

# **Untersuchungen zur Toxizität von nanopartikelhaltigen Aerosolen nach Exposition über ein *air-liquid interface***

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften  
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Matthias Wilhelm Hufnagel

aus

Schwabach

KIT-Dekan: Prof. Dr. Reinhard Fischer

1. Referentin: Prof. Dr. Andrea Hartwig

2. Referent: PD Dr. Carsten Weiss

Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.2018



---

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Darüber hinaus erkläre ich, dass die Arbeit nicht anderweitig als Prüfungsarbeit oder als Dissertation bei einer anderen Fakultät verwendet wird oder wurde.

Karlsruhe, den 05.09.2018

Matthias Wilhelm Hufnagel



*"Das Verfassen einer Dissertation ist kein Sprint, es ist ein Marathon."*

Dr. Martin Waterstraat



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
2.1	Nanomaterialien - Innovation und Risiko . . . . .	7
2.1.1	Aufnahmemechanismen . . . . .	8
2.1.2	Kupfer(II)-oxid Nanopartikel . . . . .	11
2.1.3	Titan(IV)-dioxid Nanopartikel . . . . .	13
2.1.4	Nanokomposite . . . . .	14
2.2	Expositionsmethoden . . . . .	16
2.2.1	Problematik submerser Nanopartikelexpositionen . . . . .	17
2.2.2	Exposition über ein <i>air-liquid interface</i> . . . . .	19
2.2.2.1	Diskontinuierliche ALI-Exposition . . . . .	20
2.2.2.2	Kontinuierliche ALI-Exposition . . . . .	22
2.2.2.3	Vergleichbarkeit von ALI-Expositionen mit submersen Zellkultur- und Tierversuchsexpositionen . . . . .	24
<b>3</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>25</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>27</b>
4.1	Material . . . . .	27
4.2	Methoden . . . . .	27
4.2.1	Transmissionselektronenmikroskopie . . . . .	27
4.2.2	Endotoxintest . . . . .	27
4.2.3	Zellkulturexperimente . . . . .	28
4.2.3.1	Zellkultivierung . . . . .	28
4.2.3.2	Exposition an der Vitrocell® <i>Cloud</i> . . . . .	29
4.2.3.3	Exposition an der Vitrocell® <i>Automated Exposure Station</i> . . . . .	31
4.2.3.4	Zytotoxizitätsbestimmung . . . . .	33
4.2.3.5	Genexpressionsanalysen . . . . .	34
4.2.3.6	Zellulären Aufnahme mittels GF-AAS . . . . .	39
4.2.3.7	Durchflusszytometrische Bestimmung der zellulären Aufnahme . . . . .	41

4.2.3.8	Durchflusszytometrische Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies . . . . .	42
4.2.3.9	Quantifizierung von DNA-Strangbrüchen . . . . .	43
4.2.3.10	Induktion von Apoptose und Nekrose . . . . .	45
<b>5</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>47</b>
5.1	Etablierung einer ALI-Exposition mit Hilfe von Referenzpartikeln . . . . .	47
5.1.1	Bestimmung der Partikelgrößenverteilung . . . . .	47
5.1.2	Untersuchungen zur Zytotoxizität . . . . .	50
5.1.2.1	Einfluss der Kultivierungs- und Expositionsmethode . . . . .	50
5.1.2.2	Eingesetzte Partikeldepositionen . . . . .	51
5.1.2.3	Zytotoxizität von TiO <sub>2</sub> und CuO Nanopartikeln . . . . .	51
5.1.3	Untersuchung des Wirkmechanismus nach ALI-Exposition . . . . .	55
5.1.3.1	Zelluläre Aufnahme und Bioverfügbarkeit . . . . .	56
5.1.3.2	Induktion einer zellulären Stressreaktion . . . . .	62
5.1.3.3	Induktion der DNA-Schadensantwort und spezifischer DNA-Reparaturproteine . . . . .	70
5.1.3.4	Induktion der Apoptose und Einfluss auf den Zellzyklus . . . . .	75
5.1.3.5	Beeinflussung der Expression von Genen des Fremdstoffmetabolismus . . . . .	81
5.2	Toxikologische Untersuchungen zur thermischen Verwertung von Nanokompositen . . . . .	83
5.2.1	Applizierte Dosis während der Exposition von A549-Zellen . . . . .	84
5.2.2	Beeinflussung des Genexpressionsprofils von A549-Zellen durch Verbrennungsaerosole . . . . .	85
5.2.3	Induktion von DNA-Strangbrüchen in A549-Zellen durch Verbrennungsaerosole . . . . .	90
5.2.4	Applizierte Dosis während der Exposition von 3D-Lungenzellkulturen . . . . .	92
5.2.5	Beeinflussung des Genexpressionsprofils von 3D-Lungenzellkulturen durch Verbrennungsaerosole . . . . .	93
5.2.6	Induktion von DNA-Strangbrüchen in 3D-Lungenzellkulturen durch Verbrennungsaerosole . . . . .	96
<b>6</b>	<b>Zusammenfassende Diskussion</b>	<b>101</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>115</b>

<b>8</b>	<b>Chemikalien und Instrumente</b>	<b>137</b>
8.1	Chemikalien . . . . .	137
8.2	Lösungen und Puffer . . . . .	139
8.3	Verwendete Kits . . . . .	140
8.4	Verbrauchsmaterialien . . . . .	140
8.5	Instrumente und Software . . . . .	142
 <b>9</b>	 <b>Anhang</b>	 <b>145</b>
9.1	Zelllinien Authentifizierung . . . . .	145
9.2	Liste der untersuchten Gene . . . . .	146
9.3	Ergänzende Daten zur Bestimmung des zellulären Kupfergehalts . . . . .	147
9.4	Ergänzende Daten zur Quantifizierung von DNA-Strangbrüchen . . . . .	148
9.5	Detaillierte Darstellung zur Beeinflussung der Genexpression . . . . .	149
9.6	Ergänzende Daten zur Bestimmung gelöster Partikelfraktionen . . . . .	152
9.7	Vergleich der Zellzyklusverteilung zwischen submers und ALI kultivierten Zellen	153
9.8	Partikeldurchmesser der Verbrennungsaerosole . . . . .	154
9.9	Einfluss der Hochspannung und des Stabilisators auf das Genexpressionsprofil .	155
9.10	LDH-Freisetzung der Reinluftkontrollen . . . . .	157
9.11	Induktion von Strangbrüchen durch das Anlegen einer Hochspannung und den Stabilisator . . . . .	158
9.12	Donorinformationen 3D-Lungenzellkultur . . . . .	160
9.13	Qualitative VOV-Analyse . . . . .	161
9.14	Tabellarische Zusammenfassung «Toxnet» Recherche . . . . .	166
 <b>10</b>	 <b>Publikationsliste</b>	 <b>167</b>



# Abkürzungsverzeichnis

**ALI** *air-liquid interface*

**AU** Alkalische Entwindung

**Bp** Basenpaare

**CAC** Reinluftkontrolle

**CFA** Koloniebildungsfähigkeit

**CNT** *carbon nanotubes*

**DMEM** *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

**ELPI** Elektrischer Niederdruckimpaktor

**FACS** Durchflusszytometrie

**GF-AAS** Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie

**HS** Hochspannung

**HT RT-qPCR** *high-throughput* RT-qPCR

**MT** Metallothionein

**MTF-1** *metal-regulatory transcription factor 1*

**NM** Nanomaterialien

**NOAEL** *No Observed Adverse Effect Level*

**NP** Nanopartikel

**PE** Polyethylen

**QCM** Quarzkristall-Mikrowaage

**ROS** Reaktive Sauerstoffspezies

**SD** Standardabweichung

**SMPS** *Scanning Mobility Particle Sizer*

**SSC** Seitwärtsstreulicht

**SOD** Superoxiddismutase

**SVOC** *semi volatile organic compounds*

**TEM** Transmissionselektronenmikroskopie

**TVOC** *totale volatile organic compounds*

**VOC** *volatile organic compounds*

# 1 Zusammenfassung

Aufgrund ihrer einzigartigen Eigenschaften werden Nanomaterialien (NM) immer häufiger in verschiedensten Produkten verwendet. Dabei verändern nanoskalige Verbindungen nicht nur die Eigenschaften der Materialien, in die sie integriert werden, wie z.B. das Abbrennverhalten von Nanokompositen, sondern im Vergleich zu ihren mikroskaligen Pendanten auch ihre eigenen physikochemischen Eigenschaften. Daraus resultiert aufgrund des erhöhten Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnisses auch eine gesteigerte Toxizität. Bisher wurden die meisten Zellkulturstudien zur Untersuchung toxischer Effekte durch NM unter submersen Bedingungen durchgeführt. Diese Kultivierungsbedingungen stellen jedoch kein optimales System für die Untersuchung einer inhalationstoxischen Wirkung von NM dar. So ist beispielsweise die Aussage einer exakten Dosimetrie erschwert, zudem spiegelt eine submerse Kultivierung nicht die physiologischen Bedingungen der Lunge wider. Abhilfe für diese Problematiken kann die Kultivierung über ein *air-liquid interface* (ALI) schaffen. Hierbei werden Zellen, ähnlich wie im Alveolarbereich der Lunge, auf einer Grenzfläche zwischen Luft (Atmosphäre) und Zellkulturmedium (Blut) kultiviert. Durch die Verwendung geeigneter ALI-Expositionssysteme ist zudem eine online-Erfassung der deponierten Dosis mit Hilfe einer Quarzkristall-Mikrowaage (QCM) möglich.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Nutzung eines ALI-Expositionssystems (Vitrocell® Cloud) etabliert. Im Zuge dessen wurde der Einfluss von TiO<sub>2</sub> und CuO NP auf die alveolare Lungenepithelzelllinie A549 nach ALI-Exposition untersucht. Dabei wurde zunächst die zytotoxische Wirkung beider Partikelspezies ermittelt, wobei lediglich CuO NP eine dosisabhängige Toxizität aufwies. Um ein umfassendes Bild zum Einfluss der NP auf das untersuchte Zellmodell zu erhalten, wurden Genexpressionsanalysen mit Hilfe einer innovativen Hochdurchsatz RT-qPCR Methode angefertigt und die Beobachtungen auf funktioneller Ebene verifiziert. Unter dem Einfluss von CuO NP zeigte sich eine gesteigerte Expression von Genen, die insbesondere durch lösliche Metallionen vermehrt exprimiert werden und an der Metallhomöostase beteiligt sind. Dies deutete auf eine endozytotische Aufnahme und lysosomale Prozessierung der CuO NP hin, eine Prozessabfolge, die als *trojan horse type* Mechanismus bezeichnet wird. Eine dosisabhängige Aufnahme und intrazelluläre Auflösung dieser NP konnte auf funktioneller Ebene bestätigt werden. Zusätzlich wurde auch eine vermehrte Expression von Genmarkern einer oxidativen Stressantwort ermittelt. Diese Beobachtung konnte durch eine durchflusszytometrische Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) bestätigt werden, jedoch zeigte die Genexpressionsanalyse ein wesentlich

sensitiveres Ergebnis. Zudem konnte auf die Aktivierung der redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 auf Transkriptionsebene geschlossen werden, die vermutlich aus der Induktion von oxidativem Stress durch eine Kupfer-Ionen Überladung resultiert. Ebenso wurde eine inflammatorische Antwort auf CuO NP durch eine Expression des Gens *IL8* angedeutet. Eine gesteigerte Transkription von *DDIT3* und *GADD45* wies auf eine genotoxische Wirkung dieser NP hin, die in Form von DNA-Strangbrüchen auf funktioneller Ebene verifiziert werden konnte. Es wurde daher eine Induktion von DNA-Strangbrüchen, möglicherweise bedingt durch einen erhöhten Gehalt an ROS, postuliert. Des Weiteren zeigte die Genexpressionsanalyse, insbesondere unter dem Einfluss hoher Dosierungen, die Induktion eines apoptotischen Zelltodes durch CuO NP an. Jedoch wurde durch eine durchflusszytometrische Analyse vielmehr das Einsetzen der Nekrose festgestellt. Auf Transkriptionsebene konnte zudem eine Beeinflussung von Genen beobachtet werden, die den Gruppen der Zellzykluskontrolle und des Fremdstoffmetabolismus zugehörig sind. Unter dem Einfluss von TiO<sub>2</sub> NP konnte keine Beeinflussung auf transkriptionellen und funktionellen Ebene festgestellt werden, obwohl eine intrazelluläre Verfügbarkeit dieser NP durchflusszytometrisch nachgewiesen wurde. Daraus resultiert die These, dass diese NP unter den in dieser Arbeit verwendeten Dosierungen und Inkubationszeiten keine toxischen Effekte auslösen.

Zusätzlich wurde im Rahmen des Projekts «ProCycle» der Einfluss von Verbrennungsaerosolen aus der thermischen Verwertung von Nanokompositen (Matrix: Polyethylen (PE); Füllmaterial: TiO<sub>2</sub>, CuO, CNT) untersucht. Im Fokus standen hierbei die Beeinflussung der Genexpression in A549-Zellen und einem 3D-Zellkulturmodells sowie die Erfassung eines genotoxischen Potentials der Verbrennungsaerosole auf die Zellmodelle. Hierbei zeigten im Wesentlichen die Verbrennungsprodukte PE-haltiger Materialien eine Beeinflussung des Genexpressionsprofils beider Zellmodelle. Hinsichtlich der A549-Zellen konnte dabei eine gesteigerte Expression von oxidativen Stressmarkern (*HMOX1*, *HSPA1A*) sowie eines Gens der DNA-Schadensantwort (*GADD45A*) beobachtet werden. Das 3D-Zellkulturmodell zeigte eine geringere Antwort auf die Verbrennungsaerosole, hier konnte eine gesteigerte Expression des Gens *IL8* festgestellt werden. Bezüglich der Induktion von DNA-Strangbrüchen konnte ein ähnliches Muster hinsichtlich eines toxischen Effektes durch die Verbrennung von PE-haltigen Materialien beobachtet werden, wobei kein wesentlicher Unterschied zwischen beiden Zellsystemen erkannt wurde. Anhand des gewählten Versuchsaufbaus konnte zudem gezeigt werden, dass vor allem die entstehende Gasphase für die beobachteten Effekte verantwortlich war. Zudem zeigten lediglich zwei Expositionen (PE, PE + TiO<sub>2</sub> NP) eine erhöhte Anzahl an DNA-Strangbrüchen durch eine Dosiserhöhung und damit einen durch Partikel induzierten Effekt. Eine qualitative Analyse des Gasgemisches ergab einen Einblick in die Zusammensetzung der Verbrennungsprodukte, jedoch war aufgrund der Komple-

---

xität des Gemisches keine eindeutige Aussage über den Ursprung der beobachteten Effekte möglich.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass ALI-Expositionssysteme ein wertvolles Werkzeug darstellen, um den toxischen Einfluss von NM-haltigen Aerosolen zu untersuchen. Dies schließt sowohl Aerosole reiner NM als auch freigesetzter NM aus Verbundmaterialien ein. In Kombination mit einer innovativen Methode zur Untersuchung einer Beeinflussung des Genexpressionsprofils konnte eine dosisabhängige Wirkung von CuO NP unter Verwendung der Vitrocell® *Cloud* gezeigt werden. Diese Untersuchungen bildeten die Grundlage der Verwendung des technisch anspruchsvolleren Expositionssystems, der Vitrocell® *Automated Exposure Station*, mit dem neben der partikulären auch die Gasphase von Verbrennungsaerosolen untersucht wurde. Dabei konnten die ausbleibenden adversen Effekte der partikulären Aerosolfraktion anhand des zuvor ermittelten *no observed adverse effect levels* (NOEAL), und damit einer geringen deponierten Dosis, begründet werden. Die beobachtete Veränderung des Genexpressionsprofils sowie die entstandenen DNA-Schäden waren somit auf die verbrennungsinduzierte Gasphase PE-haltiger Materialien zurückzuführen.

## Abstract

Due to their unique properties nanomaterials (NM) are widely used in various applications. Thereby, NM do not only change characteristics of the respective products, e.g. combustion properties of nanocomposites, they also show altered physicochemical properties compared to their macroscaled equivalents. Closely associated with this phenomena an enhanced toxicological potential of nanoscaled materials compared to macroscaled equivalents is known. So far most *in vitro* studies elucidating the toxicological potential of NM have been performed under submerged conditions. However, this cultivation method is not representing an appropriate system for an toxicological evaluation of airborne NM since only the applied dose can be stated without the use of computational models or further experiments and the physiological conditions of the respiratory tract are not reflected by the use of a submerged model. To overcome these limitations, cell cultures can be grown at an air-liquid interface (ALI), whereby cell culture media and ambient air represent the liquid and the air phase, respectively. Along with the use of an appropriate exposure system it is also possible to obtain the deposited mass using a quartz crystal microbalance (QCM).

Within this thesis the use of an ALI exposure system to elucidate the toxicological potential of airborne nanoparticles was established. Using this system cytotoxicity of both TiO<sub>2</sub> and CuO NP was investigated, with only CuO NP showing dose-dependent cytotoxic effects. Furthermore, the impact of both NP species on the gene expression profile of human alveolar epithelial cells (A549) was conducted using an innovative high-throughput RT-qPCR (HT RT-qPCR) method. The observed effects on transcriptional level were subsequently followed up at a functional level. After an exposure to CuO NP an increased expression of genes associated with metal homeostasis was observed indicating an endocytotic uptake and lysosomal degradation of this particle species; an uptake procedure which is also known as trojan horse type mechanism. GF-AAS analysis was performed to verify this observation on a functional level and showed a dose-dependent increase of cellular copper concentration after CuO NP exposure. Besides metal homeostasis, an enhanced expression of oxidative stress markers and redox-sensitive transcription factors (NF- $\kappa$ B, AP-1) was determined, indicating an induction of oxidative stress. Therefore, a flowcytometric assay was performed to evaluate the induction of reactive oxygen species (ROS), revealing on the one hand a dose-dependent increase of ROS levels and on the other hand a less sensitive result in comparison to the gene expression analysis. Additionally, a slight proinflammatory response and genotoxic effect was determined by an enhanced *IL8*, *DDIT3* and *GADD45* expression, respectively. The genotoxic potential was also demonstrated dose-dependently on a functional level using Alkaline Unwinding (AU) indicating the induction of DNA strand breaks. Since CuO NP also revealed an increased expression of genes coding for DNA double-strand break repair proteins, an induction of DNA double-strand breaks by an enhanced ROS level could be anticipated. Moreover, exposure

---

to CuO NP resulted in an increased expression of proapoptotic and a decreased expression of antiapoptotic factors, thus indicating an induction of apoptosis, in particular at high doses. However, a flowcytometric distinction of apoptosis and necrosis revealed rather necrotic than apoptotic effects. Furthermore, the exposure to CuO NP resulted in altered gene expression patterns of cell cycle regulators and genes associated with xenobiotic metabolism. In contrast, A549 did not show any effects on the transcriptional or functional level after ALI-exposure to TiO<sub>2</sub> NP. To validate these data, the uptake of TiO<sub>2</sub> NP was examined using a flowcytometry-based method. The results indicated an cellular uptake of these particles leading to the assumption that these TiO<sub>2</sub> NP were not reactive at the applied doses and investigated incubation periods.

Besides these studies, the impact of combustion generated aerosols from recycling processes of nanocomposites (matrix: polyethylene (PE); fill material: TiO<sub>2</sub>, CuO, CNT) on gene expression profiles in A549 cells and a 3D-cell culture model was investigated. Furthermore, the genotoxic potential of these aerosols was evaluated within the frame of the «ProCycle» project. An enhanced expression of oxidative stress markers (*HMOX1*, *HSPA1A*) in A549 cells was observed after the exposure to combustion aerosols of PE-based materials. The same pattern was observed for *GADD45*, indicating DNA damage signalling. Regarding gene expression analysis, the 3D-cell culture showed an increased *IL8*-expression and, all in all, less pronounced effects compared to A549 cells. The genotoxic potential of the combustion aerosols was followed up using AU and thus the induction of DNA strand breaks. Here, only the combustion of PE-based materials revealed an increase of DNA strand breaks while no relevant difference between the two cell models was obtained. To further elucidate the origin of the observed effects, filters were installed upstream to the cell culture to expose cells only to the gaseous phase. This experimental setup revealed no difference between the exposures to the whole aerosol, suggesting that the gaseous fraction is the driving force behind the adverse effects. Additionally, in two analysis the deposition of higher particle doses resulted in an increase of DNA strand breaks. This indicated that under the used conditions the applied particle doses might be too low to induce effects. To qualify the gaseous phase a VOC-analysis was performed, revealing a complex mixture of compounds leading to the conclusion that no single compound can be made responsible for the observed toxic effects.

Altogether, the ALI exposure system has been shown to be a valuable exposure system assessing the impact of nanoparticles as well as nanocomposites. Together with up-to-date procedures to assess the transcriptional response, dose-dependent effects of CuO NP have been observed using the Vitrocell® Cloud system. Furthermore, it was possible to reinforce these outcomes using the more sophisticated Vitrocell® Automated Exposure Station, as only low particles were applied and therefore no particle induced effects have been observed. Hence, the detected adverse effects can be traced back to the combustion-generated gaseous fraction of PE-based materials.



# 2 Einleitung

## 2.1 Nanomaterialien - Innovation und Risiko

Die Verwendung von NM in einer Vielzahl von Produkten prägt sowohl heutige als auch zukünftige Industriezweige, wie beispielsweise die Lebensmittel- und Elektronikindustrie, enorm (Hansen *et al.* 2016; zusammengefasst in Choi *et al.* 2016, Kharisov *et al.* 2017, Thiruvengadam *et al.* 2018, Yao und Zhu 2015). Hierbei eingesetzte NM werden dabei in unterschiedlicher Weise definiert. So beschreibt die ISO alle Verbindungen als NM, die entweder eine Oberflächenstruktur oder eine innere bzw. äußere Dimension im nanoskaligen Bereich (1 - 100 nm) besitzen, während die Europäische Kommission jegliche Materialien als NM definiert, die zumindest 50 % der ungebundenen, agglomerierten oder aggregierten Partikel in einer Skalierung zwischen 1 - 100 nm aufweisen. Dabei muss mindestens eine äußere Dimension im vorgegebenen Bereich vorhanden sein (zusammengefasst in Laux *et al.* 2017). Die Herstellung dieser Materialien kann sowohl durch das *top-down*- als auch durch das *bottom-up*-Verfahren erfolgen. Dabei beschreibt die *top-down*-Herstellung eine destruktive Methode zur Generierung von NM aus makroskaligen Verbindungen der gleichen chemischen Zusammensetzung durch beispielsweise Mahlprozesse oder Laserablation. Im Gegensatz hierzu werden beim *bottom-up*-Verfahren NM durch chemische Synthesen hergestellt, wobei insbesondere Fällungsreaktionen eine wichtige Rolle spielen (zusammengefasst in Khan *et al.* 2017). Durch die steigende Präsenz dieser innovativen Materialien in diversen Gebrauchsgegenständen wird die mögliche Exposition gegenüber NM erhöht (Piccinno *et al.* 2012, Vance *et al.* 2015). Diese gesteigerte Exposition kann sowohl Arbeitnehmer der verarbeitenden Industrie als auch Konsumenten entsprechender Güter betreffen, wobei eine Aufnahme dieser Materialien über den Gastrointestinaltrakt, die Haut sowie den Respirationstrakt erfolgen kann. Hierbei stellt die inhalative Aufnahme, insbesondere während Verarbeitung NM-haltiger Produkte, den wichtigsten Aufnahmeweg dar (zusammengefasst in Ding *et al.* 2017 und Kuhlbusch *et al.* 2018). Im Respirationstrakt findet dabei eine größenabhängige Deposition der NM statt, die sowohl den nasopharyngealen Bereich also auch die bronchialen und alveolaren Abschnitte der Lunge betrifft (zusammengefasst in Oberdörster *et al.* 2005). Während in den oberen Atemwegen NM über den mukoziliären Reinigungsapparat ohne große Schwierigkeiten aus der Lunge entfernt werden können, ist dies in den unteren Atemwegen nicht mehr gegeben.

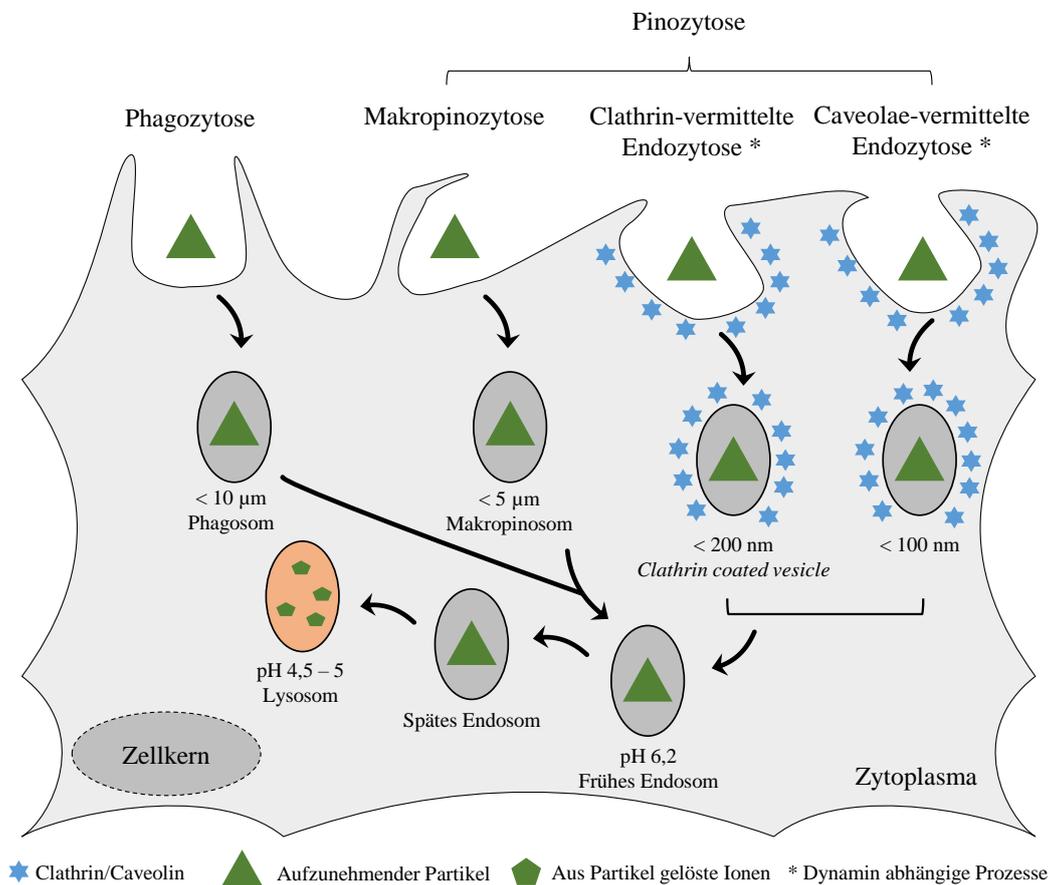
Inhalierte NM werden hier hauptsächlich von Makrophagen phagozytiert und durch diese sogenannten Fresszellen zum mukoziliären Reinigungsapparat oder durch das alveolare Epithel zu Lymphknoten transportiert. Allerdings zeigt der Schutzmechanismus der unteren Atemwege keine große Effektivität auf, sodass ein Transfer durch das Lungenepithel und damit eine systemische Verfügbarkeit von Partikeln möglich ist (zusammengefasst in Buzea *et al.* 2007 und Oberdörster *et al.* 2005). Eine erhöhte toxische Wirkung von nanoskaligen Materialien im Vergleich zu mikroskaligen Verbindungen gleicher chemischer Zusammensetzung ist bereits bekannt und wird mit dem vielfach erhöhten Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis nanoskaliger Materialien begründet (zusammengefasst in Oberdörster *et al.* 2005 und Oberdörster 2010). Auf Basis dieser Erkenntnisse entstand mit der Nanotoxikologie eine neue Wissenschaftsdisziplin, die sich der Aufklärung toxischer Wirkungen nanoskaliger Materialien widmet. Im Folgenden werden Aufnahmemechanismen erörtert, durch die Nanopartikel (NP) in die Zelle gelangen können und anschließend die Wirkmechanismen metallbasierter NP anhand zweier Referenzpartikel erläutert.

### 2.1.1 Aufnahmemechanismen

Nanopartikel werden mit Hilfe der Endozytose in Zellen aufgenommen, dabei kann zwischen zwei endozytotischen Mechanismen unterschieden werden: Phago- und Pinozytose. Dabei werden durch die Phagozytose hauptsächlich Viren, Bakterien und absterbende Zellen, aber auch Partikel zwischen 0,5 und 10  $\mu\text{m}$  aufgenommen. Jedoch bleibt dieser Aufnahmemechanismus nur speziellen Zelltypen vorbehalten, u.a. Makrophagen und Neutrophilen. Im Unterschied dazu sind jegliche Zelltypen zur Pinozytose befähigt, die in weitere Aufnahmemechanismen unterteilt ist: die Clathrin- und Caveolae-vermittelte sowie davon unabhängige Endozytose und die Mikropinozytose. Die Pinozytose dient generell zur Aufnahme von Makromolekülen, ermöglicht aber auch die Internalisierung von NP kleiner als 500 nm. Eine schematische Darstellung der jeweiligen Aufnahmemechanismen ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

Der phagozytotische Aufnahmeprozess von NP wird in drei Schritte untergliedert. Im ersten Schritt erfolgt die Opsonisierung der NP, die der Erkennung der NP durch phagozytierenden Zellen dient. Dort binden die opsonisierten NP im zweiten Schritt an Membranrezeptoren, wodurch eine intrazelluläre Signalkaskade aktiviert wird. Diese führt im letzten Schritt zur Aufnahme der NP in die Zelle. Der Aufnahmemechanismus basiert dabei auf einer Polymerisation von Actin, die in einer Reorganisation der Actinfilamente und einer Membranausstülpung resultiert. Diese umschließt die Partikel und führt zum Abschnüren eines Phagosoms. Anschließend verschmilzt dieses innerhalb der Zelle mit weiteren Vesikeln und reift so schrittweise zum Lysosom. Aufgrund der

dort anzutreffenden membranständigen V-Typ-ATPase herrscht innerhalb dieser zellulären Vesikel mit pH 4,5 - 5 ein leicht saures Milieu (zusammengefasst in Flannagan *et al.* 2012, Hasanzadeh *et al.* 2015, Oh und Park 2014).



**Abbildung 2.1: Schematische Darstellung verschiedener Aufnahmemechanismen zur Internalisierung von Nanopartikeln sowie deren intrazelluläre Prozessierung.** Dabei ist es von der Partikelgröße abhängig, ob die Aufnahme durch Phagozytose, Makropinozytose oder Clathrin- bzw. Caveolae-vermittelte Endozytose stattfindet. Die aufgenommenen Nanopartikel werden in Vesikeln von einem frühen Endosom (pH 6,2) über ein spätes Endosom zu einem Lysosom (pH 4,5 - 5) innerhalb der Zelle prozessiert (modifiziert nach Hasanzadeh *et al.* 2015, Oh und Park 2014).

Die Makropinozytose stellt im Vergleich zu der Clathrin- und Caveolae-vermittelten Endozytose einen rezeptorunabhängigen Aufnahmeart der Pinozytose dar. Hierbei wird, ähnlich der Phagozytose, durch die Ausstülpung der Zellmembran aufgrund einer Actinpolymerisation ein Vesikel gebildet. Dieses kann auch Größen im Mikrometermaßstab aufweisen und wird analog zum Phagosom intrazellulär prozessiert. Bei Clathrin handelt es sich um ein nicht membranständiges Protein, das nach der Bindung eines Liganden, z.B. Transferrin, an Membranrezeptoren eine Mem-

braneinstülpung (sog. *Clathrin-coated pits*) an dieser Stelle einleitet. Mit Hilfe des Proteins Dynamin wird diese Einstülpung schließlich zu einem Vesikel abgeschnürt, das in der Regel kleiner als 200 nm ist. Durch Actinfilamente werden diese *Clathrin-coated vesicles* weiter in das Zellinnere transportiert, wo sich schließlich Clathrin von der Vesikelaußenseite wieder löst und das Vesikel analog zum Phagosom prozessiert wird. Die Caveolae-vermittelte Endozytose läuft nach einem ähnlichen Prinzip ab. Caveolae stellen hierbei spezielle Membranstrukturen dar, die bereits einer Membraneinstülpung ähnlich sind und durch das Protein Caveolin hervorgerufen werden. Auch hier erfolgt die Bindung eines Liganden, z.B. Folsäure, an der Membranaußenseite, woraufhin die Abschnürung eines Vesikels (50 - 80 nm) durch Dynamin erfolgt. Bezüglich des weiteren Schicksals dieser Vesikel wurde bisher eine Umgehung des endolysosomalen Abbaus und ein Transport zum sog. Caveosom angenommen, jedoch wird auch eine lysosomale Verarbeitung des Vesikels inzwischen diskutiert. Die zelluläre Aufnahme von NP kann durch alle der beschriebenen Mechanismen erfolgen und unterliegt dabei keiner Präferenz (zusammengefasst in Hasanzadeh *et al.* 2015, Oh und Park 2014).

Die Aufnahme von NP wird dabei durch ihre physikochemischen Eigenschaften beeinflusst. Hinsichtlich der Größe wird beispielsweise eine optimale Partikelgröße von 50 nm für die Internalisierung in nicht-phagozytierende Zellen beschrieben (zusammengefasst in Kettler *et al.* 2014). Gleichzeitig zeigt sich auch die Reaktivität von der Partikelgröße beeinflusst; so weist auch die Induktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) eine Größenabhängigkeit bei einem Maximum durch 30 nm große NP auf (Jiang *et al.* 2008). Auch die Form der NP trägt zur Aufnahme bei, hier konnte in verschiedenen Zellkultursystemen eine höhere Aufnahme von sphärischen Au NP in Vergleich zu stäbchenförmigen NP festgestellt werden (Chithrani *et al.* 2006, Qiu *et al.* 2010). Die Beeinflussung der NP-Aufnahme durch Partikelgröße und -form wird mit der sogenannten *wrapping time* in Verbindung gebracht (Chithrani und Chan 2007). Dabei wird ein verlängerter Zeitraum beim Umschließen der NP durch die Zellmembran mit steigender Partikelgröße und Seitenverhältnisse postuliert. Neben der Form und Größe spielt auch die Ladung der verwendeten NP eine große Rolle. So ist eine erhöhte Toxizität positiv geladener Partikel im Vergleich zu neutral oder negativ geladenen NP in verschiedenen Modellsystemen bekannt (Heiden *et al.* 2007, Platel *et al.* 2016). Dies beruht auf einer verstärkten Absorption kationischer NP auf die negativ geladene Zellmembran, wodurch auch eine erhöhte Aufnahme resultiert (zusammengefasst in Verma und Stellacci 2010). Somit hat auch die Modifikation der Oberfläche durch die Funktionalisierung mit geladenen Liganden einen Einfluss auf die Toxizität von NP. Neben einer artifiziellen Modifikation der NP-Oberfläche verändert aber auch eine natürliche Oberflächenmodifikation von NP, die durch den Kontakt mit biologischen Flüssigkeiten entsteht, die Aufnahme von NP. So sind NP in zellulären Systemen einer erhöhten Ionenkonzentration sowie einer Vielzahl an Biomolekülen, wie

beispielsweisen Proteinen, ausgesetzt. Diese können mit den NP interagieren, wodurch im Falle von Proteinen die Bildung einer Proteinkorona resultiert. Die Zusammensetzung der Proteinkorona hängt dabei von der Partikelspezies, -größe, -oberflächeneigenschaft und der Expositionszeit gegenüber der biologischen Flüssigkeit ab. Letztlich wird die Oberfläche der NP durch die entstandene Proteinkorona definiert, weshalb diese auch die weiteren Interaktionen der NP mit biologischen Oberflächen, und damit auch deren Einfluss auf zelluläre Prozesse, beeinflusst. Hierzu zählt neben der *Clearance*, der Immunantwort und der toxischen Wirkung auch die zelluläre Aufnahme der Partikel (zusammengefasst in Docter *et al.* 2015 und Westmeier *et al.* 2016). So konnte bereits gezeigt werden, dass Silica NP durch die Anwesenheit von Serum im Zellkulturmedium besser in A549-Zellen aufgenommen (Lesniak *et al.* 2012). Im Gegensatz dazu wurden TiO<sub>2</sub> NP unter Anwesenheit von Serum in geringerer Menge von NCI-H292-Zellen aufgenommen, als unter Verwendung von serumfreien Zellkulturmedium (Vranic *et al.* 2017). Letztlich stellt auch die Kristallstruktur der NP einen Faktor dar, der die Toxizität von NP beeinflusst. So sind beispielsweise unterschiedliche Toxizitäten von TiO<sub>2</sub> NP bedingt durch verschiedene Kristallstrukturen bekannt (De Matteis *et al.* 2016, Sayes *et al.* 2006).

### 2.1.2 Kupfer(II)-oxid Nanopartikel

Grundsätzlich können metallbasierte NP in zwei Gruppen unterteilt werden: lösliche und unlösliche NP. Während in diesem Kapitel die Toxizität von löslichen NP anhand von Kupfer(II)-oxid (CuO) NP erläutert wird, ist in Kap. 2.1.3 der Wirkmechanismus unlöslicher NP anhand von Titan(IV)-dioxid (TiO<sub>2</sub>) NP dargestellt.

CuO NP werden in eine Vielzahl an Anwendungen, u. a. als Holzschutzmittel, additiv in Verpackungen sowie Katalysatoren verwendet (Civardi *et al.* 2015, Longano *et al.* 2012; zusammengefasst in Chang *et al.* 2012), und zeigen in physiologisch relevanten Flüssigkeiten bei einem neutralen pH-Wert eine geringfügige Löslichkeit. So konnte in Wasser und artifizieller alveolarer Flüssigkeit nach 168 Stunden eine Löslichkeit von 2 % respektive 1 % festgestellt werden (Semisch 2013). Jedoch wurde sowohl in vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe als auch durch weitere Forschergruppen, eine fast vollständige Lösung aller Partikel in artifizieller lysosomaler Flüssigkeit (pH 4,5) festgestellt (Cho *et al.* 2012b, Semisch 2013). So konnte bereits nach einer halben Stunde eine Löslichkeit von ca. 70 % sowie nach einer zwei stündigen Inkubation eine Löslichkeit von ca. 90 % beobachtet werden (Semisch 2013). Zusätzlich wurde auch eine hohe Löslichkeit in Zellkulturmedium dargelegt, wobei diese ab einer 16-stündigen Inkubation in Zellkulturmedium mit FKS in etwa 40 % betrug. Eine Inkubation mit FKS freiem Zellkulturmedium wies im Gegen-

satz dazu nach einer 24-stündigen Inkubation eine Löslichkeit von etwa 65 % auf (Semisch 2013). Zudem zeigen CuO NP im Vergleich zu mikroskaligen Verbindungen sowie Kupfer-Ionen stets die ausgeprägteste Toxizität (Karlsson *et al.* 2009, Midander *et al.* 2009, Semisch *et al.* 2014, Strauch *et al.* 2017). Dieser Beobachtung liegt der sogenannte «*trojan horse type*» Mechanismus zugrunde, der eine endozytotische Aufnahme und lysosomale Prozessierung der CuO NP zu Kupfer-Ionen postuliert (Cronholm *et al.* 2013, Limbach *et al.* 2007, Moschini *et al.* 2013). Während unter physiologischen Bedingungen der Kupferhaushalt streng homöostatisch reguliert ist (zusammengefasst in Lutsenko 2010), kann durch kupferhaltige NP über den *trojan horse type* Mechanismus und die intrazelluläre Freisetzung von Kupfer-Ionen leicht eine zelluläre Kupferüberladung hervorgerufen werden. Bedingt durch die Redoxaktivität von Kupfer-Ionen und deren Beteiligung an einer Fenton-ähnlichen Reaktion kann von der Induktion oxidativen Stresses ausgegangen werden (zusammengefasst in Poprac *et al.* 2017). Zudem besitzen Kupfer-Ionen eine starke Thiolaffinität, weshalb eine Interaktion mit Zinkfingerproteinen denkbar ist (Schwerdtle *et al.* 2007).

Für CuO NP wurden schon zahlreiche toxische Wirkungen in Zellkultursystemen und Tierversuchsstudien beschrieben. So zeigt sich diese Partikelspezies in unterschiedlichen Zelllinien sowie Toxizitätstestsystem zytotoxisch (Ahamed *et al.* 2010, Cronholm *et al.* 2013, Karlsson *et al.* 2008, 2009, Midander *et al.* 2009, Moschini *et al.* 2013, Semisch *et al.* 2014, Strauch *et al.* 2017, Wang *et al.* 2012). Aufgrund der beschriebenen Umgehung der streng regulierten Kupferhomöostase durch den *trojan horse type* Mechanismus sind auch stark erhöhte intrazelluläre Kupfergehalte nach Exposition gegenüber CuO NP bekannt (Cronholm *et al.* 2013, Semisch *et al.* 2014, Strauch *et al.* 2017, Wang *et al.* 2012), die in einer Induktion von oxidativem Stress resultieren (Ahamed *et al.* 2010, Fahmy und Cormier 2009, Jing *et al.* 2015, Karlsson *et al.* 2008, Moschini *et al.* 2013, Strauch *et al.* 2017). Im Zuge dieser oxidativen Imbalance können redoxsensitive Transkriptionsfaktoren aktiviert werden. Hierbei wird insbesondere die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und AP-1 postuliert (Cho *et al.* 2012a, Piret *et al.* 2012, Strauch *et al.* 2017). Zusätzlich wird auch eine genotoxische Wirkung der CuO NP beschrieben, u.a. durch die Induktion von Mikrokernen und DNA-Strangbrüchen (Cronholm *et al.* 2013, Karlsson *et al.* 2008, 2009, Semisch *et al.* 2014, Wang *et al.* 2012). Auch die Einleitung der Apoptose durch CuO NP ist bekannt (Karlsson *et al.* 2009, Semisch *et al.* 2014, Shafagh *et al.* 2015), jedoch wird ebenso eine Mischung aus apoptotischem und nekrotischer Zelltod (Chusuei *et al.* 2013, Strauch *et al.* 2017) sowie eine Beteiligung der Autophagie diskutiert (Moschini *et al.* 2013, Sun *et al.* 2012). Ferner wurde ebenso eine Einflussnahme auf die Zellzykluskontrolle in Form eines Zellzyklusarrests publiziert. Hierbei wird vor allem ein Arrest der G<sub>1</sub>-Phase durch CuO NP induziert (Hanagata *et al.* 2011, Strauch *et al.* 2017). Zudem wurde auch eine proinflammatorische Antwort auf eine CuO NP Exposition auf zellulärer Ebene bereits beschrieben (u.a. Dankers *et al.* 2018, Jing *et al.* 2015, Strauch *et al.* 2017, Ude *et al.* 2017).

Neben den zahlreichen Studien in Zellkultursysteme, liegen auch Veröffentlichungen zur Toxizität *in vivo* vor. Sowohl in Mäusen als auch in Ratten ist dabei nach Exposition über eine intratracheale Instillation sowie Inhalation vor allem eine inflammatorische Antwort und ein akut toxischer Effekt festgestellt worden (Kim *et al.* 2011, Minigalieva *et al.* 2017, Pettibone *et al.* 2008, Song *et al.* 2012; zusammengefasst in Ahamed *et al.* 2015). Zudem liegt eine Studie vor, die eine Exposition von CuO NP über ein *air-liquid interface* (ALI) auf ein Zellkultursystem mit einer Tierversuchsstudie mit Mäusen vergleicht. In dieser wurde eine vergleichbare LDH-Freisetzung sowie inflammatorische Antwort unter der Verwendung ähnlicher Dosierungen dargestellt. Die inflammatorische Antwort äußerte sich dabei in einer Ausschüttung von Il-8 bzw. dem murinen Il-8 Analogon CXCL1 (Jing *et al.* 2015).

### 2.1.3 Titan(IV)-dioxid Nanopartikel

Die Anwendung von Titan(IV)-dioxid (TiO<sub>2</sub>) NP in verschiedenen Produkten ist bereits weit verbreitet, u.a. als Additiv in Polymeren und Kosmetika (zusammengefasst in Fadeel und Garcia-Bennett 2010 und Zhang *et al.* 2015). Generell gilt diese Partikelspezies als Paradebeispiel eines inerten und schwerlöslichen NP (Zhong *et al.* 2017; zusammengefasst in Wang und Fan 2014, Zhang *et al.* 2015). Dennoch wurden TiO<sub>2</sub> NP von der *International Agency for Research on Cancer* als möglicherweise kanzerogen für den Menschen (Gruppe 2B) und von der MAK-Kommission als krebserzeugend Kategorie 4 eingestuft (Kuempel und Sorahan 2010, MAK-Kommission 2018). Die Einstufung der MAK-Kommission spiegelt dabei einen Stoff mit kanzerogenen Eigenschaften wider, der keinen oder einen sehr geringen Beitrag zum Krebsrisiko für den Menschen leistet. Zudem liegt für diese Stoffe kein genotoxischer Wirkmechanismus vor. TiO<sub>2</sub> kann in vielen Kristallstrukturen vorliegen, allerdings sind insbesondere Anatas, Rutil und Brookit in der Literatur gut beschrieben. Während Anatas und Rutil eine tetragonale Struktur aufweisen, liegt Brookit in einer orthorhombischen Form vor (zusammengefasst in Kwon *et al.* 2008 und Zhang *et al.* 2015). Alle drei Formen sind photokatalytisch aktiv und können somit ROS unter dem Einfluss von UV-Licht generieren (zusammengefasst in Fadeel und Garcia-Bennett 2010, Kwon *et al.* 2008). Jedoch unterscheiden sich die verschiedenen Kristallstrukturen in ihrer Reaktivität als Photokatalysator und damit auch in ihrer biologischen Aktivität (zusammengefasst in Fadeel und Garcia-Bennett 2010, Kwon *et al.* 2008, Zhang *et al.* 2015). Nach Exposition gegenüber TiO<sub>2</sub> NP in der Anatas-Struktur liegen viele Erkenntnisse bzgl. einer zyto- und genotoxischen Wirkung sowie der Induktion von oxidativem Stress aus Zellkulturstudien vor (Kansara *et al.* 2015, Srivastava *et al.* 2013, Toyooka *et al.* 2012, Wang *et al.* 2015, Zhang *et al.* 2013). Gleichzeitig werden nur geringfügige Effekte

durch NP aus einem Anatas/Rutil-Gemisch, das auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, und aus reinem Rutil aufgezeigt (Jiang *et al.* 2008, Jugan *et al.* 2012, Lagopati *et al.* 2014, Sayes *et al.* 2006, Simon-Deckers *et al.* 2008, Tedja *et al.* 2011, Vandebriel *et al.* 2018). Diese Beobachtung wird mit einer im Vergleich größeren Bandlücke zwischen Valenz- und Leitungsband sowie einer geringeren effektiven Masse von Elektronen in Partikeln der Anatas-Struktur begründet. Daraus resultiert eine gesteigerte Mobilität von Ladungsträgern und damit auch eine höhere Effizienz in der Generierung von ROS (zusammengefasst in Fadeel und Garcia-Bennett 2010). Aufgrund der unterschiedlichen zellulären Reaktion auf verschiedene TiO<sub>2</sub> NP Spezies wird im Rahmen der Ergebnisdiskussion vorzugsweise auf Studien zurückgegriffen, die die gleiche Partikelspezies verwendeten. Dabei handelt es sich um ein Gemisch aus Anatas und Rutil im Verhältnis 80 : 20.

Neben einer Schädigung des Lungengewebes nach *In-vivo*-Expositionen von Ratten und Mäusen über eine intratracheale Instillation und Inhalation ist auch die Induktion von oxidativem Stress, aber vor allem eine inflammatorischen Reaktion beschrieben (zusammengefasst in Iavicoli *et al.* 2012, Wang und Fan 2014, Zhang *et al.* 2015). Die mögliche kanzerogene Wirkung von TiO<sub>2</sub> NP wird von Iavicoli *et al.* (2012) kritisch beurteilt. So ist eine eindeutige kanzerogene Wirkung nur in einer Studie nach intratrachealer Instillation von Ratten bekannt, eine vergleichbare Studien mit Mäusen zeigt jedoch keine Kanzerogenität. Eine direkte Übertragung der Studienergebnisse auf die Spezies Mensch bleibt fragwürdig, weshalb in dieser Hinsicht weiterhin Forschungsbedarf besteht (zusammengefasst in Iavicoli *et al.* 2012). Von Seiten der MAK-Kommission wird die kanzerogene Wirkung der einatembaren Fraktion von TiO<sub>2</sub> Partikeln im Tierversuch durch eine entzündlich-proliferative Wirkung beschrieben. Diese Reaktion kann durch eine chronische Exposition und zelluläre Überladung mit TiO<sub>2</sub> Partikeln aufgrund einer verminderten *Clearance* ausgelöst werden. Expositionen, die diese Reaktion nicht hervorrufen und unter denen eine ausreichende *Clearance* vorliegt, sind nicht mit einem erhöhten Krebsrisiko in Verbindung zu bringen (MAK-Kommision 2009).

### 2.1.4 Nanokomposite

Verbundstoffe aus einer Polymermatrix und einem nanoskaligen Füllstoff werden als Nanokomposite bezeichnet. Durch den Zusatz von NM zu Polymeren wird während der Herstellung dieser Materialien unter anderem das Kristallisationsverhalten sowie die Glasübergangstemperatur des nativen Polymers beeinflusst. Dadurch erhalten Nanokomposite im Vergleich zu ihren nativen Analoga aus purem Polymer veränderte Eigenschaften, die sich sowohl negativ als auch positiv auswirken können. Zu den potentiell geänderten Eigenschaften zählen neben einem veränderten

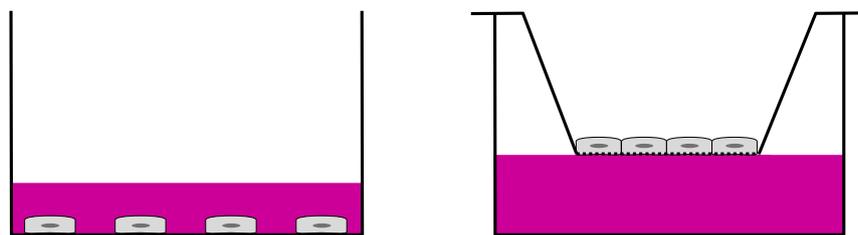
Abbrennverhalten auch eine Änderung der Steifigkeit des Materials sowie Änderungen der Permeabilität und elektrischen Eigenschaften des Polymers. Beispielfhaft soll hier der Einfluss auf das Abbrennverhalten beschrieben werden. Hierbei wird nach der Zugabe von Nanofasern zu Polymeren unter Hitzeeinwirkung die Bildung einer stabilen Schicht aus verkohltem Material postuliert. Diese umschließt das Polymer und schützt dieses somit vor einer weiteren Hitzeeinwirkung, wodurch sich die maximal mögliche Hitzeabgabe des Polymers reduziert. Resultierend wird die Flammenausbreitung auf umliegende Strukturen minimiert, weshalb folglich NM bisherige Flammschutzmittel in Polymeren ersetzen könnten (zusammengefasst in Paul und Robeson 2008). Die Freisetzung der verwendeten nanoskaligen Füllmaterialien aus den Polymermatrizes durch natürliche Einflüsse (z.B. UV-Strahlung) oder prozessbedingte Belastungen (z.B. Vermahlen oder Verbrennen) stellt dabei größtenteils ein noch ungewisses Risiko dar.

Eine Freisetzung nanoskaliger Strukturen während der Produktion von Nanokompositen ist bereits beschrieben. Dabei werden neben nanoskaligen Polymerstrukturen auch die verwendeten NP in die Umgebungsluft als einzelne Partikel und Agglomerate emittiert (Tsai *et al.* 2008). Auch die Emission durch natürliche Prozesse ist bereits gut untersucht. So zeigen beispielsweise Nguyen *et al.* (2011) die Freisetzung von Silica NP aus einem Epoxidharz durch UV-Strahlung, während *multi-walled carbon nanotubes* die Photodegradation verlangsamen (Nguyen *et al.* 2011). Die Freisetzung von Silica NP nach einer Photodegradation mit UV-Strahlen wird ebenso aus einer Polyurethanmatrix beschrieben (Jacobs *et al.* 2016). Auch eine Emission aus NM-haltigen Beschichtungen ist bekannt, wobei bereits bei normaler Handhabung dieser Materialien eine Migration der NM aus dem Nanokomposit beobachtet wird (Kim *et al.* 2016). Neben einer Freisetzung durch natürliche Prozesse oder einem alltäglich Gebrauch ist auch eine Emission von nanoskaligen Verbindungen während der Weiterverarbeitung oder mechanischen Belastung, in Form von beispielsweise Vermahlungs- und Schleifprozessen, von Nanokompositen bekannt. Dabei werden durch die Vermahlung von Nanokompositen sowohl nanoskalige Polymerpartikel (Ogura *et al.* 2013, Raynor *et al.* 2012) als auch das nanoskalige Füllmaterial (Methner *et al.* 2012) freigesetzt. Gleichzeitig ist eine Emission von *carbon nanotubes* (CNT) aus einem Nanokomposit basierend auf Epoxidharz durch mechanische Einflüsse wie beispielsweise Schleifen bekannt (Schlagenhauf *et al.* 2012; zusammengefasst in Schlagenhauf *et al.* 2014). Auch das Bohren von Nanokompositen verursacht eine im Vergleich zum nativen Polymer erhöhte Freisetzung nanoskaliger Partikel (Starost *et al.* 2017). Im Gegensatz hierzu wird jedoch auch im Vergleich zu nativen Polymeren keine erhöhte Freisetzung von nanoskaligen Verbindungen nach dem Schleifen von Nanokompositen beschrieben. Dies umfasst dabei Nanokomposite, die sowohl NP als auch CNT als Füllmaterialien enthalten. Eine *in vivo* Exposition gegenüber den dabei gesammelten Staubfraktionen zeigt zudem keine toxische Wirkung (Wohlleben *et al.* 2011). Bezüglich einer thermischen Verwer-

tung von CNT-haltigen Nanokompositen ist eine klare Temperaturabhängigkeit zu beobachten. Während geringe Temperaturen (ca. 400 °C) zu einer Freisetzung von CNT aus derartigen Nanokompositen führen, verbrennen diese bei höheren Temperaturen vollständig (Bouillard *et al.* 2013, Chivas-Joly *et al.* 2014). Die Datenlage bezüglich einer Freisetzung von nanoskaligen Strukturen aus NP-haltigen Nanokompositen ist ebenso divergent. Einerseits wurde eine Freisetzung nanoskaliger Partikel, die hauptsächlich aus der Polymermatrix stammen, beschrieben (Mosurkal *et al.* 2008, Motzkus *et al.* 2011). Andererseits wurde ebenso die gegenteilige Beobachtung gemacht und keine Freisetzung von NP festgestellt (zusammengefasst in Froggett *et al.* 2014). Eine direkte online-Exposition gegenüber Zellkultursystemen und eine toxikologische Beurteilung von Verbrennungsprodukten aus der thermischen Verwertung von Nanokompositen, wie sie in dieser Arbeit beschrieben ist, wurde bisher noch nicht publiziert.

## 2.2 Expositionsmethoden

Auf Zellkultur basierende Studien zur Untersuchungen toxischer Effekte und Wirkmechanismen werden in der Regel unter submersen Bedingungen durchgeführt. Hierbei findet die Kultivierung von Zellkulturen am Boden spezieller Platten oder Flaschen statt, wobei die Zellen dabei von Zellkulturmedium umgeben sind. Insbesondere für die Untersuchung inhalationstoxischer Effekte repräsentiert diese Kultivierungsart jedoch keine physiologischen Bedingungen, da Lungenepithelzellen auf apikaler Seite lediglich von einem dünnen Flüssigkeitsfilm in Form von Mukus oder *surfactant* umgeben sind (zusammengefasst in Fröhlich und Salar-Behzadi 2014). Diese Problematik kann mit einer Zellkultivierung an einem ALI behoben werden (Abb. 2.2).



**Abbildung 2.2:** Schematische Darstellung der Zellkultivierung unter submersen (links) und *air-liquid interface* (rechts) Bedingungen (modifiziert nach Aufderheide 2008).

Hierzu erfolgt die Kultivierung in einem Transwellsystem, das eine membranfixierende Zellkultureinlage in einer Lochplatte darstellt. Die Membran besteht dabei aus einem porösen Polymer, auf der Zellkulturen adhären können. Nach einer submersen Anwachsphase kann das apikale Medium entfernt werden, wodurch die Versorgung mit Zellkulturmedium lediglich von basaler Seite erfolgt und die apikale Seite der Umgebungsluft ausgesetzt wird. Dieses Kultivierungssystem wurde neben einer Kultivierung von Monokulturen inhalationstoxikologisch relevanter Zelllinien auch für Co-Kulturen, rekonstituierte 3D-Zellgewebe und *organ-on-a-chip* Modelle genutzt (zusammengefasst in Hiemstra *et al.* 2017). Neben einer physiologisch realistischen Kultivierung bieten die ALI-kultivierten und -exponierten Zellkulturmodelle insbesondere in der Nanotoxikologie noch weitere Vorteile, die in Kap. 2.2.2 näher beleuchtet werden. Die Problematik submerser NP Expositionen sowie die steigende Bedeutung der ALI-Exposition in der Nanotoxikologie werden im Folgenden beschrieben.

### 2.2.1 Problematik submerser Nanopartikelexpositionen

Eine submerse Exposition gegenüber NP zeigt neben einer ungeeigneten Kultivierungsmethode für Zellkulturen des Respirationstrakts noch weitere Problemstellungen auf (zusammengefasst in Paur *et al.* 2011). Insbesondere die Dosiserfassung unter submersen Bedingungen ist hierbei erwähnenswert. Allgemein ist dabei zwischen der verabreichten, deponierten und intrazellulären Dosis zu unterscheiden (zusammengefasst in Secondo *et al.* 2017). Die verabreichte Dosis beschreibt dabei die Menge an NP, die in das Zellkulturmedium appliziert wird. Diese entspricht unter submersen Bedingungen jedoch nicht der deponierten Dosis auf der Zelloberfläche (zusammengefasst in Lison und Huaux 2011). Die Ursache liegt hierbei im Einfluss der physikochemischen Partikeleigenschaften, wie beispielsweise der Größe, auf die Diffusion und Sedimentation der NP im Zellkulturmedium während der Exposition (zusammengefasst in Teeguarden *et al.* 2007).

Generell beschreibt die Diffusion eine spontane und passive Partikelbewegung von Bereichen eines hohen chemischen Potentials zu Arealen mit niedrigem chemischen Potential. Sobald sich ein System im Gleichgewicht befindet, ist auch kein Partikeltransport zu beobachten. Innerhalb eines submersen Zellkultursystems ist jedoch aufgrund der zellulären Partikelaufnahme stets ein Konzentrationsgradient an der Zelloberfläche vorzufinden, der die Diffusionsbewegung der Partikel antreibt.

Die Zeit  $t$  (s), in der NP innerhalb einer Flüssigkeit eine definierte Wegstrecke  $r$  (m) zurücklegen, kann mit Hilfe folgender Formel beschrieben werden:

$$t = \frac{\langle r^2 \rangle}{2 \cdot D} \quad (2.1)$$

hierbei stellt  $\langle r^2 \rangle$  das quadratische Mittel der Wegstrecke bzw. den Weg eines durchschnittlichen Partikels und  $D$  den Diffusionskoeffizienten ( $\text{m}^2/\text{s}$ ) dar (zusammengefasst in Teeguarden *et al.* 2007).

Dieser wird durch die Stokes-Einstein-Gleichung beschrieben (Gleichung 2.2) und ist innerhalb eines submersen Zellkultursystems nur vom Partikeldurchmesser  $d$  (m) und der Viskosität  $\mu$  ( $\text{Pa} \cdot \text{s}$ ) des Zellkulturmediums abhängig:

$$D = \frac{R \cdot T}{3 \cdot N_A \cdot \pi \cdot \mu \cdot d} \quad (2.2)$$

wobei  $R$  die Gaskonstante ( $\text{L} \cdot \text{kPa}/\text{K}/\text{mol}$ ),  $N_A$  die Avogadro-Konstante und  $T$  die Temperatur (K), die bei Expositionen von Zellkultursystemen konstant bei  $37^\circ\text{C}$  liegt, widerspiegelt (Hinderliter *et al.* 2010).

Da sich die Diffusionskonstante umgekehrt proportional zum Partikeldurchmesser verhält, benötigen größere Partikel eine längere Zeit für eine definierte Wegstrecke als kleinere. Daher ist die Partikelbewegung durch Diffusion ab einer gewissen Größe nicht mehr die treibende Kraft für deren Bewegung. Teeguarden *et al.* (2007) geben hierbei einen Schwellenwert für Partikel größer als 100 nm an. Ab dieser Partikelgröße stellt die Sedimentationsgeschwindigkeit ( $\text{m}/\text{s}$ ), und damit eine auf der Gravität beruhende Bewegung, die vorherrschende Transportform dar (zusammengefasst in Teeguarden *et al.* 2007). Diese wird durch die Stokessche Gleichung beschrieben:

$$V = \frac{g \cdot (\rho_p - \rho_f) \cdot d^2}{18 \cdot \mu} \quad (2.3)$$

dabei stellt  $g$  die Erdbeschleunigung ( $\text{m}/\text{s}^2$ ),  $\rho_p$  die Dichte des Partikels ( $\text{kg}/\text{m}^3$ ),  $\rho_f$  die Dichte des Mediums ( $\text{kg}/\text{m}^3$ ),  $\mu$  die Viskosität des Mediums ( $\text{Pa} \cdot \text{s}$ ) und  $d$  den Partikeldurchmesser (m) dar (Hinderliter *et al.* 2010).

Die Sedimentation ist somit, ebenso wie die Diffusion, von der Partikelgröße, der Dichte und der Viskosität des Mediums abhängig. Auch das nötige Suspendieren von NP in Zellkulturmedien kann zu Veränderungen der physikochemischen Eigenschaften durch Agglomeration der Partikel führen oder durch Adsorption von Proteinen des Zellkulturmediums an die Partikel die Ausbil-

dung einer Proteinkorona hervorrufen (zusammengefasst in Guggenheim *et al.* 2018 und Hussain *et al.* 2015). Dadurch kann, neben der zellulären Aufnahme, auch der hydrodynamische Durchmesser und die Dichte der Partikel beeinflusst werden, wodurch ein verändertes Diffusions- oder Sedimentationsverhalten resultiert. Zudem verhindert die Löslichkeit von NP unter submersen Bedingungen, insbesondere leicht löslicher metallbasierter NP, eine verlässliche Angabe einer exakten Dosierung (zusammengefasst in Hussain *et al.* 2015). Zur Erfassung der deponierten Dosis liegt inzwischen zwar ein mathematisches Modell vor (Hinderliter *et al.* 2010); um jedoch letztlich submers durchgeführte Studien hinsichtlich der deponierten Dosis einwandfrei vergleichen zu können, bedarf es einer standardisierten Expositionsmethode, in der Parameter wie beispielsweise die Höhe des Mediumüberstands oder eingesetzte Partikelgrößen klar definiert sind.

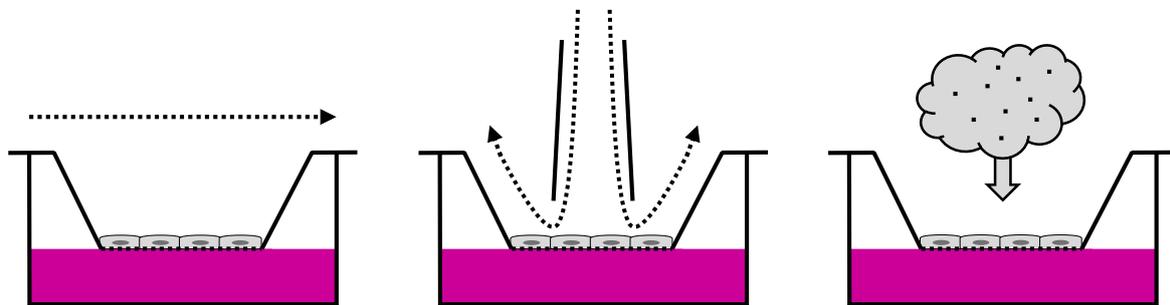
### 2.2.2 Exposition über ein *air-liquid interface*

Die Applikation von NP über ein ALI ermöglicht aufgrund der einzigartigen Kultivierungsmethode die direkte Erfassung der deponierten Dosis. Dies kann zum einem mikroskopiebasierend mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) oder Rasterelektronenmikroskopie erfolgen. Diese Verfahren definieren die Dosis als Partikelanzahl pro Fläche und können zwischen Agglomeraten sowie Primärpartikeln unterscheiden. Zum anderen kann die deponierte Dosis über eine quantitative Analyse mit Hilfe spektrometrischer Methoden, beispielsweise der Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) oder Massenspektrometrie mit induktiv gekoppelten Plasma (ICP-MS), erfolgen. Diese quantitativen Verfahren sind jedoch nur in der Lage metallbasierte NP zu bestimmen. Zudem besteht die Möglichkeit zur Erfassung einer massenbezogenen deponierten Dosis durch die Verwendung einer Quarzkristall-Mikrowaage (QCM), die Massen durch eine lineare Abnahme der Resonanzfrequenz bei steigender Deposition quantifiziert (Lenz *et al.* 2009; zusammengefasst in Secondo *et al.* 2017). Neben der Quantifizierung deponierter Dosen ist auch eine gezielte Manipulation von NP mit einer Protein-Corona, beispielsweise durch *surfactant* Proteine, vor einer ALI-Exposition denkbar (zusammengefasst in Drasler *et al.* 2017). Ein weiterer Vorteil von bedeutender Relevanz ist die Möglichkeit zur Untersuchung komplexer Aerosole beispielsweise aus Verbrennungsprozessen, da sowohl die Gasphase als auch luftgetragene Partikel mit der verwendeten Zellkultur in Kontakt kommen (zusammengefasst in Lacroix *et al.* 2018). Jedoch kann die Komplexität auch einen Nachteil darstellen, da eine entsprechende Charakterisierung des zu untersuchenden Aerosols mit adäquater Messtechnik erfolgen muss. Weitere Vor- und Nachteile einer ALI-Exposition und submersen Applikation von NP wurden von Mülhopt *et al.* (2016) und Paur *et al.* (2008) zusammengefasst (Tab. 2.1). Zur Exposition über ein ALI stehen verschiedene

**Tabelle 2.1: Tabellarische Zusammenfassung von Vor- und Nachteilen einer submersen bzw. ALI-Exposition gegenüber NP (modifiziert nach Mülhopt *et al.* 2016 und Paur *et al.* 2008).**

	Submerse Exposition	ALI-Exposition
<b>Vorteile</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ Einfach</li> <li>▷ Hochdurchsatzverfahren für Toxizitätsscreening möglich</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ Realitätsnäheres Expositionsszenario</li> <li>▷ Unverändertes Aerosol</li> <li>▷ Exakte Dosisbestimmung</li> <li>▷ Surfactant-bildende Zellen verwendbar</li> <li>▷ Gasphase aus komplexem Aerosol kann untersucht werden</li> </ul>
<b>Nachteile</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ Keine realitätsnahe Kultivierung</li> <li>▷ Medium verändert Partikeleigenschaften</li> <li>▷ Unbekannte deponierte Dosis</li> <li>▷ Keine Untersuchung der Gasfraktion bei Aerosolen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ Teuer</li> <li>▷ Kein Hochdurchsatz möglich</li> <li>▷ Komplexes System, sowohl technisch als auch chemisch</li> </ul>

Systeme unterschiedlicher Hersteller zur Auswahl, wobei generell drei Applikationsmöglichkeiten bestehen: eine diskontinuierliche Exposition gegenüber einer Partikelwolke oder eine kontinuierliche Exposition gegenüber einem Luftstrom parallel beziehungsweise im Lot zur Zelloberfläche (Abb. 2.3).

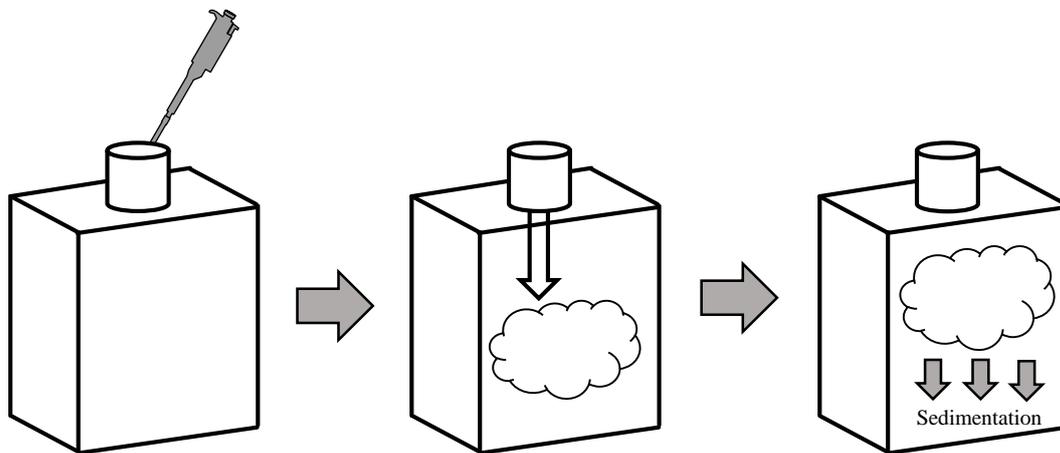


**Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Verfahren zur Exposition über ein air-liquid interface.** links: horizontaler Luftstrom; mittig: vertikaler Luftstrom; rechts: diskontinuierliche Exposition durch eine Aerosolwolke (modifiziert nach Secondo *et al.* 2017).

### 2.2.2.1 Diskontinuierliche ALI-Exposition

Die Applikation von NP über eine diskontinuierliche ALI-Exposition mit dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Expositionssystem (Vitrocell® Cloud) wurde bereits mehrfach publiziert (u.a.

Brandenberger *et al.* 2010, Herzog *et al.* 2013, Lenz *et al.* 2009, Stoehr *et al.* 2015). In diesem System werden mit Hilfe eines Aerosolgenerators aus einer NP-Suspension durch eine vibrierende Membran ein NP-haltiges Aerosol mit Flüssigkeitströpfchen im  $\mu\text{m}$ -Maßstab (ca.  $4 \mu\text{m}$ ) generiert (zusammengefasst in Dhand 2004). Das generierte NP-haltige Aerosol setzt sich anschließend während einer Sedimentationsphase innerhalb einer Expositionskammer auf ein heizbares Expositionsmodul ab, in dessen Vertiefungen für Zellkultureinlagen eingearbeitet sind. Durch diese Prozedur (Abb. 2.4) ist es möglich, Depositionseffizienzen von bis zu 57 % zu erzielen sowie Depositionen zwischen  $0,02$  und  $200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  auf die Zelloberfläche zu applizieren (Lenz *et al.* 2009). Aufgrund der Trennung der Expositionskammer in zwei Kompartimente ist außerdem eine simultane Exposition von Negativkontrollen mit dem Suspensionsträger möglich.



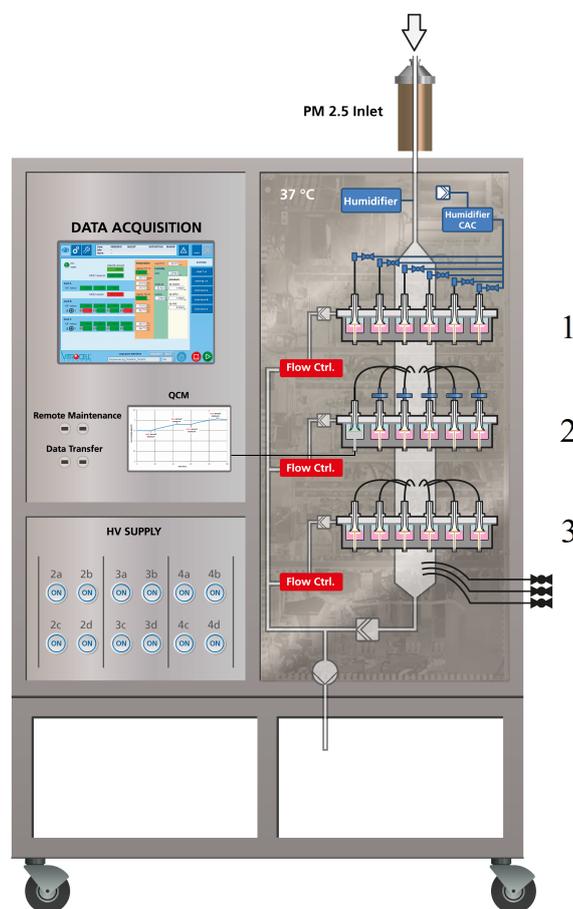
**Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Abfolge einer Exposition an einer Vitrocell® Cloud.**

Nach Zugabe einer NP-haltigen Suspension wird durch einen Aerosolgenerator ein NP-haltiges Aerosol erzeugt, das schließlich auf die Zelloberfläche absedimentiert (modifiziert nach Lenz *et al.* 2014).

Eine Gleichverteilung des Aerosols auf die jeweils eingesetzten Zellkultureinlagen wurde sowohl gravimetrisch als auch mit Hilfe einer Fluorescein-Lösung festgestellt (Lenz *et al.* 2009; 2014). Zudem ist die Verwendung einer QCM in diesem Expositionssystem bereits etabliert (Lenz *et al.* 2009). Insgesamt stellt dieses System durch die kurze Expositionszeit (10 Minuten), eine relativ kompakte Größe und einfache Handhabung ein ideales ALI-Expositionssystem im kleinen Labormaßstab dar.

### 2.2.2.2 Kontinuierliche ALI-Exposition

Eine kontinuierliche Exposition wird durch eine laminare Strömung eines NP-haltigen Aerosols auf die Zelloberfläche realisiert. Dabei kann sowohl ein horizontaler (paralleler) oder vertikaler (lotrechter) Durchfluss verwendet werden. Während bei einer horizontalen Strömung die Partikeldeposition nur durch Diffusion und Gravitation erfolgt, erhöht bei einer vertikalen Applikation des Luftstroms zusätzlich die Impaktion der NP auf die Zelloberfläche eine Partikeldeposition (zusammengefasst in Secondo *et al.* 2017).



**Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des verwendeten kontinuierlichen Expositionssystems.**

Links: Datenerfassung und -kontrolle sowie Kontrolleinheiten für das Zuschalten der Hochspannung (hier: HV). Rechts: Darstellung eines Moduls zur Exposition von Reinluftkontrollen (1, CAC), zur Exposition gegenüber der reinen Gasphase eines Aerosols mit eingebauten Filter zur Partikelabscheidung (2) und eines Moduls zur Exposition gegenüber dem nativen Aerosol (3). Das gesamte rechte Kompartement ist auf 37 °C temperiert (Verwendung der Grafik mit Erlaubnis von Mülhopt *et al.* 2016).

Expositionssysteme, die eine horizontale Strömung verwenden, zeigen noch keine weite Verbreitung (Frijns *et al.* 2017). Im Gegensatz dazu ist eine Vielzahl an Expositionssystemen zu erwerben, die Aerosole mit Hilfe einer vertikalen Strömung applizieren. Hierzu zählen unter anderem der P.R.I.T. *ExpoCube* sowie verschiedene Expositionssysteme der Firmen Vitrocell® und Cultex® (u.a. Aufderheide *et al.* 2013, Loret *et al.* 2018, Ritter und Knebel 2014)

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde mit der Vitrocell® *Automated Exposure Station* gearbeitet (Abb. 2.5), die bereits Anwendung in toxikologischen Untersuchungen von Schiffsdieselabgasen und Aerosolen aus der Holzverbrennung fand (Mülhopt *et al.* 2016). Hier wird das Aerosol zu Beginn durch ein Inlet in das Expositionssystem geleitet, das alle Partikelfractionen über  $2,5 \mu\text{m}$  abscheidet. Dementsprechend gelangen nachfolgend, wie in die Alveolen der Lunge, nur Partikel kleiner als  $2,5 \mu\text{m}$  in den Hauptreaktor. Dort erfolgt eine Befeuchtung des Aerosols auf 85 % Luftfeuchtigkeit, um eine Abnahme der Zellviabilität durch Austrocknen während der mehrstündigen Exposition zu verhindern. Zudem herrscht im Hauptreaktor mit  $37^\circ\text{C}$  die gleiche Temperatur wie in gängigen Inkubatoren. Vom Hauptreaktor wird das Aerosol mit einer Durchflussrate von 100 mL/min auf die Expositionsmodule, in die die Zellkultureinlagen eingelegt werden, verteilt. Unterhalb jeder Position zur Befestigung von Zellkultureinlagen ist eine Elektrode angebracht, um gegebenenfalls die Deposition durch das Zuschalten einer Hochspannung (1000 V) zu erhöhen. Ohne diese Option erfolgt die Partikeldeposition über Diffusion, woraus eine deutlich reduzierte Deposition resultiert (De Bruijne *et al.* 2009, Mülhopt *et al.* 2016, Savi *et al.* 2008). Die Stärke dieser Depositionserhöhung hängt von der Ionenbeweglichkeit geladener Partikel, und damit von deren Größe und Ladungszahl ab. Daher ist es nicht möglich, einen Aerosol übergreifenden Faktor für die Depositionserhöhung zu nennen, es wurde jedoch bereits eine Steigerung um den Faktor neun publiziert (Mülhopt *et al.* 2016). Durch das Zuschalten einer Hochspannung wird ein elektrisches Feld erzeugt, dessen Ausrichtung geladene Partikel auf der Zelloberfläche deponieren lässt. Neben den Expositionsmodulen befindet sich noch ein weiteres Modul zur Exposition gegenüber Reinluftkontrollen (CACs) innerhalb des Expositionsschranks. Auch hierbei wird die exponierte Reinluft, die synthetische oder mit HEPA-Filtern gefilterte Luft darstellt, zuvor auf 85 % Luftfeuchtigkeit befeuchtet und auf  $37^\circ\text{C}$  erhitzt. Alle Parameter (Temperatur, Druck, Durchflussraten, Hochspannung, QCM-Deposition) können mit Hilfe eines eingebauten Datenerfassungsprogramms überwacht werden (Mülhopt *et al.* 2016). Die Depositionseffizienz von 1,5 % ohne eine Depositionserhöhung durch das Zuschalten einer Hochspannung ist im Vergleich zur Exposition mit der Vitrocell® *Cloud* zwar deutlich geringer, jedoch zeigt das beschriebene Expositionssystem andere Vorteile, wie beispielsweise die online-Exposition von Verbrennungsaerosolen. Zudem ist eine direkte Erfassung der deponierten Dosis durch eine eingebaute QCM sowie integrierbare Gitternetze für TEM-Aufnahmen möglich (Mülhopt *et al.* 2016).

### 2.2.2.3 Vergleichbarkeit von ALI-Expositionen mit submersen Zellkultur- und Tierversuchsexpositionen

Es liegen bereits einige Studien bezüglich eines direkten Vergleichs der Wirkung von NP nach Exposition in einem submersen bzw. ALI-System vor, wobei nur Studien unter Verwendung vergleichbarer Zelldichten für beide Expositionen berücksichtigt wurden. Dabei kann jedoch keine klare Aussage darüber getroffen werden, ob eines dieser beiden Systeme eine sensiblere Reaktion auf eine Exposition gegenüber NP zeigt. So konnten einerseits ausgeprägtere Effekte nach ALI-Exposition gegenüber funktionalisierten Polystyren, TiO<sub>2</sub>, CeO<sub>2</sub> und ZnO NP beobachtet werden (Fröhlich *et al.* 2013, Lenz *et al.* 2013, Loret *et al.* 2016). Andererseits wurde aber auch eine weniger ausgeprägte zelluläre Antwort auf Ag, ZnO und Silica NP durch eine ALI-Exposition beschrieben (Herzog *et al.* 2014, Holder und Marr 2013, Panas *et al.* 2014, Xie *et al.* 2012). Da sich unter den betrachteten NP sowohl leicht (u.a. ZnO NP) als auch schwer lösliche (u.a. TiO<sub>2</sub> NP) Partikelpezies befinden, kann dies nicht mit toxischen Effekten durch gelöste Ionen in einer submersen Exposition begründet werden. Es scheinen daher andere physikochemische Eigenschaften, wie beispielsweise die Partikelgröße (Kap. 2.1.1), oder mögliche fehlerhafte Aussagen über die deponierte Dosis unter submersen Expositionen für die beschriebenen Beobachtungen verantwortlich zu sein.

Aufgrund der eher physiologischen Kultivierung von Lungenzellkulturmodellen durch ein ALI besteht die Hoffnung, Tierversuche teilweise durch Experimente unter Verwendung von ALI-Expositionen zu vermeiden. Aus diesem Grund versuchten Jing *et al.* (2015) eine Korrelation zwischen einer ALI-Exposition von Alveolar- und Bronchialzellen gegenüber CuO NP und einer Inhalations- sowie Instillationsstudie mit Mäusen zu erörtern. Hierbei begründen die Autoren dieser Studie die Vergleichbarkeit zwischen ALI-Exposition und der Tierversuchsstudie durch eine beobachtete Dosisabhängigkeit der untersuchten Endpunkte (akute Toxizität und inflammatorische Wirkung) in beiden Systemen (Jing *et al.* 2015). Auch Loret *et al.* (2018) ziehen einen Vergleich zwischen einer Exposition eines Zellkultursystems und einer Tierversuchsstudie. Dabei wurde eine proinflammatorische Reaktion von TiO<sub>2</sub> und CeO<sub>2</sub> NP sowohl nach intratrachealer Instillation in Ratten als auch nach ALI-Exposition von Co-Kulturen aus Pneumozyten und Makrophagen untersucht. Hierbei zeigt die ALI-Exposition eine zur *in vivo* Studie vergleichbare Reaktion, insbesondere wenn die applizierte Dosis auf die vorhandene Anzahl an Makrophagen normiert wird. Jedoch wird gleichzeitig auf die geringe Datenmenge verwiesen und die Untersuchung weiterer, vor allem toxisch wirkender, NP gefordert (Loret *et al.* 2018).

### 3 Fragestellung

Bedingt durch die intensive industrielle Nutzung und stetige Entwicklung innovativer Nanomaterialien (NM) ist auch eine Weiterentwicklung von Methoden zur toxikologischen Beurteilung dieser Materialien erforderlich. Die Erfassung des toxikologischen Potentials nanoskaliger Verbindungen *in vitro* beruht im Wesentlichen auf submersen Expositionen in Zellkultursystemen. Jedoch spiegelt diese Kultivierungsmethode keine physiologischen Bedingungen des Respirationstrakts wider. Insbesondere im Alveolarbereich der Lunge, den für die Nanotoxikologie relevantesten Lungenabschnitts, werden Epithelzellen lediglich von einem Flüssigkeitsfilm bedeckt und liegen an einer Grenzfläche zwischen Luft (Atmosphäre) und Flüssigkeit (Blut) vor. Um realitätsnähere Bedingungen zu simulieren ist es möglich, Zellen an einem *air-liquid interface* (ALI) zu kultivieren und anschließend über ein ALI-Expositionssystem einem NP-haltigen Aerosol auszusetzen. Diese Methode bietet im Gegensatz zur submersen Behandlung mit NP neben physiologischeren Bedingungen auch eine verlässliche Technik zur Erfassung der applizierten Dosis durch die Verwendung einer Quarzkristall-Mikrowaage (QCM). Sie liefert damit einen elementaren Baustein zur toxikologischen Beurteilung der inhalationstoxischen Wirkung von NP.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Etablierung eines statischen ALI-Expositionssystems, das eine verlässlichere Aussage zur Dosis-Wirkungsbeziehung der eingesetzten TiO<sub>2</sub> und CuO NP auf A549-Zellen geben soll. Dabei bilden Untersuchungen zur zytotoxischen Wirkung sowie zur zellulären Aufnahme beider Partikelspezies die Basis für weitere Experimente. Darauf aufbauend soll mit Hilfe einer quantitativen *high-throughput* RT-qPCR ein Einblick über den Einfluss beider Partikel auf zelluläre Prozesse gegeben werden. Dabei stehen insbesondere die Metallhomöostase, oxidative Stressantwort und DNA-Schadensantwort im Fokus der Untersuchungen. Darauf folgend sollen die auf transkriptioneller Ebene beobachteten Effekte durch Nachweise auf funktioneller Ebene gestützt werden.

Zusätzlich wird im Zuge des Projektes «ProCycle» der Einfluss von Verbrennungsaerosolen aus der thermischen Verwertung von Nanokompositen auf A549-Zellen und ein 3D-Zellkulturmodell untersucht. Auch hier sollen Genexpressionsprofile erstellt und DNA-Schäden quantifiziert werden. Hierzu werden mit Hilfe dreier nanoskaliger Füllstoffe im 10 %igen Zusatz (TiO<sub>2</sub>, CuO und CNT) und einer Kunststoffmatrix aus Polyethylen (PE) Nanokomposite hergestellt, die anschließend in Kooperation mit dem Institut für Technische Chemie (ITC) am KIT einer Verbrennung unterzogen werden. Zudem sollen auch die reinen Füllstoffe und das PE ohne Zusätze verbrannt

werden, um auftretende Toxizitäten einordnen zu können. Die Zellkulturmodelle sollen schließlich in einem dynamischen ALI-Expositionssystem gegenüber den entstehenden Verbrennungsaerosolen exponiert werden. Um zwischen toxischen Effekten durch freigesetzte NP und der Gasphase des Verbrennungsaerosols unterscheiden zu können, wird neben der Exposition gegenüber dem kompletten Aerosol auch eine Behandlung mit der reinen Gasphase stattfinden. Des Weiteren wird auch eine Exposition unter Bedingungen erfolgen, die eine Steigerung der Partikeldeposition nach sich ziehen. Letztlich soll die Gasphase auch auf ihre Zusammensetzung hin untersucht werden, um Rückschlüsse auf vorliegende Mechanismen einer toxischen Wirkung ziehen zu können.

# 4 Material und Methoden

## 4.1 Material

Eine tabellarische Auflistung aller verwendeten Chemikalien, Lösungen, Geräte und Verbrauchsmaterialien ist in Kap. 8 aufgeführt.

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Transmissionselektronenmikroskopie

Die TEM basiert auf der Möglichkeit zur Bildgebung durch die Ablenkung beschleunigter Elektronen (zusammengefasst in Zuo und Spence 2017). Hierzu wurden Gitternetze für TEM-Aufnahmen zufällig in der Vitrocell® *Cloud* verteilt und gegenüber nanopartikelhaltigen Aerosolen exponiert. Aus den erhaltenen Aufnahmen wurde mit Hilfe der Software *ImageJ* der Durchmesser primärer Partikel bestimmt und anschließend gemittelt. Die Bilder wurden von Manuela Hauser sowie Marco Mackert am KIT-ITC an einem TEM des Modells Zeiss EM 910 Leo aufgenommen.

### 4.2.2 Endotoxintest

Endotoxine stellen einen Stimulus für zahlreiche Zelltypen dar und können daher falsch positive Ergebnisse induzieren (zusammengefasst in Gorbet und Sefton 2005). Ein Nachweis zum Ausschluss einer Kontamination der NP mit diesem Toxin ist daher von großem Stellenwert hinsichtlich der Ergebnisinterpretation. Zum qualitativen Nachweis von Endotoxinen wurde das Testkit ToxinSensor™ *Gel Clot Endotoxin Assay Kit* des Herstellers GenScript verwendet. Dabei wurden

Nanopartikelsuspensionen der Konzentration 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  beider Partikelspezies mit Endotoxin-freiem Wasser hergestellt und anschließend die Analyse nach Herstellerangaben fortgeführt

### 4.2.3 Zellkulturexperimente

Alle Lösungen sowie Verbrauchsmaterialien und Geräte wurden vor dem Gebrauch für Zellkulturarbeiten entweder sterilfiltriert, autoklaviert oder mit Heißluft bzw. 80 % Ethanol sterilisiert. Bis auf die Exposition in den jeweiligen Expositionssystemen erfolgten alle Zellkulturarbeiten unter einer Sicherheitswerkbank Stufe 2. Zudem wurden alle benötigten Lösungen oder Suspensionen vorab in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die ALI-Expositionen fanden unter semi-sterilen Bedingungen statt.

#### 4.2.3.1 Zellkultivierung

Für den Großteil der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde die humane Lungenadenokarzinom-Zelllinie A549 (ATCC CCL-185) verwendet. Diese Zellen stellen Alveolarepithelzellen Typ II dar und wachsen adhärent als Monolayer (Giard *et al.* 1973). Die Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Roel Schins (Leibnitz-Institut für umweltmedizinische Forschung, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt und anschließend durch einen Auftrag des Projektpartners des Universitätsklinikums Freiburg charakterisiert (Anhang Kap. 9.1). Die Kultivierung der A549-Zelllinie erfolgte im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 100 % Luftfeuchtigkeit. Die A549-Zellen wurden in den Zellkulturmedien *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) bzw. RPMI-1640 mit Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FKS), 100 U/mL Penicillin sowie 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Streptomycin kultiviert. Hierbei wurden die Zellen vor einer Exposition in der Vitrocell® *Cloud* in DMEM und vor der Behandlung in der Vitrocell® *Automated Exposure Station* in RPMI-1640 subkultiviert. Eine Subkultivierung der Zellen erfolgte dabei alle zwei bis drei Tage. Hierfür wurde das Zellkulturmedium entfernt, die Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, mit 0,25 %iger Trypsinlösung für 30 Sekunden behandelt und schließlich für 2 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden in frischem Zellkulturmedium aufgenommen, resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe des Zellzählgerätes CASY® TT bestimmt. Eine definierte Anzahl an Zellen wurde schließlich in eine neue Zellkulturschale mit frischem Zellkulturmedium gegeben und im Inkubator subkultiviert. Für die Untersuchungen wurden Zellen der Passage 7 bis 33 verwendet.

Neben der Monokultur von A549-Zellen wurde auch ein 3D-Zellkulturmodell (MucilAir) der Firma Epithelix verwendet. Die 3D-Zellkultur wurde aus Primärzellen eines Donors (Anhang Kap. 9.12) rekonstituiert und zeigte bereits Verwendung in nanotoxikologischen Studien (Dankers *et al.* 2018, Kooter *et al.* 2017, Kuper *et al.* 2015). Nach Erhalt der 3D-Zellkulturmodelle wurden diese nach Herstellerangaben in Kultur genommen. Alle zwei bis drei Tage wurde das basale Zellkulturmedium, das mit den Kulturen geliefert wurde, in den Kavitäten gewechselt. Zudem wurde einmal pro Woche die Zelloberfläche gewaschen, hierfür wurden 400  $\mu\text{L}$  des Zellkulturmediums apikal in die Zellkultureinlagen gegeben und für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die apikale Lösung vorsichtig resuspendiert und der Überstand mit Vorsicht abgesaugt.

### **Kryokonservierung und Inkulturnahme**

Zur Kryokonservierung der verwendeten A549-Zellen wurden Aliquots mit je  $1 \times 10^6$  Zellen in 1 mL FKS/10 % DMSO (v/v) schonend in einem 2 mL Kryogefäß eingefroren und anschließend in Flüssigstickstoff gelagert. Zur Inkulturnahme wurde der Inhalt eines Kryogefäß im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen mit 10 mL Zellkulturmedium überführt. Nach einer Zentrifugation (1.300 rpm, 3 min) wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 2 mL frischem Zellkulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturschale mit Zellkulturmedium überführt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen lichtmikroskopisch überprüft und das Zellkulturmedium gewechselt. Vor Erreichen eines konfluenten Monolayers wurden die Zellen das erste Mal subkultiviert.

Eine Kryokonservierung der verwendeten 3D-Zellkulturmodelle war nicht möglich.

#### **4.2.3.2 Exposition an der Vitrocell® Cloud**

Die Exposition in der Vitrocell® Cloud kann in drei Teilschritte untergliedert werden. Dabei erfolgte die Zellkulturvorbereitungen in einer Sterilwerkbank Stufe 2, während die Exposition zur Vermeidung einer möglichen Aussetzung des Experimentators gegenüber einem NP-haltigen Aerosol in einem Digestorium stattfand. Alle Experimente wurden stets in Doppelbestimmung durchgeführt.

### **Zellkulturvorbereitung**

Es wurden zunächst pro Kavität 2 mL Zellkulturmedium in eine 12-Lochplatte vorgelegt und im Anschluss wurde ein Zellkultureinsatz eingesetzt. Anschließend wurden subkultivierte Zellen, wie in Kap. 4.2.3.1 beschrieben, abgelöst und  $531.000 \text{ Zellen/cm}^2$  in 0,5 mL Zellkulturmedium apikal im Zellkultureinsatz ausgestreut. Nach 24-stündiger submerser Anwachsphase im Inkubator wurde die Konfluenz lichtmikroskopisch überprüft, das apikale Zellkulturmedium entfernt und die Zelloberfläche mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden weitere 24 Stunden im Brutschrank kultiviert und dabei an das ALI adaptiert. Darauffolgend wurde abermals die Konfluenz lichtmikroskopisch kontrolliert und die Zelloberfläche mit PBS gewaschen.

### **Vorbereitung des Expositionssystems und der Nanopartikelsuspension**

Vor der Exposition in der Vitrocell® Cloud wurde diese sterilisiert und vorgewärmt. Zur online Erfassung der NP-Deposition wurde anschließend die Software zur Depositionserfassung durch die QCM gestartet und die Parameter so eingestellt, dass alle 3 Sekunden eine Messung der Deposition vollzogen wird. Vor der Überführung der Zellkultureinsätze wurden 3,2 mL Zellkulturmedium in die jeweiligen Kavitäten der Vitrocell® Cloud vorgelegt. Danach wurde eine NP-Suspension einer Konzentration von 1, 5 oder 10 mg/mL in 1 %igem PBS hergestellt, gut durchmischt und für 10 Minuten im Ultraschallbad sonifiziert. Vor der Zugabe in den Aerosolgenerator wurde die Suspension abermals für mind. 30 Sekunden gut durchmischt.

### **Exposition**

Die Zellkultureinsätze wurden in die Kavitäten des Expositionssystems überführt und die Expositionskammer wurde geschlossen. Es erfolgte die Zugabe von 200 bis 600  $\mu\text{L}$  der NP-Suspension in den Aerosolgenerator des Expositionskompartmentes und eine Generierung des Aerosols für eine Minute. Anschließend wurde eine Kontrollgruppe gegenüber einem Aerosol aus 1 %igem PBS im Kontrollkompartiment des Systems auf die gleiche Art und Weise ausgesetzt. Aufgrund des Größenverhältnisses von 1:3 zwischen dem Kontroll- und dem Expositionskompartment stellte das benötigte Volumen an 1 %igem PBS für die Kontrollgruppe ein Drittel des Volumen der eingesetzten NP-Suspension dar. Die generierten Aerosole sedimentierten für 10 Minuten innerhalb der jeweiligen Kompartimente. Im Anschluss daran wurde die Expositionskammer geöffnet und die Zellkultureinsätze wurden in den Inkubator überführt. Zur Ermittlung der NP-Deposition trocknete die sedimentierte Schicht für weitere 50 Minuten, bis letztlich eine konstante Masse mit Hilfe der QCM festgestellt werden konnte. Die deponierte Dosis wurde schließlich aus dem Mittel der letzten 100 Datenpunkten berechnet.

Anschließend an die Behandlung wurden die Zellen für 24 Stunden ab dem Beginn der Exposition

gegenüber den applizierten NP inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellen basal sowie apikal mit PBS gewaschen und schließlich mit 0,25 %iger Trypsinlösung basal sowie apikal für 30 Sekunden behandelt. Die Lösung wurde sowohl aus der Kavität als auch der Zellkultureinlage entfernt und die Zellen für 2 bis 3 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen, falls nicht anders beschrieben, in 1 mL Zellkulturmedium aufgenommen, gut resuspendiert und es wurde mit der nachfolgenden Analyse fortgeführt.

#### 4.2.3.3 Exposition an der Vitrocell® Automated Exposure Station

Für die Expositionen gegenüber NP-haltigen Aerosolen in der Vitrocell® Automated Exposure Station wurde aufgrund vorhandener Erfahrungen von Seiten des Projektpartners vom KIT-ITC nicht DMEM, sondern RPMI als Zellkulturmedium verwendet (Mülhopt *et al.* 2016). Der Aufbau der Expositionsanlage wurde bereits Kap. 2.2.2.2 grundsätzlich beschrieben. Hier wurde deutlich, dass im Gegensatz zu Inkubatoren innerhalb des Expositionssystems keine kontrollierte CO<sub>2</sub>-Atmosphäre herrscht. Daher musste während der Exposition auf ein Zellkulturmedium zurückgegriffen werden, dessen pH-Wert nicht über den CO<sub>2</sub>-Gehalt der Umgebungsluft gepuffert wird. Aus diesem Grund wurde während der Exposition RPMI mit einem Zusatz von 25 mM HEPES (RPMI/25 mM HEPES) verwendet. Für die Exposition der 3D-Zellkulturmodelle wurde das mitgelieferte Zellkulturmedium unter dem Zusatz von 10 mM HEPES genutzt. Die Zugabe einer höheren HEPES-Konzentration war laut Herstellerangaben nicht möglich. Eine pH-Wert Änderung des Zellkulturmediums mit 10 mM HEPES durch einen Farbumschlag des zugesetzten pH-Indikators konnte über den Expositionszeitraum von vier Stunden nicht beobachtet werden. Auch bei der Exposition mit diesem System kann die Durchführung in mehrere Abschnitte untergliedert werden. Die Zellkulturexperimente wurden in Laboren der Arbeitsgruppe von PD Dr. Carsten Weiss am KIT-ITG durchgeführt. Die Expositionen fanden in Kooperation mit dem KIT-ITC und Frau Nadine Teuscher statt.

#### Zellkulturvorbereitung

Pro Kavität wurden 1,5 mL Zellkulturmedium in eine 6-Lochplatte vorgelegt. Anschließend wurde je Kavität ein Zellkultureinsatz eingesetzt und 140.000 Zellen/cm<sup>2</sup> einer Subkultivierung in 1 mL Zellkulturmedium apikal im Zellkultureinsatz ausgestreut. Nach 24-stündiger Anwachsphase wurde ein konfluenter Zellrasen erreicht. Das apikale Zellkulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen mit PBS apikal gewaschen. Zudem wurde das basale Zellkulturmedium durch Zellkul-

turmedium mit HEPES ersetzt. Anschließend wurden die Zellen in eine 37 °C warme Transportbox überführt und zur Expositionsanlage gebracht. Pro Exposition wurden neben den benötigten Proben auch Zellkultureinsätze für Reinluftkontrollen und Inkubatorkontrollen ausgestreut. Letztere wurden während der Expositionsdauer in einem Inkubator bei 37 °C und 100 % Luftfeuchtigkeit, jedoch ohne kontrollierte CO<sub>2</sub>-Atmosphäre, gelagert.

Die 3D-Zellkulturmodelle wurden 24 Stunden vor der Exposition auf apikaler Seite gewaschen (s. Kap. 4.2.3.1). Vor der Exposition wurde das Zellkulturmedium durch Zellkulturmedium mit HEPES ersetzt und die Zellen in eine 37 °C warme Transportbox überführt und zur Expositionsanlage gebracht.

### **Vorbereitung des Expositionssystems**

Bereits am Tag vor der Exposition wurde die Befeuchtung des Systems aktiviert, um am Tag der Exposition eine Luftfeuchtigkeit von 85 % zu erreichen. Am Tag der Exposition selbst wurde schließlich die Temperierung des Expositionssystem eingeschaltet. Die zu untersuchenden Materialien wurden als Aerosol verbrannt. Hierzu diente entweder ein Bürstendosierer für die Expositionen gegenüber PE-haltigen Materialien oder eine NP-Suspension, die stetig zur Suspensionsstabilität in einem Ultraschallbad sonifiziert wurde, für die Exposition gegenüber den reinen Nanomaterialien als Aerosolquelle. Der Bürstendosierer wurde mit einem Probenkolben (4 g Probe) bestückt und ein Vorschub von 18 mm/h eingestellt. Um Verstopfungen durch das verwendete Substrat zu vermeiden, wurde hierfür bereits vorgemahlenes Granulat verwendet. Für die Exposition gegenüber den reinen Nanomaterialien wurde eine Suspension mit 4 g/L in bidestilliertem Wasser hergestellt. Zudem wurde das Programm zur Datenerfassung der deponierten Masse über die QCM gestartet. Pro Kavität eines Expositionsmoduls, das mit einer Zellkultureinlage bestückt wurde, wurden 6,5 mL Zellkulturmedium mit HEPES vorgelegt. Zusätzlich wurden einigen Expositionskavitäten ein Filter vorgeschaltet, um die partikuläre Fraktion des Aerosols abzutrennen. Die Belegung der Expositionsmodule ist in Tabelle 4.1 einzusehen.

### **Exposition**

Die Zellkultureinsätze wurden in die entsprechenden Kavitäten eingesetzt und die Expositionsmodule sachgerecht geschlossen. Es folgte ein Leaktest zur Überprüfung eines dichten Systems, anschließend wurde die Hochspannung (HS) der entsprechenden Positionen aktiviert. Darauf folgend wurde eine 10-minütige Aufwärm- und Äquilibrierphase der QCM gestartet, in der lediglich die Expositionskavität der QCM einem Luftstrom ausgesetzt wurde. Während dieser Phase wurde die Flamme, die durch ein Ethylen-Luft-Gemisch gespeist wurde, zur Verbrennung der jeweiligen Substrate gezündet. Mit dem Ablauf der Aufwärm- und Äquilibrierphase wurde der Bür-

Tabelle 4.1: Tabellarische Darstellung der Expositionsmodulbelegung.

<b>Modul A</b>	<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>A3</b>	
Belegung mit Aerosol/Filter	Zellen	Zellen	Zellen	
Hochspannung [V]	0	1000	0	
<hr/>				
<b>Modul B</b>	<b>B1</b>	<b>B2</b>	<b>B3</b>	<b>B4</b>
Belegung mit Aerosol/Filter	QCM Aerosol	Zellen Aerosol	Zellen Aerosol	Zellen Filter
Hochspannung [V]	0	0	1000	0
<hr/>				
<b>Modul C</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>
Belegung mit Aerosol/Filter	TEM-Grids Aerosol	Zellen Filter	Zellen Aerosol	Zellen Aerosol
Hochspannung [V]	1000	0	0	1000

stendosierer gestartet und anschließend wurden die Zellen für 4 Stunden im Expositionssystem gegenüber den Verbrennungsaerosolen exponiert. Das generierte Aerosol wurde aus dem Verbrennungsstrom 1:10 verdünnt, um es entsprechend vor dem Eintritt in das Expositionssystem abzukühlen. Zusätzlich wurde ein PM<sub>2,5</sub>-Filter an die Eintrittspforte des Systems angebracht um Partikel größer als 2,5  $\mu\text{m}$  abzutrennen. Innerhalb des Expositionssystem wurden die Zellen einem Luftstrom von 100 mL/min ausgesetzt. Zusätzlich wurde das Aerosol mit Hilfe eines elektrischen Niederdruckimpaktors (ELPI) und eines *Scanning Mobility Particle Sizer* (SMPS) online charakterisiert.

Im Anschluss an die Exposition wurden die Zellen wieder in 6-Lochplatten mit RPMI überführt und für 20 Stunden nachinkubiert. Nach dem Ende der Inkubation wurden die A549-Zellen wie in Kap. 4.2.3.2 beschrieben abgelöst. Während A549-Zellen hierbei für 2 - 3 Minuten mit Trypsin inkubiert wurden, erfolgte eine sechs minütige Inkubation des 3D-Zellkulturmodell im Brutschrank. Die weiterführenden Schritte waren analog zum Abtryspieren der A549-Zellen.

#### 4.2.3.4 Zytotoxizitätsbestimmung

Die Bestimmung einer akuten Toxizität wurde durch die Ermittlung der relativen Zellzahl erfasst, während längerfristige toxische Wirkung mit Hilfe der Koloniebildungsfähigkeit (CFA) bestimmt wurden.

### Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen wie in Kap. 4.2.3.2 bzw. 4.2.3.3 beschrieben abtrypsiniert und in frischem Zellkulturmedium aufgenommen. Anschließend wurde die Zellzahl mit Hilfe des Zellzählgerätes CASY® TT ermittelt. Zur Berechnung der relativen Zellzahl (RCC) eines unabhängigen Versuches wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{RCC (\% der Kontrolle)} = \frac{\bar{x}_E}{\bar{x}_K} \cdot 100 \% \quad (4.1)$$

wobei  $\bar{x}_E$  den Mittelwert aus der Doppelbestimmung der exponierten Zellen und  $\bar{x}_K$  den Mittelwert aus der Doppelbestimmung der Kontrollzellen darstellt.

### Koloniebildungsfähigkeit

Nach Ermittlung der Zellzahl wurden im Anschluss 500 Zellen aus dieser Zellsuspension in Dreifachbestimmung in 60 mm Zellkulturschalen mit frischem Zellkulturmedium subkultiviert und für 10 Tage im Brutschrank belassen. Die entstandenen Kolonien wurden mit PBS gewaschen und mit eiskaltem 96 %igen Ethanol fixiert. Nach einstündiger Färbung mit Giemsa-Lösung und Waschen mit destilliertem Wasser wurde die Kolonienanzahl in jeder Zellkulturschale mit Hilfe des Koloniezählgerätes *Colony Counter BZG-30* ermittelt. Schließlich wurde die CFA eines unabhängigen Versuches durch folgende Formel berechnet:

$$\text{CFA (\% der Kontrolle)} = \frac{\bar{x}_E}{\bar{x}_K} \cdot 100 \% \quad (4.2)$$

wobei  $\bar{x}_E$  den Mittelwert aus der Dreifachbestimmung der exponierten Zellen und  $\bar{x}_K$  den Mittelwert aus der Dreifachbestimmung der Kontrollzellen darstellt.

#### 4.2.3.5 Genexpressionsanalysen

Die Genexpressionsanalysen erfolgten mit Hilfe einer von Fischer *et al.* (2016) etablierten *high-throughput* RT-qPCR (HT RT-qPCR). Eine Auflistung der dabei untersuchten Gene ist im Anhang Kap. 9.2 aufgeführt.

Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen wie in Kap. 4.2.3.2 und 4.2.3.3 beschrieben abtrypsiniert, jedoch anstatt in Zellkulturmedium in 1 mL kaltem PBS/10 % FKS (4 °C) aufgenommen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation (1.300 rpm, 3 min, 4 °C)

wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation unter den selben Bedingungen wurde der Überstand abermals verworfen und das Zellpellet bis zur weiteren Aufarbeitung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **RNA-Isolierung und -Quantifizierung**

Die Isolierung der RNA erfolgte unter semi-sterilen Bedingungen in einem mit 80 %igem Ethanol sterilisierten Digestorium mit Hilfe des NucleoSpin® RNA Plus Kit der Firma Macherey-Nagel nach Herstellerangaben.

Hierbei wurde das Zellpellet in  $350\text{ }\mu\text{L}$  Lysepuffer resuspendiert, mit einem Vortexmischer gut durchmischt und auf eine Säule zum Entfernen der genomischen DNA überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt (30 s, 11.000 g) wurde die Säule inklusive darauf befindlicher genomischer DNA verworfen. Dem RNA-haltigen Eluat wurden  $100\text{ }\mu\text{L}$  *binding solution* hinzugegeben, das Gemisch wurde resuspendiert und auf eine zweite Säule überführt, auf der die RNA gebunden wurde. Es folgte eine erneute Zentrifugation (20 s, 11.000g) und das Aufreinigen der RNA in drei Waschschrritten mit je  $200\text{ }\mu\text{L}$  Waschpuffer 1,  $600\text{ }\mu\text{L}$  Waschpuffer 2 beziehungsweise  $250\text{ }\mu\text{L}$  Waschpuffer 2. Nach jedem Waschschrritt wurde eine Zentrifugation unter den bereits erwähnten Bedingungen durchgeführt. Schließlich wurde die Säule in ein  $1,5\text{ mL}$  Eppendorf-Reaktionsgefäß eingesetzt und die adsorbierte RNA mit  $30\text{ }\mu\text{L}$  RNA-freiem Wasser durch Zentrifugation (1 min, 11.000 g) eluiert. Dieser Schritt wiederholte sich, wobei die zuvor eluierte Lösung zur erneuten Elution genutzt wurde. Das erhaltene Eluat wurde bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  zur weiteren Aufarbeitung gelagert. Die Quantifizierung des RNA-Gehaltes im Eluat erfolgte am gleichen Tag wie die weitere Aufarbeitung und wurde photometrisch durch die Absorption bei 260 nm ermittelt. Dabei wurden  $2\text{ }\mu\text{L}$  des Eluats auf eine NanoQuant-Platte pipettiert und die Absorption bei 260 nm respektive 280 nm bestimmt. Anhand des Absorptionsquotienten wurde zudem die Reinheit der isolierten RNA beurteilt, wobei dieser für eine Fortsetzung der Analyse einen Wert größer als 2,0 aufweisen musste.

### **Reverse Transkription**

Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte mit Hilfe des qScript *cDNA Synthesis Kit* der Firma QuantaBio nach Herstellerangaben. Je Probe wurden dabei zwei technische Replikate mitgeführt. Zu  $1\text{ }\mu\text{g}$  RNA der jeweiligen Proben wurden  $5\text{ }\mu\text{L}$  Mastermix ( $1\text{ }\mu\text{L}$  Reverse Transkriptase,  $4\text{ }\mu\text{L}$  *Reaction Mix(5x)*) in eine PCR-Kavität gegeben und mit nukleasefreiem Wasser auf  $20\text{ }\mu\text{L}$  aufgefüllt. Das Gemisch wurde anschließend gut durchmischt und mit Hilfe einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Kavitäten wurden schließlich in einen Thermocycler überführt und in diesem die reverse Transkription unter Verwendung eines Temperaturprogramm (Tab. 4.2) durchgeführt.

Tabelle 4.2: Tabellarische Darstellung des Temperaturprogrammes zur cDNA-Synthese.

Zeitspanne	Temperatur [° C]
5 min	25
30 min	42
5 min	85
∞	4

### Präamplifikation (*Specific Target Amplification*)

Zur Gewährleistung einer ausreichenden Menge an Matrize wurden die Zielgene in allen Proben nach Herstellerangaben vervielfältigt. Hierzu wurden die Primer aller Zielgene in einer PCR-Kavität gesammelt und mit DNA-Suspensionspuffer auf eine Konzentration von 500 nM verdünnt. Dieser *Pooled Primer Mix* war bei -20 °C lagerbar und wurde schließlich einem Präamplifikationsansatz (Tab. 4.3) zugeführt.

Tabelle 4.3: Zusammensetzung eines Präamplifikationsansatzes.

	Volumen [ $\mu$ L]
<b>2x TaqMan PreAmp MasterMix</b>	2,50
<b>Pooled Primer Mix</b>	0,50
<b>PCR-zertifiziertes Wasser</b>	0,75
<b>cDNA-Probe</b>	1,25

Neben Proben wurde auch eine Kontrolle ohne Matrize (NTC-STA) sowie eine Kontrolle mit nicht umgeschriebener RNA (noRT-Kontrolle) mitgeführt. Die Kavitäten wurden vorsichtig durchmischt, zentrifugiert und in einen Thermocycler überführt. Dort folgte die Präamplifikation nach dem in Tabelle 4.4 aufgeführten Temperaturprogramm.

Tabelle 4.4: Tabellarische Darstellung des Temperaturprogrammes zur Präamplifikation.

Zeitspanne	Temperatur [° C]	Schritte
10 min	95	Initiale Denaturierung
15 s (12 Zyklen)	95	Denaturierung
4 min (12 Zyklen)	60	Annealing und Elongation
∞	4	Endtemperatur

### Exonukleaseverdau

Um ungebundene Primer zu entfernen erfolgte ein Verdau mit Exonuklease I. Hierfür wurden pro Ansatz 0,4  $\mu\text{L}$  Exonuklease I (20 Einheiten/ $\mu\text{L}$ , Endkonzentration 4 Einheiten/ $\mu\text{L}$ ) mit 0,2  $\mu\text{L}$  Reaktionspuffer und 1,4  $\mu\text{L}$  PCR-zertifiziertem Wasser verdünnt und zu den präamplifizierten Proben gegeben. Die Proben wurden vorsichtig durchmischt und nach Zentrifugation in einen Thermocycler überführt. Dort erfolgte der Verdau unter dem in Tabelle 4.5 beschriebenen Temperaturprogramm.

**Tabelle 4.5: Tabellarische Darstellung des Temperaturprogrammes zum Endonukleaseverdau.**

Zeitspanne	Temperatur [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Schritte
40 min	37	Verdau
15 min	80	Deaktivierung
$\infty$	4	Endtemperatur

Im Anschluss an den Verdau wurden die Proben mit TE-Puffer fünffach verdünnt, gut durchmischt, zentrifugiert und schließlich über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### Primerverdünnung und Probenvorbereitung

Die Primerpaare der Zielgene (2,5  $\mu\text{L}$ ), bestehend aus *forward* und *reverse* Primer, wurden vorab mit 25  $\mu\text{L}$  *Assay Loading Reagent* (2x) und 22,5  $\mu\text{L}$  DNA-Suspensionspuffer auf 5  $\mu\text{M}$  verdünnt. Zusätzlich wurde eine *no reaction control* (NRC) mitgeführt, bei der anstelle eines Primerpaares PCR-zertifiziertes Wasser verwendet wurde. Die vorbereiteten Lösungen wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Zur Vorbereitung der Proben für die qPCR Analyse wurden je 2,25  $\mu\text{L}$  der verdauten Proben mit 2,5  $\mu\text{L}$  *SsoFast<sup>TM</sup> EvaGreen<sup>®</sup> Supermix with Low ROX* (2x) und 0,25  $\mu\text{L}$  *DNA Sample Loading Reagent* (20x) in einer Kavität vermengt, gut durchmischt und zentrifugiert. Zusätzlich wurde eine weitere NTC mitgeführt.

### 96 x 96 Dynamic Array IFC qPCR Analyse

Sowohl die Vorbereitung als auch die Beladung des *Dynamic Array IFC (integrated fluidic circuit)* wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierbei wurden die Akkumulatoren des *Dynamic Array*, im Folgenden als Chip bezeichnet, mit Kontrollfluid befüllt und die Schutzfolie entfernt. Der Chip wurde in den *IFC Controller HX* überführt und ein Programm zur Spülung des Kontrollfluidis durch die Mikrokanäle des Chip durchlaufen. Nach Beendigung dieser Prozedur wurden innerhalb von maximal zwei Stunden je 5  $\mu\text{L}$  der Proben- respektive Primergemische in die

Chip-Kavitäten pipettiert und der Chip abermals in den *IFC Controller HX* überführt. Mit Hilfe eines Programmes wurden die Proben und Primer in die Reaktionskammern des Chips geleitet und dort durchmischt. Anschließend wurden Staubpartikel von der Chipoberfläche entfernt und der Chip in das BioMark™-System eingebracht. Dort wurden die qPCR sowie die Schmelzkurvenanalyse nach dem in Tabelle 4.6 aufgeführten Temperaturprogramm durchgeführt.

**Tabelle 4.6: Tabellarische Darstellung des Temperaturprogrammes der qPCR.**

Zeitspanne	Temperatur [° C]	Schritte
40 min	70	Thermale Durchmischung
30 s	60	Thermale Durchmischung
60 s	95	Hot Start
5 s (30 Zyklen)	96	Denaturierung
20 s (30 Zyklen)	60	Annealing und Elongation
3 s	60	Schmelzkurvenanalyse
1 °C/ 3 s	bis 95	

### Datenanalyse

Die Analyse der Rohdaten erfolgte mit Hilfe der Software *Fluidigm Real-Time PCR Analysis*. Dabei wurde zunächst eine gleichmäßige Beladung der Reaktionskammern mit Hilfe eines passiven Referenzfarbstoffes geprüft, um eine erfolgreiche Durchführung zu garantieren. Durch den DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen® wurden die  $C_q$ -Werte der Zielamplifikate bestimmt. Zur Präzisierung der erhaltenen  $C_q$ -Werte wurde die in der Software implementierte Schwellenwert-Methode (*auto detectors*), die eine Basislinien-Korrektur beinhaltet, verwendet. Anhand einer Darstellung der  $C_2$ -Werte als Heat-Map sowie durch die dargestellten Schmelzkurven konnte bereits visuell eine Überprüfung der Chipbeladung und eine Qualitätskontrolle der untersuchten Proben sowie der Negativkontrollen durchgeführt werden. Die weitere Datenverarbeitung erfolgte nach Export der  $C_q$ -Werte mit Hilfe der Software *GenEx*. Nach einer Reihe von Datenverarbeitungsprozessen (s. Fischer *et al.* 2016) wurde durch die Verwendung der integrierten Algorithmen *geNorm* und *Normfinder* die optimale Auswahl aus den vorhandenen fünf Referenzgenen bestimmt und schließlich die  $\Delta\Delta C_q$ -Methode angewandt (4.3 - 4.5).

$$\Delta C_q = C_q \text{ Zielgen} - C_q \text{ Referenzgen} \quad (4.3)$$

$$\Delta\Delta C_q = \Delta C_q \text{ Behandlung} - \Delta C_q \text{ Kontrolle} \quad (4.4)$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_q} \quad (4.5)$$

Daraus resultierten die relativen Transkriptmengen im Vergleich zur Negativkontrolle, wobei die Expressionswerte der Gene in den Negativkontrollen auf 1 gesetzt wurde (Livak und Schmittgen 2001, Pfaffl 2001). Im Zuge der vorliegenden Abschlussarbeit wird ab einer Verdopplung/Halbierung der Transkriptmenge ( $\log_2$ -facher Faktor von  $\pm 1$ ) von einer relevanten Expressionsänderung ausgegangen.

#### 4.2.3.6 Zellulären Aufnahme mittels GF-AAS

Die Quantifizierung der zellulären Aufnahme und intrazellulären Auflösung von CuO NP wurde mit Hilfe der Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie (GF-AAS) durchgeführt. Diese analytische Methode basiert auf der Wechselwirkung von Atomen und elektromagnetischer Strahlung. Dabei wird Licht durch die Atome des zu analysierenden Metalls aus dem atomatisierten Probenmaterial absorbiert, wobei das verbleibende Licht von einem Detektor erfasst wird. Durch die Erstellung einer Kalibriergeraden ist es mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes (Gl. 4.6) möglich, den gewünschten Analyten zu quantifizieren (Gey 2015).

$$E = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon_\lambda \cdot l \cdot c \quad (4.6)$$

wobei E die gemessene Extinktion,  $I_0$  die Intensität des eingestrahlt Lichts, I die Intensität des durchgelassen Lichtes,  $\varepsilon_\lambda$  den Extinktionskoeffizienten bei der Wellenlänge  $\lambda$ , l die Weglänge des Lichts durch das Graphitrohr und c die Konzentration des Analyten darstellt.

Nach Ende der Inkubation wurden die Zellen wie in Kap. 4.2.3.2 beschrieben abtrypsinisiert, in 1 mL Zellkulturmedium aufgenommen und gut resuspendiert. Aus der Zellsuspension wurden die Zellzahl sowie das Zellvolumen am Zellzählgerätes CASY® TT bestimmt und schließlich wurden 800  $\mu$ L der Zellsuspension in ein 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Suspension wurde zentrifugiert (1.300 rpm, 4 °C, 3 min), der Überstand verworfen und das Zellpellet in PBS resuspendiert. Dieser Schritt wurde wiederholt und das Zellpellet schließlich in 400  $\mu$ L RIPA-Puffer aufgenommen, resuspendiert sowie für 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Es folgte eine Zentrifugation (16.000 g, 4 °C, 1 h) und die Überführung von 380  $\mu$ L des Überstands in ein 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß. Die überführte Lösung wurde durch eine kontinuierliche Temperaturerhöhung (10 °C/h) bis zu einer Endtemperatur von 95 °C bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 300 rpm in einem Heizschüttler bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 500  $\mu$ L einer salpetersauren Wasserstoffperoxid-Lösung (30 %  $H_2O_2$ /69 %  $HNO_3$  im Verhältnis 1:1) aufgeschlossen und abermals unter Verwendung des gleichen Temperaturpro-

grammes bis zur Trockne eingedampft. Die verbliebene Probe wurde in 1 mL 0,2 %iger HNO<sub>3</sub> aufgenommen und bis zur Analyse bei 4 °C gelagert.

Zur Quantifizierung des intrazellulären Kupfergehaltes wurde mit Hilfe eines Kupferstandards eine externe Kalibriergerade im Bereich zwischen 2,5 und 25 µg/mL erstellt. Allen Messungen, sowohl den Kalibrierstandards als auch den Proben, wurde direkt vor der Zugabe des Analyten in das Messgerät ein Palladium/Magnesium-Modifier (1 g/L Pd und 0,6 g/L Mg in 0,2 % HNO<sub>3</sub>) im Verhältnis 1:4 automatisiert hinzugegeben. Als Lichtquelle wurde eine Kupfer-Hohlkathodenlampe ( $\lambda_{\text{Emission}} = 324,75 \text{ nm}$ ) verwendet. Zur Bestimmung des Kupfergehaltes wurde das in Tabelle 4.7 dargestellte Temperaturprogramm angewandt.

**Tabelle 4.7: Tabellarische Darstellung des Temperaturprogrammes zur Quantifizierung des Kupfergehaltes mittels GF-AAS.**

	Temperatur [°C]	Aufheizphase [s]	Haltezeit [s]	Gasstrom (Argon) [mL/min]
<b>Trocknung 1</b>	110	1	30	250
<b>Trocknung 2</b>	130	15	30	250
<b>Pyrolyse</b>	1200	10	20	250
<b>Atomisierung</b>	2000	0	5	0
<b>Ausheizen</b>	2450	1	3	250

Für jede Bestimmung wurden Matrix-Blindwerte, externe Standards sowie Wiederfindungen mitgeführt, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Die Ermittlung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze dieser Methode nach DIN 32645 wurde bereits von Fischer (2016) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analysen sind im Anhang Kap. 9.3 einzusehen. Die intrazelluläre Kupferkonzentration wurde mit Hilfe folgender Formel berechnet:

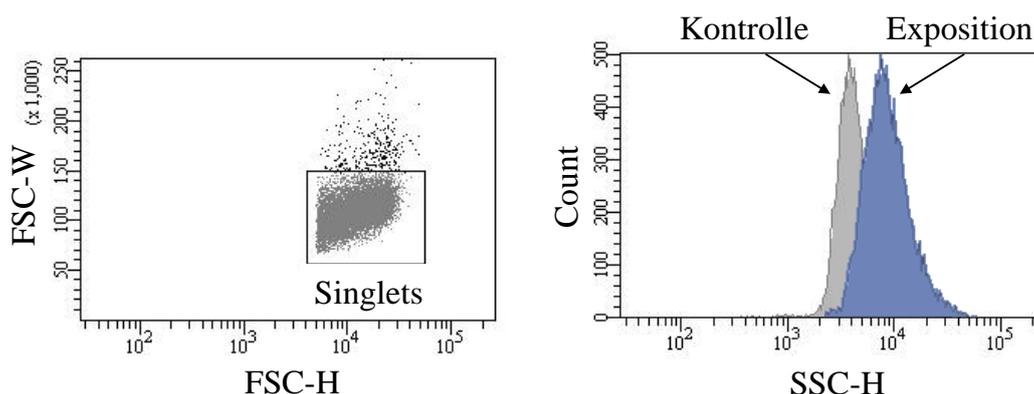
$$c_{\text{Cu}} = \frac{c_{\text{AAS}}}{M_{\text{Cu}} \cdot \text{ZZ} \cdot \text{ZV}} \quad (4.7)$$

wobei  $c_{\text{Cu}}$  die intrazelluläre Kupferkonzentration ( $\mu\text{M}$ ),  $c_{\text{AAS}}$  die ermittelte Kupferkonzentration ( $\mu\text{g/L}$ ),  $M_{\text{Cu}}$  die molare Masse von Kupfer ( $\text{g/mol}$ ), ZZ die analysierte Zellzahl ( $\text{L}^{-1}$ ) und ZV das ermittelte mittlere Zellvolumen (L) darstellt.

#### 4.2.3.7 Durchflusszytometrische Bestimmung der zellulären Aufnahme

Zur durchflusszytometrischen Untersuchung der Aufnahme von NP wurde die Veränderung des Seitwärtsstreulicht (SSC) herangezogen. Dieser Parameter gibt eine Aussage über die Granularität, Größe sowie Struktur des Zellkerns und die zelluläre Vesikelanzahl. Mehrere Publikationen beschrieben bereits eine Korrelation zwischen der NP-Aufnahme und der Zunahme des SSC-Werts (Sanders *et al.* 2012, Suzuki *et al.* 2007, Zucker *et al.* 2010; 2013).

Nach Ende der Inkubation wurden die Zellen, wie in Kap. 4.2.3.2 beschrieben, abtrypsiniert und in kaltem PBS/10 % FKS (4 °C) aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert (1.300 rpm, 3 min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Das erhaltene Zellpellet wurde in PBS aufgenommen und resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation unter den selben Bedingungen wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 1 mL PBS aufgenommen und gut resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein mit 2 mL PBS befülltes FACS-Röhrchen überführt und am Durchflusszytometer analysiert. Hierbei wurden zunächst vereinzelte Zellen von Zellagglomeraten mit Hilfe eines Dot-Plots (FSC-H gegen FSC-W) getrennt und die sog. *Singlet*-Population für die weitere Analyse verwendet (Abb. 4.1, links). Die SSC-Werte der *Singlet*-Population wurden schließlich als Histogramm dargestellt und der gemittelte SSC-Wert aus 10.000 Zellen für die weitere Berechnung herangezogen (Abb. 4.1, rechts). Um eine Aussage über eine mögliche intrazelluläre Aufnahme der NP zu treffen, wurde der SSC-Wert exponierter Zellen in Relation zum SSC-Wert unbehandelter Kontrollen gesetzt. Daraus ergab sich die x-fache Zunahme des SSC-Werts.

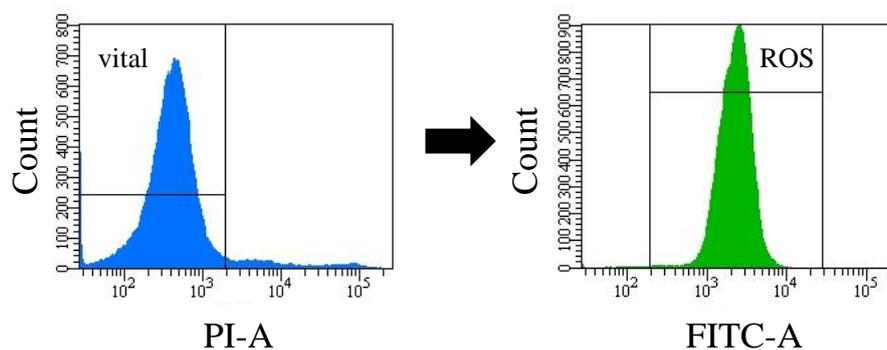


**Abbildung 4.1: Repräsentative Darstellung der Gating-Strategie zur Erfassung einzelner Zellen und des SSC-Wertes.** Links: Die Vereinzelung der Zellen wird durch die Auftragung FSC-H gegen FSC-W erfasst. Rechts: Vergleich des SSC-Wertes einer unbehandelten Kontrolle (grau) und gegenüber NP exponierten Zellpopulation (blau).

#### 4.2.3.8 Durchflusszytometrische Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies

Die Erfassung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) erfolgte mit Hilfe einer fluorogenen Sonde (Cell-ROX® Green) an einem Durchflusszytometer. Bereits in einem reduzierten Zustand zeigt die Sonde eine schwache Fluoreszenz, die jedoch bei der Oxidation durch ROS stark zunimmt (Absorptions-/Emissionsmaximum: 485/520 nm). Zudem findet eine Bindung an die DNA durch den oxidierten Farbstoff statt. Zur Detektion der emittierten Fluoreszenz wurde das Signal nach dem 530/30 nm Bandpassfilter verwendet. Aufgrund der Membrangängigkeit der Sonde ist es außerdem möglich, vitale Zellpopulationen zu untersuchen; die Zellen wurden daher zum Ausschluss toter Zellen zusätzlich mit Propidiumiodid (PI) angefärbt. Dieser Farbstoff ist nicht membranfähig und dringt nur in Zellen mit permeabler Membran ein. Dort bindet er an Nukleinsäuren, wodurch die vorliegende schwache Fluoreszenz verstärkt wird (Absorptions-/Emissionsmaximum: 493/632 nm). Zur Detektion der durch PI emittierten Fluoreszenz wurde das Signal nach dem 695/40 nm Bandpassfilter herangezogen. Beide Farbstoffe wurden mit einem Laser (488 nm) angeregt.

Die Zellen wurden nach Ende der Inkubation, wie in Kap. 4.2.3.2 beschrieben, abtrypsiniert. Anschließend wurden die Zellen in 1 mL Färbelösung, die sich aus 10  $\mu$ L PI (50  $\mu$ g/ $\mu$ L), 0,8  $\mu$ L Cell-ROX® Green und 1 mL Zellkulturmedium zusammensetzte, aufgenommen und resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein FACS-Röhrchen überführt und für 30 Minuten im Brutschrank mit der Färbelösung inkubiert.



**Abbildung 4.2: Repräsentative Darstellung der Gating-Strategie zur Ermittlung generierter ROS.**  
Es wurde eine vitale Zellpopulation selektiert (links) und in dieser die durch ROS verursachte Fluoreszenz erfasst (rechts).

Es folgte die Analyse am Durchflusszytometer, wobei wie in Kap. 4.2.3.7 nur die *Singlet*-Population analysiert wurde. Hierbei wurden je Bestimmung stets 30.000 vereinzelte Zellen untersucht. Aus dieser Population konnten tote Zellen mit Hilfe des zugesetzten PI diskriminiert werden und dadurch ausschließlich die emittierte Fluoreszenz von CellROX® Green aus Zellen mit intakter Membran ermittelt werden. Die Fluoreszenz wurde als Histogramm dargestellt und aus diesem die mittlere Fluoreszenz bestimmt (Abb. 4.2). Zur Auswertung wurden die mittleren Fluoreszenzen exponierter Zellen ins Verhältnis zur Fluoreszenz von Negativkontrollen der ALI-Exposition gesetzt, woraus sich eine x-fache Induktion an ROS ergab.

#### 4.2.3.9 Quantifizierung von DNA-Strangbrüchen

DNA-Strangbrüche wurden mit Hilfe der Alkalischen Entwindung (AU) quantifiziert (Hartwig *et al.* 1993). Diese Methode beruht auf einer Entwindung der DNA durch eine alkalische Lösung, wobei die Entwindung nur an DNA-Strangbrüchen erfolgt. Nach diversen Aufarbeitungsschritten werden einzel- (ssDNA) und doppelsträngige DNA (dsDNA) chromatographisch getrennt. Schließlich erfolgt eine fluorometrische Detektion mit einem DNA-interkalierenden Farbstoff. Bei der Durchführung dieser Methode wurden für jede Bestimmung zwei technische Replikate mitgeführt.

Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen, wie in Kap. 4.2.3.2 und 4.2.3.3 beschrieben, abtrypsinisiert und in kaltem PBS/10 % FKS aufgenommen. Es erfolgte eine Zentrifugation (1.300 rpm, 3 min, 4 °C), anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 1 mL PBS resuspendiert. Im Anschluss wurde die Zellzahl bestimmt und eine Zellsuspension der Konzentration 10.000.000 Zellen/mL hergestellt. Aus dieser Lösung wurden 10 µL in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt und 750 µL alkalische Lösung zugesetzt. Der pH-Wert der alkalischen Lösung ist hierbei zelllinienabhängig (A549: pH 12,1; MucilAir: pH 11,9). Es folgte eine 30-minütige Entwindung der DNA unter Lichtausschluss und eine anschließende Neutralisation auf pH 6,8 mit 0,1 M HCl. Anschließend wurde die Lösung 15 Sekunden mit Hilfe einer Ultraschallspitze sonifiziert (10 % Amplitude, konstante Sonifizierung) und 15 µL 10 %ige SDS-Lösung zur Stabilisierung der DNA hinzugegeben. Die Proben wurden bis zur chromatographischen Trennung der ssDNA und dsDNA bei -20 °C gelagert.

### Säulenchromatographische Trennung und Quantifizierung

Alle Schritte zur chromatographischen Separation der DNA erfolgten bis zur Anfärbung der Proben bei 60 °C. Vor der Separation der beiden DNA-Varianten wurden die benötigten Hydroxylapatit-Säulen vorbereitet, die als stationäre Phase fungieren. Hierzu wurde eine Hydroxylapatit-Suspension der Konzentration 0,1 g/mL in 0,01 M NaP-Puffer hergestellt und 30 Minuten bei 60 °C äquilibriert. Pro Säule wurden 500 µL der Suspension zwischen zwei Glasfaserfilter gegeben und anschließend mit 0,5 M KP-Puffer gewaschen. Darauffolgend wurden die Säulen mit 0,01 M NaP-Puffer konditioniert und schließlich mit den vortemperierten Proben beladen. Die Säulen wurden mit 0,01 M NaP-Puffer gespült und schließlich die ssDNA sowie die dsDNA mit 0,15 M respektive 0,35 M KP-Puffer in je einzelne Kavitäten einer 48-Lochplatte eluiert. Die DNA wurde letztlich mit Höchst-Farbstoff 33258 (Absorptions-/Emissionsmaximum: 360/455 nm) bei Raumtemperatur angefärbt (Endkonzentration  $7,5 \times 10^{-7}$  M) und nach 20 Minuten die Fluoreszenz am Mikroplattenlesegerät bestimmt.

### Berechnung der Anzahl an DNA-Strangbrüchen

Zur Feststellung der Anzahl an DNA-Strangbrüchen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wurde zu Beginn die Fluoreszenz (F) mitgeführter Blindwerte von den jeweiligen Proben abgezogen (Gl. 4.8). Aufgrund einer stärkeren Interkalation des Farbstoffes in dsDNA im Vergleich zu ssDNA wurde zur Berechnung des relativen dsDNA-Anteils ein Korrekturfaktor (2,1; Gl. 4.9) verwendet (Hartwig *et al.* 1993). Darauffolgend wurde der Anteil an dsDNA der Proben ins Verhältnis zum dsDNA-Anteil der unbehandelten Kontrollen gesetzt. Mit Hilfe einer Kalibriergerade, die im Zuge der wissenschaftlichen Abschlussarbeit für die Zelllinie A549 angefertigt wurde (Anhang Kap. 9.4), konnte die Anzahl an DNA-Strangbrüchen pro  $10^6$  Basenpaare (Bp) bestimmt werden (Gl. 4.10). Diese Berechnung unterliegt der Annahme, dass pro Gray eine Induktion von 1.000 DNA-Strangbrüchen stattfindet und sich im menschlichen Genom  $6 \times 10^9$  Bp befinden (Hartwig *et al.* 1996, Venter *et al.* 2001).

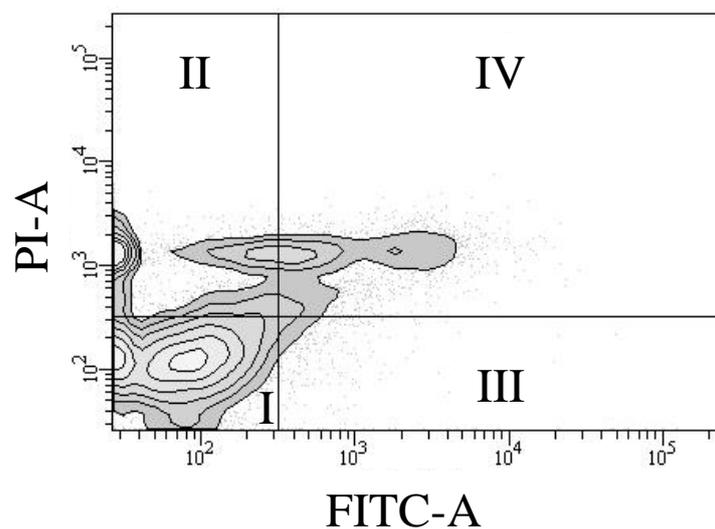
$$F = F_{\text{Probe}} - F_{\text{Blindwert}} \quad (4.8)$$

$$\text{Anteil dsDNA} = \frac{F_{\text{dsDNA}}}{F_{\text{dsDNA}} + 2,1 \cdot F_{\text{ssDNA}}} \quad (4.9)$$

$$\text{Strangbrüche pro } 10^6 \text{ bp} = -\ln \frac{\text{Anteil dsDNA}_{\text{Probe}}}{\text{Anteil dsDNA}_{\text{Kontrolle}}} \cdot \frac{10^3}{0,0534} \cdot \frac{10^6}{6 \cdot 10^9} \quad (4.10)$$

#### 4.2.3.10 Induktion von Apoptose und Nekrose

Die Unterscheidung zwischen apoptotischem und nekrotischem Zelltod wurde mit Hilfe einer PI/Annexin V-Färbung durchgeführt. Hierbei zeigt der Farbstoff PI, der, wie bereits in Kap. 4.2.3.8 beschrieben, keine intakten Membranen durchdringt, eine nekrotische Wirkung an. Die Einleitung eines apoptotischen Zelltodes wird mit Hilfe des Proteins Annexin V, das mit Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC, Absorptions-/Emissionsmaximum: 495/519 nm) konjugiert ist, erfasst. Annexin V bindet dabei spezifisch an Phosphatidylserin (PS), einen Bestandteil der Zellmembran, das nur an der Membrannenseite lokalisiert ist. Im Zuge der Apoptose verliert die Zellmembran jedoch ihren asymmetrischen Aufbau, wodurch PS auch an der äußeren Zellmembran gebunden wird und so ein positives Annexin V-FITC Signal hervorruft. Es ist jedoch anzumerken, dass auch spätapoptotische und nekrotische Zellen aufgrund einer permeablen Membran ein positives Annexin V-FITC Signal induzieren. Daher differenziert die PI/Annexin V-Färbung vier mögliche Zellpopulationen: Vitale (I), nekrotische (II), apoptotische (III) und spätapoptotische/nekrotische (IV) Zellen (Abb. 4.3). Zur Detektion von PI wurde das Signal nach dem 695/40 nm Bandpassfilter verwendet, während das Annexin V-FITC Signal nach dem 530/30 nm Bandpassfilter bestimmt wurde.



**Abbildung 4.3: Repräsentative Darstellung zur Unterscheidung von Zellpopulationen.** Hierbei wurden vitale (I), nekrotische (II), apoptotische (III) und spätapoptotische/nekrotische (IV) Zellpopulationen mit Hilfe eines Dot-Plots differenziert.

Eine halbe Stunde vor Ende der Inkubation wurden die Zellen apikal mit 200  $\mu\text{L}$  Färbelösung, die sich aus 200  $\mu\text{L}$  Ringer-Lösung, 0,25  $\mu\text{L}$  PI (50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) und 1  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC zusammensetzte, für 30 Minuten koinkubiert. Nach Ende der Koinkubation wurde die apikale Koinkubationslösung in ein FACS-Röhrchen überführt und die Zellen, wie in Kap. 4.2.3.2 beschrieben, abtrypsiniert, wobei sowohl die Wasch- als auch die Trypsinlösung ebenfalls im vorliegenden FACS-Röhrchen gesammelt wurden. Schließlich erfolgte die Aufnahme der Zellen in 1 mL Zellkulturmedium, die Zellsuspension wurde resuspendiert und ebenfalls in das FACS-Röhrchen überführt. Anschließend erfolgte die Analyse am Durchflusszytometer, wobei abermals agglomerierte Zellen diskriminiert wurden und ausschließlich 10.000 Zellen der *Singlet*-Population untersucht wurden (s. Kap. 4.2.3.8). Zur Auswertung erfolgte die Angabe der prozentualen Verteilung der jeweiligen Subpopulationen (vital, apoptotisch, nekrotisch, spätapoptotisch/nekrotisch) in Bezug auf die analysierte *Singlet*-Population.

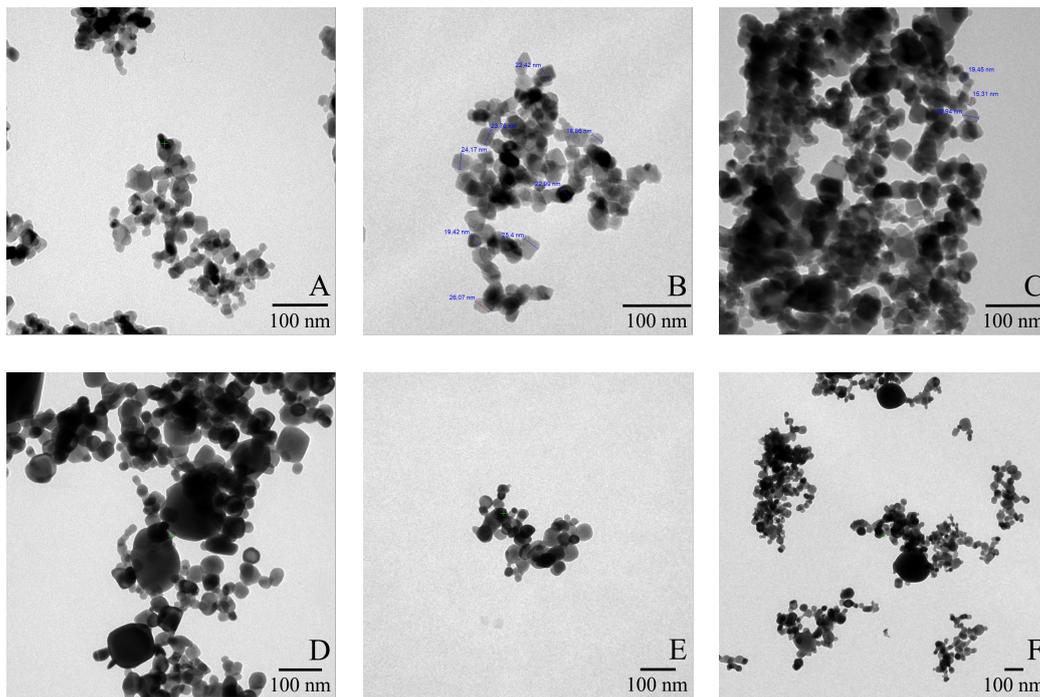
# 5 Ergebnisse und Diskussion

Mit der steigenden industriellen Verwendung von NM nimmt ebenso die Exposition gegenüber nanoskaligen Verbindungen zu, insbesondere am Arbeitsplatz. Bei der Verarbeitung, und damit sowohl während der Produktion als auch bei der thermischen und stofflichen Verwertung nanomaterialhaltiger Produkte, gilt die Inhalation als Hauptexpositionsquelle für diese Materialien (zusammengefasst in Kuhlbusch *et al.* 2018). Eine *In-vitro*-Exposition unter realitätsnahen Bedingungen ist für die inhalationstoxikologische Bewertung derartiger Verbindungen von enormer Bedeutung. Diese Prämisse kann mit Hilfe einer ALI-Zellkultivierung sowie geeigneten Expositionsanlagen erfüllt werden (zusammengefasst in Paur *et al.* 2011). Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wird die Etablierung einer derartigen ALI-Exposition sowie der toxische Wirkmechanismus der verwendeten CuO und TiO<sub>2</sub> NP beschrieben. Der zweite Teil befasst sich mit dem Effekt von Verbrennungsaerosolen aus der thermischen Nanokompositaufarbeitung nach einer ALI-Exposition auf die Genexpression von A549-Zellen und eines 3D-Zellkulturmodells sowie auf die Induktion von DNA-Strangbrüchen in diesen *in-vitro*-Systemen.

## 5.1 Etablierung einer ALI-Exposition mit Hilfe von Referenzpartikeln

### 5.1.1 Bestimmung der Partikelgrößenverteilung

Zur Bestimmung der Größenverteilung der verwendeten NP wurden die jeweiligen NP-haltigen Aerosole in der Vitrocell® Cloud auf zufällig verteilte Gitternetze für TEM-Aufnahmen appliziert. Mit Hilfe der Software *ImageJ* wurde der Durchmesser von Primärpartikeln anhand der TEM-Aufnahmen vermessen. Eine Auswahl an TEM-Aufnahmen der jeweiligen NP aus unterschiedlich konzentrierten Stammlösungen ist in Abb. 5.1 dargestellt.



**Abbildung 5.1: Repräsentative TEM-Aufnahmen der ALI applizierten Nanopartikel aus verschiedenen Stammlösungen (A-F).**

**TiO<sub>2</sub> NP:** A = 0,5 mg/mL, B = 1 mg/mL, C = 2,5 mg/mL

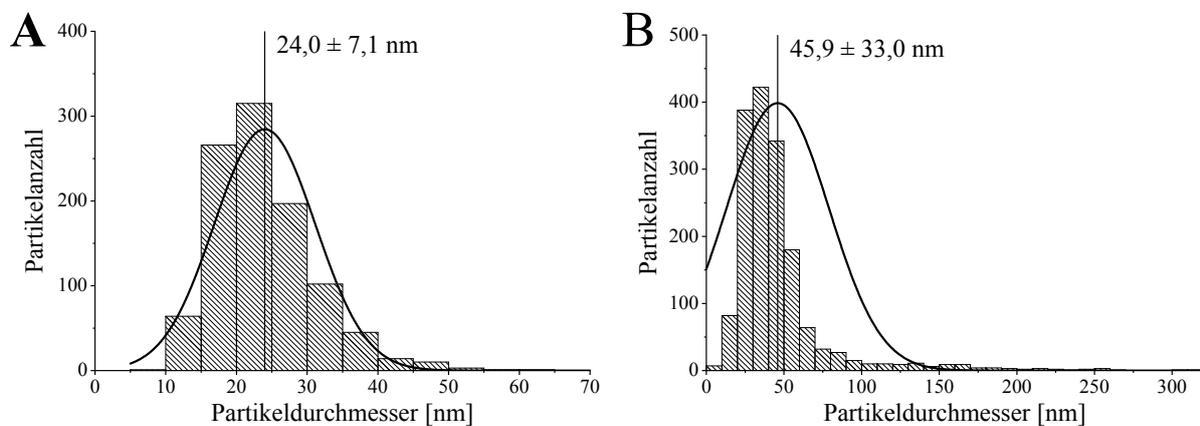
**CuO NP:** D = 0,5 mg/mL, E = 1 mg/mL, F = 2,5 mg/mL.

Die optische Begutachtung der Partikel ergab nahezu sphärische Partikel, sowohl in Bezug auf die TiO<sub>2</sub> NP (Abb. 5.1 A - C) als auch auf die CuO NP (Abb. 5.1 D - F). Während TiO<sub>2</sub> NP bereits augenscheinlich eine homogene Partikelgrößenverteilung zeigten, wiesen die untersuchten CuO NP eine stärkere Heterogenität in ihrer Größe auf (repräsentativ Abb. 5.1 D). Um eine Beeinflussung der Partikelgrößenverteilung durch die Konzentration der Stammlösung auszuschließen, wurde der Durchmesser primärer Partikel in unterschiedlich konzentrierten Stammlösungen bestimmt (Tab. 5.1).

**Tabelle 5.1: Tabellarische Zusammenfassung der Partikeldurchmesser abhängig von der eingesetzten Stammlösung.** Dargestellt sind die Mittelwerte der Durchmesser von mind. 100 Partikeln  $\pm$  SD. S1: 0,5 mg/mL; S2: 1 mg/mL; S3: 2,5 mg/mL.

Partikelspezies	Partikeldurchmesser [nm]			
	Herstellerangabe	S1	S2	S3
TiO <sub>2</sub> (Aeroxide P25, Evonik)	21	23,1 $\pm$ 6,6	24,7 $\pm$ 7,2	22,9 $\pm$ 7,3
CuO (Sigma – Aldrich)	< 50	41,5 $\pm$ 31,0	45,8 $\pm$ 30,6	49,8 $\pm$ 39,1

Hinsichtlich der verwendeten TiO<sub>2</sub> NP Stammlösungen konnten nur geringfügige und konzentrationsunabhängige Unterschiede im Partikeldurchmesser beobachtet werden. Zudem war eine homogene Größenverteilung der Partikel zu erkennen, die sich sowohl in einer geringen SD als auch, wie bereits erwähnt, in der optischen Analyse widerspiegelte (Abb. 5.1 A - C). Der mittlere Partikeldurchmesser der CuO NP zeigte hingegen eine Zunahme mit steigender Konzentration der eingesetzten Stammlösung. Gleichzeitig wiesen diese Partikel im Vergleich zu den TiO<sub>2</sub> NP insgesamt eine größere Heterogenität auf, die in einer hohen SD sowie in der optischen Auswertung ersichtlich wurde (Abb. 5.1 D - F). Die beobachteten Veränderungen im Partikeldurchmesser wurden unter Berücksichtigung der SD als nicht relevant erachtet. Daher wurde schließlich die Partikelgrößenverteilung unabhängig von der eingesetzten Stammlösung bestimmt (Abb. 5.2).



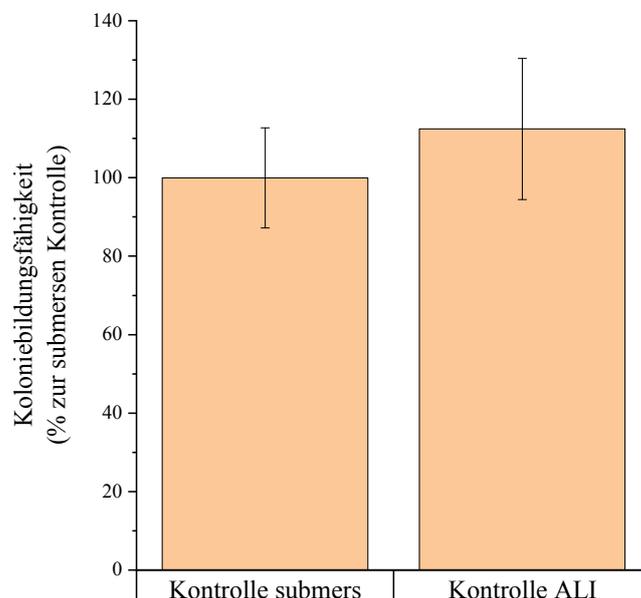
**Abbildung 5.2: Größenverteilung beider NP nach deren Exposition in der Vitrocell® Cloud unabhängig von der eingesetzten Stammlösung.** Dargestellt sind die Mittelwerte der Durchmesser von mind. 1000 Partikeln  $\pm$  SD. **A:** TiO<sub>2</sub> NP; **B:** CuO NP.

Hierbei zeigte sich hinsichtlich der TiO<sub>2</sub> NP mit  $24,0 \pm 7,1$  nm ein mittlerer Partikeldurchmesser, der etwas über der Herstellerangabe von 21 nm lag (Abb. 5.2 A). Der ermittelte Durchmesser war mit Daten aus publizierten Studien, die ebenfalls eine Größenverteilung der gleichen Partikelspezies mit Hilfe von TEM-Aufnahmen analysierten, vergleichbar (Motzkus *et al.* 2013, Yang *et al.* 2014). Die untersuchten CuO NP wiesen einen Partikeldurchmesser von  $45,9 \pm 33,0$  nm auf (Abb. 5.2 B). Dieser Wert entspricht den Herstellerangaben (< 50 nm) und ist etwas geringer als bereits publizierte Partikelgrößen aus vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe (Semisch *et al.* 2014). Ausführliche Charakterisierungen der verwendeten CuO NP und TiO<sub>2</sub> NP in verschiedenen Medien wurden bereits in mehreren Studien publiziert (Motzkus *et al.* 2013, Semisch 2013, Yang *et al.* 2014; zusammengefasst in Rasmussen *et al.* 2014).

## 5.1.2 Untersuchungen zur Zytotoxizität

### 5.1.2.1 Einfluss der Kultivierungs- und Expositionsmethode

Die Verwendung eines ALI-Expositionssystems erfordert eine Umstellung von der gängigen submersen Zellkultivierung zur Kultivierung und Exposition in einem Transwell-System. Um einen Einfluss des Zellkulturmodells auf die Viabilität auszuschließen, wurde der Effekt des NP-Suspensionsträgers (1 %-iges PBS) auf die CFA untersucht. Die über ein ALI exponierten Proben wurden dabei mit submers kultivierten Kontrollversuchen verglichen (Abb. 5.3).



**Abbildung 5.3: Beeinflussung der Koloniebildungsfähigkeit durch 1 %iges PBS (Kontrolle ALI) nach ALI-Exposition im Vergleich zu submersen Kontrollversuchen (Kontrolle submers).** A549-Zellen wurden nach 24-stündiger ALI-Adaption für zehn Minuten in der Vitrocell® Cloud gegenüber einem 1 %igen PBS-Aerosol exponiert und für 24 Stunden inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SD.

Die Exposition gegenüber dem Suspensionsträger zeigte eine leicht erhöhte CFA auf  $112 \pm 18$  % im Vergleich zu submers kultivierten Zellen (Abb. 5.3). Diese Erhöhung der CFA spiegelt jedoch unter Berücksichtigung der SD keine relevante Veränderung wider, womit falsch positive oder negative Aussagen bedingt durch die Kultivierungs- sowie Expositionsmethode ausgeschlossen werden konnten. Ein Einfluss verschiedener Lösungen auf die Zellviabilität nach ALI-Exposition wurde bereits in der Literatur dargelegt. Hierbei konnte eine geringfügige, aber nicht relevante

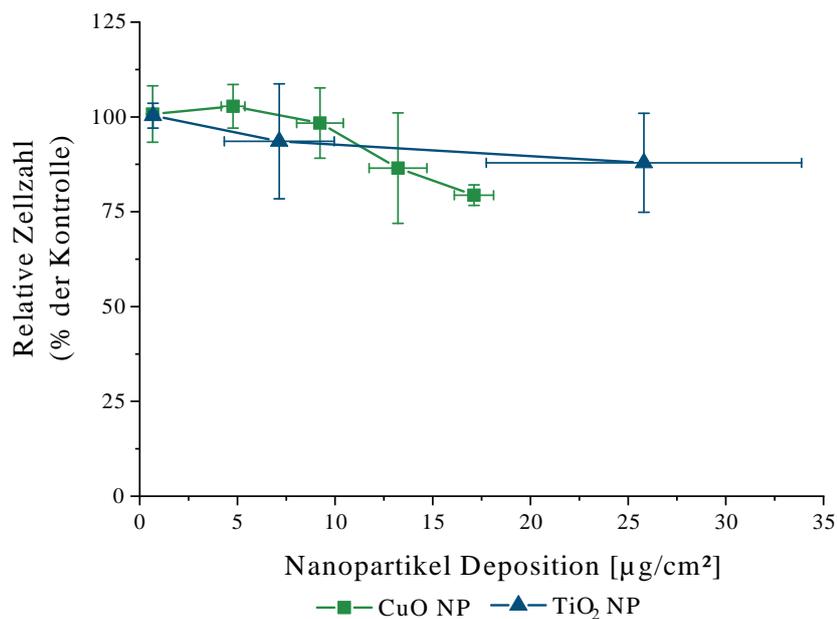
Abnahme der Zellviabilität nach Exposition gegenüber 10 mM NaCl- oder Citrat-Lösung festgestellt werden (Lenz *et al.* 2009). Dies wurde ebenso nach Exposition gegenüber Reinluft beobachtet, eine Applikation eines Aerosols aus destilliertem Wasser rief im Gegensatz dazu eine leichte erhöhte Zellviabilität hervor (Fröhlich *et al.* 2013).

### 5.1.2.2 Eingesetzte Partikeldepositionen

Mit Hilfe der Vitrocell® *Cloud* konnten A549-Zellen mit Partikeldepositionen zwischen 0,4 und 25,8  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  exponiert werden. Paur *et al.* (2011) erstellten eine Modellberechnung zur Ermittlung der Dosis in der Alveolarregion sowohl unter Arbeitsplatzbedingungen als auch durch Umgebungsluft, wobei für beide Szenarien *worst case* Bedingungen an *hot spots* des Alveolarbereichs angenommen wurden. *Hot spots* stellen dabei die Bereiche dar, an denen die höchste Dosis aufgrund einer ungleichen Deposition und *Clearance* innerhalb der Lunge sowie durch eine mögliche Unterschätzung der Dosis vorliegt. Hierbei wurde für Umgebungsluft eine Lebenszeitdosis (80 Jahre) von 6,6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  und für Arbeitsbedingungen eine tägliche Dosis (8 Stunden Schicht) von 0,13  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  sowie eine kumulative Exposition (Arbeitszeit 5 Tage die Woche, 50 Wochen im Jahr, 45 Jahre, inkl. Dosis durch Umgebungsluft für eine Gesamtlebenszeit von 80 Jahren) gegenüber 420  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  berechnet (zusammengefasst in Paur *et al.* 2011). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit applizierten Partikeldepositionen spiegeln damit durchaus kumulative Expositionen von Arbeitnehmern der verarbeitenden Industrie wider.

### 5.1.2.3 Zytotoxizität von $\text{TiO}_2$ und CuO Nanopartikeln

Insbesondere metallhaltige NP zeigen Interferenzen mit einer Vielzahl von gängigen Testsystemen zur Bestimmung der Viabilität bzw. Zytotoxizität, weshalb die Wahl eines adäquaten Testsystems und geeigneter Kontrollversuche von großer Relevanz ist (Han *et al.* 2011, Holder *et al.* 2012, Kroll *et al.* 2012, Riebeling *et al.* 2018). Daher wurde auf Basis einer Studie aus der Arbeitsgruppe (Semisch 2014), die eine Beeinflussung eines photometrischen Testsystems durch Kupfer-Ionen beschreibt, kein photometrischer Zytotoxizitätstest verwendet. Statt dessen wurden die relative Zellzahl sowie die CFA als Parameter einer toxischen Wirkung gewählt (Abb. 5.4 und 5.5).

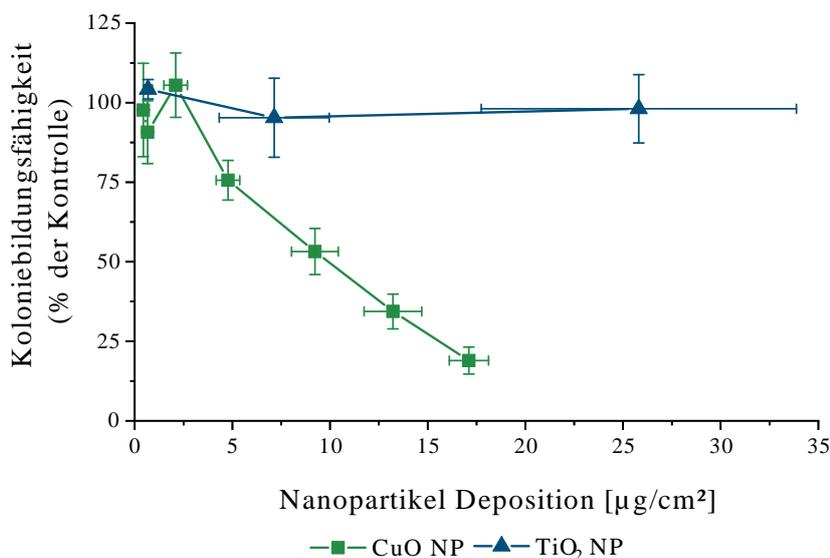


**Abbildung 5.4: Einfluss von CuO NP (■) und TiO<sub>2</sub> NP (▲) auf die relative Zellzahl nach ALI-Exposition.** A549-Zellen wurden nach 24-stündiger ALI-Adaption für zehn Minuten in der Vitrocell® Cloud gegenüber einem NP-haltigen Aerosol exponiert und für 24 Stunden inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SD.

Die relative Zellzahl wurde durch CuO NP lediglich unter dem Einfluss hoher Dosierungen geringfügig reduziert (Abb. 5.4). Hierbei war eine Abnahme auf 86 % respektive 79 % im Vergleich zur Negativkontrolle nach Exposition gegenüber  $13,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  bzw.  $17,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  zu erkennen. TiO<sub>2</sub> NP induzierten ebenfalls eine leichte Reduzierung der relativen Zellzahl. So war ein geringfügiger Rückgang der Zellzahl auf 88 % nach Exposition gegenüber der höchsten Dosis von  $25,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  zu beobachten. Beide Partikelspezies zeigten zusammenfassend einen abnehmenden Effekt auf die relative Zellzahl und damit eine geringfügige akute Toxizität.

Hinsichtlich der CFA zeigte die Behandlung mit CuO NP eine deutlich ausgeprägtere Toxizität im Vergleich zur relativen Zellzahl (Abb. 5.5). Bereits ab einer Dosis von  $4,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  konnte eine zytotoxische Wirkung festgestellt werden, wobei die CFA auf 76 % reduziert wurde. Zudem konnte eine dosisabhängige Verstärkung dieses Effekts beobachtet werden. Den stärksten zytotoxischen Einfluss zeigte die Exposition gegenüber  $17,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  mit einer Reduzierung der CFA auf 19 %. Im Gegensatz zu CuO NP zeigte die Behandlung mit TiO<sub>2</sub> NP keinen Einfluss auf die CFA.

Die zytotoxische Wirkung von CuO NP unter submersen Bedingungen konnte bereits in zahlreichen Publikationen, sowohl aus der Arbeitsgruppe (Semisch *et al.* 2014, Strauch *et al.* 2017) als auch von weiteren Forschergruppen (Ahamed *et al.* 2010, Cronholm *et al.* 2013, Karlsson *et al.* 2008; 2009, Midander *et al.* 2009, Moschini *et al.* 2013, Wang *et al.* 2012), festgestellt werden.



**Abbildung 5.5: Einfluss von CuO NP (■) und TiO<sub>2</sub> NP (▲) auf die Koloniebildungsfähigkeit nach ALI-Exposition.** A549-Zellen wurden nach 24-stündiger ALI-Adaption für zehn Minuten in der Vitrocell® Cloud gegenüber einem NP-haltigen Aerosol exponiert und für 24 Stunden inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SD.

Ebenso wurde bereits eine höhere Sensitivität der CFA im Vergleich zur Bestimmung der Zellzahl beschrieben (Semisch 2013). Auch unter ALI-Exposition wurde eine zytotoxische Wirkung von CuO NP auf A549-Zellen dargelegt (Aufderheide *et al.* 2013, Jing *et al.* 2015, Steinritz *et al.* 2013). Eine Übertragbarkeit der Ergebnisse zwischen den jeweiligen Studien nach ALI-Exposition von CuO NP ist jedoch aufgrund unterschiedlicher Primärpartikel, Inkubations- sowie Expositionszeiten, Expositionssysteme und variierender Dosiserfassung nur schwer möglich. Nach einer Exposition gegenüber CuO NP für zwei bzw. vier Stunden konnten Jing *et al.* (2015) eine dosisabhängige Zytotoxizität auf A549-Zellen mittels LDH- und *Alamar Blue*-Test aufzeigen. Die aus SMPS-Daten errechnete Dosis lag dabei mit maximal  $150 \text{ ng}/\text{cm}^2$  weit unter der Dosis, die in der vorliegenden Arbeit eine toxische Wirkung zeigte. Eine mögliche Ursache hierfür könnte im geringeren Durchmesser der von Jing *et al.* (2015) verwendeten Partikel liegen. So konnte bereits ein Einfluss des Durchmessers nanoskaliger Partikel auf deren Zytotoxizität für ZnO und Ag NP nachgewiesen werden (Gluga *et al.* 2014, Hsiao und Huang 2011). Aufderheide *et al.* (2013) und Steinritz *et al.* (2013) zeigten mittels WST-1-Test nach 24-stündiger Inkubation eine dosisabhängige Zytotoxizität von CuO NP auf A549-Zellen. Hierbei wurden zwar weitaus höhere Dosierungen ( $25 - 100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) eingesetzt, jedoch waren die verwendeten CuO NP mit denen der vorliegenden Arbeit vergleichbar. Die Betrachtung der akut toxischen Wirkung von  $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$

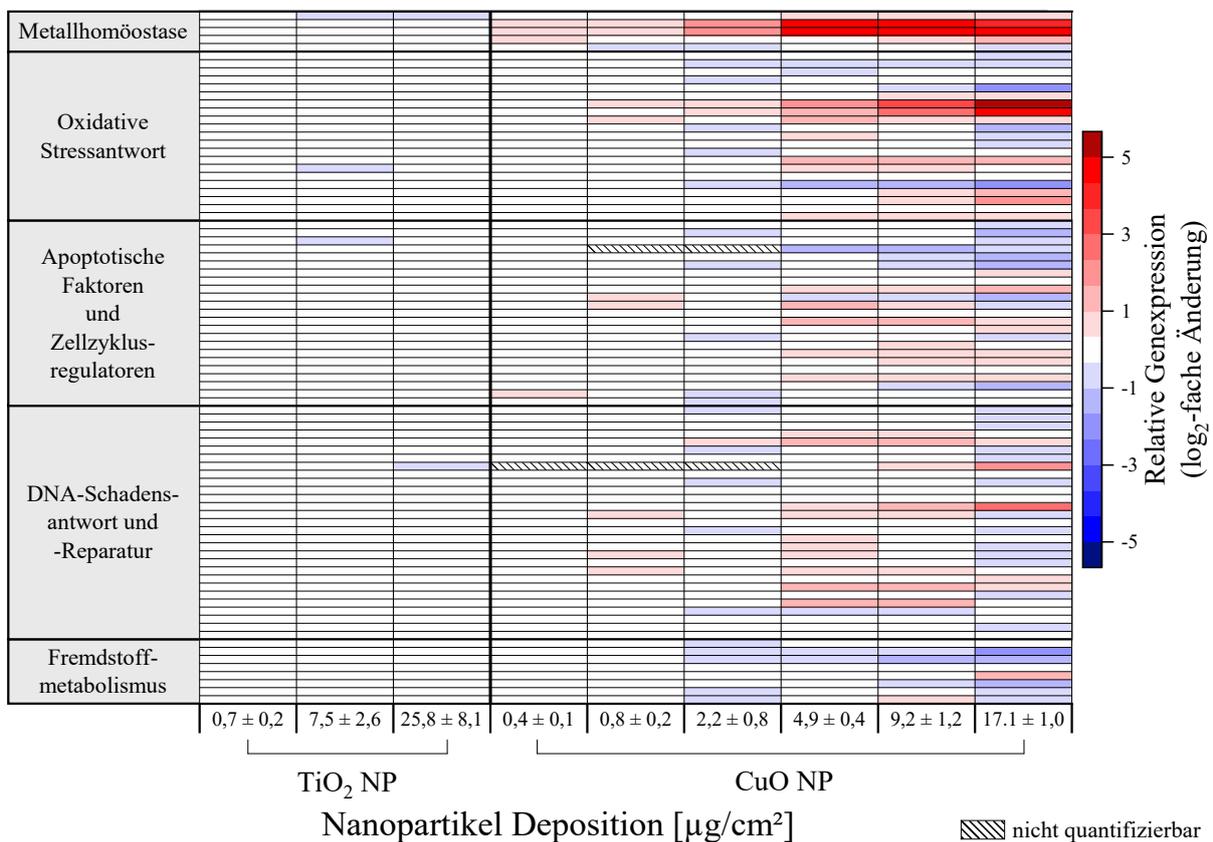
CuO NP zeigte hierbei eine Viabilität von circa 50 %. Da in der vorliegenden Arbeit keine Dosis in dieser Größenordnung verwendet wurde, ist ein Vergleich nur schwer durchführbar. Jedoch war in der vorliegenden Arbeit ebenso eine dosisabhängige Abnahme der Zellzahl durch CuO NP zu erkennen, die mit Hilfe einer Extrapolation eine zur beschriebenen Studie vergleichbare toxische Wirkung aufzeigen könnte.

Die verwendeten TiO<sub>2</sub> NP wurden ebenso bereits ausgiebig unter submersen Bedingungen untersucht, wobei keine ausgeprägte zytotoxische Wirkung auf A549-Zellen festgestellt werden konnte. Lediglich unter der Verwendung sehr hoher Dosen und/oder langer Inkubationszeit (48 h) konnte eine geringfügige Zytotoxizität beobachtet werden (Jugan *et al.* 2012, Sayes *et al.* 2006, Simon-Deckers *et al.* 2008, Tedja *et al.* 2011). Neben submersen Untersuchungen liegen zudem Studien über den Einfluss der verwendeten TiO<sub>2</sub> NP-Spezies auf A549-Zellen nach ALI-Exposition vor. Während Loret *et al.* (2016) bei einer geringen Dosis von 3 µg/cm<sup>2</sup> nach 24-stündiger Inkubation keinen toxischen Einfluss feststellen konnten, wiesen sowohl Rach *et al.* (2014) als auch Steinritz *et al.* (2013) eine dosisabhängige zytotoxische Wirkung nach. Hierbei zeigte sich unter dem Einfluss von 25 µg/cm<sup>2</sup> eine Reduzierung der Zellviabilität auf 50 % (Rach *et al.* 2014) respektive 74 % (Steinritz *et al.* 2013) mittels WST-1-Test. Die Betrachtung der vergleichbaren Dosis aus der vorliegenden Arbeit zeigt eine schwächer ausgeprägte akute Toxizität. Die Diskrepanz hinsichtlich der toxischen Wirkung könnte mit der Betrachtung unterschiedlicher Endpunkte der Toxizitätstests begründet werden. Während der WST-1-Test die metabolische Aktivität bestimmt, wurden durch die hier durchgeführte Zellzahlbestimmung alle Zellen mit intakter Zellmembran ermittelt. Zudem wurden bereits Interferenzen zwischen NP und Formazan, dem Metabolisierungsprodukt des WST-1-Tests, nachgewiesen, so dass falsch negative Ergebnisse durch dieses Testsystems nicht ausgeschlossen werden können (Kroll *et al.* 2012).

Zusammenfassend belegen die Daten der vorliegenden Arbeit eine ausgeprägte zytotoxische Wirkung der CuO NP nach ALI-Exposition. Diese Beobachtung bestätigt vorhandene Studien zur Zytotoxizität dieser NP-Spezies, sowohl unter submersen Bedingungen als auch nach ALI-Exposition. Zudem konnte eine geringfügige akut toxische Wirkung der verwendeten TiO<sub>2</sub> NP festgestellt werden, die in dieser Form auch unter submersen Bedingungen beschrieben wurde. Vergleichbare Studien zur ALI-Exposition dieser NP zeigten jedoch eine stärker ausgeprägte toxische Wirkung. Insgesamt konnten somit CuO NP und TiO<sub>2</sub> NP bezüglich einer toxischen Wirkung als Positiv- respektive Negativkontrolle für das verwendete Expositionssystem ausgemacht werden.

### 5.1.3 Untersuchung des Wirkmechanismus nach ALI-Exposition

Die HT RT-qPCR ist eine innovative und aussagekräftige Methode, um Wirkmechanismen toxischer Substanzen aufzuklären. Mit Hilfe dieser spezifischen Methode ist es möglich, simultan in 96 Proben eine Beeinflussung von 95 Genen verschiedener Gengruppen quantitativ zu erfassen. In vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe konnte diese Methode etabliert und validiert werden (Fischer *et al.* 2016). Zudem wurde sie im Rahmen von Untersuchungen zu CuO NP unter submersen Inkubationsbedingungen erfolgreich angewandt (Strauch *et al.* 2017). Auf Basis dieser Erkenntnisse sollte die HT RT-qPCR-Methode im Rahmen der vorliegenden Arbeit genutzt werden, um die Verwendung eines ALI-Expositionssystem mit Hilfe zweier Referenznanopartikel (CuO und TiO<sub>2</sub>) zu etablieren. Die Veränderungen im Genexpressionsmuster von A549-Zellen nach Exposition gegenüber beiden Partikelspezies ist in Abb. 5.6 schematisch als Heatmap dargestellt.



**Abbildung 5.6: Schematische Darstellung der Beeinflussung des Genexpressionsprofils von A549-Zellen nach ALI-Exposition gegenüber TiO<sub>2</sub> und CuO NP als Heatmap.** Eine rote Färbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine verminderte Genexpression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SD.

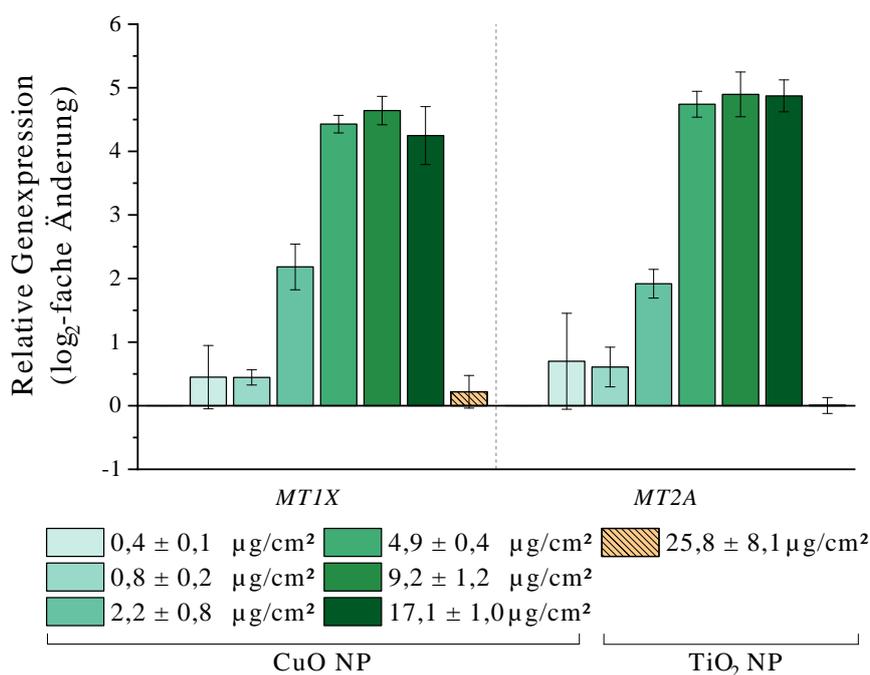
Die Exposition gegenüber TiO<sub>2</sub> NP zeigte keinen relevanten Einfluss auf das Genexpressionsprofil von A549-Zellen, wobei im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Verdopplung oder Halbierung der Transkriptmenge eines Gens (log<sub>2</sub>-facher Faktor ±1) als eine relevante Beeinflussung definiert wird. Im Gegensatz dazu konnte durch die Behandlung mit CuO NP eine dosisabhängige Veränderung des Expressionsmusters in einer Vielzahl der untersuchten Gene beobachtet werden. Dabei ist hervorzuheben, dass die Applikation von 0,4 und 0,8 µg/cm<sup>2</sup> kaum relevante Veränderungen der Genexpression aufzeigten und somit ein *No Observed Adverse Effect Level* (NOAEL) im Rahmen der Genexpressionsanalyse erfasst werden konnte. Die stärkste Dosisabhängigkeit und ausgeprägtesten Effekte zeigten die Gengruppen der Metallhomöostase und der oxidativen Stressantwort. Dies deutet sowohl auf eine zelluläre Aufnahme und Freisetzung von Kupfer-Ionen, als auch auf die Induktion von oxidativem Stress hin. Zusätzlich konnte ab einer Exposition gegenüber 4,9 µg/cm<sup>2</sup> eine Beeinflussung der Genexpression apoptotischer Faktoren sowie von Zellzyklusregulatoren beobachtet werden. Des Weiteren wurde unter dem Einfluss derselben Dosis eine dosisabhängige Zunahme der Expression von Genen der DNA-Schadensantwort festgestellt. Gene, die mit der DNA-Reparatur assoziiert werden, wurden ebenso bei einer Dosis von 4,9 µg/cm<sup>2</sup> vermehrt exprimiert. Mit steigender Dosis konnte eine Abnahme dieser Expression beobachtet werden. Auch die Gruppe von Genen, die mit dem Fremdstoffmetabolismus assoziiert werden, wurde durch CuO NP in ihrer Expression beeinflusst, wobei die betreffenden Gene meist vermindert exprimiert wurden. Eine detaillierte Heatmap-Darstellung ist in Anhang Kap. 9.5 einzusehen. Im Anschluss wird näher auf diejenigen Gene eingegangen, die eine deutliche Antwort auf die Exposition gegenüber Nanopartikeln zeigten.

### 5.1.3.1 Zelluläre Aufnahme und Bioverfügbarkeit

#### **Beeinflussung der Expression Metallhomöostase-regulierender Gene**

Die Gene *MT1X* und *MT2A* kodieren beide für Proteine der Metallothionein (MT)-Familie. MTs sind relativ kleine (ca. 10 kDa), aber cystein-reiche Proteine (ca. 15-30 %), deren Funktionen die Regulierung des Zinkhaushaltes und die Bindung von Metallionen darstellen. Aufgrund der hohen Anzahl an Thiolgruppen sind jedoch zudem antioxidative Eigenschaften dieser Proteingattung bekannt (zusammengefasst in Blindauer 2014, Krezel und Maret 2017).

Während die Exposition gegenüber CuO NP die Expression der Gene *MT1X* und *MT2A* deutlich steigerte, konnte dies nicht für die Behandlung mit TiO<sub>2</sub> NP festgestellt werden (Abb. 5.7). Die Behandlung mit 0,4 bzw. 0,8 µg/cm<sup>2</sup> CuO NP rief eine leicht erhöhte, aber noch nicht relevant gesteigerte Expression beider Gene hervor. Die Exposition gegenüber 2,2 µg/cm<sup>2</sup> steigerte bereits



**Abbildung 5.7: Einfluss der ALI-Exposition gegenüber CuO und TiO<sub>2</sub> NP auf die Expression der Gene MT1X und MT2A.** A549-Zellen wurden nach 24-stündiger ALI-Adaption für zehn Minuten in der Vitrocell® Cloud gegenüber einem NP-haltigen Aerosol exponiert und für 24 Stunden inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SD.

die Expression um den  $\log_2$ -fachen Faktor 2,2 (MT1X) respektive 1,9 (MT2A). Ab einer Dosis von  $4,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  wurde MT1X um einen  $\log_2$ -fachen Faktor von ca. 4,4 und MT2A um Faktor 4,8 erhöht. Eine weitere Dosiserhöhung resultierte nicht in einer weiteren Steigerung der Genexpression, stattdessen wurden beide Gene konstant stark vermehrt exprimiert. Die Exposition gegenüber TiO<sub>2</sub> NP führte zu keiner relevanten Expressionsänderung von beiden MT-kodierenden Genen. Die Transkription der hier untersuchten MT-kodierenden Gene kann sowohl durch eine Reihe an Transkriptionsfaktoren als auch durch oxidativen Stress erfolgen. Einen der relevantesten Transkriptionsfaktoren stellt dabei der *metal-regulatory transcription factor 1* (MTF-1) dar, der durch eine erhöhte intrazelluläre Metallionenkonzentration aktiviert wird (Heuchel *et al.* 1994; zusammengefasst in Blindauer 2014, Günther *et al.* 2012, Krezel und Maret 2017, Takahashi 2015). Dabei erfolgt die Verdrängung und Freisetzung von  $\text{Zn}^{2+}$  aus MT durch Metallionen, wie beispielsweise Kupfer-Ionen, aufgrund von höheren Bindungsaffinitäten zu Thiolgruppen der MTs. Dies kann durch eine Vielzahl an Metallionen oder auch  $\text{H}_2\text{O}_2$  erfolgen. Die freigesetzten Zink-Ionen aktivieren schließlich das Zinkfingerprotein MTF-1, das die Expression von MT-kodierenden Genen induziert (Nielson *et al.* 1985, Zhang *et al.* 2003). In Bezug auf die Ergebnisse der vorliegenden

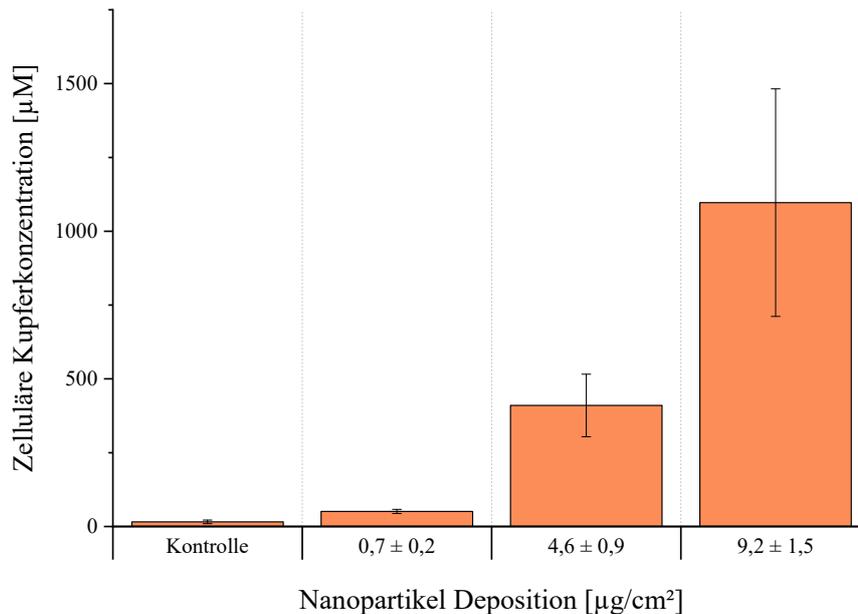
Arbeit lässt die erhöhte *MT1X*- und *MT2A*-Expression somit auf eine gesteigerte intrazelluläre Kupferionenkonzentration schließen. Diese These unterstützt der *trojan horse type* Mechanismus, der eine endozytotische Aufnahme und lysosomale Prozessierung der CuO NP zu Kupfer-Ionen postuliert (Cronholm *et al.* 2013, Limbach *et al.* 2007, Moschini *et al.* 2013). Die Induktion einer Expression MT-kodierender Gene durch CuO NP nach deren zellulärer Verarbeitung konnte durch mehrere Studien unter submersen Bedingungen aufgezeigt werden (Hanagata *et al.* 2011, Strauch *et al.* 2017). Diesbezügliche Untersuchungen nach einer ALI-Exposition wurden bisher nicht publiziert. Ein Vergleich der Expression beider Gene, unter Berücksichtigung der gleichen Zelllinie und einer vergleichbaren Dosierung, mit einer vorangegangenen Studie der Arbeitsgruppe ergab eine vergleichbare *MT1X*-Expression (Strauch *et al.* 2017), während in der vorliegenden Arbeit *MT2A* etwas ausgeprägter exprimiert wurde. Bisher wurde nur in einer Studie eine konstant gesteigerte Genexpression beobachtet (Cuillel *et al.* 2014). Eine Erklärung für die konstante Expression unter dem Einfluss hoher Dosierungen könnte eine maximale NP-Aufnahme oder auch das Erreichen einer Expressionskapazität dieser Gene bieten.

Das beobachtete Ausbleiben eines Einflusses der TiO<sub>2</sub> NP auf die *MT1X*- und *MT2A*-Expression wurde in weiteren submers durchgeführten Studien beschrieben. So zeigten Poon *et al.* (2017) keinen Effekt der verwendeten TiO<sub>2</sub> NP-Spezies auf die Genexpression in THP-1 Zellen, wohingegen Tuomela *et al.* (2013) geringfügige Effekte in MDDC- und HMDM-Zellen feststellten. Gleichzeitig konnte keine Beeinflussung in Jurkat-Zellen beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung könnte die Unlöslichkeit der TiO<sub>2</sub> NP unter lysosomalen Bedingungen darstellen (Zhong *et al.* 2017). Gleichzeitig ist zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Erkenntnis bzgl. einer Aktivierung von MTF-1 durch Titan-Ionen bekannt.

### **Bestimmung der zellulären Kupferkonzentration**

Die Quantifizierung von internalisierten NP stellt eine große Herausforderung dar. Aufgrund der Adsorption von NP an die äußere Zellmembran ist es nur teilweise möglich, membranassoziierte Partikel abzuwaschen. Es besteht daher die Möglichkeit einer Überschätzung der zellulären Partikelaufnahme mit gängigen Quantifizierungsmethoden. Aufgrund dessen wurde eine Methode zur Bestimmung der zellulären Gesamtaufnahme mittels GF-AAS gewählt, die auf einer fraktionierten Aufarbeitung der Zellen beruht und die es erlaubt, aus NP freigesetzte Ionen zu quantifizieren. Im Zuge der Aufarbeitung erfolgt dabei eine Lysierung und Abtrennung von Membranbestandteilen mittels Zentrifugation. Durch diesen Zentrifugationsschritt werden vorhandene membrangebundene NP aus dem zur Quantifizierung verwendeten Lysat entfernt, weshalb letztlich nur die intrazelluläre Ionenkonzentrationen des jeweiligen Partikels bestimmt werden kann. Eine DLS-

Analyse eines Blindwertes, einer Partikelsuspension und eines aufgearbeiteten Lysat zum Nachweis der Abtrennung der partikulären Fraktion ist in Anhang Kap. 9.6 einzusehen. Die verwendete Methode setzt eine intrazelluläre Löslichkeit der eingesetzten NP voraus und ist daher nicht für unlösliche Partikel, wie beispielsweise  $\text{TiO}_2$  NP, geeignet. Die Anwendung dieser Methode und Löslichkeit der CuO NP konnte bereits in Studien aus der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt werden (Fischer 2016, Semisch *et al.* 2014).



**Abbildung 5.8: Darstellung der intrazellulären Kupferkonzentration nach ALI-Exposition gegenüber CuO NP.** A549-Zellen wurden nach 24-stündiger ALI-Adaption für zehn Minuten in der Vitrocell® Cloud gegenüber einem NP-haltigen Aerosol exponiert und für 24 Stunden inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen  $\pm$  SD.

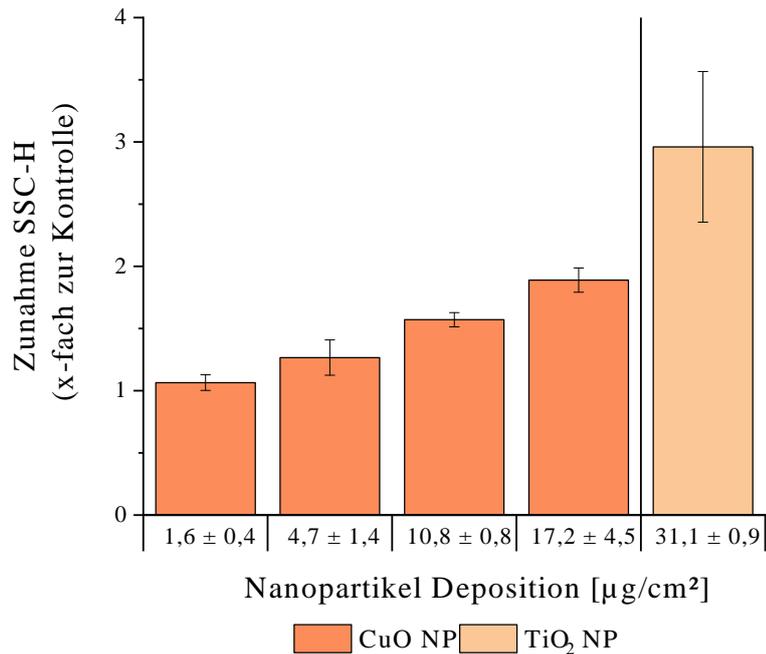
Die Exposition gegenüber CuO NP zeigte eine dosisabhängige Zunahme der intrazellulären Kupferkonzentration (Abb. 5.8), wie sie auch schon in der Literatur unter submersen Bedingungen beschrieben wurde (Cronholm *et al.* 2013, Semisch *et al.* 2014, Strauch *et al.* 2017). Hinsichtlich ALI-Expositionen sind keine Studien zur Untersuchung der Aufnahme von CuO NP bekannt. Bereits eine Exposition gegenüber der geringsten eingesetzten Dosis von  $0,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  zeigte im Vergleich zur basalen Kupferkonzentration ( $16 \mu\text{M}$ ) eine Zunahme des intrazellulären Kupfergehaltes auf  $51 \mu\text{M}$ . Eine deutliche 250-fache Steigerung im Vergleich zur Kontrolle auf  $410 \mu\text{M}$  wurde durch die Behandlung mit  $4,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  beobachtet. Die Exposition gegenüber  $9,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  erbrachte einen weiteren Anstieg des intrazellulären Kupfergehaltes auf  $1,1 \text{ mM}$ . Während auf transkriptioneller Ebene die Expression der MT-kodierenden Gene zwischen der Dosierung von  $4,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  und  $9,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  keine Zunahme aufzeigte (Kap. 5.1.3.1), konnte auf funktioneller Ebe-

ne eine Steigerung der intrazellulären Kupferkonzentration nachgewiesen werden. Das Erreichen eines Expressionsmaximums für MT-kodierende Gene scheint daher wahrscheinlicher als eine ausbleibende NP-Aufnahme ab einer Dosis von ca.  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Ein Vergleich mit vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe zeigte eine weitaus höhere zelluläre Kupferkonzentration in BEAS-2B-Zellen (Strauch *et al.* 2017) und eine leicht erhöhte Kupferkonzentration in A549-Zellen (Semisch *et al.* 2014) unter dem Einfluss vergleichbarer CuO NP Dosen. Eine Erklärung für diese Beobachtung kann in der verwendeten Zelldichte liegen. Während die vorangegangenen Studien submers und subkonfluent durchgeführt wurden, herrschen während der ALI-Exposition konfluente Bedingungen. Unter Berücksichtigung einer vergleichbaren Dosis, und damit auch Partikelanzahl, nimmt das Verhältnis zwischen Partikeln pro Zelle unter konfluenten Kultivierungsbedingungen im Vergleich zu subkonfluenten Bedingungen ab. Daher kann unter konfluenten Bedingungen, und damit nach ALI-Exposition, ebenso von einer geringeren NP-Aufnahme pro Zelle ausgegangen werden. Die gleiche Beobachtung konnte bereits in Bezug auf die zytotoxische Wirkung von ZnO NP getroffen werden (Heng *et al.* 2011). Hierbei wurde eine Verringerung der zytotoxischen Wirkung von ZnO NP mit steigender Konfluenz beobachtet und dies mit einem abnehmenden Verhältnis von Partikeln pro Zelle in Verbindung gebracht.

### **Durchflusszytometrische Bestimmung der Nanopartikel-Aufnahme**

Bedingt durch die Limitierung zur Untersuchung der zellulären Aufnahme partikulärer Verbindungen mittels GF-AAS wurde zudem eine alternative Methode basierend auf der Durchflusszytometrie (FACS) angewandt. Hierbei wird die Veränderung des SSC, einem Maß für die Granularität, Größe sowie Struktur des Zellkerns und die zelluläre Vesikelanzahl, nach einer Behandlung mit NP betrachtet. Durch die Erfassung des SSC-Werts kann jedoch nicht zwischen internalisierten und membrangebundenen Partikeln differenziert werden. Aus diesem Grund wurde diese Methode von mehreren Studien anhand eines Vergleichs der durchflusszytometrischen Methode und Mikroskopie basierender Bildgebung validiert (Sanders *et al.* 2012, Suzuki *et al.* 2007, Zucker *et al.* 2010; 2013). Dabei konnten internalisierte Partikel sowohl durch mikroskopische Aufnahmen als auch durch eine Steigerung des SSC-Wertes festgestellt werden. Somit kann mit Hilfe des SSC-Wertes ein Rückschluss auf die zelluläre Internalisierung von NP getroffen werden.

Die Behandlung mit unterschiedlichen CuO NP Dosen zeigte eine konzentrationsabhängige Aufnahme der Partikel (Abb. 5.9). Während die Exposition gegenüber  $1,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CuO NP eine marginale Veränderung um den Faktor 1,1 im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle zeigte, bewirkte die Inkubation mit  $4,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  eine Zunahme des SSC-Signales um den Faktor 1,3. Die Behandlung mit  $10,8$  bzw.  $17,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  erhöhte das SSC-Signal auf Faktor 1,6 respektive 1,9.



**Abbildung 5.9: Darstellung der NP-Aufnahme nach ALI-Exposition gegenüber CuO und TiO<sub>2</sub> NP mit Hilfe einer durchflusszytometrischen Methode.** A549-Zellen wurden nach 24-stündiger ALI-Adaption für zehn Minuten in der Vitrocell® Cloud gegenüber einem NP-haltigen Aerosol exponiert und für 24 Stunden inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SD.

Die stärkste Signalveränderung konnte bei einer Exposition gegenüber einer TiO<sub>2</sub> NP Dosis von 31,1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  beobachtet werden, hierbei ergab sich eine Signalverstärkung um Faktor 3. Die geringe Zunahme des SSC-Wertes nach Exposition gegenüber CuO NP kann mit der intrazellulären Löslichkeit dieser Partikelspezies begründet werden. Folglich stehen weniger partikuläre Verbindungen intrazellulär zur Verfügung um den SSC-Wert zu beeinflussen. Während die NP-Aufnahme mit Hilfe dieser Methode bisher nicht nach einer ALI-Exposition publiziert wurde, wiesen Moschini *et al.* (2013) unter submersen Bedingungen bereits die Aufnahme von CuO NP und TiO<sub>2</sub> NP in A549-Zellen mit Hilfe einer FACS-basierten Methode nach. Zudem konnte die Internalisierung der Partikel mit bildgebenden Methoden (TEM, konfokale Mikroskopie) zusätzlich bestätigt werden. Anhand der beschriebenen Beobachtungen ist damit von einer intrazellulären Aufnahme beider NP-Spezies auszugehen.

Zusammenfassend zeigte die Genexpressionsanalyse unter dem Einfluss von CuO NP die Induktion einer Gengruppe, die durch lösliche Metallionen vermehrt exprimiert werden. Dabei war ab einer Dosis von 4,9  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ein stabiles und stark erhöhtes Expressionsniveau zu beobachten. Unter dem Einfluss von TiO<sub>2</sub> NP konnte keine Beeinflussung auf transkriptioneller Ebene

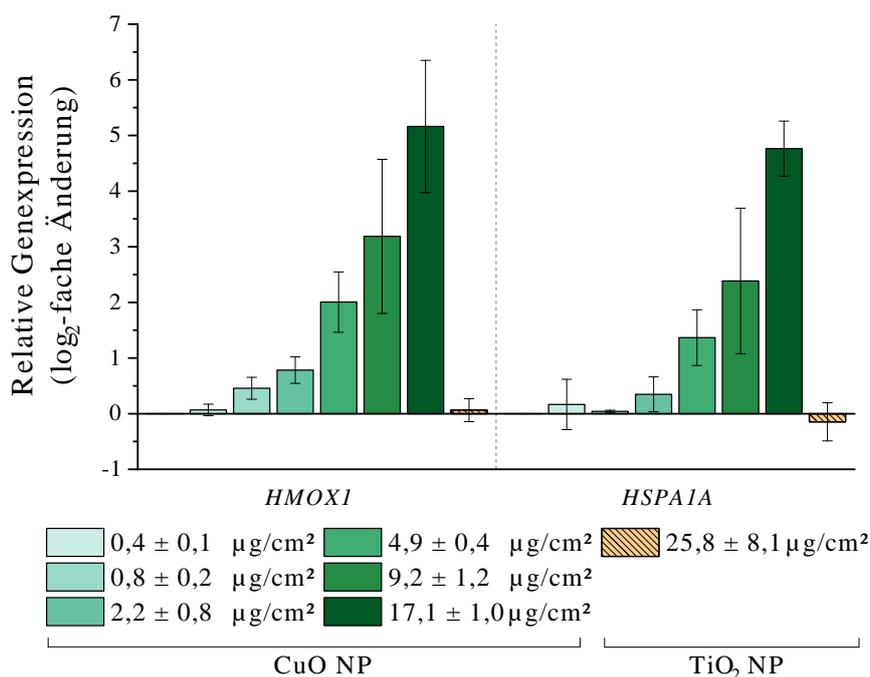
festgestellt werden. Mit Hilfe der GF-AAS konnte die intrazelluläre Aufnahme und Löslichkeit der CuO NP bestätigt werden. Gleichzeitig zeigte diese Analyse, dass das erreichte Genexpressionsmaximum nicht durch eine ausbleibende NP-Aufnahme, sondern durch das Erreichen einer maximalen Genexpressionskapazität begründet werden kann. Zudem konnte mit Hilfe einer durchflusszytometrischen Methode auch die Aufnahme beider NP-Spezies in partikulärer Form festgestellt werden.

### 5.1.3.2 Induktion einer zellulären Stressreaktion

#### Beeinflussung der Expression von Genen der zellulären Stressantwort

Die Gene *HMOX1* und *HSPA1A* stellen beide Biomarker einer zellulären Stressantwort dar. Das Gen *HMOX1* kodiert für das Enzym Hämoxigenase-1, das Häm zu Biliverdin, CO sowie  $\text{Fe}^{3+}$  abbaut, und wird durch eine Reihe von Transkriptionsfaktoren reguliert. Dazu zählen mit AP-1, Nrf2 und NF- $\kappa$ B auch Faktoren, die eine Induktion von oxidativen Stress signalisieren. Daher wird eine gesteigerte *HMOX1*-Expression mit einem erhöhten oxidativen Stresslevel in Verbindung gebracht (Pronk *et al.* 2014, van der Veen *et al.* 2016; zusammengefasst in Alam und Cook 2007, Ryter *et al.* 2006). *HSPA1A* kodiert für das Protein *heat shock 70kDa protein 1*, das zur Proteinfamilie der Chaperone gehört. Die Hauptfunktion dieser Proteingattung liegt in der Verhinderung einer fehlerhaften Proteinfaltung oder -aggregation. Auf transkriptioneller Ebene wird *HSPA1A* durch verschiedene Transkriptionsfaktoren, u.a. HSF-1 und NF- $\kappa$ B, reguliert, die durch einen Hitzeschock oder chemisch induzierten intrazellulären Stress aktiviert werden (Sasi *et al.* 2014; zusammengefasst in de Toda und De la Fuente 2015, Gupta *et al.* 2010, Hartl und Hayer-Hartl 2002, Mayer und Bukau 2005).

Beide Stressmarker (*HMOX1* und *HSPA1A*) zeigten eine dosisabhängig gesteigerte Expression unter dem Einfluss von CuO NP (Abb. 5.10). Während die Exposition gegenüber 0,4 - 2,2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  CuO NP nur eine geringfügig gesteigerte *HMOX1*-Expression hervorrief, wurde das Gen unter Einfluss höherer NP-Dosierung (4,9 - 17,1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) stark vermehrt exprimiert. Die maximale Expression lag hierbei bei einer Veränderung um den  $\log_2$ -fachen Faktor 5,2 nach Inkubation mit 17,1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Für das Gen *HSPA1A* wurde ab einer Dosis von 4,6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  eine gesteigerte Genexpression beobachtet. Diese zeigte ebenso eine ausgeprägte Dosisabhängigkeit bis zu einer maximalen Expressionsänderung um den  $\log_2$ -fachen Faktor 4,8. Die Exposition gegenüber TiO<sub>2</sub> NP zeigte keinen Einfluss auf Expression von Genen zellulärer Stressmarker.

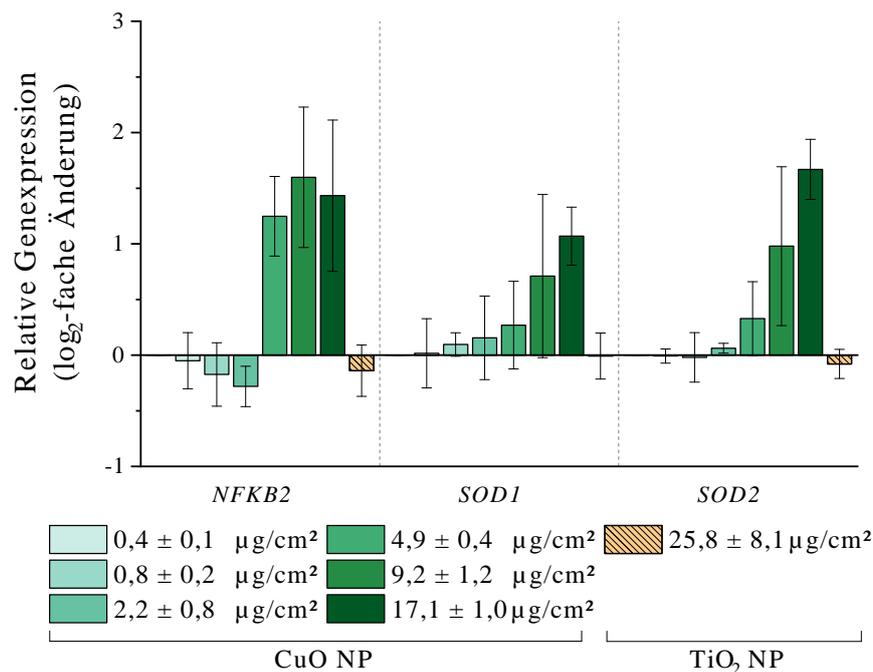


**Abbildung 5.10: Beeinflussung der Genexpression zellulärer Stressmarker nach ALI-Exposition gegenüber CuO und TiO<sub>2</sub> NP.** A549-Zellen wurden nach 24-stündiger ALI-Adaption für zehn Minuten in der Vitrocell® Cloud gegenüber einem NP-haltigen Aerosol exponiert und für 24 Stunden inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen ± SD.

Im Unterschied zur Expression der MT-kodierenden Gene (Kap. 5.1.3.1), konnte bezüglich der Genexpression zellulärer Stressmarker erst ab einer Dosis von  $4,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ein relevanter Effekt beobachtet werden. Jedoch konnte bereits unterhalb dieser Dosis eine geringfügige Tendenz erkannt werden. Dies spricht für eine ausreichende Bindung der gelösten Kupfer-Ionen durch MTs unter dem Einfluss von  $0,4 - 2,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Im Gegensatz dazu steht die dosisabhängig stark gesteigerte Expression von *HMOX1* und *HSPA1A* in einem Dosisbereich von  $4,9 - 17,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . In diesem Konzentrationsbereich wurde die konstante Expression der MT-kodierenden Gene beobachtet. Dies deutet auf eine Überschreitung der Bindungskapazität der maximal exprimierten MTs hin, die schließlich in der Induktion einer zellulären Stressantwort resultiert. Eine ähnliche Beobachtung machten Cuillel *et al.* (2014), hierbei wurde eine dosisabhängig gesteigerte Expression von *HMOX1* sowie des HSPA6-kodierenden Gens in HepG2-Zellen nach einer submersen Inkubation von CuO NP dargelegt. Gleichzeitig konnte eine stark gesteigerte und nicht dosisabhängige Expression des MT-kodierenden Gens *MT1X* festgestellt werden. Eine im Vergleich stärker ausgeprägte Expression der Stressmarker nach submerser Exposition von A549-Zellen gegenüber derselben Partikelspezies und vergleichbarer Dosierung wurde von Strauch *et al.* (2017) beschrie-

ben. Hierbei konnte im Unterschied zur vorliegenden Arbeit eine dosisabhängige Expression von MT- sowie Stressmarker-kodierenden Genen beobachtet werden. Eine gesteigerte Expression der Stressmarker *HMOX1* und *HSPA1A* wurde von Xin *et al.* (2015) in Verbindung mit der Induktion von oxidativem Stress gebracht. Hierbei wurde der Einfluss von Ag NP auf A549-Zellen unter submersen Bedingungen untersucht und eine Induktion reaktiver Sauerstoffspezies mit Hilfe unterschiedlicher Methoden bei gleichzeitiger Erhöhung der Proteingehalte von Hämoxigenase-1 (HO-1) und *HSPA1A* festgestellt.

Zusammenfassend konnte erstmalig die Induktion einer zellulären Stressantwort nach Überschreiten der Bindungskapazität der MTs durch CuO NP nach einer ALI-Exposition festgestellt werden. Im Gegensatz dazu konnte keine Induktion einer zellulären Stressantwort durch TiO<sub>2</sub> NP beobachtet werden. Die Ursache der zellulären Stressantwort wurde mit der Induktion von oxidativem Stress in Verbindung gebracht, wodurch auch Gene antioxidativer Schutzmechanismen beeinflusst wären. Der Einfluss auf die Genexpression einiger Gene antioxidativer Proteine ist in Abb. 5.11 dargestellt.



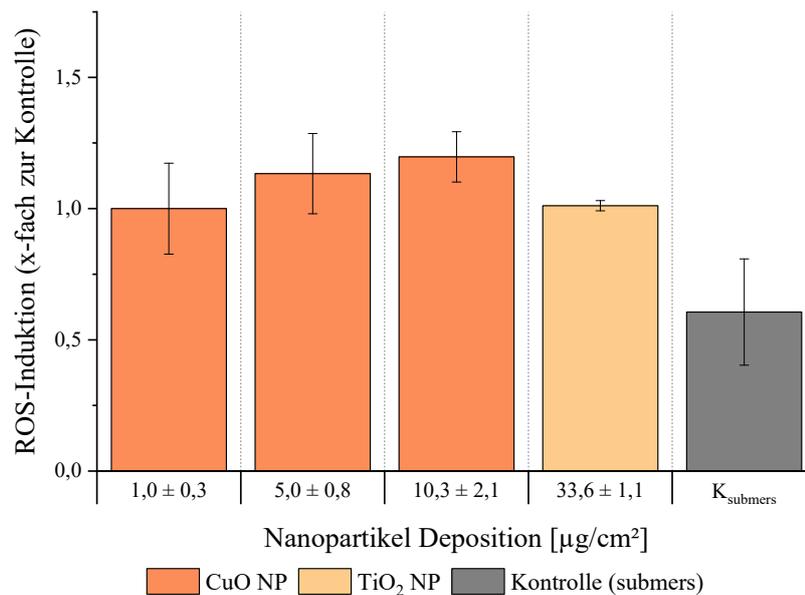
**Abbildung 5.11: Beeinflussung der Expression von Genen antioxidativ wirkender Proteine nach ALI-Exposition gegenüber CuO und TiO<sub>2</sub> NP.** A549-Zellen wurden nach 24-stündiger ALI-Adaption für zehn Minuten in der Vitrocell® Cloud gegenüber einem NP-haltigen Aerosol exponiert und für 24 Stunden inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen ± SD.

Es konnte neben der Expression der Stressmarker ein Einfluss von CuO NP auf drei Gene der antioxidativen Stressabwehr beobachtet werden, während die Behandlung mit TiO<sub>2</sub> NP keinen Effekt aufwies. Die Genexpression von *NFKB2*, das für eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B kodiert, zeigte sich unter dem Einfluss niedriger Dosierungen geringfügig herunter reguliert. Ab einer Dosis von 4,9  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  CuO NP wurde dieses Gen nahezu konstant um den log<sub>2</sub>-fachen Faktor 1,4 vermehrt exprimiert. Für die Gene *SOD1* und *SOD2*, die beide für verschiedene Varianten der Superoxiddismutase (SOD) kodieren, konnte eine dosisabhängig gesteigerte Expression beobachtet werden. Die größte Beeinflussung beider Gene konnte nach Exposition gegenüber der höchsten Dosis von 17,1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  festgestellt werden. Hierbei nahm die Expression um einen log<sub>2</sub>-fachen Faktor von 1,1 (*SOD1*) bzw. 1,7 (*SOD2*) zu.

Bestehende Studien zur Beeinflussung der Genexpression durch TiO<sub>2</sub> NP zeigen eine widersprüchliche Datenlagen unter Verwendung vergleichbarer Dosierungen (10 - 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) und Inkubationszeiten. Tuomela *et al.* (2013) untersuchten drei verschiedene immunkompetente Zelllinien und beobachteten dabei keinen Effekt auf das Transkriptom durch TiO<sub>2</sub> NP. Im Gegensatz dazu zeigten weitere Studien unter Verwendung anderer Zelllinien eine Beeinflussung der Gene von zellulären Stressmarkern sowie der inflammatorischen Antwort (Aydın *et al.* 2017, Okuda-Shimazaki *et al.* 2010, Park *et al.* 2008). Diese Studien offenbaren einen zelllinienabhängigen Einfluss der TiO<sub>2</sub> NP auf transkriptioneller Ebene. Für die hier verwendete A549-Zelllinie liegen aktuell keine Studien zur Expression antioxidativ wirkender Gene vor. Eine gesteigerte Transkription von *NFKB2*, *SOD1* und *SOD2* bedingt durch den Einfluss von CuO NP konnte in verschiedenen submersen Zellsystemen beobachtet werden (Hanagata *et al.* 2011, Piret *et al.* 2012, Strauch *et al.* 2017). Die erhöhte Transkriptmenge von *SOD1* und *SOD2*, die beide für Hyperoxid-Anion detoxifizierende Proteine kodieren, kann durch eine Vielzahl an Transkriptionsfaktoren, u.a. AP-1, NF- $\kappa$ B und Nrf2, hervorgerufen werden (zusammengefasst in Miao und Clair 2009). Zusätzlich spiegelt die gesteigerte *NFKB2*-Expression aufgrund der Selbstregulation von NF- $\kappa$ B die Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors wider (Lombardi *et al.* 1995). Da zudem die NF- $\kappa$ B Zielgene *SOD1*, *SOD2*, *HMOX1* und *IL8* unter dem Einfluss von CuO NP nach einer ALI-Exposition vermehrt exprimiert wurden, ist von einer Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors auszugehen (Das *et al.* 1995, Kunsch und Rosen 1993, Lin *et al.* 2007; zusammengefasst in Miao und Clair 2009, Milani *et al.* 2011). Eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B in A549-Zellen durch CuO NP konnte unter submersen Bedingungen bereits dargelegt werden (Cho *et al.* 2012a). Diese kann durch eine Vielzahl an Stimuli ausgelöst werden, u.a. durch oxidativen Stress oder Schwermetalle (zusammengefasst in Serasanambati und Chilakapati 2016). Insgesamt deuteten die dargestellten Ergebnisse auf eine Induktion von oxidativem Stress durch aus CuO NP gelöste Kupfer-Ionen hin; daher wurde eine durchflusszytometrische Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies durchgeführt.

### Durchflusszytometrische Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies

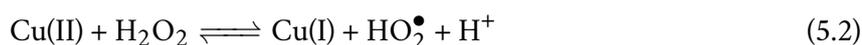
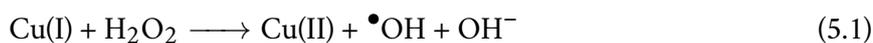
Die Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) ist mit Hilfe diverser Analysemethoden möglich. In der vorliegenden Arbeit wurde ein durchflusszytometrischer Ansatz basierend auf der Oxidation einer fluorogenen Sonde und anschließender Detektion der emittierenden Fluoreszenz gewählt (Soares *et al.* 2015, von Moos *et al.* 2015). Hierbei wurde die emittierte Fluoreszenz der jeweiligen exponierten Zellen ins Verhältnis zur Fluoreszenz der mitgeführten ALI-kultivierten und mit 1 %igen PBS exponierten Negativkontrolle gesetzt.



**Abbildung 5.12: Durchflusszytometrische Bestimmung der ROS-Induktion nach ALI-Exposition gegenüber CuO und TiO<sub>2</sub> NP.** A549-Zellen wurden nach 24-stündiger ALI-Adaption für zehn Minuten in der Vitrocell® Cloud gegenüber einem NP-haltigen Aerosol exponiert und für 24 Stunden inkubiert. Die submersive Kontrolle umfasst eine submers kultivierte und nicht behandelte Kontrollgruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SD.

Die durchflusszytometrische Bestimmung zur Induktion von ROS zeigte einen geringfügigen, aber dosisabhängigen Effekt nach Exposition gegenüber CuO NP. Während die geringste exponierte Dosis von  $1,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  noch keine Induktion von ROS im Vergleich zur ALI-kultivierten Kontrolle hervorrief, induzierte eine Behandlung mit  $5,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ROS um Faktor 1,1. Eine Inkubation mit  $10,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  erhöhte die ROS-Induktion 1,2-fach, während eine Exposition gegenüber TiO<sub>2</sub> NP keine Induktion von ROS zeigte. Zu beachten ist jedoch, dass bereits eine Kultivierung an einem ALI zu einer ROS-Induktion führt. So zeigte die submersive Kontrolle nur 60 % der ROS verglichen mit der ALI-Kontrolle. Daher kann die geringe Induktion von ROS durch CuO NP durch einen bereits erhöhten Hintergrund an ROS erklärt werden.

Die Induktion von ROS, und damit oxidativem Stress, durch TiO<sub>2</sub> NP wird widersprüchlich in der Literatur diskutiert. Einige Studien konnten leichte Effekte in A549-Zellen aufzeigen (Park *et al.* 2007, Singh *et al.* 2007), während andere deutliche Effekte auf die Zelllinie BEAS-2B beobachteten (Bhattacharya *et al.* 2009, Park *et al.* 2008). Im Gegensatz dazu konnten andere Studien keine Induktion von oxidativem Stress durch TiO<sub>2</sub> NP feststellen, auch nach einer ALI-Exposition (Hanot-Roy *et al.* 2016, Loret *et al.* 2016). Dabei ist jedoch hervorzuheben, dass nur unter dem Einsatz hoher Dosierungen eine Induktion von oxidativem Stress in A549-Zellen ermittelt wurde. Die Induktion von oxidativem Stress durch CuO NP in unterschiedlichen Zelllinien konnte unter submersen Bedingungen in vielen Studien dargelegt werden (Ahamed *et al.* 2010, Fahmy und Cormier 2009, Karlsson *et al.* 2008, Moschini *et al.* 2013, Strauch *et al.* 2017). Auch nach ALI-Exposition stellte man die Induktion von oxidativem Stress durch CuO NP fest (Jing *et al.* 2015). Unter Berücksichtigung der bereits beschriebenen Daten auf transkriptioneller Ebene (Kap. 5.1.3.2) sowie der Literaturdatenlage ist trotz der in Abb. 5.12 dargestellten lediglich geringfügigen ROS-Generierung durch CuO NP eine dosisabhängige Induktion von oxidativem Stress anzunehmen. Diese konnte unter Verwendung aller bisher vorgestellten Daten ab einer Dosis von ca. 5 µg/cm<sup>2</sup> beobachtet werden. Die Induktion von ROS durch CuO NP könnte mit folgendem Mechanismus begründet werden: Unter dem Einfluss geringerer Dosen wird eine ausreichende Bindung gelöster Kupfer-Ionen durch Metallothioneine (Kap. 5.1.3.1) angenommen. Sobald freie Kupfer-Ionen zellulär vorliegen, ist von einer ROS-Generierung durch eine Fenton-ähnliche Reaktion auszugehen (Reaktion 5.1).



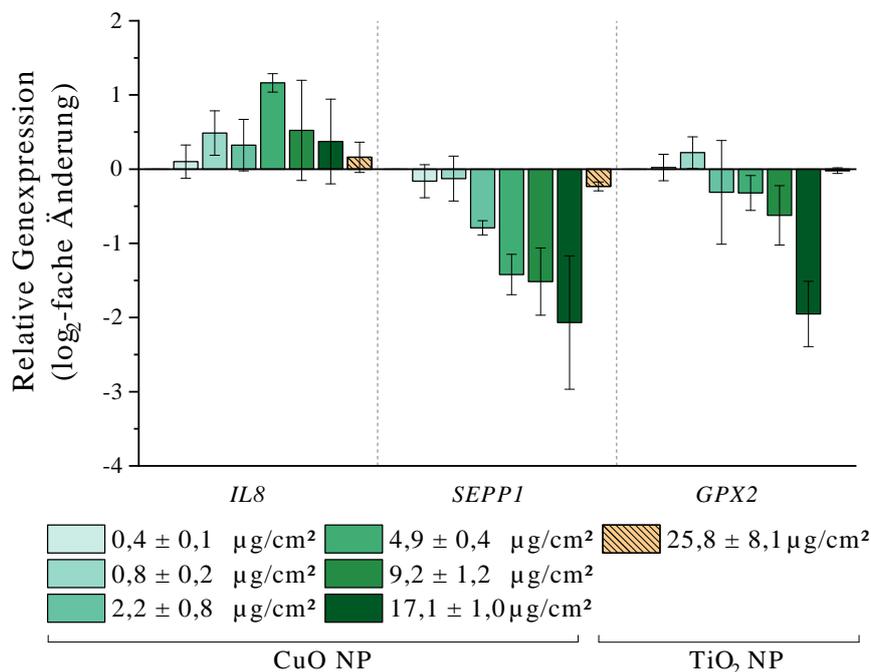
Hierbei reagiert Cu(I) mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zum Hydroxyl-Radikal (•OH), Cu(II) und Hydroxyl-Anion (Reaktion 5.1). Zudem kann auch Cu(II) durch Wasserstoffperoxid zu Cu(I) reduziert werden, wobei ein Hydroperoxyl-Radikal (HO<sub>2</sub>•) entsteht (Reaktion 5.2), und somit als Edukt der Fenton-ähnlichen Reaktion zur Verfügung stehen. Die entstandenen Radikale sind in der Lage, zelluläre Makromoleküle, also Lipide, die DNA oder Proteine, oxidativ zu schädigen (zusammengefasst in Kermanizadeh *et al.* 2015). Neben einer Schädigung von Makromolekülen verursacht eine Imbalance des zellulären Redoxstatus die Aktivierung redox-sensitiver Transkriptionsfaktoren (zusammengefasst in Martindale und Holbrook 2002).

Zusammenfassend wurde eine Induktion von oxidativem Stress durch CuO NP nach ALI-Exposition auf transkriptioneller und funktioneller Ebene festgestellt. Hierbei erwiesen sich die Ergeb-

nisse auf transkriptioneller Ebene sensitiver als die auf funktioneller Ebene. Zusätzlich wurde die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B nach ALI-Exposition gegenüber CuO NP anhand transkriptioneller Daten erstmalig festgestellt. Diese Beobachtungen wurden bisher in dieser Art und Weise noch nicht für eine ALI-Exposition gegenüber CuO NP publiziert und bestätigen die Datenlage des Wirkmechanismus dieser NP unter submersen Bedingungen. Hinsichtlich TiO<sub>2</sub> NP konnte keine Beeinflussung des Transkriptoms oder der ROS-Induktion beobachtet werden. Jedoch wurde durch publizierte Studien eine starke Abhängigkeit der Zelllinie und der eingesetzten Dosis auf eine potentielle Toxizität dieser Partikelspezies evident.

### Einfluss auf die Genexpression inflammatorischer Marker

Neben der Induktion von oxidativem Stress wird auch eine proinflammatorische Antwort auf die Exposition gegenüber NP beschrieben (zusammengefasst in Stone *et al.* 2007). Diesbezüglich ist das Interleukin 8-kodierende Gen *IL8*, das als proinflammatorische Antwort auf zellulären Stress vermehrt exprimiert wird, in das Genset der HT RT-qPCR implementiert. Die Beeinflussung der Expression von *IL8*, *SEPP1* und *GPX2* durch CuO und TiO<sub>2</sub> NP ist in Abb. 5.13 dargestellt.



**Abbildung 5.13: Einfluss auf die Genexpression von *IL8*, *SEPP1* und *GPX2* nach ALI-Exposition gegenüber CuO und TiO<sub>2</sub> NP.** A549-Zellen wurden nach 24-stündiger ALI-Adaption für zehn Minuten in der Vitrocell® Cloud gegenüber einem NP-haltigen Aerosol exponiert und für 24 Stunden inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen ± SD.

CuO NP führten bis zu einer Dosis von  $4,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  zu einer leicht erhöhten Expression von *IL8* (Abb. 5.13). Mit weiter ansteigender Dosis wurde das Gen wieder vermindert exprimiert. Die Abnahme der Genexpression unter dem Einfluss von Dosierungen über  $4,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  könnte mit der einsetzenden zytotoxischen Wirkung in diesem Konzentrationsbereich zu erklären sein. Das für Selenoprotein P kodierende Gen *SEPP1* wurde dosisabhängig vermindert exprimiert. Dieser Effekt war ab einer Dosis von  $2,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  zu beobachten. Die stärkste Beeinflussung konnte unter dem Einfluss von  $17,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CuO NP festgestellt werden. Hierbei wurde die Genexpression um den  $\log_2$ -fachen Faktor  $-2,1$  verringert. Einen ähnlichen Verlauf konnte bei der Expression des Gens *GPX2* beobachtet werden, das für ein Selenoprotein aus der Familie der Glutathionperoxidase kodiert. Hierbei zeigte sich ab einer Dosis von  $2,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  eine konzentrationsabhängige Verminderung der Genexpression. Diese erreichte den ausgeprägtesten Effekt unter dem Einfluss der höchsten CuO NP Dosis mit einer Verringerung um den  $\log_2$ -fachen Faktor  $-2,0$ . Die Exposition gegenüber  $\text{TiO}_2$  NP zeigte keinen Effekt auf die beschriebenen Gene.

Neben einer Studie zum Einfluss von CuO NP auf A549-Zellen nach ALI-Exposition (Jing *et al.* 2015) stellte man auch in submers durchgeführten Studien eine Beeinflussung von *IL8* in verschiedenen Zellsystemen fest. Dabei konnte sowohl auf transkriptioneller Ebene eine vermehrte Expression des Gens *IL8* als auch auf funktioneller Ebene eine *IL-8* Ausschüttung beobachtet werden. Neben *IL-8* wurden noch weitere Marker, u.a. *IL-6*, als Teil der inflammatorischen Antwort auf CuO NP ausgemacht (Dankers *et al.* 2018, Kooter *et al.* 2017, Piret *et al.* 2012, Strauch *et al.* 2017, Ude *et al.* 2017). Ebenso wurde bereits eine verminderte *GPX2*-Expression durch Fischer (2016) beschrieben. In Bezug auf die Beeinflussung der *SEPP1*-Expression durch CuO NP liegen keine Erkenntnisse in der Literatur vor. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass inflammatorische Marker, beispielsweise *IL-6*, eine Verminderung der *SEPP1*-Expression bewirken (Dreher *et al.* 1997, Martitz *et al.* 2015, Mostert *et al.* 2001). Die verminderte Transkriptmenge von *SEPP1* könnte somit auf eine durch oxidativen Stress verursachte inflammatorische Antwort zurückzuführen sein. Zusätzlich konnte eine Bindung von Kupfer-Ionen durch das *SEPP1*-kodierende Protein Selenoprotein P festgestellt werden (Du *et al.* 2014). Die hohe Affinität von Kupfer-Ionen zu Selenol, und damit die Bindung einer notwendigen Selenquelle, könnte eine zelluläre Unterversorgung mit Selen hervorrufen. Weiterhin konnte unter einer defizitären Selenversorgung eine verminderte Transkription von Selenoproteinen, u.a. *GPX2* und *SEPP1*, in Hühnern festgestellt werden, wobei eine Übertragbarkeit dieser Studienergebnisse auf den Menschen nicht direkt gegeben ist (Khosro *et al.* 2015, Luan *et al.* 2016). Auf dieser Grundlage könnte die beobachtete verminderte Transkription von *GPX2* und *SEPP1* einerseits durch eine inflammatorische Antwort und andererseits durch eine Selenunterversorgung erklärt werden.

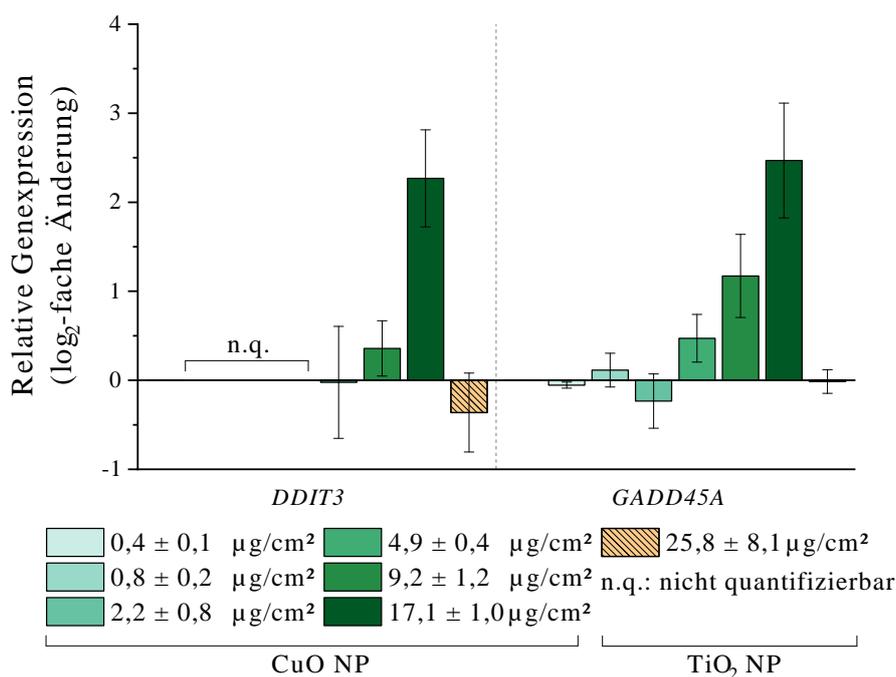
Loret *et al.* (2016) untersuchten bereits die inflammatorische Antwort von TiO<sub>2</sub> NP auf A549-Zellen nach ALI-Exposition, wobei kein Effekt auf funktioneller Ebene konstatiert wurde. Auch unter submersen Bedingungen konnte keine Ausschüttung inflammatorischer Marker in THP-1-Zellen beobachtet werden (Poon *et al.* 2017). Auf transkriptioneller Ebene wurde jedoch eine inflammatorische Antwort in verschiedenen Zellsystemen aufgezeigt (Okuda-Shimazaki *et al.* 2010, Park *et al.* 2008). Zusätzlich konnten mehrere Studien eine Induktion von IL-8 in A549-Zellen unter submersen Bedingungen darlegen. Jedoch konnte diese auf transkriptioneller Ebene erst unter der Verwendung einer hohen TiO<sub>2</sub> NP Dosis (80 µg/cm<sup>2</sup>) und auf funktioneller Ebene nach langer Inkubationszeit (72 h) beobachtet werden (Hsiao und Huang 2011, Singh *et al.* 2007).

Zusammenfassend wurde die Induktion einer inflammatorischen Antwort durch CuO NP anhand einer *IL8*-Expression beobachtet werden. Diese wird unter anderem durch eine Aktivierung der redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF-κB bewirkt (Kunsch und Rosen 1993, Lakshminarayanan *et al.* 1998). Somit ist die gesteigerte *IL8*-Expression mit einer Induktion von oxidativem Stress zu begründen, dies wurde unter submersen Bedingungen bereits dargelegt. Zusätzlich konnte erstmalig eine verminderte *GPX2*- und *SEPP1*-Expression nach einer ALI-Exposition gegenüber CuO NP beschrieben werden. Der ausbleibende Effekt durch TiO<sub>2</sub> NP nach ALI-Exposition im Vergleich zu submersen Bedingungen könnte mit der Verwendung hoher Dosierungen und verlängerter Inkubationszeiten in diesen Zellkultursystemen begründet werden.

### 5.1.3.3 Induktion der DNA-Schadensantwort und spezifischer DNA-Reparaturproteine

#### Beeinflussung der Expression von Genen der DNA-Schadensantwort

Mit den Genen *DDIT3* und *GADD45A* enthält das Genset der HT RT-qPCR zwei zelluläre Marker, die eine DNA-Schädigung signalisieren. Das Gen *GADD45A* kodiert dabei für ein Protein der *GADD45 (growth-arrest and DNA-damage inducible protein)*-Familie. Gene dieser Proteinfamilie werden durch genotoxischen Stress sowohl p53-abhängig als auch -unabhängig vermehrt transkribiert. Die Proteine interagieren schließlich mit zahlreichen weiteren Proteinen, u.a. PCNA, p21 und Cdc2/Cyclin B1, und beeinflussen so zelluläre Prozesse wie den Zellzyklus (zusammengefasst in Liebermann und Hoffman 2008, Zhan 2005). *DDIT3*, das auch unter dem Namen *CHOP* oder *GADD153* bekannt ist, wird ebenfalls im Zuge von genotoxischem Stress vermehrt exprimiert, wobei der genaue Mechanismus der Transkription bisher nicht geklärt wurde. Auf funktioneller Ebene wird dem exprimierten Protein Chop eine Rolle als Apoptose-induzierender Transkriptionsfaktor zugesprochen (Zhang *et al.* 2009; zusammengefasst in Nishitoh 2021).



**Abbildung 5.14: Einfluss auf die Genexpression von Markern der DNA-Schadensantwort nach ALI-Exposition gegenüber CuO und TiO<sub>2</sub> NP.** A549-Zellen wurden nach 24-stündiger ALI-Adaption für zehn Minuten in der Vitrocell® Cloud gegenüber einem NP-haltigen Aerosol exponiert und für 24 Stunden inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen ± SD.

Für das Gen *DDIT3* konnten nach den Expositionen gegenüber 0,4 - 2,2 µg/cm<sup>2</sup> CuO NP aufgrund einer zu geringen Genexpression keine Daten erhoben werden. Ab einer Behandlung mit 9,2 µg/cm<sup>2</sup> wurde eine erhöhte Genexpression beobachtet (Abb. 5.14). Hierbei konnte unter dem Einfluss der höchsten Deposition eine maximale Veränderung um den log<sub>2</sub>-fachen Faktor 2,3 festgestellt werden. Die Expression des Gens *GADD45A* zeigte ab einer Exposition gegenüber 4,9 µg/cm<sup>2</sup> eine dosisabhängig gesteigerte Expression. Dabei wurde mit einer log<sub>2</sub>-fachen Veränderung um Faktor 2,5 ein Expressionsmaximum unter dem Einfluss von 17,1 µg/cm<sup>2</sup> CuO NP aufgezeigt. Es konnte abermals beobachtet werden, dass die Genexpression erst ab einer Dosis von 4,9 µg/cm<sup>2</sup> gesteigert wurde. Dies korreliert zu den Beobachtungen in Kap. 5.1.3.2 bzgl. der Induktion einer zellulären Stressantwort. Die Exposition gegenüber TiO<sub>2</sub> NP zeigte keinen Einfluss auf die Expression von Genen der DNA-Schadensantwort.

Eine gesteigerte Expression von Genen der DNA-Schadensantwort (*DDIT3*, *GADD45A*) durch CuO NP legte man unter submersen Bedingungen bereits dar (Hanagata *et al.* 2011, Strauch *et al.* 2017, Wang *et al.* 2012). Bezüglich einer Beeinflussung durch TiO<sub>2</sub> NP liegen unter der Verwendung vergleichbarer Dosierung (10 - 40 µg/mL) und Inkubationszeiten abermals zelllinienabhän-

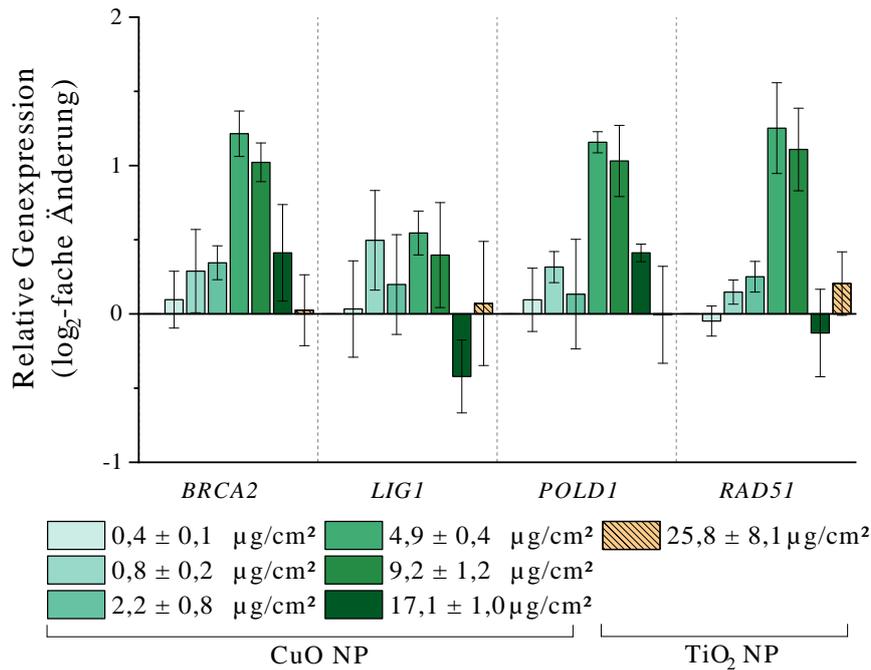
gige Effekte in der Literatur vor (Aydin *et al.* 2017, Tuomela *et al.* 2013, Okuda-Shimazaki *et al.* 2010). Wie bereits beschrieben signalisiert eine gesteigerte Expression von *DDIT3* und *GADD45A* eine Schädigung der DNA, weshalb die beschriebenen Ergebnisse auf eine genotoxische Wirkung von CuO NP hindeuten. Im Zuge dessen wurde auch die Genexpression spezifischer DNA-Reparaturproteine betrachtet.

### **Beeinflussung der Expression von Genen spezifischer DNA-Reparaturproteine**

Insgesamt konnte eine Beeinflussung der Gene *BRCA2*, *LIG1*, *POLD1* und *RAD51* beobachtet werden (Abb. 5.15). Die entsprechenden Proteine der Gene *BRCA2* und *RAD51* sind dabei spezifisch an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt (zusammengefasst in Chapman *et al.* 2012, Hoeijmakers 2001). Darüber hinaus zeigen die Proteine der Gene *LIG1* und *POLD1* noch weitere Funktionen. Lig1 spielt beispielsweise eine wichtige Rolle in der DNA-Replikation, Basenexzisionsreparatur, Nukleotidexzisionsreparatur und *mismatch*-Reparatur (zusammengefasst in Tomkinson und Mackey 1998). Zudem wurde auch eine Funktion im alternativen Reparaturweg von DNA-Doppelstrangbrüchen belegt (Paul *et al.* 2013). Die Polymerase  $\delta$  (*POLD1*) zeigt eine Beteiligung an allen Reparaturwegen sowie der DNA-Replikation (zusammengefasst in Nicolas *et al.* 2016).

Für *BRCA2* konnte unter dem Einfluss einer Dosis von  $4,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  mit einer  $\log_2$ -fachen Veränderung um Faktor 1,2 eine deutlich gesteigerte Transkriptmenge festgestellt werden. Während im Dosisbereich unterhalb dieser Behandlung keine relevante Veränderung erkannt werden konnte, wurde im höheren Dosisbereich eine Abnahme der gesteigerten Transkription beobachtet. Einen ähnlichen Effekt, sowohl in der Dosis-Wirkungsbeziehung als auch in der Effektstärke, konnte bei den Genen *POLD1* und *RAD51* beobachtet werden. Das Gen *LIG1* zeigte ebenso einen vergleichbaren Verlauf der Dosis-Wirkungsbeziehung, jedoch eine weniger stark ausgeprägte Form. Die Verringerung der Transkriptmengen bei steigender Dosierung ist mit der steigenden Zytotoxizität in Verbindung zu bringen. Die Exposition gegenüber  $\text{TiO}_2$  NP führte zu keiner Veränderung der Expression von Genen, die mit der DNA-Reparatur assoziiert werden.

Die Transkription von spezifischen DNA-Reparaturproteinen nach Exposition gegenüber den verwendeten NP wurde bisher kaum untersucht. Sowohl Strauch *et al.* (2017) als auch Biola-Clier *et al.* (2016) zeigten eine verminderte Genexpression durch CuO bzw.  $\text{TiO}_2$  NP in A549-Zellen. Im Gegensatz dazu konnten Ahamed *et al.* (2010) eine erhöhte Menge an Rad51 mittels Western Blot nachweisen. Es liegen also keine Tendenzen hinsichtlich einer Beeinflussung spezifischer DNA-Reparaturproteine in der Literatur unter submersen Bedingungen vor.

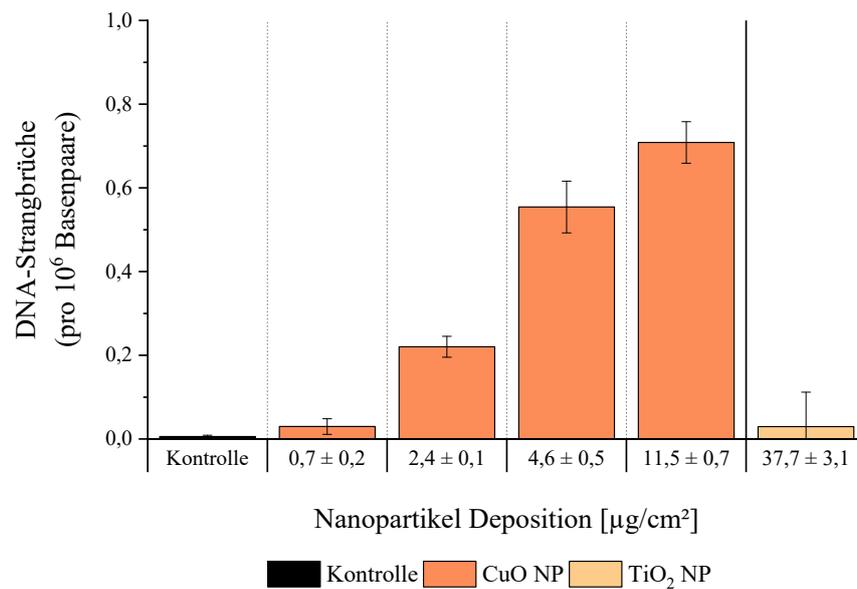


**Abbildung 5.15: Beeinflussung der Expression von DNA-Reparatur assoziierten Genen nach ALI-Exposition gegenüber CuO und TiO<sub>2</sub> NP.** A549-Zellen wurden nach 24-stündiger ALI-Adaption für zehn Minuten in der Vitrocell® Cloud gegenüber einem NP-haltigen Aerosol exponiert und für 24 Stunden inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen ± SD.

Wie bereits beschrieben stellen *BRCA2* und *RAD51* Gene dar, die spezifisch an der DNA-Doppelstrangbruchreparatur beteiligte Proteine kodieren. Die dargelegten Ergebnisse könnten daher auf eine Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen schließen. DNA-Strangbrüche generell können dabei durch eine einige Stimuli induziert werden, u.a. durch ROS (Bauer *et al.* 2011; zusammengefasst in Dizdaroglu und Jaruga 2012). Um die Induktion von DNA-Strangbrüchen auf funktioneller Ebene zu bestätigen, wurden diese mit Hilfe der Alkalische Entwindung (AU) quantifiziert.

### Induktion von DNA-Strangbrüchen

Die AU stellt aufgrund der Detektion von DNA-Strangbrüchen eine Methode zur Erfassung eines genotoxischen Potentials verschiedenster Substanz dar. Hierbei wird die DNA an DNA-Strangbrüchen mit Hilfe einer alkalischen Lösung entwunden. Nach einer definierter Zeitspanne wird die Probe neutralisiert und sonifiziert, wodurch einzel- und doppelsträngige DNA in den jeweiligen Anteilen generiert werden. Nach abschließender chromatographischer Trennung und fluorimetrischer Bestimmung kann der doppelsträngige DNA-Anteil einer Probe bestimmt und, mit Hilfe einer Kalibriergerade, die Anzahl an Strangbrüchen pro 10<sup>6</sup> Bp berechnet werden.



**Abbildung 5.16: Induktion von DNA-Strangbrüchen nach ALI-Exposition gegenüber CuO und TiO<sub>2</sub> NP.** A549-Zellen wurden nach 24-stündiger ALI-Adaption für zehn Minuten in der Vitrocell® Cloud gegenüber einem NP-haltigen Aerosol exponiert und für 24 Stunden inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SD.

Eine Exposition gegenüber CuO NP zeigte eine dosisabhängige Induktion von DNA-Strangbrüchen (Abb. 5.16). Hierbei wurde ab einer Dosis von  $2,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ein deutlicher Anstieg an DNA-Strangbrüchen beobachtet. Die höchste Anzahl an DNA-Strangbrüchen zeigte die Exposition gegenüber  $11,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  mit  $0,7$  DNA-Strangbrüchen pro  $10^6$  Bp. Eine Induktion von Strangbrüchen durch eine Behandlung mit TiO<sub>2</sub> NP konnte nicht festgestellt werden.

Die genotoxische Wirkung von CuO NP wurde in zahlreichen Studien unter submersen Bedingungen belegt (Karlsson *et al.* 2008, Semisch *et al.* 2014, Wang *et al.* 2012). Hinsichtlich der Genotoxizität der verwendeten TiO<sub>2</sub> NP wurde zum einen durch eine hohe Dosierung ( $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) eine DNA-schädigende Wirkung unter Verwendung des Comet-Assays beschrieben (Jugan *et al.* 2012, Biola-Clier *et al.* 2016). Dem gegenüber konnte jedoch keine Induktion von  $\gamma$ -H2AX Foci unter Verwendung vergleichbarer Dosierungen beobachtet werden (Barillet *et al.* 2010, Hanot-Roy *et al.* 2016). Es liegt dementsprechend eine widersprüchliche Datenlage in der Literatur vor.

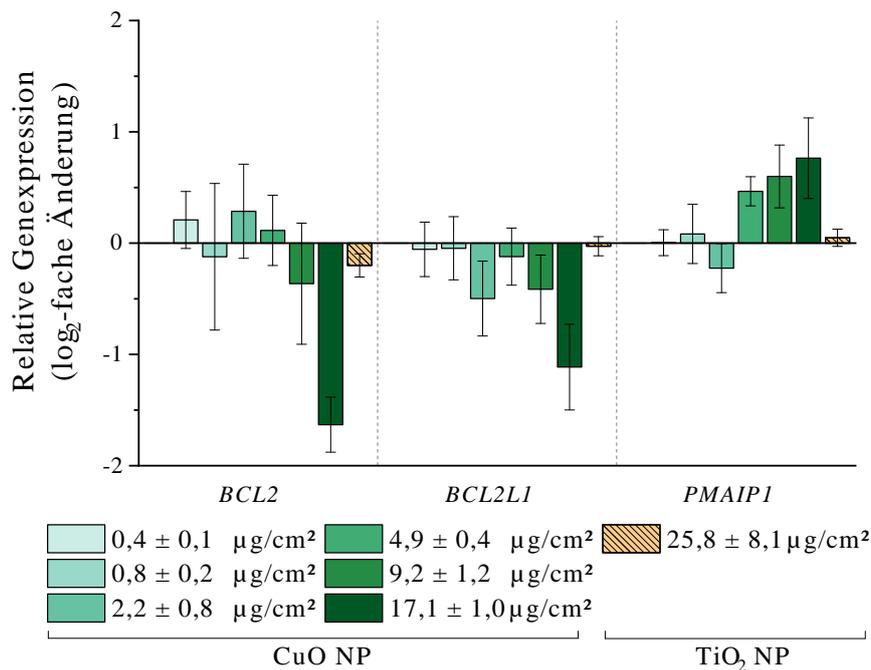
Zusammenfassend zeigte die gesteigerte Expression von *DDIT3* und *GADD45* eine genotoxische Wirkung der CuO NP an. Aufgrund der Expression verschiedener DNA-Reparaturproteinkodierender Gene wurde eine Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen postuliert. Mit Hilfe der AU konnte eine dosisabhängig gesteigerte Anzahl an DNA-Strangbrüchen ermittelt werden. Jedoch ist keine Differenzierung zwischen Einzel- und Doppelstrangbrüchen mit der in dieser Arbeit an-

gewandten Methode möglich. Das beschriebene genotoxische Potential der CuO NP wurde bereits in submers durchgeführten Studien, jedoch bisher nicht nach ALI-Exposition, beschrieben. Es konnten keine Beobachtungen hinsichtlich einer genotoxischen Wirkung von TiO<sub>2</sub> NP gemacht werden. In der Literatur wurde diese jedoch in schwacher Ausprägung zelllinienabhängig und auch dosisabhängig dargelegt.

### 5.1.3.4 Induktion der Apoptose und Einfluss auf den Zellzyklus

#### Beeinflussung der Genexpression apoptotischer Faktoren

Die Exposition gegenüber beiden Partikelspezies zeigte in drei Genen eine Expressionsänderung. Dabei handelt es sich zum einen um die Gene *BCL2* und *BCL2L1*, die für die antiapoptischen Proteine Bcl2 bzw. Bcl - x<sub>L</sub> kodieren, und zum anderen um das Gen *PMAIP1*, das für das proapoptische Protein Noxa kodiert (zusammengefasst in Cory und Adams 2002, Ploner *et al.* 2009).



**Abbildung 5.17: Einfluss auf die Genexpression der apoptotischen Faktoren *BCL2*, *BCL2L1* und *PMAIP1* nach ALI-Exposition gegenüber CuO und TiO<sub>2</sub> NP.** A549-Zellen wurden nach 24-stündiger ALI-Adaption für zehn Minuten in der Vitrocell® Cloud gegenüber einem NP-haltigen Aerosol exponiert und für 24 Stunden inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen ± SD.

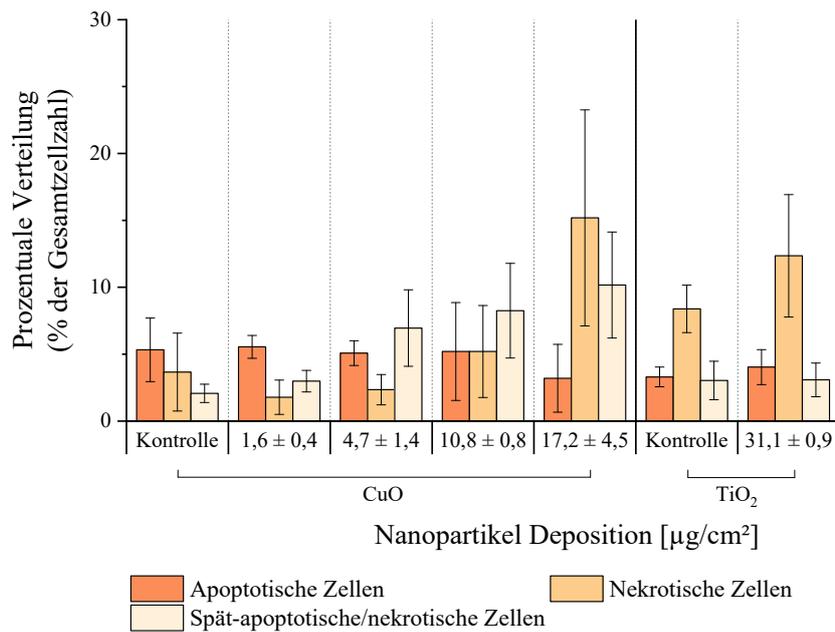
Die Expression der Gene *BCL2* und *BCL2L1* wurde durch CuO NP vermindert (Abb. 5.17). Hierbei zeigte lediglich die höchste Dosis von  $17,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  mit einer Verminderung um den  $\log_2$ -fachen Faktor -1,6 bzw. -1,1 deutliche Effekte auf die Genexpression. Dagegen wurde die Expression des Gens *PMAIP1* bei einer Exposition von  $4,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  dosisabhängig um bis zu 0,8  $\log_2$ -fach gesteigert. Somit wurden antiapoptotische Gene herunter- und ein proapoptotisches Gen hochreguliert. Die Behandlung mit  $\text{TiO}_2$  NP zeigte keine Effekte auf die Genexpression apoptotischer Faktoren. Die beschriebenen Ergebnisse und die Beteiligung aller drei Gene am intrinsischen Signalweg der Apoptose (Elmore 2007) lassen eine Induktion dieses Mechanismus durch CuO NP vermuten. Dies wurde auch in der Literatur unter submersen Bedingungen bereits beschrieben. In Bezug auf die Beeinflussung des Zelltodes durch CuO NP konnten Siddiqui *et al.* (2013) eine verminderte Transkriptmenge des Gens *BCL2* zeigen. Zudem wurde eine proapoptotische Wirkung und Induktion des intrinsischen Signalweges auf transkriptioneller Ebene postuliert (Strauch *et al.* 2017). Eine Untersuchung zur Induktion der Apoptose durch  $\text{TiO}_2$  NP wurde bisher nicht auf transkriptioneller Ebene beschrieben. Um eine apoptotische Wirkung von CuO NP auch auf funktioneller Ebene zu bestätigen, wurde eine durchflusszytometrische Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose durchgeführt.

### **Durchflusszytometrische Analyse des induzierten Zelltodes**

Die durchflusszytometrische Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose erfolgte mit Hilfe einer PI/AnnexinV-Färbung. Hierbei kann zwischen vitalen, apoptotischen, nekrotischen sowie spät-apoptotischen/nekrotischen Zellen unterschieden werden.

Während die Behandlung mit CuO NP keine Induktion apoptotischer Zellen zeigte, konnte eine dosisabhängige Zunahme an spät-apoptischen/nekrotischen Zellen registriert werden (Abb. 5.18). Zudem war ab einer Dosis von  $10,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  eine gesteigerte Anzahl nekrotischer Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle zu beobachten. Hinsichtlich der Behandlung mit  $\text{TiO}_2$  NP konnte im Vergleich zur Negativkontrolle eine leichte Induktion nekrotischer Zellen erfasst werden. Unter Berücksichtigung der SD war jedoch kein relevanter Effekt zu erkennen.

Eine Induktion der Apoptose oder Nekrose unter Beeinflussung durch  $\text{TiO}_2$  NP wird in der Literatur widersprüchlich dargestellt. Während Hanot-Roy *et al.* (2016) keine apoptotische Wirkung in A549-Zellen in Dosierungen bis zu  $800 \mu\text{g}/\text{mL}$  feststellen konnten, wurden schwache apoptotische Effekte in der gleichen Zelllinie ab  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$  von Park *et al.* (2007) beschrieben. Zusätzlich wurde eine erhöhte Caspase-3 Aktivität durch  $\text{TiO}_2$  NP in Beas-2B Zellen bereits unter dem Einfluss geringer Dosierungen (ab  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) dargelegt (Park *et al.* 2008), alle drei Studien betrachteten dabei eine 24-stündige Exposition.



**Abbildung 5.18: Durchflusszytometrische Differenzierung zwischen der Induktion apoptotischer respektive nekrotischer Zellen nach ALI-Exposition gegenüber CuO und TiO<sub>2</sub> NP.** A549-Zellen wurden nach 24-stündiger ALI-Adaption für zehn Minuten in der Vitrocell® Cloud gegenüber einem NP-haltigen Aerosol exponiert und für 24 Stunden inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SD.

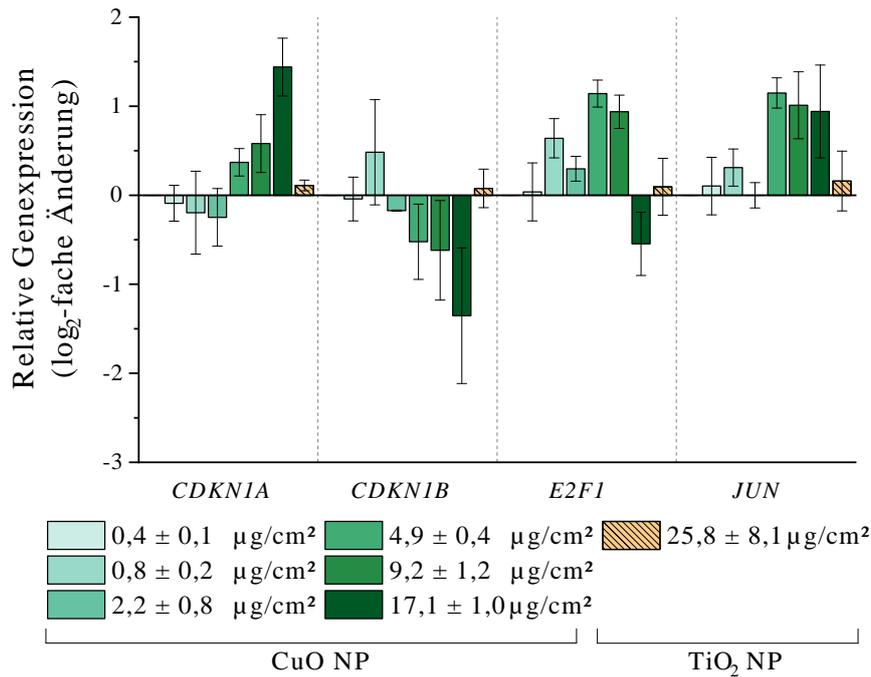
Auf funktioneller Ebene wiesen mehrere Forschungsgruppen einen apoptotischen Wirkmechanismus von CuO NP unter submersen Bedingungen nach (Karlsson *et al.* 2009, Semisch *et al.* 2014, Shafagh *et al.* 2015). Darüber hinaus wurde jedoch auch eine Mischung aus nekrotischem sowie apoptotischem Zelltod diskutiert (Chusuei *et al.* 2013, Strauch *et al.* 2017). Auch eine Beteiligung der Autophagie am Zelltod wurde beschrieben (Moschini *et al.* 2013, Sun *et al.* 2012). Das Einleiten eines apoptotischen Zelltodes bedarf unter Umständen einer längeren Inkubationszeit als der gewählten 24 Stunden. Jedoch zeigte sich eine abnehmende Zellviabilität der mit 1 %igem PBS behandelten Negativkontrolle nach 48-stündiger Inkubation (Daten nicht gezeigt), weshalb letztlich nur die Untersuchung des Zelltodes nach 24 Stunden ermittelt wurde. Zusätzlich untersuchten lediglich Strauch *et al.* (2017) eine Inkubationsdauer länger als 24 Stunden. Da die aufgeführten Studien der anderen Forschungsgruppen eine apoptotische Wirkung von CuO NP nach 24 Stunden aufzeigten, ist davon auszugehen, dass auch in diesem System und der angewandten Methode eine apoptotische Wirkung dieser NP-Spezies möglich ist. Somit können falsch negative Ergebnisse ausgeschlossen werden. Unter Bezugnahme der vorgestellten Daten, sowohl auf transkriptioneller als auch auf funktioneller Ebene, kann keine eindeutige Differenzierung zwischen apoptotischem oder nekrotischem Zelltod getroffen werden. Zusätzlich erlaubte die Durchführung der

PI/AnnexinV-Färbung in Zellkultursystemen keine Differenzierung zwischen spät-apoptotischen und nekrotischen Zellen, da spät-apoptotische Zellen nach gegebener Zeit ebenso eine positive PI-Färbung aufweisen. Martin und Sarkar (2017) postulieren einen Eintritt in die Apoptose unter dem Einfluss geringen Stresses, während die Nekrose bei einem hohen Stresslevel induziert wird. Unter Berücksichtigung der ALI-Kultivierung und deren Induktion eines erhöhten ROS-Gehalts in der mit 1 %igem PBS behandelten Negativkontrolle (Kap. 5.1.3.2), könnte eine erhöhte zelluläre Stresssituation vorliegen und damit eine Induktion der Nekrose ein mögliches Szenario darstellen. Dies ist insbesondere unter dem Einfluss der höchsten CuO NP Dosis, bei der eine erhöhte Anzahl nekrotischer Zellen beobachtet wurde, anzunehmen.

Zusammenfassend wurde erstmalig eine proapoptotische Wirkung von CuO NP nach einer ALI-Exposition auf transkriptioneller Ebene festgestellt. Auf funktioneller Ebene konnte dies nicht bestätigt werden; hierbei zeigte sich ebenso erstmalig ein eher nekrotischer Wirkmechanismus der CuO NP nach einer ALI-Exposition. Die Erkenntnisse der transkriptionellen und funktionellen Daten bestätigen publizierte submers durchgeführte Studien hinsichtlich der apoptotischen oder nekrotischen Wirkung von CuO NP. Eine apoptotische oder nekrotische Wirkung von TiO<sub>2</sub> NP konnte weder auf transkriptioneller noch auf funktioneller Ebene beobachtet werden. Diesbezüglich sind in der Literatur zelllinienabhängige Erkenntnisse vorhanden.

### **Beeinflussung der Expression von Genen der Proliferation und Zellzykluskontrolle**

Neben apoptotischen Faktoren wurden auch Gene der Proliferation in ihrer Expression verändert. Das Protein p21, für welches das Gen *CDKN1A* kodiert, kann neben der Initiation eines Zellzyklusarrests auch eine Beeinflussung der DNA-Reparatur und Replikation sowie der Apoptose bewirken (zusammengefasst in Abbas und Dutta 2009, Dutto *et al.* 2015). Ebenso wie p21, stellt auch das Protein p27, das durch das Gen *CDKN1B* kodiert wird, einen Zellzyklusinhibitor dar (zusammengefasst in Sicinski *et al.* 2007). Im Gegensatz dazu handelt es sich bei dem entsprechenden Protein zum Gen *E2F1* um einen Marker der Zellproliferation, der zudem noch eine Aktivität hinsichtlich der Apoptose sowie der DNA-Reparatur und -Replikation zeigt (zusammengefasst in Biswas und Johnson 2012, Wu *et al.* 2009). Das Gen *JUN*, das von einer Vielzahl an Stimuli induziert werden kann, kodiert für das Protein c-jun und ist ein Teil des Transkriptionsfaktors AP-1. Dieser ist in diversen zellulären Prozessen involviert, u.a. in der Zellproliferation und Apoptose (zusammengefasst in Karin 1995, Meng und Xia 2011).



**Abbildung 5.19: Beeinflussung der Expression zellzyklusregulierender Gene nach ALI-Exposition gegenüber CuO und TiO<sub>2</sub> NP.** A549-Zellen wurden nach 24-stündiger ALI-Adaption für zehn Minuten in der Vitrocell® Cloud gegenüber einem NP-haltigen Aerosol exponiert und für 24 Stunden inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen ± SD.

Während für das Protein p21 kodierende Gen *CDKN1A* ab einer Exposition gegenüber 4,9 μg/cm<sup>2</sup> CuO NP eine dosisabhängig gesteigerte Expression bis zu einer log<sub>2</sub>-fachen Veränderung um Faktor 1,4 beobachtet werden konnte, zeigte sich bezüglich der Expression des Gens *CDKN1B* unter dem Einfluss der selben Dosis mit einer Verminderung um den log<sub>2</sub>-fachen Faktor -1,4 ein gegenteiliger Effekt (Abb. 5.19). Das Gen *E2F1*, welches einen zellproliferierenden Effekt anzeigt, wurde nach Exposition gegenüber 4,9 μg/cm<sup>2</sup> um log<sub>2</sub>-fachen Faktor 1,1 vermehrt exprimiert. Mit einer weiter ansteigenden Dosis konnte jedoch ein Rückgang der Genexpression beobachtet werden, der schließlich in einer verminderten Expression um den log<sub>2</sub>-fachen Faktor -0,5 unter dem Einfluss von 17,1 μg/cm<sup>2</sup> resultierte. Eine ähnliche Tendenz konnte für das Gen *JUN*, kodierend für einen Teil des Transkriptionsfaktors AP-1, aufgezeigt werden. Hierbei wurde eine um den log<sub>2</sub>-fachen Faktor 1,1 gesteigerte Expression durch die Beeinflussung von 17,1 μg/cm<sup>2</sup> beobachtet, die mit steigender Dosis einen leichten Rückgang zeigte. Für keines der beschriebenen Gene konnte eine Beeinflussung durch die Exposition gegenüber TiO<sub>2</sub> NP festgestellt werden.

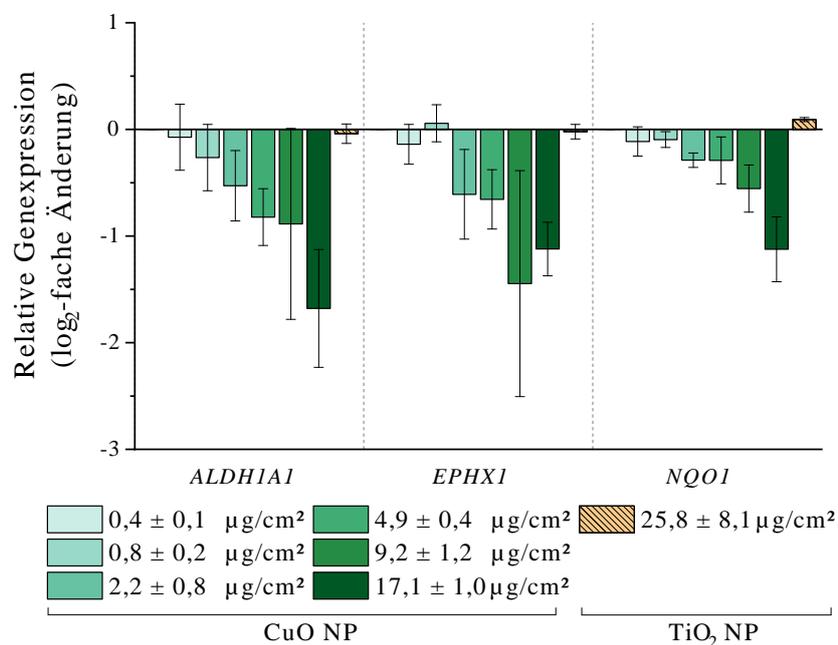
Im Gegensatz zu den vorliegenden Daten auf transkriptioneller Ebene zeigt ein Blick in die Literatur ein anderes Bild nach Exposition gegenüber TiO<sub>2</sub> NP. Eine Wirkung von TiO<sub>2</sub> NP auf den Zellzyklus konnte von Prasad *et al.* (2013) gezeigt werden. Hierbei wurde der Einfluss des Zell-

kulturmediums auf verschiedene toxikologische Parameter unter Beeinflussung von TiO<sub>2</sub> NP untersucht. Es zeigte sich ein leichter S-Phasenarrest unter Verwendung eines der drei untersuchten Medien. Auf transkriptioneller Ebene konnten Tuomela *et al.* (2013) unter Verwendung geringer Dosierungen keinen Hinweis auf einen Zellzyklusarrest durch TiO<sub>2</sub> NP feststellen. Hinsichtlich einer Beeinflussung des Zellzyklus durch CuO NP konnte dies sowohl auf transkriptioneller als auch auf funktioneller Ebene nachgewiesen werden (Hanagata *et al.* 2011, Strauch *et al.* 2017). Strauch *et al.* (2017) zeigten dabei neben einem G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phasenarrest auch eine Aktivierung von AP-1 auf, die auch auf funktioneller Ebene bestätigt wurde (Cho *et al.* 2012a, Piret *et al.* 2012). Die Transkription von *CDKN1A* kann sowohl über p53-abhängige als auch -unabhängige Mechanismen erfolgen. Da kein Einfluss auf das Gen *MDM2*, das eine p53-Aktivierung anzeigt, festgestellt wurde, ist von einer p53-unabhängigen Regulation des Gens durch andere Transkriptionsfaktoren auszugehen. So kann *CDKN1A* beispielsweise durch IL-6, das u.a. von NF- $\kappa$ B reguliert wird, in seiner Expression gesteigert werden (zusammengefasst in Abbas und Dutta 2009, Verma *et al.* 1995). Zudem korreliert die gesteigerte Transkriptmenge von *CDKN1A* mit der Induktion an DNA-Strangbrüchen (Kap. 5.1.3.3). Gegensätzlich dazu verhält sich die Expression des Zellzyklusinhibitors *CDKN1B*, weshalb keine Aussage über die Induktion eines Zellzyklusarrests anhand der transkriptionellen Daten getroffen werden kann. Die gesteigerte Expression des Gens *E2F1* bei einer Dosis von 4,9  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , das nachfolgend eine dosisabhängige Abnahme zeigt, könnte mit einer Zellproliferation in Verbindung gebracht werden. Aufgrund der konfluenten ALI-Kultivierung konnte jedoch bereits ein G<sub>1</sub>-Phasenarrest in unbehandelten Kontrollen im Vergleich zu submers kultivierten Zellen ermittelt werden (Anhang Kap. 9.7), wodurch eine Untersuchung der Zellzyklusverteilung keine aussagekräftigen Ergebnisse ergab. Eine Beeinflussung von 4,9  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  zeigte bereits eine Abnahme in der CFA (Kap. 5.1.2.3), woraufhin die Konfluenz des Monolayers nicht mehr gegeben ist und damit wieder Platz für eine Zellproliferation vorliegt. Die Abnahme der Transkriptmenge unter erhöhter Dosis kann somit mit der einsetzenden, zytotoxischen Wirkung der CuO NP erklärt werden. Die erhöhte *JUN*-Expression kann aufgrund der positiven Autoregulierung durch das kodierte Protein mit einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 gleichgesetzt werden (Angel *et al.* 1988). Diese kann durch eine Vielzahl an Stimuli hervorgerufen werden, u.a. durch oxidativen Stress (zusammengefasst in Abate *et al.* 1990, Verma *et al.* 1995). Auch eine Regulierung der Aktivität durch NF- $\kappa$ B sowie eine Interaktion der beiden Transkriptionsfaktoren konnte bereits festgestellt werden (Fujioka *et al.* 2004). Zudem spricht die gesteigerte Expression von weiteren AP-1 Zielgenen (*HMOX1*, *IL8*) für eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors. Es kann somit neben einer NF- $\kappa$ B auch von einer AP-1 Aktivierung ausgegangen werden. Zusammenfassend konnte anhand der transkriptionellen Daten keine eindeutige Aussage über das Einsetzen eines Zellzyklusarrests getroffen werden. Jedoch wurde ein Proliferation-fördernder

Effekt unter leicht toxischen Dosierungen beobachtet. Die Exposition gegenüber  $\text{TiO}_2$  NP führte zu keiner Genexpressionsänderung. In der Literatur wird ein Zellzyklusarrest nach Exposition gegenüber beiden Partikelspezies unter submersen Bedingungen beschrieben. Jedoch wird dies bereits durch die ALI-Kultivierung unter konfluenten Bedingungen induziert. Daher kann keine Aussage über eine Beeinflussung des Zellzyklus nach ALI-Exposition getroffen werden. Zudem konnte erstmalig eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 durch CuO NP nach einer ALI-Exposition festgestellt werden. Diese Beobachtung bestätigt submers durchgeführte Studien.

### 5.1.3.5 Beeinflussung der Expression von Genen des Fremdstoffmetabolismus

Auch Metabolismus-assoziierte Gene zeigte eine Beeinflussung durch NP nach ALI-Exposition, so war eine relevante Expressionsänderung von drei Genen mit unterschiedlichen Funktionen zu beobachten. *ALDH1A1* katalysiert die Oxidation von Aldehyden zu den jeweiligen Carbonsäuren, *EPHX1* wird zur Detoxifizierung bzw. Bioaktivierung verschiedener Substanzen durch die Hydrolysierung von Epoxiden benötigt und *NQO1* fungiert als zwei-Elektronen-Reduktase (zusammengefasst in Marcato *et al.* 2011, Ross *et al.* 2000 und Václavíková *et al.* 2015).



**Abbildung 5.20: Beeinflussung der Expression von Genen des Fremdstoffmetabolismus nach ALI-Exposition gegenüber CuO und  $\text{TiO}_2$  NP.** A549-Zellen wurden für zehn Minuten in der Vitrocell® Cloud gegenüber einem NP-haltigen Aerosol exponiert und für 24 Stunden inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SD.

Es zeigten sowohl *ALDH1A1* als auch *NQO1* eine dosisabhängig verminderte Genexpression. Dabei wurde die Expression maximal um den  $\log_2$ -fachen Faktor -1,7 respektive -1,1 reduziert (Abb. 5.20). Das Gen *EPHX1* wies eine ähnliche Tendenz auf, jedoch wurde hier unter dem Einfluss einer Dosis von  $17,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  das Gen wieder etwas vermehrt exprimiert. Die größte Beeinflussung zeigte die Exposition gegenüber  $9,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  mit einer Reduzierung der Expression um den  $\log_2$ -fachen Faktor -1,4. Unter dem Einfluss von  $\text{TiO}_2$  NP konnte keine Veränderung der Genexpression festgestellt werden. Bisher ist keine Beeinflussung von CuO oder  $\text{TiO}_2$  NP auf diese am Fremdstoffmetabolismus beteiligten Gene bekannt. Alle drei Gene zeigen jedoch eine Verringerung ihrer Transkriptmenge durch den Inflammationsmarker  $\text{TNF-}\alpha$  (Gharavi und El-Kadi 2005, Ito *et al.* 2014, Šmerdová *et al.* 2013). Wie bereits in Kap. 5.1.3.2 beschrieben, kann von einer inflammatorischen Reaktion nach ALI-Exposition gegenüber CuO NP ausgegangen werden. Diese könnte für den hier beobachteten Effekte einer verminderten Expression von *ALDH1A1*, *EPHX1* und *NQO1* verantwortlich sein.

## 5.2 Toxikologische Untersuchungen zur thermischen Verwertung von Nanokompositen

Im Rahmen des vom BMBF geförderten Drittmittelprojekts «ProCycle» soll die toxikologische Beurteilung von Produkten aus der thermischen und stofflichen Verwertung von Nanokompositen erfolgen. Dabei wurde sowohl die thermische Verwertung als auch die werkstoffliche Verwertung in Form eines Mahlungsprozesses betrachtet. In der vorliegenden Arbeit werden die Experimente zur thermischen Verwertung der Nanokomposite vorgestellt. Hierzu wurden Nanokomposite, die Verbundstoffe aus einer Kunststoffmatrix und eingebetteten Nanomaterialien darstellen, durch Projektpartner des Fraunhofer Instituts für Chemische Technologie (ICT) hergestellt und anschließend im Labormaßstab verbrannt. Dabei wurden Polyethylen (PE) als Kunststoffmatrix und TiO<sub>2</sub> NP, CuO NP bzw. CNT im Anteil von 10 % als Füllmaterialien zur Herstellung repräsentativer Referenzmaterialien verwendet. Zusätzlich zu den Nanokompositen wurden die Matrix und auch die Füllstoffe einzeln verbrannt, um eine Differenzierung einer toxikologischen Wirkung durch die nanoskaligen Füllstoffe oder die Kunststoffmatrix zu ermöglichen. Das Verbrennungsaerosol wurde vor der online Exposition gegenüber den Zellkultursystemen in der Vitrocell® *Automated Exposure Station* zur Abkühlung 1:10 verdünnt. Für jede Exposition konnten insgesamt drei Expositionsmodule à drei Expositions-kavitäten bestückt werden. Dabei wurden in einem Modul Zellen stets Reinluft ausgesetzt, diese stellten die Reinluftkontrollen (*clean air control*, CAC) dar. Zusätzlich wurden zwei Module wie folgt beprobt:

1. Exposition gegenüber dem nativen Verbrennungsaerosol (-HS)
2. Exposition gegenüber dem nativen Verbrennungsaerosol unter einer erhöhten Deposition der partikulären Aerosolfraction durch das Anlegen einer Hochspannung (+HS)
3. Exposition gegenüber einem gefilterten Verbrennungsaerosol und somit lediglich der gasförmigen Aerosolfraction (+Filter).

Gleichzeitig wurde das Verbrennungsaerosol von Seiten des Projektpartners am KIT-ITC unter Verwendung eines elektrischen Niederdruckimpaktors (ELPI) charakterisiert (Anhang Kap. 9.8). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Beeinflussung des Genexpressionsprofils sowie die Induktion von DNA-Strangbrüchen in A549-Zellen und einem 3D-Lungenzellmodell (MucilAir - Epithelix) betrachtet. Im Folgenden werden die Ergebnisse nach Exposition gegenüber den Verbrennungsprodukten aus der thermischen Verwertung der Nanokomposite, Füllstoffe und der Matrix beschrieben und diskutiert.

### 5.2.1 Applizierte Dosis während der Exposition von A549-Zellen

Während der Exposition von A549-Zellen mit den entsprechenden Verbrennungsaerosolen konnte keine Dosis mit Hilfe der QCM ermittelt werden. Allerdings erfolgte die Charakterisierung der Aerosole mit Hilfe eines ELPI durch den Projektpartner am KIT-ITC. Basierend auf dieser Charakterisierung konnte eine Massenkonzentration und folglich eine deponierte Dosis unter gewissen Annahmen berechnet werden (Tab. 5.2). So wurde eine Dichte der PE-haltigen Materialien und der CNT von  $1 \text{ g/cm}^3$  angenommen, während für die reinen NP deren Bulk-Dichte verwendet wurde. Zur Berechnung der erhöhten Dosis wurde die Dosis mit Faktor 5 multipliziert. Dieser Faktor beruht auf vorherigen Studien von Seiten des Projektpartners am KIT-ITC.

**Tabelle 5.2: Tabellarische Zusammenfassung der mathematisch bestimmten Dosierungen der Exposition von A549-Zellen.** Diese basieren auf Daten, die durch das KIT-ITC erhoben wurden. Aufgrund der errechneten Massenkonzentration und des bekannten Massenstroms des Aerosols, ist es möglich aus diesen Daten die Masse pro Fläche zu berechnen.

Material	Massenkonzentration <sup>1</sup> mittels ELPI [ $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ]	Dosis ohne HS [ $\text{ng}/\text{cm}^2$ ]	Dosis mit HS <sup>2</sup> [ $\text{ng}/\text{cm}^2$ ]
TiO <sub>2</sub> NP	$137 \pm 20$	$15 \pm 2$	$73 \pm 11$
CuO NP	$256 \pm 151$	$27 \pm 16$	$136 \pm 80$
CNT	$44 \pm 7$	$5 \pm 1$	$23 \pm 4$
PE	$505 \pm 8$	$54 \pm 1$	$268 \pm 4$
PE + TiO <sub>2</sub> NP	$527 \pm 317$	$56 \pm 34$	$280 \pm 168$
PE + TiO <sub>2</sub> NP <sup>3</sup>	$209 \pm 27^3$	$22 \pm 3^3$	$111 \pm 14^3$
PE + CuO NP	$235 \pm 18$	$25 \pm 2$	$125 \pm 10$
PE + CNT	$106 \pm 16$	$11 \pm 2$	$54 \pm 8$

<sup>1</sup> Für die Dosisberechnung PE-haltiger Materialien sowie der CNT wurde mit einer Dichte von  $1 \text{ g/cm}^3$  kalkuliert, für die Berechnung der NP wurde deren Bulk-Dichte verwendet.

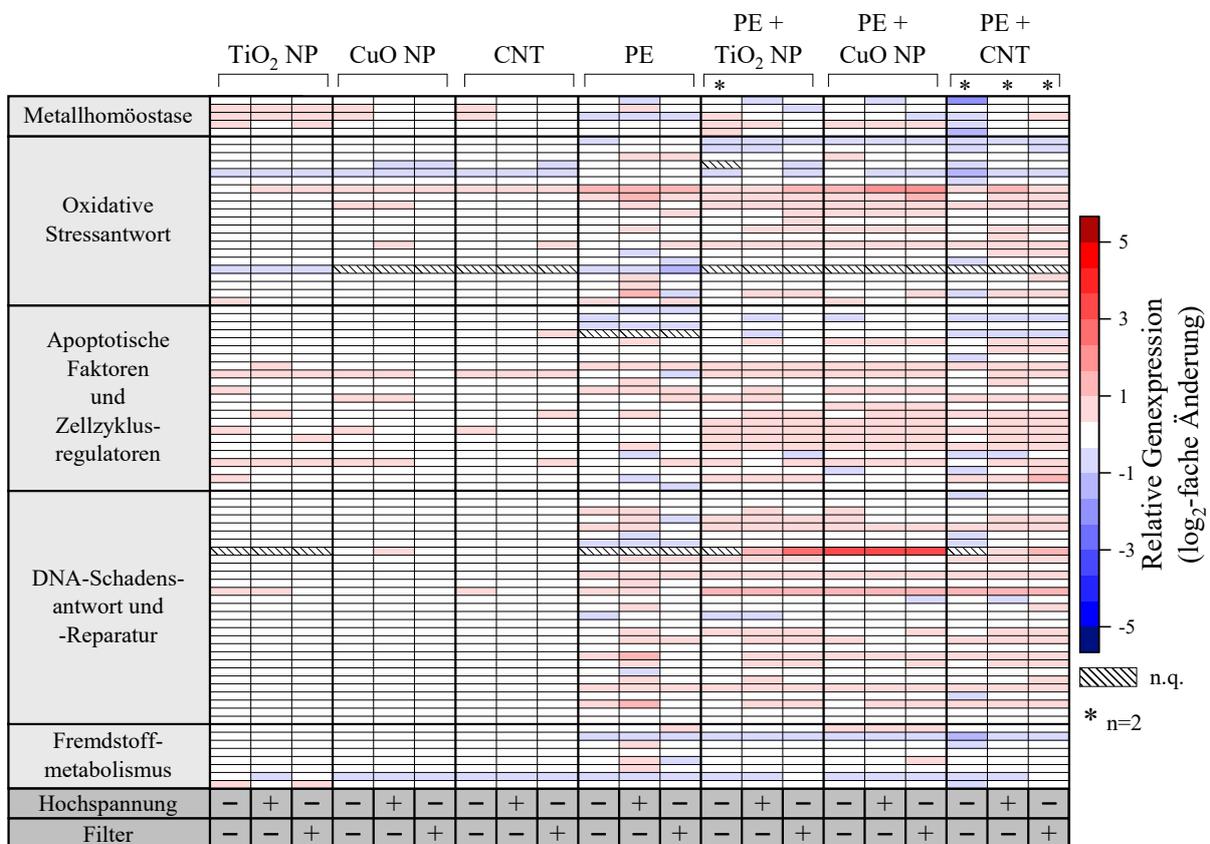
<sup>2</sup> Basierend auf vorherigen Studien wurde mit einer Steigerung um Faktor 5 gerechnet.

<sup>3</sup> Aufgrund eines geänderten Versuchsaufbaus wurden alle Expositionen des nativen Verbrennungsaerosols (-HS) nachträglich wiederholt. Daher gelten nur für diese Expositionen die mit <sup>3</sup> gekennzeichneten Dosen.

Während die geringste Deposition in der Vitrocell® *Cloud* ca.  $400 \text{ ng/cm}^2$  betrug, konnten selbst unter Bedingungen für eine erhöhte Partikeldeposition in der Vitrocell® *Automated Exposure Station* maximal  $268 \text{ ng/cm}^2$ , und damit insgesamt sehr geringe Dosierungen, appliziert werden. Zudem konnte für keines der CuO NP-haltigen Aerosole eine Dosis appliziert werden, die den zuvor ermittelten NOAEL für CuO NP überschritt.

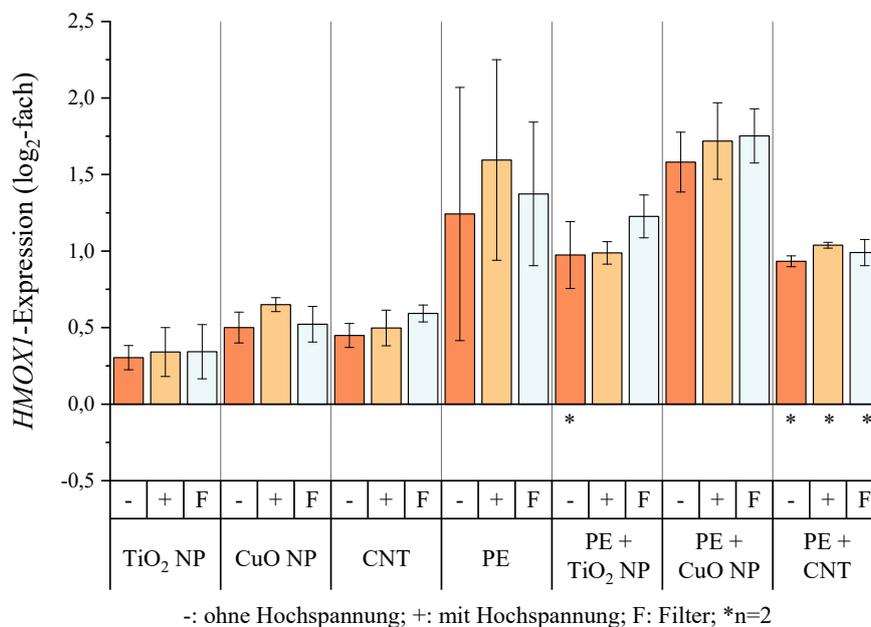
### 5.2.2 Beeinflussung des Genexpressionsprofils von A549-Zellen durch Verbrennungsaerosole

Ebenso wie bereits in Kap. 5.1.3 wurde auch im Rahmen dieses experimentellen Aufbaus mit Hilfe der HT RT-qPCR eine Beeinflussung der Genexpression untersucht. Die Veränderung des Genexpressionsprofils von A549-Zellen durch die Verbrennungsaerosole aller untersuchten Materialien ist in Abb. 5.21 schematisch als Heatmap dargestellt. Eine detaillierte Heatmap inklusive Gennamen ist im Anhang (Kap. 9.5 Abb. 9.4) einzusehen.



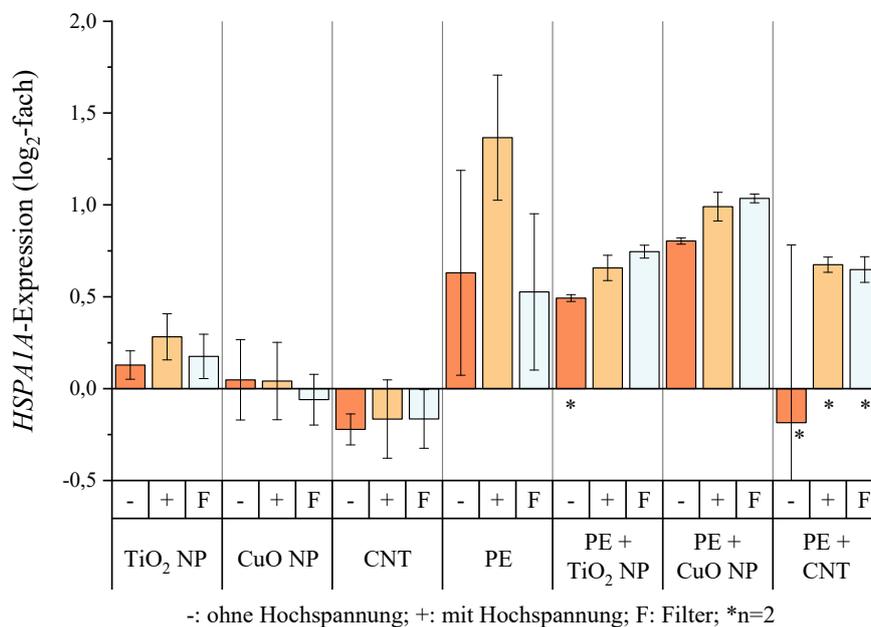
**Abbildung 5.21: Schematische Darstellung der Beeinflussung des Genexpressionsprofils von A549-Zellen durch Aerosole aus der Verbrennung von TiO<sub>2</sub> NP, CuO NP, CNT, PE sowie Nanokompositen bestehend aus PE und den jeweiligen Nanomaterialien als Heatmap.** Eine rote Färbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine reduzierte Genexpression. Für jede Exposition wurden CACs und Expositionen gegenüber dem nativen Aerosol (-HS, -Filter), einer erhöhten Partikeldeposition (+HS, - Filter) sowie der reinen Gasfraktion des Aerosols (-HS, + Filter) untersucht. Dargestellt sind, sofern nicht anders gekennzeichnet, die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen ± SD. n.q.: nicht quantifizierbar.

Um falsch positive oder falsch negative Ergebnisse durch das Zuschalten einer HS auszuschließen, wurde dieser Effekt auf CACs untersucht. Gleiches galt für den Stabilisator, der der nativen CNT-Lösung zugesetzt werden musste, um eine stabile Suspension zu erhalten. Die Ergebnisse beider Analysen sind im Anhang Kap. 9.9 dargestellt. Dabei konnte kein Einfluss durch die HS und nur eine geringfügige Beeinflussung nach der Verbrennung des Stabilisators beobachtet werden. Es zeigten sich keine relevanten Veränderungen im Genexpressionsprofil unter dem Einfluss von Aerosolen nach Verbrennung der Nanomaterialien (Abb. 5.21). Im Gegensatz dazu konnten nach Exposition gegenüber den Verbrennungsprodukten PE-haltiger Materialien relevante Effekte beobachtet werden. Hierbei zeigten insbesondere die Gene der zellulären Stressmarker *HMOX1* und *HSPA1A* sowie das Gen *GADD45A*, das auf eine DNA-Schadensantwort hinweist, eine deutliche Veränderung in ihrer Expression. Die *HMOX1*-Expression unter dem Einfluss aller Verbrennungsaerosole ist in Abb. 5.22 dargestellt.



**Abbildung 5.22: Beeinflussung der Expression von *HMOX1* durch verschiedene Verbrennungsaerosole.** A549-Zellen wurden für vier Stunden in der Vitrocell® Atomated Exposure Station gegenüber einem Verbrennungsaerosol exponiert und für weitere 20 Stunden nachinkubiert. Für jede Exposition wurden CACs und Expositionen gegenüber dem nativen Aerosol (-HS, -Filter), einer erhöhten Partikeldeposition (+HS, - Filter) sowie der reinen Gasfraktion des Aerosols (-HS, + Filter) untersucht. Dargestellt sind, sofern nicht anders gekennzeichnet, die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SD.

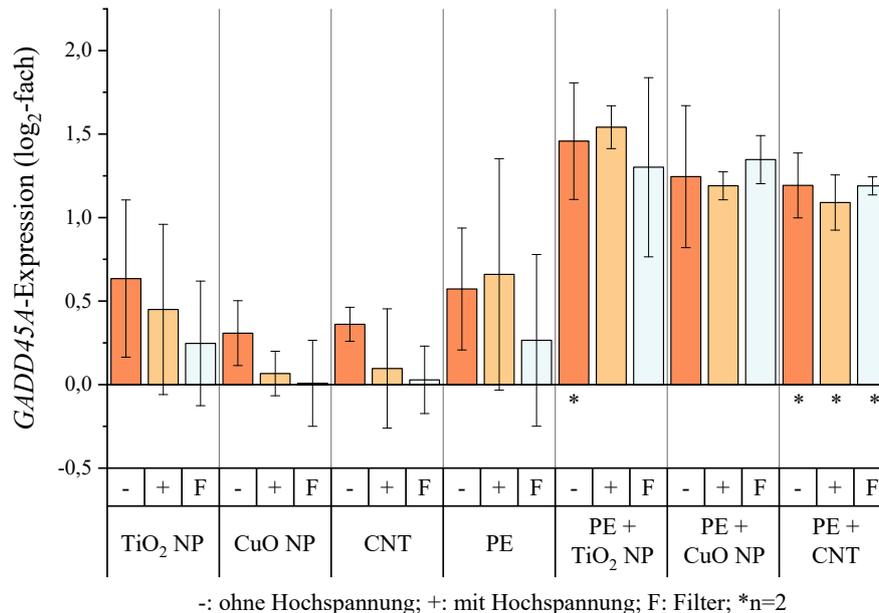
Unter dem Einfluss der Verbrennungsaerosole aus der thermischen Behandlung von TiO<sub>2</sub> NP, CuO NP und CNT konnte eine geringe Erhöhung der *HMOX1*-Expression beobachtet werden. Dabei wurde eine maximale Erhöhung um den log<sub>2</sub>-fachen Faktor 0,5 festgestellt. Im Gegensatz dazu bewirkte die Verbrennung PE-haltiger Materialien eine um den log<sub>2</sub>-fachen Faktor 1 bis 1,8 gesteigerte Transkriptmenge. Das Maximum konnte hierbei unter dem Einfluss des Aerosols aus der Verbrennung des PE + TiO<sub>2</sub> NP Nanokomposits beobachtet werden. Generell zeigte die Expression des Gens *HMOX1* unabhängig vom Verbrennungsgut keinen Unterschied zwischen dem nativen Verbrennungsaerosol (-HS), einer Dosiserhöhung (+HS) und einem vorgeschalteten Filter.



**Abbildung 5.23: Beeinflussung der Expression von *HSPA1A* durch verschiedene Verbrennungsaerosole.** A549-Zellen wurden für vier Stunden in der Vitrocell® Atomated Exposure Station gegenüber einem Verbrennungsaerosol exponiert und für weitere 20 Stunden nachinkubiert. Für jede Exposition wurden CACs und Expositionen gegenüber dem nativen Aerosol (-HS, -Filter), einer erhöhten Partikeldeposition (+HS, - Filter) sowie der reinen Gasfraktion des Aerosols (-HS, + Filter) untersucht. Dargestellt sind, sofern nicht anders gekennzeichnet, die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen ± SD.

Ein ähnlicher Effekt konnte bei der Expression des Gens *HSPA1A* festgestellt werden (Abb. 5.23). So wurde wiederholend keine relevante Änderung der Transkriptmenge durch die Verbrennungsaerosole aus der thermischen Behandlung der Nanomaterialien beobachtet. Die Verbrennung PE-haltiger Materialien zeigte jedoch eine leicht erhöhte Expression von *HSPA1A*, die maximal um den log<sub>2</sub>-fachen Faktor 1,4 gesteigert wurde. Lediglich das Anlegen einer HS während der PE-Verbrennung verzeichnete eine Steigerung der *HSPA1A*-Expression, wohingegen alle weiteren

Untersuchungen diesen Effekt nicht bestätigten. Zudem zeigte sich abermals kein Unterschied zwischen den Proben mit vorgeschaltetem Filter und Proben, die gegenüber dem gesamten Aeerosol exponiert wurden. Auch die Expression des Gens *GADD45A*, einem Marker der DNA-Schadensantwort, zeigte eine Zunahme (Abb. 5.24).

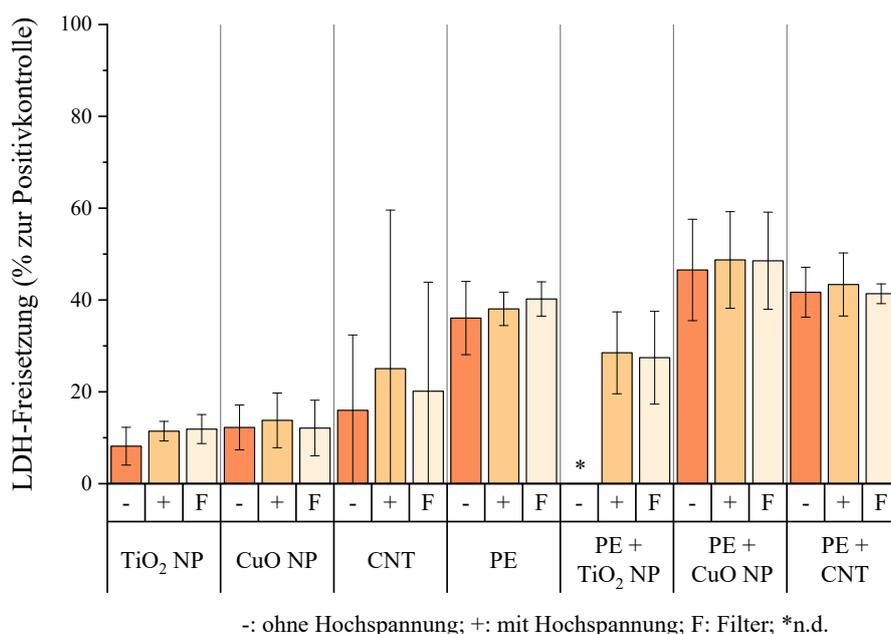


**Abbildung 5.24: Beeinflussung der Expression von *GADD45A* durch verschiedene Verbrennungsaerosole.** A549-Zellen wurden für vier Stunden in der Vitrocell® Atomated Exposure Station gegenüber einem Verbrennungsaerosol exponiert und für weitere 20 Stunden nachinkubiert. Für jede Exposition wurden CACs und Expositionen gegenüber dem nativen Aeerosol (-HS, -Filter), einer erhöhten Partikeldeposition (+HS, - Filter) sowie der reinen Gasfraktion des Aerosols (-HS, + Filter) untersucht. Dargestellt sind, sofern nicht anders gekennzeichnet, die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SD.

Hierbei wurden nur geringfügig gesteigerte Transkriptmengen nach der Exposition gegenüber den Verbrennungsaerosolen der reinen Nanomaterialien erfasst. Die stärkste Ausprägung war dabei durch die Exposition des nativen Verbrennungsaerosols von TiO<sub>2</sub> NP sowie CuO NP und CNT zu beobachten. Es ist jedoch anzumerken, dass die SD nach Exposition gegenüber TiO<sub>2</sub> NP auf eine große Varianz der Ergebnisse hinweisen und diese daher nicht gänzlich aussagekräftig sind. Eine Erklärung für eine Induktion der *GADD45A*-Expression nach Exposition gegenüber den nativen Verbrennungsaerosolen von CuO NP und CNT bei gleichzeitigem Ausbleiben dieser Beobachtung unter einer erhöhten Partikeldeposition (+HS) ist nach jetzigem Stand nicht möglich. Die Exposition gegenüber Verbrennungsaerosolen PE-haltiger Materialien führte abermals zu einer stark vermehrten und, mit Ausnahme der Exposition gegenüber PE-Verbrennungsprodukten, einer probenübergreifend relativ stabil gesteigerten *GADD45A*-Expression um den log<sub>2</sub>-fachen

Faktor 1,3. Die Verbrennung von PE resultierte im Vergleich zu anderen PE-haltigen Materialien in einer geringeren *GADD45A*-Expression. Reproduzierbar wurde festgestellt, dass keine relevanten Unterschiede zwischen den Expositionen des gesamten Aerosols und der Exposition gegenüber der Gasphase des Aerosols zu erkennen waren.

Zusammenfassend deuteten die Befunde der transkriptionellen Ebene auf die Induktion einer zellulären Stressantwort sowie auf induzierte DNA-Schäden nach Exposition gegenüber Verbrennungsaerosolen aus der thermischen Verwertung PE-haltiger Materialien hin. Eine Beeinflussung des Genexpressionsprofils durch die Verbrennungsaerosole der reinen Nanomaterialien konnte nicht beobachtet werden. Da zudem kein Unterschied zwischen Expositionen gegenüber den gesamten Verbrennungsaerosolen (+/- HS) und der reinen Gasphase (Filter) ersichtlich wurde, ist von einer toxischen Wirkung von Gasen generiert aus der PE-Verbrennung auszugehen, dies wird in 5.2.6 näher diskutiert. Diese These wird durch die vom Projektpartner des Universitätsklinikums Freiburg erhobenen Zytotoxizitätsdaten gestützt (Abb. 5.25). Hierbei wurde die LDH-

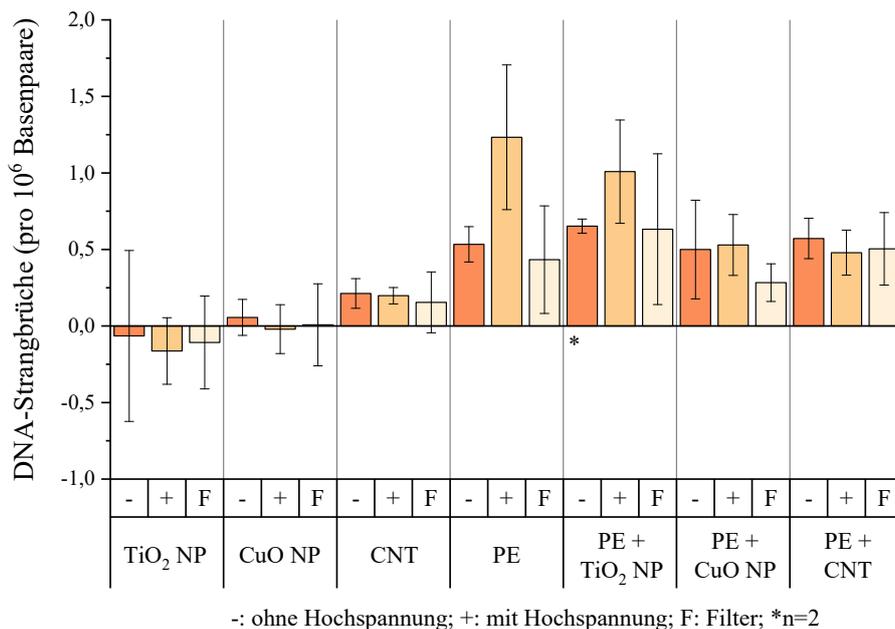


**Abbildung 5.25: LDH-Freisetzung durch verschiedene Verbrennungsaerosole in Relation zu einer mitgeführten Positivkontrolle (100 %).** A549-Zellen wurden für vier Stunden in der Vitrocell® Atomated Exposure Station gegenüber einem Verbrennungsaerosol exponiert und für weitere 20 Stunden nachinkubiert. Für jede Exposition wurden CACs und Expositionen gegenüber dem nativen Aerosol (-HS, -Filter), einer erhöhten Partikeldeposition (+HS, - Filter) sowie der reinen Gasfraktion des Aerosols (-HS, + Filter) untersucht. Dargestellt sind, sofern nicht anders gekennzeichnet, die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen ± SD. Die Bestimmung der LDH-Freisetzung wurde durch den Projektpartner des Universitätsklinikums Freiburg durchgeführt. n.d.: nicht bestimmt.

Freisetzung bestimmt und in Relation zur Freisetzung vollständig lysierter Zellen gesetzt, die LDH-Freisetzung der CAC ist in Anhang Kap. 9.10 einzusehen. Auch die LDH-Freisetzung zeigte unter dem Einfluss von Verbrennungsaerosolen aus der Verbrennung PE-haltiger Materialien weitaus ausgeprägtere Effekte als eine Exposition der Zellen gegenüber den Verbrennungsaerosolen der reinen NM.

### 5.2.3 Induktion von DNA-Strangbrüchen in A549-Zellen durch Verbrennungsaerosole

Neben der Beeinflussung des Genexpressionsprofils durch die Verbrennungsaerosole wurde die Induktion von DNA-Strangbrüchen untersucht. Zum Ausschluss falsch positiver oder falsch negativer Ergebnisse wurde eine DNA-schädigende Wirkung durch das Zuschalten der HS und das Verbrennen des Suspensionstabilisators betrachtet (Anhang Kap. 9.11).



**Abbildung 5.26: Induktion von DNA-Strangbrüchen durch verschiedene Verbrennungsaerosole.** A549-Zellen wurden für vier Stunden in der Vitrocell® Automated Exposure Station gegenüber einem Verbrennungsaerosol exponiert und für weitere 20 Stunden nachinkubiert. Für jede Exposition wurden CACs und Expositionen gegenüber dem nativen Aerosol (-HS, -Filter), einer erhöhten Partikeldeposition (+HS, - Filter) sowie der reinen Gasfraktion des Aerosols (-HS, + Filter) untersucht. Dargestellt sind, sofern nicht anders gekennzeichnet, die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SD.

Dabei konnte keine Beeinträchtigung durch das Anlegen der HS, aber eine erhöhte Anzahl an Strangbrüchen durch das Verbrennen des Stabilisators festgestellt werden. Die Verbrennung von reinem TiO<sub>2</sub> und CuO NP zeigte keine Induktion von DNA-Strangbrüchen auf, wohingegen bei der Verbrennung der CNT eine geringe, aber vernachlässigbare Induktion von DNA-Läsionen quantifiziert werden konnte (Abb. 5.26). Diese lag zudem weit unter der Anzahl an DNA-Strangbrüchen, die nach dem Verbrennen des Stabilisators beobachtet wurde. Somit konnte eine negative Beeinflussung durch den Stabilisator ausgeschlossen werden. Bei der Verbrennung der reinen Nanomaterialien war abermals kein Unterschied zwischen den Expositionen gegenüber dem gesamten Verbrennungsaerosol (-/+ HS) und der gasförmigen Fraktion (Filter) ersichtlich. Die Exposition gegenüber den Verbrennungsaerosolen PE-haltiger Materialien zeigte hingegen einen deutlichen Anstieg an DNA-Strangbrüchen. Die Exposition gegenüber diesen Verbrennungsaerosolen induzierte probenübergreifend zwischen 0,5 und 0,6 DNA-Strangbrüche pro 10<sup>6</sup> Bp. Lediglich die Verbrennung von PE als auch die des Komposits aus PE + TiO<sub>2</sub> NP zeigte eine zusätzlich gesteigerte Anzahl an DNA-Strangbrüchen mit dem Anlegen der HS zur Dosiserhöhung. Die Exposition gegenüber dem gefilterten Aerosol wies probenübergreifend 0,3 bis 0,6 DNA-Strangbrüche pro 10<sup>6</sup> Bp auf und befand sich somit im Bereich der Exposition ohne angelegte HS. Abermals war zu erkennen, dass die adverse Reaktion nicht durch die partikuläre, sondern durch die gasförmige Fraktion des Verbrennungsaerosol hervorgerufen wurde. Ausnahmen bildeten hierbei die Exposition gegenüber dem Verbrennungsaerosol von PE und PE + TiO<sub>2</sub> NP. Vergleicht man die applizierte Dosis (Kap. 5.2.1, Tab. 5.2) dieser beiden Materialien (PE, PE + TiO<sub>2</sub> NP) mit der Verbrennung der weiteren Nanokomposite (PE + CuO NP, PE + CNT), so wurde eine um Faktor 2 erhöhte applizierte Dosis bestimmt. Die gesteigerte Anzahl an DNA-Strangbrüchen unter erhöhter Partikeldeposition nach Verbrennung von PE und PE + TiO<sub>2</sub> NP könnte somit durch die im Vergleich erhöhte Dosis, und damit dem Überschreiten eines NOAEL, begründet werden. Die Beobachtungen zur Induktion von DNA-Schäden durch Verbrennungsaerosole aus der thermischen Verwertung PE-haltiger Materialien auf transkriptioneller Ebene konnten somit, mit Ausnahme der vermehrten DNA-Strangbrüche nach erhöhter Partikeldosis des Verbrennungsaerosols nach Verbrennung von PE bzw. PE + TiO<sub>2</sub> NP, auch auf funktioneller Ebene bestätigt werden. Im Vergleich zur ALI-Exposition mit der Vitrocell® Cloud (Kap. 5.1.3.3) konnte keine Induktion von DNA-Strangbrüchen durch CuO NP-haltige Verbrennungsaerosole beobachtet werden. Wie bereits erwähnt (Kap. 5.2.1, Tab. 5.2) lagen die applizierten Dosierungen der partikulären Fraktion dieser Verbrennungsaerosole jedoch weit unter dem zuvor an der Vitrocell® Cloud ermittelten NOAEL für CuO NP. Auch die partikuläre Deposition der weiteren Verbrennungsaerosole lag in einem sehr niedrigen Bereich, weshalb dies eine weitere Erklärung für ausbleibende Effekte durch diese Aerosolfraktion darstellen könnte.

Zusammenfassend deutet die gesteigerte Expression von *HMOX1* und *HSPA1A* nach Exposition gegenüber Verbrennungsaerosolen PE-haltiger Materialien auf eine zelluläre Stressantwort gegenüber Produkten der PE-Verbrennung hin. Die gesteigerte *GADD45A*-Expression zeigt einen ähnlichen Verlauf und deutet neben der Stressantwort auf eine DNA-schädigende Wirkung dieser Verbrennungsprodukte hin. Die Schädigung der DNA durch verbrennungsinduzierte Verbindungen konnte in Form von DNA-Strangbrüchen auf funktioneller Ebene bestätigt werden.

Die toxischen Effekte wurden hierbei meist durch die Gasphase des Aerosols, und lediglich in zwei Ausnahmen unter erhöhter Dosis auch durch die partikuläre Fraktion, induziert. Eine zytotoxische Wirkung von Verbrennungsprodukten aus der thermischen Verwertung von PE auf A549-Zellen konnte bereits nachgewiesen werden (Lestari *et al.* 2011). Jedoch sind hinsichtlich der weiteren toxikologischen Wirkungen derzeit keine Literaturstudien bekannt, die ein direkt vergleichbares Verbrennungsaerosol untersuchten. Es liegen jedoch einige Studien zur Untersuchung von Zigarettenrauch vor, der ebenfalls ein Verbrennungsaerosol darstellt, allerdings kann keine direkte Vergleichbarkeit zur Nanokompositverbrennung garantiert werden. Dabei konnte bereits eine genotoxische Wirkung (Okuwa *et al.* 2010) und Induktion der *HMOX1*-Expression (Fukano *et al.* 2006) in A549-Zellen durch die reine Gasphase von Zigarettenrauch festgestellt werden. Dies bestärkt die These der Beeinflussung der Genexpression und eine Induktion von DNA-Strangbrüchen durch die gasförmige Phase des Verbrennungsaerosols. Jedoch könnte auch die niedrige partikuläre Dosis für ein Ausbleiben eines Effekts durch die Partikelfraktion der Aerosole verantwortlich gemacht werden.

### 5.2.4 Applizierte Dosis während der Exposition von 3D-Lungenzellkulturen

Neben der Auswirkung auf A549-Zellen wurde auch die Beeinflussung der Verbrennungsaerosole auf ein 3D-Lungenzellmodell untersucht. Dabei handelt es sich um das Produkt MucilAir der Firma Epithelix, das ein 3D-Modell des bronchialen Epithels darstellt. Die 3D-Zellkultur wurde aus Primärzellen eines Donors (Anhang Kap. 9.12) rekonstituiert und zeigte bereits Verwendung in nanotoxikologischen Studien (Dankers *et al.* 2018, Kooter *et al.* 2017, Kuper *et al.* 2015). Auch hier wurde zum Ausschluss falsch positiver oder negativer Ergebnisse ein Einfluss der angelegten Hochspannung ausgeschlossen (Anhang Kap. 9.9). Im Unterschied zur Exposition der A549-Zellen wurden lediglich zwei Proben mit dem Verbrennungsaerosol exponiert. Hierbei handelte es sich zum einen um eine Probe mit angelegter Hochspannung zur Dosiserhöhung und zum anderen um eine Probe mit vorgeschaltetem Filter zur Untersuchung der reinen Gasphase. Auf Basis der

voran gegangene Experimente und dem Ausbleiben einer toxischen Wirkung eines bestimmten Nanokomposits wurden die Experimente unter Verwendung des 3D-Zellkulturmodells auf das wirtschaftlich relevanteste Nanokomposit (PE + TiO<sub>2</sub> NP) beschränkt.

**Tabelle 5.3: Tabellarische Zusammenfassung der mathematisch bestimmten Dosen nach Exposition der 3D-Lungenzellkultur.** Diese basieren auf Daten, welche im Rahmen des Projektes «ProCycle» durch das KIT-ITC erhoben wurden. Hierbei wurde mit Hilfe eines ELPI die Massenkonzentration der Verbrennungsaerosole bestimmt. Aufgrund des bekannten Massenstrom gegenüber dem die Zellen exponiert sind, ist es möglich aus diesen Daten die Masse pro Fläche zu berechnen.

Material	Massenkonzentration <sup>1</sup> mittels ELPI [ $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ]	Dosis ohne HS [ $\text{ng}/\text{cm}^2$ ]	Dosis mit HS <sup>2</sup> [ $\text{ng}/\text{cm}^2$ ]
TiO <sub>2</sub> NP	20610 ± 801	2186 ± 361	10932 ± 1803
PE	465 ± 120	48 ± 12	238 ± 58
PE + TiO <sub>2</sub> NP	209 ± 27	22 ± 3	111 ± 14

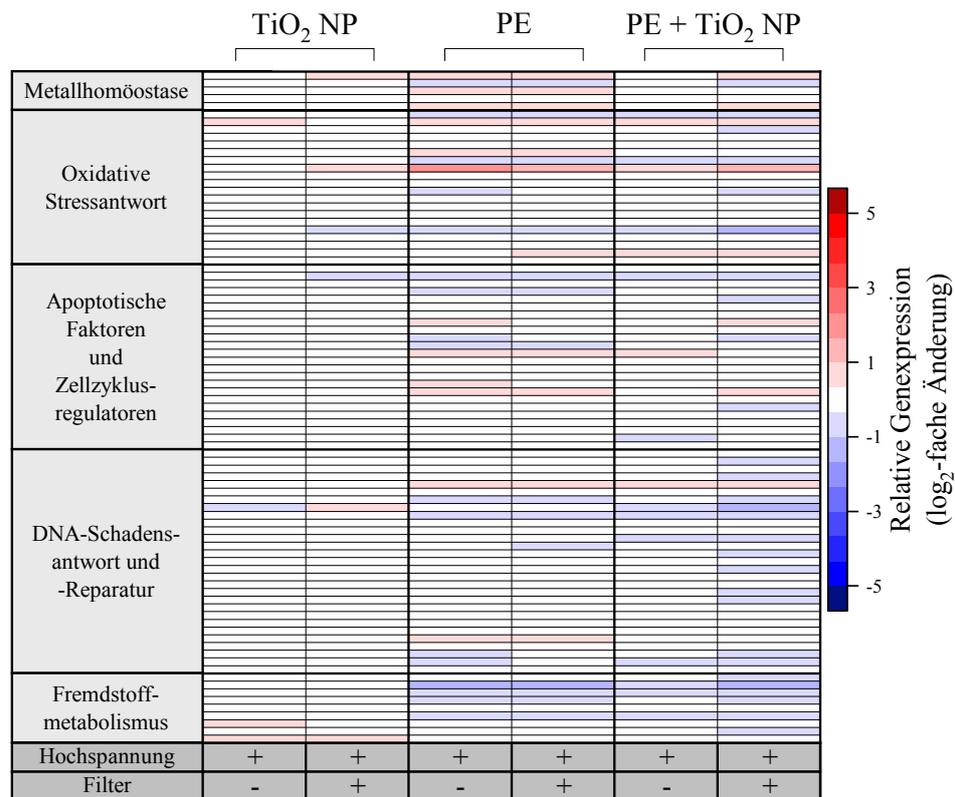
<sup>1</sup> Berechnet aus Daten ermittelt mit einem ELPI. Für die Berechnung der Dosis PE-haltiger Materialien wurde mit einer Massenkonzentration von 1 g/cm<sup>3</sup> kalkuliert. Die Dosisberechnung der TiO<sub>2</sub> NP erfolgte mit deren Bulk-Dichte.

<sup>2</sup> Es wurde mit einem Steigerungsfaktor von 5 gerechnet, dieser basiert auf vorherigen Studien von Seiten des KIT-ITC.

Während die Exposition gegenüber dem PE-Verbrennungsaerosol eine vergleichbare partikuläre Dosis zu der Exposition von A549-Zellen ergab (54 respektive 48 ng/cm<sup>2</sup>), wurde die 3D-Lungenzellkultur im Vergleich zu den A549-Zellen gegenüber einer um den Faktor 145 erhöhten Dosis an TiO<sub>2</sub> NP exponiert (Tab. 5.3). Die Dosis an Partikeln aus der Verbrennung des PE + TiO<sub>2</sub> NP Komposits zeigte sich hingegen bei der 3D-Lungenzellkultur im Vergleich zu den A549-Zellen um die Hälfte reduziert. Insgesamt wurden abermals geringe partikuläre Dosierungen nach einer Exposition gegenüber Verbrennungsaerosolen PE-haltiger Materialien appliziert, während die partikuläre Dosis nach TiO<sub>2</sub> NP-Verbrennung sich stark erhöht zeigte.

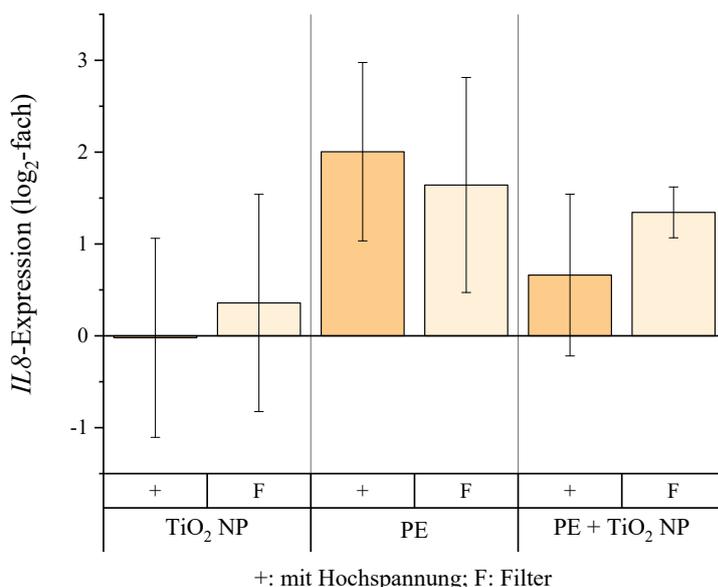
### 5.2.5 Beeinflussung des Genexpressionsprofils von 3D-Lungenzellkulturen durch Verbrennungsaerosole

Analog zu den Untersuchungen der A549-Zellen, wurde auch das 3D-Lungenzellkulturmodell hinsichtlich einer Beeinflussung des Genexpressionsprofils untersucht (Abb. 5.27). Eine detaillierte Heatmap inklusive Gennamen ist im Anhang (Kap. 9.5 Abb. 9.5) einzusehen. Wie bereits bei



**Abbildung 5.27: Schematische Darstellung der Beeinflussung des Genexpressionsprofils von 3D-Lungenzellkulturen durch Aerosole aus der Verbrennung von TiO<sub>2</sub> NP, PE sowie den Nanokompositen bestehend aus diesen Materialien als Heatmap.** Eine rote Färbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine reduzierte Genexpression. Für jede Exposition wurden CACs sowie Expositionen gegenüber einer erhöhten Partikeldeposition (+HS, - Filter) und der reinen Gasphase (-HS, + Filter) untersucht. Dargestellt sind, sofern nicht anders gekennzeichnet, die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SD.

der Exposition von A549-Zellen gegenüber TiO<sub>2</sub> NP zeigten auch die rekonstituierten Primärzellen keine Beeinflussung des Genexpressionsprofils durch dieses Verbrennungsaerosol. Die Exposition gegenüber dem Verbrennungsaerosol von PE bzw. des TiO<sub>2</sub> NP-haltigen Nanokomposits zeigte hingegen eine Veränderung in der Transkriptmenge einiger Gene. Jedoch wurde lediglich bei einem Gen eine relevante Beeinflussung beobachtet. Dabei handelt es sich um das Gen *IL8*, das für einen Marker der inflammatorischen Antwort kodiert. Die Expression dieses Gens nach Exposition gegenüber den jeweiligen Verbrennungsaerosolen ist in Abb. 5.28 dargestellt. Die Exposition gegenüber dem Verbrennungsaerosol der TiO<sub>2</sub> NP zeigte keine relevante Beeinflussung des Gens *IL8*, wohingegen die Exposition gegenüber dem Aerosol aus der PE-Verbrennung in einer Zunahme um den log<sub>2</sub>-fachen Faktor von 1,6 bis 2 resultierte. Die Exposition gegenüber dem

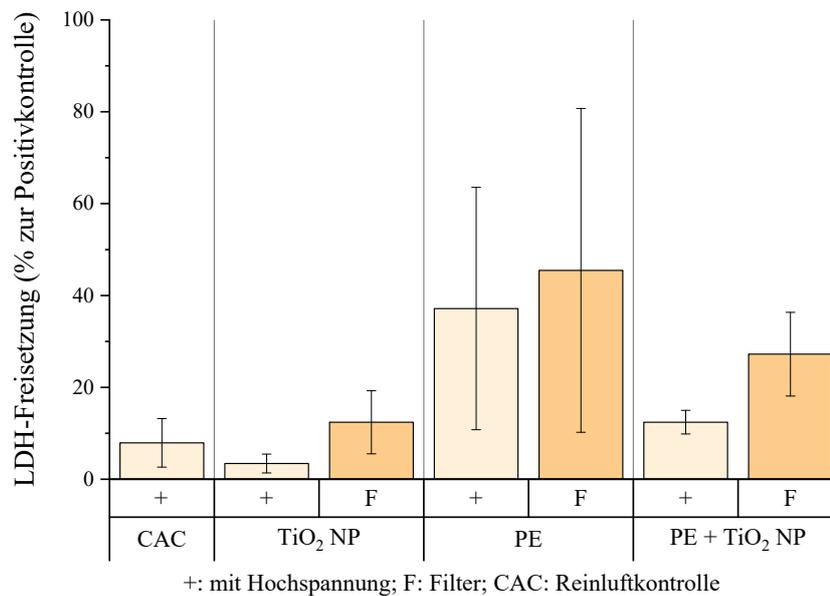


**Abbildung 5.28: Beeinflussung der IL8-Expression durch verschiedene Verbrennungsaerosole.**

Das 3D-Zellkulturmodell wurde für vier Stunden in der Vitrocell® Automated Exposure Station gegenüber einem Verbrennungsaerosol exponiert und für weitere 20 Stunden nachinkubiert. Für jede Exposition wurden CACs sowie Expositionen gegenüber einer erhöhten Partikeldeposition (+HS, - Filter) und der reinen Gasphase (+HS, + Filter) untersucht. Dargestellt sind, sofern nicht anders gekennzeichnet, die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SD.

Verbrennungsaerosol des Nanokomposits zeigte eine im Vergleich etwas abgeschwächtere Genexpression. Insgesamt wurde eine große Varianz der Ergebnisse beobachtet, die durch die hohe Standardabweichung ersichtlich ist. Zudem konnte hinsichtlich der Verbrennung PE-haltiger Materialien kein relevanter Unterschied zwischen der Exposition gegenüber dem gesamten Aerosol und der reinen Gasphase (+ Filter) erkannt werden. Dies spricht nochmals für die Induktion einer toxischen Wirkung durch die Gasphase und nicht durch partikuläre Aerosolfraktion.

Diese Beobachtung zeigte sich auch in der LDH-Freisetzung, die durch den Projektpartner des Universitätsklinikums Freiburg durchgeführt wurde (Abb. 5.29). Auch hierbei wurde kein eindeutiger Unterschied zwischen der Exposition unter erhöhter Partikeldeposition (+) und der reinen Gasphase (F) festgestellt. Zudem konnte dargelegt werden, dass das Verbrennungsaerosol aus der TiO<sub>2</sub> NP Verbrennung eine geringere Toxizität aufweist als die Verbrennungsaerosole aus der Verbrennung PE-haltiger Materialien. Zusätzlich wurde ein geringer Unterschied zwischen der Exposition gegenüber den Verbrennungsprodukten der PE bzw. PE + TiO<sub>2</sub> NP Verbrennung aufgezeigt, aufgrund der hohen SD der Ergebnisse nach der PE-Verbrennung konnte jedoch keine eindeutige Aussage getroffen werden. Diese Beobachtung wurde daher als Tendenz eingestuft.

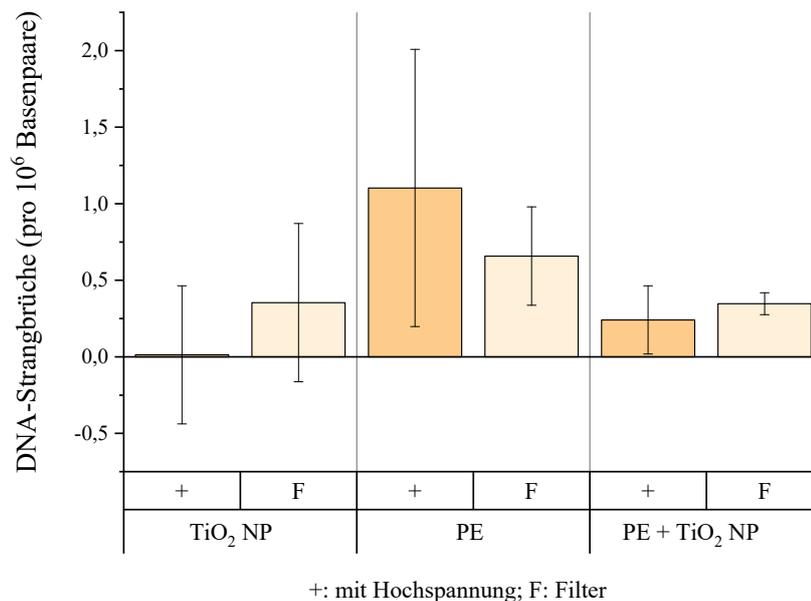


**Abbildung 5.29: LDH-Freisetzung durch verschiedene Verbrennungsaerosole in Relation zu einer mitgeführten Positivkontrolle (100 %).** Das 3D-Zellkulturmodell wurde für vier Stunden in der Vitrocell® Automated Exposure Station gegenüber einem Verbrennungsaerosol exponiert und für weitere 20 Stunden nachinkubiert. Für jede Exposition wurden CACs sowie Expositionen gegenüber einer erhöhten Partikeldeposition (+HS, - Filter) und der reinen Gasphase (-HS, + Filter) untersucht. Dargestellt sind, sofern nicht anders gekennzeichnet, die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SD. Die Bestimmung der LDH-Freisetzung wurde durch den Projektpartner des Universitätsklinikums Freiburg durchgeführt.

## 5.2.6 Induktion von DNA-Strangbrüchen in 3D-Lungenzellkulturen durch Verbrennungsaerosole

Zusätzlich zur Beeinflussung auf transkriptioneller Ebene wurde auch für das 3D-Zellkulturmodell die Induktion von DNA-Strangbrüchen mit Hilfe der AU untersucht. Ein möglicher Einfluss der Hochspannung auf die genomische Stabilität ist in Anhang Kap. 9.11 ersichtlich.

Die Exposition gegenüber dem Verbrennungsaerosol der TiO<sub>2</sub> NP zeigte keine bzw. eine durch die hohe Standardabweichung vernachlässigbare Induktion von DNA-Strangbrüchen. Das Aerosol aus der Verbrennung des Nanokomposits PE + TiO<sub>2</sub> NP bewirkte eine geringe Induktion von DNA-Strangbrüchen, während das Aerosol aus der thermischen Verarbeitung von PE mit einer Induktion von 1,1 bzw. 0,7 DNA-Strangbrüchen pro 10<sup>6</sup> Bp eine deutliche genotoxische Wirkung aufwies, wobei abermals eine hohe Standardabweichung zu beobachten war. Wie bereits bei der *IL8*-Expression dargelegt, konnte auch hinsichtlich der Induktion von DNA-Strangbrüchen



**Abbildung 5.30: Induktion von DNA-Strangbrüchen durch verschiedene Verbrennungsaerosole.**

Das 3D-Zellkulturmodell wurde für vier Stunden in der Vitrocell® Automated Exposure Station gegenüber einem Verbrennungsaerosol exponiert und für weitere 20 Stunden nachinkubiert. Für jede Exposition wurden CACs sowie Expositionen gegenüber einer erhöhten Partikeldeposition (+HS, - Filter) und der reinen Gasphase (-HS, + Filter) untersucht. Dargestellt sind, sofern nicht anders gekennzeichnet, die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SD.

kein eindeutiger Unterschied zwischen den Expositionen gegenüber dem gesamten Aerosol (+) oder der Gasphase (F) beobachtet werden. Daher erhärtet sich die These, dass nicht von einem partikulär induzierten Effekt, sondern von einer toxischen Wirkung der generierten Gasphase auszugehen ist. Im Vergleich zu den Expositionen gegenüber A549-Zellen konnte hinsichtlich der Induktion von DNA-Strangbrüchen vergleichbare Effekte beobachtet werden. Die Beeinflussung der Genexpression zeigte deutlich ausgeprägtere Veränderungen in A549-Zellen. Auch die applizierte Dosis variierte zwischen den Expositionen (Kap. 5.2.4, Tab. 5.3). Insbesondere die stark erhöhte TiO<sub>2</sub> NP Dosis ist hierbei bemerkenswert. Das Ausbleiben einer Reaktion auf diese stark erhöhte Dosis bestätigt die bereits vorgestellten Daten nach Exposition von A549-Zellen gegenüber TiO<sub>2</sub> NP mit Hilfe der Vitrocell® Cloud. Zusätzlich wurde bereits eine geringere Empfindlichkeit der 3D-Gewebe im Vergleich zu A549-Zellen beschrieben (Kooter *et al.* 2016), die u.a. auf der vorhandenen mukoziliären Clearance beruht (Kuper *et al.* 2015). So zeigten Kooter *et al.* (2016) eine geringere Sensitivität der zytotoxischen, inflammatorischen und genotoxischen Wirkung im 3D-Gewebe gegenüber A549- und Beas-2B-Zellen. Ein Literaturvergleich hinsichtlich der toxischen Wirkung eines identischen Verbrennungsaerosol auf das Zellkultursystem ist nicht möglich,

da diesbezüglich keine Studien vorliegen. Jedoch wurde bereits eine IL-8 Sekretion nach Exposition gegenüber Zigarettenrauch beobachtet, der ebenfalls ein Verbrennungsaerosol darstellt, wenn auch anderer Komposition (Banerjee *et al.* 2017, Ishikawa *et al.* 2018). Darüber hinaus zeigten beide Studien auch eine vielseitige Beeinflussung des Zellmodells auf transkriptioneller Ebene. Jedoch wurden in den vorgestellten Ergebnissen schwächer ausgeprägte Effekte beschrieben. Eine größere Beeinflussung auf das Zellkultursystem wurde auch von Haswell *et al.* (2017) nach Exposition gegenüber genormten Zigarettenrauch und Verwendung einer RNA-Sequenzierung festgestellt. Ein mit den vorliegenden Ergebnissen vergleichbares Resultat zeigten Bisig *et al.* (2018). Hier wurde nur ein geringfügiger Einfluss auf die Expression von *HMOX1* und *NQO1* nach sechstündiger Exposition gegenüber Autoabgasen beobachtet. Abermals ist jedoch zu beachten, dass eine direkte Übertragbarkeit der beobachteten Effekte in Literaturstudien auf die vorgestellten Ergebnissen der vorliegenden Abschlussarbeit aufgrund einer variierender Zusammensetzung der Verbrennungsaerosole aus dem Abbrennen einer Zigaretten und der Nanokompositverbrennung nicht gegeben ist. Ein Literaturvergleich bezüglich einer genotoxischen Wirkung in diesem Zellmodell kann aufgrund fehlender Literatur nicht gezogen werden.

Aufgrund der Erkenntnisse, dass die induzierten Effekte mit der Verbrennung PE-haltiger Materialien korrelierten, wurde von Seiten des Projektpartners des Universitätsklinikum Freiburg eine quali- und quantitative Analyse der verbrennungsgenerierten *volatile organic compounds* (VOC) in Auftrag gegeben. Hierbei wurde neben dem nativen Verbrennungsgas einer PE-Verbrennung auch die Gasphase nach Durchfließen eines Denuders untersucht. Mit diesem sollte eine mögliche Abscheidung von VOCs an der enthaltenen Aktivkohle erzielt werden.

**Tabelle 5.4: Tabellarische Zusammenfassung der quantitativen Bestimmung der TVOC- und SVOC-Gehalte aus der Verbrennung von PE.** Neben dem nativen Verbrennungsgas wurde auch das Gasgemisch nach Durchfließen eines Denuders untersucht. TVOC: Substanzen zwischen C<sub>6</sub> und C<sub>16</sub>; SVOC: Substanzen: > C<sub>16</sub>.

	natives Verbrennungsgas	Verbrennungsgas nach Denuder
<b>TVOC-Wert</b> [ $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ]	161	200
<b>SVOC-Wert</b> [ $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ]	1580	1680

Die quantitative VOC-Analyse wurde dabei vom Auftragnehmer in zwei unterschiedliche Bestimmungsgasparameter unterteilt. Dabei handelte es sich einerseits um den TVOC-Wert, der alle kohlenstoffhaltigen Substanzen mit einer C-Atomanzahl zwischen 6 und 16 umfasst. Andererseits wurde der SVOC-Wert bestimmt, dieser beinhaltet alle Substanzen mit >16 C-Atomen. Während das native Verbrennungsgas einen TVOC-Wert von  $161 \mu\text{g}/\text{m}^3$  aufwies, konnte der eingesetzte Denuder diesen Wert nicht senken. Im Gegenteil, es war ein Anstieg auf  $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$  zu erkennen. Auch bezüglich des SVOC-Wertes erzielte der Denuder nicht den gewünschten Effekt. Hier war eine

Zunahme um von  $1580 \mu\text{g}/\text{m}^3$  im nativen Verbrennungsgas auf  $1680 \mu\text{g}/\text{m}^3$  nach Durchfließen des Denuders zu beobachten. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden nachträglich keine Versuche mit vorgeschalteten Denuder zur Abtrennung toxischer Gase durchgeführt. Zusätzlich zur quantitativen Analyse des VOC-Gehaltes erfolgte auch eine qualitative Untersuchung des Verbrennungsgases. Hierzu wurden die Massenspektren von Peaks eines im Full-Scan-Modus aufgenommen Chromatogramms mit einer Spektrenbibliothek verglichen und Referenzspektren mit der höchsten Übereinstimmung zugeordnet. In Tab. 5.5 sind alle Substanzen des nativen Verbrennungsgases aufgelistet, deren Peakfläche mind. 1 % der gesamt integrierten Peakflächen im Chromatogramm aufwiesen. Eine detaillierte Auflistung aller detektierten Substanzen ist in Anhang Kap. 9.13 einzusehen.

**Tabelle 5.5: Tabellarische Zusammenfassung der qualitativen VOC-Analyse des nativen Verbrennungsgases aus der thermischen Verwertung von PE.** Aufgelistet sind nur Substanzen, die einen prozentualen Peakflächenanteil > 1 % der gesamten integrierten Peakflächen im Chromatogramm aufwiesen. %Area: prozentualer Anteil der Peakfläche an der Summe aller automatisch integrierten Peakflächen im Chromatogramm; Qual: Grad der Übereinstimmung mit der verwendeten Spektrenbibliothek.

Nummer	%Area (%)	Name	Qual (%)	CAS-Nummer
1	62,7	2,5-Diphenyl-4-benzochinon	94	000844-51-9
2	18,7	1,2,3,4,5,6,7,8-Octahydro-9-phenylanthracen	72	125379-29-5
3		1,2,3,6,7,8,9,10,11,12-decahydrobenzo[e]pyren	72	092387-50-3
4	1,7	1-Tridecanol	91	000112-70-9
5		1-Dodecen	91	000112-41-4
6	1,3	Benzaldehyd	97	000100-52-7

Insgesamt konnten vier Peaks identifiziert werden, die die festgelegten Bedingungen erfüllten. Dabei konnten mit Substanz 1 und 6 zwei Substanzen mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit identifiziert werden. Im Gegensatz dazu war keine Unterscheidung zwischen Substanz 2 und 3 bzw. 4 und 5 möglich. Mit 62,7 % stellte Substanz 1 den größten Anteil des Verbrennungsgases, gefolgt von Substanz 2/3, die mit 18,7 % im Verbrennungsgas zu finden war. Die Anteile von Substanz 4/5 sowie Substanz 6 lagen unterhalb von 2 % vor. Mit Hilfe der Datenbank «Toxnet» wurde schließlich eine Recherche zur toxikologischen Beurteilung dieser Stoffe durchgeführt (Anhang Kap. 9.14). Während für die Substanzen 1, 4, 5 und 6 ausreichend Daten vorlagen, waren keine toxikologischen Daten für die Substanzen 2 und 3 vorhanden. Für alle Verbindungen, zu denen Daten vorlagen, konnte eine reizende Wirkung festgestellt werden. Zudem wurde für die Substanzen 1,4 und 6 eine akut toxische Wirkung festgestellt. Ein fundiert genotoxischer Effekt konnte lediglich für Substanz 6 aufgezeigt werden, während alle Substanzen weitere toxische Wirkungen, u.a. reizende Wirkungen, aufwiesen. Bei Substanz 2 und 3 handelt es sich um aromatische Koh-

lenwasserstoffe, bei Substanz 3 sogar um einen polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoff (PAK), deren toxische Wirkung bereits ausführlich untersucht wurde (zusammengefasst in Baird *et al.* 2005 und Guo *et al.* 2011). Ob lediglich eine Substanz des Verbrennungsaerosol für die beobachteten Effekte verantwortlich ist, oder das gesamte Gasgemisch, kann nicht endgültig geklärt werden. Zudem könnte auch die Bindung von PAKs an die verbrennungsinduzierten Partikel, wie es bei Partikeln der Holzverbrennung bereits festgestellt wurde, eine mögliche Ursache für eine toxische Wirkung darstellen (Gauggel-Lewandowski *et al.* 2013). Dies würde auch die Beobachtung einer gesteigerten Anzahl an DNA-Strangbrüchen bei erhöhter Partikeldosis erklären.

## 6 Zusammenfassende Diskussion

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Exposition von ALI-kultivierten Lungenzellkultursystemen gegenüber nanoskaligen Materialien mit Hilfe entsprechender ALI-Expositionssystemen. Hierzu erfolgte zunächst die Etablierung eines statischen ALI-Expositionssystems (Vitrocell® *Cloud*) unter Verwendung von toxisch (CuO NP) und nicht-toxisch (TiO<sub>2</sub> NP) wirkenden Referenzpartikeln und A549-Zellen. Dabei wurde insbesondere die toxische Wirkung der CuO NP nach ALI-Exposition mit Studien zum Wirkmechanismus dieser Partikelspezies unter submersen Bedingungen verglichen. Des Weiteren erfolgten Untersuchungen zur Beeinflussung der Genexpression und genotoxischen Wirkung von Verbrennungsaerosolen aus der thermischen Wiederverwertung von Nanokompositen auf A549-Zellen und ein 3D-Lungenzellkulturmodell. Hierbei wurde mit der Vitrocell® *Automated Exposure Station* ein dynamisches Expositionssystem verwendet, mit dem auch die Gasphase aus der Verbrennung untersucht werden konnte.

Vor der Exposition gegenüber Zellen wurden die sphärischen NP bezüglich ihrer Partikelgröße nach ALI-Exposition mit Hilfe von TEM-Aufnahmen charakterisiert. Hierbei konnte kein Einfluss der Stammlösungskonzentration auf diesen Parameter beobachtet werden. Für TiO<sub>2</sub> NP wurde ein Partikeldurchmesser von  $24,0 \pm 7,1$  nm bestimmt, der mit den Herstellerangaben (21 nm) und Literaturdaten vergleichbar war (Motzkus *et al.* 2013, Yang *et al.* 2014). CuO NP zeigten mit  $44,8 \pm 34,6$  nm sowohl einen größeren Partikeldurchmesser als auch eine höhere Heterogenität der Partikelgröße als die TiO<sub>2</sub> NP. Dieser Wert erfüllte ebenso die Herstellerangaben (< 50 nm), zeigte sich jedoch geringer als bereits publizierte Partikeldurchmesser dieser Partikelspezies (Semisch *et al.* 2014). Im Gegensatz zu den Daten der vorliegenden Arbeit basiert der publizierte Wert jedoch auf einer mathematische Ermittlung des Partikeldurchmessers.

Ein Einfluss der ALI-Kultivierung und des in den NP-Stammlösungen verwendeten Suspensions-trägers (1%iges PBS) auf die Zellviabilität konnte ausgeschlossen werden. Mit Hilfe der Vitrocell® *Cloud* war es möglich, A549-Zellen mit Partikeldepositionen zwischen  $0,4 - 25,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  zu exponieren. Diese Depositionen kann nach Berechnungen durch Paur *et al.* (2011) eine kumulative Exposition von Arbeitnehmern widerspiegeln. Nach ALI-Exposition von A549-Zellen gegenüber CuO NP wurde eine zytotoxische Wirkung beobachtet, wobei die Betrachtung der CFA im Vergleich zur relativen Zellzahl einen ausgeprägteren Effekt zeigte. Hierbei wurde eine dosisabhängige Abnahme der CFA ab einer Dosis von  $4,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  festgestellt. Die Beobachtungen zur Zytotoxizität der CuO NP auf A549-Zellen decken sich sowohl mit Studien unter submersen Be-

dingungen (u.a. Cronholm *et al.* 2013, Moschini *et al.* 2013, Semisch *et al.* 2014, Wang *et al.* 2012) als auch nach ALI-Exposition (Aufderheide *et al.* 2013, Jing *et al.* 2015, Steinritz *et al.* 2013). Im Gegensatz zu CuO NP konnte unter dem Einfluss von TiO<sub>2</sub> NP lediglich eine geringfügige akute Toxizität in Form einer reduzierten relativen Zellzahl festgestellt werden. Jedoch beschränkte sich dieser Effekt auf die höchste Dosis (25,8 µg/cm<sup>2</sup>) und spiegelte sich nicht in einer Beeinflussung der CFA wider. Diese Beobachtungen wurden ebenfalls in Studien zum Einfluss der verwendeten TiO<sub>2</sub> NP-Spezies auf A549-Zellen unter submersen Bedingungen beschrieben. Dabei wurde lediglich unter der Verwendung sehr hoher Dosen und/oder langer Inkubationszeit (48 h) eine geringfügige Zytotoxizität festgestellt (Jugan *et al.* 2012, Sayes *et al.* 2006, Simon-Deckers *et al.* 2008, Tedja *et al.* 2011). Bezüglich ALI-Expositionen dieser Partikelspezies wurde unter dem Einfluss einer geringen Partikeleposition keine zytotoxische Wirkung beobachtet (Loret *et al.* 2016). Jedoch zeigten Rach *et al.* (2014) und Steinritz *et al.* (2013) im Vergleich zu den vorgestellten Ergebnissen und unter Verwendung einer vergleichbaren Dosis eine ausgeprägtere zytotoxische Wirkung auf. Diese Diskrepanz kann mit der Betrachtung verschiedener toxikologischer Endpunkte und einer möglichen Interferenz zwischen den NP mit den in der Literatur verwendeten Testsystemen begründet werden (Kroll *et al.* 2012). Somit konnten hinsichtlich einer toxischen Wirkung CuO NP als Positivkontrolle und TiO<sub>2</sub> NP als Negativkontrolle für das verwendete Expositionssystem identifiziert werden.

Aufbauend auf den Zytotoxizitätsuntersuchungen wurden Genexpressionsanalysen unter dem Einfluss beider Partikelspezies durchgeführt. Dabei konnte keine Änderung im Genexpressionsprofil von A549-Zellen durch TiO<sub>2</sub> NP beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigten CuO NP eine dosisabhängige und vielseitige Beeinflussung des Genexpressionsprofils dieser Zellen. Aufgrund ausbleibender Effekte unter dem Einfluss niedriger CuO NP Dosen (0,4 - 0,8 µg/cm<sup>2</sup>) konnte hierbei ein NOAEL festgestellt werden.

In der Gruppe von Genen, die mit der Metallhomöostase assoziiert sind, konnten erstmalig gesteigerte Transkriptmengen an *MT1X* und *MT2A*, die beide für Proteine der Metallothionein (MT)-Familie kodieren und damit u.a. der Bindung von Metallionen dienen (zusammengefasst in Krezel und Maret 2017, Blindauer 2014), nach einer ALI-Exposition gegenüber CuO NP gezeigt werden. Sowohl *MT1X* als auch *MT2A* zeigten den selben Verlauf der Expressionsänderung: Während im niedrigen Dosisbereich eine leichte, aber nicht relevant gesteigerte mRNA-Menge vorlag, konnte eine Vervierfachung (log<sub>2</sub>-fache Änderung um Faktor 2) der Transkriptmenge unter dem Einfluss von 2,2 µg/cm<sup>2</sup> CuO NP beobachtet werden. Ab einer Deposition von 4,9 µg/cm<sup>2</sup> CuO NP und höher lag eine konstant ca. 21- (*MT1X*; log<sub>2</sub>-facher Faktor 4,4) bzw. ca. 28-fach (*MT2A*; log<sub>2</sub>-facher Faktor 4,8) gesteigerte Expression der Gene vor. Den wichtigen Transkriptionsfaktor dieser Gene stellt MTF-1 dar, der durch eine erhöhte intrazelluläre Ionenkonzentration verschiedener

---

Metalle, darunter auch Kupfer, aktiviert wird (Heuchel *et al.* 1994; zusammengefasst in Blindauer 2014, Günther *et al.* 2012, Krezel und Maret 2017, Takahashi 2015). Somit kann durch eine gesteigerte Expression MT-kodierender Gene unter dem Einfluss von CuO NP auf eine erhöhte intrazelluläre Kupferionenkonzentration geschlossen werden. Diese kann mit Hilfe des *trojan horse type* Mechanismus begründet werden, der eine endozytotische Aufnahme und lysosomale Prozessierung der CuO NP zu Kupfer-Ionen beschreibt (Cronholm *et al.* 2013, Limbach *et al.* 2007, Moschini *et al.* 2013). Gestützt wird diese These durch mehrere Studien, die eine erhöhte *MT1X*- und *MT2A*-Expression nach CuO NP Exposition unter submersen Bedingungen belegen (Hanagata *et al.* 2011, Strauch *et al.* 2017). Jedoch wurde bisher nur in einer Publikation eine konstant erhöhte Transkriptmenge dieser Gene beobachtet (Cuillel *et al.* 2014). Dies könnte entweder mit dem Erreichen einer maximalen Expressionskapazität dieser Gene oder mit einer konstanten Aufnahme der NP begründet werden. Um letzteres zu überprüfen, wurde die intrazelluläre Aufnahme der CuO NP mit Hilfe einer GF-AAS basierten Methode untersucht. Die Untersuchung ergab eine dosisabhängig gesteigerte Kupferkonzentration nach ALI-Exposition von A549-Zellen gegenüber CuO NP. Auch Studien aus der unserer Arbeitsgruppe konnten bereits eine zelluläre Aufnahme der CuO NP in verschiedenen Zellsystemen, auch A549-Zellen, feststellen (Semisch *et al.* 2014, Strauch *et al.* 2017). Aufgrund der dosisabhängigen Zunahme der intrazellulären Kupferkonzentration zwischen der Exposition mit 4,6 und 9,2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  konnte eine Sättigung der intrazellulären Aufnahme ab einer Deposition von ca. 5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ausgeschlossen werden. Es wurde daher das Erreichen eines Expressionsmaximums unter dem Einfluss der beschriebenen Dosen postuliert.

Eine Beeinflussung der MT-kodierenden Gene durch TiO<sub>2</sub> NP wurde nicht festgestellt was Ergebnisse aus einigen anderen Studien bestätigte. Diese beschriebenen Ergebnisse in der Literatur sind widersprüchlich. So konnte einerseits in THP-1 und Jurkat-Zellen keine erhöhte Genexpression beobachtet werden (Poon *et al.* 2017, Tuomela *et al.* 2013), andererseits wurde eine geringfügig gesteigerte Expression in MDDC- und HMDM-Zellen beschrieben (Tuomela *et al.* 2013). Eine Aktivierung von MTF-1 durch Titan-Ionen ist nicht bekannt, jedoch aufgrund der Unlöslichkeit dieser Partikelspezies unter lysosomalen Bedingungen sehr unwahrscheinlich (Zhong *et al.* 2017). Um auch die intrazelluläre Aufnahme der schwerlöslichen TiO<sub>2</sub> NP in A549-Zellen nachzuweisen, wurde eine durchflusszytometrische Methode angewandt, die zusätzlich durch bildgebende Nachweismethoden in diversen Publikationen validiert wurde (Sanders *et al.* 2012, Suzuki *et al.* 2007, Zucker *et al.* 2010; 2013). Dabei konnte, neben einer dosisabhängigen Aufnahme an CuO NP, auch die Internalisierung von TiO<sub>2</sub> NP festgestellt werden.

Nach ALI-Exposition gegenüber CuO NP wurde erstmalig eine gesteigerte Expression der Gene *HMOX1* und *HSPA1A*, die beide zelluläre Stressmarker darstellen, ermittelt. Hierbei konnte in beiden Genen unterhalb einer Dosis von 4,9  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  CuO NP eine leicht gesteigerte, aber nicht

relevante Expression beobachtet werden. Unter dem Einfluss von  $4,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CuO NP sowie höherer Partikeldosen konnte jedoch eine dosisabhängig gesteigerte Genexpression dieser Stressmarker, und somit die Induktion einer zellulären Stressreaktion, festgestellt werden. Dies konnte bereits in Studien unter submersen Bedingungen auf transkriptioneller Ebene beobachtet werden (Cuillel *et al.* 2014, Strauch *et al.* 2017). Die Induktion der zellulären Stressantwort spiegelt, unter Berücksichtigung der konstant gesteigerten Expression MT-kodierender Gene, gleichzeitig eine zunehmende Überschreitung von Bindungskapazitäten wider. Die Expression beider Stressmarker wird u.a. durch redox-sensitive Transkriptionsfaktoren reguliert, wodurch die vermehrte Expression dieser Gene auf eine Induktion von oxidativem Stress hindeutet (zusammengefasst in Alam und Cook 2007, Gupta *et al.* 2010). Diese These zeigte sich auch in der Expression von *NFKB2*, *SOD1* und *SOD2*, die alle Gene antioxidativ wirkender Proteine darstellen. Hierbei wurde einerseits eine konstant um ca. 2,6-fach ( $\log_2$ -facher Faktor 1,4) gesteigerte Genexpression ab einer Dosis von  $4,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CuO NP im Falle von *NFKB2* beobachtet. Andererseits wurde eine dosisabhängige Zunahme der Transkriptmenge von *SOD1* und *SOD2* festgestellt, die ab einer Exposition gegenüber  $9,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CuO NP eine Relevanz aufwies. Eine gesteigerte mRNA-Menge dieser Gene nach Exposition gegenüber CuO NP konnte bereits unter submersen Bedingungen in mehreren Studien belegt werden (Hanagata *et al.* 2011, Piret *et al.* 2012, Strauch *et al.* 2017), jedoch bisher nicht nach einer ALI-Exposition. Aufgrund der positiven Selbstregulation von NF- $\kappa$ B nach dessen Aktivierung kann durch eine gesteigerte *NFKB2*-Expression von einer Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors ausgegangen werden (Lombardi *et al.* 1995). Zusätzlich zeigten die NF- $\kappa$ B Zielgene *SOD1*, *SOD2*, *HMOX1* und *IL8* erhöhte mRNA-Mengen, wobei auch andere Transkriptionsfaktoren wie AP-1 die Expression dieser Gene induzieren können (zusammengefasst in Alam und Cook 2007, Lakshminarayanan *et al.* 1998, Miao und Clair 2009).

Um eine Erhöhung an oxidativem Stress auch auf funktioneller Ebene nachzuweisen, wurde die Induktion reaktiver Sauerstoffspezies durchflusszytometrisch bestimmt. Hierbei ergab sich eine geringe dosisabhängige Zunahme an ROS nach Exposition gegenüber CuO NP ab einer Deposition von  $5,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Die sehr geringe 1,2-fache Zunahme an ROS im Vergleich zu einer ALI-kultivierten Kontrolle unter dem Einfluss der höchsten CuO NP Dosis verweist auf die geringe Sensitivität dieses Testsystems im Vergleich zur Genexpressionsanalyse. Es konnte jedoch belegt werden, dass bereits die ALI-Kultivierung selbst eine ROS-Induktion hervorruft, womit die geringe Sensitivität zumindest teilweise durch einen erhöhten Hintergrund erklärt werden kann. Nach Betrachtung der bereits beschriebenen Daten auf transkriptioneller Ebene sowie der Literaturdatenlage unter submerser (Ahamed *et al.* 2010, Fahmy und Cormier 2009, Karlsson *et al.* 2008, Moschini *et al.* 2013, Strauch *et al.* 2017) und ALI-Exposition (Jing *et al.* 2015) ist trotz der lediglich geringfügigen ROS-Induktion durch CuO NP im funktionellen Testsystem eine dosisab-

---

hängige Zunahme von oxidativem Stress festgestellt worden. Bemerkenswert ist, dass unterhalb der Deposition von  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CuO NP keine oxidative Stressreaktion beobachtet wurde. Daraus kann abgeleitet werden, dass geringe Mengen an Kupfer-Ionen durch MT ausreichend gebunden werden können. Wird die Bindungskapazität jedoch überschritten, in der vorliegenden Arbeit ab ca.  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , liegen freie Kupfer-Ionen vor, die durch die Fenton-ähnlichen Reaktion zur Entstehung verschiedener ROS-Spezies beitragen können (Lee *et al.* 2014). Zusätzlich zu einer Schädigung zellulärer Makromoleküle durch ROS führt ein Ungleichgewicht des zellulären Redoxstatus zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise NF- $\kappa$ B und AP-1 (zusammengefasst in Martindale und Holbrook 2002).

Neben einer Induktion von oxidativem Stress konnte eine erhöhte Expression des Inflammationsmarkers *IL8* festgestellt werden. Dieser zeigte unter dem Einfluss von  $4,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  eine Verdopplung der Transkriptmenge, die sich mit steigender Dosis wieder reduzierte. Die Abnahme der Genexpression unter Dosiserhöhung kann mit einer einsetzenden zytotoxischen Wirkung erklärt werden. Eine Beeinflussung von *IL8* durch CuO NP konnte bereits auf transkriptioneller sowie funktioneller Ebene in verschiedenen Zellsystemen und submersen Bedingungen dargelegt werden (Dankers *et al.* 2018, Kooter *et al.* 2017, Piret *et al.* 2012, Strauch *et al.* 2017, Ude *et al.* 2017). Auch nach ALI-Exposition zeigte sich eine inflammatorische Antwort in Form einer Il-8 Ausschüttung durch CuO NP (Jing *et al.* 2015). Neben Il-8 wurden auch weitere Inflammationsmarker, u.a. Il-6, nach Exposition gegenüber CuO NP induziert (Dankers *et al.* 2018). Zusätzlich zur Expression von *IL8* konnte erstmalig eine dosisabhängig abnehmende Genexpression von *SEPP1* und *GPX2* nach einer ALI-Exposition gegenüber CuO NP beobachtet werden. Zwar konnte bereits eine verminderte *GPX2*-Expression durch Fischer (2016) unter submersen Bedingungen festgestellt werden, bezüglich einer beeinflussten *SEPP1*-Expression liegen jedoch keine Literaturergebnisse vor. Es wurde allerdings beschrieben, dass eine Ausschüttung verschiedener inflammatorischer Proteine, darunter Il-6, die Expression dieses Gens vermindert (Dreher *et al.* 1997, Martitz *et al.* 2015, Mostert *et al.* 2001). Somit könnte die abnehmende *SEPP1*-Expression eine Folge der inflammatorischen Antwort auf die Exposition gegenüber CuO NP darstellen. Gleichzeitig konnte auch eine Bindung von Kupfer-Ionen durch Selenoprotein P, das durch *SEPP1* kodiert wird, gezeigt werden (Du *et al.* 2014). Ein Verlust der Bioverfügbarkeit von Selen durch die hohe Selenolaffinität von Kupfer und damit eine zelluläre Unterversorgung mit Selen wäre somit denkbar. Unter diesen Bedingungen konnte bereits durch eine selendefiziente Fütterung von Hühnern eine verminderte Expression von Selenoproteinen, u.a. *SEPP1* und *GPX2* festgestellt werden, wobei eine direkte Übertragbarkeit der Ergebnisse dieser Studien auf den Menschen nicht gegeben ist (Khosro *et al.* 2015, Luan *et al.* 2016).

Eine Beeinflussung zellulärer Stressmarker oder von Genen antioxidativer Proteine durch TiO<sub>2</sub> NP konnte nicht dargelegt werden. Auch auf funktioneller Ebene wurde keine ROS-Generierung durch diese NP-Spezies ersichtlich. Ebenso war keine Induktion einer inflammatorischen Antwort auf transkriptioneller Ebene zu erkennen. In der Literatur liegen jedoch diesbezüglich unterschiedliche Ergebnisse vor. So konnte einerseits unter Verwendung dreier immunkompetenter Zelllinien keine Beeinflussung der Genexpression festgestellt werden (Tuomela *et al.* 2013), während andere Zelllinien eine zelluläre Stressantwort auf transkriptioneller Ebene aufwiesen (Aydın *et al.* 2017, Okuda-Shimazaki *et al.* 2010, Park *et al.* 2008). Für die hier untersuchten A549-Zellen liegen keine Studien in der Literatur vor. Auch auf funktioneller Ebene liegt eine widersprüchliche Datenlage vor; so konnte in A549-Zellen lediglich eine leichte Induktion von oxidativem Stress gezeigt werden (Park *et al.* 2007, Singh *et al.* 2007), wohingegen Beas-2B-Zellen stärkere Effekte nach Exposition gegenüber TiO<sub>2</sub> NP aufwiesen (Bhattacharya *et al.* 2009, Park *et al.* 2008). Gleichzeitig wurde auch eine ausbleibende Induktion von oxidativem Stress festgestellt (Hanot-Roy *et al.* 2016), darunter auch unter ALI-Exposition (Loret *et al.* 2016). Eine genauere Betrachtung der Literaturstudien zeigt jedoch, dass lediglich unter dem Einsatz hoher Dosierungen eine Induktion von oxidativem Stress in A549-Zellen beobachtet wurde. Hinsichtlich einer inflammatorischen Antwort konnte sowohl auf transkriptioneller (Okuda-Shimazaki *et al.* 2010, Park *et al.* 2008) als auch auf funktioneller Ebene eine Beeinflussung durch TiO<sub>2</sub> NP festgestellt werden (Hsiao und Huang 2011, Singh *et al.* 2007). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass auf funktioneller Ebene erst nach längerer Inkubationszeit (72 h) oder höherer Dosierung (80 µg/cm<sup>2</sup>) eine IL-8 Ausschüttung beobachtet werden konnte. Gleichzeitig wurde unter submersen Bedingungen in THP-1 Zellen keine inflammatorische Reaktion auf funktioneller Ebene gezeigt, dies gilt auch für eine ALI-Exposition von A549-Zellen (Loret *et al.* 2016).

Neben der Induktion einer zellulären Stressantwort auf erhöhten oxidativen Stress ist auch eine genotoxische Wirkung von CuO NP unter submersen Bedingungen, sowohl auf transkriptioneller (Hanagata *et al.* 2011, Strauch *et al.* 2017, Wang *et al.* 2012) als auch auf funktioneller Ebene (Karlsson *et al.* 2008, Semisch *et al.* 2014, Wang *et al.* 2012) beschrieben worden. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit, die diese Effekte erstmalig nach einer ALI-Exposition darlegt. So konnte ab einer Deposition von 4,9 bzw. 9,2 µg/cm<sup>2</sup> eine dosisabhängig vermehrte *GADD45A*- respektive *DDIT3*-Expression beobachtet werden. Beide Gene deuten auf eine Schädigung der DNA hin und stellen somit genotoxische Genmarker dar (zusammengefasst in Liebermann und Hoffman 2008, Zhang *et al.* 2009). Die erhöhte Genexpression genotoxischer Marker deckt sich mit den CuO NP Dosierungen, die bereits eine zelluläre Stressantwort aufzeigten und stützen damit die These des Überschreitens einer Bindungskapazität. Zusätzlich zur DNA-Schadensantwort auf transkriptioneller Ebene wurde auch eine glockenförmige Expressi-

---

on von Genen beobachtet, die mit der DNA-Reparatur assoziiert werden (*BRCA2*, *LIG1*, *POLD1* und *RAD51*). Hierbei zeigte sich ein Expressionsmaximum unter dem Einfluss von  $4,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CuO NP, das mit steigender Partikeldeposition wieder abnahm. Während die den Genen entsprechenden Proteine Brca2 und Rad51 spezifisch an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt sind (zusammengefasst in Chapman *et al.* 2012, Hoeijmakers 2001), zeigen die Proteine Lig1 und Polymerase  $\delta$  eine Beteiligung an mehreren DNA-Reparaturwegen (zusammengefasst in Nicolas *et al.* 2016, Paul *et al.* 2013, Tomkinson und Mackey 1998). Wie bereits beschrieben wurden mit *BRCA2* und *RAD51* zwei Gene vermehrt exprimiert, deren kodierte Proteine spezifische an der DNA-Doppelstrangbruchreparatur beteiligt sind. Anhand dieser Beobachtung wäre eine Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch CuO NP möglich. Wahrscheinlicher ist jedoch eine generelle Induktion von DNA-Strangbrüchen, die durch verschiedene Stimuli induziert werden, u.a. durch ROS (Bauer *et al.* 2011; zusammengefasst in Dizdaroglu und Jaruga 2012). Eine Induktion von DNA-Strangbrüchen wurde auf funktioneller Ebene mit Hilfe der AU quantifiziert. Hierbei konnte eine klare dosisabhängig zunehmende Anzahl an DNA-Strangbrüchen durch CuO NP beobachtet werden. Eine Differenzierung zwischen Einzel- oder Doppelstrangbrüchen konnte weder mit der verwendeten Methode noch mit den in der Literatur angewandten Methoden getroffen werden (Karlsson *et al.* 2008, Semisch *et al.* 2014, Wang *et al.* 2012).

Eine Beeinflussung der DNA-Schadensantwort und -Reparatur durch TiO<sub>2</sub> NP konnte nicht beobachtet werden. Auch die Induktion von DNA-Strangbrüchen auf funktioneller Ebene mittels AU konnte nicht nachgewiesen werden. In der Literatur liegen zelllinienabhängige Ergebnisse hinsichtlich einer Beeinflussung von Genen der DNA-Schadensantwort und -Reparatur vor. Während Aydın *et al.* (2017) nach Inkubation mit  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  einen Effekt von TiO<sub>2</sub> NP auf diese Zellgruppe in Form einer gesteigerten Expression feststellte, konnten Tuomela *et al.* (2013) und Okuda-Shimazaki *et al.* (2010) keine Beeinflussung beobachten. Zusätzlich konnte auch eine abnehmende Genexpression durch den Einfluss einer hohen TiO<sub>2</sub> NP-Dosierung auf A549-Zellen unter submersen Bedingungen aufgezeigt werden (Biola-Clier *et al.* 2016). Hinsichtlich einer genotoxischen Wirkung der verwendeten TiO<sub>2</sub> NP wurde zum einen unter Verwendung hoher Dosierungen ( $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) beschrieben (Jugan *et al.* 2012, Biola-Clier *et al.* 2016). Dem gegenüber konnte jedoch keine Induktion von  $\gamma$ -H2AX Foci unter Verwendung vergleichbarer Dosierungen beobachtet werden (Barillet *et al.* 2010, Hanot-Roy *et al.* 2016). Es liegt dementsprechend wieder eine widersprüchliche Datenlage in der Literatur vor.

Eine starke Schädigung der DNA kann letztlich zum Zelltod führen, wobei hierfür hauptsächlich zwei Mechanismen unterschieden werden: Apoptose und Nekrose. Insgesamt zeigten sich drei Gene apoptotischer Faktoren durch CuO NP nach ALI-Exposition beeinflusst. Zwei dieser Gene, *BCL2* und *BCL2L1*, kodieren für antiapoptotische Gene und wurden mit steigender Dosis

vermindert exprimiert. Das Gen *PMAIP1* hingegen kodiert für das proapoptotische Protein Noxa und zeigte eine dosisabhängig gesteigerte Expression. Da alle drei Gene im intrinsischen Signalweg der Apoptose eine Rolle spielen (zusammengefasst in Elmore 2007), kann die Einleitung dieses Signalweges postuliert werden. Diese Beobachtung deckt sich mit Untersuchungen auf transkriptioneller Ebene zum Wirkmechanismus von CuO NP in unterschiedlichen Zellsystemen und unter submersen Bedingungen (Siddiqui *et al.* 2013, Strauch *et al.* 2017). Im Genset der verwendeten HT RT-qPCR Methode finden sich jedoch lediglich Gene apoptotischer Faktoren, weshalb unter Verwendung dieser Methode keine Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose getroffen werden konnte. Um dies zu ermöglichen, und zusätzlich die Apoptose auf funktioneller Ebene zu bestätigen, wurden die Zellen einer PI/AnnexinV-Färbung unterzogen und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Im Gegensatz zu den Beobachtungen auf transkriptioneller Ebene konnte keine Zunahme apoptotischer Zellen durch die Exposition gegenüber CuO NP beobachtet werden. Stattdessen wurde ab einer Deposition von  $4,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  eine dosisabhängig zunehmende Anzahl an spät-apoptotischen/nekrotischen Zellen und ab einer Dosis von  $10,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  zudem eine Zunahme nekrotischer Zellen festgestellt. Die Einleitung eines Zelltodes ab einer Dosis von ca.  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  deckt sich mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen zur Induktion einer zellulären Stressantwort und DNA-schädigenden Wirkung. Insgesamt konnte aus dieser Analyse eher die Induktion eines nekrotischen als apoptotischen Zelltodes resümiert werden. In der Literatur wurde bereits mehrfach ein apoptotischen Wirkmechanismus von CuO NP auf funktioneller Ebene beschrieben (Karlsson *et al.* 2009, Semisch *et al.* 2014, Shafagh *et al.* 2015). Zusätzlich wurde jedoch auch das Einsetzen beider Wirkmechanismen (Chusuei *et al.* 2013, Strauch *et al.* 2017) und die Einleitung des Zelltodes durch Autophagie diskutiert (Moschini *et al.* 2013, Sun *et al.* 2012). Insgesamt wurde dieser Endpunkt erstmalig nach einer ALI-Exposition gegenüber CuO NP untersucht, wobei durch die verwendeten Methoden keine klare Aussage über das Einsetzen der Apoptose oder Nekrose getroffen werden kann. Jedoch wurde bereits ein Eintritt in die Apoptose unter dem Einfluss geringen Stresses und die Einleitung der Nekrose bei einem hohen zellulären Stresslevel postuliert (zusammengefasst in Martin und Sarkar 2017). Aufgrund des bereits beschriebenen hohen ROS-Hintergrunds könnte nach Exposition gegenüber CuO NP eine erhöhte Stresssituation in der Zelle vorliegen, und daher eher ein nekrotischer Zelltod eingeleitet werden.

Während auf transkriptioneller Ebene keine Beeinflussung durch TiO<sub>2</sub> NP beobachtet werden konnte, zeigte die PI/AnnexinV-Färbung eine geringfügige, und unter Berücksichtigung der SD eine nicht relevante Zunahme an nekrotischen Zellen. In der Literatur liegen keine Studien zur apoptotischen Wirkung dieser Partikelspezies auf transkriptioneller Ebene vor. Auf funktioneller Ebene werden widersprüchliche Aussagen in der Literatur getroffen. So konnte die Einleitung eines apoptotischen Zelltodes sowohl durch geringe (Park *et al.* 2008) als auch hohe Dosierungen

---

(Park *et al.* 2007) beobachtet werden, wobei dabei nicht die gleiche Partikelspezies wie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Hanot-Roy *et al.* (2016) hingegen zeigten unter Verwendung der selben Partikelspezies keine apoptotische Wirkung unter der Verwendung von 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  auf und bestätigen damit die vorgestellten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.

Auch Gene von zellzyklusregulierenden und proliferationsassoziierten Proteinen zeigten sich in ihrer Expression durch CuO NP verändert. Dabei konnte eine dosisabhängig gesteigerte Transkriptmenge an *CDKN1A* und eine dosisabhängig verminderte Expression von *CDKN1B* festgestellt werden. Zudem zeigte sich ein zur Expression der DNA-Reparaturproteine analoges glockenförmiges Expressionsmuster für *E2F1*. Zusätzlich wurde unter dem Einfluss einer Dosis von 4,9  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  eine konstante, ungefähr verdoppelte mRNA-Menge an *JUN* beobachtet. Eine erhöhte Transkription von *CDKN1A* kann sowohl über p53-abhängige als auch -unabhängige Mechanismen erfolgen (zusammengefasst in Gartel und Tyner 1999). Da keine gesteigerte Transkription des Gens *MDM2*, das eine Aktivierung von p53 anzeigt, beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt), ist von einer p53-unabhängigen Transkription auszugehen. In Kombination mit der verminderten Expression des Zellzyklusinhibitor-kodierenden Gens *CDKN1B* kann keine Aussage hinsichtlich einer zellzyklussarretierenden Wirkung getroffen werden. Für eine proliferierende Wirkung spricht hingegen die Expression des Proteins E2F, das durch *E2F1* kodiert wird und während der Proliferation sowie in der DNA-Reparatur und -Replikation eine Rolle spielt (zusammengefasst in Biswas und Johnson 2012, Wu *et al.* 2009). Eine funktionelle Betrachtung des Zellzyklus konnte aufgrund der konfluenten ALI-Kultivierung nicht durchgeführt werden. Hier wurde bereits in Negativkontrollen ein Arrest in der G<sub>1</sub>-Phase im Vergleich zu submers kultivierten Zellen beobachtet. In der Literatur wurde bereits eine zellzyklusinhibierende Wirkung von CuO NP unter submersen Bedingungen beschrieben (Hanagata *et al.* 2011, Strauch *et al.* 2017). Des Weiteren zeigt die gesteigerte *JUN*-Expression aufgrund der positiven Autoregulierung des Transkriptionsfaktors AP-1 eine Aktivierung eben jenes Proteins an (Angel *et al.* 1988). Dies deckt sich auch mit der Expression der AP-1 Zielgene *HMOX1* und *IL8* sowie einer Interaktion mit NF- $\kappa$ B (Fujioka *et al.* 2004) und einer Aktivierung durch oxidativen Stress (zusammengefasst in Abate *et al.* 1990, Verma *et al.* 1995). Somit kann neben einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B auch von einer Aktivierung des AP-1 Signalweges durch die von Kupfer-Ionen induzierten ROS ausgegangen werden. Dies konnte in der Literatur bereits unter submersen Bedingungen dargelegt werden (Cho *et al.* 2012a, Strauch *et al.* 2017), wird aber in dieser Arbeit erstmalig nach einer ALI-Exposition festgestellt.

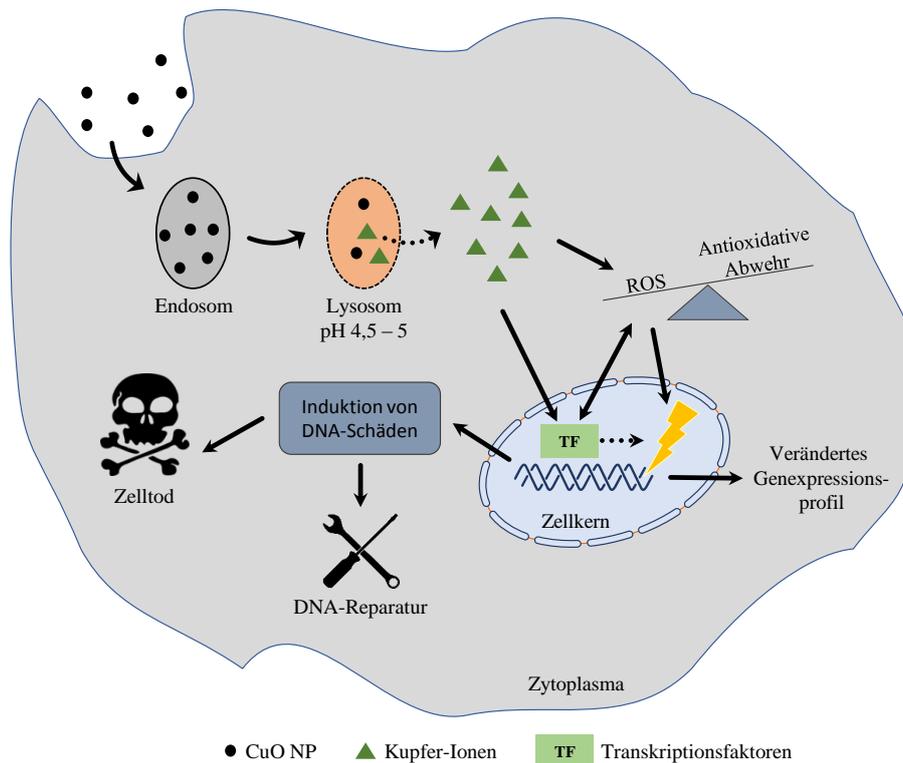
Eine Veränderung der Expression zellzyklusassoziiierter Gene durch TiO<sub>2</sub> NP wurde nicht beobachtet. Dies konnte auf transkriptioneller Ebene in Jurkat-Zellen, HMD-Makrophage und MDD-Zellen zwar unter Verwendung geringer Dosierungen bestätigt werden (Tuomela *et al.* 2013), je-

doch nicht funktioneller Ebene in Beas-2B-Zellen nach Inkubation mit 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Prasad *et al.* 2013) und scheint abermals zelllinien- sowie dosisabhängig zu sein.

Auch in Genen, die mit dem Fremdstoffmetabolismus assoziiert sind, konnte ein Einfluss durch CuO NP in Form einer dosisabhängig verminderten Expression von *ALDH1A1*, *EPHX1* und *NQO1* durch CuO NP festgestellt werden. Diese Beobachtungen können aufgrund fehlender Studien jedoch nicht durch Literaturdaten gestützt werden. Allerdings ist für all diese Gene ein negativer Einfluss des Inflammationsmarkers TNF- $\alpha$  auf deren Expression bekannt (zusammengefasst in Gharavi und El-Kadi 2005, Ito *et al.* 2014, Šmerdová *et al.* 2013). Wie bereits erwähnt, wurde in Studien eine inflammatorische Antwort auf CuO NP beschrieben, die mit der verminderten Expression von *ALDH1A1*, *EPHX1* und *NQO1* in Verbindung gebracht werden könnten.

Letzlich zeigten  $\text{TiO}_2$  NP auch keinen Einfluss auf die Expression von Genen, die mit dem Fremdstoffmetabolismus assoziiert werden. Dies bezüglich liegen auch keine Studien vor.

Zusammengefasst konnte die intrazelluläre Aufnahme von  $\text{TiO}_2$  NP dargelegt werden, wobei diese Partikelspezies unter den hier verwendeten Dosierungen und Inkubationszeiten keine Beeinflussung der untersuchten zellulären Prozesse aufzeigte. Zudem konnte die Internalisierung und Auflösung der CuO NP zu Kupfer-Ionen auf transkriptioneller und funktioneller Ebene festgestellt werden. Diese Beobachtung folgt dem bereits vielfach publizierten Aufnahmeweges des *trojan horse type* Mechanismus. Hierbei erfolgt die endozytotische Aufnahme von NP in Endosomen, die sich schließlich zu Lysosomen prozessiert werden und aufgrund des dort vorherrschenden sauren pH-Wertes zur Auflösung der CuO NP zu Kupfer-Ionen führen. Dadurch wird die zelluläre Kupferhomöostase umgangen, wodurch eine Überladung der Zelle mit Kupfer-Ionen resultiert. Zwar erfolgt eine Bindung dieser Ionen durch Metallothioneine, jedoch wird diese ab einer bestimmten Exposition überschritten; im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte dies bei ca. 5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  beobachtet werden. Ab einer Exposition gegenüber dieser Dosis konnte zudem eine zelluläre Antwort festgestellt werden. Diese umfasste eine oxidative Stressreaktion auf mRNA-Ebene, die mit Redoxaktivität von Kupfer-Ionen begründet werden kann. Die Induktion von oxidativem Stress wurde zudem durchflusszytometrisch erfasst. Dieses Ungleichgewicht des zellulären Redoxstatus konnte durch die Aktivierung der redoxsensitiven Transkriptionsmarker AP-1 und NF- $\kappa\text{B}$  auf transkriptioneller Ebene bestätigt werden. NF- $\kappa\text{B}$  ist zudem für das Einleiten einer inflammatorischen Antwort bekannt, die in Form einer gesteigerten *IL8*-Expression festgestellt wurde. Zusätzlich konnte auch die genotoxische Wirkung von CuO NP auf transkriptioneller und funktioneller Ebene gezeigt werden. Hierbei wird eine Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch einen erhöhten Gehalt an ROS postuliert. Die induzierten DNA-Schäden können einerseits durch DNA-Reparaturmechanismen repariert werden oder auch zur Induktion eines Zelltodes führen (zusammengefasst in Abb. 6.1). Die hier vorgestellte zelluläre Prozessabfolge nach ALI-



**Abbildung 6.1: Grafische Zusammenfassung der erhaltenen Ergebnisse zum Wirkmechanismus von CuO NP nach ALI-Exposition.** CuO NP umgehen die zelluläre Kupferhomöostase durch eine Aufnahme über endozytotische Prozesse in die Zelle. Dort werden sie durch eine endolysosomale Weiterverarbeitung schließlich im sauren Milieu des Lysosoms zu Kupfer-Ionen aufgelöst. Diese können einerseits Transkriptionsfaktoren aktivieren oder zur Induktion reaktiver Sauerstoffspezies führen. Das erhöhte intrazelluläre oxidative Stresslevel resultiert in der Aktivierung redoxsensitiver Transkriptionsfaktoren sowie in DNA-Schäden, die entweder repariert werden oder zum Zelltod führen können.

Exposition deckt sich zum größten Teil mit dem in der Literatur für submerse Expositionen beschriebenen Wirkmechanismus. Aufgrund dessen ergibt sich die Schlussfolgerung, dass eine ALI-Exposition dieselbe zelluläre Reaktion auf NP hervorruft wie eine submerse Behandlung. Jedoch bietet eine ALI-Exposition den Vorteil einer direkten Aussage der deponierten Dosis und gibt somit eine eindeutige Auskunft über Dosis-Wirkungsbeziehungen. Zudem wurde der Wirkmechanismus von CuO NP nach einer ALI-Exposition bisher nicht in dem Umfang der vorliegenden Arbeit untersucht.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit befasste sich mit der Exposition verschiedener Zellkultursysteme gegenüber Verbrennungsaerosolen aus der thermischen Wiederverwertung von Nanokompositen. Dies stellte einen Teil des Drittmittelprojekts «ProCycle» dar, in dem Recyclingprodukte aus Nanokompositen toxikologisch beurteilt wurden. Für die hier vorgestellten Experi-

mente wurden Modellkomposite mit PE als Kunststoffmatrix sowie TiO<sub>2</sub> NP, CuO NP und CNT als Füllmaterialien in 10 %igen Massenanteilen von Seiten eines Projektpartners hergestellt und anschließend in Kooperation mit dem KIT-ITC verbrannt. Zusätzlich zu den Nanokompositen wurden auch dessen Bestandteile einzeln thermisch aufgearbeitet, um eine Aussage über die Ursache der möglichen toxischen Wirkung treffen zu können. Das Verbrennungsaerosol wurde zur Abkühlung 1:10 mit Reinluft verdünnt und anschließend durch den Projektpartner des KIT-ITC hinsichtlich der partikulären Fraktion charakterisiert. Das Verbrennungsaerosol wurde schließlich in der Vitrocell® *Automated Exposure Station* auf die verwendeten Zellkultursysteme, A549-Zellen sowie ein 3D-Lungzellmodell (MucilAir - Epithelix), geleitet. Hierbei konnten insgesamt drei Expositionsmodule à drei Expositions-kavitäten bestückt werden. In einem Modul wurden Zellen stets Reinluft ausgesetzt, diese stellten die sog. Reinluftkontrollen (CAC) dar. Zusätzlich wurden zwei Module mit je einer Exposition gegenüber dem nativen Verbrennungsaerosol (-HS), einer Exposition gegenüber dem nativen Verbrennungsaerosol unter einer erhöhten Deposition der partikulären Aerosolfraktion durch das Anlegen einer Hochspannung (+HS) und einer Exposition gegenüber einem gefilterten Verbrennungsaerosol und somit lediglich der gasförmigen Aerosolfraktion beprobt. Im Rahmen dieses Projekt wurde von Seiten des KIT-IAB die Beeinflussung der Genexpression sowie die Induktion von DNA-Strangbrüchen in beiden Zellkultursystemen untersucht.

Dabei konnte nur eine geringfügige Beeinflussung durch Verbrennungsaerosole auf das Genexpressionsprofil von A549-Zellen festgestellt werden. Lediglich die Gene *HMOX1*, *HSPA1A* und *GADD45A* zeigten eine relevante Veränderung. Hierbei wurde keine Beeinflussung der Gene durch die Verbrennungsaerosole der reinen Nanomaterialien festgestellt, während die Verbrennungsaerosole PE-haltiger Materialien eine vermehrte Expression der drei Gene hervorriefen. In keiner der Analysen konnte dabei ein relevanter Unterschied zwischen der Exposition gegenüber dem nativen Verbrennungsaerosol, einem Verbrennungsaerosol unter erhöhter Partikeldeposition oder der gasförmigen Fraktion des Aerosols ausgemacht werden. Somit kann in diesem Fall von einer toxischen Wirkung der verbrennungsgenerierten Gasphase, und nicht der partikulären Aerosolfraktion, ausgegangen werden. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass sehr niedrige Partikeldepositionen errechnet wurden. Auch die Induktion von DNA-Strangbrüchen zeigte lediglich unter der Beeinflussung von Verbrennungsaerosolen PE-haltiger Materialien ein ausgeprägtes Ergebnis. Im Unterschied zu den Genexpressionsanalysen konnte jedoch für die Verbrennung von PE und des Nanokomposits aus PE + TiO<sub>2</sub> NP im Vergleich zur Exposition gegenüber dem nativen Verbrennungsaerosols eine erhöhte Anzahl an DNA-Strangbrüchen unter dem Einfluss des Verbrennungsaerosols mit erhöhter Partikeldeposition beobachtet werden. Dies kann mit der Applikation einer um Faktor zwei erhöhten Dosis bei der Verbrennung dieser Materialien im Vergleich

---

zu den anderen Nanokompositverbrennungen, und damit einem eventuellen Überschreiten einer nicht genotoxischen Dosis, begründet werden. Abgesehen von diesen Ausnahmen wurde jedoch wieder kein Unterschied zwischen den unterschiedlichen Expositionen ausgemacht, wodurch die postulierte These einer toxischen Wirkung durch die Gasfraktion erhärtet wird. In der Literatur konnten keine Studien gefunden werden, die einen ähnlichen Versuchsaufbau aufwiesen. Zwar konnte bereits die zytotoxische Wirkung von Produkten der PE-Verbrennung belegt werden (Lestari *et al.* 2011), jedoch sind keine weiteren Studien mit einem direkt vergleichbaren Verbrennungsaerosol bekannt. Die Datenlage hinsichtlich anderer Verbrennungsaerosole, wie beispielsweise Zigarettenrauch, ist jedoch weitaus besser. So konnte bereits eine genotoxische Wirkung sowie erhöhte *HMOX1*-Expression nach Exposition gegenüber der Gasphase von genormten Zigarettenrauch beobachtet werden (Fukano *et al.* 2006, Okuwa *et al.* 2010). Eine direkte Vergleichbarkeit der Verbrennungsaerosole ist jedoch aufgrund unterschiedlich zusammengesetzter Gasphase nicht gegeben.

Auf Basis der vorgestellten Ergebnisse und dem Ausbleiben einer ausgeprägten toxischen Wirkung durch ein bestimmtes Nanokomposit wurde für die Experimente unter Verwendung des 3D-Lungenzellkulturmodells mit dem Nanokomposit PE + TiO<sub>2</sub> NP nur das wirtschaftlich relevante Nanokomposit sowie dessen Bestandteile verbrannt. Zusätzlich entfiel die Exposition gegenüber dem nativen Verbrennungsaerosol, somit wurde nur gegenüber dem Verbrennungsaerosol unter erhöhter Partikeldeposition und der reinen Gasfraktion des Aerosols exponiert. Im Vergleich zu den vorangegangenen Experimenten konnte hinsichtlich der Exposition gegenüber dem PE und PE + TiO<sub>2</sub> NP Verbrennungsaerosol eine vergleichbare Dosis appliziert werden. Die Dosis für die Exposition gegenüber dem Aerosol aus der TiO<sub>2</sub> NP Verbrennung zeigte sich stark erhöht. Insgesamt war eine noch schwächere Beeinflussung des Genexpressionsprofils des 3D-Modells im Vergleich zu den A549-Zellen zu beobachten, lediglich das Gen *IL8* wurde in seiner Expression beeinflusst. Dabei wurde nur nach Exposition gegenüber Verbrennungsaerosolen der PE-haltigen Materialien eine relevante Expressionsänderung festgestellt. Zudem konnte analog zu den bisherigen Ergebnissen keine Unterscheidung zwischen der Exposition gegenüber dem gesamten Aerosol und der Gasfraktion beobachtet werden, dies zeigte sich auch in der Untersuchung zur Induktion von DNA-Strangbrüchen. Die schwächer ausgeprägte Reaktion des 3D-Lungenzellkulturmodells im Vergleich zu A549-Zellen wurde bereits beschrieben (Kooter *et al.* 2016) und ist mit der intakten mukoziliären *Clearance* im 3D-Lungenzellkulturmodell zu erklären (Kuper *et al.* 2015). Wie bereits in der Diskussion zu den Ergebnissen in Bezug auf die Exposition von A549-Zellen erwähnt, liegt keine Literatur mit einem direkt vergleichbaren Verbrennungsaerosol vor. Jedoch wurde bereits eine IL-8-Sekretion und eine Beeinflussung des Genexpressionsprofils nach Exposition gegenüber Zigarettenrauch beschrieben (Banerjee *et al.* 2017, Haswell *et al.* 2017, Ishikawa

*et al.* 2018). Zusätzlich wurde auch ein Effekt auf die Genexpression des Zellkulturmodells nach Exposition gegenüber Autoabgasen beobachtet (Bisig *et al.* 2018). Die direkte Vergleichbarkeit dieser Studien zum hier exponierten Verbrennungsaerosol ist jedoch fraglich.

Um die Ursache der toxischen Wirkung der Gasfraktion des Aerosols näher zu untersuchen, wurde durch einen Projektpartner eine VOC-Analyse in Auftrag gegeben. Dabei konnte vor allem ein hoher Anteil an schwerflüchtigen Kohlenwasserstoffen ( $> C_{16}$ ) ausgemacht werden. Eine qualitative Analyse des Verbrennungsgases ergab vier mögliche Verbindungen, die mind. 1 % der gesamtanalysierten Peakflächen ausmachten. Dabei konnten jedoch nur zwei Verbindungen eindeutig identifiziert werden (2,5-Diphenyl-4-benzochinon, Benzaldehyd), während für zwei Verbindungen je zwei mögliche Substanzen in Frage kommen. Eine Analyse mit Hilfe der Datenbank «Toxnet» ergab eine Vielzahl an toxischen Wirkungen aller sechs möglichen Substanzen, wobei für zwei Verbindungen noch keine toxikologischen Daten in der Literatur vorliegen. Nur für eine Substanz (Benzaldehyd) ist eine genotoxische Wirkung belegt. Da keine Substanz ausgemacht wurde, die die beschriebenen Effekte eindeutig hervorrufen könnte, kann keine klare Aussage über die exakte Ursache der toxischen Wirkung getroffen werden. Einen weiteren Wirkmechanismus könnte die Bindung von PAKs an verbrennungsinduzierten Partikel, wie es bei Partikeln der Holzverbrennung bereits festgestellt wurde, darstellen (Gauggel-Lewandowski *et al.* 2013). Dies würde auch die Beobachtung einer gesteigerten Anzahl an DNA-Strangbrüchen bei erhöhter Partikeldosis erklären. Hierzu sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Zusammenfassend wurde in der vorgelegten Arbeit gezeigt, dass ALI-Expositionssysteme ein wertvolles Werkzeug darstellen, um den toxischen Einfluss von NM-haltigen Aerosolen zu untersuchen. Dies schließt sowohl Aerosole reiner NM als auch aus Verbundmaterialien freigesetzte NM ein. So konnte durch die Verwendung eines handlichen ALI-Expositionssystems, der Vitrocell® *Cloud*, in Kombination mit einer innovativen Methode zur Erstellung von Genexpressionsanalysen der Wirkmechanismus von CuO und TiO<sub>2</sub> NP dosisabhängig dargelegt werden. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde der Einfluss verschiedener Verbrennungsaerosole aus der thermischen Verwertung von Nanokompositen mit Hilfe eines zukunftsweisenden ALI-Expositionssystems, der Vitrocell® *Automated Exposure Station*, untersucht. Dieses System stellt dabei ein technisch anspruchsvolleres ALI-Expositionssystem dar, das neben der Untersuchung einer partikulären Fraktion auch die Untersuchung einer Gasphase sowie eines kompletten Aerosols ermöglicht. Im Zuge dieser Untersuchungen wurde die gasförmige Fraktion der Verbrennungsaerosole PE-haltiger Materialien als Ursache für die beobachteten Veränderung des Genexpressionsprofils sowie der entstandenen DNA-Schäden ausgemacht. Anhand eines zuvor mit der Vitrocell *Cloud* ermittelten NOAEL konnten zudem die ausbleibenden adversen Effekte der partikulären Aerosolfraktion auf eine geringe und damit nicht toxische Dosis, zurückgeführt werden.

# 7 Literaturverzeichnis

- Abate, C., Patel, L., Rauscher, F. J., und Curran, T. 1990. Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. *Science*, 249(4973):1157–1161.
- Abbas, T. und Dutta, A. 2009. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature Reviews Cancer*, 9(6):400.
- Ahamed, M., Akhtar, M. J., Alhadlaq, H. A., und Alrokayan, S. A. 2015. Assessment of the lung toxicity of copper oxide nanoparticles: current status. *Nanomedicine*, 10(15):2365–2377.
- Ahamed, M., Siddiqui, M. A., Akhtar, M. J., Ahmad, I., Pant, A. B., und Alhadlaq, H. A. 2010. Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in human lung epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(2):578–583.
- Alam, J. und Cook, J. L. 2007. How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene? *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 36(2):166–174.
- Angel, P., Hattori, K., Smeal, T., und Karin, M. 1988. The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell*, 55(5):875–885.
- Aufderheide, M. 2008. An efficient approach to study the toxicological effects of complex mixtures. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 60(2-3):163–80.
- Aufderheide, M., Halter, B., Mohle, N., und Hochrainer, D. 2013. The CULTEX RFS: a comprehensive technical approach for the in vitro exposure of airway epithelial cells to the particulate matter at the air-liquid interface. *Biomed Research International*, 2013:734137.
- Aydın, E., Türkez, H., Hacımüftüoğlu, F., Tatar, A., und Geyikoğlu, F. 2017. Molecular genetic and biochemical responses in human airway epithelial cell cultures exposed to titanium nanoparticles in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 105(7):2056–2064.
- Baird, W. M., Hooven, L. A., und Mahadevan, B. 2005. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 45(2-3):106–114.
- Banerjee, A., Haswell, L. E., Baxter, A., Parmar, A., Azzopardi, D., Corke, S., Thorne, D., Adamson, J., Mus-honganono, J., Gaca, M. D., et al. 2017. Differential Gene Expression Using RNA Sequencing Profiling in a Reconstituted Airway Epithelium Exposed to Conventional Cigarette Smoke or Electronic Cigarette Aerosols. *Applied In Vitro Toxicology*, 3(1):84–98.

- Barillet, S., Simon-Deckers, A., Herlin-Boime, N., Mayne-L'Hermite, M., Reynaud, C., Cassio, D., Gouget, B., und Carrière, M. 2010. Toxicological consequences of TiO<sub>2</sub>, SiC nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes exposure in several mammalian cell types: an in vitro study. *Journal of Nanoparticle Research*, 12(1):61–73.
- Bauer, M., Goldstein, M., Christmann, M., Becker, H., Heylmann, D., und Kaina, B. 2011. Human monocytes are severely impaired in base and DNA double-strand break repair that renders them vulnerable to oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(52):21105–21110.
- Bhattacharya, K., Davoren, M., Boertz, J., Schins, R. P., Hoffmann, E., und Dopp, E. 2009. Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. *Particle and Fibre Toxicology*, 6:17.
- Biola-Clier, M., Beal, D., Caillat, S., Libert, S., Armand, L., Herlin-Boime, N., Sauvaigo, S., Douki, T., und Carrière, M. 2016. Comparison of the DNA damage response in BEAS-2B and A549 cells exposed to titanium dioxide nanoparticles. *Mutagenesis*, 32(1):161–172.
- Bisig, C., Comte, P., Güdel, M., Czerwinski, J., Mayer, A., Müller, L., Petri-Fink, A., und Rothen-Rutishauser, B. 2018. Assessment of lung cell toxicity of various gasoline engine exhausts using a versatile in vitro exposure system. *Environmental Pollution*, 235:263–271.
- Biswas, A. K. und Johnson, D. G. 2012. Transcriptional and nontranscriptional functions of E2F1 in response to DNA damage. *Cancer Research*, 72(1):13–17.
- Blindauer, C. A. 2014. *Binding, transport and storage of metal ions in biological cells*, volume 2, chapter Metallothioneins. Royal Society of Chemistry.
- Bouillard, J., R'Mili, B., Moranviller, D., Vignes, A., Le Bihan, O., Ustache, A., Bomfim, J. S., Frejafon, E., und Fleury, D. 2013. Nanosafety by design: risks from nanocomposite/nanowaste combustion. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(4):1–11.
- Brandenberger, C., Muhlfield, C., Ali, Z., Lenz, A. G., Schmid, O., Parak, W. J., Gehr, P., und Rothen-Rutishauser, B. 2010. Quantitative evaluation of cellular uptake and trafficking of plain and polyethylene glycol-coated gold nanoparticles. *Small*, 6(15):1669–78.
- Buzea, C., Pacheco, I. I., und Robbie, K. 2007. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Bioin-terphases*, 2(4):MR17–MR71.
- Chang, Y.-N., Zhang, M., Xia, L., Zhang, J., und Xing, G. 2012. The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nanoparticles. *Materials*, 5(12):2850.
- Chapman, J. R., Taylor, M. R. G., und Boulton, S. J. 2012. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Molecular Cell*, 47(4):497–510.

- Chithrani, B. D. und Chan, W. C. 2007. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Letters*, 7(6):1542–1550.
- Chithrani, B. D., Ghazani, A. A., und Chan, W. C. 2006. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Letters*, 6(4):662–668.
- Chivas-Joly, C., Motzkus, C., Guillaume, E., Ducourtieux, S., Saragoza, L., Lesenechal, D., Lopez-Cuesta, J.-M., Longuet, C., Sonnier, R., und Minisini, B. 2014. Influence of carbon nanotubes on fire behaviour and aerosol emitted during combustion of thermoplastics. *Fire and Materials*, 38(1):46–62.
- Cho, W.-S., Duffin, R., Poland, C. A., Duschl, A., Oostingh, G. J., MacNee, W., Bradley, M., Megson, I. L., und Donaldson, K. 2012a. 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(1):22–35.
- Cho, W.-S., Duffin, R., Thielbeer, F., Bradley, M., Megson, I. L., MacNee, W., Poland, C. A., Tran, C. L., und Donaldson, K. 2012b. Zeta potential and solubility to toxic ions as mechanisms of lung inflammation caused by metal/metal oxide nanoparticles. *Toxicological Sciences*, 126(2):469–477.
- Choi, C., Choi, M. K., Hyeon, T., und Kim, D.-H. 2016. Nanomaterial-based soft electronics for healthcare applications. *ChemNanoMat*, 2(11):1006–1017.
- Chusuei, C. C., Wu, C.-H., Mallavarapu, S., Hou, F. Y. S., Hsu, C.-M., Winiarz, J. G., Aronstam, R. S., und Huang, Y.-W. 2013. Cytotoxicity in the age of nano: the role of fourth period transition metal oxide nanoparticle physicochemical properties. *Chemico-Biological Interactions*, 206(2):319–26.
- Civardi, C., Schubert, M., Fey, A., Wick, P., und Schwarze, F. W. 2015. Micronized copper wood preservatives: efficacy of ion, nano, and bulk copper against the brown rot fungus *Rhodonia placenta*. *PLoS One*, 10(11):e0142578.
- Cory, S. und Adams, J. M. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer*, 2(9):647.
- Cronholm, P., Karlsson, H. L., Hedberg, J., Lowe, T. A., Winnberg, L., Elihn, K., Wallinder, I. O., und Moller, L. 2013. Intracellular uptake and toxicity of Ag and CuO nanoparticles: a comparison between nanoparticles and their corresponding metal ions. *Small*, 9(7):970–82.
- Cuillel, M., Chevallet, M., Charbonnier, P., Fauquant, C., Pignot-Paintrand, I., Arnaud, J., Cassio, D., Michaud-Soret, I., und Mintz, E. 2014. Interference of CuO nanoparticles with metal homeostasis in hepatocytes under sub-toxic conditions. *Nanoscale*, 6(3):1707–15.

- Dankers, A. C., Kuper, C. F., Boumeester, A. J., Fabriek, B. O., Kooter, I. M., Gröllers-Mulderij, M., Tromp, P., Nelissen, I., Vandebriel, R. J., *et al.* 2018. A practical approach to assess inhalation toxicity of metal oxide nanoparticles in vitro. *Journal of Applied Toxicology*, 38(2):160–171.
- Das, K. C., Lewis-Molock, Y., und White, C. W. 1995. Activation of NF-kappa B and elevation of MnSOD gene expression by thiol reducing agents in lung adenocarcinoma (A549) cells. *The American Journal of Physiology*, 269(5 Pt 1):L588–602.
- De Bruijne, K., Ebersviller, S., Sexton, K. G., Lake, S., Leith, D., Goodman, R., Jetters, J., Walters, G., Doyle-Eisele, M., Woodside, R., *et al.* 2009. Design and testing of electrostatic aerosol in vitro exposure system (EAVES): an alternative exposure system for particles. *Inhalation Toxicology*, 21(2):91–101.
- De Matteis, V., Cascione, M., Brunetti, V., Toma, C. C., und Rinaldi, R. 2016. Toxicity assessment of anatase and rutile titanium dioxide nanoparticles: The role of degradation in different pH conditions and light exposure. *Toxicology in Vitro*, 37:201–210.
- de Toda, I. M. und De la Fuente, M. 2015. The role of Hsp70 in oxi-inflamm-aging and its use as a potential biomarker of lifespan. *Biogerontology*, 16(6):709–721.
- Dhand, R. 2004. New frontiers in aerosol delivery during mechanical ventilation. *Respiratory Care*, 49(6):667.
- Ding, Y., Kuhlbusch, T. A., Van Tongeren, M., Jiménez, A. S., Tuinman, I., Chen, R., Alvarez, I. n. L., Miko-lajczyk, U., Nickel, C., Meyer, J., *et al.* 2017. Airborne engineered nanomaterials in the workplace? A review of release and worker exposure during nanomaterial production and handling processes. *Journal of Hazardous Materials*, 322:17–28.
- Dizdaroglu, M. und Jaruga, P. 2012. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Research*, 46(4):382–419.
- Docter, D., Strieth, S., Westmeier, D., Hayden, O., Gao, M., Knauer, S. K., und Stauber, R. H. 2015. No king without a crown—impact of the nanomaterial-protein corona on nanobiomedicine. *Nanomedicine*, 10(3):503–519.
- Drasler, B., Sayre, P., Steinhäuser, K. G., Petri-Fink, A., und Rothen-Rutishauser, B. 2017. In vitro approaches to assess the hazard of nanomaterials. *NanoImpact*, 8:99–116.
- Dreher, I., Jakobs, T. C., und Köhrle, J. 1997. Cloning and Characterization of the Human Selenoprotein P Promoter – Response of Selenoprotein P Expression to Cytokines in Liver Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 272(46):29364–29371.
- Du, X., Wang, Z., Zheng, Y., Li, H., Ni, J., und Liu, Q. 2014. Inhibitory effect of selenoprotein P on Cu<sup>+</sup>/Cu<sup>2+</sup>-induced A $\beta$ 42 aggregation and toxicity. *Inorganic Chemistry*, 53(3):1672–1678.

- Dutto, I., Tillhon, M., Cazzalini, O., Stivala, L. A., und Prosperi, E. 2015. Biology of the cell cycle inhibitor p21 CDKN1A: molecular mechanisms and relevance in chemical toxicology. *Archives of Toxicology*, 89(2):155–178.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4):495–516.
- Fadeel, B. und Garcia-Bennett, A. E. 2010. Better safe than sorry: understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(3):362–374.
- Fahmy, B. und Cormier, S. A. 2009. Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells. *Toxicology In Vitro*, 23(7):1365–1371.
- Fischer, B. M. 2016. *Einfluss von Cadmium und Kupferoxid-Nanopartikeln auf die genomische Stabilität: Identifizierung der Wirkmechanismen auf Basis von Genexpressionsprofilen mittels High-Throughput RT-qPCR*. Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie.
- Fischer, B. M., Neumann, D., Piberger, A. L., Risnes, S. F., Köberle, B., und Hartwig, A. 2016. Use of high-throughput RT-qPCR to assess modulations of gene expression profiles related to genomic stability and interactions by cadmium. *Archives of Toxicology*, 90(11):2745–2761.
- Flannagan, R. S., Jaumouillé, V., und Grinstein, S. 2012. The cell biology of phagocytosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 7:61–98.
- Frijns, E., Verstraelen, S., Stoehr, L. C., van Laer, J., Jacobs, A., Peters, J., Tirez, K., Boyles, M., Geppert, M., Madl, P., *et al.* 2017. A novel exposure system termed NAVETTA for in vitro laminar flow electrodeposition of nanoaerosol and evaluation of immune effects in human lung reporter cells. *Environmental Science & Technology*.
- Froggett, S. J., Clancy, S. F., Boverhof, D. R., und Canady, R. A. 2014. A review and perspective of existing research on the release of nanomaterials from solid nanocomposites. *Particle and Fibre Toxicology*, 11(1):17.
- Fröhlich, E., Bonstingl, G., Höfler, A., Meindl, C., Leitinger, G., Pieber, T. R., und Roblegg, E. 2013. Comparison of two in vitro systems to assess cellular effects of nanoparticles-containing aerosols. *Toxicology in Vitro*, 27(1):409–417.
- Fröhlich, E. und Salar-Behzadi, S. 2014. Toxicological assessment of inhaled nanoparticles: role of in vivo, ex vivo, in vitro, and in silico studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(3):4795–822.
- Fujioka, S., Niu, J., Schmidt, C., Sclabas, G. M., Peng, B., Uwagawa, T., Li, Z., Evans, D. B., Abbruzzese, J. L., und Chiao, P. J. 2004. NF- $\kappa$ B and AP-1 connection: mechanism of NF- $\kappa$ B-dependent regulation of AP-1 activity. *Molecular and Cellular Biology*, 24(17):7806–7819.

- Fukano, Y., Yoshimura, H., und Yoshida, T. 2006. Heme oxygenase-1 gene expression in human alveolar epithelial cells (A549) following exposure to whole cigarette smoke on a direct in vitro exposure system. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 57(5-6):411–418.
- Gartel, A. L. und Tyner, A. L. 1999. Transcriptional regulation of the p21 (WAF1/CIP1) gene. *Experimental Cell Research*, 246(2):280–289.
- Gauggel-Lewandowski, S., Heussner, A. H., Steinberg, P., Pieterse, B., van der Burg, B., und Dietrich, D. R. 2013. Bioavailability and potential carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons from wood combustion particulate matter in vitro. *Chemico-Biological Interactions*, 206(2):411–422.
- Gey, M. H. 2015. *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethoden, Strukturanalytik, Applikationen*. Springer-Verlag.
- Gharavi, N. und El-Kadi, A. O. 2005. Down-regulation of aryl hydrocarbon receptor–regulated genes by tumor necrosis factor- $\alpha$  and lipopolysaccharide in murine hepatoma hepa 1c1c7 cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94(3):493–506.
- Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H., und 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(5):1417–23.
- Gliga, A. R., Skoglund, S., Wallinder, I. O., Fadeel, B., und Karlsson, H. L. 2014. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Particle and Fibre Toxicology*, 11(1):11.
- Gorbet, M. B. und Sefton, M. V. 2005. Endotoxin: the uninvited guest. *Biomaterials*, 26(34):6811–6817.
- Guggenheim, E. J., Milani, S., Röttgermann, P. J., Dusinska, M., Saout, C., Salvati, A., Rädler, J. O., und Lynch, I. 2018. Refining in vitro models for nanomaterial exposure to cells and tissues. *NanoImpact*.
- Günther, V., Lindert, U., und Schaffner, W. 2012. The taste of heavy metals: gene regulation by MTF-1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1823(9):1416–1425.
- Guo, Y., Wu, K., Huo, X., und Xu, X. 2011. Sources, Distribution, and Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Journal of Environmental Health*, 73(9):22–25.
- Gupta, S. C., Sharma, A., Mishra, M., Mishra, R. K., und Chowdhuri, D. K. 2010. Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? *Life Sciences*, 86(11-12):377–84.
- Han, X., Gelein, R., Corson, N., Wade-Mercer, P., Jiang, J., Biswas, P., Finkelstein, J. N., Elder, A., und Oberdöster, G. 2011. Validation of an LDH assay for assessing nanoparticle toxicity. *Toxicology*, 287:99–104.

- Hanagata, N., Zhuang, F., Connolly, S., Li, J., Ogawa, N., und Xu, M. 2011. Molecular responses of human lung epithelial cells to the toxicity of copper oxide nanoparticles inferred from whole genome expression analysis. *ACS Nano*, 5(12):9326–38.
- Hanot-Roy, M., Tubeuf, E., Guilbert, A., Bado-Nilles, A., Vigneron, P., Trouiller, B., Braun, A., und Lacroix, G. 2016. Oxidative stress pathways involved in cytotoxicity and genotoxicity of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles on cells constitutive of alveolo-capillary barrier in vitro. *Toxicology in Vitro*, 33:125–135.
- Hansen, S. F., Heggelund, L. R., Besora, P. R., Mackevica, A., Boldrin, A., und Baun, A. 2016. Nanoproducts—what is actually available to European consumers? *Environmental Science: Nano*, 3(1):169–180.
- Hartl, F. U. und Hayer-Hartl, M. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 295(5561):1852–1858.
- Hartwig, A., Dally, H., und Schlepegrell, R. 1996. Sensitive analysis of oxidative DNA damage in mammalian cells: use of the bacterial Fpg protein in combination with alkaline unwinding. *Toxicology Letters*, 88(1-3):85–90.
- Hartwig, A., Klyszcz-Nasko, H., Schlepegrell, R., und 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(1):107–112.
- Hasanzadeh, K. M., J Harding, F., und H Voelcker, N. 2015. Insights into cellular uptake of nanoparticles. *Current Drug Delivery*, 12(1):63–77.
- Haswell, L. E., Baxter, A., Banerjee, A., Verrastro, I., Mushonganono, J., Adamson, J., Thorne, D., Gaça, M., und Minet, E. 2017. Reduced biological effect of e-cigarette aerosol compared to cigarette smoke evaluated in vitro using normalized nicotine dose and RNA-seq-based toxicogenomics. *Scientific Reports*, 7(1):888.
- Heiden, T. C. K., Dengler, E., Kao, W. J., Heideman, W., und Peterson, R. E. 2007. Developmental toxicity of low generation PAMAM dendrimers in zebrafish. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 225(1):70–79.
- Heng, B. C., Zhao, X., Xiong, S., Ng, K. W., Boey, F. Y.-C., und Loo, J. S.-C. 2011. Cytotoxicity of zinc oxide (ZnO) nanoparticles is influenced by cell density and culture format. *Archives of Toxicology*, 85(6):695–704.
- Herzog, F., Clift, M. J. D., Piccapietra, F., Behra, R., Schmid, O., Petri-Fink, A., und Rothen-Rutishauser, B. 2013. Exposure of silver-nanoparticles and silver-ions to lung cells in vitro at the air-liquid interface. *Particle and Fibre Toxicology*, 10(1).
- Herzog, F., Loza, K., Balog, S., Clift, M. J., Epple, M., Gehr, P., Petri-Fink, A., und Rothen-Rutishauser, B. 2014. Mimicking exposures to acute and lifetime concentrations of inhaled silver nanoparticles by two different in vitro approaches. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 5:1357–70.

- Heuchel, R., Radtke, F., Georgiev, O., Stark, G., Aguet, M., und Schaffner, W. 1994. The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression. *The EMBO journal*, 13(12):2870–2875.
- Hiemstra, P. S., Grootaers, G., van der Does, A. M., Krul, C. A., und Kooter, I. M. 2017. Human lung epithelial cell cultures for analysis of inhaled toxicants: Lessons learned and future directions. *Toxicology in Vitro*.
- Hinderliter, P. M., Minard, K. R., Orr, G., Chrisler, W. B., Thrall, B. D., Pounds, J. G., und 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):36.
- Hoeijmakers, J. H. 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411(6835):366.
- Holder, A. L., Goth-Goldstein, R., Lucas, D., und Koshland, C. P. 2012. Particle-induced artifacts in the MTT and LDH viability assays. *Chemical Research in Toxicology*, 25(9):1885–1892.
- Holder, A. L. und Marr, L. C. 2013. Toxicity of silver nanoparticles at the air-liquid interface. *BioMed Research International*, 2013:11.
- Hsiao, I.-L. und Huang, Y.-J. 2011. Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles toward human lung epithelial cells. *Science of the Total Environment*, 409(7):1219–1228.
- Hussain, S. M., Warheit, D. B., Ng, S. P., Comfort, K. K., Grabinski, C. M., und Braydich-Stolle, L. K. 2015. At the Crossroads of Nanotoxicology in vitro: Past Achievements and Current Challenges. *Toxicological Sciences*, 147(1):5–16.
- Iavicoli, I., Leso, V., und Bergamaschi, A. 2012. Toxicological effects of titanium dioxide nanoparticles: a review of in vivo studies. *Journal of Nanomaterials*, 2012:5.
- Ishikawa, S., Matsumura, K., Kitamura, N., Ishimori, K., Takanami, Y., und Ito, S. 2018. Application of a direct aerosol exposure system for the assessment of biological effects of cigarette smoke and novel tobacco product vapor on human bronchial epithelial cultures. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 96:85–93.
- Ito, K., Zolfaghari, R., Hao, L., und Ross, A. C. 2014. Inflammation rapidly modulates the expression of ALDH1A1 (RALDH1) and vimentin in the liver and hepatic macrophages of rats in vivo. *Nutrition & Metabolism*, 11(1):54.
- Jacobs, D. S., Huang, S.-R., Cheng, Y.-L., Rabb, S. A., Gorham, J. M., Krommenhoek, P. J., Lee, L. Y., Nguyen, T., und Sung, L. 2016. Surface degradation and nanoparticle release of a commercial nanosilica/polyurethane coating under UV exposure. *Journal of Coatings Technology and Research*, 13(5):735–751.

- Jiang, J., Oberdörster, G., Elder, A., Gelein, R., Mercer, P., und Biswas, P. 2008. Does nanoparticle activity depend upon size and crystal phase? *Nanotoxicology*, 2(1):33–42.
- Jing, X., Park, J. H., Peters, T. M., und Thorne, P. S. 2015. Toxicity of copper oxide nanoparticles in lung epithelial cells exposed at the air–liquid interface compared with in vivo assessment. *Toxicology in Vitro*, 29(3):502–511.
- Jugan, M.-L., Barillet, S., Simon-Deckers, A., Herlin-Boime, N., Sauvaigo, S., Douki, T., und Carriere, M. 2012. Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells. *Nanotoxicology*, 6(5):501–13.
- Kansara, K., Patel, P., Shah, D., Shukla, R. K., Singh, S., Kumar, A., und Dhawan, A. 2015. TiO<sub>2</sub> nanoparticles induce DNA double strand breaks and cell cycle arrest in human alveolar cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 56(2):204–217.
- Karin, M. 1995. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 270(28):16483–16486.
- Karlsson, H. L., Cronholm, P., Gustafsson, J., und Moller, L. 2008. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chemical Research in Toxicology*, 21(9):1726–32.
- Karlsson, H. L., Gustafsson, J., Cronholm, P., und Moller, L. 2009. Size-dependent toxicity of metal oxide particles—a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicology Letters*, 188(2):112–8.
- Kermanizadeh, A., Chauché, C., Brown, D. M., Loft, S., und Møller, P. 2015. The role of intracellular redox imbalance in nanomaterial induced cellular damage and genotoxicity: a review. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 56(2):111–124.
- Kettler, K., Veltman, K., van de Meent, D., van Wezel, A., und Hendriks, A. J. 2014. Cellular uptake of nanoparticles as determined by particle properties, experimental conditions, and cell type. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(3):481–492.
- Khan, I., Saeed, K., und Khan, I. 2017. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*.
- Kharisov, B. I., González, M. O., Quezada, T. S., de la Fuente, I. G., und Longoria, F. 2017. Materials and nanomaterials for the removal of heavy oil components. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 156:971–982.
- Khoso, P. A., Yang, Z., Liu, C., und Li, S. 2015. Selenoproteins and heat shock proteins play important roles in immunosuppression in the bursa of Fabricius of chickens with selenium deficiency. *Cell Stress and Chaperones*, 20(6):967–978.

- Kim, J. S., Adamcakova-Dodd, A., O'Shaughnessy, P., Grassian, V. H., und Thorne, P. S. 2011. Effects of copper nanoparticle exposure on host defense in a murine pulmonary infection model. *Particle and Fibre Toxicology*, 8(1):29.
- Kim, Y. S., Davis, R., Uddin, N., Nyden, M., und Rabb, S. A. 2016. Quantification of nanoparticle release from polymer nanocomposite coatings due to environmental stressing. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 13(4):303–313.
- Kooter, I. M., Gröllers-Mulderij, M., Duistermaat, E., Kuper, F., und Schoen, E. D. 2017. Factors of concern in a human 3D cellular airway model exposed to aerosols of nanoparticles. *Toxicology in Vitro*, 44:339–348.
- Kooter, I. M., Gröllers-Mulderij, M., Steenhof, M., Duistermaat, E., van Acker, F. A., Staal, Y. C., Tromp, P. C., Schoen, E., Kuper, C. F., und van Someren, E. 2016. Cellular effects in an in vitro human 3D cellular airway model and A549/BEAS-2B in vitro cell cultures following air exposure to cerium oxide particles at an air–liquid interface. *Applied In Vitro Toxicology*, 2(1):56–66.
- Krezel, A. und Maret, W. 2017. The functions of metamorphic metallothioneins in zinc and copper metabolism. *International journal of Molecular Sciences*, 18(6):1237.
- Kroll, A., Pillukat, M. H., Hahn, D., und Schnekenburger, J. 2012. Interference of engineered nanoparticles with in vitro toxicity assays. *Archives of Toxicology*, 86(7):1123–36.
- Kuempel, E. D. und Sorahan, T. 2010. Identification of Research Needs to Resolve the Carcinogenicity of High-priority IARC Carcinogens. Technischer bericht, IARC.
- Kuhlbusch, T. A., Wijnhoven, S. W., und Haase, A. 2018. Nanomaterial exposures for worker, consumer and the general public. *NanoImpact*, 10:11–25.
- Kunsch, C. und Rosen, C. A. 1993. NF-kappa B subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter. *Molecular and Cellular Biology*, 13(10):6137–6146.
- Kuper, C. F., Gröllers-Mulderij, M., Maarschalkerweerd, T., Meulendijks, N. M., Reus, A., van Acker, F., Zondervan-van den Beuken, E. K., Wouters, M. E., Bijlsma, S., und Kooter, I. M. 2015. Toxicity assessment of aggregated/agglomerated cerium oxide nanoparticles in an in vitro 3D airway model: The influence of mucociliary clearance. *Toxicology in Vitro*, 29(2):389–397.
- Kwon, S., Fan, M., Cooper, A. T., und Yang, H. 2008. Photocatalytic applications of micro-and nano-TiO<sub>2</sub> in environmental engineering. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 38(3):197–226.
- Lacroix, G., Koch, W., Ritter, D., Gutleb, A. C., Larsen, S. T., Loret, T., Zanetti, F., Constant, S., Chortarea, S., Rothen-Rutishauser, B., et al. 2018. Air–Liquid Interface In Vitro Models for Respiratory Toxicology Research: Consensus Workshop and Recommendations. *Applied In Vitro Toxicology*, 4(2).

- Lagopati, N., Tsilibary, E.-P., Falaras, P., Papazafri, P., Pavlatou, E. A., Kotsopoulou, E., und Kitsiou, P. 2014. Effect of nanostructured TiO<sub>2</sub> crystal phase on photoinduced apoptosis of breast cancer epithelial cells. *International Journal of Nanomedicine*, 9:3219.
- Lakshminarayanan, V., Drab-Weiss, E. A., und Roebuck, K. A. 1998. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and tumor necrosis factor- $\alpha$  induce differential binding of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF- $\kappa$ B to the interleukin-8 promoter in endothelial and epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 273(49):32670–32678.
- Laux, P., Tentschert, J., Riebeling, C., Braeuning, A., Creutzenberg, O., Epp, A., Fessard, V., Haas, K.-H., Haase, A., Hund-Rinke, K., *et al.* 2017. Nanomaterials: certain aspects of application, risk assessment and risk communication. *Archives of Toxicology*, pages 1–21.
- Lee, H.-J., Lee, H., und Lee, C. 2014. Degradation of diclofenac and carbamazepine by the copper (II)-catalyzed dark and photo-assisted Fenton-like systems. *Chemical Engineering Journal*, 245:258–264.
- Lenz, A. G., Karg, E., Brendel, E., Hinze-Heyn, H., Maier, K. L., Eickelberg, O., Stoeger, T., und Schmid, O. 2013. Inflammatory and oxidative stress responses of an alveolar epithelial cell line to airborne zinc oxide nanoparticles at the air-liquid interface: a comparison with conventional, submerged cell-culture conditions. *Biomed Research International*, 2013:652632.
- Lenz, A. G., Karg, E., Lentner, B., Dittrich, V., Brandenberger, C., Rothen-Rutishauser, B., Schulz, H., Ferron, G. A., und Schmid, O. 2009. A dose-controlled system for air-liquid interface cell exposure and application to zinc oxide nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology*, 6:32.
- Lenz, A.-G., Stoeger, T., Cei, D., Schmidmeir, M., Semren, N., Burgstaller, G., Lentner, B., Eickelberg, O., Meiners, S., und Schmid, O. 2014. Efficient bioactive delivery of aerosolized drugs to human pulmonary epithelial cells cultured in air-liquid interface conditions. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 51(4):526–535.
- Lesniak, A., Fenaroli, F., Monopoli, M. P., Åberg, C., Dawson, K. A., und Salvati, A. 2012. Effects of the presence or absence of a protein corona on silica nanoparticle uptake and impact on cells. *ACS Nano*, 6(7):5845–5857.
- Lestari, F., Hayes, A., Green, A., und Chattopadhyay, G. 2011. An alternative method for in vitro fire smoke toxicity assessment of polymers and composites using human lung cells. *Fire and Materials*, 35(6):411–429.
- Liebermann, D. A. und Hoffman, B. 2008. Gadd45 in stress signaling. *Journal of Molecular Signaling*, 3(1):15.
- Limbach, L. K., Wick, P., Manser, P., Grass, R. N., Bruinink, A., und 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(11):4158–4163.

- Lin, C.-C., Chiang, L.-L., Lin, C.-H., Shih, C.-H., Liao, Y.-T., Hsu, M.-J., und Chen, B.-C. 2007. Transforming growth factor- $\beta$ 1 stimulates heme oxygenase-1 expression via the PI3K/Akt and NF- $\kappa$ B pathways in human lung epithelial cells. *European Journal of Pharmacology*, 560(2-3):101–109.
- Lison, D. und Huaux, F. 2011. In vitro studies: Ups and downs of cellular uptake. *Nature Nanotechnology*, 6(6):332–3.
- Livak, K.J. und Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-  $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4):402–408.
- Lombardi, L., Ciana, P., Cappellini, C., Trecca, D., Guerrini, L., Migliazza, A., Teresa Maiolo, A., und Neri, A. 1995. Structural and functional characterization of the promoter regions of the NFKB2 gene. *Nucleic Acids Research*, 23(12):2328–2336.
- Longano, D., Ditaranto, N., Cioffi, N., Di Niso, F., Sibillano, T., Ancona, A., Conte, A., Del Nobile, M., Sabbatini, L., und Torsi, L. 2012. Analytical characterization of laser-generated copper nanoparticles for antibacterial composite food packaging. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(4):1179–1186.
- Loret, T., Peyret, E., Dubreuil, M., Aguerre-Chariol, O., Bressot, C., le Bihan, O., Amodeo, T., Trouiller, B., Braun, A., Egles, C., *et al.* 2016. Air-liquid interface exposure to aerosols of poorly soluble nanomaterials induces different biological activation levels compared to exposure to suspensions. *Particle and Fibre Toxicology*, 13(1):58.
- Loret, T., Rogerieux, F., Trouiller, B., Braun, A., Egles, C., und Lacroix, G. 2018. Predicting the in vivo pulmonary toxicity induced by acute exposure to poorly soluble nanomaterials by using advanced in vitro methods. *Particle and Fibre Toxicology*, 15(1):25.
- Luan, Y., Zhao, J., Yao, H., Zhao, X., Fan, R., Zhao, W., Zhang, Z., und Xu, S. 2016. Selenium deficiency influences the mRNA expression of selenoproteins and cytokines in chicken erythrocytes. *Biological Trace Element Research*, 171(2):427–436.
- Lutsenko, S. 2010. Human copper homeostasis: a network of interconnected pathways. *Current Opinion in Chemical Biology*, 14(2):211–217.
- MAK-Kommission 2009. Titandioxid (einatembare Fraktion). In *Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe – Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten*. 47. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim.
- MAK-Kommission 2018. MAK- und BAT-Werte-Liste 2018 – Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen und Biologische Arbeitsstofftoleranzwerte.
- Marcato, P., Dean, C. A., Giacomantonio, C. A., und Lee, P. W. 2011. Aldehyde dehydrogenase: its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *Cell Cycle*, 10(9):1378–1384.

- Martin, A. und Sarkar, A. 2017. Overview on biological implications of metal oxide nanoparticle exposure to human alveolar A549 cell line. *Nanotoxicology*, 11(6):713–724.
- Martindale, J. L. und Holbrook, N. J. 2002. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *Journal of Cellular Physiology*, 192(1):1–15.
- Martitz, J., Becker, N.-P., Renko, K., Stodter, M., Hybsier, S., und Schomburg, L. 2015. Gene-specific regulation of hepatic selenoprotein expression by interleukin-6. *Metallomics*, 7(11):1515–1521.
- Mayer, M. und Bukau, B. 2005. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(6):670.
- Meng, Q. und Xia, Y. 2011. c-Jun, at the crossroad of the signaling network. *Protein & Cell*, 2(11):889–898.
- Methner, M., Crawford, C., und Geraci, C. 2012. Evaluation of the potential airborne release of carbon nanofibers during the preparation, grinding, and cutting of epoxy-based nanocomposite material. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 9(5):308–318.
- Miao, L. und Clair, D. K. S. 2009. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(4):344–356.
- Midander, K., Cronholm, P., Karlsson, H. L., Elihn, K., Möller, L., Leygraf, C., und Wallinder, I. O. 2009. Surface Characteristics, Copper Release, and Toxicity of Nano- and Micrometer-Sized Copper and Copper (II) Oxide Particles: A Cross-Disciplinary Study. *Small*, 5(3):389–399.
- Milani, P., Gagliardi, S., Cova, E., und Cereda, C. 2011. SOD1 transcriptional and posttranscriptional regulation and its potential implications in ALS. *Neurology Research International*, 2011.
- Minigalieva, I. A., Katsnelson, B. A., Panov, V. G., Privalova, L. I., Varaksin, A. N., Gurvich, V. B., Sutunkova, M. P., Shur, V. Y., Shishkina, E. V., Valamina, I. E., et al. 2017. In vivo toxicity of copper oxide, lead oxide and zinc oxide nanoparticles acting in different combinations and its attenuation with a complex of innocuous bio-protectors. *Toxicology*, 380:72–93.
- Moschini, E., Gualtieri, M., Colombo, M., Fascio, U., Camatini, M., und Mantecca, P. 2013. The modality of cell-particle interactions drives the toxicity of nanosized CuO and TiO<sub>2</sub> in human alveolar epithelial cells. *Toxicology Letters*, 222(2):102–16.
- Mostert, V., Dreher, I., Köhrle, J., Wolff, S., und Abel, J. 2001. Modulation of selenoprotein P expression by TGF- $\beta$ 1 is mediated by Smad proteins. *Biofactors*, 14(1-4):135–142.
- Mosurkal, R., Samuelson, L. A., Smith, K. D., Westmoreland, P. R., Parmar, V. S., Yan, F., Kumar, J., und Watterson, A. C. 2008. Nanocomposites of TiO<sub>2</sub> and siloxane copolymers as environmentally safe flame-retardant materials. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 45(11):942–946.

- Motzkus, C., Chivas-Joly, C., Guillaume, E., Ducourtieux, S., Saragoza, L., Lesenechal, D., und Mace, T. 2011. Characterization of aerosol emitted by the combustion of nanocomposites. *Journal of Physics: Conference Series*, 304(1):012020.
- Motzkus, C., Macé, T., Vaslin-Reimann, S., Ausset, P., und Maillé, M. 2013. Characterization of manufactured TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Journal of Physics: Conference Series*, 429(1):012012.
- Mülhopt, S., Dilger, M., Diabaté, S., Schlager, C., Krebs, T., Zimmermann, R., Buters, J., Oeder, S., Wäscher, T., Weiss, C., *et al.* 2016. Toxicity testing of combustion aerosols at the air–liquid interface with a self-contained and easy-to-use exposure system. *Journal of Aerosol Science*, 96:38–55.
- Nguyen, T., Pellegrin, B., Bernard, C., Gu, X., Gorham, J. M., Stutzman, P., Stanley, D., Shapiro, A., Byrd, E., Hettenhouser, R., *et al.* 2011. Fate of nanoparticles during life cycle of polymer nanocomposites. *Journal of Physics: Conference Series*, 304(1):012060.
- Nicolas, E., Golemis, E. A., und Arora, S. 2016. POLD1: Central mediator of DNA replication and repair, and implication in cancer and other pathologies. *Gene*, 590(1):128–141.
- Nielson, K. B., Atkin, C., und Winge, D. 1985. Distinct metal-binding configurations in metallothionein. *Journal of Biological Chemistry*, 260(9):5342–5350.
- Nishitoh, H. 2021. CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response. *The Journal of Biochemistry*, 151(3):217–219.
- Oberdörster, G. 2010. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *Journal of Internal Medicine*, 267(1):89–105.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., und Oberdörster, J. 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*, 113(7):823.
- Ogura, I., Kotake, M., Shigeta, M., Uejima, M., Saito, K., Hashimoto, N., und Kishimoto, A. 2013. Potential release of carbon nanotubes from their composites during grinding. *Journal of Physics: Conference Series*, 429(1):012049.
- Oh, N. und Park, J.-H. 2014. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *International Journal of Nanomedicine*, 9(Suppl 1):51.
- Okuda-Shimazaki, J., Takaku, S., Kanehira, K., Sonezaki, S., und Taniguchi, A. 2010. Effects of titanium dioxide nanoparticle aggregate size on gene expression. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(6):2383–92.

- Okuwa, K., Tanaka, M., Fukano, Y., Nara, H., Nishijima, Y., und Nishino, T. 2010. In vitro micronucleus assay for cigarette smoke using a whole smoke exposure system: a comparison of smoking regimens. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 62(4):433–440.
- Panas, A., Comouth, A., Saathoff, H., Leisner, T., Al-Rawi, M., Simon, M., Seemann, G., D?ssel, O., Mülhopt, S., Paur, H.-R., Fritsch-Decker, S., Weiss, C., und Diabaté, S. 2014. Silica nanoparticles are less toxic to human lung cells when deposited at the air–liquid interface compared to conventional submerged exposure. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 5:1590–1602.
- Park, E.-J., Yi, J., Chung, K.-H., Ryu, D.-Y., Choi, J., und Park, K. 2008. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology Letters*, 180(3):222–229.
- Park, S., Lee, Y. K., Jung, M., Kim, K. H., Chung, N., Ahn, E.-K., Lim, Y., und Lee, K.-H. 2007. Cellular toxicity of various inhalable metal nanoparticles on human alveolar epithelial cells. *Inhalation Toxicology*, 19 Suppl 1:59–65.
- Paul, D. und Robeson, L. M. 2008. Polymer nanotechnology: nanocomposites. *Polymer*, 49(15):3187–3204.
- Paul, K., Wang, M., Mladenov, E., Bencsik-Theilen, A., Bednar, T., Wu, W., Arakawa, H., und Iliakis, G. 2013. DNA ligases I and III cooperate in alternative non-homologous end-joining in vertebrates. *PLoS One*, 8(3):e59505.
- Paur, H.-R., Cassee, F. R., Teeguarden, J., Fissan, H., Diabate, S., Aufderheide, M., Kreyling, W. G., Hänninen, O., Kasper, G., Riediker, M., *et al.* 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(10):668–692.
- Paur, H.-R., Mülhopt, S., Weiss, C., und Diabaté, S. 2008. In vitro exposure systems and bioassays for the assessment of toxicity of nanoparticles to the human lung. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 3(3):319–329.
- Pettibone, J. M., Adamcakova-Dodd, A., Thorne, P. S., O’Shaughnessy, P. T., Weydert, J. A., und Grassian, V. H. 2008. Inflammatory response of mice following inhalation exposure to iron and copper nanoparticles. *Nanotoxicology*, 2(4):189–204.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9):e45–e45.
- Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S., und Nowack, B. 2012. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(9):1–11.

- Piret, J.-P., Jacques, D., Audinot, J.-N., Mejia, J., Boilan, E., Noël, F., Fransolet, M., Demazy, C., Lucas, S., Saout, C., *et al.* 2012. Copper (II) oxide nanoparticles penetrate into HepG2 cells, exert cytotoxicity via oxidative stress and induce pro-inflammatory response. *Nanoscale*, 4(22):7168–7184.
- Platel, A., Carpentier, R., Becart, E., Mordacq, G., Betbeder, D., und Nesslany, F. 2016. Influence of the surface charge of PLGA nanoparticles on their in vitro genotoxicity, cytotoxicity, ROS production and endocytosis. *Journal of Applied Toxicology*, 36(3):434–444.
- Ploner, C., Kofler, R., und Villunger, A. 2009. Noxa: at the tip of the balance between life and death. *Oncogene*, 27(S1):S84.
- Poon, W.-L., Alenius, H., Ndika, J., Fortino, V., Kolhinen, V., Meščeriakovas, A., Wang, M., Greco, D., Lähde, A., Jokiniemi, J., *et al.* 2017. Nano-sized zinc oxide and silver, but not titanium dioxide, induce innate and adaptive immunity and antiviral response in differentiated THP-1 cells. *Nanotoxicology*, 11(7):936–951.
- Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C. J., und Valko, M. 2017. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(7):592–607.
- Prasad, R. Y., Wallace, K., Daniel, K. M., Tennant, A. H., Zucker, R. M., Strickland, J., Dreher, K., Kligerman, A. D., Blackman, C. F., und DeMarini, D. M. 2013. Effect of treatment media on the agglomeration of titanium dioxide nanoparticles: impact on genotoxicity, cellular interaction, and cell cycle. *ACS Nano*, 7(3):1929–1942.
- Pronk, T. E., van der Veen, J. W., Vandebriel, R. J., van Loveren, H., de Vink, E. P., und Pennings, J. L. 2014. Comparison of the molecular topologies of stress-activated transcription factors HSF1, AP-1, NRF2, and NF- $\kappa$ B in their induction kinetics of HMOX1. *Biosystems*, 124:75–85.
- Qiu, Y., Liu, Y., Wang, L., Xu, L., Bai, R., Ji, Y., Wu, X., Zhao, Y., Li, Y., und Chen, C. 2010. Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods. *Biomaterials*, 31(30):7606–7619.
- Rach, J., Budde, J., Mühle, N., und Aufderheide, M. 2014. Direct exposure at the air-liquid interface: evaluation of an in vitro approach for simulating inhalation of airborne substances. *Journal of Applied Toxicology*, 34(5):506–15.
- Rasmussen, K., Mast, J., De Temmerman, P.-J., Verleysen, E., Waegeneers, N., Van Steen, F., Pizzolon, J. C., De Temmerman, L., Van Doren, E., Jensen, K. A., *et al.* 2014. Titanium dioxide, NM-100, NM-101, NM-102, NM-103, NM-104, NM-105: characterisation and physico-chemical properties. Technischer bericht, European Commission Joint Research Centre (JRC).
- Raynor, P. C., Cebula, J. I., Spangenberg, J. S., Olson, B. A., Dasch, J. M., und D'Arcy, J. B. 2012. Assessing potential nanoparticle release during nanocomposite shredding using direct-reading instruments. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 9(1):1–13.

- Riebeling, C., Piret, J.-P., Trouiller, B., Nelissen, I., Saout, C., Toussaint, O., und Haase, A. 2018. A guide to nanosafety testing: Considerations on cytotoxicity testing in different cell models. *NanoImpact*, 10:1–10.
- Ritter, D. und Knebel, J. 2014. Investigations of the biological effects of airborne and inhalable substances by cell-based in vitro methods: fundamental improvements to the ALI concept. *Advances in Toxicology*, 2014.
- Ross, D., Kepa, J. K., Winski, S. L., Beall, H. D., Anwar, A., und Siegel, D. 2000. NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. *Chemico-Biological Interactions*, 129(1-2):77–97.
- Ryter, S. W., Alam, J., und Choi, A. M. K. 2006. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiological Reviews*, 86(2):583–650.
- Sanders, K., Degn, L. L., Mundy, W. R., Zucker, R. M., Dreher, K., Zhao, B., Roberts, J. E., und Boyes, W. K. 2012. In vitro phototoxicity and hazard identification of nano-scale titanium dioxide. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 258(2):226–36.
- Sasi, B. K., Sonawane, P. J., Gupta, V., Sahu, B. S., und Mahapatra, N. R. 2014. Coordinated transcriptional regulation of Hspa1a gene by multiple transcription factors: crucial roles for HSF-1, NF-Y, NF- $\kappa$ B, and CREB. *Journal of Molecular Biology*, 426(1):116–135.
- Savi, M., Kalberer, M., Lang, D., Ryser, M., Fierz, M., Gaschen, A., Rička, J., und Geiser, M. 2008. A Novel Exposure System for the Efficient and Controlled Deposition of Aerosol Particles onto Cell Cultures. *Environmental Science & Technology*, 42(15):5667–5674.
- Sayes, C. M., Wahi, R., Kurian, P. A., Liu, Y., West, J. L., Ausman, K. D., Warheit, D. B., und Colvin, V. L. 2006. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicological Sciences*, 92(1):174–185.
- Schlagenhauf, L., Chu, B. T., Buha, J., Nußesch, F., und Wang, J. 2012. Release of carbon nanotubes from an epoxy-based nanocomposite during an abrasion process. *Environmental Science & Technology*, 46(13):7366–7372.
- Schlagenhauf, L., Nüesch, F., und Wang, J. 2014. Release of carbon nanotubes from polymer nanocomposites. *Fibers*, 2(2):108–127.
- Schwerdtle, T., Hamann, I., Jahnke, G., Walter, I., Richter, C., Parsons, J. L., Dianov, G. L., und Hartwig, A. 2007. Impact of copper on the induction and repair of oxidative DNA damage, poly(ADP-ribosyl)ation and PARP-1 activity. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(2):201–10.

- Secondo, L. E., Liu, N. J., und Lewinski, N. A. 2017. Methodological considerations when conducting in vitro, air-liquid interface exposures to engineered nanoparticle aerosols. *Critical Reviews in Toxicology*, 47(3):225–262.
- Semisch, A. 2013. *Zyto- und Genotoxizität von nano- und mikroskaligem Kupferoxid: Einfluss der Bioverfügbarkeit*. Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie.
- Semisch, A., Ohle, J., Witt, B., und Hartwig, A. 2014. Cytotoxicity and genotoxicity of nano - and micro-particulate copper oxide: role of solubility and intracellular bioavailability. *Particle and Fibre Toxicology*, 11:10.
- Semisch, A. und Hartwig, A. 2014. Copper ions interfere with the reduction of the water-soluble tetrazolium salt-8. *Chemical Research in Toxicology*, 27(2):169–71.
- Serasanamabati, M. und Chilakapati, S. R. 2016. Function of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) in human diseases-a review. *South Indian Journal of Biological Sciences*, 2(4):368–387.
- Shafagh, M., Rahmani, F., und Delirezh, N. 2015. CuO nanoparticles induce cytotoxicity and apoptosis in human K562 cancer cell line via mitochondrial pathway, through reactive oxygen species and P53. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 18(10):993–1000.
- Sicinski, P., Zacharek, S., und Kim, C. 2007. Duality of p27Kip1 function in tumorigenesis. *Genes & Development*, 21(14):1703–1706.
- Siddiqui, M. A., Alhadlaq, H. A., Ahmad, J., Al-Khedhairi, A. A., Musarrat, J., und Ahamed, M. 2013. Copper oxide nanoparticles induced mitochondria mediated apoptosis in human hepatocarcinoma cells. *PLoS One*, 8(8):e69534.
- Simon-Deckers, A., Gouget, B., Mayne-L’Hermite, M., Herlin-Boime, N., Reynaud, C., und Carriere, M. 2008. In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. *Toxicology*, 253(1-3):137–146.
- Singh, S., Shi, T., Duffin, R., Albrecht, C., van Berlo, D., Höhr, D., Fubini, B., Martra, G., Fenoglio, I., Borm, P. J., et al. 2007. Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO<sub>2</sub>: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 222(2):141–151.
- Šmerdová, L., Neča, J., Svobodová, J., Topinka, J., Schmuczerová, J., Kozubík, A., Machala, M., und Vondráček, J. 2013. Inflammatory mediators accelerate metabolism of benzo [a] pyrene in rat alveolar type II cells: the role of enhanced cytochrome P450 1B1 expression. *Toxicology*, 314(1):30–38.

- Soares, J., Raimundo, L., Pereira, N. A., dos Santos, D. J., Pérez, M., Queiroz, G., Leão, M., Santos, M. M., und Saraiva, L. 2015. A tryptophan-derived oxazolopiperidone lactam is cytotoxic against tumors via inhibition of p53 interaction with murine double minute proteins. *Pharmacological Research*, 95:42–52.
- Song, M.-F., Li, Y.-S., Kasai, H., und Kawai, K. 2012. Metal nanoparticle-induced micronuclei and oxidative DNA damage in mice. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 50(3):211–216.
- Srivastava, R., Rahman, Q., Kashyap, M., Singh, A., Jain, G., Jahan, S., Lohani, M., Lantow, M., und Pant, A. 2013. Nano-titanium dioxide induces genotoxicity and apoptosis in human lung cancer cell line, A549. *Human & Experimental Toxicology*, 32(2):153–166.
- Starost, K., Frijns, E., Van Laer, J., Faisal, N., Egizabal, A., Elizetxea, C., Nelissen, I., Blázquez, M., und Njuguna, J. 2017. The effect of nanosilica (SiO<sub>2</sub>) and nanoalumina (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) reinforced polyester nanocomposites on aerosol nanoparticle emissions into the environment during automated drilling. *Aerosol Science and Technology*, 51(9):1035–1046.
- Steinritz, D., Möhle, N., Pohl, C., Papritz, M., Stenger, B., Schmidt, A., Kirkpatrick, C. J., Thiermann, H., Vogel, R., Hoffmann, S., *et al.* 2013. Use of the Cultex® Radial Flow System as an in vitro exposure method to assess acute pulmonary toxicity of fine dusts and nanoparticles with special focus on the intra- and inter-laboratory reproducibility. *Chemico-Biological Interactions*, 206(3):479–490.
- Stoehr, L. C., Endes, C., Radauer-Preiml, I., Boyles, M. S., Casals, E., Balog, S., Pesch, M., Petri-Fink, A., Rothen-Rutishauser, B., Himly, M., *et al.* 2015. Assessment of a panel of interleukin-8 reporter lung epithelial cell lines to monitor the pro-inflammatory response following zinc oxide nanoparticle exposure under different cell culture conditions. *Particle and Fibre Toxicology*, 12(1):29.
- Stone, V., Johnston, H., und Clift, M. J. 2007. Air pollution, ultrafine and nanoparticle toxicology: cellular and molecular interactions. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 6(4):331–340.
- Strauch, B. M., Niemand, R. K., Winkelbeiner, N. L., und Hartwig, A. 2017. Comparison between micro- and nanosized copper oxide and water soluble copper chloride: interrelationship between intracellular copper concentrations, oxidative stress and DNA damage response in human lung cells. *Particle Fibre Toxicology*, 14(1):28.
- Sun, T., Yan, Y., Zhao, Y., Guo, F., und Jiang, C. 2012. Copper Oxide Nanoparticles Induce Autophagic Cell Death in A549 Cells. *PLoS One*, 7(8):e43442.
- Suzuki, H., Toyooka, T., und Ibuki, Y. 2007. Simple and easy method to evaluate uptake potential of nanoparticles in mammalian cells using a flow cytometric light scatter analysis. *Environmental Science & Technology*, 41(8):3018–3024.
- Takahashi, S. 2015. Positive and negative regulators of the metallothionein gene. *Molecular Medicine Reports*, 12(1):795–799.

- Tedja, R., Marquis, C., Lim, M., und Amal, R. 2011. Biological impacts of TiO<sub>2</sub> on human lung cell lines A549 and H1299: particle size distribution effects. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(9):3801–3813.
- Teeguarden, J. G., Hinderliter, P. M., Orr, G., Thrall, B. D., und Pounds, J. G. 2007. Particokinetics in vitro: dosimetry considerations for in vitro nanoparticle toxicity assessments. *Toxicological Sciences*, 95(2):300–12.
- Thiruvengadam, M., Rajakumar, G., und Chung, I.-M. 2018. Nanotechnology: current uses and future applications in the food industry. *3 Biotech*, 8(1):74.
- Tomkinson, A. E. und Mackey, Z. B. 1998. Structure and function of mammalian DNA ligases. *Mutation Research*, 407(1):1–9.
- Toyooka, T., Amano, T., und Ibuki, Y. 2012. Titanium dioxide particles phosphorylate histone H2AX independent of ROS production. *Mutation Research*, 742(1-2):84–91.
- Tsai, S., Ashter, A., Ada, E., Mead, J. L., Barry, C. F., und Ellenbecker, M. J. 2008. Airborne nanoparticle release associated with the compounding of nanocomposites using nanoalumina as fillers. *Aerosol Air Quality Research*, 8(2):160–177.
- Tuomela, S., Autio, R., Buerki-Thurnherr, T., Arslan, O., Kunzmann, A., Andersson-Willman, B., Wick, P., Mathur, S., Scheynius, A., Krug, H. F., *et al.* 2013. Gene expression profiling of immune-competent human cells exposed to engineered zinc oxide or titanium dioxide nanoparticles. *PLoS One*, 8(7):e68415.
- Ude, V. C., Brown, D. M., Viale, L., Kanase, N., Stone, V., und Johnston, H. J. 2017. Impact of copper oxide nanomaterials on differentiated and undifferentiated Caco-2 intestinal epithelial cells; assessment of cytotoxicity, barrier integrity, cytokine production and nanomaterial penetration. *Particle and Fibre Toxicology*, 14(1):31.
- Václavíková, R., Hughes, D. J., und Souček, P. 2015. Microsomal epoxide hydrolase 1 (EPHX1): Gene, structure, function, and role in human disease. *Gene*, 571(1):1–8.
- van der Veen, J. W., Paskel, R. F., Smits, N. A., Hodemaekers, H., van Loveren, H., und Ezendam, J. 2016. The involvement of the Toll-like receptor signaling and Nrf2-Keap1 pathways in the in vitro regulation of IL-8 and HMOX1 for skin sensitization. *Journal of Immunotoxicology*, 13(1):1–6.
- Vance, M. E., Kuiken, T., Vejerano, E. P., McGinnis, S. P., Hochella Jr, M. F., Rejeski, D., und Hull, M. S. 2015. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 6:1769.
- Vandebriel, R. J., Vermeulen, J. P., van Engelen, L. B., de Jong, B., Verhagen, L. M., Liset, J., Hoonakker, M. E., und de Jong, W. H. 2018. The crystal structure of titanium dioxide nanoparticles influences immune activity in vitro and in vivo. *Particle and Fibre Toxicology*, 15(1):9.

- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., *et al.* 2001. The sequence of the human genome. *Science*, 291(5507):1304–1351.
- Verma, A. und Stellacci, F. 2010. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small*, 6(1):12–21.
- Verma, I. M., Stevenson, J. K., Schwarz, E. M., Van Antwerp, D., und Miyamoto, S. 1995. Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes & Development*, 9(22):2723–2735.
- von Moos, N., Maillard, L., und Slaveykova, V. I. 2015. Dynamics of sub-lethal effects of nano-CuO on the microalga *Chlamydomonas reinhardtii* during short-term exposure. *Aquatic Toxicology*, 161:267–275.
- Vranic, S., Gosens, I., Jacobsen, N. R., Jensen, K. A., Bokkers, B., Kermanizadeh, A., Stone, V., Baeza-Squiban, A., Cassee, F. R., Tran, L., *et al.* 2017. Impact of serum as a dispersion agent for in vitro and in vivo toxicological assessments of TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Archives of Toxicology*, 91(1):353–363.
- Wang, J. und Fan, Y. 2014. Lung injury induced by TiO<sub>2</sub> nanoparticles depends on their structural features: size, shape, crystal phases, and surface coating. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(12):22258–22278.
- Wang, Y., Cui, H., Zhou, J., Li, F., Wang, J., Chen, M., und Liu, Q. 2015. Cytotoxicity, DNA damage, and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(7):5519–5530.
- Wang, Z., Li, N., Zhao, J., White, J. C., Qu, P., und Xing, B. 2012. CuO Nanoparticle Interaction with Human Epithelial Cells: Cellular Uptake, Location, Export, and Genotoxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 25(7):1512–1521.
- Westmeier, D., Stauber, R. H., und Docter, D. 2016. The concept of bio-corona in modulating the toxicity of engineered nanomaterials (ENM). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 299:53–57.
- Wohlleben, W., Brill, S., Meier, M. W., Mertler, M., Cox, G., Hirth, S., von Vacano, B., Strauss, V., Treumann, S., Wiench, K., Ma-Hock, L., und Landsiedel, R. 2011. On the lifecycle of nanocomposites: comparing released fragments and their in-vivo hazards from three release mechanisms and four nanocomposites. *Small*, 7(16):2384–95.
- Wu, Z., Zheng, S., und Yu, Q. 2009. The E2F family and the role of E2F1 in apoptosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(12):2389–2397.
- Xie, Y., Williams, N. G., Tolic, A., Chrisler, W. B., Teeguarden, J. G., Maddux, B. L., Pounds, J. G., Laskin, A., und Orr, G. 2012. Aerosolized ZnO nanoparticles induce toxicity in alveolar type II epithelial cells at the air-liquid interface. *Toxicological Sciences*, 125(2):450–61.

- Xin, L., Wang, J., Wu, Y., Guo, S., und Tong, J. 2015. Increased oxidative stress and activated heat shock proteins in human cell lines by silver nanoparticles. *Human & Experimental Toxicology*, 34(3):315–323.
- Yang, Y., Doudrick, K., Bi, X., Hristovski, K., Herckes, P., Westerhoff, P., und Kaegi, R. 2014. Characterization of food-grade titanium dioxide: the presence of nanosized particles. *Environmental Science & Technology*, 48(11):6391–6400.
- Yao, S. und Zhu, Y. 2015. Nanomaterial-enabled stretchable conductors: strategies, materials and devices. *Advanced Materials*, 27(9):1480–1511.
- Zhan, Q. 2005. Gadd45a, a p53-and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage. *Mutation Research*, 569(1):133–143.
- Zhang, B., Georgiev, O., Hagmann, M., Günes, c., Cramer, M., Faller, P., Vasák, M., und Schaffner, W. 2003. Activity of metal-responsive transcription factor 1 by toxic heavy metals and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in vitro is modulated by metallothionein. *Molecular and Cellular Biology*, 23(23):8471–8485.
- Zhang, J., Song, W., Guo, J., Zhang, J., Sun, Z., Li, L., Ding, F., und Gao, M. 2013. Cytotoxicity of different sized TiO<sub>2</sub> nanoparticles in mouse macrophages. *Toxicology and Industrial Health*, 29(6):523–33.
- Zhang, R., Niu, Y., Du, H., Cao, X., Shi, D., Hao, Q., und Zhou, Y. 2009. A stable and sensitive testing system for potential carcinogens based on DNA damage-induced gene expression in human HepG2 cell. *Toxicology in Vitro*, 23(1):158–165.
- Zhang, X., Li, W., und Yang, Z. 2015. Toxicology of nanosized titanium dioxide: an update. *Archives of Toxicology*, 89(12):2207–2217.
- Zhong, L., Yu, Y., Lian, H.-z., Hu, X., Fu, H., und Chen, Y.-j. 2017. Solubility of nano-sized metal oxides evaluated by using in vitro simulated lung and gastrointestinal fluids: implication for health risks. *Journal of Nanoparticle Research*, 19(11):375.
- Zucker, R., Daniel, K., Massaro, E., Karafas, S., Degn, L., und Boyes, W. 2013. Detection of silver nanoparticles in cells by flow cytometry using light scatter and far-red fluorescence. *Cytometry Part A*, 83(10):962–972.
- Zucker, R., Massaro, E., Sanders, K., Degn, L., und Boyes, W. 2010. Detection of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in cells by flow cytometry. *Cytometry Part A*, 77(7):677–685.
- Zuo, J. M. und Spence, J. C. 2017. *Advanced transmission electron microscopy*. Springer.

# 8 Chemikalien und Instrumente

## 8.1 Chemikalien

**Tabelle 8.1:** Auflistung der verwendeten Chemikalien sowie deren Hersteller.

Chemikalie	Hersteller
20x DNA Binding Dye Sample Loading Reagent	Fluidigm (San Francisco)
2x Assay Loading Reagent	Fluidigm (San Francisco)
2x TaqMan® PreAmp Master Mix	Applied Biosystems (Darmstadt)
AAS-Kupferstandard (1 g/L)	Roth (Karlsruhe)
AAS-Magnesium-Matrixmodifier	Perkin Elmer (Rodgau)
AAS-Palladium-Matrixmodifier	Perkin Elmer (Rodgau)
Annexin V-FITC	BioLegend (San Diego)
CasyTon®	Roche (Mannheim)
CellROX Green	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Cu(II)-oxid Nanopartikel	Sigma-Aldrich (Steinheim)
di-Kaliumhydrogenphosphat, ≥ 99 %, p.A.	Roth (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO), ≥ 99,9 %	Sigma-Aldrich (Steinheim)
di-Natriumhydrogenphosphat, ≥ 99%, p.A.	Roth (Karlsruhe)
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
DNA Away	Roth (Karlsruhe)
DNA Suspension Buffer	TEKnova (Kristiansand)
Ethanol 80 %ig und 96 %ig	Roth (Karlsruhe)
Exonuklease I (20 U/?L) New England	BioLabs (Frankfurt)
Exonuklease Reaktionspuffer New England	BioLabs (Frankfurt)
Fetales Kälberserum 10 %ig (FKS)	Invitrogen (Darmstadt)
Giemsa®Stammlösung	Roth (Karlsruhe)
HEPES, ≥ 99,5 %, p.A.	Roth (Karlsruhe)
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Hydroxylapatit, high resolution	Calbiochem (Läufelfingen)
IFC Control Line Fluid	Fluidigm (San Francisco)
Kaliumchlorid, ≥ 99,5 %, p.A.	Roth (Karlsruhe)

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle 8.1 – Fortsetzung der vorherigen Seite

Chemikalie	Hersteller
Kaliumdihydrogenphosphat, $\geq 99,5$ %, p.A.	Roth (Karlsruhe)
Nanokomposite	Fraunhofer ICT (Pfinztal)
Natriumchlorid, $\geq 99,5$ %, p.A.	Roth (Karlsruhe)
Natriumdihydrogenphosphat, $\geq 99$ %, p.A.	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid, $\geq$ %, p.A.	Roth (Karlsruhe)
Natronlauge 1 N	Roth (Karlsruhe)
PCR Certified Water	TEKnova (Kristiansand)
Penicillin-Streptomycin-Lösung (P.: 5000 U/ml, S.: 5 mg/l)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Primer Fluidigm	Fluidigm (San Francisco)
Propidiumiodid (1 g/L)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Protease-Inhibitor	Roche (Basel)
RPMI-Medium	Sigma-Aldrich (Steinheim)
RPMI-Medium + 25 mM HEPES	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Salpetersäure Supra Qualität (69 %)	Roth (Karlsruhe)
Salzsäure 0,1 N	Roth (Karlsruhe)
Salzsäure 4 N	Roth (Karlsruhe)
SDS 10 %	Roth (Karlsruhe)
SsoFast™ EvaGreen® Supermix mit Low ROX	BioRad (München)
TE-Puffer	TEKnova (Kristiansand)
Titan(IV)-dioxid Nanopartikel, Aeroxide P25	Evonik (Essen)
Tris, $\geq 99,5$ %	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100 10% Lsg.	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Trypsin, 0,25 % Trypsin in EDTA	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Wasserstoffperoxid Suprapur® (30%)	Merck Millipore (Darmstadt)

## 8.2 Lösungen und Puffer

**Tabelle 8.2:** Auflistung der verwendeten Puffer oder Lösungen sowie deren Zusammensetzung.

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</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-EDTA (pH 7,4)</b>	0,5 mM EDTA in PBS
<b>Trypsin-Lösung</b>	0,25 % Trypsin in PBS-EDTA
<b>RIPA-Puffer</b>	10 mM Tris (pH 7,6) 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % TritonX-100 1 % DOC 0,1 % SDS 1 mM PMSF (in Isopropanol) 1x Protease Inhibitor Cocktail
<b>Alkalische Lösung</b>	2,6252 g NaCl 1 mL NaOH, 1 M (A549-Zellen) 0,75 mL NaOH, 1 M (3D-Zellkultursystem) 1 mL Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,5 M aufgefüllt auf 50 mL bidest. H <sub>2</sub> O
<b>Hydroxylapatit-Lösung</b>	pro Säule: 0,05 g Apatit und 0,5 mL 0,01 M NaP
<b>0,15 M KP-Puffer</b>	15,3 mL KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,5 M 14,7 mL K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,5 M aufgefüllt auf 100 mL bidest. H <sub>2</sub> O
<b>0,35 M KP-Puffer</b>	37,5 mL KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,5 M 34,3 mL K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,5 M
<b>0,5 M KP-Puffer</b>	51 mL KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,5 M 49 mL K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> aufgefüllt auf 100 mL bidest. H <sub>2</sub> O

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle 8.2 – Fortsetzung der vorherigen Seite

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
0,1 M NaP-Puffer	1,96 mL Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,5 M
	2,04 mL NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,5 M
	aufgefüllt auf 200 mL bidest. H <sub>2</sub> O

### 8.3 Verwendete Kits

Tabelle 8.3: Auflistung der verwendeten Kits.

Verwendete Kits	Hersteller
qScript™ cDNA Synthesis Kit	QuantaBio (Beverly)
NucleoSpin® RNA Plus Kit	Macherey-Nagel (Düren)
ToxinSensor™ Gel Clot Endotoxin Assay Kit	GenScript (Piscataway)

### 8.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8.4: Auflistung der benötigten Verbrauchsmaterialien sowie deren Hersteller.

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
1,2 mL Sample Cups	Perkin Elmer (Waltham)
12-well Platten	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
2,5 mL Sample Cups	Perkin Elmer (Waltham)
48-well Platten	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
5 mL round bottom tube	Corning (Amsterdam)
6-well Platten	Corning (Amsterdam)
Balzers™ AT Quarzkristalle	Colnatec (Gilbert)
Casy-Cups	Roche (Mannheim)
Corning Costar Transwell Zellkultureinsätze	Corning (Amsterdam)
Dynamic Array IFC	Fluidigm (San Francisco)

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle 8.4 – Fortsetzung der vorherigen Seite

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Einmalspritzen (5 mL)	Terumo (Eschborn)
Eppendorf-Reaktionsgefäße, 1,5 mL und 2 mL	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Glasfilterfritte 0,7 cm	Whatman (Maidstone)
Handschuhe (Latex)	VWR International (Darmstadt)
Handschuhe (Nitril)	Ansell (Richmond)
Kryoröhrchen mit Gewinde, 1,8 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Parafilm	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Pipettenspitzen 10 $\mu$ L	Mettler-Toledo (Gießen)
Pipettenspitzen 10 $\mu$ L	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettenspitzen 100-1000 $\mu$ L	Brandt (Wertheim)
Pipettenspitzen 1-200 $\mu$ L	Ratiolab (Deieck)
Pipettenspitzen 5 mL	Eppendorf (Hamburg)
Plastik-Zentrifugenröhrchen, 15 mL und 50 mL	Sarstedt (Nümbrecht)
Sterilindikatorband Autoklav	Roth (Karlsruhe)
Sterilindikatorband Heißluftsterillikator	Roth (Karlsruhe)
TEM-Gitternetz (Formvar-Film auf Kupfernetz, 200 mesh)	Plano (Wetzlar)
ThinCert™ Transwell Zellkultureinsätze	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Wägeschiffchen	Roth (Karlsruhe)
Zellkulturflasche, 150 cm <sup>2</sup>	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturflasche, 25 cm <sup>2</sup>	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturflasche, 75 cm <sup>2</sup>	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturschalen ( 15 cm, 10 cm, 6 cm)	Sarstedt (Nümbrecht)

## 8.5 Instrumente und Software

**Tabelle 8.5:** Auflistung der verwendeten Instrumente bzw. Software sowie deren Hersteller.

Instrument/Software	Hersteller
AeronebLab Nebulizer System	Aerogen (Galway)
Atomabsorptionsspektrometer PinAAcle 900 T	Perkin Elmer (Waltham)
Autoklav D-150	Systemec (Linden)
Biomark	Fluidigm (San Francisco)
Brutschrank Heracell 150i	Thermo Scientific (Langenselbold)
Casy® TTC Cell Couter & Analyser System	Roche (Mannheim)
Centrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Centrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg)
Colony Counter BZG-30	WTW (Weilheim)
Cryo 1°C Cooler	VWR International (Darmstadt)
Durchflusszytometer LSR Fortessa	Becton-Dickinson (Heidelberg)
Eismaschine	Ziegra (Isernhagen)
Eppendorf Pipette 1000-5000 ?l	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Pipette 100-1000 ?l	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Pipette 10-100 ?l	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Pipette 2,5-10 ?l	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Pipette 20-200 ?l	Eppendorf (Hamburg)
Feinwaage BP 61 S	Sartorius (Göttingen)
Galaxy Mini Centrifuge	VWR International (Darmstadt)
Glaspipetten 5, 10, 20 ml	Roth (Karlsruhe)
Heißluftsterilisator	Memmert (Büchenbach)
Heizschüttler Thermomixer C	Eppendorf (Hamburg)
IFC Controller HX	Fluidigm (San Francisco)
Laborspülmaschine Professional G7883	Miele (Güterloh)
Megafuge 1.0	Heraeus (Hanau)
MicroCentrifuge	Roth (Karlsruhe)
Mikroskop Axiovert 40C	Carl Zeiss AG (Feldbach)
Multipipette Pipete Lite XLS® 0,5-10 ?l	Mettler Toledo (Gießen)
NanoQuant Platte	Tecan Group (Crailsheim)
Nebulizer Unit (4,0 – 6,0 VMD)	Aerogen (Galway)
PCR Workstation Pro	Peqlab (Erlangen)
pH-Meter 3210	WTW (Weilheim)

Fortsetzung auf der nächsten Seite

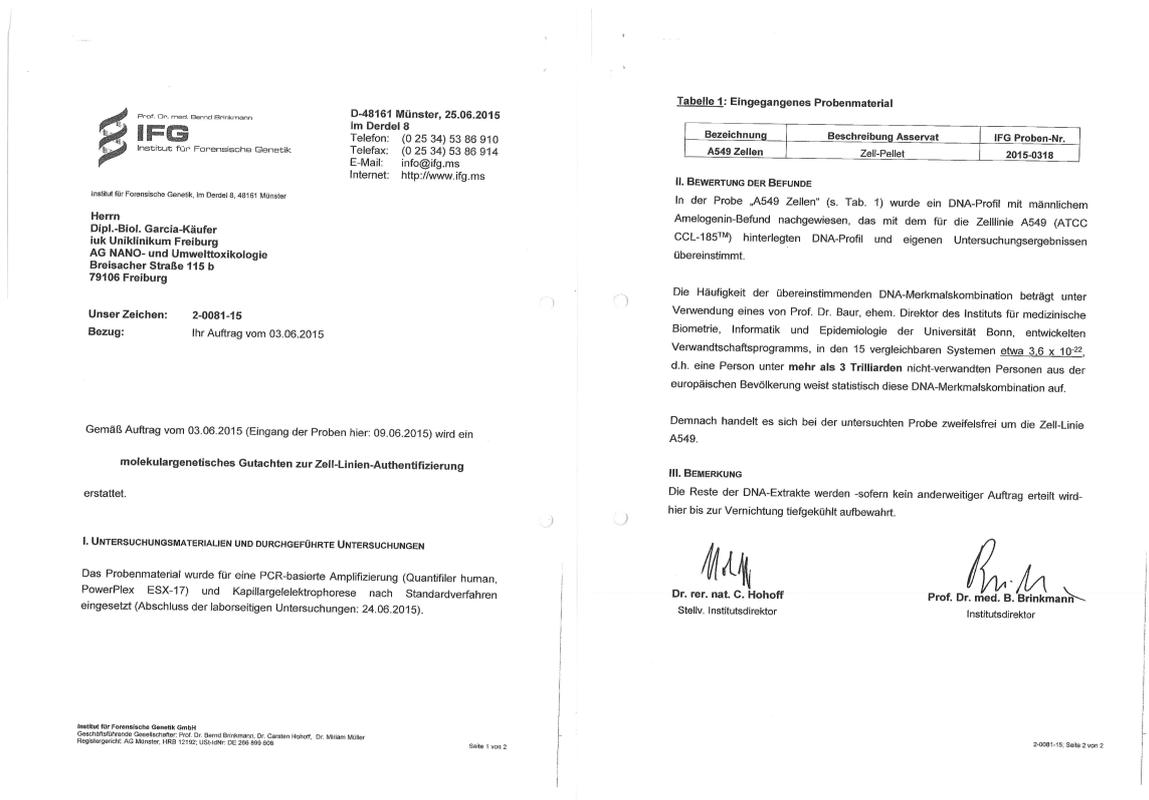
Tabelle 8.5 – Fortsetzung der vorherigen Seite

Instrument/Software	Hersteller
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Reinstwasseranlage Milli-Q	Merck Millipore (Darmstadt)
Rotator	Labinco B.V. (Bredastadt)
Software »BD FACSDiva«	Becton-Dickinson (Heidelberg)
Software »Fluidigm Real Time PCR Analysis«	Fluidigm (San Francisco)
Software »GenEx«	MultiD Analyses (Göteborg)
Software »Image J«	Open Source
Sonifizierungsapparatur Sonifier W-250 D	Branson Ultrasonics (Danbury)
Sterilwerkbank HERAsafeKS	Thermo Scientific (Langenselbold)
T100 Thermal Cycler	BioRad (München)
Tecan Infinite M200 PRO	Tecan Group (Crailsheim)
Tischzentrifuge Eppireaktionsgefäße	VWR International (Darmstadt)
Ultraschallbad Sonorex Super RK 255 H	Bandelin (Berlin)
Vitrocell Automated Exposure Station	Vitrocell (Waldkirch)
Vitrocell Cloud 12/12	Vitrocell (Waldkirch)
Vortex-Genie 2T	Scientific Industries (New York)
Waage VWR 1502	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad	Memert (Schwabach)
Wasserbad	Julubo (Seelbach)



# 9 Anhang

## 9.1 Zelllinien Authentifizierung



**Abbildung 9.1: Kopie des Berichts eines molekulargenetischen Gutachtens zur Zelllinien Authentifizierung durchgeführt vom Institut für Forensische Genetik und in Auftrag gegeben durch den Projektpartner des Universitätsklinikums Freiburg.**

Die von Seiten des Universitätsklinikums Freiburg in Auftrag gegebene Zelllinien Authentifizierung bestätigte, dass es sich bei den erhaltenen Zellen um die Zelllinie A549 handelt.

## 9.2 Liste der untersuchten Gene

In Tabelle 9.1 ist das Geneset der verwendeten HT RT-qPCR-Methode dargestellt. Die Primer-Sequenzen können in Fischer (2016) eingesehen werden.

**Tabelle 9.1: Auflistung aller in der HT RT-qPCR enthaltenen Gene.**

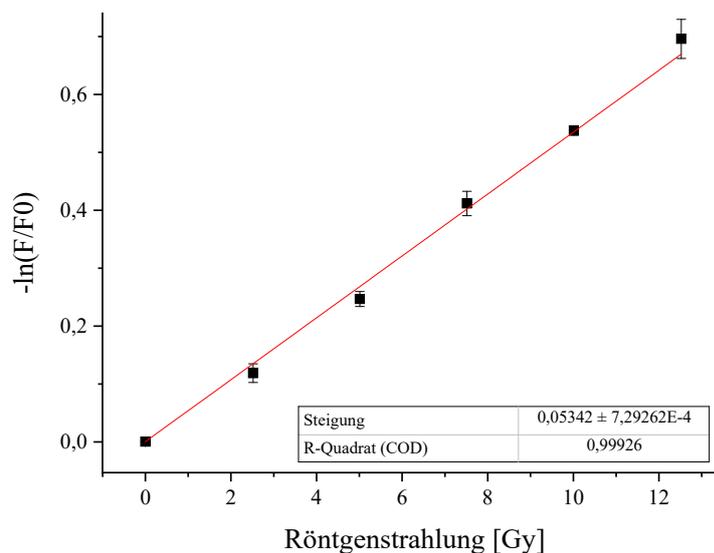
Referenzgene	Metall-homöostase	Oxidative Stressantwort	Apoptotische Faktoren und Zellzyklusregulatoren	DNA-Schadensantwort und Reparatur	Fremdstoff-metabolismus
ACTB	FTH1	CAT	APAF1	APEX1	ABCB1
B2M	MT1X	G6PD	AXIN2	ATM	ABCC1
GAPDH	MT2A	GCLC	BAX	ATR	ADH1B
GUSB	SLC30A1	GPX1	BBC3	BRCA1	ALDH1A1
HPRT1	TFRC	GPX2	BCL2	BRCA2	CYP1A1
		GSR	BCL2L1	DDB1	EPHX1
		HMOX1	BTRC	DDB2	GSTP1
		HSPA1A	CCND1	DDIT3	NAT1
		IL8	CDKN1A	ERCC1	NQO1
		KEAP1	CDKN1B	ERCC2	SULT1A1
		MAP3K5	CDKN2B	ERCC4	UGT1A
		NFE2L2	E2F1	ERCC5	
		NFKB1	EGFR	GADD45A	
		NFKB2	JUN	LIG1	
		NFKBIA	MDM2	LIG3	
		PRDX1	MYC	MGMT	
		SEPP1	PLK3	MLH1	
		SOD1	PMAIP1	MSH2	
		SOD2	PPM1D	OGG1	
		TXN	SIRT2	PARP1	
		TXNRD1	TNFRSF10B	PCNA	
			TP53	POLB	
			VEGFA	POLD1	
			XIAP	RAD50	
				RAD51	
				RRM2B	
				XPA	
				XPC	
				XRCC5	

## 9.3 Ergänzende Daten zur Bestimmung des zellulären Kupfergehalts

Die Ermittlung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32645 wurde für die hier verwendete Methode innerhalb der Arbeitsgruppe bereits von Fischer (2016) durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine Nachweisgrenze von  $0,14 \mu\text{g/mL}$ , eine Erfassungsgrenze von  $0,29 \mu\text{g/L}$  und eine Bestimmungsgrenze von  $0,43 \mu\text{g/L}$  für die Quantifizierung von Kupfer mittels GF-AAS.

Zusätzlich zu den Proben wurden stets ein Leeraufschluss und Wiederfindungen mitgeführt. Die für die Wiederfindungen ergaben sich Werte von 95 % für interne Wiederfindungen (Aufschluss aus Zellen + Kupferstandard) bzw. 105 % für externe Wiederfindungen (Aufschluss eines Kupferstandards).

## 9.4 Ergänzende Daten zur Quantifizierung von DNA-Strangbrüchen



**Abbildung 9.2: Darstellung der Kalibriergerade zur Berechnung der Anzahl an DNA-Strangbrüchen in A549-Zellen.** Die Zellen wurde mit Röntgenstrahlen entsprechender Dosis bestrahlt und direkt danach der AU unterzogen.

Die bisherige Berechnung der Anzahl an DNA-Strangbrüchen basiert auf der von Hartwig *et al.* (1996) durchgeführten Untersuchungen zum Einfluss von Röntgenstrahlung auf Hela- bzw. V79-Zellen. Im Zuge der fortschreitenden Technik und einer präziseren Erfassung der Strahlendosis erschien es im Rahmen der wissenschaftlichen Abschlussarbeit von Frau Bettina Homberg sinnvoll, die durchgeführten Experimente mit der hier verwendeten Zelllinie zu überprüfen.

Hierbei wurden die Zellen mit der gegebenen Dosis auf Eis bestrahlt und direkt im Anschluss der AU unterzogen. Es zeigte sich nach einer linearen Regression eine Gerade der Geradengleichung  $y = 0,05342x + 5,8 \cdot 10^{-4}$ . Die ermittelte Steigung von 0,05342 zeigte sich im Vergleich zur Studie von Hartwig *et al.* (1996), 0,06, leicht verändert. Es fand daher eine dementsprechende Abänderung der Berechnung zur Anzahl an DNA-Strangbrüchen statt.

## 9.5 Detaillierte Darstellung zur Beeinflussung der Genexpression

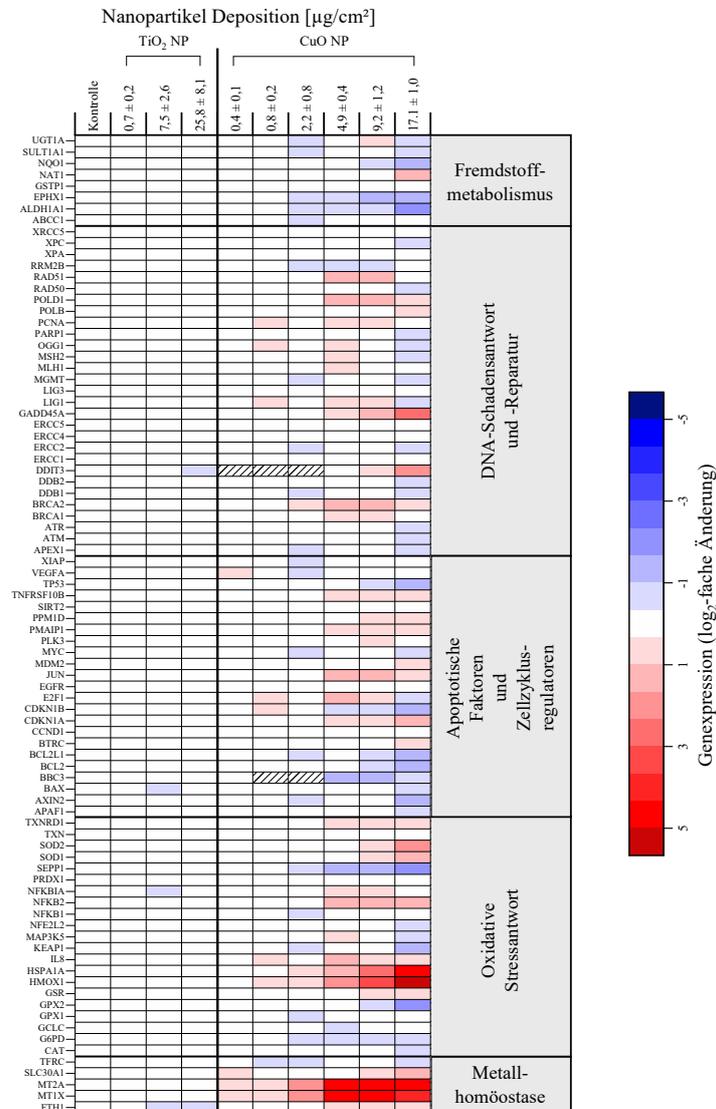


Abbildung 9.3: Schematische Darstellung zur Beeinflussung der Genexpression von A549-Zellen durch TiO<sub>2</sub> und CuO NP als Heatmap. Die Daten entsprechen denen auf Abb. 5.6, es wurden jedoch noch die Gennamen ergänzt.

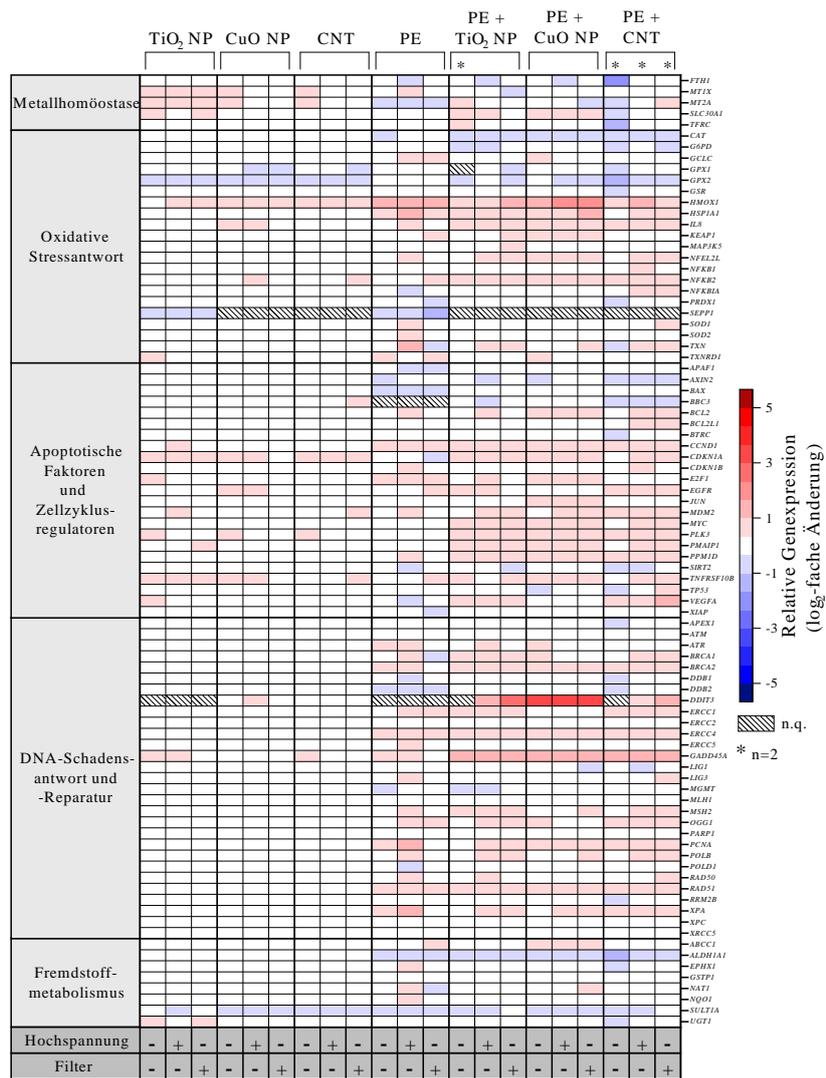


Abbildung 9.4: Schematische Darstellung der Beeinflussung des Genexpressionsprofils von A549-Zellen durch verschiedene Verbrennungsaerosole als Heatmap. Die Daten entsprechen denen auf Abb. 5.21, es wurden jedoch noch die Gennamen ergänzt.

## 9.5 Detaillierte Darstellung zur Beeinflussung der Genexpression

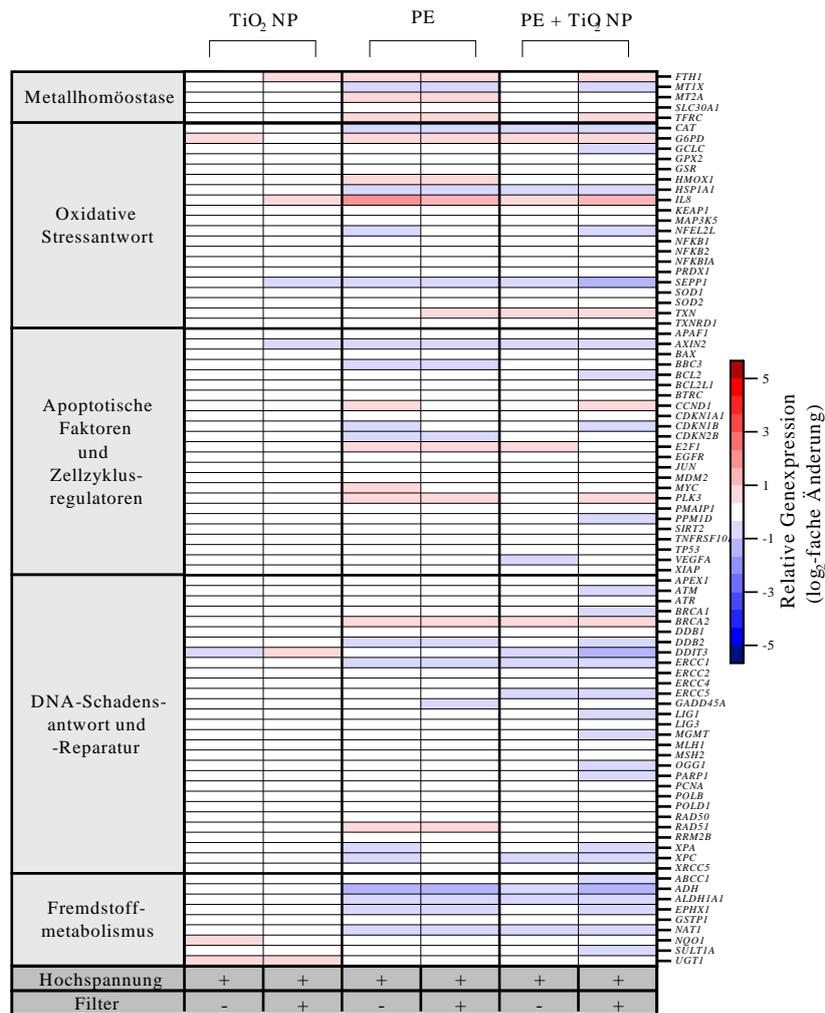
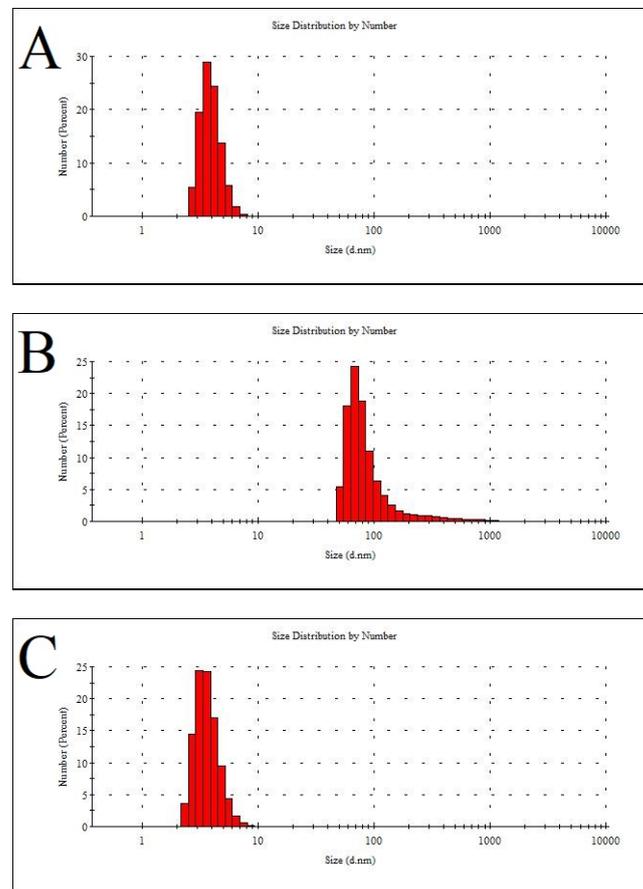


Abbildung 9.5: Schematische Darstellung der Beeinflussung des Genexpressionsprofils von 3D-Lungenzellkulturen durch verschiedene Verbrennungsaerosole als Heatmap. Die Daten entsprechen denen auf Abb. 5.21, es wurden jedoch noch die Gennamen ergänzt.

## 9.6 Ergänzende Daten zur Bestimmung gelöster Partikelfractionen

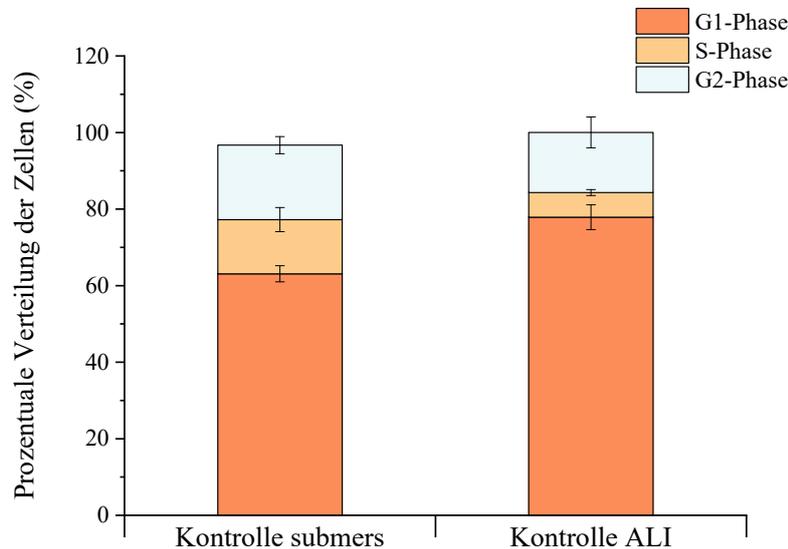


**Abbildung 9.6:** Darstellung des hydrodynamischen Partikeldurchmessers zur Überprüfung einer Abzentrifugation der Partikelfraktion im Zuge der Aufarbeitung für die GF-AAS-Analyse. Die Partikelsuspension ( $\text{TiO}_2$  NP) wurde dabei unter den gleichen Bedingungen der GF-AAS Aufarbeitung zentrifugiert (16.000 g, 1 h, 4 °C). Dargestellt sind die Messwerte aus zwei unabhängigen Versuchen.

**A:** Blank, **B:** Partikelsuspension nativ, **C:** Partikelsuspension zentrifugiert.

Um das Abzentrifugieren der Partikelfraktion im Zuge der Aufarbeitung zur Analyse mittel GF-AAS zu überprüfen, wurden DLS Messungen eines Blanks (A) sowie einer nativen (unbehandelten) Partikelsuspension ( $\text{TiO}_2$  NP) (B) und einer aufgearbeiteten (16.000 g, 1 h, 4 °C; C) Partikelsuspension ( $\text{TiO}_2$  NP) durchgeführt. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass die Partikelgrößenverteilung der zentrifugierten Partikelsuspension mit dem Blank übereinstimmt. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass durch die Aufarbeitung zur GF-AAS-Analyse unlösliche Partikel abzentrifugiert werden und daher nicht quantifiziert werden können.

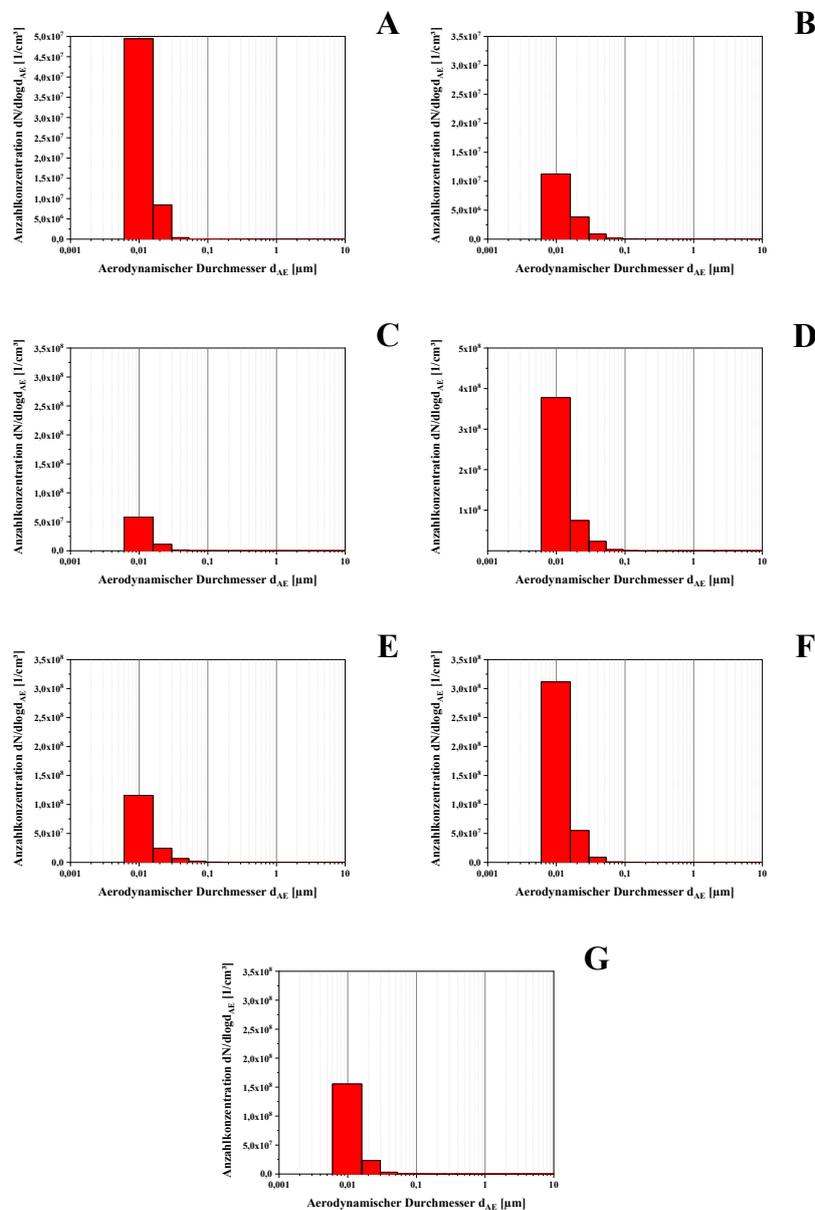
## 9.7 Vergleich der Zellzyklusverteilung zwischen submers und ALI kultivierten Zellen



**Abbildung 9.7: Darstellung der Zellzyklusverteilung submers und ALI kultivierter Zellen.** Die im ALI kultivierten Zellen wurde unter konfluenten Bedingungen untersucht. Dargestellt ist der Mittelwert aus zwei unabhängigen Versuchen  $\pm$  Range/2.

Die Untersuchungen zum Einfluss auf den Zellzyklus wurden im Rahmen der Masterarbeit von Frau Lisa Weis durchgeführt. Der Vergleich zweier unbehandelter Kontrollen unter den jeweiligen Kultivierungsbedingungen zeigte bereits eine Beeinflussung der Zellzyklusverteilung (Abb. 9.7). Bei einer Kultivierung durch ein ALI wurde im Vergleich zu submers wachsenden Zellen eine erhöhte G1-Phase ermittelt, die wahrscheinlich im Zusammenhang mit den konfluenten Bedingungen, und damit keiner Möglichkeit zur Proliferation, bei dieser Kultivierungsmethode steht. Aufgrund dessen war keine Untersuchung zur Beeinflussung der Zellzyklusverteilung durch die verwendeten NP möglich, ohne falsch positive Ergebnisse ausschließen zu können.

## 9.8 Partikeldurchmesser der Verbrennungsaerosole

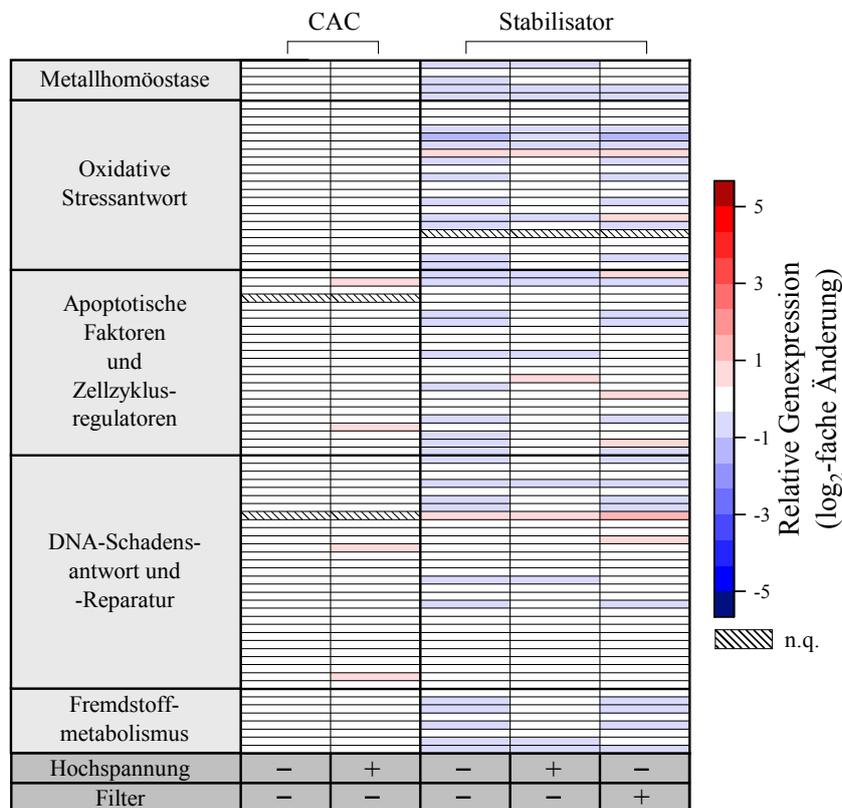


**Abbildung 9.8: Repräsentative Darstellung des aerodynamischen Durchmessers gegenüber der Anzahlkonzentration der Aerosole nach der Verbrennung des jeweiligen Substrates (A-G).** Die Daten wurden von Seiten des KIT-ITC erhoben.

**A:** TiO<sub>2</sub> NP, **B:** CuO NP, **C:** CNT, **D:** PE, **E:** PE + TiO<sub>2</sub> NP, **F:** PE + CuO NP, **G:** PE + CNT.

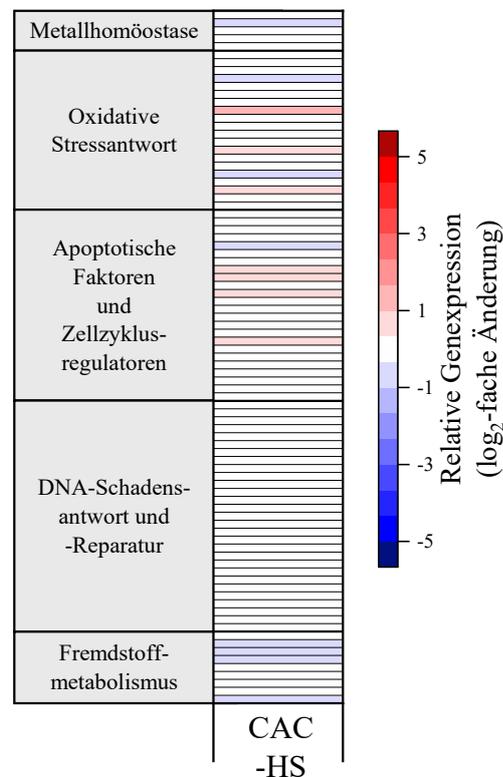
Es zeigte sich probenunabhängig ein vergleichbarer aerodynamischer Durchmesser der partikulären Fraktionen der Verbrennungsaerosole, wodurch eine variierende zelluläre Aufnahme aufgrund der Größenabhängigkeit dieses Prozess ausgeschlossen werden konnte.

## 9.9 Einfluss der Hochspannung und des Stabilisators auf das Genexpressionsprofil



**Abbildung 9.9:** Schematische Darstellung der Beeinflussung des Genexpressionsprofils von A549-Zellen durch das Anlegen einer Hochspannung und durch das Verbrennen des Stabilisators der CNT-Suspension (Gummi Arabicum). Eine rote Färbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine reduzierte Genexpression. Dargestellt sind, sofern nicht anderweitig gekennzeichnet, die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  Standardabweichung. n.q.: nicht quantifiziert.

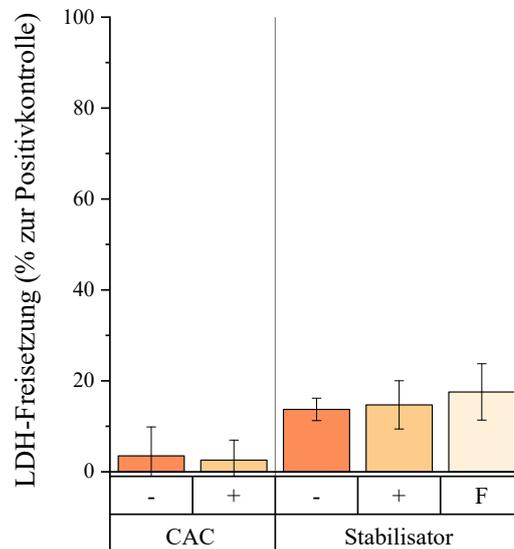
Während die Reinluftkontrolle (CAC) mit Hochspannung (2. Spalte) keine Auswirkung auf das Genexpressionsprofil der A549-Zellen zeigte, konnte eine leicht verminderte Genexpression unter dem Einfluss der Verbrennungsprodukte des Stabilisators (Gummi Arabicum) beobachtet werden.



**Abbildung 9.10: Schematische Darstellung der Beeinflussung des Genexpressionsprofils von MucilAir-Zellgewebe durch das Anlegen einer Hochspannung.** Es wurde auf eine Reinluftkontrolle mit angelegter Hochspannung normiert. Eine rote Färbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine reduzierte Genexpression. Dargestellt sind, sofern nicht anderweitig gekennzeichnet, die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  Standardabweichung. CAC: Reinluftkontrolle.

Das Anlegen einer Hochspannung zeigte keine relevante Veränderung des Genexpressionsprofils nach Exposition gegenüber Reinluft.

## 9.10 LDH-Freisetzung der Reinluftkontrollen

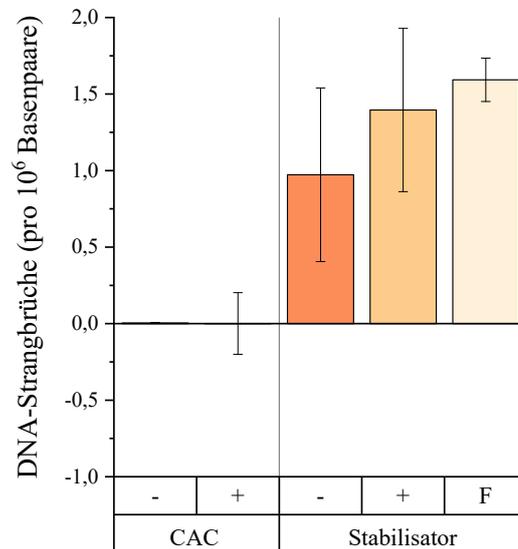


-: ohne Hochspannung; +: mit Hochspannung; F: Filter; CAC: Reinluftkontrolle

**Abbildung 9.11: LDH-Freisetzung durch synthetische Luft bzw. das Verbrennen des Stabilisators der CNT-Suspension (Gummi Arabicum) in Relation zu einer mitgeführten Positivkontrolle (100 %).** A549-Zellen wurden für vier Stunden in der Vitrocell® *Automated Exposure Station* gegenüber einem Verbrennungsaerosol exponiert und für weitere 20 Stunden nachinkubiert. Für jede Exposition wurden CACs und Expositionen gegenüber dem nativen Aerosol (-HS, -Filter), einer erhöhten Partikeldeposition (+HS, - Filter) sowie der reinen Gasfraktion des Aerosols (-HS, + Filter) untersucht. Dargestellt sind, sofern nicht anderweitig gekennzeichnet, die Mittelwerte aus drei unabh. Versuchen  $\pm$  SD.

Die Exposition gegenüber Reinluft zeigte eine geringfügige Freisetzung von LDH. Auch durch die Verbrennung des Suspensionsstabilisators Gummi Arabicum führte zu einer geringen LDH-Freisetzung.

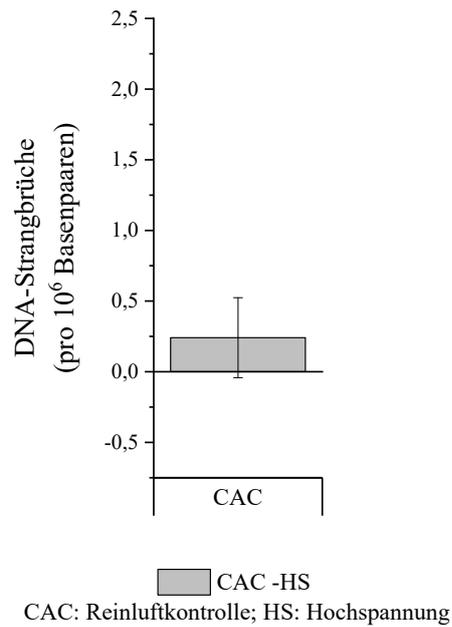
## 9.11 Induktion von Strangbrüchen durch das Anlegen einer Hochspannung und den Stabilisator



-: ohne Hochspannung; +: mit Hochspannung; F: Filter; CAC: Reinluftkontrolle

**Abbildung 9.12: Induktion von DNA-Strangbrüchen durch das Anlegen einer Hochspannung oder das Verbrennen des Stabilisators der CNT-Suspension (Gummi Arabicum).** Die Zellen wurden für vier Stunden in der Vitrocell Automated Exposure Station gegenüber einem Verbrennungsaerosol oder Reinluft (CAC) exponiert und für weitere 20 Stunden nachinkubiert. Dargestellt sind, sofern nicht anderweitig gekennzeichnet, die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SD.

Während das Anlegen der Hochspannung keine DNA-Strangbrüche induzierte, konnte dies unter dem Einfluss nach Verbrennen des Stabilisators der CNT-Suspension (Gummi Arabicum) festgestellt werden.



**Abbildung 9.13: Induktion von DNA-Strangbrüchen durch das Abschalten einer Hochspannung, es wurde auf die Reinluftkontrolle mit Hochspannung normiert.** Die Zellen wurden für vier Stunden in der Vitrocell Automated Exposure Station gegenüber Reinluft (CAC) exponiert und für weitere 20 Stunden nachinkubiert. Dargestellt sind, sofern nicht anderweitig gekennzeichnet, die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SD.

Es ist zu erkennen, dass das Abschalten der Hochspannung zu einer vernachlässigbaren und biologisch nicht relevanten Induktion an DNA-Strangbrüchen führt.

## 9.12 Donorinformationen 3D-Lungenzellkultur

**Tabelle 9.2: Tabellarische Zusammenfassung der Donorinformationen zum erworbenen MucilAir-Produkt.** TEER: Transepithelialer elektrischer Widerstand.

Donorinformation		Zellinformation		Qualitätskontrolle	
Alter	46	Zelltyp	hAEC/Bronchial	Sterilität	ja
Geschlecht	weiblich	Aussaat	04.12.2017	Mycoplasmen	nein
Abstammung	kaukasisch	Tag des ALI	11.12.2017	TEER [ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ]	$376 \pm 23$
Raucher	nein			Zilienschlag [Hz]	$7,2 \pm 0,3$
Pathologie	keine bekannt			Mucus	vorhanden
Batchnummer	MD1466901			HIV-1/HIV-2	negativ
				Hepatitis B	negativ
				Hepatitis C	negativ

## 9.13 Qualitative VOV-Analyse

**Tabelle 9.3: Tabellarische Zusammenfassung der qualitativ erfassten Substanzen aus der VOC-Analyse des nativen Verbrennungsgases. Aufgelistet sind nur identifizierte Substanzen.** %Area: prozentualer Anteil der Peakfläche an der Summe aller automatisch integrieren Peakflächen im Chromatogramm; Qual: Grad der Übereinstimmung mit der verwendeten Spektrenbibliothek.

Area (%)	Name	Qual
0,15	Ethanol	91
0,42	2-Propenal	76
	Diazoethan	47
0,44	2-Propanol	50
	Methoxyaceton	40
0,05	1,3-Cyclopentadien	87
	Isopropenylacetylen	74
0,05	2-Propen-1-ol	52
	3-Buten-1,2-diol	40
0,04	Cyclopenten	80
	1-Methyl-2-methylenecyclopropan	64
0,27	Nitromethan	83
	1-Amino-2-Propanol	35
0,08	1,5-Hexadien	91
	2-Cyclopropylidenpropan	72
0,81	1-Hexen	95
	Cyclopentanon	32
0,19	2-Butanon	64
	S-(+)-1,3-Butandiol	45
0,04	4-Methyl-1,3,2-dioxathian-2-oxid	53
	Tetrahydrofuran	49
0,05	3-Methylfuran	91
	2-Methylfuran	91
0,21	Essigsäure	91
0,09	Tetrahydrofuran	90
0,08	trans-2-Butenal	94
	Methacrolein	90
0,59	Benzol	95
0,11	Tetrahydro-2-methylfuran	83

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle 9.3 – Fortsetzung der vorherigen Seite

%Area (%)	Name	Qual
	2-Methylpentan	59
0,08	Cyclohexen	83
0,06	1-Penten-3-on	72
0,19	1-Hepten	95
	1-Hexen	47
0,05	n-Heptan	86
	3-Methylhexan	36
0,09	Dimethylsilandiol	52
0,09	2,4,4-Trimethyl-1-penten	93
	(Z)-5,5-Dimethyl-2-hexen	64
0,07	Methylmethacrylat	68
	2-Hydroxypropylmethacrylat	53
	Methylcrotonat	52
0,06	n-Hexadecan	89
	Heneicosan	46
	Docosan	41
0,09	6-Aza-5,7,12,14-tetrathiapentacen	78
	Ethyl-(2E)-3-[2-(Diethoxyphosphoryl)-4-(dimethylamino)phenyl]-2-propenoat	74
0,76	1-Dodecen	62
	1-Tridecanol	58
0,14	Ethyl-2-isopropylphenyloxalsäureester	70
	(4-Methoxyphenyl)methylcapronsäureester	38
0,19	Nonylphenol	64
	4-tert-Octylphenol	50
0,16	Nonylphenol	91
0,28	2,3-Dichloroquinoxalin	58
	2,4-Dichloro-1,5-naphthyridin	46
0,40	4-Methoxy-?-methylbenzenpropanol	64
	4-(1,1-Dimethylpropyl)phenylacetat	59
	Adenin	53
0,07	2-Methyl-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenol	53
	1-(1,1-Dimethylethyl)-4-methoxybenzen	53
0,05	Estragol	50
	3-Methoxy-1H-indazol	27
	4-Phenacylquinazolin	50
	Fortsetzung auf der nächsten Seite	

Tabelle 9.3 – Fortsetzung der vorherigen Seite

%Area (%)	Name	Qual
	2-Oxo-4,6-diphenyl-1,2-dihydropyrimidin	45
0,12	[1,1':3',1''-Terphenyl]-2'-ol	99
	[1,1':3',1''-Terphenyl]-4'-ol	96
	6,6-Diphynylbicyclo[3.1.0]hex-3-en-2-on	87
0,06	1,2,3,3a,3b,4,5,6,7,7a,9,10,11,12-Tetradecahydrobenzo[b]fluoranthen	60
	1,2,3,3a,4,5,7,8,9,10,11,12,12a-Tetradecahydrobenzo[b]pyren	53
62,73	2,5-Diphenyl-1,4-benzoquinon	94
18,68	1,2,3,4,5,6,7,8-octahydro-9-phenylanthracen	72
	1,2,3,6,7,8,9,10,11,12-Decahydrobenzo[e]pyren	72
0,92	2,5-dDiphenylfuran	64
	2,6-Diphenyl-4Hpyran-4-on	55
1,67	1-Tridecanol	91
	1-Dodecen	91
0,06	2-Methyltridecan	53
	4-Methyltridecan	49
0,06	n-Pentadecan	91
	Heneicosan	91
0,19	Tetracosan	83
	Docosan	74
0,08	Diethylphtalat	87
0,09	3,3-Dimethylbutanamid	64
	Methylether-2-hexanol	59
0,06	4-Methyloctan	76
	5-Methyldodecan	43
0,05	p-Xylol	95
	m-Xylol	94
0,06	1-Hepten-3-on	87
	1-Octen-3-on	53
0,07	1-Nonen	92
	1-Decen	58
0,30	Cyclohexanon	95
	2-Methylcyclopentanon	70
0,08	n-Nonan	72
	n-Octan	50

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle 9.3 – Fortsetzung der vorherigen Seite

%Area (%)	Name	Qual
0,18	4-Ethyloctan	64
	2,2,5,5-Tetramethylhexan	53
1,28	Benzaldehyd	97
0,19	Phenol	91
0,50	Benzonitril	94
	Tricyclo[3.1.0.0(2,4)]hex-3-en-3-carbonitril	91
0,26	Octamethylcyclotetrasiloxan	91
	Bis-(Trimethylsilyl)ether-2'-6'-dihydroxyacetophenon	72
0,47	2-Ethyl-1-hexanol	78
0,06	Benzylalkohol	83
0,04	Phenylacetaldehyd	64
	Styroloxid	25
0,35	Acetophenon	91
	2-Chloracetophenon	64
0,04	1-(1,2-Dimethylpropyl)-1-methyl-2-nonylcyclopropan	80
	cis-1,1,3,4-Tetramethylcyclopentan	60
0,07	n-Undecan	96
	Nonanal	72
0,15	Decamethylcyclopentasiloxan	78
0,05	1-Dodecen	95
	Heneicosan	55
0,06	Decanal	91
0,06	Ethylenglykolmonophenylether	91
0,05	2-Chloro-4-(4-methoxyphenyl)-6-(4-nitrophenyl)pyrimidin	50
	tert-Butyldimethylsilylstearinsäureester	47
0,08	n-Undecan	87
	Triacontan	56
0,08	Isopropenylmethylketon	50
	Isobutanal	43
0,14	Toluol	94
0,09	4-Methylpent-1-en-3-on	59
	Diethylcyanamid	38
0,08	Methyl ?-arabinosid	74
	Buttersäure	64
0,17	Cyclooctan	91
	Fortsetzung auf der nächsten Seite	

Tabelle 9.3 – Fortsetzung der vorherigen Seite

%Area (%)	Name	Qual
	1-Octen	90
0,04	Styrol	95
0,34	Nonylphenol	99
0,04	8-Methylheptadecan	74
	4-Methyldodecan	74
0,10	2-Methyldecen	52
	4-Methyl-1-undecen	46
0,11	Benzoylthiocyanat	72
	1-Phenyl-2-(4-pyridinyl)ethanon	72
0,06	Diphenylmethan	94
	2-Methylbiphenyl	90
	?-Phenyl-N-[2-(2,2,2-trifluoroethoxy)ethyl]-Benzenacetamid	80
0,25	Phenylacetylen	64
0,06	Benzophenon	60
0,08	Octan	90
	Nonan	64
0,30	Hexamethylcyclotrisiloxan	91
	Decamethyltetrasiloxan	64
0,14	2-Cyclopenten-1-on	93
	3-Methyl-1H-pyrazol	49
	Dehydromevalonolacton	45
0,09	2,4-Dimethyl-1-hepten	94
	1,2,3-Trimethylcyclopentan	83
	5-Methyl-1-hepten	72

## 9.14 Tabellarische Zusammenfassung «Toxnet» Recherche

**Tabelle 9.4: Tabellarische Zusammenfassung zur Toxizität der qualitativ erfassten Substanzen.**

Aufgelistet sind vier toxische Endpunkte in drei Bewertungsstufen. ✓: positiver Effekt bekannt; ?: keine Daten vorhanden; X: negativer Effekt bekannt.

Nummer	Wirkung			
	Reizend	Akut toxisch	Genotoxisch	Weitere
1	✓	✓	?	✓
2	?	?	?	?
3	?	?	?	?
4	✓	✓	X	✓
5	✓	X	X	✓
6	✓	✓	✓	✓

# 10 Publikationsliste

## Publikationen in Fachzeitschriften

Fischbach A., Krüger A., Hampp S., Assmann G., Rank L., **Hufnagel M.**, Stöckl M.T., Fischer J.M.F., Veith S., Rossatti P., Ganz M., Ferrando-May E., Hartwig A., Hauser K., Wiesmüller L., Bürkle A., Mangerich A. 2018. „*The C-terminal domain of p53 orchestrates the interplay between non-covalent and covalent poly(ADP-ribosylation) of p53 by PARP1.*“ *Nucleic Acids Res.*, 46(2):804-22.

## **Publikationen in Vorbereitung**

**Hufnagel, M.**, Schoch S., Wall J., Strauch, B., Hartwig A. „*Revealing the toxicity of nanoparticles using air-liquid interface exposure.*“

**Hufnagel M.\***, Teuscher, N.\*, Wingert, N., Garcia-Käufer, M., Hübner, C., Berger, M., Krebs, T., Baumann, W., Mülhopt, S., Paur H.-R., Gminski, R., Stapf, D., Hartwig, A. „*Impact of nanocomposite combustion aerosols on A549 cells and a 3D airway model.*“ \*Geteilte Erstautorenschaft

Wingert, N., **Hufnagel M.**, Garcia-Käufer, M., Hübner, C., Berger, M., Krebs, T., Hartwig, A., Gminski, R. „*Cellular response of A549 cells and a 3D airway model to grinding-induced nanocomposite dusts.*“

Rank L., Krüger A., Reber J.M., **Hufnagel M.**, Schmalz M., Trussina I., Lehner M., Zübel T., Schütz K., Marx A., Hartwig A., Ferrando-May E., Bürkle A., Mangerich A. „*Poly(ADP-ribose) chain length and branching are essential for cellular physiology and stress response.*“

**Hufnagel M.**, Schilling R., Strauch B.M., Hartwig A. „*Essentielle Spurenelemente, toxische Metallverbindungen: Funktionen, Wirkungsmechanismen und Konsequenzen für die Risikobewertung.*“

### **Vorträge auf Fachtagungen**

Hufnagel M., Schoch S., Strauch B., Hartwig A. *Gene expression profiling of copper oxide and titanium dioxide nanoparticles after air-liquid interface exposure*. 4. Fachtagung der Experimentellen und Klinischen Pharmakologen und Toxikologen in Baden-Württemberg, 15.07.2016, Konstanz (DE)

Hufnagel M., Schoch S., Strauch B., Hartwig A. *Revealing the impact of CuO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles on alveolar epithelial-like cells after air-liquid interface exposure by gene expression analysis*. Bridging the disciplines - NanoForum for Young Scientists, 24. - 26.08.2017, Mainz (DE)

Hufnagel M., Schoch S., Strauch B., Hartwig A. *The impact of CuO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles on gene expression following air-liquid interface exposure*. NanoSafety 2017, 11. - 13.10.2017, Saarbrücken (DE)

Hufnagel M., Schoch S., Strauch B., Hartwig A. *Elucidating the toxicological potential of nanoparticles using air-liquid interface exposure*. 46<sup>th</sup> Meeting of the European Environmental Mutagenesis and Genomics Society/30<sup>th</sup> Meeting of the German Society for Environmental Mutation Research, 18. - 21.03.2018, Potsdam (DE)

### **Posterbeiträge auf Fachtagungen**

Hufnagel M., Schoch S., Strauch B., Hartwig A. *Copper oxide nanoparticles: Impact on alveolar epithelial-like cells following air-liquid interface exposure*. 45<sup>th</sup> Meeting of the European Environmental Mutagenesis and Genomics Society, 14. - 18.08.2016, Kopenhagen (DK)

Hufnagel M., Schoch S., Strauch B., Hartwig A. *Impact of CuO nanoparticles on genomic stability after an air-liquid interface exposure*. Symposium on DNA damage response, genetic instability and cancer, 25. - 26.11.2016, Mainz (DE)

Hufnagel M., Schoch S., Strauch B., Hartwig A. *Verwendung von Genexpressionsanalysen zur Aufklärung des Wirkmechanismus von CuO Nanopartikeln*. 46. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 25. - 27.09.2017, Würzburg (DE)

---

Hufnagel M., Schoch S., Hartwig A. *Genotoxicity of CuO nanoparticles determined by high-throughput RT-qPCR and air-liquid interface exposure*. DNA-Repair 2018 – 15<sup>th</sup> Biennial Meeting of the DGDR, 9. - 12.09.2018, Karlsruhe (DE)

Hufnagel M., Schoch S., Strauch B., Hartwig A., *Application of air-liquid interface exposure combined with high-throughput RT-qPCR to investigate the toxicological impact of nanoparticles*. NanoTox 2018 – 9<sup>th</sup> International Conference on Nanotoxicology, 18. - 21.09.2018, Neuss (DE)

Hufnagel M., Teuscher N., Wall J., Mackert M., Mühlhopt S., Hartwig A. *Impact of nanocomposite combustion-generated aerosols on genomic stability*. NanoTox 2018 - 9<sup>th</sup> International Conference on Nanotoxicology, 18. - 21.09.2018, Neuss (DE)

**Preise und Auszeichnungen**

Mutagenesis/Oxford University Press Poster Award, 45<sup>th</sup> Meeting of the European Environmental Mutagenesis and Genomics Society, 14. - 18.08.2016, Kopenhagen (DK)

Young Speaker Award, Bridging the disciplines - Nanoforum for Young Scientists, 24. - 26.08.2017, Mainz (DE)