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chemical Society Reviews*, 41: 2780.
- Waugh D.J.J. & Wilson C. (2008). The Interleukin-8 Pathway in Cancer. *Clinical Cancer Research*, 14: 6735–6741.
- Wei L., Nakajima S., Hsieh C.-L., Kanno S., Masutani M., Levine A.S., Yasui A. & Lan L. (2013). Damage response of XRCC1 at sites of DNA single strand breaks is regulated by phosphorylation and ubiquitylation after degradation of poly(ADP-ribose). *Journal of Cell Science*, 126: 4414–4423.
- Welz B. & Sperling M. (1998). Atomic Absorption Spectrometry. 3 edn., Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- Whitehouse C.J., Taylor R.M., Thistlethwaite A., Zhang H., Karimi-Busheri F., Lasko D.D., Weinfeld M. & Caldecott K.W. (2001). XRCC1 Stimulates Human Polynucleotide Kinase Activity at Damaged DNA Termini and Accelerates DNA Single-Strand Break Repair. *Cell*, 104: 107–117.
- Whitsett J. & Weaver T. (2002). Hydrophobic surfactant proteins in lung function and disease. *New England Journal of Medicine*, 347: 2141–2148.
- Wiedemann C., Schulz H.L. & Weber B.H.F. (2004). Quantitative Real-Time PCR – Eine Frage der Normalisierung. *BioSpektrum*, 1: 99–102.
- Williams D.B. & Carter C.B. (2009). Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science. 2 edn., Springer Verlag, New York.
- Wohlleben W. (2012). Validity range of centrifuges for the regulation of nanomaterials: from classification to as-tested coronas. *Journal of Nanoparticle Research*, 14: 1300.
- Wong V.C., Morse J.L. & Zhitkovich A. (2013). p53 activation by Ni(II) is a HIF-1 $\alpha$  independent response causing caspases 9/3-mediated apoptosis in human lung cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 269: 233–9.
- Wu B., Cui H., Peng X., Fang J., Zuo Z., Deng J. & Huang J. (2013). Investigation of the serum oxidative stress in broilers fed on diets supplemented with nickel chloride. *Health*, 5: 454–459.
- Xie K. (2001). Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 12: 375–91.
- Xu Z., Ren T., Xiao C., Li H. & Wu T. (2011). Nickel promotes the invasive potential of human lung cancer cells via TLR4/MyD88 signaling. *Toxicology*, 285: 25–30.
- Yamamoto Y. & Gaynor R.B. (2001). Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 107: 135–142.
- Zhang L. & Fang B. (2005). Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene Therapy*, 12: 228–237.
- Zhang Q., Kusaka Y., Sato K., Mo Y., Fukuda M. & Donaldson K. (1998a). Toxicity of ultrafine nickel particles in lungs after intratracheal instillation. *Journal of Occupational Health*, 40:

171–176.

- Zhang Q., Kusaka Y., Sato K., Nakakuki K., Kohyama N. & Donaldson K. (1998b). Differences in the Extent of Inflammation Caused By Intratracheal Exposure To Three Ultrafine Metals: Role of Free Radicals. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 53: 423–438.
- Zhang Q., Kusaka Y., Zhu X., Sato K., Mo Y., Kluz T. & Donaldson K. (2003). Comparative toxicity of standard nickel and ultrafine nickel in lung after intratracheal instillation. *Journal of Occupational Health*, 45: 23–30.
- Zhao C.-M. & Wang W.-X. (2011). Importance of surface coatings and soluble silver in silver nanoparticles toxicity to *Daphnia magna*. *Nanotoxicology*, 6: 361–370.
- Zhuang Z., Shen X., Shen H., Ng V. & Ong C. (1996). DNA strand breaks and poly (ADP-ribose) nickel subsulfide in MRC-5 lung fibroblast polymerase activation induced by crystalline cells. *Human & Experimental Toxicology*, 15: 891–897.

## 8. Anhang

### A. Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
5-(N-Ethyl-N-Isoprpyl)-Amilorid (EIPA)	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)
2-Mercaptoethanol	Serva (Heidelberg, DE)
Albumin Fraktion V (BSA)	Merck (Darmstadt, DE)
Assay Loading Reagent (2-fach)	Fluidigm (San Francisco, USA)
Auranofin	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Bisbenzimid (Hoechst 33258)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
CasyTon®	Roche Diagnostics (Mannheim, DE)
Collagen	Roche (Basel, DE)
Coulter Isoton II Diluent	Beckman (Krefeld, DE)
DAPI staining solution (Cystain DNA/Protein)	Partec (Münster, DE)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
DNA Away	Molecular BioProducts (San Diego, USA)
DNA Binding Dye Sample Loading Reagent (20-fach)	Fluidigm (San Francisco, USA)
DNA suspension buffer	TEKnova (Hollister, USA)
Dulbecco's Modified Eagel's Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Dynamin I Inhibitor, Dynasore	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)
ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
Ethanol (96%, vergällt)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Exonuclease 1 (20 U/μl)	New England BioLabs (Frankfurt am Main, DE)
Exonuclease reaction buffer	New England BioLabs (Frankfurt am Main, DE)
FACS-Flow	BD (Heidelberg, DE)
Fibronectin	Roche (Basel, DE)
Formaldehyd (37%)	Roth (Karlsruhe, DE)
Fötale Kälberserum (FKS)	Invitrogen by Life Technologies (Darmstadt, DE)
Hydroxylapatit (high resolution)	Merck (Darmstadt, DE)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe, DE)
Katalase (bovine liver)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Milchpulver, blotting grade	Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumhydroxid Maßlösung (NaOH; 1 M)	Roth (Karlsruhe, DE)
Nickel AAS-Standard 1000 mg/L	Roth (Karlsruhe, DE)
Nickel(II)chlorid (≥ 99,9%, p.A.)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Nickel Nanocolor Küvettentest	Macherey-Nagel (Düren, DE)

Nickel Nanopartikel (< 100 nm; ≥ 99%)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Nickeloxid Nanopartikel (< 50 nm; ≥ 99,8%)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
NucleoSpin RNA II (RNA Isolation Kit)	Macherey-Nagel (Düren, DE)
LAL Reagent Water	Lonza (Basel, CH)
OptEIA™ IL-8 ELISA Kit	BD Biosciences (Heidelberg, DE)
OptEIA™ IL-6 ELISA Kit	BD Biosciences (Heidelberg, DE)
PageRuler Prestained Protein ladder	Fermentas, (St. Leon Rot, DE)
PCR Certified Water	TEKnova (Hollister, USA)
Primer	Eurofins (Hamburg, DE)
Primer (Gene Expression Design)	Fluidigm (San Francisco, USA)
qScript™ cDNA Synthesis Kit	Quanta Biosciences via VWR (Dresden, DE)
RNase Away	Molecular BioProducts (San Diego, USA)
Salzsäure Maßlösung (HCl; 0,1 und 4 M)	Roth (Karlsruhe, DE)
Salpetersäure Supra Qualität (69%)	Roth (Karlsruhe, DE)
SDS 10% Lösung	Applichem (Darmstadt, DE)
Soybean Trypsin Inhibitor (SBIT)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
SsoFastEvaGreen® Supermix with low ROX	BioRad (München, DE)
TaqMan® PreAmp Master-Mix (2-fach)	Life Technologies (Darmstadt, DE)
TE buffer (10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8.0)	TEKnova (Hollister, USA)
ToxinSensor™ TM Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit	Genscript (Piscataway, USA)
Trichloressigsäure (≥ 99 %, reinst)	Roth (Karlsruhe, DE)
Triton X-100 10% Lösung "BioUltra"	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Trypsin (10x)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Vectashield Mounting Medium (DAPI)	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
Wasserstoffperoxid Supra Qualität(30%)	Merck (Darmstadt, DE)
WST-8 Cell Counting Kit-8	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)

## B. Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
96-Well-Platten, transparent	TTP (Trasadingen, CH)
Blotting-Papier 1,5 mm	Roth (Karlsruhe, DE)
Deckglaser Ø 12 mm	Roth (Karlsruhe, DE)
Einmalküvetten Polystyrol (10 x 10 x 45 mm)	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Einmalspritzen, 1mL	Terumo (Eschborn, DE)
Einmalspritzen, 3 mL	Braun (Melsungen, DE)
Kapillarzellen (DTS 1061C)	Malvern Instruments (Worcestershire, UK)
Kryoröhrchen mit Innengewinde	Roth (Karlsruhe, DE)

Multipipettenspitzen (1; 5; 10 mL)	Eppendorf (Hamburg, DE)
Objekttrager superfrost	Roth (Karlsruhe, DE)
Parafilm	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Pipettenspitzen, pyrogenfrei, 1000 µL	Biostep (Jahnsdorf, DE)
Pipettenspitzen, pyrogenfrei, 200 µL	Biostep (Jahnsdorf, DE)
PVDF-Membran Amersham Hybond-P	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
Quarzküvette (10 mm)	Hellma (Müllheim, D)
Rollrandgläser mit Schnappdeckel (50 mL)	Roth (Karlsruhe, DE)
Zellkulturflaschen (25; 75; 150 cm <sup>2</sup> )	TTP (Trasadingen, CH)
Zellkulturschalen (22,1; 60,1; 9,2 cm <sup>2</sup> )	TTP (Trasadingen, CH)
Zentrifugenröhrchen (15; 50 mL)	Sarstedt (Nümbrecht, DE)

## C. Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Atomabsorptionsspektrometer PinAAcle 900T	Perkin Elmer (Rodgau, DE)
Autoklav D-150	Systec (Linden, DE)
Axio Imager Z2 und Axio Observer	Carl Zeiss (Oberkochen, DE)
Biomark HD System	Fluidigm (San Francisco, USA)
Blotting Kammer	peqlab (Erlangen, DE)
Brutschrank Heracell 150i	Thermo Scientific (Langenselbold, DE)
Chromatographieblock	Georg, Franz & Bose
Casy® TTC Cell Counter and Analyser System	Roche Diagnostics (Mannheim, DE)
Elektrophorese Kammer	peqlab (Erlangen, DE)
Geldokumentationsgerät Fujifilm LAS 3000	raytest (Straubenhardt, DE)
Heizschüttler MKR 13	HLC BioTech (Bovenden, DE)
Heizschüttler SH 26	CAT (Staufen, DE)
iCycler	BioRad (München, DE)
IFC Controlle HX	Fluidigm (San Francisco, USA)
LSRII Fortessa	BD Sciences (Heidelberg, DE)
Multikanalpipette (30-300 µL)	Eppendorf (Hamburg, DE)
Multikanalpipette (1-10 µL)	Mettler-Toledo (Gießen, DE)
Multipette®	Eppendorf (Hamburg, DE)
NanoQuant Platte	Tecan (Männedorf, CH)
PCR Workstation Pro	PeqLab (Erlangen, DE)
Plattenlesegerät Infinite M200 Pro	Tecan (Männedorf, CH)
Real-Time System CFX96	BioRad (Hercules, USA)
Reinstwasseranlage Milli-Q	Millipore (Darmstadt, DE)
Software AA Winlab32	Perkin Elmer (Rodgau, DE)

---

Software BD FACSDiva™	BD Sciences (Heidelberg, DE)
Software Data Collection	Fluidigm (San Francisco, USA)
Software GenEx	MultiD (Göteborg, SE)
Software IBM Statistics 19	SPSS Statistics (Chicago, USA)
Software Real-Time PCR Genetic Analysis	Fluidigm (San Francisco, USA)
Software Tecani-Control	Tecan (Crailsheim, DE)
Software ZEN	Carl Zeiss (Oberkochen, DE)
Sonifier® D-250	Branson (Danbury, USA)
Sterilbank HERAsafeKS	Thermo Scientific (Langenselbold, DE)
Ultraschallspitze Model 102C	Branson (Danbury, USA)
Zellzählgerät Coulter Z2	Beckman (Krefeld, DE)
Zentrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg, DE)
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus (Hanau, DE)
Zentrifuge Galaxy Mini	VWR International (Darmstadt, DE)
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus (Hanau, DE)
Vortex Genie 2T	Scientific Industries (New York, USA)

## D. Geräteeinstellungen

### DLS-Analyse

Tabelle 7: Parameter zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius und des Zetapotentials.

	DMEM mit 10% FKS	LHC-9
<b>Brechungsindex</b>	1,34	1,34
<b>Dielektrizitätskonstante</b>	77,59	68,84
<b>Dichte (g/cm<sup>3</sup>)</b>	1,00	1,00
<b>Viskosität (mPa·s)</b>	1,13	1,18

Tabelle 8: Geräteeinstellungen für DLS- und Zetapotentialmessungen.

Parameter	DLS	Zetapotential
<b>Probenviskosität</b>	Dispersant viscosity	-
<b>Temperatur</b>	20°C	20°C
<b>Äquilibrierungszeit</b>	20 s	20 s
<b>Messwinkel</b>	173°	-
<b>Anzahl Läufe</b>	50	automatisch 10-100
<b>Anzahl Messungen</b>	1	1
<b>Messdauer</b>	1 s	-
<b>Messposition</b>	1,25	automatisch
<b>Abschwächung</b>	automatisch	automatisch
<b>Analysemodell</b>	General purpose	automatisch
<b>mathematische Modell</b>	-	Smoluchowski
<b>Spannung</b>	-	automatisch

### AAS-Analyse

Tabelle 9: Temperaturprogramm am PinAAcle 900T Graphitrohr-AAS zur Bestimmung der Nickelkonzentration.

Schritt	Temperatur (°C)	Ramp Time	Hold Time	Gas Fluss (mL/min)	Gas
1	110	1	30	250	Argon
2	150	15	40	250	Argon
3	1100	10	20	250	Argon
4	2300	0	5	0	Argon
5	2500	1	5	250	Argon

Die Kalibrierung der AAS-Analyse erfolgte im Bereich von 4 – 12 µg/L Nickel (in 0,2%iger HNO<sub>3</sub>). Nach jeder sechsten Messung wurde eine neue Kalibrierkurve erstellt (Regressionskoeffizient  $\geq 0,995$ ). Um eventuelle Messfehler während der Analyse ausschließen zu können, wurde ein externer Standard mitgeführt, welcher mindestens zu 95% wiedergefunden wurde. Die Quantifizierung des Nickelgehalts der Probe erfolgte in Doppelbestimmung. Um Verluste während der Aufarbeitung auszuschließen, wurde bei jeder Versuchsreihe ein interner Standard mitgeführt. Die Wiederfindung lag bei  $92 \pm 5\%$ .

Die Nachweis-, die Erfassungsgrenze und die Bestimmungsgrenze wurden nach der Leerwertmethode gemäß DIN 32645 bestimmt. Hierfür wurden drei Blindwerte jeweils zehnmal vermessen. Aus den Daten konnten folgende Werte berechnet werden:

Nachweisgrenze: 0,35 µg/L Ni  
 Erfassungsgrenze: 0,71 µg/L Ni  
 Bestimmungsgrenze: 1,85 µg/L Ni

### Genexpressionsanalyse

Tabelle 10: Temperaturprogramm der cDNA-Synthese.

Temperatur (°C)	Zeit (min)
25	5
42	30
85	5
4	∞

Tabelle 11: Temperaturprogramm der Prä-Amplifikation.

Temperatur (°C)	Zeit (min)	
95	10	
95	15 sek	} 12x
60	4	
4	∞	

Tabelle 12: Analysenprogramm der Real-Time PCR.

Segment	Prozess	Temperatur (°C)	Zeit (sek)	Heizrate (°C/sek)
1	Thermisches Mischen	70	2400	5,5
		60	30	5,5
2	Hot Start	95	60	5,5
3	PCR (30 Zyklen)	96	5	5,5
		60	20	5,5
4	Schmelzkurvenanalyse	60	3	1
		60-95		1°C/3 sek

## E. Verwendete Lösungen und Puffer

### Löslichkeit der Partikel

**Künstliche alveoläre Flüssigkeit (AAF; pH 7,4)**  
(Studer et al. 2010)

- 0,0952 g/L MgCl<sub>2</sub>
- 6,0193 g/L NaCl
- 0,2982 g/L KCl
- 0,1420 g/L Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 0,0710 g/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 0,3676 g/L CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O
- 0,9526 g/L NaAcetat 2H<sub>2</sub>O
- 2,6043 g/L NaHCO<sub>3</sub>
- 0,0970 g/L NaCitrat 2H<sub>2</sub>O
- 0,1000 g/L Phosphatidylcholin  
gelöst in bidest. H<sub>2</sub>O

**Künstliche lysosomale Flüssigkeit**  
(ALF; pH 4,5 – 5)  
(Midander et al. 2007)

- 3,210 g/L NaCl
- 6,000 g/L NaOH
- 20,800 g/L Zitronensäure
- 0,1285 g/L CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O
- 0,0710 g/L di-Natriumhydrogenphosphat
- 0,0390 g/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 0,0476 g/L MgCl<sub>2</sub>
- 0,0590 g/L Glycin
- 0,0770 g/L Tri-Natriumcitrat-Dihydrat
- 0,0900 g NaTartat 2H<sub>2</sub>O
- 0,0850 g Natriumlactat

	0,0860 g Natriumpyruvat gelöst in bidest. H <sub>2</sub> O
<b><u>Zellkultur</u></b>	
<b>PBS (pH 7,4)</b>	0,1 M NaCl 0,0045 M KCl 0,007 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,003 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>PBS (10% FKS)</b>	50 mL FKS-Lösung in 450 mL PBS-Lösung
<b>PBS -T</b>	0,05% Tween in PBS
<b>PBS-EDTA (pH 7,4)</b>	0,1 M NaCl 0,0045 M KCl 0,007 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,003 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,5 mM EDTA
<b><u>Quantifizierung von DNA-Strangbrüchen</u></b>	
<b><u>mittels Alaklischer Entwindung</u></b>	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5 M	70,98 g/L
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,5 M	68,995 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5 M	87,09 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,5 M	68,05 g/L
EDTA 0,1 M (pH 8)	18,612 g/500 mL
TRIS 0,1 M (pH 8)	6,057 g/500 mL in bidest. H <sub>2</sub> O
Alkalische Lösung (pH 12,3) A549 und HeLa S3 Zellen	0,03 M NaOH 0,01 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,9 M NaCl
Alkalische Lösung (pH 11,8) BEAS-2B	0,014 M NaOH 0,01 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,9 M NaCl
Natriumphosphatpuffer (NaP-Puffer) 0,01 M (pH 6,9)	0,0051 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,0049 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Kaliumphosphatpuffer (KP-Puffer)	0,0765 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

0,15 M (pH 6,9)	0,0735 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Kaliumphosphatpuffer (KP-Puffer) 0,35 M (pH 6,9)	0,1785 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1715 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Kaliumphosphatpuffer (KP-Puffer) 0,5 M (pH 6,9)	0,255 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,245 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

**Bioverfügbarkeit****RIPA Puffer**

0,01 M Tris
0,15 M NaCl
0,001 M EDTA
1% Triton-X
1% Natriumdeoxychololat (DOC)
0,1 % SDS

**F. Pipettierschemata****Genexpressionsanalyse**

Tabelle 13: cDNA-Synthese Pipettierschema.

<b>Komponente</b>	<b>Gehalt/Volumen (µg/µL)</b>
RNA	1 µg
Reaktionsmix (5x)	4 µL
reverse Transkriptase	1 µL
Nuklease-freies Wasser	Endvolumen 20 µL

Tabelle 14: Pipettierschema zur Herstellung des Prä-Amplifikations-Mix.

<b>Komponente</b>	<b>Volumen/Reaktion (µL)</b>
TaqMan PreAmp Mix (2-fach)	2,5
500 nM gepoolte Primer	0,5
Wasser	0,75
cDNA	1,25

Tabelle 15: Pipettierschema zur Herstellung des Exonuklease-Mix.

<b>Komponente</b>	<b>Volumen (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
Reaktionspuffer (10-fach)	0,2
Exonuklease (20 U/ $\mu\text{l}$ )	0,4
Wasser	1,4

Tabelle 16: Pipettierschema zur Herstellung des Assay Mix Solution.

<b>Komponente</b>	<b>Volumen/Reaktion (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
Assay Loading Reagenz (2-fach)	25
DANN Suspension Puffer (1-fach)	22,5
Primer (100 $\mu\text{M}$ )	2,5

Tabelle 17: Pitettierschema zur Herstellung des Sample Mix Solution.

<b>Komponente</b>	<b>Volumen/Reaktion (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
SsoFast EvaGreen Supermix (2-fach)	2,5
DNA Binding Dye Sample	0,25
Loading reagent (20-fach)	
Proben aus dem Exonukleaseverdau	2,25

## G. Verwendete Primer

Tabelle 18: Übersicht über die untersuchten Gene, deren kodierte Proteine und die zugehörigen Primersequenzen.

Gen-symbol	Kodiertes Protein	Gen ID	RefSeq	Primersequenz 5' --> 3'
<b>ABCB1</b>	ATP-binding cassette, Multidrug resistance protein 1, ABCB1 = MDR1	5243	NM_000927.4	fwd:AACACCACTGGAGCATTGAC rev:ACAGCAAGCCTGGAACCTA
<b>ABCC1</b>	ATP-binding cassette, Multidrug resistance-associated protein 1, ABCC1 = MRP1	4363	NM_004996.3	fwd:CCTGTTCTCGGAAACCATCC rev:AAGGTGATCCTCGACAGGAA
<b>ACTB</b>	Actin, cytoplasmic 1	60	NM_001101.3	fwd:CCAACCGCGAGAAGATGAC rev:TAGCACAGCCTGGATAGCAA
<b>ADH1B</b>	Alcohol dehydrogenase 1B	125	NM_000668.5	fwd:GGTGGACATCAACAAGGACAA rev:CAACATAACAGGGAAGCCATCAT
<b>ALDH1A1</b>	Aldehyde dehydrogenase 1	216	NM_000689.4	fwd:CTGATGCCGACTTGGACAATG rev:ATACTTCTTAGCCCGCTCAACA
<b>APAF1</b>	Apoptotic peptidase activating factor 1	317	NM_181861.1	fwd:ACCGTCTCCGCATTCTGA rev:TCTGTAACACTCTTGTCTCTGGTT
<b>APEX1</b>	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1	328	NM_001641.3	fwd:ACTGTGCCTTCAAGAGACCAAATG rev:TCCTCATCGCCTATGCCGTAA
<b>ATM</b>	ATM serine/threonine kinase	472	NM_000051.3	fwd:TACCAAGCAGCATGGAGGAA rev:GATTCATGGTAACTGGTTCCTTCTAC
<b>ATR</b>	ATR serine/threonine kinase	545	NM_001184.3	fwd:CATTCAAAGCGCCACTGAA rev:CGCTGCTCAATGTCAAGAACA
<b>AXIN2</b>	Axin 2	8313	NM_004655.3	fwd:TGATAAGGTCCTGGCAACTCA rev:GCGTGGTCTCTGTCTCT
<b>B2M</b>	Beta-2-microglobulin	567	NM_004048.2	fwd:AAGATGAGTATGCCTGCCGTGT rev:TCTTCAAACCTCCATGATGCTGCT
<b>BAX</b>	BCL2-associated X protein	581	NM_004324.3	fwd:GGGTTGTCGCCCTTTTCTAC rev:TCTTGGATCCAGCCCAACA
<b>BBC3</b>	BCL2 binding component 3	674	NM_001127240.2	fwd:ACGACCTCAACGCACAGTA rev:ATGCTACATGGTGCAGAGAAAG
<b>BCL2</b>	B-cell CLL/lymphoma 2	254	NM_000633.2	fwd:TGACAGAGGATCATGCTGTACTTA rev:TCCAATTCCTTTGGATCTTTATTTC
<b>BCL2L1</b>	BCL2-like 1	598	NM_138578.1	fwd:CCTCTCCCGACCTGTGATAC rev:GGCTCAACCAGTCCATTGTC
<b>BRCA1</b>	breast cancer 1 susceptibility protein	672	NM_007294.3	fwd:GCTTGACACAGGTTTGGAGTATGC rev:GAGAGTTGGACACTGAGACTGGTT
<b>BRCA2</b>	breast cancer 2	675	NM_000059.3	fwd:ATGCAGCAGACCCAGCTTA

	susceptibility protein			rev:TCCATGGCCTTCCTAATTTCCA
<b>BTRC</b>	beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase	8945	NM_033637.3	fwd:GAGCAGTGGTCAGAGTCAGAT rev:ACACAAGTTCAGCAGCATAG
<b>CAT</b>	catalase	847	NM_001752.3	fwd:AGAAGTGCGGAGATTCAACAC rev:CCTCATTACAGCAGTTCACA
<b>CCND1</b>	cyclin D1, G1/S specific	595	NM_053056.2	fwd:AGAGGCGGAGGAGAACAAA rev:AGGGCGGATTGGAAATGAAC
<b>CDKN1A</b>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	1026	NM_000389.4	fwd:GCAGACCAGCATGACAGATTTCC rev:ACAAACTGAGACTAAGGCAGAAGA
<b>CDKN1B</b>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)	1027	NM_004064.4	fwd:AGGAAGCGACCTGCAACC rev:TTGGGGAACCGTCTGAAACA
<b>CDKN2B</b>	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)	1030	NM_004936.3	fwd:TTACGGCCAACGGTGGATTA rev:GGCATGCCCTTGTCTCC
<b>CYP1A1</b>	cytochrome P450 family 1	1543	NM_000499.3	fwd:AAACCAGTGGCAGATCAACC rev:AGGGGTGAGAAACCGTTCA
<b>DDB1</b>	damage-specific DNA binding protein 1, XPE = DDB1	1642	NM_001923.4	fwd:GGAGTCAATCACCTATCACAATGG rev:GGTATGTCAAGCACTCAGCAAT
<b>DDB2</b>	damage-specific DNA binding protein 2	1643	NM_000107.2	fwd:TCAAAGGGATTGGAGCTGGAG rev:GTGACCACCATTTCGGCTACTA
<b>DDIT3</b>	DNA-damage-inducible transcript 3	1649	NM_001195053.1	fwd:TTAAGTCTAAGGCACTGAG rev:GGTGTGGTGATGTATGAA
<b>E2F1</b>	E2F transcription factor 1	1869	NM_005225.2	fwd:AGCTCATTGCCAAGAAGTCCAA rev:TCCTGGGTCAACCCCTCAA
<b>EGFR</b>	epidermal growth factor receptor	27113	NM_201282.1	fwd:GAACCCCGAGGGCAAATACA rev:CACGAGCCGTGATCTGTCA
<b>EPHX1</b>	epoxide hydrolase 1	596	NM_000120.3	fwd CCACGACTTACACCAGAGGAT rev:AATCTCCACCTGCTTCTTCCA
<b>ERCC1</b>	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1	2067	NM_202001.2	fwd:GCCGACTGCACATTGATCC rev:TCCGCTGGTTTCTGCTCATA
<b>ERCC2</b>	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2, XPD = ERCC2	2068	NM_000400.3	fwd:TACCCCGAGCAGTTCTCCTA rev:CTGAGGGCATCTCCAGGAC
<b>ERCC4</b>	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 4, XPF = ERCC4	2072	NM_005236.2	fwd:CTTCTGGAATCTCTGAGAGCAA rev:GAGGTGCTGGAGTCAAGAAA
<b>ERCC5</b>	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5, XPG = ERCC5	2073	NM_000123.3	fwd:TTGATGGGGATGCTCCACTA rev:TGGAGTCACTGGACGCTAA
<b>FTH1</b>	Ferritin, heavy chain	2495	NM_002032.2	fwd:TTACCTGTCCATGTCTTAC rev:CATCACAGTCTGGTTTCT

<b>G6PD</b>	glucose-6-phosphate dehydrogenase	2539	NM_000402.4	fwd:GCCGTCACCAAGAACATTCA rev:CTCCCGAAGGGCTTCTCC
<b>GADD45A</b>	growth arrest and DNA-damage-inducible protein, alpha	1647	NM_001924.3	fwd:GCTCCTGCTCTTGGAGAC rev:CAGGATCCTTCCATTGAGATGAA
<b>GAPDH</b>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2597	NM_002046.5	fwd:ACACCATGGGGAAGGTGAAG rev:GTGACCAGGCGCCCAATA
<b>GCLC</b>	glutamate-cysteine ligase (catalytic subunit)	2729	NM_001498.3	fwd:TGGATGCCATGGGATTTGGAA rev:CTCAGATATACTGCAGGCTTGGAA
<b>GPX1</b>	glutathione peroxidase 1	2876	NM_201397.1	fwd:CACCCTCTCTTCGCCTTCC rev:GAGCTTGGGGTTCGGTCATAA
<b>GPX2</b>	glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)	2877	NM_002083.3	fwd:GCTTTCATTGCCAAGTCCTTCTAT rev:TCATTCTGACAGTTCTCCTGATGT
<b>GSR</b>	glutathione reductase	2936	NM_001195104.1	fwd:TTGCGTGAATGTTGGATGTGTA rev:ATGGGACTTGGTGAGATTGTTT
<b>GSTP1</b>	glutathione S-transferase pi 1	2950	NM_000852.3	fwd:CACCCTGTACCAGTCCAATACC rev:TCCTGCTGGTCCTTCCCATA
<b>GUSB</b>	glucuronidase, beta	2990	NM_000181.3	fwd:CATCGATGACATCACCGTCAC rev:ACAGGTTACTGCCCTTGACA
<b>HMOX1</b>	hemeoxygenase 1	3162	NM_002133.2	fwd:CAGTCAGGCAGAGGGTGATA rev:GCTCCTGCAACTCCTCAAA
<b>HPRT1</b>	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	3251	NM_000194.2	fwd:GCTTTCCTTGGTCAGGCAGTA rev:ACTTCGTGGGGTCTTTTTCAC
<b>HSPA1A</b>	heat shock 70kDa protein 1A	3303	NM_005345.5	fwd:TCCTGTGTTTGCAATGTTGAA rev:CTGCATGTAGAAACCGGAAAA
<b>IL8</b>	interleukin 8	3576	NM_000584.3	fwd:TTCAGAGACAGCAGAGCACAC rev:AAGTTCTTTAGCACTCCTTGGCA
<b>JUN</b>	Jun Proto-Oncogene (AP-1)	3725	NM_002228.3	fwd:AAGAACTCGGACCTCCTCAC rev:TGGATTATCAGGCGCTCCA
<b>KEAP1</b>	kelch-like ECH-associated protein 1	9817	NM_012289.3	fwd:AACTTCGCTGAGCAGATTGG rev:CGTAGAACCGTCGCTGTT
<b>LIG1</b>	DNA ligase I	3978	NM_000234.2	fwd:TGGGAAGTACCCGGACATCA rev:GCTTCGGTGTCCAGGATGAA
<b>LIG3</b>	DNA ligase III	3980	NM_013975.3	fwd:TCCAGGACTTCTTCCGAAA rev:CAGCAGCAGCTTCACTGTTA
<b>MAP3K5</b>	mitogen-activated protein kinase kinasekinase 5	4217	NM_005923.3	fwd:ATCATTCGGAAGGCGGTACA rev:ACTCTCAGATGCAAGGCTGAA
<b>MDM2</b>	E3 ubiquitin protein ligase MDM2 (proto-oncogene)	4193	NM_002392.5	fwd:CCATGATCTACAGGAAGTGGTA rev:GACACCTGTTCTCACTCACA
<b>MGMT</b>	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase	4255	NM_002412.3	fwd:TGTGAAATTCGGAGAAGTGA rev:GAGGATGGGGACAGGATT

<b>MLH1</b>	DNA mismatch repair protein, mutL homolog 1	4292	NM_0011676 18.1	fwd:CTTCACCCAGACTTTGCTACC rev:GGCATAGACCTTATCACTACTTCC
<b>MSH2</b>	DNA mismatch repair protein, mutS homolog 2	4436	NM_000251.2	fwd:CCAGCAGCAAAGAAGTGCTA rev:TGTTTCACCTTGGACAGGAAC
<b>MT1X</b>	metallothionein 1X	4501	NM_005952.3	fwd:ACCACGCTTTTCATCTGTCC rev:GAGCAGTTGGGGTCCATTTCC
<b>MT2A</b>	metallothionein 2A	4502	NM_005953.3	fwd:AACCTGTCCCGACTCTAG rev:GAAGTCGCGTTCCTTACA
<b>MYC</b>	MYC proto-oncogene protein	4609	NM_002467.4	fwd:GCCGCATCCACGAAACTTTG rev:GAGGCTGCTGGTTTTCCACTAC
<b>NAT1</b>	arylamine N-acetyltransferase 1	9	NM_000662.6	fwd:AGGAAGAAGCAGCAATCTGTCT rev:TCGGATCTGGTGTGAAGAATGT
<b>NFE2L2</b>	NF-E2-related factor 2, nuclear factor, erythroid 2-like 2 (Nrf2)	4780	NM_0011454 12.2	fwd:CAGTCAGCGACGGAAAGAGTA rev:GGGCAACCTGGGAGTAGTT
<b>NFKB1</b>	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1, p105 subunit	4790	NM_003998.3	fwd:AGAGTGCTGGAGTTCAGGATAAC rev:TGAAGGTGGATGATTGCTAAGTGT
<b>NFKB2</b>	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2, p100 subunit	4791	NM_0010774 94.3	fwd:CCTGACTTTGAGGGACTGTATC rev:GGCTAGATGCAAGGCTGTT
<b>NFKBIA</b>	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	4792	NM_020529.2	fwd:ACTTTCGAGGAAATACCC rev:GATAGAGGCTAAGTGTAGAC
<b>NQO1</b>	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	1728	NM_000903.2	fwd:TCGGACCTCTATGCCATGAAC rev:AAAGTTCGCAGGGTCCTTCA
<b>OGG1</b>	8-oxoguanine DNA glycosylase, HOGG1 = OGG1	4968	NM_002542.5	fwd:GTGTACTAGCGGATCAAGTATGGA rev:CAGTCGCACACCTTGAATT
<b>PARP1</b>	poly (ADP-ribose) polymerase 1	142	NM_001618.3	fwd:TTCTGGAGGACGACAAGGAA rev:GTTGCTACCGATCACCGTAC
<b>PCNA</b>	proliferating cell nuclear antigen	5111	NM_182649.1	fwd:TCTGAGGGCTTCGACACCTA rev:CATTGCCGCGCATTTTAGTA
<b>PLK3</b>	serine/threonine kinase, polo-like kinase 3	1263	NM_004073.2	fwd:ACTGTCCAGGTGAACTTC rev:GAAGCGAGGTAAGTACAAG
<b>PMAIP1</b>	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	5366	NM_021127.2	fwd:CAGTTGGAGGCTGAGGTTC rev:TCCTGAGTTGAGTAGCACACT
<b>POLB</b>	DNA polymerase beta	5423	NM_002690.2	fwd:AAGAAATTGCCTGGAGTAGGAACA rev:CAGATGGACCAATGCCACTAACT
<b>POLD1</b>	DNA polymerase delta 1 (catalytic subunit)	5424	NM_002691.3	fwd:AGCTGGTGGAGTCTAAGTACAC rev:GACGGAGTCAGTGTACCATA
<b>PPM1D</b>	protein phosphatase 1D (Mg2+/Mn2+ dependent)	8493	NM_003620.3	fwd:AGCCAGAACTTCCCAAGGAAA rev:ACTACACGATTACCCAGAC
<b>PRDX1</b>	peroxiredoxin 1	5052	NM_002574.3	fwd:GCCTTCCAGTTCCTGACAA

				rev:TTCGGCTGAATCTGAAGTCTTG
<b>RAD50</b>	DNA repair protein RAD50 (homolog ( <i>S. cerevisiae</i> ))	1011 1	NM_005732.3	fwd:TCCCTCCTGGAACCAAAGGAA rev:AGACGAATCTGGGCTCTCACA
<b>RAD51</b>	DNA repair protein RAD51 (recombinase)	5888	NM_002875.4	fwd:GGGAAGACCCAGATCTGTCA rev:ATGTACATGGCCTTTCCTTCAC
<b>RRM2B</b>	ribonucleotide reductase M2 B (TP53 inducible)	5048 4	NM_015713.4	fwd:CCTTGCGATGGATAGCAGATAGA rev:AGTCCTGGCATAAGACCTCTC
<b>SEPP1</b>	selenoprotein P 1 (plasma)	6414	NM_005410.2	fwd:AAACTGCTCTCTCACGACTCTC rev:AGGTGCTGATGTCCATGATTGT
<b>SIRT2</b>	NAD dependent protein deacetylase sirtuin 2	2293 3	NM_0011932 86.1	fwd:TCAAGCCAACCATCTGTCACTA rev:CTCCACCAAGTCCTCCTGTT
<b>SLC30A1</b>	solute carrier family 30 1 (zinc transporter = ZNT1)	7779	NM_021194.2	fwd:AGAAGTGGTGATACAGTGGAAGT rev:GGGTCAGGGAAACATGGATTC
<b>SOD1</b>	superoxide dismutase 1	6647	NM_000454.4	fwd:TGATCTCACTCTCAGGAGACCAT rev:ACCACAAGCCAAACGACTTC
<b>SOD2</b>	superoxide dismutase 2	6648	NM_0010244 66.1	fwd:AGGATCCACTGCAAGGAACA rev:GTGCTCCCACACATCAATCC
<b>SULT1A1</b>	sulfotransferase 1A (cytosolic)	6817	NM_001055.3	fwd:AAGTTCATGGTCGAGAAGTGT rev:ACGGTGGTGTAGTTGGTCATAG
<b>TFRC</b>	transferrin receptor 1	7037	NM_003234.2	fwd:CACCATCAAGCTGCTGAATGA rev:GCCTTACTATACGCCACATAACC
<b>TNFRSF10B</b>	tumor necrosis factor receptor superfamily member 10b	8795	NM_003842.4	fwd:GCACCACGACCAGAAACAC rev:ACAATCACCGACCTTGACCAT
<b>TP53</b>	tumor protein p53	7157	NM_000546.5	fwd:CGAGATGTTCCGAGAGCTGAAT rev:TTTATGGCGGGAGGTAGACTGA
<b>TXN</b>	thioredoxin	7295	NM_0012449 38.1	fwd:TTACAGCCGCTCGTCAGA rev:CCCACCTTTTGTCCCTTCTT
<b>TXNRD1</b>	thioredoxin reductase 1	7296	NM_003330.3	fwd:GCATCCCTGGTGACAAAGAA rev:CCAACAACCAGGGTCTTACC
<b>UGT1A1</b>	UDP glucuronosyltransferase 1A	5465 8	NM_000463.2	fwd:TCCCAGGAATTTGAAGCCTACAT rev:TCGTGTTGTTGCAAGATTCG
<b>VEGFA</b>	vascular endothelial growth factor A	7422	NM_0010253 66.2	fwd:TACATCTTCAAGCCATCC rev:CTGTAGGAAGCTCATCTC
<b>XIAP</b>	E3 ubiquitin protein ligase X-linked inhibitor of apoptosis	331	NM_001167.3	fwd:AGGAGTGTCTGGTAAGAACTACTG rev:GCATACTGTCTTTCTGAGCATTCA
<b>XPA</b>	DNA repair protein xerodermapigmentosum, complementation group A	7507	NM_000380.3	fwd:ACATCATTCAATGGGGTGATA rev:ACCCCAAACCTCAAGAGACC
<b>XPC</b>	DNA repair protein xerodermapigmentosum, complementation group C	7508	NM_004628.4	fwd:TAAAGGGGTCCATGAGGACACA rev:CTGGCTGGCTGCAGATGTTA
<b>XRCC5</b>	X-ray repair	7520	NM_021141.3	fwd:TGATTTGCTGGAGGACATTGAAAG

complementing defective  
repair in Chinese hamster  
cells 5

rev:AATCGGCTGCTGAGGTCA

## H. Ergänzende Daten

### Angaben zur Partikelinkubation

Tabelle 19: Dosisumrechnung gebräuchlicher Konzentrationsangaben in der Partikeltoxikologie.

<b>Ni (µg/mL)</b>	10	30	50	100	150
<b>Ni (µg/cm<sup>2</sup>)</b>	2	6	10	20	30

Tabelle 20: Angaben zu verwendeten Zellkultuschalen.

<b>Zellkulturschalen Fläche (cm<sup>2</sup>)</b>	60,1	22,1	9,2	0,335
<b>Zelldichte (cm<sup>2</sup>)</b>	16639	16652	16630	16638
<b>Volumen (cm<sup>2</sup>)</b>	0,2	0,2	0,2	0,3

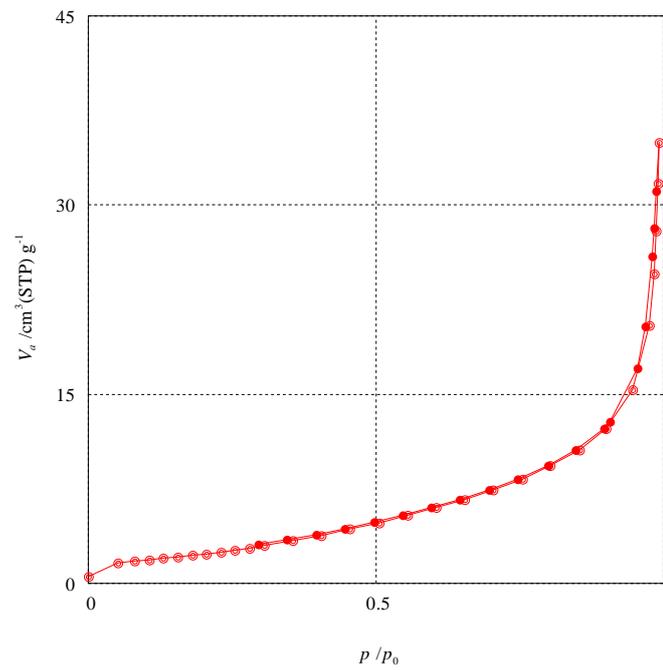
### Löslichkeitsuntersuchungen

Tabelle 21: Anhand der Löslichkeitsversuche berechneter freigesetzte Nickelgehalt in Abhängigkeit von der verwendeten Inkubationskonzentration.

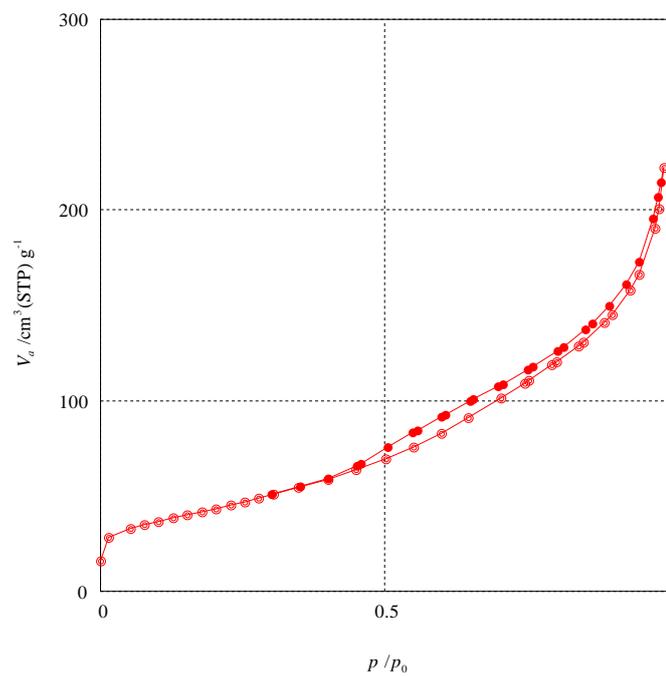
	<b>Ni (µg/mL)</b>	<b>10</b>	<b>30</b>	<b>50</b>
<b>NiNP</b>	<b>DMEM</b>	0,2	0,7	1,2
	<b>LHC-9</b>	0,2	0,7	1,1
<b>NiONP</b>	<b>DMEM</b>	2,5	7,5	12,5
	<b>LHC-9</b>	1,2	3,5	5,8

**Spezifische Oberfläche mittels BET-Analyse**

A)



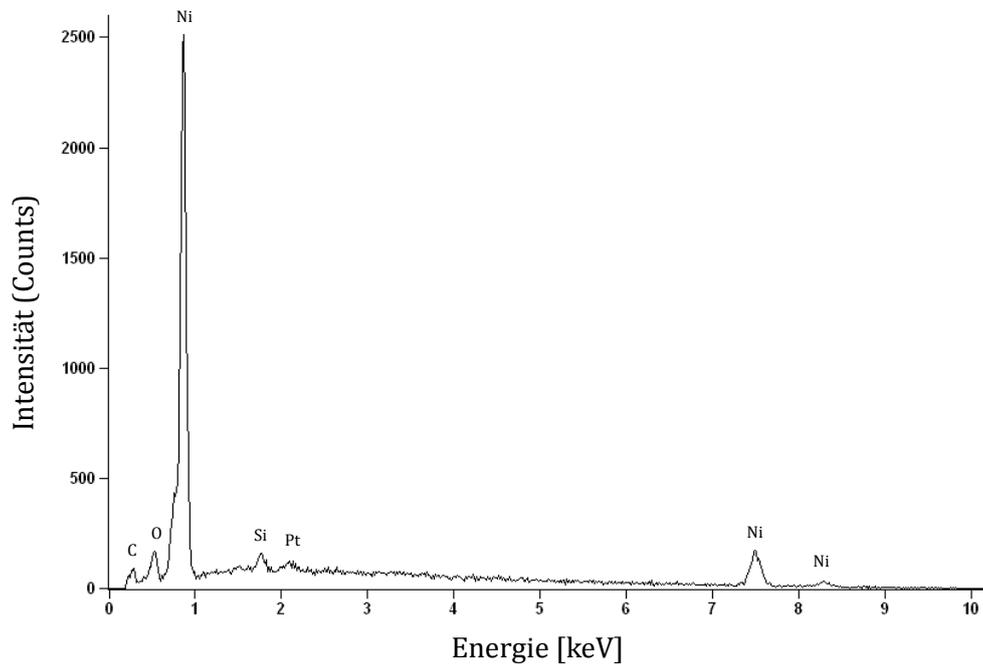
B)



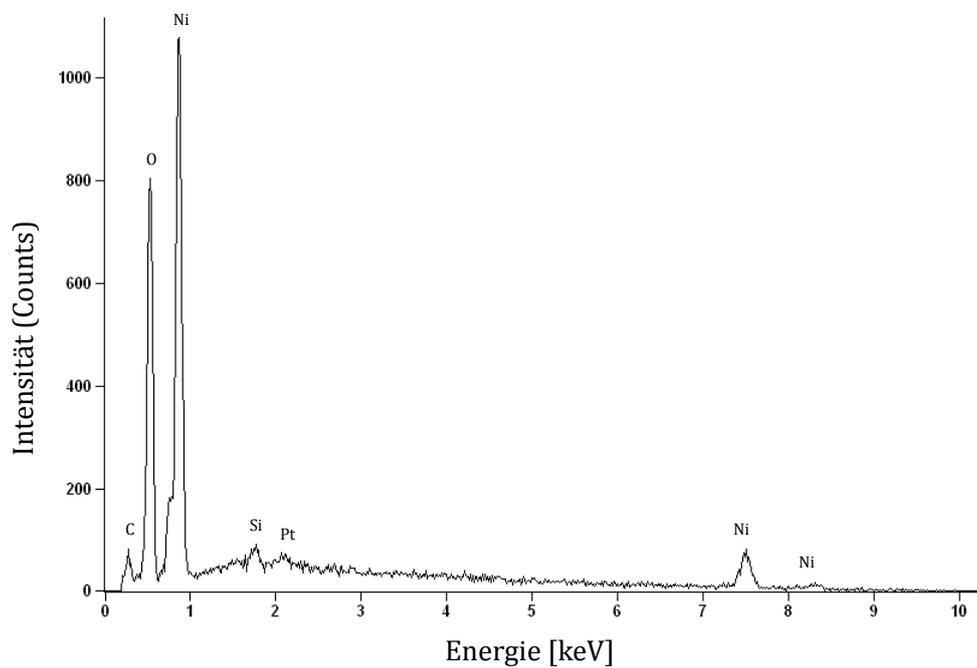
**Abbildung 29: BET Adsorptions- und Desorptionsisothermen von A) NiNP und B) NiONP.** Die partikulären Verbindungen wurden bei 300°C für 2 h unter Vakuum getrocknet und analysiert.

**Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)**

A)



B)



**Abbildung 30: EDX-Spektren der A) NiNP und B) NiONP.** Für die Analyse wurden die Partikel in Wasser resuspendiert, auf einen Siliziumwafer aufgegeben, getrocknet, zur Erhöhung der Leitfähigkeit mit Platin (Pt) überzogen und analysiert.

## Genexpressionsanalyse

Tabelle 22: Ausführliche Genexpressionsdaten in BEAS-2B Zellen nach 6 h Inkubation mit NiCl<sub>2</sub>, NiNP und NiONP als log2-fache Regulation relativ zur Kontrolle.

	NC		NiCl <sub>2</sub> (µg Ni/mL)						NiNP (µg Ni/mL)						NiONP (µg Ni/mL)					
	0	SD	10	SD	30	SD	50	SD	10	SD	30	SD	50	SD	10	SD	30	SD	50	SD
<i>ABCC1</i>	0,00	0,04	0,19	0,42	0,22	0,35	0,26	0,45	-0,42	0,67	-0,52	0,95	-0,41	0,51	-0,14	0,51	-0,32	0,57	-0,08	0,47
<i>APAF1</i>	0,00	0,05	0,05	0,17	0,35	0,57	0,30	0,28	0,03	0,63	-0,21	0,81	0,19	0,58	0,07	0,39	0,06	0,53	0,00	0,34
<i>APEX1</i>	0,00	0,03	-0,21	0,25	-0,31	0,25	-0,38	0,27	-0,09	0,34	-0,11	0,30	-0,19	0,31	-0,06	0,29	-0,26	0,13	-0,45	0,20
<i>ATM</i>	0,00	0,03	-0,21	0,13	-0,01	0,28	-0,16	0,25	-0,21	0,11	-0,24	0,16	-0,22	0,13	-0,16	0,08	-0,25	0,11	0,01	0,26
<i>ATR</i>	0,00	0,04	-0,30	0,56	-0,09	0,34	-0,16	0,59	0,40	0,93	0,71	1,39	0,26	0,67	-0,02	0,49	0,25	0,59	0,16	0,57
<i>BAX</i>	0,00	0,03	-0,41	0,51	-0,19	0,05	-0,30	0,30	-0,06	0,27	-0,31	0,13	-0,19	0,15	-0,15	0,20	-0,06	0,08	-0,16	0,19
<i>BCL2</i>	0,00	0,10	-0,55	0,13	-0,36	0,28	-0,20	0,40	-0,35	0,36	0,05	0,89	-0,47	0,18	-0,67	0,20	-0,36	0,14	-0,51	0,27
<i>BCL2L1</i>	0,00	0,05	-0,71	0,32	-0,64	0,10	-0,76	0,38	-0,80	0,26	-1,41	0,39	-0,87	0,28	-0,90	0,31	-0,88	0,05	-1,15	0,28
<i>BRCA1</i>	0,00	0,08	-0,30	0,19	-0,78	0,09	-1,03	0,38	-0,23	0,13	-0,51	0,15	-0,26	0,10	-0,33	0,10	-0,39	0,09	-0,55	0,13
<i>BRCA2</i>	0,00	0,03	-0,25	0,33	-0,17	0,14	-0,28	0,34	0,01	0,37	0,02	0,45	0,04	0,32	-0,05	0,26	0,01	0,35	0,08	0,41
<i>BTRC</i>	0,00	0,07	-0,51	0,14	-0,66	0,25	-0,73	0,26	-0,46	0,26	-0,64	0,22	-0,40	0,17	-0,48	0,07	-0,42	0,14	-0,65	0,13
<i>CAT</i>	0,00	0,05	-0,24	0,17	-0,34	0,31	-0,35	0,37	-0,02	0,54	0,15	0,76	-0,13	0,36	-0,15	0,39	-0,25	0,34	-0,34	0,23
<i>CCND1</i>	0,00	0,13	0,19	0,37	0,18	0,26	0,10	0,32	-0,25	0,35	-0,27	0,33	-0,28	0,20	-0,06	0,16	-0,05	0,10	0,07	0,15
<i>CDKN1A1</i>	0,00	0,14	-0,22	0,18	-0,18	0,30	-0,64	0,14	-0,52	1,31	0,17	0,55	0,07	0,35	0,14	0,53	0,11	0,36	0,00	0,44
<i>CDKN1B</i>	0,00	0,05	-0,25	0,08	-0,12	0,13	-0,03	0,04	-0,05	0,18	0,03	0,21	-0,19	0,09	-0,11	0,06	-0,23	0,02	-0,03	0,08
<i>CDKN2B</i>	0,00	0,07	-0,25	0,29	-0,53	0,51	-0,69	0,30	-0,77	0,17	-0,50	0,44	-0,58	0,47	-0,32	0,52	-0,44	0,43	-0,25	0,81
<i>DDB1</i>	0,00	0,08	-0,10	0,09	-0,25	0,11	-0,39	0,18	-0,50	0,45	-0,79	0,53	-0,45	0,28	-0,23	0,13	-0,48	0,25	-0,76	0,28
<i>DDB2</i>	0,00	0,22	-0,12	0,17	-0,23	0,20	-0,47	0,12	-0,39	0,40	-0,41	0,09	-0,25	0,13	-0,02	0,41	-0,29	0,06	-0,33	0,27
<i>E2F1</i>	0,00	0,06	-0,50	0,45	-0,57	0,27	-0,67	0,37	-0,65	0,32	-0,71	0,09	-0,44	0,19	-0,46	0,38	-0,52	0,10	-0,66	0,23
<i>EGFR</i>	0,00	0,05	-0,19	0,28	0,25	0,14	0,20	0,14	-0,20	0,30	-0,39	0,34	-0,07	0,18	-0,14	0,09	-0,03	0,13	-0,09	0,14
<i>EPHX1</i>	0,00	0,02	-0,17	0,11	-0,24	0,07	-0,12	0,09	-0,36	0,05	-0,44	0,18	-0,43	0,15	-0,29	0,15	-0,38	0,11	-0,27	0,07
<i>ERCC1</i>	0,00	0,04	-0,09	0,21	-0,15	0,17	-0,29	0,22	0,16	0,34	0,31	0,62	0,18	0,32	0,08	0,30	0,08	0,19	-0,04	0,21
<i>ERCC2</i>	0,00	0,08	-0,28	0,09	-0,68	0,15	-1,06	0,31	-0,92	0,57	-1,16	0,69	-0,73	0,21	-0,53	0,22	-0,73	0,21	-0,81	0,15

<b>ERCC4</b>	0,00	0,03	-0,07	0,06	-0,04	0,19	-0,06	0,12	-0,08	0,37	0,14	0,38	-0,03	0,18	0,00	0,16	-0,02	0,27	0,21	0,23
<b>ERCC5</b>	0,00	0,09	-0,05	0,13	-0,12	0,16	-0,17	0,12	-0,16	0,12	-0,11	0,18	-0,11	0,20	0,04	0,17	-0,15	0,20	0,09	0,25
<b>FTH1</b>	0,00	0,19	-0,59	0,54	-0,19	0,67	0,38	0,39	0,09	0,27	0,08	0,21	0,03	0,33	-0,44	0,24	0,18	0,15	-0,13	0,27
<b>G6PD</b>	0,00	0,08	-0,07	0,09	-0,06	0,18	-0,15	0,17	-0,50	0,26	-0,40	0,24	-0,35	0,18	-0,18	0,21	-0,27	0,10	-0,04	0,13
<b>GADD45A</b>	0,00	0,43	0,18	0,29	0,47	0,25	0,34	0,07	0,14	1,07	0,80	1,25	0,39	0,59	0,38	0,73	0,53	0,62	0,23	0,55
<b>GCLC</b>	0,00	0,03	-0,31	0,60	0,90	0,26	1,39	0,34	-0,22	0,21	-0,46	0,20	-0,20	0,17	-0,34	0,38	-0,24	0,15	-0,39	0,18
<b>GPX1</b>	0,00	0,06	-0,21	0,39	-0,19	0,37	-0,39	0,39	0,02	0,27	0,04	0,49	0,10	0,35	-0,01	0,52	0,07	0,34	0,03	0,38
<b>GSR</b>	0,00	0,11	-0,55	0,25	-0,15	0,05	0,12	0,33	-0,53	0,14	-0,80	0,19	-0,54	0,14	-0,60	0,13	-0,54	0,09	-0,61	0,10
<b>GSTP1</b>	0,00	0,07	-0,12	0,27	0,03	0,19	-0,06	0,26	-0,07	0,16	0,09	0,40	0,02	0,31	0,03	0,35	0,04	0,18	-0,11	0,17
<b>HMOX1</b>	0,00	0,19	1,90	0,10	3,51	0,10	3,78	0,55	0,92	0,85	1,43	0,25	1,59	0,22	1,58	0,15	1,77	0,06	2,18	0,07
<b>HSP1A1</b>	0,00	0,02	-0,21	0,19	0,79	1,46	0,81	1,47	0,46	0,96	1,29	1,45	0,44	0,58	0,37	0,34	0,47	0,73	0,85	0,63
<b>IL8</b>	0,00	0,04	0,71	0,20	1,12	0,38	1,19	0,16	1,00	0,56	0,96	0,35	0,73	0,20	0,66	0,17	0,57	0,25	0,52	0,37
<b>JUN</b>	0,00	0,02	0,90	0,68	1,44	1,02	1,34	0,87	0,75	1,28	0,82	0,99	1,17	0,98	0,97	0,77	1,18	0,84	1,15	0,63
<b>KEAP1</b>	0,00	0,04	-0,14	0,11	-0,15	0,25	-0,14	0,29	-0,71	0,59	-0,91	0,77	-0,55	0,47	-0,35	0,16	-0,39	0,16	-0,31	0,18
<b>LIG1</b>	0,00	0,06	-0,21	0,36	-0,20	0,09	-0,32	0,26	-0,20	0,26	-0,40	0,11	-0,18	0,20	-0,26	0,19	-0,13	0,09	-0,28	0,27
<b>LIG3</b>	0,00	0,09	-0,33	0,20	-0,52	0,12	-0,78	0,27	-0,37	0,23	-0,43	0,14	-0,22	0,17	-0,38	0,23	-0,24	0,17	-0,31	0,24
<b>MAP3K5 (ASK1)</b>	0,00	0,08	-0,15	0,16	-0,30	0,06	-0,37	0,12	0,15	0,45	-0,08	0,21	-0,03	0,12	-0,07	0,18	-0,15	0,06	-0,27	0,01
<b>MDM2</b>	0,00	0,04	0,11	0,09	0,12	0,13	-0,12	0,24	-0,15	1,06	0,45	0,52	0,13	0,29	0,31	0,35	0,23	0,43	0,40	0,42
<b>MGMT</b>	0,00	0,08	-0,08	0,11	-0,15	0,23	-0,08	0,20	-0,06	0,36	0,24	0,43	-0,12	0,26	0,08	0,17	-0,07	0,24	0,02	0,13
<b>MLH1</b>	0,00	0,08	-0,33	0,35	-0,30	0,05	-0,32	0,34	-0,33	0,21	-0,59	0,10	-0,18	0,15	-0,33	0,21	-0,22	0,09	-0,46	0,24
<b>MSH2</b>	0,00	0,04	-0,29	0,12	-0,44	0,30	-0,63	0,26	0,22	0,81	0,74	1,29	0,00	0,53	0,03	0,38	0,02	0,50	0,06	0,35
<b>MT1X</b>	0,00	0,05	1,55	0,17	2,07	0,28	2,08	0,33	0,77	0,26	1,05	0,86	0,71	0,24	0,42	0,11	0,69	0,01	0,44	0,14
<b>MT2A</b>	0,00	0,07	0,40	0,83	0,12	1,21	0,33	0,84	-0,07	0,48	0,24	0,30	-0,07	0,40	-0,39	0,60	0,14	0,34	-0,14	0,46
<b>MYC</b>	0,00	0,06	0,06	0,23	0,37	0,53	0,48	0,34	-0,35	0,57	-0,42	0,52	-0,18	0,47	-0,13	0,27	-0,23	0,51	-0,25	0,44
<b>NAT1</b>	0,00	0,13	-0,41	0,28	-0,40	0,29	-0,45	0,53	-0,09	0,39	-0,08	0,54	-0,21	0,22	-0,19	0,33	-0,29	0,28	-0,45	0,23
<b>NFEL2L</b>	0,00	0,03	-0,57	0,32	-0,49	0,41	-0,38	0,41	-0,49	0,76	-0,35	0,91	-0,63	0,59	-0,60	0,60	-0,62	0,51	-0,73	0,38
<b>NFKB1</b>	0,00	0,03	0,23	0,03	0,00	0,07	0,01	0,21	-0,21	0,34	-0,51	0,57	-0,27	0,33	-0,01	0,12	-0,28	0,24	-0,18	0,21
<b>NFKB1A</b>	0,00	0,21	-0,36	0,74	-0,37	0,13	-0,20	0,54	0,17	0,33	-0,17	0,32	0,10	0,21	0,00	0,53	-0,07	0,19	-0,40	0,16
<b>NFKB2</b>	0,00	0,03	0,38	0,17	0,12	0,14	-0,11	0,33	-0,20	0,71	-0,33	0,95	-0,04	0,47	0,25	0,16	0,05	0,23	0,22	0,21

<b>NQO1</b>	0,00	0,04	0,03	0,03	0,37	0,02	0,46	0,16	-0,13	0,17	-0,06	0,08	-0,22	0,07	-0,03	0,14	-0,06	0,07	-0,01	0,08
<b>OGG1</b>	0,00	0,05	-0,34	0,35	-0,61	0,11	-0,78	0,50	-0,13	0,19	-0,21	0,36	-0,14	0,27	-0,19	0,38	-0,16	0,17	-0,20	0,28
<b>PARP1</b>	0,00	0,10	-0,06	0,02	-0,33	0,08	-0,53	0,18	-0,33	0,16	-0,35	0,23	-0,34	0,11	-0,19	0,10	-0,30	0,06	-0,15	0,13
<b>PCNA</b>	0,00	0,01	0,02	0,07	-0,06	0,21	-0,11	0,10	0,30	0,61	0,69	0,91	0,07	0,42	0,16	0,22	0,01	0,29	0,00	0,13
<b>PLK3</b>	0,00	0,18	0,07	0,28	-0,03	0,06	-0,25	0,12	-0,30	0,23	-0,33	0,19	-0,12	0,36	-0,01	0,63	0,03	0,27	-0,21	0,52
<b>PMAIP1</b>	0,00	0,19	-0,35	0,09	0,33	0,32	0,60	0,24	-0,38	0,49	-0,23	0,42	-0,45	0,09	-0,39	0,17	-0,36	0,04	-0,45	0,08
<b>POLB</b>	0,00	0,05	-0,18	0,17	-0,20	0,16	-0,20	0,28	0,16	0,57	0,54	0,93	0,07	0,32	0,02	0,31	-0,01	0,27	-0,29	0,23
<b>POLD1</b>	0,00	0,02	-0,24	0,39	-0,23	0,20	-0,39	0,35	-0,49	0,67	-1,05	0,88	-0,37	0,46	-0,41	0,12	-0,30	0,27	-0,40	0,12
<b>PPM1D</b>	0,00	0,02	-0,32	0,42	-0,08	0,22	-0,14	0,23	-0,14	0,40	-0,18	0,36	-0,03	0,25	-0,08	0,47	-0,04	0,30	-0,19	0,37
<b>PRDX1</b>	0,00	0,05	-0,16	0,07	-0,19	0,24	-0,10	0,34	-0,10	0,47	0,30	0,67	-0,21	0,32	-0,18	0,09	-0,06	0,21	-0,10	0,10
<b>RAD50</b>	0,00	0,05	-0,30	0,43	-0,25	0,26	-0,27	0,43	-0,03	0,48	-0,14	0,51	-0,08	0,36	-0,20	0,45	-0,13	0,43	-0,31	0,50
<b>RAD51</b>	0,00	0,02	-0,13	0,14	-0,30	0,07	-0,39	0,14	-0,01	0,16	0,08	0,41	0,00	0,21	-0,04	0,28	-0,14	0,11	-0,33	0,09
<b>RRM2B</b>	0,00	0,07	-0,06	0,18	-0,27	0,13	-0,33	0,13	-0,31	0,33	-0,24	0,20	-0,30	0,20	-0,15	0,09	-0,31	0,12	-0,43	0,20
<b>SIRT2</b>	0,00	0,03	-0,50	0,53	-0,50	0,31	-0,68	0,58	-0,61	0,13	-0,83	0,16	-0,52	0,40	-0,54	0,60	-0,54	0,24	-0,72	0,34
<b>SLC30A1</b>	0,00	0,05	1,10	0,53	1,71	0,62	1,82	0,80	-0,55	0,54	-0,53	0,74	-0,67	0,32	-0,72	0,55	-0,41	0,39	-0,46	0,37
<b>SOD1</b>	0,00	0,05	-0,29	0,31	-0,02	0,25	-0,12	0,47	0,27	0,75	0,67	1,19	0,25	0,53	0,01	0,37	0,30	0,41	0,10	0,35
<b>SOD2</b>	0,00	0,07	0,28	0,16	0,45	0,11	0,67	0,14	0,64	0,50	0,93	0,84	0,37	0,22	0,40	0,19	0,40	0,22	0,37	0,08
<b>SULT1A</b>	0,00	0,10	-0,21	0,42	-0,04	0,08	-0,11	0,38	-0,09	0,24	-0,08	0,13	0,13	0,14	0,08	0,18	0,09	0,12	0,04	0,17
<b>TFRC</b>	0,00	0,10	0,05	0,37	-0,11	0,59	0,12	0,27	-0,27	0,94	-0,71	1,11	-0,25	0,74	-0,17	0,43	-0,32	0,73	-0,49	0,62
<b>TNFRSF10B</b>	0,00	0,03	-0,02	0,25	0,10	0,28	-0,07	0,38	-0,42	0,65	-0,39	0,68	-0,19	0,40	-0,02	0,23	-0,22	0,42	-0,18	0,30
<b>TP53</b>	0,00	0,04	-0,02	0,14	-0,10	0,14	-0,14	0,16	-0,14	0,12	0,01	0,25	-0,14	0,16	0,02	0,25	-0,09	0,17	0,13	0,14
<b>TXN</b>	0,00	0,02	-0,55	0,78	-0,61	0,69	-0,12	0,23	-0,41	0,75	0,33	0,54	-0,52	0,43	-0,52	0,56	-0,35	0,32	-0,30	0,42
<b>TXNRD1</b>	0,00	0,04	-0,01	0,46	1,38	0,04	1,64	0,15	-0,13	0,14	-0,29	0,10	-0,04	0,16	-0,17	0,19	0,18	0,06	0,04	0,18
<b>VEGFA</b>	0,00	0,09	1,01	0,66	1,75	1,19	1,95	0,94	1,07	1,47	1,03	1,39	1,34	1,46	1,10	1,29	1,28	1,33	1,29	1,21
<b>XIAP</b>	0,00	0,04	-0,35	0,11	-0,27	0,26	-0,04	0,29	-0,27	0,29	-0,13	0,27	-0,33	0,22	-0,40	0,24	-0,31	0,22	-0,52	0,29
<b>XPA</b>	0,00	0,08	0,11	0,08	-0,29	0,09	-0,61	0,11	0,22	0,52	0,76	1,04	0,07	0,39	0,10	0,22	0,11	0,38	0,18	0,22
<b>XPC</b>	0,00	0,03	0,04	0,19	-0,14	0,28	-0,36	0,16	-0,33	0,18	-0,26	0,01	-0,28	0,20	-0,06	0,32	-0,22	0,27	-0,08	0,37
<b>XRCC5</b>	0,00	0,04	-0,14	0,15	-0,29	0,11	-0,34	0,13	-0,30	0,23	-0,42	0,28	-0,43	0,18	-0,27	0,10	-0,43	0,23	-0,43	0,19

Tabelle 23: Ausführliche Genexpressionsdaten in BEAS-2B Zellen nach 24 h Inkubation mit NiCl<sub>2</sub>, NiNP und NiONP als log2-fache Regulation relativ zur Kontrolle.

	NC		NiCl <sub>2</sub> (µg Ni/mL)						NiNP (µg Ni/mL)						NiONP (µg Ni/mL)					
	0	SD	10	SD	30	SD	50	SD	10	SD	30	SD	50	SD	10	SD	30	SD	50	SD
<b>ABCC1</b>	0,00	0,06	0,13	0,17	0,42	0,06	0,32	0,32	0,48	0,29	0,50	0,16	0,29	0,34	0,49	0,10	0,40	0,21	0,46	0,11
<b>APAF1</b>	0,00	0,11	0,24	0,43	0,85	0,12	1,09	0,21	0,60	0,22	0,77	0,08	0,83	0,14	0,54	0,08	0,57	0,12	0,61	0,15
<b>APEX1</b>	0,00	0,02	-0,36	0,04	-0,76	0,09	-0,82	0,15	-0,77	0,14	-0,93	0,16	-0,98	0,20	-0,76	0,07	-0,90	0,19	-0,97	0,19
<b>ATM</b>	0,00	0,14	0,08	0,13	0,43	0,17	0,61	0,34	0,36	0,06	0,61	0,13	0,65	0,18	0,26	0,10	0,36	0,16	0,45	0,05
<b>ATR</b>	0,00	0,11	-0,30	0,15	-0,82	0,18	-1,07	0,20	-0,78	0,24	-0,86	0,04	-0,80	0,21	-0,71	0,13	-0,70	0,29	-0,74	0,08
<b>BAX</b>	0,00	0,03	-0,37	0,33	-0,34	0,14	-0,27	0,27	-0,34	0,35	-0,23	0,08	-0,30	0,38	-0,37	0,07	-0,29	0,33	-0,12	0,10
<b>BCL2</b>	0,00	0,06	-0,91	0,67	-0,46	0,21	-0,29	0,25	-0,92	0,44	-0,70	0,20	-0,75	0,25	-0,91	0,35	-0,75	0,37	-0,59	0,09
<b>BCL2L1</b>	0,00	0,09	-0,57	0,53	-0,34	0,14	-0,66	0,17	-0,14	0,09	-0,18	0,24	-0,23	0,06	-0,16	0,12	-0,29	0,05	-0,28	0,25
<b>BRCA1</b>	0,00	0,07	-0,29	0,33	-0,18	0,17	-0,07	0,28	-0,41	0,39	-0,36	0,18	-0,30	0,37	-0,39	0,08	-0,48	0,35	-0,54	0,10
<b>BRCA2</b>	0,00	0,18	0,01	0,19	0,49	0,12	0,48	0,07	0,32	0,17	0,49	0,05	0,57	0,13	0,28	0,11	0,44	0,19	0,53	0,13
<b>BTRC</b>	0,00	0,10	-0,38	0,41	-0,28	0,09	-0,21	0,18	-0,37	0,21	-0,30	0,14	-0,25	0,20	-0,36	0,06	-0,46	0,30	-0,47	0,13
<b>CAT</b>	0,00	0,05	-0,45	0,10	-1,35	0,45	-1,30	0,46	-1,21	0,38	-1,36	0,51	-1,26	0,42	-1,15	0,43	-1,30	0,42	-1,40	0,48
<b>CCND1</b>	0,00	0,07	-0,77	0,09	-1,36	0,53	-1,37	0,53	-1,22	0,39	-1,37	0,41	-1,42	0,56	-0,98	0,17	-1,13	0,23	-1,11	0,22
<b>CDKN1A1</b>	0,00	0,06	0,57	0,15	2,12	0,33	2,25	0,29	1,80	0,21	2,10	0,41	2,03	0,16	1,68	0,36	1,83	0,33	2,09	0,45
<b>CDKN1B</b>	0,00	0,12	-0,06	0,06	-0,41	0,15	-0,55	0,09	-0,06	0,11	-0,18	0,21	-0,06	0,05	-0,16	0,15	-0,04	0,08	-0,04	0,31
<b>CDKN2B</b>	0,00	0,04	0,06	0,66	0,41	0,60	0,08	0,15	0,41	0,32	0,38	0,45	0,39	0,32	0,24	0,33	0,23	0,43	0,24	0,63
<b>DDB1</b>	0,00	0,03	-0,53	0,33	-0,77	0,28	-0,79	0,33	-0,60	0,15	-0,71	0,17	-0,75	0,17	-0,58	0,24	-0,85	0,19	-0,95	0,12
<b>DDB2</b>	0,00	0,02	-0,66	0,20	-0,42	0,13	-0,74	0,14	-0,40	0,07	-0,40	0,05	-0,39	0,04	-0,37	0,22	-0,30	0,07	-0,22	0,10
<b>E2F1</b>	0,00	0,06	-0,53	0,64	0,26	0,39	0,58	0,50	-0,09	0,60	0,15	0,27	0,00	0,52	-0,23	0,33	-0,20	0,51	0,06	0,27
<b>EGFR</b>	0,00	0,02	-0,08	0,38	1,05	0,06	0,72	0,22	1,01	0,19	1,17	0,09	1,06	0,15	0,90	0,03	0,93	0,13	1,12	0,13
<b>EPHX1</b>	0,00	0,06	-0,23	0,17	-0,67	0,42	-0,69	0,49	-0,71	0,17	-0,91	0,34	-0,93	0,20	-0,77	0,34	-0,85	0,34	-0,85	0,37
<b>ERCC1</b>	0,00	0,05	-0,26	0,05	-0,41	0,11	-0,54	0,12	-0,40	0,14	-0,42	0,06	-0,47	0,18	-0,36	0,03	-0,38	0,14	-0,32	0,10
<b>ERCC2</b>	0,00	0,09	-1,03	0,30	-1,53	0,29	-1,45	0,18	-1,18	0,24	-1,31	0,16	-1,53	0,20	-1,06	0,28	-1,38	0,23	-1,40	0,18
<b>ERCC4</b>	0,00	0,09	-0,45	0,04	-0,36	0,10	-0,34	0,22	-0,46	0,08	-0,35	0,10	-0,28	0,13	-0,43	0,07	-0,36	0,15	-0,20	0,14
<b>ERCC5</b>	0,00	0,09	-0,26	0,10	-0,32	0,11	-0,44	0,10	-0,16	0,04	-0,16	0,16	-0,13	0,10	-0,19	0,12	-0,24	0,10	-0,26	0,11

<b>FTH1</b>	0,00	0,19	0,63	0,20	1,59	0,31	1,74	0,41	1,10	0,29	1,27	0,03	1,32	0,28	0,95	0,12	1,12	0,20	1,30	0,10
<b>G6PD</b>	0,00	0,01	0,29	0,25	0,32	0,31	0,13	0,13	0,35	0,08	0,33	0,17	0,26	0,08	0,25	0,09	0,16	0,06	0,31	0,22
<b>GADD45A</b>	0,00	0,37	-0,23	0,83	1,17	0,21	1,13	0,27	0,73	0,55	0,83	0,41	0,98	0,58	0,60	0,40	1,08	0,50	0,94	0,31
<b>GCLC</b>	0,00	0,02	0,92	1,09	1,27	0,77	1,26	0,95	1,48	0,69	1,41	0,50	1,46	0,69	1,35	0,29	1,23	0,61	1,17	0,35
<b>GPX1</b>	0,00	0,04	-0,32	0,15	-0,83	0,05	-0,77	0,20	-0,69	0,31	-0,76	0,15	-0,79	0,34	-0,63	0,07	-0,68	0,37	-0,64	0,24
<b>GSR</b>	0,00	0,06	0,17	0,38	-0,16	0,30	-0,12	0,41	0,00	0,18	-0,18	0,11	-0,14	0,31	-0,04	0,05	-0,20	0,38	-0,23	0,20
<b>GSTP1</b>	0,00	0,06	-0,17	0,15	-0,23	0,23	-0,25	0,35	-0,48	0,36	-0,43	0,22	-0,62	0,43	-0,44	0,18	-0,57	0,38	-0,39	0,28
<b>HMOX1</b>	0,00	0,03	2,57	1,23	5,43	0,66	5,18	0,55	3,54	0,54	4,28	0,50	4,49	0,31	3,00	0,38	3,63	0,18	4,34	0,34
<b>HSP1A1</b>	0,00	0,10	0,27	1,18	-0,23	0,79	0,72	0,94	-0,41	1,01	-0,48	0,81	-0,47	1,01	-0,09	0,80	-0,27	0,72	-0,24	0,60
<b>IL8</b>	0,00	0,04	1,79	0,74	4,00	0,65	3,63	0,81	3,77	0,45	4,12	0,36	4,17	0,28	3,67	0,28	4,13	0,18	4,14	0,30
<b>JUN</b>	0,00	0,06	0,83	0,64	2,72	0,15	2,84	0,14	2,54	0,06	2,81	0,26	2,81	0,05	2,31	0,21	2,56	0,06	2,88	0,27
<b>KEAP1</b>	0,00	0,05	-0,26	0,40	0,10	0,24	0,05	0,15	-0,02	0,15	-0,04	0,08	-0,16	0,10	-0,08	0,08	-0,26	0,22	-0,17	0,26
<b>LIG1</b>	0,00	0,03	-0,48	0,38	-0,67	0,26	-0,70	0,46	-0,56	0,34	-0,68	0,20	-0,70	0,41	-0,57	0,21	-0,64	0,41	-0,50	0,28
<b>LIG3</b>	0,00	0,05	-0,77	0,47	-0,81	0,19	-0,74	0,21	-0,70	0,28	-0,68	0,12	-0,69	0,26	-0,65	0,17	-0,71	0,32	-0,64	0,10
<b>MAP3K5 (ASK1)</b>	0,00	0,05	0,02	0,09	-0,41	0,06	-0,46	0,13	-0,15	0,03	-0,32	0,06	-0,31	0,07	-0,21	0,14	-0,30	0,09	-0,50	0,05
<b>MDM2</b>	0,00	0,09	0,08	0,04	0,69	0,28	0,54	0,49	0,55	0,29	0,74	0,28	0,81	0,45	0,49	0,19	0,61	0,47	0,67	0,36
<b>MGMT</b>	0,00	0,02	-0,37	0,22	-0,95	0,25	-1,17	0,37	-0,84	0,12	-1,05	0,36	-1,21	0,28	-0,94	0,18	-1,02	0,28	-1,05	0,53
<b>MLH1</b>	0,00	0,03	-0,37	0,55	-0,11	0,17	-0,22	0,32	-0,26	0,33	-0,25	0,10	-0,20	0,37	-0,24	0,07	-0,25	0,36	-0,19	0,12
<b>MSH2</b>	0,00	0,10	-0,09	0,28	-0,44	0,12	-0,24	0,15	-0,45	0,12	-0,52	0,06	-0,47	0,13	-0,43	0,10	-0,43	0,13	-0,51	0,06
<b>MT1X</b>	0,00	0,14	1,87	0,37	2,81	0,67	3,02	0,55	1,00	0,10	1,08	0,41	0,97	0,09	1,00	0,54	1,03	0,16	1,35	0,47
<b>MT2A</b>	0,00	0,20	1,71	0,40	2,08	0,77	2,10	0,51	0,52	0,22	0,47	0,46	0,26	0,15	0,47	0,63	0,26	0,26	0,51	0,19
<b>MYC</b>	0,00	0,06	0,39	0,33	0,95	0,16	0,57	0,07	0,65	0,11	0,67	0,15	0,58	0,09	0,75	0,15	0,73	0,12	0,83	0,08
<b>NAT1</b>	0,00	0,02	-0,37	0,16	-0,76	0,04	-0,76	0,13	-0,75	0,13	-0,86	0,18	-0,75	0,08	-0,76	0,05	-0,79	0,07	-0,95	0,12
<b>NFEL2L</b>	0,00	0,04	-0,50	0,37	-0,44	0,46	-0,25	0,37	-0,65	0,33	-0,63	0,35	-0,53	0,30	-0,76	0,29	-0,69	0,35	-0,74	0,36
<b>NFKB1</b>	0,00	0,05	-0,32	0,50	0,68	0,46	0,54	0,32	0,56	0,18	0,64	0,29	0,62	0,14	0,46	0,25	0,48	0,11	0,51	0,27
<b>NFKB1A</b>	0,00	0,03	0,04	0,35	0,82	0,06	0,50	0,57	0,83	0,30	0,78	0,12	0,80	0,34	0,70	0,05	0,79	0,29	0,76	0,21
<b>NFKB2</b>	0,00	0,05	-0,28	0,51	1,48	0,32	1,63	0,15	1,15	0,14	1,36	0,17	1,29	0,11	1,05	0,32	1,21	0,13	1,43	0,27
<b>NQO1</b>	0,00	0,04	0,52	0,16	0,66	0,35	0,73	0,24	0,28	0,12	0,30	0,17	0,28	0,19	0,22	0,02	0,17	0,08	0,21	0,15

<b>OGG1</b>	0,00	0,06	-0,51	0,30	-0,56	0,22	-0,41	0,36	-0,75	0,51	-0,67	0,24	-0,74	0,46	-0,65	0,21	-0,68	0,56	-0,61	0,28
<b>PARP1</b>	0,00	0,02	-0,52	0,11	-0,86	0,22	-0,97	0,12	-0,66	0,04	-0,75	0,16	-0,76	0,05	-0,59	0,19	-0,80	0,21	-0,78	0,16
<b>PCNA</b>	0,00	0,06	-0,18	0,35	-0,54	0,06	-0,46	0,15	-0,64	0,17	-0,78	0,11	-0,67	0,22	-0,68	0,09	-0,76	0,16	-0,95	0,02
<b>PLK3</b>	0,00	0,06	0,07	0,69	0,80	0,21	0,67	0,39	0,55	0,32	0,57	0,11	0,45	0,31	0,68	0,12	0,61	0,47	0,75	0,30
<b>PMAIP1</b>	0,00	0,08	0,31	0,78	1,98	0,11	1,93	0,19	1,50	0,41	1,70	0,21	1,82	0,23	1,41	0,26	1,73	0,22	1,58	0,07
<b>POLB</b>	0,00	0,05	-0,63	0,07	-0,55	0,10	-0,62	0,15	-0,83	0,08	-0,84	0,03	-0,79	0,09	-0,80	0,04	-0,85	0,10	-1,02	0,09
<b>POLD1</b>	0,00	0,03	-0,49	0,64	-0,23	0,37	-0,30	0,55	-0,24	0,46	-0,24	0,25	-0,28	0,44	-0,33	0,29	-0,31	0,45	-0,16	0,28
<b>PPM1D</b>	0,00	0,02	-0,30	0,39	-0,21	0,12	-0,21	0,18	-0,27	0,29	-0,23	0,16	-0,16	0,27	-0,33	0,16	-0,28	0,27	-0,26	0,09
<b>PRDX1</b>	0,00	0,04	-0,04	0,31	-0,62	0,11	-0,20	0,10	-0,83	0,18	-0,89	0,22	-0,87	0,15	-0,75	0,09	-0,85	0,26	-0,90	0,26
<b>RAD50</b>	0,00	0,10	-0,26	0,22	-0,27	0,07	-0,31	0,11	-0,33	0,17	-0,29	0,02	-0,21	0,09	-0,36	0,11	-0,45	0,08	-0,65	0,17
<b>RAD51</b>	0,00	0,02	-0,47	0,26	-0,05	0,19	-0,06	0,34	-0,38	0,29	-0,26	0,19	-0,29	0,24	-0,41	0,18	-0,39	0,20	-0,29	0,12
<b>RRM2B</b>	0,00	0,02	-0,50	0,23	-0,46	0,28	-0,39	0,14	-0,54	0,13	-0,52	0,18	-0,44	0,06	-0,62	0,21	-0,71	0,08	-0,87	0,09
<b>SIRT2</b>	0,00	0,07	-0,69	0,64	-0,38	0,32	-0,44	0,49	-0,53	0,50	-0,35	0,15	-0,52	0,50	-0,48	0,26	-0,61	0,49	-0,34	0,16
<b>SLC30A1</b>	0,00	0,04	0,84	0,66	1,97	0,16	2,25	0,13	0,03	0,36	0,20	0,11	0,38	0,12	-0,19	0,04	0,12	0,27	0,15	0,12
<b>SOD1</b>	0,00	0,05	-0,09	0,14	-0,34	0,12	-0,06	0,11	-0,69	0,30	-0,68	0,07	-0,63	0,19	-0,64	0,10	-0,61	0,26	-0,64	0,06
<b>SOD2</b>	0,00	0,07	0,29	0,51	2,90	0,19	2,65	0,21	2,54	0,23	2,85	0,20	2,88	0,04	2,33	0,17	2,68	0,08	2,84	0,09
<b>SULT1A</b>	0,00	0,21	-0,12	0,17	-0,15	0,26	-0,03	0,10	-0,16	0,19	-0,04	0,05	-0,10	0,15	-0,22	0,14	-0,16	0,21	0,01	0,12
<b>TFRC</b>	0,00	0,07	1,10	0,27	1,41	0,46	1,37	0,51	1,34	0,48	1,38	0,57	1,44	0,50	1,28	0,47	1,19	0,43	1,11	0,60
<b>TNFRSF10B</b>	0,00	0,07	-0,22	0,39	0,68	0,23	0,88	0,08	0,54	0,10	0,74	0,12	0,77	0,08	0,46	0,23	0,61	0,13	0,73	0,08
<b>TP53</b>	0,00	0,08	-0,41	0,12	-0,61	0,35	-0,94	0,38	-0,53	0,12	-0,65	0,29	-0,72	0,20	-0,51	0,24	-0,61	0,20	-0,49	0,36
<b>TXN</b>	0,00	0,05	0,19	0,53	-0,17	0,09	0,03	0,15	-0,37	0,15	-0,41	0,09	-0,36	0,10	-0,33	0,16	-0,31	0,11	-0,44	0,06
<b>TXNRD1</b>	0,00	0,03	1,13	0,85	2,06	0,48	2,37	0,45	1,74	0,57	1,88	0,27	1,95	0,43	1,62	0,33	1,63	0,48	1,60	0,19
<b>VEGFA</b>	0,00	0,10	1,08	0,64	2,68	0,21	2,61	0,45	2,54	0,42	2,75	0,25	2,80	0,35	2,27	0,20	2,58	0,30	2,80	0,21
<b>XIAP</b>	0,00	0,09	-0,30	0,54	0,52	0,17	0,55	0,20	0,10	0,30	0,30	0,17	0,34	0,23	0,05	0,18	0,06	0,29	0,01	0,12
<b>XPA</b>	0,00	0,08	-0,42	0,31	-0,61	0,17	-0,76	0,16	-0,68	0,11	-0,71	0,03	-0,68	0,18	-0,60	0,07	-0,63	0,24	-0,71	0,10
<b>XPC</b>	0,00	0,07	-0,60	0,16	-0,83	0,28	-1,08	0,11	-0,79	0,10	-0,76	0,25	-0,85	0,08	-0,68	0,27	-0,79	0,09	-0,71	0,24
<b>XRCC5</b>	0,00	0,04	-0,43	0,06	-0,93	0,11	-0,92	0,07	-0,75	0,02	-0,92	0,08	-0,88	0,06	-0,68	0,06	-0,98	0,12	-1,14	0,05

Tabelle 24: Ausführliche Genexpressionsdaten in A549 Zellen nach 6 h Inkubation mit NiCl<sub>2</sub>, NiNP und NiONP als log2-fache Regulation relativ zur Kontrolle.

	Kontrolle		NiCl <sub>2</sub> (µg Ni/mL)						NiNP (µg Ni/mL)						NiONP (µg Ni/mL)					
	0	SD	10	SD	30	SD	50	SD	10	SD	30	SD	50	SD	10	SD	30	SD	50	SD
<i>ABCC1</i>	0,00	0,07	0,17	0,13	0,06	0,07	0,21	0,11	0,23	0,11	0,08	0,13	0,17	0,23	-0,03	0,43	0,38	0,30	0,03	0,15
<i>ALDH1A1</i>	0,00	0,09	-0,01	0,07	0,09	0,06	-0,13	0,02	-0,14	0,10	-0,08	0,21	-0,27	0,08	-0,08	0,21	-0,17	0,16	-0,08	0,19
<i>APAF1</i>	0,00	0,06	0,04	0,23	0,21	0,08	0,29	0,04	0,01	0,29	0,05	0,20	-0,06	0,11	-0,04	0,31	-0,02	0,29	0,20	0,26
<i>APEX1</i>	0,00	0,05	0,14	0,04	0,09	0,10	0,10	0,19	0,01	0,13	-0,08	0,19	-0,07	0,15	-0,01	0,11	0,06	0,16	-0,11	0,18
<i>ATM</i>	0,00	0,05	-0,01	0,14	-0,02	0,14	0,28	0,09	0,13	0,15	-0,01	0,22	0,18	0,22	0,03	0,12	0,09	0,07	-0,01	0,33
<i>ATR</i>	0,00	0,13	-0,40	0,11	-0,25	0,03	-0,25	0,21	-0,25	0,19	-0,12	0,02	-0,21	0,16	0,22	0,43	-0,28	0,20	-0,06	0,29
<i>BAX</i>	0,00	0,15	0,17	0,08	0,21	0,29	-0,27	0,39	0,03	0,24	0,08	0,23	0,00	0,12	-0,22	0,52	-0,10	0,13	0,06	0,38
<i>BCL2</i>	0,00	0,10	-0,16	0,09	-0,03	0,09	-0,10	0,14	-0,21	0,12	-0,17	0,10	-0,16	0,11	0,08	0,22	-0,20	0,13	-0,07	0,21
<i>BCL2L1</i>	0,00	0,20	-0,11	0,19	0,04	0,09	-0,29	0,10	-0,21	0,10	-0,25	0,33	-0,24	0,19	-0,34	0,29	-0,07	0,21	-0,20	0,22
<i>BRCA1</i>	0,00	0,02	-0,03	0,15	-0,03	0,10	-0,27	0,34	-0,05	0,11	-0,15	0,18	-0,31	0,23	0,10	0,04	-0,11	0,07	-0,14	0,14
<i>BRCA2</i>	0,00	0,07	-0,25	0,26	-0,15	0,14	-0,01	0,12	-0,09	0,24	-0,07	0,18	-0,02	0,18	0,15	0,17	0,02	0,09	0,01	0,31
<i>BTRC</i>	0,00	0,15	-0,13	0,19	-0,06	0,14	-0,19	0,29	-0,11	0,14	-0,16	0,12	-0,31	0,26	0,01	0,15	-0,07	0,19	0,00	0,10
<i>CAT</i>	0,00	0,09	-0,03	0,12	-0,09	0,09	-0,01	0,15	-0,05	0,04	-0,08	0,08	-0,10	0,11	0,08	0,04	-0,09	0,16	-0,12	0,05
<i>CCND1</i>	0,00	0,08	0,14	0,00	-0,11	0,10	-0,11	0,14	0,11	0,17	0,01	0,11	0,07	0,10	0,10	0,13	0,26	0,13	0,18	0,06
<i>CDKN1A1</i>	0,00	0,28	-0,06	0,08	-0,18	0,04	-0,37	0,05	-0,07	0,18	-0,25	0,41	-0,35	0,32	-0,20	0,19	-0,13	0,12	-0,22	0,25
<i>CDKN1B</i>	0,00	0,12	0,13	0,15	0,02	0,17	0,21	0,15	0,05	0,02	-0,02	0,12	0,06	0,10	0,27	0,21	0,22	0,16	0,08	0,28
<i>DDB1</i>	0,00	0,24	0,36	0,09	0,32	0,13	0,11	0,01	0,18	0,06	-0,04	0,19	-0,03	0,39	-0,24	0,56	0,27	0,10	-0,08	0,48
<i>DDB2</i>	0,00	0,13	0,06	0,20	-0,02	0,20	-0,13	0,06	-0,10	0,15	-0,20	0,02	-0,15	0,26	-0,35	0,19	0,10	0,17	-0,29	0,12
<i>E2F1</i>	0,00	0,25	-0,08	0,10	-0,06	0,09	-0,41	0,22	-0,06	0,12	-0,15	0,16	-0,16	0,12	0,00	0,21	-0,22	0,17	-0,14	0,18
<i>EGFR</i>	0,00	0,09	0,00	0,21	0,10	0,12	0,12	0,06	0,15	0,16	0,14	0,12	0,18	0,10	0,07	0,28	0,18	0,21	0,34	0,15
<i>EPHX1</i>	0,00	0,02	0,13	0,02	0,09	0,09	0,04	0,14	0,04	0,13	0,00	0,10	0,03	0,06	-0,01	0,07	0,15	0,09	-0,05	0,07
<i>ERCC1</i>	0,00	0,03	-0,10	0,10	-0,11	0,08	-0,20	0,13	-0,06	0,10	0,00	0,01	-0,10	0,11	0,08	0,17	-0,08	0,07	-0,03	0,07
<i>ERCC2</i>	0,00	0,35	0,40	0,03	0,12	0,16	-0,21	0,11	0,26	0,14	0,01	0,17	0,08	0,10	-0,34	0,38	-0,05	0,10	-0,20	0,33
<i>ERCC4</i>	0,00	0,10	0,06	0,07	-0,01	0,12	0,11	0,13	0,13	0,11	0,03	0,17	0,12	0,12	0,25	0,26	0,19	0,08	0,14	0,25
<i>ERCC5</i>	0,00	0,07	0,06	0,04	0,03	0,09	0,22	0,03	0,08	0,05	-0,03	0,17	0,10	0,06	0,00	0,08	0,14	0,08	-0,01	0,18
<i>FTH1</i>	0,00	0,12	-0,06	0,03	0,12	0,11	0,07	0,18	-0,37	0,32	-0,10	0,46	-0,68	0,32	-0,02	0,23	-0,04	0,38	0,20	0,01

<b>G6PD</b>	0,00	0,19	0,25	0,07	0,12	0,04	0,11	0,21	0,16	0,15	0,01	0,06	0,13	0,09	-0,12	0,32	0,12	0,13	-0,05	0,22
<b>GADD45A</b>	0,00	0,33	0,17	0,44	0,00	0,37	-0,12	0,43	0,23	0,34	0,03	0,29	0,04	0,35	0,43	0,33	0,23	0,42	0,06	0,33
<b>GCLC</b>	0,00	0,06	-0,10	0,09	0,17	0,08	0,18	0,04	0,00	0,24	0,04	0,08	-0,08	0,04	0,10	0,13	-0,06	0,14	0,17	0,06
<b>GPX1</b>	0,00	0,00	-0,08	0,07	-0,05	0,05	-0,16	0,09	-0,04	0,03	0,00	0,10	-0,09	0,04	0,19	0,08	0,00	0,07	0,04	0,07
<b>GPX2</b>	0,00	0,05	-0,01	0,09	0,13	0,10	-0,05	0,06	-0,14	0,05	-0,02	0,21	-0,25	0,18	-0,03	0,27	0,13	0,21	-0,03	0,24
<b>GSR</b>	0,00	0,08	-0,01	0,03	0,05	0,09	-0,14	0,09	0,03	0,06	-0,03	0,14	-0,16	0,15	0,03	0,29	0,02	0,01	0,05	0,20
<b>GSTP1</b>	0,00	0,10	0,12	0,09	0,16	0,04	-0,05	0,16	0,09	0,08	0,10	0,15	0,03	0,10	-0,16	0,25	0,01	0,10	-0,04	0,21
<b>HMOX1</b>	0,00	0,09	0,46	0,08	0,61	0,11	0,96	0,46	0,35	0,10	0,47	0,01	0,59	0,07	0,06	0,22	0,63	0,08	0,72	0,16
<b>HSP1A1</b>	0,00	0,16	0,05	0,08	-0,47	0,16	-0,31	0,16	0,00	0,22	-0,27	0,27	-0,28	0,11	0,24	0,44	-0,33	0,04	-0,53	0,30
<b>IL8</b>	0,00	0,05	-0,29	0,28	-0,18	0,18	0,18	0,15	-0,06	0,18	-0,08	0,06	0,11	0,04	0,43	0,36	0,76	0,13	1,13	0,29
<b>JUN</b>	0,00	0,16	0,07	0,03	0,05	0,06	-0,01	0,08	0,23	0,10	0,21	0,06	0,18	0,04	0,27	0,19	0,38	0,12	0,53	0,14
<b>KEAP1</b>	0,00	0,30	0,45	0,15	0,35	0,15	0,30	0,11	0,24	0,30	0,05	0,08	0,13	0,40	0,00	0,48	0,47	0,29	0,12	0,28
<b>LIG1</b>	0,00	0,14	0,03	0,06	0,13	0,06	-0,05	0,10	-0,01	0,18	-0,05	0,14	-0,08	0,10	0,03	0,19	-0,01	0,10	-0,03	0,20
<b>LIG3</b>	0,00	0,04	-0,09	0,07	0,02	0,06	-0,15	0,09	-0,01	0,15	-0,08	0,07	-0,12	0,03	0,00	0,15	-0,11	0,06	-0,08	0,14
<b>MAP3K5 (ASK1)</b>	0,00	0,09	-0,05	0,03	-0,08	0,04	-0,07	0,07	-0,04	0,11	0,06	0,11	-0,04	0,04	0,16	0,17	0,08	0,11	0,22	0,11
<b>MDM2</b>	0,00	0,05	-0,06	0,04	-0,19	0,13	0,02	0,02	0,05	0,11	-0,14	0,11	-0,09	0,10	0,03	0,12	0,02	0,07	-0,10	0,19
<b>MGMT</b>	0,00	0,05	0,25	0,05	0,09	0,03	0,23	0,05	-0,01	0,29	-0,07	0,13	-0,04	0,27	0,02	0,08	0,19	0,23	-0,18	0,12
<b>MLH1</b>	0,00	0,04	-0,06	0,04	0,07	0,04	-0,16	0,09	-0,07	0,13	-0,05	0,06	-0,20	0,02	0,02	0,19	-0,10	0,15	-0,05	0,07
<b>MSH2</b>	0,00	0,14	-0,23	0,09	-0,34	0,12	-0,28	0,18	-0,24	0,03	-0,23	0,07	-0,23	0,06	0,13	0,37	-0,22	0,08	-0,21	0,14
<b>MT1X</b>	0,00	0,09	-0,48	0,34	-0,59	0,61	-0,83	0,50	-0,21	0,25	0,09	0,03	-0,08	0,15	-0,24	0,05	-0,14	0,30	0,10	0,10
<b>MT2A</b>	0,00	0,29	-0,08	0,22	-0,23	0,29	-0,33	0,33	-0,14	0,27	0,06	0,52	-0,09	0,29	-0,35	0,42	0,04	0,21	0,10	0,49
<b>MYC</b>	0,00	0,16	0,30	0,16	0,36	0,32	0,17	0,28	0,18	0,23	0,17	0,29	0,15	0,24	-0,11	0,52	0,34	0,23	0,45	0,34
<b>NAT1</b>	0,00	0,02	-0,05	0,08	0,10	0,08	0,13	0,15	-0,09	0,10	-0,06	0,04	-0,10	0,13	0,16	0,14	0,03	0,03	0,02	0,07
<b>NFEL2L</b>	0,00	0,06	-0,21	0,25	-0,24	0,31	-0,16	0,26	-0,18	0,04	-0,18	0,09	-0,21	0,08	0,02	0,33	-0,05	0,10	-0,23	0,18
<b>NFKB1</b>	0,00	0,08	0,38	0,07	0,15	0,09	0,18	0,17	0,28	0,15	0,11	0,12	0,21	0,09	0,04	0,37	0,39	0,23	0,23	0,13
<b>NFKB1A</b>	0,00	0,14	0,20	0,14	0,22	0,38	0,19	0,43	-0,03	0,39	-0,04	0,50	-0,27	0,40	0,00	0,43	0,26	0,28	0,30	0,30
<b>NFKB2</b>	0,00	0,31	0,61	0,11	0,38	0,07	0,33	0,21	0,52	0,19	0,20	0,12	0,27	0,16	0,18	0,26	0,63	0,06	0,52	0,14
<b>NQO1</b>	0,00	0,02	0,13	0,06	0,04	0,03	0,08	0,14	0,14	0,06	0,06	0,04	0,09	0,13	0,11	0,09	0,06	0,07	0,03	0,07
<b>OGG1</b>	0,00	0,14	0,05	0,06	0,10	0,03	-0,15	0,11	-0,11	0,05	-0,13	0,13	-0,16	0,22	0,08	0,17	0,05	0,13	-0,05	0,17

<b>PARP1</b>	0,00	0,08	0,22	0,05	0,06	0,07	0,05	0,11	0,21	0,12	0,04	0,09	0,15	0,10	0,01	0,21	0,16	0,16	0,03	0,10
<b>PCNA</b>	0,00	0,13	-0,13	0,04	-0,30	0,12	-0,12	0,14	-0,19	0,07	-0,25	0,09	-0,23	0,06	-0,02	0,21	-0,13	0,14	-0,28	0,19
<b>PLK3</b>	0,00	0,16	-0,03	0,12	-0,09	0,13	-0,33	0,06	-0,23	0,24	-0,14	0,18	-0,12	0,10	-0,30	0,19	-0,03	0,18	0,02	0,21
<b>PMAIP1</b>	0,00	0,07	-0,10	0,08	-0,13	0,11	0,01	0,16	-0,05	0,10	-0,12	0,23	-0,23	0,19	0,19	0,12	0,13	0,17	0,23	0,07
<b>POLB</b>	0,00	0,07	-0,15	0,14	-0,22	0,10	-0,10	0,13	-0,22	0,08	-0,24	0,04	-0,37	0,04	0,14	0,33	-0,15	0,06	-0,15	0,12
<b>POLD1</b>	0,00	0,21	0,13	0,05	0,19	0,06	-0,03	0,08	0,13	0,09	0,06	0,11	0,05	0,09	0,00	0,27	0,08	0,07	0,06	0,20
<b>PPM1D</b>	0,00	0,06	-0,13	0,17	-0,07	0,08	-0,11	0,28	0,02	0,27	-0,03	0,07	-0,18	0,05	0,22	0,18	-0,01	0,15	0,04	0,16
<b>PRDX1</b>	0,00	0,06	0,04	0,12	-0,01	0,16	0,10	0,16	-0,26	0,39	-0,23	0,41	-0,32	0,50	-0,04	0,09	-0,06	0,10	-0,21	0,25
<b>RAD50</b>	0,00	0,07	-0,20	0,11	-0,08	0,03	-0,07	0,19	-0,05	0,21	-0,08	0,04	-0,15	0,07	0,19	0,19	-0,10	0,10	0,06	0,25
<b>RAD51</b>	0,00	0,05	0,02	0,04	-0,07	0,09	-0,24	0,05	0,00	0,06	-0,03	0,05	-0,17	0,01	0,01	0,12	-0,15	0,09	-0,17	0,04
<b>RRM2B</b>	0,00	0,05	0,14	0,09	-0,01	0,10	0,07	0,06	0,08	0,08	-0,09	0,04	-0,13	0,18	0,03	0,13	-0,01	0,12	-0,10	0,05
<b>SIRT2</b>	0,00	0,22	-0,01	0,08	0,10	0,14	-0,09	0,12	-0,02	0,21	0,00	0,13	0,11	0,09	-0,12	0,36	0,09	0,16	0,07	0,18
<b>SLC30A1</b>	0,00	0,12	-0,37	0,36	-1,18	1,13	-1,10	1,31	-0,22	0,19	-0,17	0,21	-0,29	0,28	0,11	0,05	0,18	0,12	0,36	0,09
<b>SOD1</b>	0,00	0,34	-0,23	0,29	-0,11	0,19	-0,09	0,32	-0,19	0,31	-0,04	0,07	-0,19	0,30	0,33	0,59	-0,15	0,26	0,00	0,36
<b>SOD2</b>	0,00	0,05	0,00	0,06	0,01	0,03	0,19	0,03	0,05	0,06	0,03	0,08	0,05	0,07	0,18	0,14	0,16	0,08	0,28	0,18
<b>SULT1A</b>	0,00	0,15	0,34	0,03	0,42	0,20	0,22	0,22	0,05	0,30	0,14	0,29	-0,17	0,28	0,16	0,37	0,24	0,10	0,23	0,27
<b>TFRC</b>	0,00	0,18	0,27	0,18	0,38	0,13	0,34	0,07	0,03	0,14	0,06	0,14	-0,09	0,48	-0,10	0,43	0,30	0,03	0,29	0,17
<b>TNFRSF10B</b>	0,00	0,07	0,19	0,06	0,05	0,18	0,13	0,17	0,33	0,10	0,21	0,14	0,29	0,07	0,15	0,29	0,49	0,05	0,39	0,14
<b>TP53</b>	0,00	0,05	0,26	0,15	0,23	0,16	0,38	0,30	0,17	0,09	0,05	0,06	0,14	0,12	0,10	0,14	0,20	0,21	0,04	0,08
<b>TXN</b>	0,00	0,11	-0,09	0,17	-0,21	0,17	-0,02	0,23	-0,54	0,58	-0,50	0,56	-0,45	0,52	0,03	0,36	-0,14	0,10	-0,28	0,06
<b>TXNRD1</b>	0,00	0,15	0,02	0,13	0,17	0,12	0,03	0,17	0,11	0,19	0,10	0,05	0,01	0,08	0,27	0,11	0,16	0,23	0,38	0,08
<b>UGT1</b>	0,00	0,05	-0,03	0,16	0,12	0,07	-0,07	0,03	-0,13	0,12	0,02	0,30	-0,40	0,10	-0,06	0,33	-0,04	0,20	0,01	0,06
<b>VEGFA</b>	0,00	0,17	-0,15	0,06	0,20	0,23	0,52	0,48	-0,18	0,15	-0,03	0,24	-0,16	0,24	0,03	0,20	0,26	0,09	0,63	0,24
<b>XIAP</b>	0,00	0,22	0,00	0,18	0,02	0,15	0,02	0,29	-0,17	0,10	-0,34	0,51	-0,34	0,45	-0,09	0,39	0,01	0,06	0,01	0,13
<b>XPA</b>	0,00	0,12	-0,17	0,11	-0,37	0,30	-0,44	0,45	-0,20	0,06	-0,24	0,16	-0,25	0,09	0,10	0,45	-0,15	0,04	-0,26	0,25
<b>XPC</b>	0,00	0,10	0,28	0,07	0,17	0,14	0,17	0,12	0,22	0,05	0,07	0,18	0,13	0,13	-0,03	0,19	0,27	0,14	-0,07	0,11
<b>XRCC5</b>	0,00	0,09	0,07	0,08	0,01	0,12	-0,01	0,06	0,04	0,06	-0,06	0,06	-0,07	0,14	-0,03	0,16	0,11	0,05	-0,01	0,08

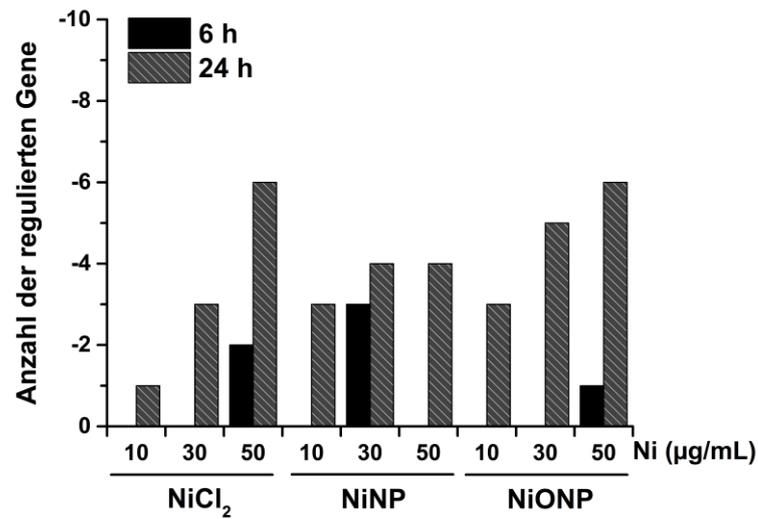
Tabelle 25: Ausführliche Genexpressionsdaten in A549 Zellen nach 24 h Inkubation mit NiCl<sub>2</sub>, NiNP und NiONP als log2-fache Regulation relativ zur Kontrolle.

	Kontrolle		NiCl <sub>2</sub> (µg Ni/mL)						NiNP (µg Ni/mL)						NiONP (µg Ni/mL)					
	0	SD	10	SD	30	SD	50	SD	10	SD	30	SD	50	SD	10	SD	30	SD	50	SD
<b>ABCC1</b>	0,00	0,05	0,07	0,17	-0,15	0,20	-0,44	0,08	0,33	0,19	-0,18	0,10	-0,21	0,17	0,22	0,10	-0,25	0,15	-0,26	0,10
<b>ALDH1A1</b>	0,00	0,01	-0,02	0,07	-0,61	0,09	-0,87	0,04	-0,05	0,28	-0,27	0,08	-0,62	0,05	0,04	0,14	-0,21	0,17	-0,73	0,05
<b>APAF1</b>	0,00	0,08	0,02	0,15	0,10	0,31	0,38	0,35	-0,21	0,39	0,09	0,03	0,11	0,14	-0,07	0,17	0,19	0,27	0,45	0,30
<b>APEX1</b>	0,00	0,14	-0,03	0,06	-0,09	0,10	-0,15	0,11	-0,05	0,05	-0,13	0,08	-0,10	0,08	0,14	0,05	0,17	0,04	0,14	0,03
<b>ATM</b>	0,00	0,14	-0,13	0,11	0,02	0,16	-0,14	0,15	-0,10	0,37	-0,09	0,09	0,04	0,22	-0,01	0,06	0,05	0,18	0,22	0,14
<b>ATR</b>	0,00	0,36	-0,24	0,10	-0,38	0,13	-0,39	0,16	-0,25	0,19	-0,31	0,22	-0,43	0,33	-0,33	0,07	-0,22	0,10	-0,43	0,18
<b>BAX</b>	0,00	0,08	0,11	0,10	-0,09	0,16	0,10	0,12	0,02	0,19	-0,02	0,08	0,03	0,11	-0,03	0,13	0,11	0,13	0,09	0,20
<b>BCL2</b>	0,00	0,22	-0,05	0,07	-0,08	0,09	0,19	0,10	-0,37	0,20	-0,10	0,10	-0,08	0,19	-0,08	0,06	0,12	0,33	0,03	0,16
<b>BCL2L1</b>	0,00	0,20	0,01	0,13	-0,28	0,08	0,03	0,17	-0,29	0,19	-0,16	0,10	-0,44	0,25	-0,07	0,10	-0,15	0,21	-0,16	0,07
<b>BRCA1</b>	0,00	0,30	-0,19	0,02	-0,55	0,05	-0,76	0,13	-0,63	0,83	-0,41	0,15	-0,83	0,36	-0,16	0,08	-0,30	0,08	-0,71	0,06
<b>BRCA2</b>	0,00	0,13	-0,09	0,08	0,01	0,08	0,01	0,05	0,10	0,20	0,07	0,11	-0,04	0,17	-0,04	0,05	0,07	0,12	-0,03	0,09
<b>BTRC</b>	0,00	0,10	-0,03	0,02	-0,48	0,18	-0,30	0,07	-0,39	0,48	-0,26	0,12	-0,57	0,23	-0,14	0,11	-0,15	0,08	-0,32	0,07
<b>CAT</b>	0,00	0,21	-0,25	0,03	-0,40	0,09	-0,62	0,09	-0,17	0,14	-0,28	0,11	-0,33	0,23	-0,13	0,13	-0,42	0,14	-0,62	0,01
<b>CCND1</b>	0,00	0,16	-0,19	0,19	-0,22	0,16	-0,22	0,17	0,13	0,42	-0,46	0,13	-0,39	0,09	0,08	0,10	-0,45	0,09	-0,42	0,13
<b>CDKN1A1</b>	0,00	0,26	0,01	0,11	0,02	0,14	0,33	0,10	-0,31	0,25	0,07	0,07	0,12	0,15	0,01	0,07	0,25	0,15	0,33	0,16
<b>CDKN1B</b>	0,00	0,23	-0,12	0,09	-0,11	0,08	-0,25	0,06	0,10	0,26	-0,22	0,10	-0,16	0,29	-0,03	0,08	-0,28	0,12	-0,24	0,07
<b>DDB1</b>	0,00	0,20	0,06	0,04	-0,34	0,12	-0,26	0,14	-0,15	0,29	-0,31	0,17	-0,55	0,16	0,33	0,07	-0,15	0,11	-0,21	0,14
<b>DDB2</b>	0,00	0,21	0,17	0,10	0,18	0,09	0,11	0,09	0,01	0,31	0,21	0,13	0,22	0,10	0,23	0,12	0,44	0,12	0,35	0,05
<b>E2F1</b>	0,00	0,37	-0,17	0,26	-0,61	0,18	-0,56	0,17	-0,10	0,48	-0,46	0,18	-0,66	0,34	-0,13	0,18	-0,60	0,33	-0,87	0,22
<b>EGFR</b>	0,00	0,17	0,11	0,14	0,42	0,34	0,80	0,37	0,17	0,32	0,23	0,06	0,44	0,19	-0,04	0,09	0,29	0,18	0,84	0,25
<b>EPHX1</b>	0,00	0,17	-0,20	0,14	-0,38	0,23	-0,58	0,27	0,00	0,19	-0,31	0,26	-0,29	0,19	0,09	0,13	-0,21	0,03	-0,47	0,26
<b>ERCC1</b>	0,00	0,08	-0,15	0,11	-0,35	0,10	-0,30	0,10	0,03	0,46	-0,30	0,17	-0,40	0,20	-0,21	0,10	-0,43	0,10	-0,51	0,10
<b>ERCC2</b>	0,00	0,48	-0,32	0,26	-0,62	0,27	-0,94	0,15	-0,25	0,33	-0,58	0,22	-0,68	0,26	-0,03	0,20	-0,70	0,28	-0,82	0,30
<b>ERCC4</b>	0,00	0,14	-0,13	0,06	-0,13	0,04	-0,29	0,06	0,26	0,40	-0,19	0,08	-0,15	0,23	-0,01	0,04	-0,19	0,15	-0,22	0,08
<b>ERCC5</b>	0,00	0,01	-0,15	0,09	-0,03	0,09	-0,16	0,07	0,06	0,13	-0,18	0,06	-0,01	0,21	-0,06	0,09	-0,06	0,18	0,18	0,14
<b>FTH1</b>	0,00	0,78	0,66	0,15	0,52	0,25	0,73	0,24	0,39	0,31	0,64	0,12	0,27	0,72	0,46	0,23	0,76	0,16	0,72	0,31

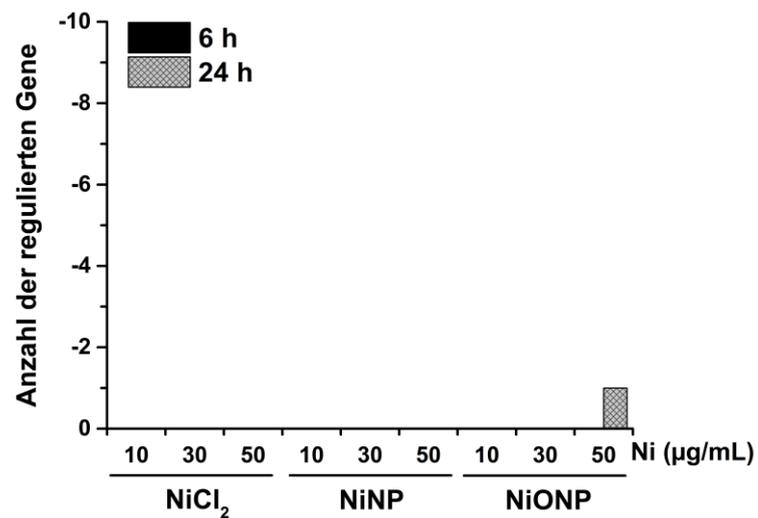
<b>G6PD</b>	0,00	0,14	-0,05	0,18	-0,11	0,15	-0,38	0,06	0,33	0,38	-0,18	0,10	-0,15	0,05	0,25	0,13	-0,32	0,10	-0,39	0,14
<b>GADD45A</b>	0,00	0,12	0,06	0,16	0,57	0,16	1,15	0,21	-0,24	0,33	0,40	0,20	0,40	0,16	-0,10	0,12	0,89	0,13	0,89	0,30
<b>GCLC</b>	0,01	0,14	0,17	0,22	-0,05	0,22	-0,06	0,10	0,07	0,16	0,14	0,15	-0,07	0,14	0,03	0,19	-0,06	0,23	-0,31	0,11
<b>GPX1</b>	0,00	0,02	0,10	0,01	0,15	0,04	0,49	0,05	0,27	0,51	0,16	0,06	0,26	0,15	-0,05	0,04	0,21	0,09	0,24	0,03
<b>GPX2</b>	0,00	0,62	0,16	0,58	-0,04	0,50	-0,12	0,69	-0,01	0,55	0,17	0,51	-0,07	0,47	0,20	0,22	0,46	0,34	0,00	0,64
<b>GSR</b>	0,00	0,06	-0,02	0,16	-0,45	0,13	-0,49	0,01	-0,23	0,16	-0,23	0,08	-0,51	0,08	-0,02	0,12	-0,31	0,23	-0,79	0,12
<b>GSTP1</b>	0,00	0,03	0,02	0,07	-0,13	0,17	-0,17	0,11	0,00	0,14	-0,08	0,09	-0,10	0,15	0,06	0,05	0,03	0,11	-0,03	0,17
<b>HMOX1</b>	0,00	0,14	0,48	0,23	1,02	0,41	1,36	0,43	0,91	0,70	0,85	0,31	1,30	0,46	0,62	0,13	0,98	0,25	1,44	0,46
<b>HSP1A1</b>	0,00	0,85	-0,43	0,45	-0,15	0,31	0,04	0,35	0,11	0,55	-0,40	0,44	0,00	0,66	-0,16	0,28	-0,40	0,49	0,14	0,42
<b>IL8</b>	0,00	0,34	-0,02	0,32	0,46	0,28	0,65	0,36	-0,23	0,45	0,08	0,23	-0,04	0,39	-0,27	0,19	-0,21	0,21	-0,08	0,53
<b>JUN</b>	0,00	0,12	0,05	0,16	0,49	0,23	1,02	0,24	0,19	0,42	0,22	0,08	0,46	0,19	-0,17	0,08	0,24	0,16	0,66	0,18
<b>KEAP1</b>	0,00	0,22	0,13	0,20	0,04	0,34	0,01	0,18	0,12	0,12	-0,14	0,12	-0,17	0,17	0,36	0,22	0,07	0,17	-0,10	0,27
<b>LIG1</b>	0,00	0,22	-0,02	0,16	-0,34	0,08	-0,33	0,15	0,02	0,35	-0,26	0,08	-0,48	0,11	0,06	0,09	-0,13	0,22	-0,41	0,14
<b>LIG3</b>	0,00	0,05	-0,08	0,08	-0,29	0,15	-0,32	0,07	0,10	0,29	-0,23	0,07	-0,25	0,07	-0,02	0,04	-0,16	0,09	-0,33	0,18
<b>MAP3K5 (ASK1)</b>	0,00	0,29	-0,33	0,14	-0,30	0,13	-0,12	0,10	-0,50	0,42	-0,50	0,13	-0,38	0,17	-0,25	0,05	-0,36	0,06	-0,19	0,09
<b>MDM2</b>	0,00	0,13	0,05	0,14	0,54	0,15	0,70	0,17	0,27	0,11	0,42	0,02	0,73	0,19	0,05	0,10	0,70	0,08	0,97	0,07
<b>MGMT</b>	0,00	0,20	-0,03	0,09	-0,10	0,28	-0,27	0,24	0,31	0,39	-0,14	0,19	-0,11	0,20	0,20	0,08	0,06	0,11	0,15	0,25
<b>MLH1</b>	0,00	0,04	-0,29	0,06	-0,74	0,11	-0,77	0,03	-0,27	0,13	-0,57	0,09	-0,80	0,13	-0,34	0,13	-0,57	0,04	-0,61	0,08
<b>MSH2</b>	0,00	0,22	-0,37	0,02	-0,68	0,09	-0,86	0,04	-0,42	0,34	-0,73	0,15	-0,87	0,21	-0,33	0,06	-0,89	0,13	-0,97	0,08
<b>MT1X</b>	0,00	0,24	0,43	0,12	0,73	0,17	1,20	0,19	0,52	0,77	0,91	0,32	0,77	0,45	0,01	0,11	-0,41	0,20	-0,74	0,15
<b>MT2A</b>	0,00	0,17	0,75	0,18	0,94	0,12	1,33	0,20	0,50	0,65	1,02	0,31	0,59	0,54	0,55	0,13	0,01	0,17	-0,29	0,04
<b>MYC</b>	0,00	0,18	0,13	0,18	0,11	0,18	0,40	0,16	0,06	0,27	0,08	0,16	-0,02	0,29	0,18	0,08	0,25	0,13	0,24	0,08
<b>NAT1</b>	0,00	0,26	-0,10	0,05	-0,17	0,20	-0,30	0,09	-0,47	0,59	-0,04	0,16	-0,25	0,23	-0,13	0,21	0,01	0,18	-0,11	0,06
<b>NFEL2L</b>	0,00	0,32	0,02	0,04	-0,04	0,11	-0,18	0,11	-0,10	0,16	-0,12	0,13	-0,21	0,33	0,05	0,08	-0,11	0,07	-0,09	0,12
<b>NFKB1</b>	0,00	0,02	-0,09	0,08	0,17	0,23	0,43	0,19	-0,11	0,35	-0,12	0,02	0,21	0,13	0,05	0,11	0,07	0,08	0,49	0,17
<b>NFKB1A</b>	0,00	0,41	0,13	0,20	0,29	0,12	0,94	0,03	-0,02	0,27	0,23	0,08	0,25	0,08	0,20	0,09	0,73	0,10	0,81	0,15
<b>NFKB2</b>	0,00	0,22	0,02	0,05	1,38	0,43	1,93	0,27	0,11	0,25	0,63	0,25	1,43	0,49	0,16	0,14	1,52	0,16	2,14	0,19
<b>NQO1</b>	0,00	0,20	-0,04	0,06	-0,06	0,09	-0,36	0,13	-0,02	0,13	-0,12	0,14	-0,11	0,20	0,02	0,08	-0,21	0,12	-0,27	0,05
<b>OGG1</b>	0,00	0,12	-0,03	0,10	-0,25	0,09	-0,27	0,07	-0,03	0,24	-0,22	0,10	-0,31	0,09	-0,10	0,11	-0,03	0,06	-0,27	0,10

<b>PARP1</b>	0,00	0,04	-0,23	0,14	-0,26	0,17	-0,44	0,13	0,04	0,22	-0,40	0,06	-0,35	0,15	-0,04	0,14	-0,47	0,22	-0,38	0,24
<b>PCNA</b>	0,00	0,18	-0,23	0,05	-0,39	0,12	-0,60	0,09	-0,16	0,22	-0,36	0,07	-0,52	0,23	-0,09	0,15	-0,35	0,08	-0,48	0,24
<b>PLK3</b>	0,00	0,16	-0,01	0,07	-0,05	0,14	0,42	0,05	-0,09	0,08	-0,16	0,13	-0,07	0,08	0,11	0,11	0,17	0,17	0,11	0,27
<b>PMAIP1</b>	0,00	0,44	-0,11	0,12	0,10	0,12	0,52	0,22	-0,42	0,58	-0,11	0,25	-0,06	0,38	-0,19	0,08	0,25	0,16	0,22	0,26
<b>POLB</b>	0,00	0,46	-0,17	0,14	-0,26	0,16	-0,28	0,27	-0,54	0,86	-0,24	0,24	-0,36	0,40	-0,19	0,03	-0,17	0,09	-0,15	0,16
<b>POLD1</b>	0,00	0,14	-0,19	0,11	-0,58	0,20	-0,53	0,15	-0,19	0,13	-0,55	0,06	-0,74	0,13	-0,15	0,15	-0,63	0,18	-0,86	0,20
<b>PPM1D</b>	0,00	0,03	-0,17	0,09	-0,32	0,09	-0,17	0,10	-0,18	0,19	-0,27	0,07	-0,33	0,15	-0,18	0,08	-0,02	0,09	-0,16	0,08
<b>PRDX1</b>	0,00	0,53	0,15	0,17	-0,03	0,22	-0,13	0,20	0,05	0,28	-0,01	0,20	-0,19	0,57	0,11	0,12	-0,07	0,09	-0,03	0,19
<b>RAD50</b>	0,00	0,17	-0,16	0,07	-0,31	0,07	-0,39	0,09	-0,40	0,59	-0,24	0,18	-0,42	0,23	-0,14	0,11	-0,20	0,12	-0,30	0,06
<b>RAD51</b>	0,00	0,13	-0,26	0,04	-0,46	0,02	-0,52	0,06	-0,20	0,07	-0,52	0,09	-0,64	0,09	-0,10	0,07	-0,53	0,07	-0,57	0,04
<b>RRM2B</b>	0,00	0,10	-0,02	0,08	-0,13	0,16	-0,37	0,03	-0,37	0,82	-0,20	0,12	-0,34	0,30	0,07	0,14	-0,04	0,19	-0,05	0,15
<b>SIRT2</b>	0,00	0,21	0,12	0,12	0,19	0,20	0,42	0,20	0,13	0,33	0,28	0,16	0,30	0,32	-0,01	0,07	0,28	0,14	0,33	0,14
<b>SLC30A1</b>	0,00	0,23	-0,04	0,03	-0,33	0,05	-0,18	0,11	-0,61	0,79	-0,21	0,11	-0,62	0,38	-0,25	0,08	-0,79	0,09	-1,36	0,08
<b>SOD1</b>	0,00	0,40	-0,17	0,16	-0,32	0,18	-0,18	0,19	-0,24	0,16	-0,22	0,22	-0,39	0,28	-0,25	0,08	-0,26	0,08	-0,23	0,12
<b>SOD2</b>	0,00	0,08	-0,11	0,18	0,70	0,33	1,33	0,29	0,09	0,29	0,29	0,20	0,94	0,19	-0,19	0,10	0,60	0,23	1,40	0,20
<b>SULT1A</b>	0,00	0,50	0,29	0,17	0,10	0,31	0,06	0,15	0,25	0,28	0,18	0,18	-0,08	0,55	0,40	0,31	0,52	0,09	0,35	0,27
<b>TFRC</b>	0,00	0,28	0,39	0,07	0,44	0,16	0,66	0,22	-0,13	0,63	0,38	0,10	0,27	0,32	0,29	0,08	0,62	0,22	0,75	0,17
<b>TNFRSF10B</b>	0,00	0,30	0,04	0,13	0,61	0,33	1,08	0,40	0,38	0,55	0,31	0,16	0,70	0,38	0,13	0,10	0,52	0,15	0,95	0,16
<b>TP53</b>	0,00	0,16	0,42	0,10	0,63	0,18	0,38	0,26	0,80	0,21	0,61	0,13	0,75	0,20	0,55	0,16	0,86	0,06	0,81	0,14
<b>TXN</b>	0,00	0,70	0,19	0,18	0,26	0,38	0,14	0,29	-0,14	0,71	0,12	0,24	0,06	0,80	0,28	0,22	0,24	0,20	0,26	0,32
<b>TXNRD1</b>	0,00	0,10	-0,03	0,29	-0,30	0,23	-0,28	0,10	-0,11	0,14	-0,25	0,13	-0,39	0,10	-0,19	0,14	-0,31	0,24	-0,56	0,19
<b>UGT1</b>	0,00	0,50	0,22	0,14	-0,25	0,29	-0,52	0,20	0,09	0,32	0,11	0,23	-0,54	0,61	0,30	0,33	0,06	0,10	-0,52	0,29
<b>VEGFA</b>	0,00	0,40	0,72	0,11	1,01	0,33	1,51	0,36	0,70	0,22	0,92	0,11	0,89	0,29	0,38	0,17	0,92	0,24	1,23	0,38
<b>XIAP</b>	0,00	0,36	0,21	0,04	-0,03	0,20	0,12	0,10	-0,36	0,86	-0,05	0,11	-0,22	0,52	0,14	0,10	0,03	0,24	0,08	0,13
<b>XPA</b>	0,00	0,07	-0,32	0,07	-0,30	0,05	-0,43	0,08	0,03	0,45	-0,33	0,13	-0,24	0,16	-0,23	0,10	-0,33	0,18	-0,26	0,06
<b>XPC</b>	0,00	0,09	-0,12	0,14	0,05	0,11	0,02	0,14	0,10	0,03	-0,14	0,05	0,16	0,11	0,14	0,11	0,18	0,12	0,30	0,10
<b>XRCC5</b>	0,00	0,09	-0,11	0,06	-0,43	0,06	-0,54	0,13	-0,23	0,29	-0,36	0,12	-0,55	0,17	-0,06	0,06	-0,40	0,19	-0,47	0,17

A)



B)



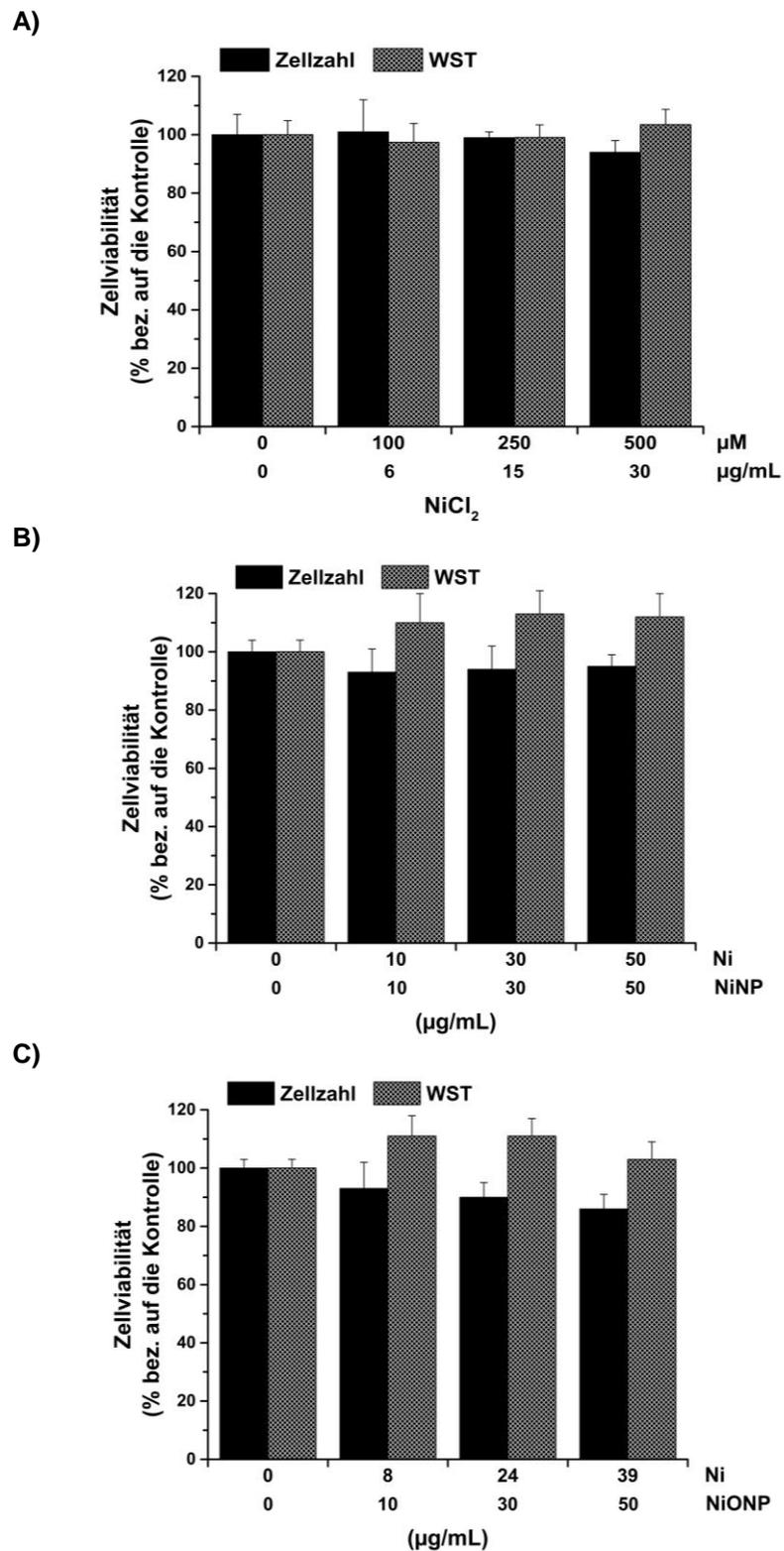
**Abbildung 31: Zeit- und konzentrationsabhängige Anzahl von reprimierten Genen nach Behandlung mit verschiedenen Nickelverbindungen in A) BEAS-2B und B) A549 Zellen.** Die Zellen wurden mit verschiedenen Nickelverbindungen für 6 und 24 h inkubiert. Die Analyse der mRNA erfolgte mittels RT-qPCR, wobei die Werte auf die unbehandelte Kontrolle normiert und auf die Referenzgene *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *GUSB*, *HPRT1* normalisiert wurden. Dargestellt ist die Anzahl der signifikant mehr als 2-fach reprimierten Gene pro Zeitpunkt und Konzentration aus vier Bestimmungen von zwei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichungen zur Kontrolle wurden mit ANOVA und Dunnett's Post-Hoc Test bestimmt ( $n = 4$ ;  $p \leq 0,05$ ).

Tabelle 26: Spearman-Korrelationsanalyse der Genexpressiondaten aus BEAS-2B Zellen nach 24 h Inkubation mit NiCl<sub>2</sub>, NiNP und NiONP. Die Analyse der mRNA erfolgte mittels RT-qPCR, wobei die Werte auf die unbehandelte Kontrolle normiert und auf die Referenzgene *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *GUSB*, *HPRT1* normalisiert wurden. Zur Auswertung wurde der Mittelwert aus vier Bestimmungen von zwei unabhängigen Versuchen herangezogen.

	Ni (µg/mL)	NiCl <sub>2</sub>			NiNP			NiONP		
		10	30	50	10	30	50	10	30	50
NiCl <sub>2</sub>	10	1,00	0,78	0,80	0,76	0,72	0,73	0,78	0,76	0,72
	30	0,78	1,00	0,97	0,95	0,96	0,96	0,94	0,96	0,95
	50	0,80	0,97	1,00	0,89	0,90	0,91	0,88	0,90	0,90
NiNP	10	0,76	0,95	0,89	1,00	0,99	0,98	0,99	0,98	0,96
	30	0,72	0,96	0,90	0,99	1,00	0,99	0,98	0,99	0,98
	50	0,73	0,96	0,91	0,98	0,99	1,00	0,97	0,98	0,96
NiONP	10	0,78	0,94	0,88	0,99	0,98	0,97	1,00	0,98	0,97
	30	0,76	0,96	0,90	0,98	0,99	0,98	0,98	1,00	0,99
	50	0,72	0,95	0,90	0,96	0,98	0,96	0,97	0,99	1,00

Tabelle 27: Spearman-Korrelationsanalyse der Genexpressiondaten aus A549 Zellen nach 24 h Inkubation mit NiCl<sub>2</sub>, NiNP und NiONP. Die Analyse der mRNA erfolgte mittels RT-qPCR, wobei die Werte auf die unbehandelte Kontrolle normiert und auf die Referenzgene *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *GUSB*, *HPRT1* normalisiert wurden. Zur Auswertung wurde der Mittelwert aus vier Bestimmungen von zwei unabhängigen Versuchen herangezogen.

	Ni (µg/mL)	NiCl <sub>2</sub>			NiNP			NiONP		
		10	30	50	10	30	50	10	30	50
NiCl <sub>2</sub>	10	1,00	0,70	0,65	0,46	0,84	0,60	0,71	0,70	0,52
	30	0,70	1,00	0,92	0,55	0,92	0,95	0,50	0,81	0,85
	50	0,65	0,92	1,00	0,40	0,85	0,89	0,33	0,78	0,83
NiNP	10	0,46	0,55	0,40	1,00	0,50	0,59	0,58	0,37	0,37
	30	0,84	0,92	0,85	0,50	1,00	0,88	0,54	0,85	0,76
	50	0,60	0,95	0,89	0,59	0,88	1,00	0,44	0,80	0,85
NiONP	10	0,71	0,50	0,33	0,58	0,54	0,44	1,00	0,54	0,41
	30	0,70	0,81	0,78	0,37	0,85	0,80	0,54	1,00	0,90
	50	0,52	0,85	0,83	0,37	0,76	0,85	0,41	0,90	1,00



**Abbildung 32: Bestimmung der zytotoxischen Wirkung von A) NiCl<sub>2</sub>, B) NiNP und C) NiONP in HeLa S3 Zellen.** Die Zellen wurden mit Nickelverbindungen für 24 h behandelt und die Zytotoxizität anhand der Zellzahl und mit Hilfe des WST-Assays bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD relativ zu der Kontrolle aus mindestens drei unabhängigen Versuchen (n = 3).