

Erfassung von Genexpressionsprofilen in Zellkulturmodellen der
Epidermis mittels quantitativer Hochdurchsatz Realtime PCR und
ihre Beeinflussung durch partikuläre Metallverbindungen sowie
Mineralölkohlenwasserstoffe

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

Diplom-Lebensmittelchemiker

Paul Martin Schumacher

aus

Heidelberg

KIT-Dekan:	Prof. Dr. Manfred Wilhelm
1. Referentin:	Prof. Dr. Andrea Hartwig
2. Referent:	Hon. Prof. Dr. Thomas Kuballa
Tag der mündlichen Prüfung:	08.12.2020

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 27.10.2020

Paul Martin Schumacher

Für einen sechsjährigen Jungen,
der mit einem Vergrößerungsglas
im Garten sitzt, Insekten beobachtet und sagt:
„Wenn ich groß bin, werde ich einmal Forscher.“

INHALTSVERZEICHNIS

1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 EINLEITUNG	4
2.1 DIE MENSCHLICHE HAUT	4
2.1.1 EPIDERMIS	4
2.1.2 DERMIS	5
2.2 UV-STRAHLUNG	6
2.3 MINERALÖLE	8
2.3.1 VERWENDUNG VON MINERALÖLEN IN KOSMETIKA	10
2.3.2 ANALYTIK VON MINERALÖLEN	10
2.3.3 KERNSPINRESONANZSPEKTROSKOPIE (¹ H-NMR)	11
2.3.4 PRÜFVERFAHREN IP346	12
2.3.5 TOXIKOLOGISCHE BEWERTUNG VON MINERALÖLEN	13
2.3.6 METABOLISMUS DER HAUT	15
2.3.7 PHOTOTOXIZITÄT	16
2.4 NANOPARTIKEL	18
2.4.1 NANOMATERIALIEN IN KOSMETIKA	19
2.4.2 DERMAL E AUFNAHME VON NANOPARTIKELN	20
2.4.3 KUPFEROXIDNANOPARTIKEL	21
2.4.4 CHROMOXID-PARTIKEL	22
3 ZIELSETZUNG	26
4 MATERIAL UND METHODEN	28
4.1 ZELLKULTUR	28
4.1.1 ZELLINIEN UND KULTIVIERUNG	28
4.1.2 KRYOKONSERVIERUNG UND INKULTURNAHME	29
4.1.3 INKUBATIONEN	30
4.2 ZELLZAHL UND KOLONIEBILDUNGSFÄHIGKEIT	34
4.3 ERMITTLUNG DER ZYTOTOXIZITÄT MITTELS ATP-ASSAY	35
4.4 BESTIMMUNG DES ZELLULÄREN KUPFERGEHALTES MITTELS GRAPHITROHR- ATOMABSORPTIONSSPEKTROMETRIE	35
4.5 EINFLUSS VON ENDOZYTÖSEINHIBITOREN AUF DIE ZELLULÄRE KUPFERAUFNAHME	36

4.6	BESTIMMUNG DES INTRAZELLULÄREN ROS-GEHALTES MITTELS DCF-DA ASSAY.....	37
4.7	PROTEINEXTRAKTION.....	38
4.8	WESTERN BLOT	38
4.9	GENEXPRESSIONSANALYSEN	40
4.9.1	RNA-ISOLIERUNG UND QUANTIFIZIERUNG	40
4.9.2	CDNA-SYNTHESE	41
4.9.3	PRÄAMPLIFIKATION (SPECIFIC TARGET AMPLIFICATION).....	41
4.9.4	PRIMER- UND PROBENVORBEREITUNG	42
4.9.5	96X96 DYNAMIC ARRAY IFC QPCR ANALYSE.....	43
4.9.6	DATENANALYSE UND DARSTELLUNG.....	44
4.10	DNA-METHYLIERUNGSANALYSEN.....	45
4.10.1	DNA-ISOLIERUNG	45
4.10.2	ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY	46
4.11	KOLORIMETRISCHER NACHWEIS VON CHROM(VI)	46
4.12	PARTIKELCHARAKTERISIERUNG.....	47
4.12.1	PARTIKEL	47
4.12.2	TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPIE	47
4.12.3	HYDRODYNAMISCHE GRÖßENVERTEILUNG.....	48
4.12.4	LÖSLICHKEITSBESTIMMUNG VON CHROM(III)-OXID-PARTIKELN	49
4.13	KERNSPINRESONANZSPEKTROSKOPIE (¹ H-NMR)	49
5	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	52
5.1	MINERALÖLKOHLENWASSERSTOFFE	52
5.1.1	ZYTOTOXIZITÄTSUNTERSUCHUNGEN	53
5.1.2	GENEXPRESSIONSANALYSEN.....	60
5.1.3	WESTERN BLOT	71
5.1.4	NACHWEIS REAKTIVER SAUERSTOFFSPEZIES	75
5.2	KUPFERVERBINDUNGEN	79
5.2.1	PARTIKELCHARAKTERISIERUNG.....	80
5.2.2	ZYTOTOXIZITÄT DER KUPFERVERBINDUNGEN.....	81
5.2.3	GENEXPRESSIONSANALYSEN MIT KUPFERVERBINDUNGEN	84
5.2.4	AUFNAHMESTUDIEN	94
5.2.5	NACHWEIS REAKTIVER SAUERSTOFFSPEZIES	98
5.3	CHROMVERBINDUNGEN.....	101

5.3.2 ZYTOTOXIZITÄT DER CHROMVERBINDUNGEN	103
5.3.3 GENEXPRESSION	108
5.3.4 NACHWEIS REAKTIVER SAUERSTOFFSPEZIES	115
5.3.5 DNA-METHYLIERUNGSMUSTER.....	117
6 ZUSAMMENFASSENDER DISKUSSION	124
7 LITERATURVERZEICHNIS	138
8 ANHANG	150
8.1 VERWENDETE MATERIALIEN	150
8.1.1 VERWENDETE CHEMIKALIEN	150
8.1.2 VERWENDETE LÖSUNGEN UND PUFFER.....	152
8.1.3 VERWENDETE VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	155
8.1.4 VERWENDETE ANTIKÖRPER.....	156
8.1.5 VERWENDETE KITS.....	156
8.1.6 INSTRUMENTE UND SOFTWARE	156
8.2 UNTERSUCHTE GENE	158
8.3 EIGENSCHAFTEN DER KUPFEROXID-NANOPARTIKEL.....	161
8.4 NACHWEIS-, BESTIMMUNGS- UND ERFASSUNGSGRENZE DER KUPFERBESTIMMUNG	161
8.5 KOLONIEBILDUNGSFÄHIGKEIT NACH B[a]P-BEHANDLUNG	162
8.6 PARAMETER DER ¹ H-NMR-SPEKTROSKOPIE.....	163
8.7 MIGRATIONSSTUDIEN VON LABORWARE IN DMSO	164
8.8 ZYTOTOXIZITÄT DER ENDOZYTOSSEINHIBITOREN	165
8.9 DETAILLIERTE DARSTELLUNG ZUR BEEINFLUSSUNG DER GENEXPRESSION.....	166
8.9.1 BEHANDLUNG MIT B[a]P.....	166
8.9.2 BEHANDLUNG MIT MOAH (GRAVEX 913 EXTRAKTE)	168
8.9.3 BEHANDLUNG MIT EINZELSUBSTANZEN (MOAH).....	170
8.9.4 BEHANDLUNG MIT KUPFERVERBINDUNGEN (HACAT)	172
8.9.5 BEHANDLUNG MIT KUPFERVERBINDUNGEN (EA.HY926 ZELLEN)	174
8.9.6 BEHANDLUNG MIT CHROMVERBINDUNGEN.....	176
8.10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	179
8.11 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	181
8.12 TABELLENVERZEICHNIS.....	186
10 PUBLIKATIONSLISTE	188

1 ZUSAMMENFASSUNG

Die Haut ist das funktionell vielseitigste und größte Organ des Menschen. Ihr Aufbau gliedert sich in drei Bestandteile, wobei die Epidermis die äußerste Schicht der Haut darstellt. Sie besteht aus einem mehrschichtigem verhornten Plattenepithel, dessen Zellen einem ständigen Erneuerungsprozess unterliegen. Die Dermis grenzt eng an die darüber liegende Epidermis an und enthält Bindegewebsfasern sowie ein fein kapillarisiertes Blutgefäßnetz. Dieses dient neben der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung auch zur Thermoregulation des Körpers. Die Unterhaut (Subcutis) beinhaltet vor allem große Blutgefäße, druck- und temperaturempfindliche Sinneszellen sowie das subcutane Fett- und Bindegewebe. Zu den wichtigsten Funktionen der oberen Hautschichten gehören der Schutz vor exogenen Faktoren wie Pathogenen, Druck, Hitze, Chemikalien und solarer UV-Strahlung. Gerade kosmetische Mittel müssen daher bei normalem oder vernünftigerweise voraussehbarem Gebrauch sicher und frei von Inhaltsstoffen sein, die adverse Effekte auf der Haut verursachen oder dazu beitragen, dass nach zusätzlicher Sonnenlichtexposition Hautirritationen die Folge sind. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der toxikologischen Bewertung von partikulären Kupfer- und Chromverbindungen sowie Mineralölkohlenwasserstoffen, die in kosmetischen Mitteln Einsatz finden und deren dermale Exposition mit potentiell adversen Effekten einhergehen könnte. Für die toxikologischen Untersuchungen kamen Modellzelllinien der Haut zum Einsatz, die verschiedene Gewebestrukturen nachempfinden sollten. Gewonnene Erkenntnisse über potentielle Wirkmechanismen sollen bei der toxikologischen Risikobewertung der betroffenen Agenzien helfen.

In der toxikologischen Risikobewertung haben sich in der Vergangenheit Hochdurchsatz Genexpressionsanalysen etabliert, um mechanistische Untersuchung adverser Effekte zu untersuchen. Die substanzspezifischen Veränderungen der Genexpressionsmuster gelten dabei als sensitiver Indikator für das toxikologische Potential einer Noxe und ermöglichen eine prädiktive Risikoabschätzung. Die dabei untersuchten Gene geben Hinweise auf transkriptionelle Veränderungen vielfältiger zellulärer Mechanismen wie dem Fremdstoffmetabolismus, der Metallhomöostase, der oxidativen Stressantwort, der Zellzyklusregulation und der Apoptose sowie der DNA-Schadenserkennung und -Reparatur.

Zur Identifikation sensibler *Targets* der Haut wurde auf zwei Zelllinien zurückgegriffen, die in den äußeren Hautschichten lokalisiert sind. Humane Keratinozyten (HaCaT) stellen den häufigsten Zelltyp der Epidermis dar, wohingegen Blutgefäß-auskleidende Epithelzellen (EA.hy926) in der Grenzschicht der Epidermis und Dermis anzutreffen sind und dort vor allem in unmittelbarer Nähe von Hautanhangsgebilden wie Haarfollikel oder Schweißdrüsen in Kontakt mit Fremdstoffen kommen. Die Epidermiszellen wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl mit Mineralölkohlenwasserstoffen als auch mit Chrom- und Kupferverbindungen behandelt.

Mineralöle werden in diversen kosmetischen Mitteln aufgrund ihrer konsistenzgebenden und emollienten Eigenschaften sowie ihrer hohen Hautverträglichkeit eingesetzt. Die dabei verwendeten Mineralöle sind hochaufgereinigte, komplexe Gemische von Kohlenwasserstoffen, bei denen zwischen *mineral oil saturated hydrocarbons* (MOSH) und *mineral oil aromatic hydrocarbons* (MOAH) differenziert wird. Aufgrund von Strukturanalogien zu polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) wird vermutet, dass durch Verunreinigungen oder durch Verwendung von Mineralölrohstoffen minderer Qualität MOAH enthalten sein können, von welchen eine potentiell kanzerogene Wirkung ausgehen kann.

Zunächst erfolgten Zytotoxizitätsuntersuchungen des Keratinozytenmodells mit ausgewählten Einzelsubstanzen der MOAH sowie mittels LC-GC-extrahierten MOAH-Fractionen eines Mineralölrohstoffes. Da es in der sonnenlichtexponierten Haut durch Koexposition von UV-Strahlen und PAK zu phototoxischen Effekten kommt, wurde zusätzlich die Bestrahlung mit künstlichem Sonnenlicht für die Experimente der MOAH berücksichtigt. Sowohl Zytotoxizitäts- als auch Genexpressionsanalysen der Koexposition zeigten, dass photoaktive, mehrkernige Aromaten zum Teil starke adverse Effekte hervorriefen. Dabei wurden vor allem Gene der NRF2-regulierten oxidativen Stressantwort induziert. Zudem führte die Koexposition in den Keratinozyten zur Induktion von Genen des Zellzyklusarrestes und der Apoptose. Die alleinige Behandlung mit MOAH-Extrakten zeigte keine phototoxischen Effekte. Einzig das Gen *CYP1A1* wurde vermehrt exprimiert. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass in den analysierten MOAH-Fractionen planare, aromatische Kohlenwasserstoffe enthalten waren, die als Substrate zu einer Aktivierung des Arylhydrocarbon-Rezeptors (AhR) dienten. Die Liganden des AhR wurden somit erfolgreich durch die LC-GC-Aufreinigung extrahiert. Synergistische oder additive Effekte der untersuchten MOAH-Fractionen mit künstlichem Sonnenlicht konnten nicht identifiziert werden. Auf Genexpressionsebene ließ dies darauf schließen, dass nur ein geringer Anteil der Verbindungen ausgedehnte Aromatensysteme besaßen, von denen keine phototoxischen Effekte ausgingen.

Weitere Analysen wurden durchgeführt, um Unterschiede der mechanistischen Wirkweise von Kupferoxid-Nanopartikeln (CuO) und löslichem Kupferchlorid (CuCl₂) in Keratinozyten und Endothelzellen zu untersuchen. CuO NP gelten dabei als vielversprechende Alternative zu chemischen Bakteriziden und sind aufgrund ihrer Hitzebeständigkeit, der Lagerstabilität sowie ihres verhältnismäßig geringem allergenen Potentials favorisiert für die Anwendung in Bedarfsgegenständen und kosmetischen Mitteln. Aus den durchgeführten Zytotoxizitätsstudien wurde ersichtlich, dass die Keratinozyten sensitiver auf CuCl₂ reagierten als auf CuO NP. Gegenteilige Effekte ließen sich bei den Endothelzellen beobachten. Hier führten die CuO NP zu einer starken Reduktion der Zellviabilität, wohingegen die Inkubationen mit CuCl₂ in den entsprechenden Konzentrationsbereichen keine Zytotoxizität aufzeigten. HaCaT Zellen zeigten keine Unterschiede in den Expressionsniveaus nach Behandlung von löslichem und nanopartikulärem Kupferverbindungen. EA.hy926 zeigten im Gegensatz zu den HaCaT Zellen nach Behandlung mit CuCl₂ und CuO NP Unterschiede in ihren Genexpressionsmustern. Nanopartikuläres CuO führte hierbei zu ausgeprägten Effekten in Genen der Metallhomöostase und der oxidativen Stressantwort.

Aufnahmestudien der Nanopartikel und Messungen des oxidativen Stressniveaus der Zellen deuteten auf abweichende Aufnahmemechanismen in den beiden Gewebetypen hin. Für zukünftige Fragestellungen sollte daher, neben den am häufigsten anzutreffenden Zelltypen, stets das sensitivstes *Target* des Zielgewebes in die Untersuchungen miteinbezogen werden.

Neben partikulären Kupferverbindungen finden auch Chrompartikel in kosmetischen Mitteln, beispielsweise als grüne Pigmente in Lidschatten oder Mascara, Verwendung. Eine weitere dermale Expositionsquelle gegenüber partikulären Cr-Verbindungen stellen Ledererzeugnisse dar, die mithilfe von Cr(III)-Salzen gegerbt werden. Herstellungsbedingte Verunreinigungen mit krebserzeugenden Chromaten sind bei mangelhafter Prozessführung nicht auszuschließen. Daher wurden Keratinozyten mit Cr₂O₃ Partikeln drei verschiedener Hersteller sowie den löslichen Referenzverbindungen Chromchlorid (CrCl₃) und Kaliumdichromat (K₂Cr₂O₇) behandelt. Während zwei der drei untersuchten Partikel frei von Cr(VI) waren und analog zu CrCl₃ keinerlei zytotoxischen Effekte oder Abweichungen in den Genexpressionsmustern zeigten, wiesen Partikel des dritten Herstellers hohe Gehalte von bis zu 4 % (w/w) an löslichem Cr(VI) auf. Nach der Ergebnisbetrachtung gab es Hinweise darauf, dass die adversen Effekte der verunreinigten Chrompartikel allein auf das freigesetzte Cr(VI) zurückzuführen waren. Die Schadensantwortmuster in den Genexpressionsprofilen entsprachen nach Partikelinkubation den Profilen von löslichem Cr(VI). Ausgeprägte Dosis-Wirkungsbeziehungen der beiden Verbindungen äußerten sich dabei in einer gesteigerten Expression von oxidativen Stressmarkern (*HMOX1*, *HSPA1A*), Zellzyklusregulatoren (*CDKN1A*, *JUN*) und Genen der Apoptose (*APAF1*, *PMAIP1*). In hohen Konzentrationen hemmten die Cr(VI)-haltigen Cr₂O₃ Partikel, analog zum löslichem K₂Cr₂O₇, die Expression DNA-Reparatur-assoziiierter Gene. Die Repression von DNA-Reparaturgenen wurde dabei mit Einflüssen von Cr(VI) auf epigenetische Modifikationen der Zelle in Verbindung gebracht. Untersuchungen des genomweiten DNA-Methylierungsmusters zeigten eine zeit- und konzentrationsabhängige Abnahme des globalen Methylierungsgrades der DNA um mehr als 50 % nach einer 24 h Cr(VI)-Inkubation. Die globale Hypomethylierung schien jedoch reversibel und der 5-Methylcytosingehalt stieg nach 48-stündiger Cr(VI)-Exposition wieder auf sein Ursprungsniveau an. Rückschlüsse für die Bedeutung einer globalen Hypomethylierung auf genspezifischer Ebene, die zu einer Repression der betroffenen DNA-Schadensantwortgene führen, ließen sich jedoch derzeit, aufgrund der Komplexität der epigenetischen Vorgänge, nicht treffen und bedürfen weiterer Untersuchungen. Die bekannten genotoxischen Wirkungen von Chromaten in Kombination mit einer gehemmten DNA-Schadensantwort können jedoch beschleunigend auf die Tumorgenese wirken. Aus den genannten Gründen sollte bei der Verwendung von nanopartikulären Cr(III)-Salzen in kosmetischen Mitteln oder in Kollagenquervernetzern für die Lederherstellung ein Höchstmaß an Sorgfalt bei der Auswahl der eingesetzten Rohstoffe getroffen werden.

2 EINLEITUNG

2.1 DIE MENSCHLICHE HAUT

Die Haut (Cutis) bildet die Körperoberfläche und stellt das größte und schwerste Organ des Menschen dar. Ihre Fläche beträgt circa 2 m² und ihr Gewicht macht 10 - 20 % der Gesamtkörpermasse aus. Ihre Dicke variiert stark und beträgt beispielsweise an den Augenlidern nur etwa 1 mm, während sie an den Fußsohlen bis zu 5 mm dick sein kann. Die Haut ist in Schichten untergliedert: Epidermis (Oberhaut) und Dermis (Lederhaut) bilden die Cutis. Die fettzellenreiche Subcutis (Unterhaut) ist strukturell eng mit der darüber liegenden Dermis verknüpft und enthält größere Blutgefäße, Nervenzellen sowie druck- und temperaturempfindliche Sinneszellen (SOBOTTA UND WELSCH, 2009).

2.1.1 EPIDERMIS

Die Epidermis ist die äußerste, typischerweise 0,05 – 0,1 mm dicke Schicht der menschlichen Haut. Sie besteht aus einem mehrschichtigen verhornten Plattenepithel, dessen Zellen einem ständigen Erneuerungsprozess unterliegen. Etwa 90 % der Epidermis machen dabei Keratinozyten aus. Gebildet werden die Keratinozyten im *Stratum basale*, einer Zellschicht aus kubisch-prismatischen epidermalen Stammzellen, die in hohem Maße proliferieren. Die hier gebildeten Zellen wandern lateral und schieben ältere Zellen nach außen auf die Hautoberfläche. Auf dieser Migrationsstrecke unterliegen Keratinozyten einer progressiven Differenzierung zu Korneozyten (Hornzellen): Dabei flachen sie ab, verlieren ihren Zellkern und exprimieren zytosolische Keratinfilamente (siehe Abbildung 1). Diese Intermediärfilamente, die sog. Desmosomen, sorgen für einen ausgeprägten Zell-Zell-Verband. Während der Differenzierungsprozesse im *Stratum granulosum* bildet sich zusätzlich der sogenannte *Cornified Envelope* aus: Dieser stellt eine hochvernetzte, schwerlösliche Einlagerung in die Zellmembran der Korneozyten dar und besteht aus Glycin-, Serin-, Cystein- sowie Prolin-reichen Proteinen wie Filaggrin, Involucrin und Loricrin, die auch unter dem Sammelbegriff *small proline rich proteins* (SPR) bekannt sind. Sowohl der *Cornified Envelope* als auch die Verknüpfung der Korneozyten durch Desmosomen tragen dazu bei, dass die Epidermis eine protektive Barriere gegen mechanische, physikalische und chemische Umwelteinflüsse darstellt (ROOK UND BURNS, 2010; NATARAJAN *et al.*, 2014).

Andere Zelltypen der Epidermis sind Melanozyten, Merkel Zellen und Langerhans'sche Zellen. Melanozyten synthetisieren das namensgebende Pigment Melanin und sind für die Hautfärbung verantwortlich. Das gebildete Melanin wird dabei in kleinen Vesikeln, den sog. Melanosomen, verpackt und über zahlreiche Dendriten an umliegende Keratinozyten abgegeben. In den Keratinozyten wird das Melanin freigesetzt. Dort fungiert es auf zwei Wegen als photoprotektiver Filter. Zum einen streut es solare Ultraviolettstrahlung (UV-Strahlung) und hindert sie daran, in subepidermales Gewebe vorzudringen.

Weiterhin ist das gebildete Melaninpolymer ein stabiles Radikal, welches antioxidative Wirkung zeigt und beispielsweise entstandene Sauerstoffradikale detoxifiziert (JABLONSKI UND CHAPLIN, 2000).

Merkel Zellen kommen einzeln oder in kleinen Gruppen vor und sind im *Stratum basale* angesiedelt. An ihnen enden große, flache Nervenfasern aus tieferen Bereichen der Dermis. Merkel Zellen besitzen mechanorezeptive Funktionen und registrieren die Stärke und Häufigkeiten von Druckänderungen auf der Haut. An berührungsempfindlichen Stellen, wie Fingerspitzen und Fußzehen, sind sie besonders häufig (SOBOTTA UND WELSCH, 2009).

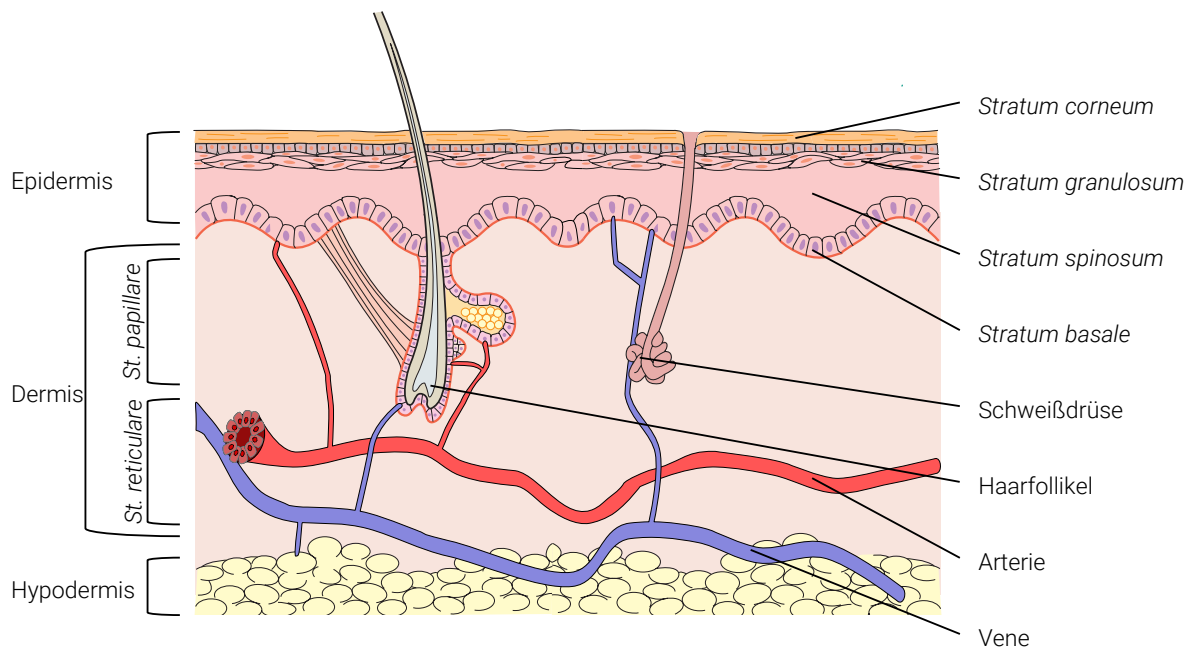


Abbildung 1: Querschnittszeichnung der Haut und Unterhaut.

Die Epidermis (Oberhaut) besteht aus den vier Schichten *Stratum corneum*, *St. granulosum*, *St. spinosum* und *St. basale*. Die Dermis (Lederhaut) besteht aus zwei Schichten, dem *Stratum papillare* und dem *Stratum reticulare*. Die Unterhaut beginnt mit der fettzellenreichen Hypodermis (McGRATH et al., 2010).

Langerhans'sche Zellen befinden sich vorwiegend im *Stratum spinosum* und bilden über ihre langen Dendriten ein dynamisches Netzwerk aus. Diese dendritischen Zellfortsätze sind in der Lage, in die Haut eingedrungene Antigene aufzunehmen. Nach Antigenaufnahme wandern Langerhans'sche Zellen in lymphatische Organe, wie Tonsillen der Lymphknoten, und präsentieren dort die jeweiligen Antigene. Sie nehmen somit eine Schlüsselrolle im adaptiven Immunsystem der Haut ein (SOBOTTA UND WELSCH, 2009).

2.1.2 DERMIS

Die Dermis besteht aus zwei Schichten, dem *Stratum papillare* und dem *Stratum reticulare*. Sie ist durchzogen von reißfesten Kollagen- und Elastinfasern. Auch Mikrofibrillen, Fibronectin und Hyaluronsäure stellen wichtige Bestandteil der Dermis dar. Das *Stratum papillare* ist eng mit der darüber liegenden epidermalen Basalschicht verbunden. Es besitzt zahlreiche Blutkapillaren und versorgt die

Epidermis. Die mitunter wichtigsten Funktionen der Dermis sind der Schutz vor Verletzungen und die Speicherung von Wasser. Ihr struktureller Aufbau begünstigt die Festigkeit bei gleichbleibender Elastizität. Tief in die strukturegebende Extrazellulärmatrix sind Hautanhangsgebilde wie Haarfollikel, Talg- und Schweißdrüsen sowie weitere Tastzellen eingebettet. Blutgefäße durchziehen die Dermis und versorgen ebenfalls die darüber liegende epidermale Basalschicht. Arterien der Haut zweigen aus tieferliegenden Gefäßen der Muskulatur ab und bilden im Grenzbereich von Subcutis und Dermis ein arterielles Gefäßnetz. Parallel dazu verläuft ein venöses Gefäßnetz. Durch Vasodilatation bzw. Vasokonstriktion findet eine Thermoregulation der Körpertemperatur statt. Schweißdrüsen und Talgdrüsen werden über schlingenförmige Arterien ernährt. Auch die Endstücke der Haarfollikel (Haarpapillen) sind an die beiden Gefäßnetze angeschlossen und versorgen so die an den Haarschäften eingestülpte Epidermis (Abbildung 1) (SOBOTTA UND WELSCH, 2009). Haarschäfte und Schweißdrüsen gelten als potentieller Eintrittsort von Fremdstoffen wie Chemikalien und Nanomaterialien in die Dermis und in die angrenzenden Blutgefäße (RANGAN *et al.*, 2012; VOGT *et al.*, 2014; GULSON *et al.*, 2010). Gerade in den engen Haarfollikeln können Partikel, aber auch hydrophobe Flüssigkeiten persistieren und in die Wurzelscheide der Haarpapillen aufgenommen werden (LADEMANN *et al.*, 2006; VOGT *et al.*, 2006). Während die Penetration der Epidermis durch Hautanhangsgebilde jedoch nur zu einem geringen Anteil zur Exposition gegenüber Fremdstoffen beiträgt, stellen dagegen Verletzungen und Irritationen der Haut, beispielsweise bei einem Sonnenbrand (siehe Kapitel 2.2) eine erhebliche Einschränkung der dermalen Schutzfunktion dar (LADEMANN *et al.*, 2006).

2.2 UV-STRAHLUNG

Die von der Sonne emittierte Strahlung erreicht die Erdoberfläche im Wellenlängenbereich 1000 Nanometer (nm) bis 280 nm. Das Spektrum von 1000 bis 770 nm wird auch Infrarotstrahlung bezeichnet. Der Wellenlängenbereich des sichtbaren Lichtes erstreckt sich von 770 – 380 nm und liegt oberhalb der Ultraviolett (UV) Strahlung (380 – 100 nm). Die UV-Strahlung wird ferner ihrer Energie entsprechend in drei Wellenlängenbereiche unterteilt: UVA-Strahlung schließt mit 380 – 315 nm direkt an den sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums an. UVB wird mit 315 – 280 nm auch als „mittleres UV“ bezeichnet. Der Bereich zwischen 280 und 100 nm wird als UVC beschrieben und spielt auf der Erdoberfläche eine eher untergeordnete Rolle, da kurzwellige Strahlung unter 280 nm in der Stratosphäre und Troposphäre durch Sauerstoff und Ozon vollständig absorbiert wird. UVB wird, in Abhängigkeit der Beschaffenheit der Ozonschicht, ebenfalls zu einem Großteil absorbiert. Etwa 10 % erreichen dabei die Erde. UVA-Strahlung erreicht weitestgehend ungehindert die Oberfläche (Bundesamt für Strahlenschutz, 2017).

UV-Strahlung gilt als die häufigste Ursache für verschiedene Hautkrebsarten und ist durch die IARC (*International Agency for Research on Cancer*) in die höchste Risikogruppe 1 als „krebserregend für den Menschen“ eingestuft. Bei Hautkrebs wird dabei in zwei Kategorien unterschieden. Karzinome der

Basalzellen (Basaliom) und das Plattenepithelkarzinom werden dabei zu weißem Hautkrebs gezählt. Karzinome der Pigmentzellen (Melanozyten) werden als schwarzer Hautkrebs bezeichnet (RIGEL, 2008; SOBOTTA UND WELSCH, 2009). UV-Strahlung erzeugt in der Epidermis eine Vielzahl an Schäden, die sich akut in Form von Rötungen und Schwellungen äußern (UV-Erythem) und/oder sich in chronischen Schäden manifestieren (UV-bedingte Hautalterung, Hautkrebs).

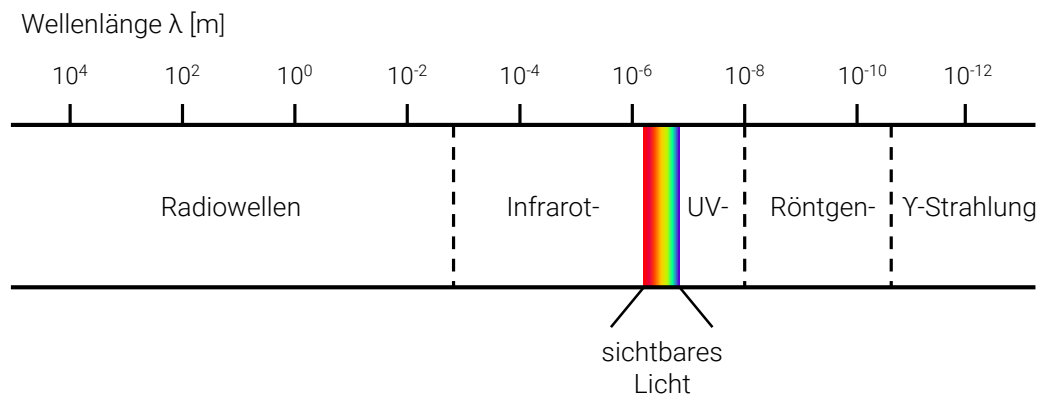


Abbildung 2: Spektrum elektromagnetischer Strahlung.

Das solare Emissionsspektrum erstreckt sich von 10^{-3} bis 10^{-8} m. Für den Menschen sichtbares Licht umfasst dabei den Spektralbereich von $7,7 - 3,8 \times 10^{-7}$ m. Der sich anschließende Ultraviolett (UV)-Bereich wird entsprechend der Wellenlängen in UVA ($3,8 - 3,15 \times 10^{-7}$ m), UVB ($3,15 - 2,8 \times 10^{-7}$ m) und UVC ($2,8 - 1,0 \times 10^{-7}$ m) unterteilt (modifiziert nach HARTEN, 2009).

UVB erreicht aufgrund seiner geringen Eindringtiefe ausschließlich die in der Epidermis lokalisierten Zelltypen. Dort absorbieren an erster Stelle Melanin, aber auch Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Basen (λ_{\max} ca. 260 nm) und Proteine (Tyrosin- und Tryptophanreste, λ_{\max} ca. 280 nm), Kollagenfasern und trans-Urocaninsäure (Bestandteil von Hautschweiß, λ_{\max} ca. 310 – 320 nm). Andere Strukturen wie Lipide, Carotinoide und Porphyrine absorbieren dabei ebenfalls im UVB-Spektrum und werden in angeregte Zustände versetzt. Moleküle, die mit UV-Strahlung wechselwirken, sind auch unter dem Begriff Chromophore bekannt. Durch Umlagerungsreaktionen, Isomerisierung und Photoaddition kommt es zur Bildung von Photoprodukten. Des Weiteren können angeregte Chromophore Energie durch strahlungslosen Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) auf andere Verbindungen übertragen, wodurch diese an Reaktivität gewinnen. Alternativ ist auch eine Abgabe von Elektronen der angeregten Strukturen möglich, was zu einer Radikalentstehung führt (ROOK UND BURNS, 2010).

Die DNA ist sicherlich das bedeutendste Chromophor der Epidermis. UV-induzierte Läsionen der DNA können maßgeblich den zellulären Metabolismus stören, den Zelltod einleiten und Mutationen hervorrufen. Zu den bekanntesten DNA-Schäden gehören die Bildung von Cyclobutandimeren (CPD) und 6,4-Photodimeren (6,4-PD) (Abbildung 3). Weitere Bestrahlung der Photodimere kann zu Isomerisierungsreaktionen und Dewarisomeren führen (YOKOYAMA UND MIZUTANI, 2014; DOUKI UND SAGE, 2016; ROOK UND BURNS, 2010).

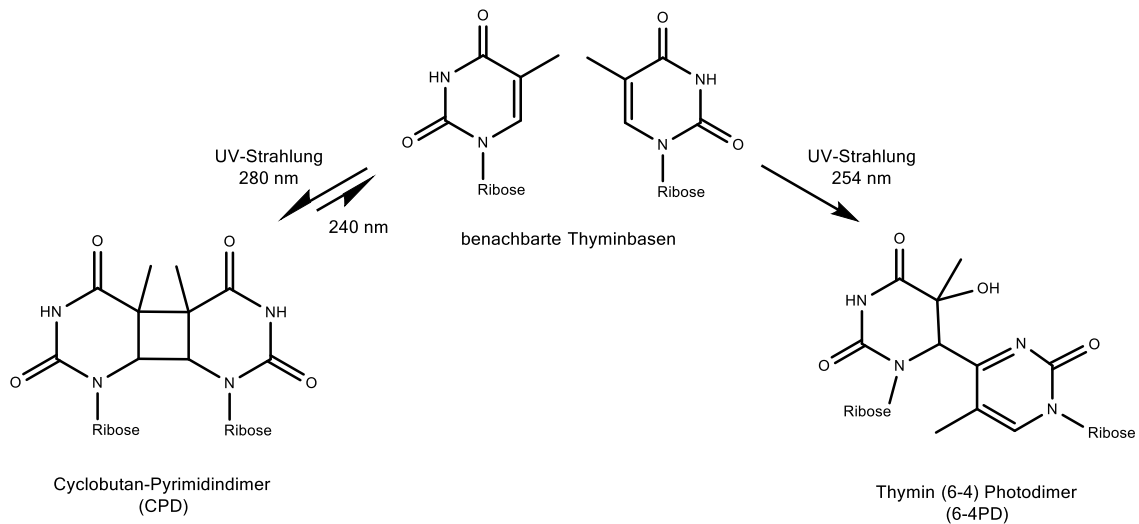


Abbildung 3: Bildung von UV-induzierten DNA-Schäden.

In Abhängigkeit der absorbierten Energie entstehen Cyclobutan-Pyrimidindimere, die durch Öffnung des Cyclobutanringes wieder in die Ausgangsform übergehen können. Alternativ kommt es zur Bildung von 6,4-Photodimeren zweier benachbarter Thyminbasen (YOKOYAMA UND MIZUTANI, 2014).

UVB-Strahlung wird aufgrund seiner direkten Schädigung von DNA-Basen und anderen Chromophoren als besonders zytotoxisch und mutagen angesehen (ZASTROW *et al.*, 2017). UVA-Strahlung dringt tiefer in die Haut ein und weist ein anderes Schadensmuster auf: Es führt vor allem durch die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), der Suppression des Immunsystems und durch den Kollagenabbau zu teilweise schwerwiegenden Schädigungen der Haut. Wie auch nach UVB-Bestrahlung werden Chromophore gebildet, die Elektronen an andere Systeme abgeben und so auch indirekt über ROS zu sekundären, oxidativen DNA-Basenschäden führen können.

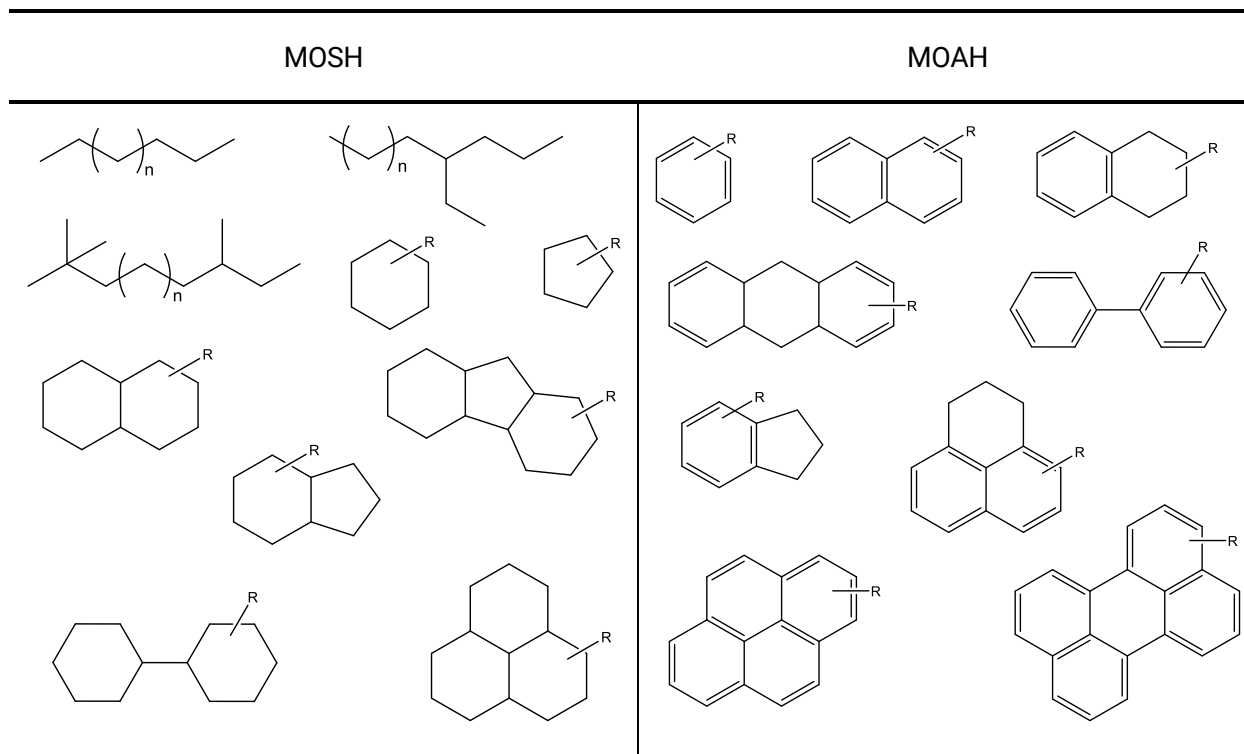
Aufgrund der starken Generierung von ROS und der damit einhergehenden Auslastung antioxidativer Schutzsysteme der Haut ist diese sowohl während, als auch nach der Exposition von Sonnenlicht empfindlicher gegenüber exogenen Einflüssen von Substanzen, die äußerlich auf die Haut appliziert werden. Im ersten Teil dieser Dissertationsschrift soll untersucht werden, welche synergistischen Effekte durch den Einfluss von Mineralölen auf die sonnenlichtexponierte Haut ausgehen.

2.3 MINERALÖLE

Mineralöle stellen ein komplexes Gemisch unterschiedlicher Kohlenwasserstoffe dar, die in gesättigte und aromatische Verbindungen unterteilt werden. Die Struktur und Größe der Kohlenwasserstoffe variiert hierbei stark. Zu den gesättigten Mineralölkohlenwasserstoffen (*mineral oil saturated hydrocarbons*, MOSH) zählen sowohl verzweigte als auch unverzweigte Alkane (Paraffine) sowie alkylierte Cycloalkane (Naphthene), die als Cyclopentane und -hexane in einkernigen, zweikernigen oder mehrkernigen Ringsystemen vorliegen. Der aromatische Bestandteil (*mineral oil aromatic hydrocarbons*, MOAH) besteht

aus unterschiedlichen hochalkylierten sowie teilhydrierten Ringsystemen, die mindestens jedoch einen Aromaten enthalten (EFSA, 2012). Das Stoffgemisch eines Mineralöls kann dabei viele hunderte bis tausende verschiedene Verbindungen umfassen, die auszugsweise in Tabelle 1 dargestellt sind.

Tabelle 1: Auswahl an Mineralölkohlenwasserstoffen, die in gesättigte (*mineral oil saturated hydrocarbons, MOSH*) und ungesättigte/aromatische (*mineral oil aromatic hydrocarbons, MOAH*) Kohlenwasserstoffe unterteilt sind.



Die Zusammensetzung von Mineralölen hängt dabei von der Herkunft des Rohöls und den durchlaufenen Raffinationsprozessen ab. Grundsätzlich erfolgt die Raffination des entsalzten Rohöls durch Destillation unter Atmosphärendruck oder im Vakuum in leichte, mittelschwere und schwere Destillate, die in unterschiedlichen Produktzweigen weiterverarbeitet werden (MACKERER *et al.*, 2003; CARRILLO *et al.*, 2019; PIROW *et al.*, 2019)

Durch entsprechende Desulphurierung bzw. -nitrierung werden Schwefel- und Stickstoffverbindungen, wie Heteroaromaten, entfernt. Hydrierungs- sowie Isomerisierungsreaktionen ermöglichen es, gezielt Einfluss auf gewünschte Produkteigenschaften zu nehmen und potentiell toxische Verbindungen, wie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK), zu entfernen.

Hochraffinierte Mineralölkohlenwasserstoffe werden nach sorgfältiger Aufreinigung zur Herstellung von sogenannten Weißölen eingesetzt. Die klaren und transparenten Öle finden wiederum Anwendung in Bereichen der Pharmazie, der Lebensmittelindustrie und in Lebensmittelkontaktmaterialien sowie in der Kosmetik (CARRILLO *et al.*, 2019; PIROW *et al.*, 2019).

2.3.1 VERWENDUNG VON MINERALÖLEN IN KOSMETIKA

Mineralöle werden aufgrund ihrer konsistenzgebenden Eigenschaften, ihrem geringen allergenen Potential und ihrer hohen Hautverträglichkeit in vielerlei kosmetischen Mitteln eingesetzt. Zu den Produkten mit hohem Gehalt an Mineralölen zählen Lippenpflegekosmetika, Hautcremes, Haarpflegemitteln, Körperlotionen und Babyöl. Der prozentuale Anteil an Mineralölen variiert dabei stark und kann zwischen 1 % und 99 % liegen. Häufig enthalten Kosmetika mehrere Mineralölprodukte unterschiedlicher Molekularmassenverteilung. Bei den in der Kosmetikindustrie verwendeten Wachsen und Mineralölen variiert die Länge der Kohlenstoffketten zwischen 15 und 100 Kohlenstoffatomen (PETRY *et al.*, 2017). Mineralöhlhaltige Verbindungen tragen die Bezeichnungen *Mineral Oil*, *Ozokerit* (Erdwachs), *Cera Microcristallina*, *Microcrystalline Wax* (mikrokristallines Wachs), *Petrolatum*, *Vaseline*, *Paraffinum liquidum* und *Paraffinum subliquidum* (medizinisches Weißöl) (BfR, 2018). Für die Verwendung in Kosmetika im Sinne der Verordnung (EU) Nr. 1223/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 30. November 2009 sind nur solche Rohstoffe auf Mineralölbasis zulässig, deren Raffinationsprozesse vollständig bekannt und deren Ausgangsstoffe nicht kanzerogen sind. Weiterhin ist in den Erwägungsgründen der Verordnung aufgeführt, dass zur Gewährleistung der Produktsicherheit verbotene Stoffe nur dann in Spuren zulässig sind, wenn diese unter guten Herstellungspraktiken technisch unvermeidlich und die kosmetischen Mittel sicher sind.

Trotz des hohen Raffinationsgrades der Rohstoffe standen mineralöhlhaltige Kosmetika in der Vergangenheit häufiger in der Kritik, potentiell krebserregende Stoffe zu enthalten (Stiftung Warentest, 2015; CVUA, 2019). Aufgrund von Strukturanalogien zu polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) wird vermutet, dass auch andere Verbindungen der Gruppe der MOAH enthalten sind, von welchen eine potentiell kanzerogene Wirkung zu erwarten ist (BfR, 2018). Damit hochraffinierte Mineralöle und -wachse für die kosmetische Verwendung geeignet sind, müssen sie den Anforderungen der IP346 Methode entsprechen, welche in Abschnitt 2.3.4 genauer dargestellt wird.

2.3.2 ANALYTIK VON MINERALÖLEN

Durch die enorme Komplexität der MOSH- und MOAH-Fractionen ist eine Einzelstoffidentifizierung aufgrund der unzureichenden Trennleistung säulenchromatographischer Analysen nicht hinreichend möglich. Neue Analysenmethoden und Trennverfahren wurden in den letzten Jahren mit Nachdruck zur Anwendung in der amtlichen Überwachung von Lebensmitteln, Bedarfsgegenständen und Kosmetika gebracht. Die derzeit am häufigsten eingesetzten Verfahren zur Analytik von Mineralölkohlenwasserstoffen basieren auf einer Vortrennung mittels Festphasenextraktion (*solid phase extraction*, SPE) oder *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Der Vortrennung angeschlossen erfolgt eine gaschromatographische (GC) Separation der Fraktionen über eine apolare stationäre Phase. Die hierbei eingesetzte Technik entspricht der sogenannten „simulierten Destillation“, bei der die destillative

Verdampfung der Komponenten eines Mineralölgemisches auf einer Dimethylpolysiloxan-Phase erfolgt. Die Detektion der Substanzen erfolgt zumeist mittels Flammenionisationsdetektor (FID), da dieser eine geringe Selektivität aufweist und praktisch für alle Kohlenwasserstoffe die gleiche *Response* pro Masseneinheit zeigt. Dies macht eine Quantifizierung auch ohne Kalibrierung mit entsprechenden internen Standards möglich.

Der Informationsgehalt der LC-GC-FID-Analytik ist limitiert auf die Erfassung von MOSH und MOAH als Summenparameter, die Charakterisierung des Siedepunktbereichs und damit die Einschätzung der Molmassenverteilung (BIEDERMANN UND GROB, 2012). Um Aussagen über Größe und Alkylierungsgrad von aromatischen Ringsystemen treffen zu können, ist eine Kopplung von zwei gaschromatographischen Säulen (GC x GC) mit anschließender massenspektrometrischer Erfassung notwendig (WEBER *et al.*, 2019).

Das Chemische und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe (CVUA) war an der Entwicklung einer Screeningmethode zur Untersuchung von Rohstoffen auf Mineralölbasis, welche auch für kosmetische Mittel eingesetzt werden, beteiligt (CVUA, 2019). Diese Methode basiert auf einer quantitativen Analyse mittels Protonen-Kernspinresonanzspektroskopie ($^1\text{H-NMR}$) und ergänzt die bestehenden LC-GC-Methoden in der Routineüberwachung.

2.3.3 KERNSPINRESONANZSPEKTROSKOPIE ($^1\text{H-NMR}$)

Die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) wird im Allgemeinen zur Strukturaufklärung von organischen Molekülen eingesetzt. Die Methode beruht auf der resonanten Wechselwirkung von Atomkernen in einem angelegten Magnetfeld B_0 . Atomkerne, deren Kernspin ungleich null ist sind NMR-aktiv und lassen sich in einem magnetischen Feld in Abhängigkeit ihres magnetischen Momentes parallel oder antiparallel zur magnetischen Flussrichtung B_0 ausrichten. Atomkerne besitzen dabei ein elementspezifisches Verhalten, welches über das gyromagnetische Verhältnis beschrieben wird. Die resultierende energetische Aufspaltung in einen energiearmen (E_α) und einen energiereichen (E_β) Energiezustand ermöglicht die Anregung eines Kernspinübergangs durch einen geeigneten Energieeintrag. Um einen solchen NMR-Übergang zu induzieren, muss die Induktionsfrequenz der Empfängerfrequenz entsprechen. Diese sogenannte Larmorfrequenz wird dabei von der chemischen Umgebung im Molekül sowie der Abschirmung durch Elektronen beeinflusst. Hieraus lässt sich eine chemische Verschiebung (δ) der Signale ableiten, die sich zumeist auf eine Referenzsubstanz wie Tetramethylsilan (TMS) bei $\delta = 0,0$ ppm bezieht. Das Anregen der Atomkerne erfolgt durch das Einbringen hochfrequenter Radiofrequenzpulse. Die anschließende Relaxation des Systems in den Grundzustand ermöglicht die Aufzeichnung des sogenannten *Free Induction Decay* (FID), welcher den zeitlichen Verlauf des Abfalls der Magnetisierung darstellt. Nach Fourier-Transformation des FID wird ein Frequenzspektrum erhalten, welches durch weitere Prozessierungsschritte optimiert werden kann (FRIEBOLIN UND THIELE, 2013).

Die NMR-Spektroskopie findet auch als Quantifizierungsmethode (qNMR) Anwendung. Von großem Interesse sind dabei Reinheitsbestimmungen bei der chemischen Synthese beispielsweise von pharmazeutischen Produkten, aber auch in Umweltanalysen oder bei der Quantifizierung von Lebensmittelinhaltsstoffen (MONAKHOVA *et al.*, 2014). In der Regel erfolgt die Quantifizierung mit einem Signal eines der Probe zugesetzten chemischen Referenzstandards (interne Referenzierung). Gerade bei biologischen Anwendungen kann dies jedoch erschwert werden, da die Verbindung Reaktionen mit der Probe eingehen kann oder es zu Signalüberlappungen kommt. Die Quantifizierung mittels externer Standards wird daher in einigen Anwendungsgebieten bevorzugt. Beim sogenannten *Electronic REference To access In-vivo Concentrations* (ERETIC)-Verfahren wird ein synthetisches Pulssignal erzeugt, welches zuvor mithilfe einer Lösung bekannten Gehalts kalibriert wurde und somit als Referenz zur Bestimmung absoluter Konzentrationen herangezogen werden kann. Eine alternative Methode, die im Gegensatz zum ERETIC-Verfahren keine spezielle Hardwareausstattung erfordert, wird als *PULse length-based CONcentration determination* (PULCON) bezeichnet (MONAKHOVA *et al.*, 2014).

2.3.4 PRÜFVERFAHREN IP346

Wie eingangs erwähnt gilt das Prüfverfahren IP346 als Prädiktionmethode zur Ermittlung des kanzerogenen Potentials eines Mineralöls, welches für den Einsatz in Kosmetik und Arzneimitteln vorgesehen ist (BfR, 2018). Die Ursprünge dieser Methode gehen auf Mäusehauttests zurück, die in den 70er und 80er Jahren zur Beurteilung der Kanzerogenität eines Rohöls herangezogen wurden (Concawe, 1994). Durch das aus den Nagerstudien gewonnene Wissen konnten Korrelationen des Gehaltes an PAK in einem Dimethylsulfoxid (DMSO)-Extrakt eines zu untersuchenden Mineralölrohstoffes und der Tumorfrequenz in Mäusehauttests gewonnen werden. Anhand der Daten von Positivkontrollen und einer Bibliothek getesteter Mineralöle wurde eine Toleranzgrenze von 3 Gewichtsprozent (w/w) des DMSO-Extraktes festgelegt. Statistische Auswertungen ergaben, dass eine gravimetrischen Zunahmen des DMSO-Extraktes von über 3 % (w/w) mit einem signifikanten Anstieg der Tumorzinzidenz in den Nagerstudien korrelierten (BfR, 2018; CARRILLO *et al.*, 2019). Die IP346 hat weiterhin Bestand, auch wenn sie nicht den heutigen Anforderungen entspricht. So wurde beispielsweise angemerkt, dass DMSO niedrig-alkylierte und unsubstituierte aromatische Verbindungen nahezu vollständig extrahiert, während die Extraktionseffizienz für teil- und hochalkylierte Aromaten deutlich geringer ausfällt (NATUSCH UND TOMKINS, 2002). Des Weiteren wird das damalige Vorgehen mit den heute geltenden Qualitätsparametern nicht gerecht, da zum Zeitpunkt der Methodenentwicklung noch keine standardisierten OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*)-Richtlinien für die Durchführung von Kanzerogenitätsstudien postuliert waren (BfR, 2018).

Bei dem Prüfverfahren IP346 werden die entsprechenden Rohöle zunächst in Cyclohexan gelöst und im Anschluss zweimalig mit DMSO einer flüssig-flüssig-Extraktion unterzogen. Die Extraktionseffizienz von unsubstituierten 3-7 Ring PAK liegt dabei bei nahe 100 % (NATUSCH UND TOMKINS, 2002) und basiert dabei

auf der hohen Affinität des Schwefelatoms auf die delokalisierten π -Elektronensysteme der Aromaten (siehe Abbildung 4).

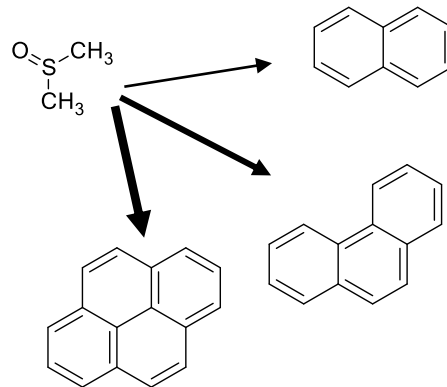


Abbildung 4: Steigende Affinität von Dimethylsulfoxid (DMSO) auf die delokalisierten π -Elektronensysteme polyzyklischer Aromaten.

Die Korrelationen zwischen den DMSO-extrahierbaren Anteilen und der Tumorzinzidenz in Nagerstudien wurde 2016 von Concawe (*CONservation of Clean Air and Water in Europe*) und der IARC für insgesamt 92 Basisöle unterschiedlicher Kategorien neu evaluiert. Für die Testung von Mineralölen mittels IP346 wurde eine Vorhersagekraft von 86 % für kanzerogene Mineralöle festgelegt. Diese Prüfmethode gilt somit weiterhin als *quasi-analytisches* Verfahren, um die die Kanzerogenität von Mineralölen zu bestimmen (BARP *et al.*, 2017).

Die im Abschnitt 5.1 aufgeführten toxikologischen Untersuchungen zu aromatischen Mineralölkohlenwasserstoffen in humanen Keratinozyten fanden in Anlehnung an die IP346 Prädiktionsmethode statt. Dabei wurden entsprechende Mineralölrohstoffe zunächst mittels $^1\text{H-NMR}$ quantifiziert und Proben mit einem hohen MOAH-Anteil für weitere Studien selektiert. Eine Aufkonzentration des MOAH-Humps erfolgte in den ausgewählten Proben dann mittels LC-GC und einem nachgeschalteten Fraktionssammler. Diese LC-GC-Eluate wurden im Anschluss für die Applikation in Zellkultursystemen in DMSO gelöst. DMSO gilt in geringen Konzentrationen von kleiner 1 % als nicht zytotoxisch und findet in der molekularbiologischen Forschung häufig Anwendung als Lösungsvermittler.

2.3.5 TOXIKOLOGISCHE BEWERTUNG VON MINERALÖLEN

Die Datenlage zur toxikologischen Relevanz von Mineralölen und -wachsen ist widersprüchlich und wird kontrovers diskutiert. Großangelegte Studien und jahrzehntelange epidemiologische Erfahrungen zeigen, dass trotz täglicher Applikation von kosmetischen Mitteln auf die Haut keine Auswirkungen auf die Gesundheit durch mineralöhlhaltige Kosmetika feststellbar sind. Auch die Auswertung von über 80.000 Epikutantests wies darauf hin, dass von medizinischen Weißölen kein Sensibilisierungspotential für die menschliche Haut ausgeht (SCHNUCH *et al.*, 2006).

Gesättigte Mineralölkohlenwasserstoffe (MOSH) können sich in Abhängigkeit der Kettenlänge im menschlichen Organismus anreichern. In Fischer-344-Ratten führte die Applikation hoher Dosismengen niedrigviskoser Mineralöle zu einer erhöhten Inzidenz an Granulomen der Leber, die mit Entzündungsreaktionen einhergingen. Eine toxikologische Relevanz der in diesem Tiermodell beobachteten Läsionen ist für den Menschen derzeit fraglich. Nicht unberechtigte Kritik wird an den zugrundeliegenden Tierexperimenten genommen, da Fischer-344-Ratten einen anderen Metabolismus niederviskoser Mineralölgemische aufzeigen als andere Rattenstämme. Auch in Humanstudien konnten weder Mikrogranulome der Leber und Milz, noch inflammatorische Reaktionen festgestellt werden (CARRILLO *et al.*, 2019; PIROW *et al.*, 2019).

Neben der Akkumulation von MOSH in Milz, Leber und Drüsengewebe werden für die Gruppe der MOAH andere Wirkmechanismen diskutiert. Unalkylierte PAK gehören ebenfalls zu den MOAH und für einige Vertreter der PAK ist eine karzinogene Wirkung nachgewiesen. Aufgrund der Strukturanalogien wird daher vermutet, dass auch andere Verbindungen unter den MOAH zu finden sind, von denen eine potentiell kanzerogene Wirkung zu erwarten ist. Die Literaturdaten der Einzelsubstanzen lassen sich weiterhin nicht auf die gesamte MOAH-Fraktion und nicht auf alkylierte sowie teilhydrierte Aromaten übertragen (BfR, 2018). Nach derzeitigem Kenntnisstand sind insbesondere Mineralölkomponenten, die einen Aromatenanteil mit 3-7 Polyzyklen aufweisen, für eine kanzerogene Wirkung verantwortlich (IARC, 2012; PIROW *et al.*, 2019).

Die Aufnahme von Mineralölkohlenwasserstoffen in die menschliche Haut hängt von einer Vielzahl an Faktoren ab. Neben Lipophilie, Molekulargewicht und Ladung einer Substanz sind auch Auftragungsfläche und Kontaktzeit entscheidend. Des Weiteren tragen physiologische Eigenschaften wie Alter, Geschlecht und Beschaffenheit der Haut (Wunden) maßgeblich zur Penetrationsrate von Verbindungen bei. Topisch applizierte Substanzen erreichen den systemischen Blutkreislauf über inter- und intrazelluläre Wege durch Hautanhangsgebilde wie Schweißdrüsen und Haarfollikel (KIELHORN *et al.*, 2006). Für Substanzen mit einem Molekulargewicht von >500 Da, die entweder stark unpolar oder eine hohe Elektrophilie besitzen, wird postuliert, dass diese eine vernachlässigbar kleine Permeabilität durch die Epidermis besitzen und somit nicht in den systemischen Blutkreislauf aufgenommen werden. Grundsätzlich konnten kaum Mineralölkohlenwasserstoffe in tieferen Schichten unterhalb des *Stratum corneums* festgestellt werden, wodurch die Relevanz einer systemischen Verfügbarkeit durch Absorption über die Haut fragwürdig scheint (PETRY *et al.*, 2017; BfR, 2018). Auch wenn sich diese Studien überwiegend auf MOSH fokussieren, wird derzeit davon ausgegangen, dass die Annahmen ebenso für MOAH-Fraktionen gültig sind (Petry *et al.*, 2017).

Sofern eingesetzte Inhaltsstoffe den Reinheitsanforderungen der europäischen Kosmetikverordnung entsprechen, gehen nach heutigem Kenntnisstand keine Gesundheitsrisiken für den Verbraucher aus (BfR, 2018). Kürzlich durchgeführte Studien des CVUA Karlsruhe an insgesamt 57 Lippenprodukten wiesen jedoch darauf hin, dass in Lippenkosmetika des unteren Preissegmentes nicht nur hochaufgereinigte

Mineralöle eingesetzt wurden. Bei 30 % der Lippenprodukte (17 Proben) zeigten sich MOAH-Gehalte von 0,1 bis 1,0 g/100 g. Vier Proben (7 %) zeigten MOAH-Gehalte von über 1,4 g/100 g.

In der Überwachung kann bei fehlendem Grenzwert auf das 95. Perzentil einer möglichst umfangreichen Analysenserie zurückgegriffen werden. Ausgehend von der Guten Herstellungspraxis soll unter Berücksichtigung des ALARA (*as low as reasonably achievable*)-Prinzips seitens des Inverkehrbringers gewährleistet werden, dass Gehalte an Kontaminanten in Kosmetika auf so niedrige Werte minimiert werden, wie sie durch eine vernünftige Herstellungspraxis möglich sind. Eine Empfehlung für die Verkehrsüblichkeit für solche Kosmetika ließe sich anhand des 95. Perzentils abgeben. Das 95. Perzentil beschreibt den Wert, oberhalb dessen die 5 % der am höchsten ermittelten Werte einer Warenkorbanalyse liegen. MOAH-Gehalte oberhalb dieses Wertes könnten zukünftig aufgrund ihrer offensichtlichen Vermeidbarkeit als nicht tolerabel angesehen werden.

In Folgendem soll auf die Metabolisierung von MOAH eingegangen werden, falls diese als Kontaminationen in kosmetischen Mitteln anzutreffen sind.

2.3.6 METABOLISMUS DER HAUT

Die Haut ist ein stoffwechselaktives Organ. Sie ist dazu in der Lage, sowohl endogene Verbindungen wie beispielsweise Hormone, Steroide und Entzündungsmediatoren abzubauen als auch die Detoxifizierung von xenobiotischen Verbindungen wie Medikamente, Pestizide und Industrie- und Umweltchemikalien einzuleiten. Hierbei werden im sog. Phase I Metabolismus lipophile Fremdstoffe oxidiert, um ihre Reaktivität und ihre Konjugierbarkeit zu erhöhen (=Aktivierungsschritt). Daran angeschlossen finden in Reaktionen des Phase II Metabolismus Konjugationsreaktionen an die aktivierten Fremdstoffe statt. Die Konjugation mit Glucuronsäure, Acetat, Sulfonsäure oder Glutathion erhöht die Wasserlöslichkeit der Substanzen und ermöglicht so die *Clearance* (Ausschleusung) der Verbindungen über Urin oder Fäzes. Die kutane Aktivierung von Metaboliten kann jedoch auch eine kritische Determinante der Exposition des Menschen sein. Fremdstoffe, die eine Aktivierung erfahren, besitzen zum Teil eine gesteigerte Reaktivität gegenüber zellulären Strukturen wie Zell- und Kernmembran, Proteinen und Nukleinsäuren.

Die metabolische Aktivität der Haut ist um ein Vielfaches geringer als die der Leber, doch spielt sie aufgrund der großen Oberfläche und sog. Depoteffekten, bei denen die Substanz in Haarfollikeln, Schweiß- und Talgdrüsen aufgenommen und sukzessive abgegeben werden, eine nicht zu vernachlässigende Rolle. Das Maß der Metabolisierung einer topisch applizierten Verbindung hängt dabei stark von den chemischen Eigenschaften und den individuellen Enzymaktivitäten einzelner Probanden ab. Ester, primäre Amine, Alkohole sowie Aromaten werden besonders effizient metabolisiert (KIELHORN *et al.*, 2006).

2.3.7 PHOTOTOXIZITÄT

Neben der enzymatischen Aktivierung von Vertretern der MOAH spielt auch eine Aktivierung aromatischer Verbindungen durch Sonnenlicht eine Rolle. Studien belegen, dass Sonnenlicht die Toxizität von PAK erhöht. Durch Absorption von Photonen im Wellenlängenbereich von UVA können PAK in angeregte Zustände übergehen. PAK mit vier oder mehr Ringen absorbieren auch sichtbares Licht. Um PAK in angeregte Zustände zu überführen, muss die absorbierte Energie bestimmte Schwellenwerte überschreiten. Im Allgemeinen beträgt diese Energie die Energiedifferenz zwischen dem *highest occupied molecular orbital* (HOMO) und dem *lowest unoccupied molecular orbital* (LUMO) (WANG *et al.*, 2007). Nach Absorption von Lichtenergie gelangen Aromaten in einen angeregten Singulett- oder Triplett-Zustand. Durch Übergang in diese Zustände können die angeregten Aromaten Energie oder Elektronen auf molekularen Sauerstoff und zelluläre Verbindungen übertragen. Die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, freien Radikalen und reaktiven Zwischenprodukte ist die Folge (WANG *et al.*, 2007; Fu *et al.*, 2012). Die Aktivierung über Sonnenlicht ähnelt dabei der enzymatischen Aktivierung, bei der ebenfalls aus inerten Verbindungen reaktive Spezies gebildet werden (Yu, 2002).

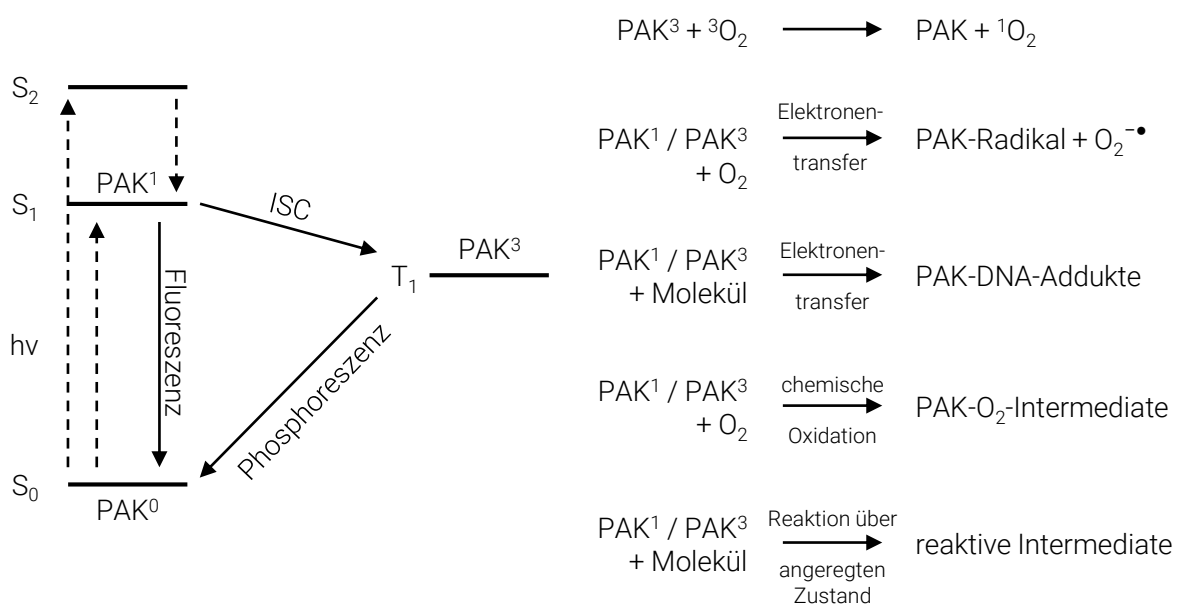


Abbildung 5: Vereinfachtes Jablónski-Schema polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe.

Bei Lichtabsorption ($h\nu$) werden phototoxische Verbindungen, wie polyaromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) in den angeregten Singulett-Zustand (S_1) und weiterer angeregte Übergangszustände (S_2) gehoben. Zusätzlich zur Fluoreszenz und dem strahlungsfreien Zerfall (nicht gezeigt) des S_1 -Zustandes können S_1 -PAK (PAK^1) über Interkombination (*intersystem crossing, ISC*) in den Triplett-Zustand (T_1) des Moleküls übergehen. Sowohl die PAK im S_1 - als auch im T_1 -Zustand können mit umgebenden Molekülen zur Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wie S_1 -Sauerstoff, Hyperoxidanionradikal, PAK-DNA-Addukten, oxidierten PAK und weiteren reaktiven (radikalischen) PAK beitragen (modifiziert nach WANG *et al.*, 2007).

Zu den wichtigsten Vertretern der reaktiven Intermediate werden PAK gezählt, die mit molekularem Sauerstoff reagieren. Zu diesen hydrophilen, oxidierten PAK gehört zum Beispiel die Stoffklasse der Chinone. Die Chinonbildung erfolgt aus Endoperoxiden nach Umlagerung und weiterer Oxidation. Ein Beispiel hierfür ist die in Abbildung 6 dargestellte Bildung von 9,10-Anthrachinon aus Anthracen.

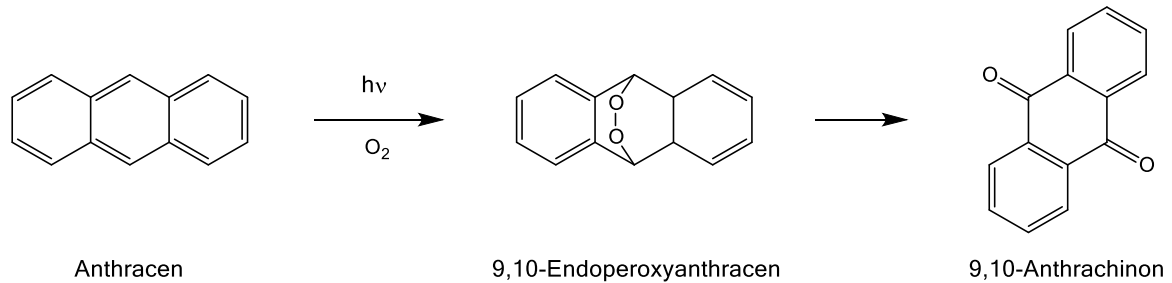


Abbildung 6: Bildung von 9,10-Anthrachinon nach photolytischer Aktivierung.

(Modifiziert nach Fu *et al.*, 2012)

Auch Benzo[*a*]pyren (B[*a*]P), das am besten untersuchte PAK, zeigt nach UV-Bestrahlung in Gegenwart von Luftsauerstoff die Bildung von Photooxidationsprodukten wie Chinonen und Ringöffnungsprodukten (Yu 2002). Die Bildung von Chinonderivaten in Epidermis und Dermis ist in zweierlei Hinsicht nachteilig für die Integrität und die Gesundheit der Haut. Chinone sind an Redoxcyclingprozessen beteiligt. Redoxcycling beschreibt dabei die zyklische Reduktion von Chinonen zu korrespondierenden Semichinonen.

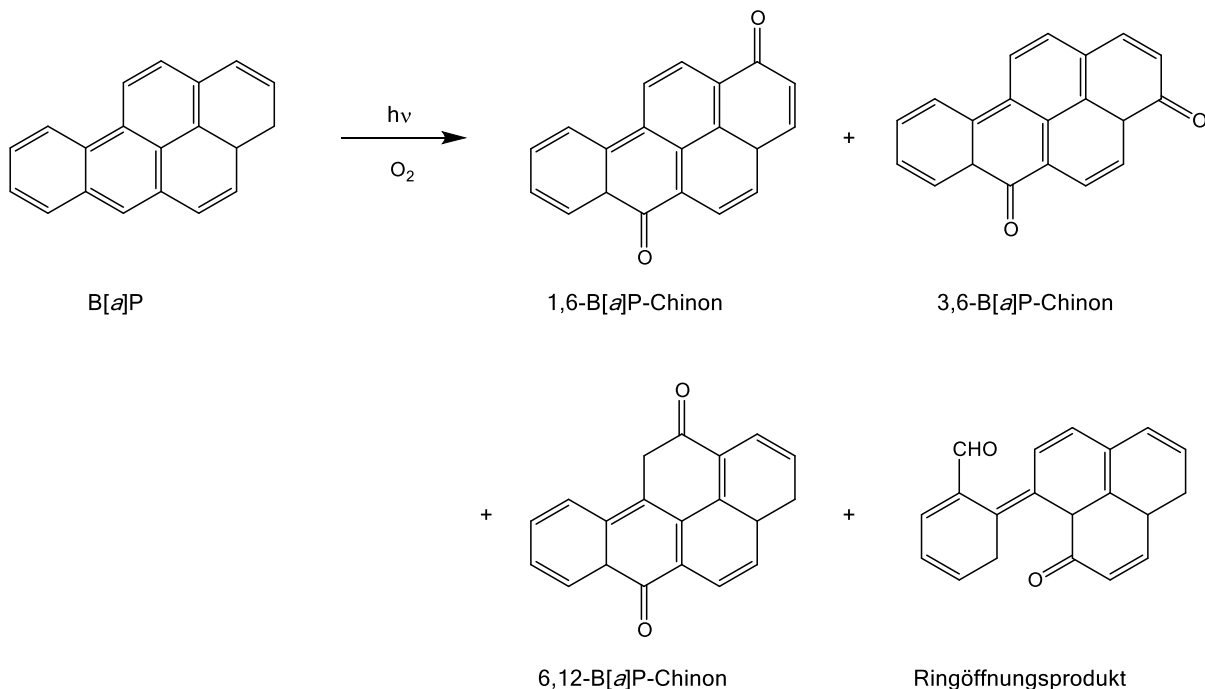


Abbildung 7: Bildung von Photooxidationsprodukten ausgehend von Benzo[*a*]pyren.

(Modifiziert nach Fu *et al.*, 2012)

Die darauffolgende Rückbildung des Chinonssystems erfolgt durch die Reaktion mit molekularem Sauerstoff. Dabei werden Superoxidanionen gebildet, die im Anschluss zu unreaktiverem Wasserstoffperoxid dismutieren. Wasserstoffperoxid führt in Folgereaktionen zu oxidativem Stress, was wiederum die antioxidative Kapazitäten der Zelle verringert (KELLY *et al.*, 2019). So wird beispielsweise der Pool des antioxidativ-wirkenden Tripeptids Glutathion (GSH) depletiert. GSH gilt während dem Sonnenbaden als wichtiger Bestandteil der hauteigenen Radikalabwehr und bietet eine wichtige Schutzfunktion vor UV-induzierten Hauterythemen. Reaktive Zwischenprodukte wie ROS führen weiterhin zu Lipid- und Proteinoxidationen sowie zu lokalen Inflammationsreaktionen. ROS schädigen außerdem die DNA durch die Ausbildung von oxidativen DNA-Addukten und DNA-Strangbrüchen (LEE *et al.*, 2012B).

Des Weiteren sind reaktive Verbindungen wie Chinone in der Lage, unter UV-Bestrahlung zu fragmentieren und niedermolekulare radikalische Spaltprodukte auszubilden, deren Diffusion in tiefere Schichten der Dermis erleichtert ist (HOPF *et al.*, 2018). Die hohe Proliferationsrate und das Abschilferungsvermögen der Kerneozyten ist unterhalb des *Stratum basale* nicht mehr gegeben, wodurch entstandene Schäden persistieren können (NATARAJAN *et al.*, 2014).

Zwar ist die phototoxische Wirkung von PAK auf der Haut lange bekannt, jedoch liegen nur wenige Studien vor, die eine Koexposition von Mineralölen und Sonnenstrahlen berücksichtigen. Im ersten Teil der Dissertationsschrift wird daher der Einfluss von MOAH-Fractionen auf die sonnenlichtexponierte Hautzelllinie HaCaT (*human adult low calcium high temperature keratinocytes*) untersucht. Neben den Untersuchungen von Mineralölen widmet sich der zweite Teil dieser Arbeit dem Einfluss und potentiellen Wirkmechanismen von Metallnanopartikeln auf humane Keratinozyten sowie Endothelzellen der Haut.

2.4 NANOPARTIKEL

Die Entwicklung und Forschung der Nanotechnologien schreitet immer weiter voran. Fortwährend werden neue Materialien entwickelt und neue Anwendungen gefunden. Viele Nanomaterialien haben den Weg in den Alltag der Verbraucher geschafft. Das Internationale Institut für Normung (*International Organization for Standardization*, ISO) definiert Nanotechnologien als Verfahren und Technologien, mit deren Hilfe Strukturen und Materialien erforscht, bearbeitet oder produziert werden, die in mindestens einer Raumrichtung (Höhe, Breite, Länge) kleiner als 100 nm sind (ISO/TS 80004-1:2010). Eine Untergruppe der Nanomaterialien bilden dabei die Nanopartikel (NP). NP gehören definitionsgemäß zu den kleinsten Nanomaterialien. Ihre Raumausdehnung ist in alle drei Dimensionen kleiner als 100 nm. NP besitzen im Gegensatz zu höherskaligen Partikeln und Feststoffen ein größeres Oberfläche-zu-Masse Verhältnis. Dadurch unterscheiden sie sich maßgeblich in ihren physikochemischen Eigenschaften. Es kommt beispielsweise zu Wechselwirkungen von NP und elektromagnetischen Feldern des sichtbaren Lichtes, wodurch Absorptionsbanden verschoben werden und im Vergleich zu größeren Partikeln unterschiedliche

optische Eigenschaften hervorgehen. Die große spezifische Oberfläche von NP erhöht weiterhin die chemische Reaktivität (NEL *et al.*, 2006; OBERDÖRSTER *et al.*, 2005).

Zwei verschiedene Verfahren zur Herstellung von Nanomaterialien sind heute etabliert. Sie werden in *Top-Down*-Verfahren und *Bottom-Up*-Verfahren unterteilt. Unter *Top-Down* versteht man die Zerkleinerung von größeren Strukturen zu Nanomaterialien. Beispiele hierfür sind klassische Mahlprozesse oder Laserablation. Bei *Bottom-Up*-Strategien werden nanoskalige Strukturen durch physikalische oder chemische Prozesse aus atomaren bzw. molekularen Bestandteilen erzeugt. Ein Beispiel für solch einen *Bottom-Up*-Prozess ist die Herstellung von NP durch Kondensationsreaktionen aus der Gasphase oder der flüssigen Phase (KHAN *et al.*, 2019).

Um die Vorteile und Chancen dieser besonderen Materialien bei einem hohen Maß an Sicherheit zu bewahren, sind in den letzten Jahren unter großem Aufwand gesetzliche Regelwerke erstellt worden, die der Minimierung möglicher Risiken für den Verbraucher dienen sollen. Für Biozide, Lebensmittel, Verpackungen und Kosmetika wurden dedizierte Rechtstexte verfasst, die die bestimmungsgemäße Verwendung von Nanomaterialien definieren.

2.4.1 NANOMATERIALIEN IN KOSMETIKA

Nanomaterialien finden aufgrund ihrer besonderen Produkteigenschaften in der kosmetischen Anwendung seit Jahren Einsatz. Vor allem in Sonnencremes, Lidschatten, Mascara und Deodorants sind sie zu finden. Aufgrund veränderter optischer Eigenschaften sind beispielsweise Titandioxid und Zinkoxid Nanopartikel nicht länger weiß, sondern transparent und hinterlassen nach dem Eincremen mit Sonnencreme keinen störenden weißen Film. Farbgebende Kosmetika erhalten aufgrund von Nanopartikeln besondere Deckkraft und führen zu einer verlängerten Haltbarkeit auf der Haut. Die große Oberflächenreaktivität von Silbernanopartikeln wird sich bei Deodorants zu Nutze gemacht: Von der Oberfläche abgegebene Silberionen hemmen das bakterielle Wachstum und wirken so der Geruchsentstehung entgegen (LOHANI *et al.*, 2014).

Die EU Kosmetikverordnung ergänzt in ihren Definitionen von Nanomaterialien die Größendefinition von kleiner 100 nm in mindestens einer Raumausrichtung um die biologische Beständigkeit und die absichtliche Verwendung. Nanomaterialien gemäß der EU Kosmetikverordnung sind daher explizit wegen ihrer besonderen Eigenschaften eingesetzte, unlösliche und beständige Materialien. Nanoskalige Liposomen, Micellen oder Vesikel fallen somit nicht in den Regulationsbereich der Verordnung (EG) Nr. 1223/2009.

Anforderungen an bestimmte Nanomaterialien bezüglich Reinheit, Zusammensetzung, Beschichtungen, Verunreinigungen und Partikelgröße sind in den Anhängen der EU Kosmetikverordnung umfassend beschrieben. Nanomaterialien, die diesen Anforderungen entsprechen und nicht bereits durch Anhang IV

der Kosmetikverordnung zugelassen sind, bedürfen einer Anmeldung bei der EU-Kommission. Ihre gesundheitliche Unbedenklichkeit muss vor Inverkehrbringen durch einen Sicherheitsbericht belegt werden. Zulassungsbeschränkungen für Nanomaterialien gibt es für UV-Filter, Konservierungs- und Farbstoffe. In Sprays dürfen Nanomaterialien generell nicht eingesetzt werden (VO (EG) Nr. 1223/2009).

In Kosmetika verwendete Nanomaterialien müssen gemäß INCI (*International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*) auf der Inhaltsstoffliste durch den Zusatz „nano“ hervorgehoben werden. Der Gesetzgeber möchte dem Verbraucher auf diese Weise eine Entscheidungshilfe zur Kaufabsicht geben (VO (EG) Nr. 1223/2009).

Seit Juli 2017 existiert ein durch den Verbraucher einsehbarer Katalog aller in der EU registrierten Nanomaterialien für kosmetische Mittel. Dieser wird regelmäßig aktualisiert und gibt Überblick über die eingesetzten Nanomaterialien.

Die Studienlage über den Verbleib und die hervorgerufenen Reaktionen von Nanomaterialien auf der menschlichen Haut sowie das Wissen über potentielle Schadwirkungen von Nanopartikeln (beispielsweise Kupfer- oder Chromnanopartikeln) auf die menschliche Gesundheit ist begrenzt. In der vorliegenden Arbeit wurden daher Aufnahmestudien in Modellzellsysteme der Haut durchgeführt und potentielle Wirkmechanismen genauer untersucht.

2.4.2 DERMALER AUFNAHME VON NANOPARTIKELN

Die Aufnahme und der Transport von Nanopartikeln und Nanomaterialien durch die Haut ist stark von deren physikochemischen Eigenschaften abhängig. Auch physiologische Faktoren wie Hautbeschaffenheit, Alter und betroffene Körperregion spielen eine Rolle. Potentielle Penetrationsrouten von Nanopartikeln durch intakte Haut lassen sich in drei Haupteintrittswege einteilen: Die endozytotische intrazelluläre Aufnahme mit anschließender Weitergabe in tieferliegende Hautschichten, die interzelluläre Penetration durch die Extrazellulärmatrix des *Stratum corneum* und das Eindringen von Partikeln in Hautanhangsgebilde wie Haarfollikel, Schweiß- und Talgdrüsen (LOHANI *et al.*, 2014). Die Aufnahmerate von Nanomaterialien in gesunde Haut ist als gering einzuschätzen (LAUX *et al.*, 2018; RANCAN *et al.*, 2012; VOGT *et al.*, 2014), allerdings können Verletzungen, Irritationen und UV-Bestrahlung negativen Einfluss auf die Barrierefunktion der Haut haben und eine Partikelabsorption begünstigen. So gibt es beispielsweise Hinweise darauf, dass Zinkionen nach Applikation des nanopartikulären UV-Filters Zinkoxid in Blut und Urin gefunden werden konnten, wenn Probanden den UV-Schutz während des Sonnenbadens auftrugen (GULSON *et al.*, 2010; VOGT *et al.*, 2014; MORTENSEN *et al.*, 2008; VOGT *et al.*, 2014). Erkenntnisse wie diese weisen darauf hin, dass Nanopartikel bis tief in die Haut eindringen und dort sowohl in Zellen unterhalb des *Stratum Basale* als auch in Blutgefäße eintreten können (MORTENSEN *et al.*, 2008).

Untersuchungen bezüglich potentieller Wirkmechanismen von unterschiedlichen Partikeln wurden in der vorliegenden Arbeit somit in Keratinozyten des *Stratum basale* (HaCaT) als auch einer Modellzelllinie für Endothelgewebe von Blut- und Lymphgefäßen (EA.hy926) durchgeführt.

2.4.3 KUPFEROXIDNANOPARTIKEL

Kupfer ist ein ubiquitär vorkommendes Übergangsmetall der 1. Nebengruppe. Aufgrund seiner hohen thermischen und elektrischen Leitfähigkeit findet Kupfer hauptsächlich in der Herstellung technischer und elektrischer Produkte Anwendung. Ferner ist es ein wichtiges Legierungsmetall. Kupfer kommt in den Oxidationsstufen von $+I$ bis $+IV$ vor, wobei $+I$, und $+II$ am häufigsten vertreten sind (JANIÁK *et al.*, 2018). Kupferverbindungen wie Kupferoxid (CuO) finden immer häufiger Einsatz im nanoskaligen Größenbereich. So gelten Kupferoxidnanopartikel (CuO NP) als vielversprechende Alternative zu chemischen Bakteriziden. Aufgrund ihrer Hitzebeständigkeit, Lagerstabilität, ihres verhältnismäßig geringem allergenen Potentials und ihrer antibakteriellen Wirkung gegenüber Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien sind sie für Anwendungen in Bedarfsgegenständen und kosmetischen Mitteln sowie Pharmazeutika interessant.

CuO NP sind dabei eine preisgünstige und stabile Alternative und lassen sich gut in Polymere einarbeiten (GAWANDE *et al.*, 2016). Der genaue Mechanismus der bakteriziden Wirkung von CuO NP ist nicht abschließend geklärt. Es wird vermutet, dass freier Cu(II) zu Störungen der bakteriellen Membranen führt und eine gesteigerte ROS-Produktion die Bakterien abtötet (BEYTH *et al.*, 2015; LEMIRE *et al.*, 2013). CuO NP zeigen vergleichbare antimikrobielle Effekte wie Silbernanopartikel und sind gegen einige Keime sogar effektiver als Silber- und Goldnanopartikel.

2.4.3.1 TOXIZITÄT VON KUPFEROXIDNANOPARTIKELN

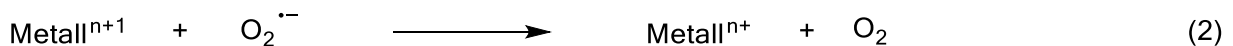
Aufgrund ihres hohen Redoxpotentials führten CuO NP in zellulären Testsystemen zu inflammatorischen Reaktionen in Lungenepithelzellen und wiesen zyto- und genotoxische Effekte auf. Im Vergleich zu äquimolaren löslichen Kupferkonzentrationen zeigten CuO NP unter *in-vitro*-Bedingungen eine erhöhte Toxizität (SEMISCH *et al.*, 2014; STRAUCH *et al.*, 2017). Als Grund hierfür wird der sog. *Trojan Horse mechanism* diskutiert (KARLSSON *et al.*, 2008). Kupfer ist ein essentieller Cofaktor in mehr als 30 Metalloenzymen wie beispielsweise Superoxiddismutase (SOD), Cytochrom-C-Oxidase (COX), Lipoxygenase (LOX) oder Dopamin- β -Hydroxylase und besitzt eine Schlüsselrolle bei wichtigen zellulären Funktionen (SHIM UND HARRIS, 2003). Aus diesem Grund ist eine gut regulierte Kupferaufnahme in die Zelle notwendig. Nanoskalige Partikel können endozytiert werden. Dabei bildet sich um membranständige NP eine Einstülpung der Zellmembran und der Partikel wird internalisiert. Das gebildete Endosom reift zum Lysosom heran und es kommt zu einer Ansäuerung des pH-Wertes auf ca. 4,5 (CANTON UND BATTAGLIA, 2012). CuO NP lösen sich aufgrund des sauren pH-Wertes schnell auf. Dies führt zu einer bis zu hundertfach erhöhten intrazellulären Kupferionenkonzentration. Die antioxidativen Schutzmechanismen

der Zelle werden so überlastet. Eine Dysregulation der normalen Redox-Homöostase und ein gesteigertes Level an ROS können zu Schädigungen zellulärer Makromoleküle wie Lipide, Proteine und DNA führen.

Mechanistisch ist die Entstehung von ROS nicht vollständig nachvollzogen. Zu den am besten verstandenen Mechanismen zur Generierung von ROS gehört die Fenton-Reaktion (1), bei der ein Übergangsmetallion mit Wasserstoffperoxid unter Bildung des hochreaktiven Hydroxylradikals reagiert. Übergangsmetalle wie Fe(II), Cu(I), Cr(IV, V), Co(II), Ni(II) und V(IV) generieren mit zum Teil stark unterschiedlichen Effizienzen über die Fenton-Reaktion freie Radikale.



Eine weitere Schlüsselrolle bei der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies spielt die Haber-Weiss Reaktion (2). Während der Haber-Weiss Reaktion reagieren Übergangsmetalle wie Cr(IV, V), Co(I, II), V(IV) mit Superoxidanionen und werden dabei reduziert. Die reduzierten Metallverbindungen stehen daraufhin wieder der Fentonreaktion zur Verfügung und können weitere Hydroxylradikale generieren.



Endogene Antioxidantien wie Superoxiddismutase (SOD), Katalase (CAT) und Glutathionperoxidase (GPX) können entstandene ROS zu einem gewissen Maße detoxifizieren. Daneben tragen exogene Antioxidantien, wie Vitamine und phenolische Verbindungen, ebenfalls zum Schutz vor oxidativen Schäden bei. Das wohl wichtigste Schutzsystem vor oxidativem Stress ist das in allen Zellen vorkommende Tripeptid GSH. Es reduziert freie Radikale und geht dabei die oxidierte Dimerstruktur GSSG über (LEE *et al.*, 2012B).

2.4.4 CHROMOXID-PARTIKEL

Chrom ist ein ubiquitär vorkommendes Übergangsmetall der 6. Nebengruppe. Aufgrund seiner Oxidationsbeständigkeit, seines Glanzes und seiner Härte wird es häufig als Legierungsmetall in korrosionsbeständigen und gehärteten Stählen verwendet. Chrom kommt in allen Oxidationsstufen von -II bis +VI vor, wobei 0, +II, +III und +VI am häufigsten vertreten sind. Sein Name leitet sich aus dem Griechischen *chroma*, übersetzt Farbe, ab (BRIEHL, 2014). Lange Zeit galt Chrom als essentielles Spurenelement (SCHWARZ UND MERTZ, 1959). Seine Funktion im insulinabhängigen Glucosemetabolismus, welcher in den 1960er Jahren postuliert wurde, wird derzeit hinterfragt und ist noch immer Gegenstand der aktuellen wissenschaftlichen Debatte (PAVESI UND MOREIRA, 2020). Die EFSA (*European Food Safety Authority*) kam 2014 zu dem Schluss, dass keine vorteiligen Effekte durch eine Supplementierung der Nahrung mit Chrom zu erwarten sind (EFSA, 2014).

Die Einsatzgebiete von Chrom in Alltagsgegenständen sind vielfältig. Neben der Verwendung als Legierungsmetall findet es auch in der Lederindustrie Anwendung. Etwa 90 % aller Ledererzeugnisse wie

Schuhe, Gürtel, Uhrenarmbänder, Handschuhe und Möbel sind heute mithilfe von Cr-Salzen gegerbt. Das hierbei eingesetzte Cr(III) dient der Kollagenquervernetzung, wobei Koordinationsverbindungen von Aminosäureseitenketten (Arginin/Asparagin) der Kollagenfibrillen mit Cr(III) als Zentralatom ausgebildet werden. Durch intermolekulare Vernetzung wird das Leder nach dem Gerbprozess stabil gegenüber mikrobiellem Abbau und besitzt eine verringerte Wasseraufnahmekapazität. Es ist außerdem mechanisch belastbarer und bleibt dauerelastisch (HEDBERG *et al.*, 2015; SREERAM UND RAMASAMI, 2003).

Aufgrund seiner intensiven Färbung finden Chromverbindungen auch als Pigmente Einsatz. Sowohl Cr(III)-Oxid, als auch Cr(III)-Hydroxid sind laut Anhang IV der EU-Kosmetikverordnung Nr. 1223/2009 als Farbpigmente in kosmetischen Mitteln zugelassen. Beide Verbindungen sind grün gefärbt und kommen vor allem in Lidschatten, Eyelinern und Mascara vor (Environmental Working Group, 2020). Auch die Tätowierindustrie macht sich die intensive und beständige Färbung von Chromoxid zu Nutzen und setzt es in Tätowierfarben ein (SCHREIVER *et al.*, 2017). Eine weitere Expositionsquelle gegenüber Cr-Verbindungen stellt die Verarbeitung zementhaltiger Baustoffe dar. Hier tritt das Chrom als Kontaminante hervor. Der Eintrag von Chrom findet zum einen direkt über die verwendeten Rohstoffe wie Kalkstein, Tonerden und Sand statt. Zum anderen kommt es bei der Prozessierung von Zement zum Abrieb von hochfesten Edelstahllegierungen der Walzen, Mühlen und Brennöfenauskleidungen. Die überwiegend dreiwertigen Cr(III)-Verbindungen werden beim Brennen unter Sauerstoffeinfluss in der Ofenatmosphäre nahezu vollständig zu hexavalenten Chromaten oxidiert (BENEDIX, 2015). Cr(VI) und Cr(III) besitzen dabei ein stark unterschiedliches Wirkpotential, worauf in Folgendem eingegangen werden soll.

2.4.4.1 TOXIZITÄT VON CHROMVERBINDUNGEN

Bei der toxikologischen Betrachtung von Cr-Verbindungen bedarf es einer expliziten Unterscheidung der Oxidationsstufe der jeweiligen Cr-Spezies. Cr(III) und Cr(VI) unterscheiden sich in ihren zellulären Aufnahmemechanismen und daher in ihrer Toxizität. Cr(III) bindet aufgrund ähnlicher Größe und Ladung wie dreiwertiges Eisen an das Eisentransportprotein Transferrin und gelangt somit rezeptorvermittelt in die Zelle. Zwar kann Cr(III) an DNA-Basen binden und zu DNA-*Intercrosslinks* und *-Intracrosslinks* sowie ternären DNA-Addukten mit Aminosäuren, GSH oder Ascorbinsäure führen, diese kommen jedoch erst zum Tragen, wenn Cr(III) in unmittelbarer Nähe zu zellulären Zielstrukturen aus höherwertigen Cr-Spezies wie Cr(IV) oder Cr(V) reduziert wird. Die geringe Bioverfügbarkeit, die Reaktionsträgheit sowie die hohe Stabilität von Cr(III)-Verbindungen sind ausschlaggebend für die nur schwach ausgeprägte akute Toxizität von Cr(III) (ZHITKOVICH, 2011; PAVESI UND MOREIRA, 2020).

Im Gegensatz dazu ähneln sechswertige Chromate strukturell aufgrund ihrer tetraedrischen Anordnung den Sulfaten. Sie gelangen durch erleichterte Diffusion über unspezifische Anionentransporter in die Zellen. Chromate sind potente Oxidationsmittel und in der Lage über das sogenannte „*Uptake Reduction Model*“ (Abbildung 8) vielerlei Zielorgane wie Haut, Lunge und Nieren zu schädigen. Es wird nach der Aufnahme über Ein- und Zweielektronensysteme wie Glutathion und Ascorbinsäure zu Cr(III) reduziert. Bei

der Reduktion von Cr(VI) entstehen hochreaktive Intermediate unter der Bildung von ROS. Cr(V) und Cr(VI) können an Kernproteine wie Histone binden und in den Nukleus gelangen (LEVINA *et al.*, 2006). Eine mögliche Folge sind hierbei Chromosomenaberrationen sowie die Bildung von Mikronuklei. Cr(VI)-Verbindungen gelten als klastogen (Chromosomen-brechend) und aneugen (Spindelapparat-beeinflussend) (WISE *et al.*, 2018).

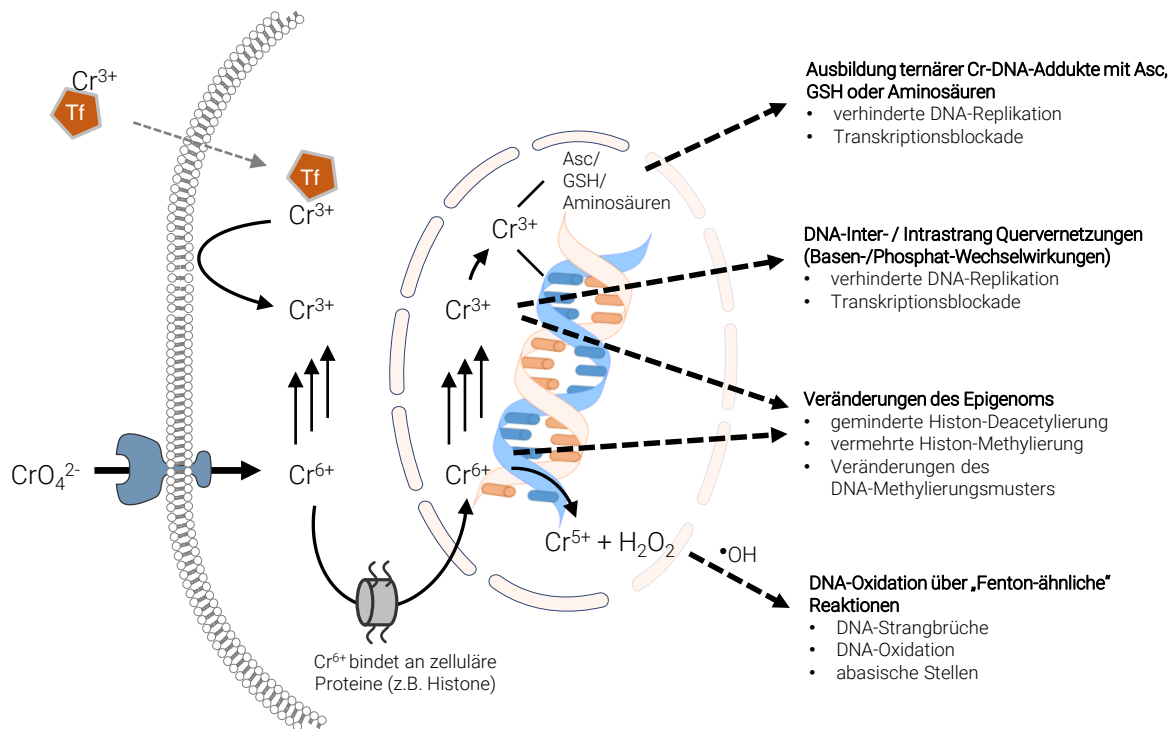


Abbildung 8: Schematischer Überblick der Chrom-induzierten Genotoxizität.

Chromat (CrO_4^{2-}) gelangt über anionische Transporter in das Zellinnere. Cr(III) kann die Zellmembran nicht durchqueren und wird nur in geringem Maße, Transferin (TF)-vermittelt, aufgenommen. Intrazellulär wird Cr(VI) zu Cr(V), Cr(IV) und Cr(III) reduziert. Cr(VI) kann durch Proteinbindung, z.B. an Histonen in den Zellkern gelangen und dort durch Kernproteine reduziert werden. Cr(V) ist in der Lage DNA-Basen direkt zu oxidieren und zu abstrahieren. Die Folge sind Oxidationsprodukte, abasische Stellen und DNA-Strangbrüche. Cr(VI) und Cr(III) führen über bisher noch wenig erforschte Mechanismen zur Veränderung des Epigenoms und haben beispielsweise Einfluss auf die Transkription von DNA-Reparaturgenen. Cr(V) kann in Fenton-ähnlichen Reaktionen Oxidationsprodukte, wie 8-Oxoguanin, bilden. Cr(III) besitzt eine hohe Affinität zu Proteinen, DNA-Basen und dem DNA-Phosphatrückgrat. Bekannte Läsionen der DNA, die zu einer Transkriptionsblockade und einer geminderten Replikation führen, sind ternäre DNA-Addukte mit DNA-Basen bzw. dem DNA-Phosphatgerüst, Cr(III) und Molekülen wie Ascorbinsäure (Asc), Aminosäuren (AS) oder Peptiden wie Glutathion (GSH). Quervernetzungen des DNA-Phosphatrückgrates mit Cr(III) führen ebenfalls zu einer Transkriptionsblockade und einer gehemmten DNA-Replikation (O'BRIEN *et al.*, 2003; BROWNING, 2017).

Weiterhin ist bekannt, dass Chromate epigenetische Veränderungen, wie Histonmodifikationen und DNA-Methylierungen hervorrufen. Infolgedessen wird die Ablesehäufigkeit bestimmter Gene verringert. Kommt ein sogenanntes „gene silencing“ beispielsweise in Tumorsuppressorgenen vor, kann dies maßgeblich zur Krebsentstehung beitragen (Hu *et al.*, 2018). Cr(VI) und seine Verbindungen sind von der IARC als krebserzeugend für den Menschen eingestuft (IARC, 1990).

Neben den genotoxischen und mutagenen Eigenschaften von Cr(VI)-Verbindungen sind auch hautsensibilisierende Wirkungen bekannt. In der Allgemeinbevölkerung beträgt die Prävalenz einer Cr-vermittelten Kontaktdermatitis 1 – 3 % (THYSSEN UND MENNÉ, 2010). Der Mechanismus der Cr-vermittelten Kontaktdermatitis ist nicht im Detail verstanden. Es wird angenommen, dass Cr(VI) in die Epidermis eindringt und anschließend mithilfe von Aminosäureresten, wie Methionin, Cystein oder intrazellulären Antioxidantien zu Cr(III) reduziert wird. Erst in dieser Form stellt Chrom ein Hapten dar, bindet an Makromoleküle und verursacht schließlich die Aktivierung spezifischer T-Zellen. Nach wiederholter Exposition gegenüber Chrom kann eine Akkumulation von Lymphozyten und Makrophagen eine Spingiose hervorrufen. Wasser tritt in das Interstitium ein, Keratinozyten werden auseinander gedrängt und eine Bläschenbildung auf der Haut wird sichtbar (BUTERS UND BIEDERMANN, 2017). Auch Cr(III) kann eine Hautirritation hervorrufen, wobei diese in den meisten Fällen schwächer ablaufen, was wiederum auf die bessere Resorptionsrate von hexavalentem Chrom zurückzuführen ist (BREGNBAK *et al.*, 2015).

3 ZIELSETZUNG

Die Haut gilt als größtes Organ des Menschen und stellt eine unmittelbare Barriere zwischen Körper und Umwelt dar. Zu den wichtigsten Funktionen der oberen Hautschichten (Epidermis) gehören der Schutz vor exogenen Faktoren wie Pathogenen, Druck, Hitze, Chemikalien und solarer UV-Strahlung. Gerade kosmetische Mittel müssen daher bei normalem oder vernünftigerweise voraussehbarem Gebrauch sicher und frei von Inhaltsstoffen sein, die adverse Effekte auf der Haut verursachen, oder dazu beitragen, dass nach zusätzlicher Sonnenlichtexposition Hautirritationen die Folge sind.

Ziel dieser Dissertation ist es, die bereits etablierte Methode der quantitativen Hochdurchsatz-*Realtime* PCR auf Zellkulturmodelle der Haut anzuwenden. Substanzspezifische Veränderungen der Genexpression gelten als sensitiver Indikator für das toxikologische Potential einer Noxe und ermöglichen eine prädiktive Risikoabschätzung. In dieser Arbeit werden Hautmodellssysteme sowohl mit Mineralölkohlenwasserstoffen als auch mit Chrom- und Kupferverbindungen behandelt. Der Einsatz der genannten Substanzen in kosmetischen Mitteln wird aktuell kritisch diskutiert. Die Ergebnisse sollen daher neue Erkenntnisse zu toxikologischen Wirkprofilen liefern und bei der Einordnung dieser Verbindungen helfen.

Ein Thema, welches in den letzten Jahren vermehrt für Schlagzeilen sorgte, sind Mineralölkohlenwasserstoffe in kosmetischen Mitteln. Bei den dabei eingesetzten Verbindungen handelt es sich um ein Gemisch von Kohlenwasserstoffen unterschiedlicher Struktur und Größe, die in die Klasse der gesättigten Mineralölkohlenwasserstoffe (MOSH, *mineral oil saturated hydrocarbons*) und der ungesättigten Mineralölkohlenwasserstoffe (MOAH, *mineral oil aromatic hydrocarbons*) eingeteilt werden. Die MOAH-Fraktion kann bei Rohstoffen minderer Qualität potentiell krebserregende Substanzen wie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) enthalten. Neben genotoxischen Wirkungen von PAK liegen auch Hinweise auf phototoxische Effekte nach Bestrahlung mit Sonnenlicht vor. Diesbezüglich sollen Zusammenhänge zwischen MOAH-Gehalten verschiedener Mineralöle und zytotoxische Effekten in humanen Keratinozyten untersucht werden. Neben mittels *online* gekoppelten flüssig-gaschromatographischen (LC-GC) gewonnenen MOAH-Fractionen aus Mineralölrohstoffen kommen insgesamt 14 ausgewählte aromatische Kohlenwasserstoffe mit unterschiedlichen Substitutions- und Alkylierungsgraden als Referenzsubstanzen zum Einsatz. Zusätzlich zu substanzspezifischen Effekten der MOAH-Verbindungen sollen auch phototoxische Effekte in Keratinozyten untersucht werden.

Die Analyse der behandelten Proben sollen dabei mittels quantitativer Hochdurchsatz-PCR untersucht werden, um zelluläre Wirkmechanismen und mögliche synergistische Effekte von MOAH und künstlichem Sonnenlicht zu identifizieren. Für ein tiefergehendes Verständnis der durch die Genexpressionanalysen erlangten Ergebnisse und um die Veränderungen auf Transkriptionsebene zu verifizieren, sollen Untersuchungen auf funktioneller Ebene angeschlossen werden. Proteinexpressionsniveaus und Experimente zur Entstehung von oxidativem Stress sollen Rückschlüsse darauf geben, welche zellulären

Antwortmechanismen in sonnenlichtexponierter Haut nach dem Auftragen von MOAH-belasteten Kosmetika initiiert werden.

Aktuelle Penetrationsstudien zeigen, dass gerade kleine, nanoskalige Partikel in die Epidermis eindringen können und eine Akkumulation in Haarfollikeln stattfindet. Der zweite Fokus dieser Arbeit lag daher auf den Wirkungen von Chromoxid- (Cr_2O_3) und Kupferoxid (CuO)-Nanopartikeln sowie den entsprechenden löslichen Metallverbindungen. Sowohl Cr_2O_3 als auch CuO -Partikel besitzen in kosmetischen Mitteln Relevanz: Das grüne Cr(III)-Oxid findet unter anderem als Farbpigment in Lidschatten und Mascara, aber auch in Tätowierfarbe Anwendung. Kupfer wird aufgrund seiner antimikrobiellen Eigenschaften und der nachgesagten Fähigkeit, Gewebe sowie Haarfollikel zu erneuern eingesetzt. Nach dermalen Aufnahme von Metallverbindungen gibt es jedoch auch Hinweise auf mutagene und kanzerogene Wirkungen von Chrom und Kupfer. Cr(III)-Oxid kann mit löslichen Cr(VI)-Verbindungen verunreinigt sein und so in die Zelle aufgenommen werden. Für Cr(VI) wurde bereits postuliert, dass es nach Aufnahme in die Zelle und intrazellulärer Reduktion zu ternären DNA-Addukten, DNA-Quervernetzungen, Chromosomenabberationen und Mikronuklei führt. Kupfer(II) ist redoxaktiv und erhöht das oxidative Stresslevel der Zelle. Oxidative Schäden an DNA-Basen, Proteinen und Lipidmembranen sind die Folge. Kupfer-basierte Nanopartikel unterliegen aufgrund ihrer Größe einer erhöhten endozytotischen Aufnahme und wirken zytotoxisch sowie genotoxisch.

Neben Zellkulturexperimenten werden verschiedene Cr-Partikel unterschiedlicher Hersteller mittels Elektronenmikroskopie und dynamischer Lichtstreuung charakterisiert. Weiterhin wird mithilfe von subzellulären Systemen die Freisetzung von Cr-Ionen in biologische Modelflüssigkeiten analysiert. Die Oxidationsstufe spielt bei Cr-Verbindungen hinsichtlich der zellulären Aufnahme und Toxizität eine maßgebliche Rolle. Daher wird ein Verfahren zur Bestimmung des Oxidationszustandes der Cr-Ionen etabliert.

Als zelluläre Testsysteme finden humane Keratinozyten und Endothelzellen Anwendung. Um geeignete Inkubationsbedingungen für nachfolgende Experimente zu schaffen, werden entsprechende leicht bis moderat toxische Konzentrationen der erwähnten Metallverbindungen etabliert. Angeschlossen an die Zytotoxizitätsuntersuchungen sollen Hochdurchsatzgenexpressionsanalysen erfolgen. Anhand der substanzinduzierten Veränderungen in den Genexpressionsprofilen erfolgen weiterführende mechanistische Untersuchungen der eingesetzten Zelllinien. Eine unkontrollierte Freisetzung von redoxaktiven Cu- und Cr-Ionen nach Partikelaufnahme (*Trojan Horse mechanism*) soll mithilfe entsprechender Assays nachvollzogen werden, wobei ein gesondertes Augenmerk auf die Unterschiede zwischen den partikulären und löslichen Metallverbindungen sowie die unterschiedlichen Valenzen der drei- und sechswertigen Cr-Verbindungen gelegt werden soll. Abschließend erfolgen DNA-Methylierungsanalysen nach Behandlung mit ausgewählten Cr-Verbindungen, um potentielle Einflüsse von Chrom auf epigenetische Veränderungen der DNA zu identifizieren.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 ZELLKULTUR

Im folgenden Abschnitt werden die im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Materialien und Methoden beschrieben. Eine Auflistung der eingesetzten Lösungen, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte befindet sich im Anhang (Kapitel 8.1). Vor Verwendung in der Zellkultur wurden Lösungen und Puffer sowie Verbrauchsmaterialien sterilfiltriert, hitzeautoklaviert oder mit Heißluft sterilisiert. Alle Tätigkeiten mit lebenden Zellen wurden zum Schutz vor Kontamination in einer Reinraumwerkbank mit vertikaler Strömung (*Laminar Flow*) gemäß DIN EN 12469 durchgeführt (Thermo Electron LED GmbH; Safety Cabinet Type KS 18).

4.1.1 ZELLINIEN UND KULTIVIERUNG

Bei der Durchführung der folgenden Experimente wurde auf zwei verschiedene Zelllinien zurückgegriffen, die wichtige Zielzellen der Dermis nachempfinden. Als Modellzelllinie für Keratinozyten des *Stratum basale* kamen HaCaT zum Einsatz. EA.hy926 wurden modellhaft als gefäßauskleidendes Endothelgewebe von subkutanen Lymph- und Blutgefäßen verwendet.

HaCaT (*Human adult low Calcium high Temperature*) Zellen wachsen adhärent als *Monolayer*. Der Name dieser Zelllinie leitet sich aus der Herkunft der Zelle und den Kultivierungsbedingungen ab. Die Zellen wurden aus der Rückenhaut eines 62-jährigen männlichen Patienten entnommen und unterlagen während der Kultivierung bei niedrigen Calciumkonzentrationen (0,2 mM) und einer Temperatur von 38,5 °C einer spontanen Immortalisierung. Dabei entwickelte sich ein hypodiploider Chromosomensatz von durchschnittlich 44 Chromosomen. Trotz des transformierten Phänotyps und des unbegrenzten Wachstumspotentials können HaCaT Zellen, ähnlich wie normale menschliche Keratinozyten, eine strukturierte und differenzierte Zellarchitektur ausbilden und exprimieren keratinozytenspezifische Markerproteine, wie Keratin, Ivolucrin und Filaggrin. Sie eignen sich daher als passendes *in-vitro*-Modell der menschlichen Haut (BOUKAMP *et al.*, 1988; TROUBA *et al.*, 2002).

Bei der Zelllinie EA.hy926 handelt es sich um einen somatischen Zellhybrid. Sie wurde experimentell aus der Zelllinie A549 (Lungenkarzinomzelllinie) und primären Endothelzellen der menschlichen Nabelschnur gewonnen. Durch die Fusionierung dieser Zellen bekam EA.hy926 80 Chromosomenpaare und übernahm die Eigenschaft der Kontinuität der Zelllinie A549. Daher handelt es sich bei EA.hy926 ebenfalls um eine permanente Zelllinie (EDGEELL *et al.*, 1983). In dieser Arbeit werden EA.hy926 als Modellzelllinie für gefäßauskleidendes Endothelgewebe eingesetzt, wie es in den Blutgefäßen des *St. basale* oder in unmittelbarer Nähe der Haarfollikel anzutreffen ist.

Als Nährmedium wurde für beide Zelllinien DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) eingesetzt, wobei die EA.hy926 in DMEM *High Glucose* (DMEM HG) kultiviert wurden. Den Medien beider Zelllinien wurden 10 % fötales Kälberserum (FKS), 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin zugesetzt. Als zusätzliches Supplement im Medium der HaCaT Zellen wurde 200 mM des Dipeptids GlutaMAX™ (L-Alanine-L-glutamin) verwendet. Das DMEM HG der EA.hy926 wurde mit 2 M HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure) gepuffert. Die Kultivierungsbedingungen im Brutschrank betragen 37 °C bei einer 5 %igen CO₂-Atmosphäre und 100 % Luftfeuchtigkeit.

Beide Zelllinien wurden alle 2-3 Tage passagiert. Hierfür wurden die Lösungen auf 37 °C temperiert. Für eine Subkultivierung der Zellen wurde das Medium entnommen und der Zellrasen mit warmer phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Nach Absaugen der PBS wurden 2 mL 0,25 %ige Trypsinlösung zugegeben und für 7 min (HaCaT) bzw. 2 min (EA.hy926) bei 37 °C inkubiert. Eine erfolgreiche Trypsinierung war unter dem Lichtmikroskop erkennbar; die Zellen zeigten dann eine charakteristische runde Form auf und lösten sich vom Boden des Zellkulturgefäßes ab. Nach Ablauf der Inkubationszeit konnten die Zellen mithilfe einer 1000 µL Pipette abgelöst und nach Zellzahlbestimmung mittels CASY® in definierter Zellzahl für Zellkulturexperimente verwendet werden.

4.1.2 KRYOKONSERVIERUNG UND INKULTURNAHME

Um stets auf vitale Zellen mit einer vergleichbaren Passagezahl zurückgreifen zu können, wurden Zellen mit niedrigen Passagezahlen kryokonserviert. Aliquote von je 10⁶ Zellen wurden in 1 mL Einfrierlösung (FKS / 10 % DMSO) suspendiert und anschließend in ein vorgekühltes Kryoröhrchen gegeben. Durch die Zuhilfenahme eines *Cryo 1°C Coolers* (VWR) konnte die Temperatur schrittweise auf -80 °C heruntergekühlt werden. Das langsame Senken der Temperatur ermöglicht der Einfrierlösung bis in das Zellinnere vorzudringen. Bei Säugerzellen sollte eine Temperatursenkung von etwa -1 °C/min angestrebt werden. Das zugesetzte DMSO verhindert eine Eiskristallbildung und somit die Disruption von Zellorganellen. Nach 24 h wurde das Kryoröhrchen in Flüssigstickstoff (-196 °C) überführt.

Für die Inkulturnahme wurde das tiefgefrorene Kryoröhrchen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und unmittelbar in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen mit 10 mL frischem Nährmedium gegeben. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei Raumtemperatur und 250 x g wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen und in einem sterilen Zellkulturgebilde ausplattiert. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel, nach 48 h die erste Subkultivierung. Die Zellen wurden nach dreimaligem Passagieren für Experimente verwendet.

4.1.3 INKUBATIONEN

Für Zellkulturexperimente wurde diese mit der entsprechenden Verbindung inkubiert. Vor Inkubation wurden die Integrität und die Konfluenz der Zellen lichtmikroskopisch untersucht. Die Inkubation erfolgte zum Zeitpunkt des logarithmischen Wachstums nach einer 48-stündigen (HaCaT) bzw. 24-stündigen (EA.hy926) Wachstumsphase.

4.1.3.1 INKUBATION MIT MINERALÖLFRAKTIONEN (MOAH)


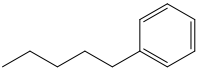
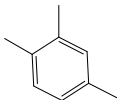
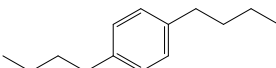
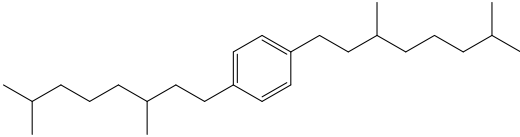
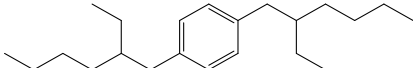
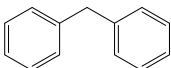
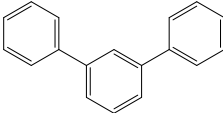
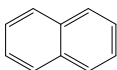
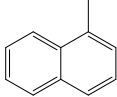
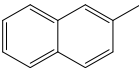
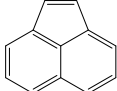

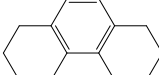
Die Inkubation mit MOAH-Fractionen erfolgte ausgehend von fraktionierten Proben, welche mittels LC-System (Agilent LC 1200/1260 Series, Infinity II) des CVUA Karlsruhes gewonnen wurden. Als Trennsäule diente eine Normalphasen-LC-Säule (Restek Allure, 25 cm x 2,1 mm) mit einer Porengröße von 60 Å. Das Silicagel ermöglichte ein starkes Zurückhalten der aromatischen Kohlenwasserstoffe der MOAH-Fraktion und der in der Probe enthaltenen Triglyceride. Dies resultierte in einem minimalen *Tailing* und einer guten Trennung zwischen MOSH und MOAH. Als Fließmittel wurden Hexan zur Gradientenelution sowie Dichlormethan für die Rückspülung und Rekonditionierung eingesetzt. Die erhaltene Fraktion wurde unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockene eingeeengt, auf der Ultrafeinwaage ausgewogen und für weitere Arbeiten in DMSO (molekularbiologische Güte) aufgenommen. Der MOAH-Gehalt wurde per ¹H-NMR bestimmt und als Naphthalin-Äquivalente berechnet (siehe Kapitel 4.13). Zu Etablierungszwecken der Methode wurde als Mineralölrohstoff auf das Fabrikationsöl Gravex 913 (Shell) zurückgegriffen. Es handelt sich dabei um ein naphthenbasisches Raffinat mit einer relativ hohen Polarität und damit einhergehenden guten Löseeigenschaften. Naphtenbasierte Öle besitzen einen hohen Aromatengehalt und sind niederviskos. Der mittels ¹H-NMR ermittelte MOAH-Gehalt betrug 4,89 %. Der finale MOAH-Gehalt berechnete sich anhand der Gesamteinwaage. Von diesem Wert ausgehend wurden DMSO-Verdünnungen in Endkonzentrationen von 50 - 250 µM in Zellkulturmedium hergestellt.

Sowohl für Kontrollen als auch für behandelte Proben belief sich die DMSO-Konzentration im Medium dabei stets auf 0,5 % (v/v). Um eine möglichst homogene Verteilung der gelösten Substanz im Medium zu gewährleisten, wurde das Inkubationsmedium vor Verwendung sorgfältig resuspendiert. Die Inkubationsdauer richtete sich an realen Applikationsszenarien von Lippen(pflege)produkten. Für 6 h verblieben die Substanzen auf den Keratinozyten, daran angeschlossen war eine 18-stündige Nachinkubation in frischem Nährmedium.

4.1.3.2 INKUBATION MIT B[a]P UND MINERALÖLKOHLENWASSERSTOFFEN

Bei der Behandlung mit B[a]P wurde analog zur den Behandlungen der MOAH-Fractionen vorgegangen. B[a]P wurde als Feststoff eingewogen und anschließend in DMSO aufgenommen. Aus einer Stammlösung mit der Konzentration von 30 mM wurden entsprechende Verdünnungen hergestellt. Zu beachten war, dass die Endkonzentration nochmals um den Faktor 200 verdünnt wurden, da der DMSO-Gehalt in der Inkubationslösung 0,5 % (v/v) nicht überschreiten durfte.

Tabelle 2: Liste der eingesetzten Mineralölkohlenwasserstoffe.

Toluol		92,14 g/mol
Pentylbenzol		148,25 g/mol
1,2,4-Trimethylbenzol		120,20 g/mol
1,4-Di-n-Butylbenzol		190,33 g/mol
1,4-Bis(3,7-dimethyloctyl)benzol		358,65 g/mol
1,4-Bis(2-ethylhexyl)benzol		302,55 g/mol
Diphenylmethan		168,24 g/mol
m-Terphenyl		230,31 g/mol
Naphthalin		128,17 g/mol
1-Methylnaphthalin		142,20 g/mol
2-Methylnaphthalin		142,20 g/mol
Acenaphthylen		152,20 g/mol
Phenanthren		178,23 g/mol
Octahydrophenanthren		186,30 g/mol

Bei den Einzelsubstanzen handelt es sich um unterschiedlich alkylierte sowie teilhydrierte aromatische Verbindungen. Sie wurden ebenfalls eingewogen und in DMSO auf 10 mg/mL verdünnt.

Die Inkubation erfolgte nach Verdünnung auf die Endkonzentration in DMSO in den Konzentrationen 10 µM, 50 µM und 125 µM

Die HaCaT Zellen wurden je nach Experimentdesign mit unterschiedlichen Konzentration von B[a]P behandelt, z.B.:

- 10 nM, 100 nM, 250 nM für Bestrahlungsexperimente
- 10 µM, 100 µM, 250 µM für Experimente ohne Sonnenlichtbestrahlung

4.1.3.3 BESTRAHLUNGSEXPERIMENTE

Um die jeweiligen Verbindungen auf potentielle Phototoxizität zu untersuchen, wurden Bestrahlungsversuche mittels Atlas SUNTEST CPS+ durchgeführt. Das Xenon-Tischprüfgerät liefert eine mittlere Bestrahlungsintensität auf Probenhöhe von 510 W/m². Die Leistungsdichte im UVA-Bereich (320 – 400 nm) beträgt dabei 56,2 W/m² und 2,84 W/m² im UVB-Bereich (290 - 320 nm). Die Proben wurden dabei für 210 Sekunden bestrahlt. Somit belief sich die Strahlendosis auf 1,18 J/cm² im UVA-Bereich und 60 mJ/cm² im UVB-Bereich. Die Proben wurden für 3 h mit den Testsubstanzen behandelt, das Medium wurde abgesaugt und durch PBS ersetzt und bei Raumtemperatur bestrahlt. Die Deckel der Zellkulturgefäße wurden während der Bestrahlung gegen eine UV-durchlässige Quarzglasplatte der Fa. GVB GmbH ersetzt. Nicht bestrahlte Kontrollen wurden für die Dauer der Bestrahlung ebenfalls aus dem Inkubator herausgenommen und im Dunkeln aufbewahrt. Nach Bestrahlung wurde das Medium erneut auf die Zellen gegeben und weitere 3 h auf den Zellen belassen. Auf diese Weise konnten unterschiedliche Effekte des künstlichen Sonnenlichts in den Zellen nachempfunden werden.

In den ersten Stunden der Inkubation werden die Testsubstanzen bereits in die Zelle aufgenommen und zum Teil metabolisiert. Das Ersetzen des Mediums durch PBS während der Bestrahlung verhindert die Entstehung von Photosensibilisatoren im Nährmedium. Aufgenommene Mineralölkohlenwasserstoffe werden, wie in Kapitel 2.3.7 beschrieben, durch die Bestrahlung aktiviert und/oder unterliegen einer photolytischen Fragmentierung. UV-behandelte Zellen weisen eine erniedrigte Membranintegrität auf (LARSSON *et al.*, 2005). Die erneute Behandlung der Zellen mit Inkubationslösung begünstigt so, dass weiter Testsubstanz in die Zelle aufgenommen wird. An die zweite Behandlung mit den gewählten Testsubstanzen war eine 18-stündige Nachinkubationszeit angeschlossen.

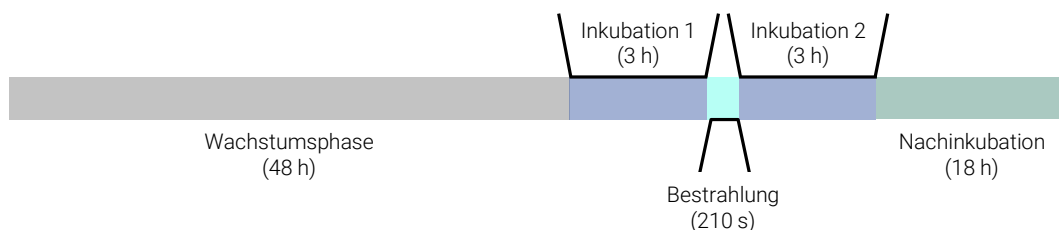


Abbildung 9: Inkubationsschema der bestrahlten Mineralölkohlenwasserstoffe.

4.1.3.4 PARTIKELINKUBATION

Für die Partikelinkubationen wurden zunächst Massen von 10 – 100 mg in 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße eingewogen. Um eine benötigte Stammlösung in der Konzentration 1 mg/mL zu erhalten, wurden die eingewogenen Partikel zweimal mit je 500 µL bidestiliertem Wasser quantitativ in ein steriles Schnappdeckelglas überführt, welches eine definierte Menge bidestiliertem Wasser enthielt, sodass die finale Konzentration von 1 mg/mL resultierte. Die Lösung wurde für 10 min in einem Ultraschallbad sonifiziert (35 kHz, 160 Watt). Anschließend erfolgte die Herstellung der Inkubationskonzentrationen in den entsprechenden Nährmedien. Unabhängig des Experimentes wurde pro cm² Wachstumsfläche mit 200 µL Inkubationsmedium inkubiert. Für eine 6 cm Zellkulturschale mit 21 cm² entsprach dies 4,2 mL Inkubationsvolumen; die Kavitäten einer 96-Well Platte mit 0,31 cm² Wachstumsfläche wurde entsprechend mit 66 µL inkubiert.

4.1.3.4.1 KUPFERVERBINDUNGEN

Kupferchlorid wurde als lösliche Kupferverbindung als Referenz zu den CuO NP eingesetzt. Die Inkubationslösungen wurden in äquimolaren Konzentrationen an freien Cu(II)-Ionen (siehe Tabelle 3) unter der Annahme einer vollständigen Löslichkeit der Partikel verdünnt.

Tabelle 3: Dosisangaben von partikulären und löslichen Kupferverbindungen.

CuO NP	0,5 µg/mL	1 µg/mL	2 µg/mL	5 µg/mL	20 µg/mL	50 µg/mL
CuCl ₂ [µM]	6,3	12,6	25,2	63,0	252,0	630,0
CuO [mg/cm ²]	0,1	0,2	0,4	1,0	4,0	10,0

4.1.3.4.2 CHROMVERBINDUNGEN

Aus Chromchlorid und Kaliumdichromat wurden Stammlösungen hergestellt, die für die Inkubationen entsprechend mit Medium verdünnt wurden. Chromchlorid wurde als lösliche Cr(III)-Verbindung als Referenz zu den Cr₂O₃ Partikeln eingesetzt. Die Konzentration der freien Cr(III)-Ionen in der Stammlösung betrug 200 mM. Die Inkubationslösungen wurden in äquimolaren Konzentrationen (siehe Tabelle 4) unter der Annahme einer vollständigen Löslichkeit der Partikel verdünnt.

Tabelle 4: Dosisangaben von partikulären und löslichen Chrom(III)-Verbindungen.

Cr ₂ O ₃	1,0 µg/mL	2,0 µg/mL	5,0 µg/mL	10,0 µg/mL	20,0 µg/mL	50,0 µg/mL
CrCl ₃ ·6H ₂ O [µM]	13,2	26,4	66,0	132,0	264,0	660,0
[mg/cm ²]	0,1	0,2	0,4	1,0	4,0	10,0

Kaliumdichromat wurde als lösliche Cr(VI)-Referenz vergleichend zu den Cr₂O₃ Partikeln eingesetzt. Die Konzentration der freien Cr(VI)-Ionen in der Stammlösung betrug 10 mM. Die Inkubationslösungen wurden in äquimolaren Konzentrationen (siehe Tabelle 5) unter der Annahme einer vollständigen Löslichkeit der Partikel verdünnt.

Tabelle 5: Dosisangaben von partikulären und löslichen Chrom(VI)-Verbindungen.

Cr ₂ O ₃	0,1 µg/mL	0,2 µg/mL	0,5 µg/mL	1,0 µg/mL	2,0 µg/mL	5,0 µg/mL
K ₂ Cr ₂ O ₇ [µM]	1,32	2,64	6,6	13,2	26,4	66,0
[mg/cm ²]	0,02	0,04	0,1	0,2	0,4	1,0

4.2 ZELLZAHL UND KOLONIEBILDUNGSFÄHIGKEIT

Um die Zytotoxizität von B[a]P zu bestimmen und die Ergebnisse des unter 4.3 beschriebenen ATP-Assays einordnen zu können, wurden Versuche zur Zellzahlbestimmung mit anschließender Untersuchung der Koloniebildungsfähigkeit durchgeführt. Die akut zytotoxische Wirkung von B[a]P wurde mittels der Zellzahl bestimmt. Das klonogene Langzeitüberleben und somit die chronisch-toxischen, wachstumshemmenden Effekte des PAK, wurden mit Hilfe des Kolonieformationsassays (*colony forming ability assay* = CFA) untersucht. Wachstumshemmende Substanzen führen aufgrund einer gestörten Proliferation zu kleineren und/oder weniger Kolonien im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Dazu wurden zunächst je 4×10^5 HaCaT Zellen in 60 mm Schalen ausgestreut und unter den zuvor dargestellten Wachstumsbedingungen für 48 h kultiviert. Im Anschluss wurde das Medium abgesaugt und mit je 4,2 mL der Testsubstanzlösungen für 3 h vorinkubiert, in PBS bestrahlt und erneut für 3 h inkubiert (siehe Abschnitt 4.1.3.2). Für jede Konzentration wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Nach der Behandlung wurden die Zellen trypsiniert und in frischem Medium aufgenommen. Nach Aufnahme der trypsinierten Zellen in 50 µL CASYTon® erfolgte die Zellzahlbestimmung mittels CASY® TT Zellzählgerät.

Zur Ermittlung der Koloniebildungsfähigkeit wurden nach Behandlung jeder Schale 300 Zellen entnommen und in Dreifachbestimmung weitersetzt. Die Zellen wurden anschließend für 10 Tage im Inkubator kultiviert. Die Anzahl der Tage richtet sich dabei nach der Größe der Kolonien. Eine zählbare Kolonie sollte aus mindestens 50 Zellen bestehen. Die Kolonien wurden für eine Stunde mit Giemsa®-Färbelösung (1:20) angefärbt und im Anschluss mit PBS gewaschen und mit gekühltem Ethanol für 5 min fixiert. Die Reste der Färbelösung wurden entfernt, mit destilliertem Wasser abgespült und die Zellkulturschalen über Nacht getrocknet. Die Anzahl der violett gefärbten Kolonien wurde mittels Koloniezählgerät (*Colony Counter BZG-30*) bestimmt. Die Ermittlung der Koloniebildungsfähigkeit wurden

im Rahmen der wissenschaftlichen Abschlussarbeiten von Frau M.Sc. Yanfang Xu und Herrn M.Sc. Marcel Kuntz durchgeführt.

4.3 ERMITTLUNG DER ZYTOTOXIZITÄT MITTELS ATP-ASSAY

Die Bestimmung der akuten zytotoxischen Wirkung der getesteten Mineralölfractionen, von B[a]P, den aromatischen Einzelverbindungen sowie der Metallverbindungen wurde mithilfe eines ATP-Assays durchgeführt. Der ATP-Assay wurde in weißwandigen 96-well Platten mit transparentem Boden durchgeführt. Pro Kavität wurden 10^5 Zellen ausgestreut und entsprechend der Zelllinie für 24 h (EA.hy926) bzw. 48 h (HaCaT) kultiviert. Die Inkubation der Zellen erfolgte wie in Kapitel 4.1.3 beschrieben. Nach 6- (MOAH) bzw. 24-stündiger (Metallverbindungen) Exposition wurden die Versuche abgebrochen, die Inkubationslösungen entfernt und 60 μ L frisches Medium hinzugegeben. So wurde verhindert, dass im Überstand verbliebene Mineralölkohlenwasserstoffe bzw. Metallverbindungen negativen Einfluss auf die Testergebnisse nehmen. Im Anschluss wurden 60 μ L CellTiter-Glo®-Reagenz in jede Kavität hinzugegeben und eine Äquilibrationsphase von 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln eingehalten. Das zugesetzte CellTiter-Glo® lysiert die Zellen, wodurch intrazelluläres ATP freigesetzt wird. Die Messung der Biolumineszenz fand am Mikrotiterplattenlesegerät Infinte® 200 Pro statt. Die Platte wurde vor jeder Messung 2 min orbital geschüttelt, um eine gute Durchmischung zu gewährleisten. Nach einer Äquilibrationsdauer von 10 min, die der Stabilisierung des Signals diente, wurde die Photonenemission bei 562 nm gemessen.

4.4 BESTIMMUNG DES ZELLULÄREN KUPFERGEHALTES MITTELS GRAPHITROHR-ATOMABSORPTIONSSPEKTROMETRIE

Für die Aufnahmeuntersuchungen von Kupfer wurden 10^6 Zellen in 10 cm Zellkulturschalen ausgestreut und für 24 h (EA.hy926) oder 48 h (HaCaT) kultiviert. Die Inkubation mit CuO NP und CuCl₂ erfolgte für 24 h. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen trypsinisiert, in kaltem Abbruchmedium (PBS/10 % FKS) aufgenommen, durch Zentrifugation pelletiert (1250 rpm, 5 min, 4 °C), zweimal mit PBS gewaschen und dazwischen erneut bei genannten Bedingungen zentrifugiert. Die Ermittlung der Zellzahl sowie des mittleren Zellvolumens erfolgte mit Hilfe eines Casy® TT Zellzählgerätes, bevor die Zellen mittels Zentrifugation pelletiert wurden.

Für die Gesamtaufnahmeuntersuchungen wurden die Zellen in 400 μ L RIPA-Puffer resuspendiert und zur Lyse 30 min auf Eis bei 110 U/min geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 16000 rpm für 60 min. Der Überstand, der nur noch die lösliche Zellfraktion beinhaltetete, wurde für die Kupferbestimmung mittels GF-AAS verwendet.

Die erhaltenen löslichen Zellfraktionen wurden in einem Heizschüttler bis zur Trockene eingedampft. Dabei wurde bei 65 °C mit dem Erhitzen begonnen und die Temperatur stündlich um 10 °C bis zu einer Temperatur von 95 °C erhöht. Anschließend wurden 500 µL einer 1:1 Mischung aus 30 % H₂O₂ und 69 % HNO₃ zu den Proben gegeben und durch erneute stufenweise Temperaturerhöhung von 65 °C auf 95 °C verascht. Der verbleibende Rückstand wurde in 1 mL bidest. Wasser aufgenommen und entsprechende Verdünnungen in 0,2 % HNO₃ für die Kupfermessung mittels GF-AAS hergestellt.

Für die AAS-Messungen wurden 20 µL der Probelösung mit 5 µL Palladium/Magnesium-*Modifier* (1 g/L Pd und 0,6 g/L Mg in 0,2 % HNO₃) mittels Autosampler pipettiert und mit einem kupferspezifischen Temperaturprogramm analysiert (siehe Tabelle 6). Der *Matrix-Modifier* ermöglicht eine verlustfreie Pyrolyse der Matrix, da er den Analyten in höherflüchtige Formen überführt. Für eine externe Kalibrierung wurden Kupferkonzentrationen von 2,5 – 25 µg/L in 0,2 % HNO₃ mit einer AAS-Kupferstandardlösung mittels Autosampler hergestellt. Durch Bestimmung der mittleren Zellvolumina konnte die intrazelluläre Konzentration an Kupfer berechnet werden. Als Emissionsquelle wurde eine elementspezifische Kupferhohlkathodenlampe bei der Wellenlänge von 324,75 nm verwendet.

Tabelle 6: Temperaturprogramm der Kupferbestimmung mittels Graphitrohr AAS.

	Temperatur [°C]	Ramp Time [s]	Hold Time [s]	Gasstrom [mL/min]
Trocknen 1	110	1	30	250
Trocknen 2	130	15	30	250
Pyrolyse	1200	10	20	250
Atomisierung	2000	0	5	0
Ausheizen	2450	1	3	250

Für die durchgeführten Bestimmungen wurden Blindwerte der zellulären Matrix und externe Standards sowie interne Wiederfindungen mitgeführt. Bei Etablierung der Methode wurden die Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze für die Kupferbestimmung mittels Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie (GF-AAS) nach DIN 32645 ermittelt. Diese Ergebnisse sind in Anhang 8.4 dargestellt.

Die Aufnahmeuntersuchungen mit CuO NP und CuCl₂ wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dipl.-LMCh. Yvonne Zerbe, die Aufnahmeuntersuchungen mit den Endozytoseinhibitoren in Zusammenarbeit mit Frau M.Sc. Duc Bao Mach im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeiten durchgeführt.

4.5 EINFLUSS VON ENDOZYTLOSEINHIBITOREN AUF DIE ZELLULÄRE KUPFERAUFNAHME

Um Aussagen über die Aufnahmemechanismen von Kupferoxidnanopartikeln in Endothelzellen zu treffen, wurden Experimente mit Endozytoseinhibitoren durchgeführt. Vorversuche zeigten, dass humane

Keratinocyten (HaCaT) Nanopartikel nur in geringem Maße endozytieren. Als sensitives *Target* in der menschlichen Haut wurden daher EA.hy926 als Modellzelllinie gewählt, da sie eine hohe Endozytoserate aufzeigte. Die Aufnahmestudien wurden exemplarisch an CuO NP durchgeführt.

Stammlösungen der Endozytoseinhibitoren Hydroxydynasore (OH-Dyn) und Monodansylcadaverin (MDC) wurden in DMSO hergestellt. Vor Inkubation mit 1 µg/mL CuO NP und 12,6 µM CuCl₂ wurden die Zellen mit den OH-Dyn und MDC in Orientierung an Literaturwerte vorkonditioniert. Eine Vehikelkontrolle mit 0,5 % DMSO (v/v) wurde mitgeführt. Die Dauer und die Inkubationskonzentrationen der Vorkonditionierung sind Tabelle 7 zu entnehmen (McCLUSKEY *et al.*, 2013; LUNOV *et al.*, 2011). Im Anschluss an die Vorkonditionierung wurden die Inkubationslösungen auf die Zellen appliziert. Erneut wurden OH-Dyn und MDC für die Dauer der Behandlung dem Medium hinzugegeben.

Da Endozytoseinhibitoren mitunter einen großen Einfluss auf zelluläre Stoffwechselprozesse besitzen und als zytotoxisch gelten, wurden die Inkubationskonzentrationen im Rahmen der wissenschaftlichen Abschlussarbeit von Frau M.Sc. Duc Bao Mach für die EA.hy926 Zelllinie etabliert (siehe Anhang 8.88.8).

Tabelle 7: Eingesetzte Inkubations- und Vorkonditionierungsparameter der Endozytoseinhibitoren.

	Stammlösung [mM]	Inkubations- konzentration [µM]	Vorkonditionierung [min]
Vehikelkontrolle (DMSO)	---	---	60
Hydroxydynasore	20	50	60
Monodansylcadaverin	50	50	10

4.6 BESTIMMUNG DES INTRAZELLULÄREN ROS-GEHALTES MITTELS DCF-DA ASSAY

Für den DCF-DA (2,7-Dichlorofluorescein-Diacetat) Assay wurden 10⁵ Zellen pro 200 µl Medium im 96-Well-Format ausplattiert. Die Anwuchsphase betrug 24 h (EA.hy926) bzw. 48 h (HaCaT). Das Zellkulturmedium wurde abgenommen und 100 µL mit einer 100 µM DCF-DA Lösung vorinkubiert (= *Preloading*). Zur Herstellung dieser DCF-DA-Inkubationslösung wurde die DCF-DA Stammlösung (40 mM in DMSO) in *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) auf die Endkonzentration von 100 µM verdünnt. Nach dem *Preloading* wurde die Inkubationslösung abgesaugt und die Zellen mit 100 µL warmen HBSS gewaschen. Anschließend wurde in jede Kavität die entsprechende Inkubationslösung der jeweiligen Testsubstanzen pipettiert. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte nach Anregung bei 480 nm und der Emissionsdetektion bei 530 nm an einem Multiplattenlesegerät (TECAN® Infinite Pro M200). Als Positivkontrolle kam dabei das Oxidationsmittel tert-Butylhydroperoxid (tBHP) in den Konzentrationen 250 µM, 500 µM und 1000 µM zum Einsatz. Die Positivkontrolle wurde eine Stunde vor Abbruch direkt in das

Inkubationsmedium gegeben. Die Etablierung dieses Versuches wurde in Zusammenarbeit mit Frau M.Sc. Yanfang Xu im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit durchgeführt.

4.7 PROTEINEXTRAKTION

Die Zellyse erfolgte mithilfe eines Lysepuffers (siehe Tabelle 20), welcher den Proteaseinhibitor-Cocktail *complete Mini* (Roche) enthielt, um die Aktivität von Serin-, Cystein- und Metalloproteasen herabzusetzen und die Autoproteolyse zu mindern. Pro 10^6 Zellen wurden dem Zellpellet 50 μL des Lysepuffers zugegeben, resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde bei 14000 rpm für 20 min ($4\text{ }^\circ\text{C}$) zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

Die Ermittlung der Proteingehalte erfolgte mittels Proteinbestimmung nach Bradford (BRADFORD, 1976). Diese Quantifizierungsmethode basiert auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau G-250 an Proteine. Die Adduktbildung bringt eine Verschiebung im Farbspektrum von 465 nm (rot) nach 595 nm (blau) mit sich, welche am Spektralphotometer detektiert und innerhalb eines linearen Korrelationsbereiches quantifiziert werden kann.

Für die Quantifizierung wurde eine externe Kalibrierung mit Rinderserumalbumin (BSA) durchgeführt. Der lineare Bereich dieser Kalibrierung lag dabei zwischen 0,01 mg/mL und 0,75 mg/mL. Die Messung erfolgte am Absorptionsmaximum des Farbstoff-Protein-Komplexes bei 595 nm mittels TECAN Ininifite®200 PRO. Je 20 μL Probe bzw. Kalibrierlösung wurden zusammen mit 180 μL Bradford-Reagenzmix (140 μL bidest. Wasser und 40 μL Protein Assay Farbstoffkonzentrat) in eine Kavität einer 96-Well Platte gegeben und im Spektralphotometer durch leichtes Schütteln gemischt. Die Datenauswertung erfolgte mithilfe von Microsoft Excel.

4.8 WESTERN BLOT

Die Trennung der extrahierten Proteine erfolgte elektrophoretisch mittels SDS PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). Der Zusatz des negativ geladenen Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat) sorgt dafür, dass die Eigenladung der Proteine überlagert wird und alle Proteine zur Anode wandern. Die Trennung erfolgt so nur nach Molekülgröße und nicht nach deren Ladung (JANSOHN UND ROTHÄMEL, 2012). Um die Quartär-, Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine durch Reduktion von Disulfidgruppen nachhaltig zu zerstören, wurde Lämmli-Puffer mit β -Mercaptoethanol zugegeben (Tabelle 25) und für 5 min bei $95\text{ }^\circ\text{C}$ auf dem Thermoschüttler erhitzt.

Für die Gelelektrophorese wurden ein 10 %iges Trenngel (Tabelle 21) sowie ein 4 %iges Sammelgel (Tabelle 22) hergestellt. Nachdem die Gele in eine Elektrophoresekammer eingespannt waren, konnte Laufpuffer (Tabelle 23) eingefüllt werden. Im Anschluss wurden die Gele mit dem Marker beladen (8 μL), welcher als Molekulargewichtsstandard diente. Anschließend wurden 25 μL der aufgearbeiteten Proben

in die jeweiligen Geltaschen pipettiert. Um übermäßige Blasenbildung sowie Aufschäumen zu verhindern und die Fokussierung der Proteinbanden im Gel zu verbessern, erfolgte die Auftrennung zunächst bei 50 V für etwa 5 min und dann bei 180 V für 1 h.

Nach erfolgreicher Trennung wurden die Proteinbanden für weitere Analysen mittels Western Blotting auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen, wo sie für einen immunologischen Nachweis zugänglich waren. Hierzu wurde das Trenngel vom Sammelgel gelöst und in den 4 °C kalten Transferpuffer (Tabelle 24) getaucht. Des Weiteren wurden vier Whatman-Papiere, eine in Methanol vorkonditionierte PVDF-Membran und zwei Vlieseinlagen mit genanntem Transferpuffer befeuchtet. Im Anschluss daran wurde das Tank-Blot System aufgebaut. Zu beachten war, dass die Membran zur Anode zeigte. Um Luftblasen zwischen den Whatmann-Papieren, der Membran und dem Gel zu entfernen, wurde vorsichtig mit einem Glasstab ausgewalzt. Die Tank-Blot Kammer wurde zum Schluss mit dem Transferpuffer befüllt und konnte unter Rühren bei 4 °C und einer Spannung von 30 V über Nacht im Kühlkubator gelagert werden. Am nächsten Tag folgte die Überprüfung des Proteintransfers auf die Membran mithilfe einer temporären Ponceau-S-Färbung. Bei positivem Befund wurde die Membran wieder mit 20 mL PBST (PBS mit 0,1 % Tween20®) entfärbt.

Nach erfolgreichem Proteintransfer wurde die Membran 1 h mit 25 mL Blockierlösung (PBST mit 5 % Milchpulver) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Anschließend konnte die Membran vorsichtig in ein 50 mL Röhrchen überführt und mit 5 mL einer entsprechenden Verdünnung des Primärantikörpers über Nacht bei 4 °C auf einem Rotator inkubiert werden. Als Primärantikörper kamen hierbei, je nach Fragestellung, entweder monoklonale CYP1A1 bzw. MMP1 Antikörper aus zum Einsatz, welche spezifisch an eines der Proteine binden.

Nach Inkubation mit Primärantikörper folgten drei Waschschrte der Membran auf dem Taumler für jeweils zehn Minuten in PBST. Anschließend wurde die Membran in ein weiteres 50 mL Röhrchen überführt und mit 5 mL einer 1:1000 Verdünnung der Sekundärantikörperlösung über Nacht bei 4 °C auf einem Rotator inkubiert. Für den Nachweis der Ladekontrolle ERK2 (C14, SC-154) wurde eine Sekundärantikörperlösung mit der Verdünnung 1:2000 eingesetzt. Durch dreimaliges, zehninütiges Waschen in PBST auf dem Taumler konnte der überschüssige Sekundärantikörper von der Membran gewaschen werden. Zur Detektion wurde ein *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent-Kit* eingesetzt. Dieses Kit bestand aus Luminol-Lösung und einer Base. Je 500 µL der jeweiligen Lösung wurden in ein Eppendorfgefäß gegeben und durchmischt. Dieses Reaktionsgemisch konnte auf die Membran aufgebracht werden und dort eine Minute mit der Peroxidase des Sekundärantikörpers reagieren. Anschließend wurde die überschüssige Lösung abgegossen und mithilfe eines FUJIFILM *Luminescent Image Analyzer LAS-3000* die Chemolumineszenz gemessen. Die Auswertung des Western Blots erfolgte mit der Software *Aida Image Analyzer v.3.27*. Die Proteinnachweise wurden von Frau M.Sc. Yanfang Xu im Rahmen ihrer Wissenschaftlichen Abschlussarbeit durchgeführt.

4.9 GENEXPRESSIONSANALYSEN

Die Genexpressionsanalyse erfolgte mittels *High-Throughput-RT-qPCR*. Bei der angewandten Methode ließen sich Aussagen über Expression und Aktivität von insgesamt 95 Genen treffen (FISCHER *et al.*, 2016). Die gesamte mRNA eines Zellpellets wurde hierfür von genomischer DNA (gDNA) getrennt und mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben, vervielfältigt und anschließend detektiert. Mitgeführte unbehandelte Kontrollen wurden bei der Datenauswertung auf eins normiert. So konnte die relative Genexpression der Proben zur jeweiligen Kontrolle bestimmt werden. Insgesamt fünf Referenzgene, die unabhängig der Behandlung exprimiert werden, ermöglichten eine relative Quantifizierung der Zielsequenzen. Die Auswahl der Referenzgene entsprach den Empfehlungen der MIQE-Guidelines (*Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments*) und umfasste die Gene *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *GUSB* sowie *HPRT1* (BUSTIN *et al.*, 2009). Eine vollständige Auflistung der untersuchten Gene und der codierenden Proteine befindet sich im Anhang 8.2.

Für die Versuche wurden zunächst je 5×10^5 Zellen in Zellkulturschalen (\emptyset 60 mm) ausgestreut und für 24 h (EA.hy926) bzw. 48 h (HaCaT) kultiviert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation für 3 h + 3 h (Mineralölkohlenwasserstoffe) und 24 h (Metallverbindungen) mit 4,2 mL der Inkubationslösungen (siehe Abschnitt 4.1.3.1 und 4.1.3.4). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt, die Zellen trypsiniert und in 3 mL PBS/FKS (10 %) aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und durch Zentrifugation pelletiert (3 min, 1300 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 1 mL PBS resuspendiert und zur erneuten Zentrifugation (3 min, 1300 rpm, 4 °C) in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Absaugen des Überstands wurde das Zellpellet bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.9.1 RNA-ISOLIERUNG UND QUANTIFIZIERUNG

Die Isolierung der RNA sowie alle folgenden Arbeitsschritte erfordern höchst sterile Arbeitsbedingungen. Störende DNasen, RNasen sowie Fremd-DNA und -RNA auf allen Arbeitsflächen und Verbrauchsmaterialien wurden entweder mit Ethanol (96 %ig), speziellen Reinigungslösungen (*DNA Away*, *RNase Away*) und/oder einer vorausgegangenen Autoklavierung beseitigt. Außerdem wurden autoklavierte Kunststoffpipettenspitzen verwendet. Die Isolierung der RNA erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin® Plus Kits (Macherey-Nagel).

Das Zellpellet wurde zunächst in 350 µL Lysepuffer (LBP) resuspendiert, Vortex-gemischt und anschließend auf eine gDNA *Removal* Säule überführt, um die gDNA zu entfernen. Nach Zentrifugation (30 s, 11000 x g) befand sich die RNA im Eluat, wohingegen die gDNA auf der Säule verblieb und verworfen wurde. Dem Eluat wurden 100 µL *Bindung Solution* (BS) zugesetzt und moderat resuspendiert. Das gesamte Lysat wurde anschließend auf eine weitere Säule gegeben und erneut zentrifugiert (20 s,

11000 x g). Dabei erfolgte die Bindung der RNA an die Säule und die Abtrennung von störenden Bestandteilen. Anschließend folgten zwei Waschschriffe, wobei zunächst 200 µL Waschpuffer 1 (WB1) zugegeben und erneut zentrifugiert (20 s, 11000 x g) wurde. Der Durchgang wurde verworfen und die Säule in ein neues Auffanggefäß gegeben. Der zweite Waschschriff mit 600 µL Waschpuffer 2 (WB2) und denselben Zentrifugationsbedingungen folgte. Es wurden nochmals 250 µL WB2 zugegeben und erneut unter genannten Bedingungen zentrifugiert. Der Durchgang wurde verworfen und die Säule in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurde die auf der Säule vorhandene RNA mit 30 µL RNase-freiem Wasser durch Zentrifugation (1 min, 11000 x g) ins Eluat überführt. Um eine Steigerung der RNA-Ausbeute zu ermöglichen, wurde das RNA-haltige Eluat erneut auf die Säule gegeben und wieder zentrifugiert. Bei hoher Zellzahl wurde zweimal mit frischem Wasser eluiert. Die extrahierte RNA war so bei -80 °C für mehrere Wochen lagerungsfähig.

Bevor die RNA in cDNA umgeschrieben werden konnte, musste zunächst der RNA-Gehalt aus den Proben bestimmt werden. Dies erfolgte durch Messung der Absorption an einem Spektralphotometer (TECAN Ininifite®200 PRO) bei 260 nm. Dazu wurden 2 µL Probenmaterial auf eine NanoQuant™-Platte pipettiert und mithilfe des Photometers gemessen. Zudem wurde die Absorption bei 280 nm ermittelt und das Verhältnis von 260/280 nm berechnet. Jede Probe musste einen Absorptionsquotienten von $\geq 2,0$ aufweisen, da die Probe sonst als verunreinigt galt.

4.9.2 cDNA-SYNTHESE

Das Umschreiben der RNA in cDNA erfolgte mittels *qScript cDNA Synthese* Kit. Dafür wurden je Reaktionsansatz 1 µg RNA mit je 5 µL des Mastermixes (1 µL *iScript Reverse Transcriptase* + 4 µL *Reaction Mix* (5x)) versetzt und mit nukleasefreiem Wasser auf 20 µL ergänzt, Vortex-gemischt und anschließend zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte die Umschreibung entsprechend folgendem Temperaturprogramm:

Tabelle 8: Temperaturprogramm cDNA-Synthese

5 min	25 °C
30 min	42 °C
5 min	85 °C
Endtemperatur	4 °C

Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte in Doppelbestimmung. Die erhaltene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.9.3 PRÄAMPLIFIKATION (SPECIFIC TARGET AMPLIFICATION)

Die Präamplifikation (STA) dient der Vervielfältigung der jeweiligen Zielgene (*templates*). Die Probenvorbereitung sowie die folgenden Arbeitsschritte wurden entsprechend den Herstellerangaben

durchgeführt. Dabei wurden zunächst die Primer in einem PCR-Cap *gepoolt* und mit DNA-Suspensionspuffer auf eine Endkonzentration von 500 nM (*Pooled Primer Mix*) verdünnt. Die Stammlösung des *Pooled Primer Mix* war bei -20 °C lagerungsfähig. Ein 5 µL Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 9: Reaktionsansatz *Pooled Primer Mix*

2x TaqMan PreAmp Master Mix	2,50 µL
Pooled Primer Mix	0,50 µL
PCR zertifiziertes Wasser	0,75 µL
cDNA-Probe	1,25 µL

Zusätzlich zu den Proben wurden eine Wasserkontrolle ohne *template* (NTC-STA) und eine nicht umgeschriebene RNA-Kontrolle (NoRT) mitgeführt. Anschließend wurden die Proben durchmischt und zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte die STA im *Thermocycler* nach folgendem Temperaturprogramm:

Tabelle 10: Temperaturprogramm der Präamplifikation

initiale Denaturierung	10 min		95 °C
Denaturierung	15 s	(12x)	95 °C
Annealing und Elongation	4 min	(12x)	60 °C
Endtemperatur			4 °C

Der Präamplifikation war ein Exonuklease I Verdau angeschlossen. Dieser ermöglichte die Entfernung ungebundener Primer sowie überschüssiger Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) und minimierte so den *Carry-Over*-Effekt. Hierfür wurden 0,4 µL Exonuklease I (Exo I, 20 units/µL), 0,2 µL 10x Exonuklease I Reaktionspuffer und 1,4 µL PCR zertifiziertes Wasser zugegeben, um eine Arbeitskonzentration von 4 units/µL zu erhalten. 2 µL dieses Reaktionsgemisches wurden zu den jeweiligen STA-Proben gegeben. Nach Durchmischung und Zentrifugation erfolgte der Verdau nach folgendem Temperaturprogramm:

Tabelle 11: Temperaturprogramm Exonuklease I Verdau

Verdau	40 min	37 °C
Inaktivierung	15 min	80 °C
Endtemperatur		4 °C

Die STA und Exo I behandelten Proben wurden im Anschluss mit TE-Puffer 5-fach verdünnt und bei -20 °C maximal zwei Tage aufbewahrt.

4.9.4 PRIMER- UND PROBENVORBEREITUNG

Die *forward* und *reverse* Primerpaare (100 µM) wurden im nächsten Schritt auf eine Arbeitskonzentration von 5 µM verdünnt, indem 2,5 µL jedes Primerpaares, 25 µL 2x *Assay Loading Reagent* und 22,5 µL DNA

Suspensionspuffer zugegeben wurden. Analog wurde eine *No Reaction Control* (NRC) mitgeführt, bei der das Primerpaar durch PCR zertifiziertes Wasser ersetzt war. Die Reaktionsgemische der Primerpaare wurden bei -20 °C aufbewahrt.

Für den *Reactionmix* wurden je 2,25 µL der STA und Exo I behandelten Proben mit 2,5 µL 2x SsoFast™ EvaGreen® Supermix with Low ROX und 0,25 µL 20x DNA Sample Loading Reagent versetzt, gemischt und zentrifugiert. Des Weiteren wurde eine nicht präamplifizierte Wasserkontrolle ohne *template* (NTC) mitgeführt.

4.9.5 96X96 DYNAMIC ARRAY IFC qPCR ANALYSE

Die Vorbereitung und Beladung des *dynamic array IFC* (*integrated fluidic circuit*) erfolgte nach Herstellerangaben. Dazu wurden die Akkumulatoren des *dynamic array* zunächst mit 150 µL *Control Line Fluid* mit Hilfe einer Spritze befüllt und anschließend die Schutzfolie am Boden des Chips entfernt. Der Chip wurde in den *IFC Controller HX* geladen und das *Prime* (136x) Programm gestartet, wodurch das Fluid in die Mikrokanäle des Chips geleitet wurde. Im Anschluss erfolgte das Pipettieren der einzelnen Proben- und Primer-Reaktionsgemische (siehe Abbildung 10).

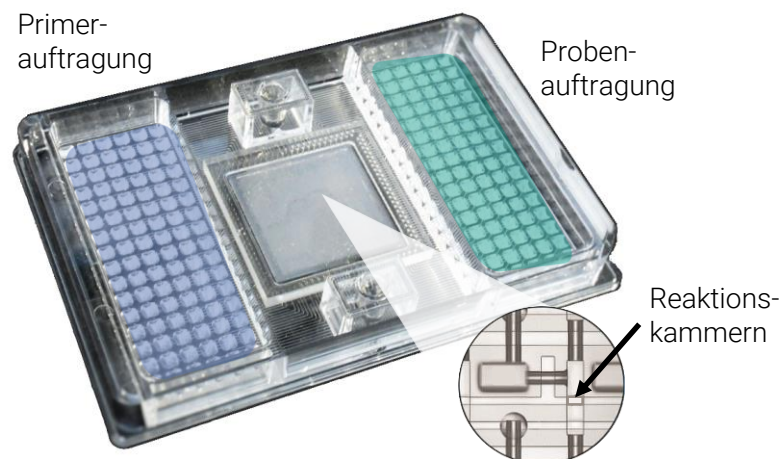


Abbildung 10: Schematischer Aufbau eines Fluidigm *dynamic arrays*.

In die Kavitäten rechts werden 96 zu analysierende Proben und links 95 Primer-Paare sowie eine *no-reaction control* (NRC) pipettiert. In jeder der 9216 Reaktionskammern wird jeweils eine Probe mit einem Primerpaar kombiniert. Die Reaktionskammern sind mit ventilsteuerten Kanälen verbunden.

Dies musste innerhalb von 2 h durchgeführt werden, um einen Druckabfall im Chip zu vermeiden. Dazu wurden je 5 µL Proben- und Primer-Reaktionsgemisch luftblasenfrei in die entsprechenden Kavitäten pipettiert (siehe Abbildung 10). Das Durchmischen der Proben und Primer in den 9216 Reaktionskammern erfolgte erneut im *IFC Controller HX* mittels *Load Mix* (136x) Programm. Nach der Beladung des Chips wurden anhaftende Staubpartikel auf dessen Oberfläche mit Klebestreifen entfernt. Der Chip wurde

anschließend in das BioMark™ System überführt. Die qPCR sowie die Schmelzkurvenanalyse wurden entsprechend folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

Tabelle 12: Temperaturprogramme qPCR und Schmelzkurvenanalyse

thermale Durchmischung	2400 s	70 °C
thermale Durchmischung	30 s	60 °C
Hot Start	60 s	95 °C
Denaturierung	5 s (30x)	96 °C
Annealing und Elongation	20 s (30x)	60 °C
Schmelzkurvenanalyse	3 s	60 °C
Temperaturerhöhung	1 °C / 3 s	95 °C

4.9.6 DATENANALYSE UND DARSTELLUNG

Die Auswertung und Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der Software *Fluidigm Real-Time PCR Analysis*. Dabei wurde zunächst die gleichmäßige Beladung aller PCR-Reaktionskammern durch den passiven Referenz-Farbstoff ROX überprüft. Die C_q -Werte (*Cycle of Quantification*) der jeweiligen Zielamplifikate wurden in allen Reaktionskammern mit dem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff *EvaGreen®* ermittelt. Für eine Präzisierung der C_q -Werte wurde die in der Software enthaltene Schwellenwert-Methode (*auto detectors*) zur Korrektur der Basislinien eingesetzt.

Mit Hilfe einer *Heat Map* wurden die Daten zunächst übersichtlich dargestellt. Die Visualisierung als *Heat Map* ermöglichte einen generellen Überblick sowie eine Überprüfung von eventuellen Beladungsproblemen. Die Gene wurden hierbei als Spalten und die Proben als Reihen angezeigt, die C_q -Werte wurden anhand einer Farbskalierung dargestellt. Kleine C_q -Werte wurden in gelb oder rot abgebildet, während hohe C_q -Werte in Farben wie violett und blau sichtbar waren. Des Weiteren konnten auch Negativkontrollen wie NoRT, NTC, NTC-STA und NRC einer optischen Überprüfung unterzogen werden.

Weiterhin wurden die resultierenden Schmelzkurven angezeigt, wodurch die Spezifität der PCR-Reaktionen überprüft werden konnte. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Daten der *Heat Map* exportiert und mittels *GenEx* Software bearbeitet. Dabei wurden über die integrierten Programm-Tools *geNorm* und *NormFinder* die geeigneten Referenzgene selektiert. Mit Hilfe dieser Tools wurden sowohl die optimale Anzahl als auch die am besten geeigneten Referenzgene identifiziert. Für die Normalisierung standen die fünf Referenzgene *ACTB*, *BSM*, *GAPDH*, *GUSB* und *HPRT1* zur Verfügung.

Als Maß für die Quantifizierung wurde der C_q -Wert herangezogen. Er entspricht der Anzahl an PCR Zyklen, die nötig sind, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau (*threshold*), das sich signifikant vom Hintergrund unterscheidet, zu erreichen. Die Expressionsunterschiede wurden anschließend auf der Grundlage dieser C_q -Werte mit Hilfe der sogenannten $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -Methode evaluiert (LIVAK UND SCHMITTGEN, 2001). Dabei wurde zunächst der C_q -Wert des Referenzgens vom C_q -Wert des zu untersuchenden Gens

innerhalb einer Probe subtrahiert (Gleichung 1). Im Anschluss wurde die Differenz aus dem ΔC_q -Wert der Kontrolle und dem ΔC_q -Wert der Behandlung gebildet (Gleichung 2). Der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle (Ratio), normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe, ergab sich aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta C_q}$ (Gleichung 3).

$$\Delta C_q = C_q \text{ Zielgen} - C_q \text{ Referenzgen} \quad (\text{Gl. 1})$$

$$\Delta\Delta C_q = \Delta C_q \text{ Behandlung} - \Delta C_q \text{ Kontrolle} \quad (\text{Gl. 2})$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_q} \quad (\text{Gl. 3})$$

Der Mittelwert der in Doppelbestimmung durchgeführten Umschreibung jeder Probe wurde berechnet und mit dem Wert der zugehörigen Kontrolle, deren relative Genexpression auf 1 normiert wurde, ins Verhältnis gesetzt. Die Vereinigung der unabhängigen Versuche sowie die graphische Darstellung erfolgten mit dem MS-Office-Programm Excel.

4.10 DNA-METHYLIERUNGSANALYSEN

Um der Frage nachzugehen, inwieweit Cr(VI) Einfluss auf das Methylierungsmuster der DNA nimmt und ob Veränderungen der DNA-Methylierung nach einer subchronischen Inkubationsperiode erkenntlich sind, wurden Untersuchungen mithilfe eines *MethylFlash™ Global DNA Methylation ELISA* (EpiGentek) durchgeführt. Für die Versuche wurden zunächst je 5×10^5 HaCaT Zellen in Zellkulturschalen (\varnothing 60 mm) ausgestreut und für 24 h kultiviert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation für 24 h und 48 h in den Cr(VI)-Konzentrationen von 13,2 μM und 26,4 μM . Nach den genannten Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet, die DNA mithilfe eines *FitAmp™ Blood and Cultured Cell DNA Extraction Kit* (EpiGentek) isoliert.

4.10.1 DNA-ISOLIERUNG

Die DNA-Isolierung mittels *FitAmp™ Blood and Cultured Cell DNA Extraction Kit* (EpiGentek) erfolgte entsprechend der Versuchsdurchführung des Herstellers. Das Zellpellet wurde dabei in 200 μL des Suspensionspuffers (CB1) suspendiert. Nach erfolgreicher Zellyse wurden 4 μL der *DNA-Digestion-Solution* (CB2+CB3) hinzugegeben und nach einer gründlichen Durchmischung die DNA bei 65 °C für 15 min fragmentiert. Nach Ablauf des DNA-Verdaus wurden 400 μL des *DNA-Capture-Buffers* hinzugegeben und sorgfältig resuspendiert. Das Gemisch wurde im Anschluss auf eine DNA-Isolationssäule überführt und für 45 sek bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Durchgang wurde verworfen und die DNA-Isolationssäule auf ein weiteres *Collection Tube* platziert. Es folgten drei Waschschrte mit Ethanol (reinst). Zunächst wurde mit 300 μL 70%igem Ethanol gewaschen und für 30 sek bei 12000 rpm zentrifugiert. Die nächsten beiden Schritte bestanden aus der Zugabe von jeweils 200 μL 90 %igem Ethanol und einer Zentrifugation unter genannten Bedingungen. Ein Waschschrte mit 18 μL der DNA-

Elution-Solution (CB5) schloss sich an. Reinheitsbestimmung und die Quantifizierung erfolgten mittels NanoQuant™ Platte an einem Multiplattenlesegerät (TECAN® Infinite Pro M200).

4.10.2 ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

Zur Quantifizierung des Methylierungsgrades der DNA fand ein 5-mC-spezifischer ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) der Fa. Epigentek Anwendung. Die Durchführung erfolgte entsprechend der Versuchsvorschrift des Herstellers. Zur absoluten Quantifizierung der DNA-Methylierung wurde eine Verdünnungsreihe eines 5-mC-Standards angesetzt, um eine Kalibrierung des 5-mC-Gehaltes von 0,1% bis 5,0 % zu erhalten.

Im Anschluss erfolgte das Binden der DNA in den Kavitäten der ELISA-Platte. 100 ng DNA bzw. 2 µl der 5-mC-Verdünnungsreihe und 2 µL der Negativkontrolle (= unmethylierte DNA) wurden in 100 µL der vorgelegten *Binding Solution* (BS) resuspendiert. Während einer einstündigen Inkubation bei 37 °C wurden die DNA-Fragmente an das *Coating* der ELISA-Platte assoziiert. Es folgten drei Waschschrte mit jeweils 150 µL verdünnter Waschpuffer-Lösung (WB1). Daran Angeschlossen war die Detektion mithilfe des 5-mC-spezifischen Antikörpers. 50 µL der *5-mC Detection Complex Solution* wurden für 50 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen der *5-mC Detection Complex Solution* wurde fünfmalig mit 150 µL WB1 gewaschen. Durch Zugabe der *Developer Solution* (DS) bildete sich ein blauer Farbkomplex, dessen Farbintensität nach ca. 3 min sein Optimum erreichte. Durch Zugabe der *Stop Solution* (SS) färbte sich die Lösung der ELISA-Kavität gelb. Die Messung an einem Multiplattenlesegerät (TECAN® Infinite Pro M200) erfolgte nach 10 min bei 450 nm.

Für die Auswertung kam folgende Polynomfunktion zweiten Grades zum Einsatz:

$$5\text{-mC}\% = \frac{(b^2 + 4aY)^{0,5} - b}{2a \cdot S} * 100 \%$$

Die Bezugsgrößen wurden der Funktion: $Y = aX^2 + bX$ entnommen.

Die Variable S ist die eingesetzte Menge an DNA in Nanogramm.

4.11 KOLORIMETRISCHER NACHWEIS VON CHROM(VI)

Für den selektiven Nachweis von Cr(VI) neben Cr(III) wurde eine kolorimetrische Nachweismethode angewendet. Das farblose Diphenylcarbazid (DPC) reagiert dabei in saurem pH-Wert mit Cr(VI) und bildet einen farbigen Cr(III)-Diphenylcarbazon-Komplex. Diese Oxidationsreaktion ist nur mit Chromationen möglich, Cr(III)-Ionen bilden in wässrigen Lösungen eine Hydrathülle aus und stehen der Reaktion nicht zur Verfügung (HARZDORF, 1990). Die Methode wurde im Rahmen einer wissenschaftlichen Abschlussarbeit von Frau M.Sc. Franziska Fischer angepasst und etabliert.

Für den Nachweis wurde eine 1 %ige DPC Lösung in Aceton hergestellt und bis zur Verwendung tiefgefroren. Zur Analyse der Proben wurde ein Mastermix aus je 15 µL Schwefelsäure, 15 µL Phosphorsäure, 12 µL bidest. Wasser und 8 µL DPC-Lösung erstellt und durchmischt. Für die Messung wurden jeweils 250 µL der zu untersuchenden Probe und 50 µL Mastermix in eine Kavität einer transparenten 96-Well Platte pipettiert. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 540 nm an einem Multiplattenlesegerät (TECAN® Infinite Pro M200).

Zur Berechnung der Proben wurde eine Kalibriergeraden aus einer Chromatstammlösung mit 5 mg/L erstellt. Aus dieser Stammlösung wurden Kalibrierpunkte mit einem Gehalt von 0 mg/L, 0,1 mg/L, 0,2 mg/L, 0,5 mg/L, 1,0 mg/L und 2,0 mg/L in Mikroreaktionsgefäße pipettiert und die Absorption an einem Multiplattenlesegerät (TECAN® Infinite Pro M200) gemessen.

4.12 PARTIKELCHARAKTERISIERUNG

Partikel können sich in ihren physikochemischen Eigenschaften hinsichtlich Partikelgrößenverteilung, Morphologie, spezifischer Oberfläche, Kristallstruktur, chemischer Zusammensetzung, Ladung und Löslichkeit unterscheiden. Die verwendeten Partikel wurden daher einer Charakterisierung mittels unterschiedlicher physikochemischer Verfahren unterzogen. Es wurden dabei elektronenmikroskopische Aufnahmen, Messungen der dynamischen Lichtstreuung (DLS) und Röntgenbeugungsbasierte Elementenanalyse (XPS = *X-ray photoelectron spectroscopy*) Verfahren eingesetzt. Außerdem wurde die Löslichkeit in Wasser und artifizierlicher lysosomaler Flüssigkeit bestimmt.

4.12.1 PARTIKEL

Die Kupferoxid-Partikel (CuO) (Lotnummer: 544868, MKAA0633) wurden von Sigma Aldrich GmbH (St. Louis, USA) erworben. Chromoxid-Partikel stammen von drei verschiedenen Herstellern. Lanxess (Köln, Deutschland) Lot Nummer: CHC 2018-19, Sigma Aldrich GmbH (Steinheim, Deutschland) Lot Nummer: 634239 und NanoAmor (Texas, USA) Lot Nummer: 1910-091918. Die Charakterisierung der CuO NP wurde weitestgehend in einer vorausgegangenen Arbeit von Frau Dr. Annetta Semisch im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführt. Die charakteristischen Parameter sind im Anhang 8.3 dargestellt. Für die jeweiligen Chromoxid-Partikel werden sie im Folgendem aufgelistet.

4.12.2 TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPIE

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ist ein bildgebendes Verfahren mit einer um den Faktor $10^3 - 10^4$ höheren Auflösung als lichtmikroskopische Untersuchungen. Dabei werden Elektronen von einer Kathode emittiert und in einer Gleichspannung beschleunigt. Über Kondensorenllinsen werden die Elektronen elektrisch fokussiert und als gleichförmiger Strahl auf den Probenträger projiziert. Die Strahlenelektronen

interagieren dabei mit der Probe auf dem Objektträger auf unterschiedliche Arten. Sie können dünne Schichten und Atome mit niedriger Ordnungszahl durchdringen oder mit Atomkernen bzw. deren Elektronenhüllen interagieren. Folglich wird die Bewegungsrichtung der Elektronen verändert, es kommt zu einer Streuung der Elektronen. Durch die Streuung entstehen vergrößerte Zwischenbilder, die durch einen Fluoreszenzschirm in Lichtsignale umgewandelt und mittels CCD-Kamera Modulen erfasst werden. Die TEM-Aufnahmen ermöglichen es Aussagen über die Morphologie und die Größenverteilung von Partikeln zu treffen (MICHLER, 2019).

Für die Probenvorbereitung wurden sonifizierte Suspensionen der Chromoxid-Partikel in verschiedenen Zellkulturmedien und Wasser auf TEM-Grids (Kupfernetze mit amorpher Kohlebeschichtung, Firma Plano) benebelt. Beim Abtrocknen der Suspensionen bleiben die Partikel sowie organische bzw. anorganische Bestandteile des Zellkulturmediums auf der Trägerplatte haften. Bei der Untersuchung werden dann sowohl TEM-Grid als auch Partikel durchstrahlt und analysiert.

Die Aufnahmen wurden am Laboratorium für Elektronenmikroskopie des Karlsruher Institut für Technologie (KIT) an einem CM 200 FEG/ST der Firma PHILIPS (Eindhoven, Niederlande) von Frau Dr.-Ing. Heike Störmer angefertigt. Die Auswertung der Partikelgrößenverteilung und der Morphologie erfolgte mit der Bildbearbeitungssoftware *ImageJ* (*National Institutes of Health, Maryland, USA*).

Teile der Partikelgrößencharakterisierung wurden im Rahmen der wissenschaftlichen Abschlussarbeit von Frau M.Sc. Duc Bao Mach behandelt.

4.12.3 HYDRODYNAMISCHE GRÖßENVERTEILUNG

Der hydrodynamische Durchmesser der verwendeten Partikel wurde mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) ermittelt. Partikel im Mikro- und Nanometerbereich werden in Lösung aufgrund der Brown'schen Molekularbewegungen durch die Bewegung der Flüssigkeitsmoleküle umhergestoßen. Die mittlere Bewegungsgeschwindigkeit der Partikel in Lösung wird dabei als Diffusionskoeffizient bezeichnet und ist von der Partikelgröße abhängig. Durch Bestrahlung der Probenzelle mithilfe eines Lasers kommt es zu Streulicht und sogenannten Streuzentren. Durch die Bewegung der Partikel in Flüssigkeit fallen diese Streuzentren zusammen und es kommt zu zeitlichen Unterschieden der Streuintensität. Diese Fluktuation der Helligkeitspunkte gibt Aussage über den Diffusionskoeffizienten. Für runde Partikel einer monodispersen Lösung kann über die Stokes-Einstein-Beziehung auf den hydrodynamischen Radius der Partikel geschlossen werden (LAUTH UND KOWALCZYK, 2016).

Um genaue Berechnungen des hydrodynamischen Durchmessers anstellen zu können, müssen Parameter wie Viskosität, Dichte, Temperatur und Brechungsindex der Flüssigkeit bekannt sein. Für das verwendete DMEM-HG wurden sie entsprechend neu bestimmt und die Berechnungen angepasst. Für DMEM ohne erhöhten Zuckergehalt konnte auf bereits etablierte Daten zurückgegriffen werden. Die

Bestimmung von Viskosität und Dichte wurden von Herrn M.Sc. Benjamin Bindereif am Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik durchgeführt.

Die DLS-Messungen erfolgten an einem Zetasizer Nano ZS der Firma Malvern (Herrenberg, Deutschland). 1,5 mL der jeweiligen sonifizierten (10 min) Partikelsuspension (10 µg/mL, 20 µg/mL, 50 µg/mL) wurden in DMEM-HG mit 10 % FKS oder in bidestilliertem Wasser suspendiert und in Polystyrol-Küvetten überführt. Der Abstand des Messpunktes ausgehend von der Küvettenwand, die Anzahl der Messdurchläufe und die Messdauer wurden vor der Messung optimiert. Die Auswertung der generierten Daten erfolgte durch die Software Zetasizer Nano ZS Dispersion Technology Software (DTS) Version 6.20 (Malvern).

4.12.4 LÖSLICHKEITSBESTIMMUNG VON CHROM(III)-OXID-PARTIKELN

Um die Löslichkeit von Chromoxid zu bestimmen wurden die Überstände verschiedener Partikelsuspensionen mittels der in Kapitel 4.11 vorgestellten Methode in bidest. Wasser und artifizieller lysosomaler Flüssigkeit (ALF) (siehe Tabelle 19) bestimmt. ALF besitzt dabei einen pH-Wert von 4,5 bis 5,0 und ist in seiner Zusammensetzung der lysosomalen Flüssigkeit nachempfunden. Durch den niedrigen pH-Wert sind viele Metallpartikel gut in ALF löslich. Partikelsuspensionen mit einer Konzentration von 1 mg/mL wurden dafür in 1,5 mL Reaktionsgefäße pipettiert und in den Testflüssigkeiten resuspendiert. Die Proben wurden direkt, nach 24 h, nach 48 h und nach 120 h einer Zentrifugation bei 4 °C und 16000 x g unterzogen. Die Überstände wurden im Anschluss, wie unter Kapitel 4.11 beschrieben, auf lösliche Cr(VI)-Verunreinigungen überprüft.

4.13 KERNSPINRESONANZSPEKTROSKOPIE (¹H-NMR)

Für die Quantifizierung von Mineralölkohlenwasserstoffen wurde eine modifizierte Variante des PULCON-Verfahrens kombiniert mit der ERETIC-Methodik eingesetzt, die ursprünglich für Reinheitsbestimmungen pharmazeutischer Referenzsubstanzen entwickelt wurde. Die Methode wurde auf die Analyse kosmetischer Rohstoffe auf Mineralölbasis übertragen und für die Untersuchung kosmetischer Mittel weiterentwickelt (LACHENMEIER *et al.*, 2017). Zur Ermittlung des ERETIC-Faktors dient hierbei eine vor der Messreihe analysierte QuantRef-Lösung, die Substanzen einer definierten Konzentration enthält. Hierzu werden definierte Signalbereiche der QuantRef-Spektren integriert und jeweils gemäß Formel (1) in einen ERETIC-Faktor umgerechnet. Der mittlere ERETIC-Faktor aller Signale stellt anschließend die Grundlage für weitere Berechnungen dar. Die Methode ermöglicht die Konzentrationsbestimmung von Mineralölkohlenwasserstoffen und weiteren Nebenbestandteilen.

$$\text{ERETIC} = \frac{I \times M}{c \times N} \quad (1)$$

I	absolutes Integral
M	Molekulargewicht der Substanz
c	Konzentration
N	Anzahl der signalgenerierenden Protonen

Mit Hilfe der Gleichung 2 können Summenparameter der Mineralölkohlen-wasserstoffe bestimmt werden. Aufgrund der Komplexität und der Vielzahl an Substanzen erfolgt die Quantifizierung jedoch über Berechnungsäquivalente. Wie auch in der *Pharmacopoea Europaea* (Ph. Eur.)-Methode dient bei der Bestimmung von MOAH Naphthalin ($M = 128,17 \text{ g/mol}$) als Referenzstandard. Analog erfolgt die Berechnung des MOSH-Gehaltes über die aliphatische Referenz Decalin ($M = 138,25 \text{ g/mol}$), während Nebenbestandteile als Glycerin-Äquivalente ($M = 92,09 \text{ g/mol}$) quantifiziert werden (LACHENMEIER *et al.*, 2017).

$$c = \frac{I \times M}{\text{ERETIC} \times N} \quad (2)$$

I	absolutes Integral
M	Molekulargewicht der Substanz
ERETIC	ERETIC-Faktor
N	Anzahl der signalgenerierenden Protonen

Messungen in Cyclohexan erfordern die Zugabe eines geeigneten deuterierten Lösungsmittels. Daher wurden die in Cyclohexan gelösten Probelösungen mit Aceton- d_6 im Verhältnis 80:20 versetzt. Aufgrund des hohen Anteils an undeutertem Lösungsmittel ist dennoch eine Unterdrückung des Lösungsmittelsignals von Cyclohexan erforderlich, um ein geeignetes Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) zu erhalten. Im Gegensatz zu klassischen chromatographischen Methoden wird die MOAH-Fraktion nicht entsprechend ihres Retentionsverhaltens getrennt, sondern die aromatischen Verbindungen werden anhand ihrer unsubstituierten H-Atome erfasst. Die Signale der Ring-Protonen sind als sog. Hump (siehe Abbildung 11) bei einer chemischen Verschiebung (δ) größer 6,5 ppm zu finden. Ein- und Zweiringsysteme werden zwischen 7,2 ppm und 6,5 ppm aufgenommen, wohingegen polyzyklische Verbindungen mit mehr als drei aromatischen Zentren weiter in das Tieffeld verschoben sind. Aliphatische Ringsysteme und Alkylketten substituierter Aromaten finden sich im Bereich von $\delta = 3,0$ bis $\delta = 0,2$ ppm, wobei die weiter im Tieffeld verschobenen Signale auf mit aromatischen Systemen koppelnde Protonen hindeuten. Über diese

Information lassen sich zum Teil strukturelle Informationen der analysierten Mineralölkohlenwasserstoffe erhalten (WEBER *et al.*, 2018).

Eine Zusammenstellung der NMR-Parameter ist in Anhang 8.6 zu finden. Die QuantRef-Lösung für Messungen in Cyclohexan/Aceton- d_6 setzt sich aus Diethylphthalat und Ethylbenzol zusammen. Kontrolllösungen wurden in Cyclohexan bzw. 1,4-Di-n-Butylbenzol gelöst. Die Auswertung der Messungen erfolgte mithilfe von Excel-Berechnungsvorlagen, die vom CVUA zur Verfügung gestellt wurden. Abbildung 11 zeigt ein Spektrum des naphthenischen Mineralöls Gravex 913 und dessen charakteristischen MOAH-Hump. Alle ^1H -NMR-Experimente wurden am CVUA in Kooperation mit Frau Dr. Weber, Frau M.Sc. Tamina Schmidt, Frau M.Sc. Renate Paulick und Herrn Prof. Dr. Thomas Kuballa durchgeführt.

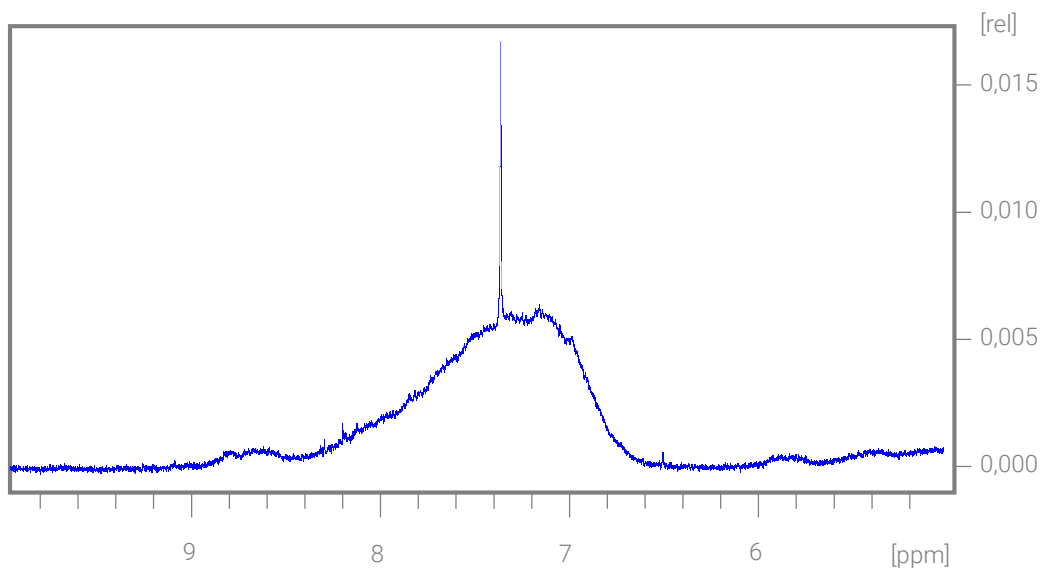


Abbildung 11: ^1H -NMR-Spektrum des naphthenbasierten Mineralöls Gravex 913 der Fa. Shell.

Deutlich zu erkennen ist der charakteristische Hump der *mineral oil aromatic hydrocarbons* (MOAH). Für MOAH liegt der Integrationsbereich zwischen $\delta = 9,2$ ppm und 6,5 ppm.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Ergebnisse, die im Rahmen der vorliegenden Dissertation erhoben wurden, werden im Folgendem in zwei Unterkapitel gegliedert. Im ersten Teil (5.1) werden die Ergebnisse der Untersuchungen von Mineralölkohlenwasserstoffen und künstlichem Sonnenlicht sowie möglichen synergistischen Effekten dargestellt und diskutiert. Der zweite Teil beschäftigt sich mit der Charakterisierung von ausgewählten Kupfer- (5.2) und Chromverbindungen (5.3) und deren Einfluss auf Modellzelllinien der Epidermis sowie gefäßauskleidenden Endothelzellen. Einen zentralen Aspekt der Dissertation stellen dabei vergleichende Genexpressionsuntersuchungen der getesteten Substanzklassen dar. Dabei wurden bereits postulierte Wirkmechanismen auf Genexpressionsebene nachvollzogen und um neue ergänzt. Die Hochdurchsatz RT-qPCR stellte sich dabei als adäquate Methode heraus, um einen detaillierten Überblick über mögliche *modes of action* einer Substanz zu erlangen.

5.1 MINERALÖLKOHLENWASSERSTOFFE

Die in kosmetischen Mitteln eingesetzten Mineralölkohlenwasserstoffe liegen zumeist als Gemische vor, welche durch derzeitige säulenchromatographische Trennmethode nur unzureichend zu analysieren sind. Toxikologische Untersuchungen zu aromatischen Kohlenwasserstoffen, unter der Berücksichtigung einer realitätsbezogenen möglichen Koexposition durch Sonnenbestrahlung, wie sie seit wenigen Jahren bei der Expositionsabschätzung von Arbeitern im Straßenbau durchgeführt werden (HOPF *et al.*, 2018), gibt es hierzu nach dem derzeitigen Kenntnisstand nicht.

Ziel war es daher, eine Methode zur toxikologischen Bewertung von Mineralölen in Kosmetika zu etablieren und Genexpressionsuntersuchungen durchzuführen. Für die Etablierung wurde auf den Mineralölrohstoff Gravex 913 (Shell) zurückgegriffen. Dabei handelt es sich um ein naphthenbasiertes Raffinat mit einer vergleichsweise hohen Polarität. Gravex 913 ist kein Mineralölrohstoff, der Bedeutung für die Herstellung kosmetischer Mittel besitzt. Er wurde jedoch aufgrund seines definierten Aromatengehaltes von 4,89 % (mittels $^1\text{H-NMR}$ bestimmt) und seiner guten Löseeigenschaften als Referenzsubstanz eingesetzt. Vor dem Einsatz in Zellkulturexperimenten wurde der MOAH-Anteil des Mineralöls mittels *online*-gekoppelter LC-GC extrahiert und mittels Fraktionssammler aufkonzentriert. Nach Abblasen von etwaigen Verunreinigungen des Fließmittels und der anschließenden gravimetrischen Bestimmung, wurde eine Stammlösung in DMSO von 10 mg/mL hergestellt. Diese Stammlösung wird nachfolgend als *MOAH-Fraktion* bezeichnet und sowohl für Zytotoxizitätsuntersuchungen als auch Genexpressionsanalysen verwendet.

5.1.1 ZYTOTOXIZITÄTSUNTERSUCHUNGEN

Die Toxizität einer Substanz kann anhand der Zellviabilität, einem wichtigen Parameter zur Beurteilung biologischer Effekte, abgeschätzt werden. Nachfolgend sind die zytotoxischen Wirkungen von MOAH-Extrakten, Benzo[a]pyren und entsprechenden Einzelsubstanzen (siehe Tabelle 2) dargestellt. Alle Untersuchungen wurden entweder allein mit den jeweiligen Verbindungen behandelt oder koinkubiert. Dabei erfolgte zunächst die Inkubation mit MOAH/PAK für 3 h, welcher eine Bestrahlung definierter Dosis an künstlichen Sonnenlicht (UVA-Anteil 1,18 J/cm², UVB-Anteil 60 mJ/cm²) angeschlossen war. Nach 3,5 min in der Bestrahlungsstation (ATLAS CPS+) erfolgte eine zweite Inkubation mit den jeweiligen MOAH/PAK für 3 h. Bei der Darstellung der Daten wurde die Zellviabilität auf die Vehikelkontrolle mit einem 0,5 %igen DMSO-Volumenanteil im Zellkulturmedium bezogen und in Prozent berechnet. Für die MOAH-Extrakte und die Einzelsubstanzen wurde der ATP-Gehalt zur Abschätzung der Zellviabilität herangezogen.

ATP spielt eine zentrale Rolle in biologischen Systemen. Es ist in allen metabolisch aktiven Zellen nachweisbar und erfährt eine Degradation, sobald Zellen Schaden nehmen und absterben. Der ATP-Gehalt steht so in direkter Korrelation mit der Zellviabilität. Der Nachweis von zellulärem ATP beruht auf der durch Luciferase katalysierten Reaktion von ATP und D-Luciferin (siehe Abbildung 12), bei der in Gegenwart von molekularem Sauerstoff und Magnesiumionen neben Oxyluciferin Energie in Form von Photonen freigesetzt werden. Die Intensität des emittierten Lichts ist dabei proportional zu der in der Zelle befindlichen ATP-Menge und als Biolumineszenz mit einem Luminometer bei einer Wellenlänge von 562 nm messbar. Das Ergebnis wird als relative Lichteinheit (RLU) angegeben (Promega Corporation, 2015).

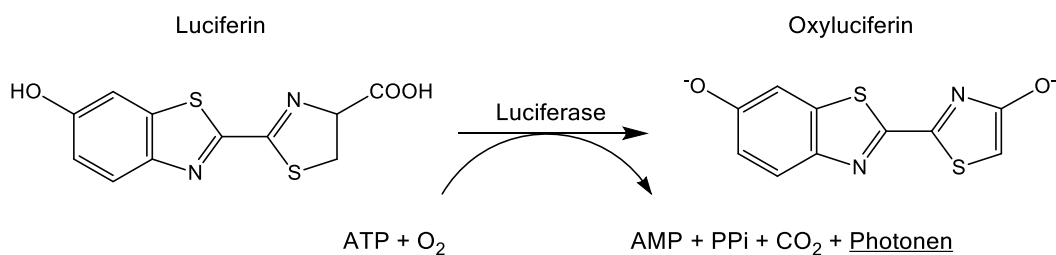


Abbildung 12: Reaktionsmechanismus des ATP-Assays.

Bei der durch Luciferase katalysierten Umsetzung von Luciferin zu Oxyluciferin werden unter ATP-Verbrauch Photonen frei, die als Messsignal dienen.

5.1.1.1 BENZO[a]PYREN

Die Etablierung des ATP-Assays erfolgte mit dem bekannten Photosensibilisator B[a]P (Abbildung 19). Neben dem ATP-Assay wurden ebenfalls Zytotoxizitätsuntersuchungen anhand der Zellzahl (Abbildung 13) und der Koloniebildungsfähigkeit (siehe Anhang 8.5) durchgeführt.

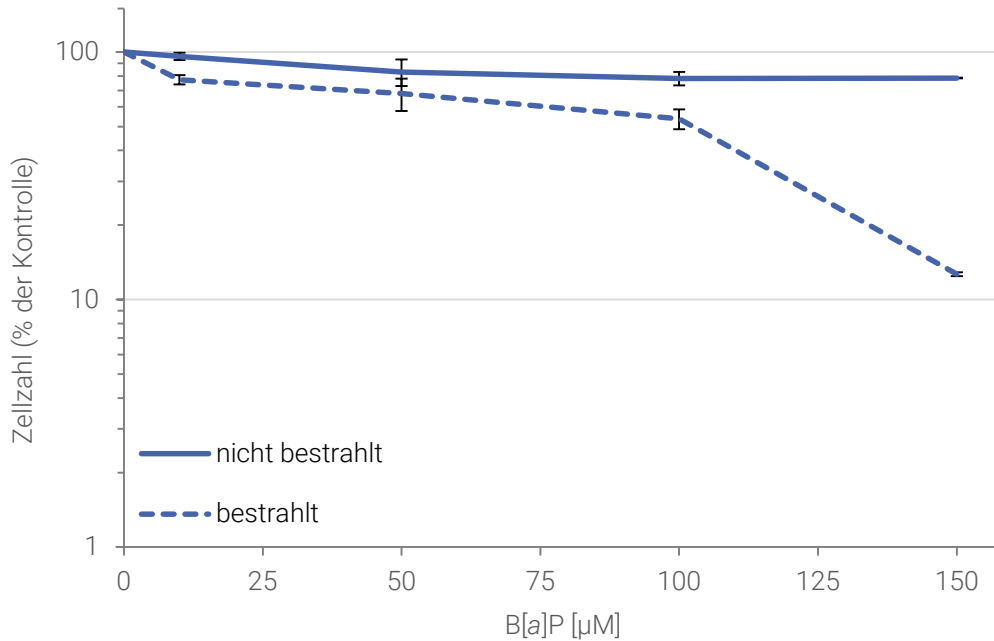


Abbildung 13: Lebendzellzahl der HaCaT Zellen nach Inkubation mit Benzo[a]pyren.

HaCaT Zellen wurden für 3 h in der B[a]P-haltigen Inkubationslösungen vorbehandelt, wahlweise für 3,5 min in PBS bestrahlt und erneut für 3 h mit B[a]P inkubiert. Abgebildet sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus zwei unabhängigen Versuchen (bestrahlt) bzw. drei unabhängigen Versuchen (nicht bestrahlt). Die Ergebnisse sind in Prozent der jeweiligen Kontrollen dargestellt. Die unterbrochene Linie stellt die Kombinationsbehandlung von B[a]P und der Bestrahlung, mit einem UVA-Anteil von 1,18 J/cm² und einem UVB-Anteil von 60 mJ/cm², dar.

Die Ergebnisse der akuten Zytotoxizitätsuntersuchungen sind in Abbildung 13 dargestellt. B[a]P führte zu einer leichten, konzentrationsabhängigen Abnahme der Lebendzellzahl nach Behandlung von 10 µM (96,0 % vitale Zellen) bis 100 µM (78,3 % vitale Zellen). Auch in einem Konzentrationsbereich von 150 µM waren nach der Inkubation noch 78,5 % der Zellen intakt. Durch zusätzliche Bestrahlung nahm die Lebendzellzahl bereits bei 10 µM um 23 % ab (77,3 % vitale Zellen). Es war eine deutliche konzentrationsabhängige Reduktion der Zellzahl in den nachfolgenden Inkubationskonzentrationen erkennbar. Die Lebendzellzahl sank bei 50 µM auf 67,9 %, bei 100 µM auf 53,7 % und betrug nach 150 µM Behandlung noch 12,7 %.

5.1.1.2 AROMATISCHE MINERALÖLKOHLENWASSERSTOFFE (MOAH)

Untersuchungen mit den MOAH-Fractionen des Gravex 913 Rohstoffes (Abbildung 14) zeigten keine akuten zytotoxischen Effekte in den getesteten Konzentrationsbereichen (50 µM, 150 µM, 250 µM). Weder die nicht bestrahlten Proben noch die sonnenlichtexponierten Proben zeigten eine Abnahme des basalen ATP-Gehaltes. Der ATP-Gehalt der bestrahlten MOAH-exponierten Zellen zeigte eine leichte Induktion des ATP-Niveaus, was auf eine erhöhte metabolische Aktivität der Zelle schließen ließ.

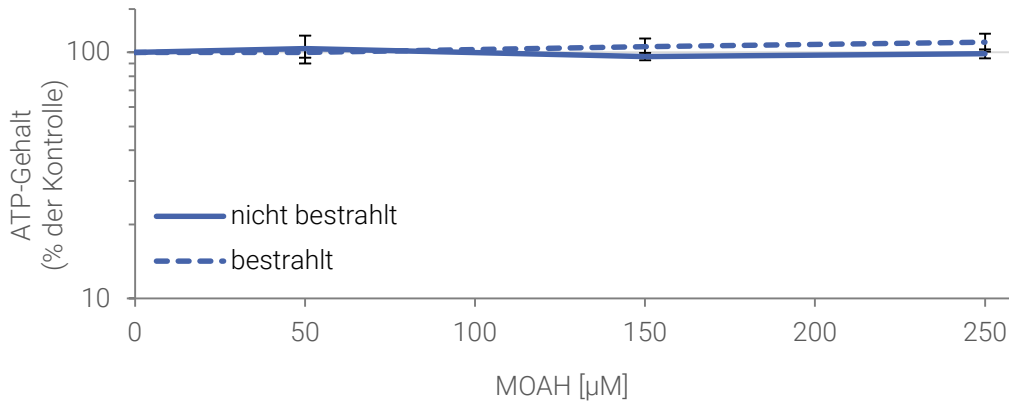


Abbildung 14: ATP-Gehalt der HaCaT-Zellen nach Inkubation mit MOAH-Fractionen (Gravex 913).

HaCaT Zellen wurden für 3 h in der MOAH-haltigen Inkubationslösungen vorbehandelt, wahlweise für 3,5 min in PBS bestrahlt und erneut für 3 h mit B[a]P inkubiert. Abgebildet sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens drei Bestimmungen aus drei unabhängigen Versuchen. Die Ergebnisse sind in Prozent der jeweiligen Kontrollen dargestellt. Die unterbrochene Linie stellt die Koexposition der MOAH-Behandlung und der Bestrahlung, mit einem UVA-Anteil von 1,18 J/cm² und einem UVB-Anteil von 60 mJ/cm², dar.

5.1.1.3 EINZELSUBSTANZEN (MOAH)

Die in Abbildung 15 dargestellten Toxizitätsuntersuchungen nach 3 h + 3 h Inkubation mit unterschiedlichen MOAH Einzelsubstanzen zeigten, dass sowohl Behandlungen mit 10 µM als auch Behandlungen mit 50 µM keinen nachteiligen Effekt auf den ATP-Gehalt und somit die Zellviabilität in den HaCaT Zellen hatten. Konzentrationen von 125 µM erwiesen sich bei Pentylnbenzol (Substanz 2) als stark zytotoxisch (ATP-Gehalt 41 % bzw. 35 %), wobei die simultane Behandlung mit künstlichem Sonnenlicht in Anbetracht der Fehlerbalken zu keiner Verstärkung des Effektes führten. Die 125 µM Behandlungen von 1,2,4-Trimethylbenzol (Substanz 3) und 1,4-Dibutylbenzol (Substanz 4) waren moderat toxisch und riefen eine ATP-Depletion von 33 % (29 % bestrahlt) und 22 % (25 % bestrahlt) hervor.

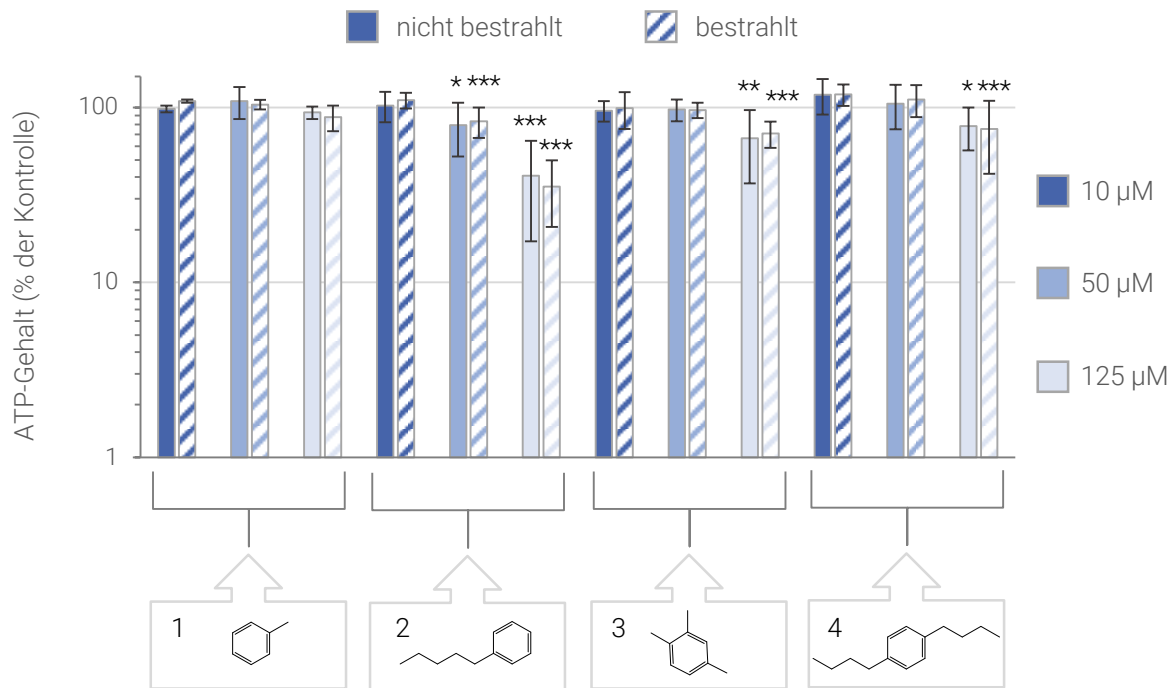


Abbildung 15: ATP-Gehalt der HaCaT-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen MOAH.

HaCaT Zellen wurden für 3 h mit den jeweiligen Inkubationslösungen vorbehandelt, wahlweise für 3,5 min in PBS bestrahlt und erneut für 3 h inkubiert. Abgebildet sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von drei Bestimmungen aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett's T Post-Hoc-Test: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$. Die Ergebnisse sind in Prozent der jeweiligen Kontrollen dargestellt. Substanz 1: Toluol, Substanz 2: Pentylbenzol, Substanz 3: 1,2,4-Trimethylbenzol, Substanz 4: 1,4-Dibutylbenzol wurden in 10 μM , 50 μM und 125 μM inkubiert. Die schraffierten Balken stellen die Kombinationsbehandlung der Bestrahlung, mit einem UVA-Anteil von 1,18 J/cm^2 und einem UVB-Anteil von 60 mJ/cm^2 , dar.

Abbildung 16 zeigt die Zellviabilität nach Behandlung mit 1,4-Bis(2-ethylhexyl)benzol, 1,4-Bis(3,7-dimethyloctyl)benzol, Diphenylmethan und m-Terphenyl. Alle drei Behandlungen der 1,4-substituierten Benzole (Substanz 5 und Substanz 6) zeigten keinen Einfluss auf den zellulären ATP-Gehalt. Diphenylmethan (Substanz 7) verminderte den ATP-Gehalt der HaCaT Zellen ab einer Konzentration von 50 μM auf 68 % (65 % bestrahlt) der Kontrolle. 125 μM waren stark zytotoxisch und führten zu einer ATP-Depletion auf 20 % bzw. 21 % der Ausgangs-ATP-Konzentration.

m-Terphenyl (Substanz 8) führte ab einer Behandlungskonzentration von 50 μM zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme des ATP-Gehaltes auf 84 % (67 % bestrahlt). Bereits hier zeigten sich die phototoxischen Effekte von m-Terphenyl, welche sich bei Behandlungen mit 125 μM noch weiter verstärkten. Bei Inkubationen mit 125 μM wurde der basale ATP-Gehalt auf 71 % bzw. 46 % (bestrahlt) gesenkt. Terphenyle absorbieren im UVA-Bereich und neigen unter Bestrahlung im sichtbaren Licht zur Radikalbildung. Aufgrund ihrer Eigenschaften werden Terphenylderivate als Photoinitiatoren bei der Photopolymerisation von Kunststoffen eingesetzt (HOLA *et al.*, 2020). Mögliche phototoxische Effekte ausgehend von Radikalen sind daher zu erwarten.

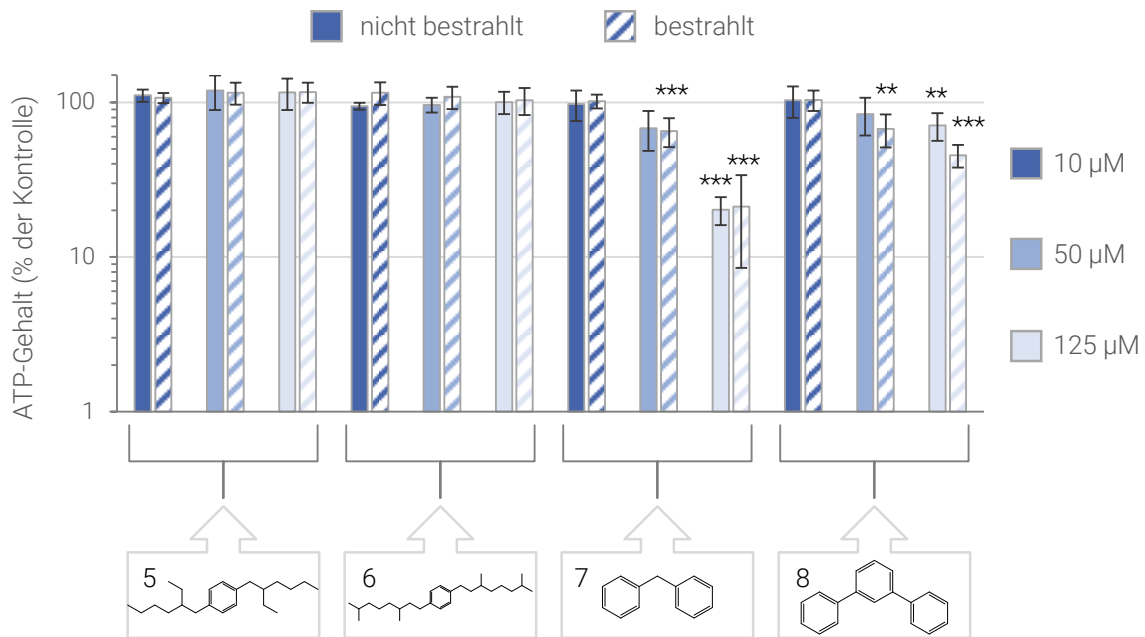


Abbildung 16: ATP-Gehalt der HaCaT Zellen nach Inkubation mit verschiedenen MOAH.

HaCaT Zellen wurden für 3 h mit den jeweiligen Inkubationslösungen vorbehandelt, wahlweise für 3,5 min in PBS bestrahlt und erneut für 3 h inkubiert. Abgebildet sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von drei Bestimmungen aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett's T Post-Hoc-Test: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$. Die Ergebnisse sind in Prozent der jeweiligen Kontrollen dargestellt. Substanz 5: 1,4-Bis(2-ethyl-hexyl)benzol, Substanz 6: 1,4-Bis(3,7-dimethyloctyl)benzol, Substanz 7: Diphenylmethan, Substanz 8: m-Terphenyl wurden in 10 μM , 50 μM und 125 μM inkubiert. Die schraffierten Balken stellen die Kombinationsbehandlung der Bestrahlung, mit einem UVA-Anteil von 1,18 J/cm^2 und einem UVB-Anteil von 60 mJ/cm^2 , dar.

In Abbildung 17 sind carbozyklische Aromaten der Naphthalinfamilie dargestellt. Naphthalin und seine methylierten Derivate 1- und 2-Methylnaphthalin (Substanzen 9, 10, 11) erwiesen sich bei 50 μM als moderat zytotoxisch und senkten den ATP-Gehalt um 30 % bis 40 %. Die Bestrahlung zeigte in diesen Konzentrationsbereichen noch keine synergistischen Effekte. Naphthalin kann dermal aufgenommen werden. Die Metabolisierung führt über eine Cytochrom-P450 vermittelte Oxidation zum 1,2-Epoxid und einer Vielzahl weiterer, zum Teil reaktiver Metabolite, die nach Konjugation an Sulfate, Glucuronsäure und Glutathion entgiftet und renal ausgeschieden werden können. Im Gegensatz zu den mehrkernigen PAK, welche häufig als Epoxide oder Diolepoide die eigentlich krebserregenden Agenzien darstellen, wird für Naphthalin (und seine Derivate) postuliert, dass es über die Bildung von Naphthochinone durch Redoxcycling die Konzentration von ROS erhöht und so zelluläre Strukturen schädigen kann (BZgA, 2007; BOLTON *et al.*, 2000). Andererseits zeigten Auswertungen von *Biomonitoring*-Untersuchungen, dass bei naphthalinexponierten Arbeitern Proteinaddukte nachgewiesen werden konnten, was darauf schließen lässt, dass auch kovalente Bindungen von Naphthochinonen ausgebildet werden.

Diese zusätzliche Bildung von Chinonen und reaktiven Photolyseprodukten sowie die Depletion des GSH-Status der Zelle können die in Abbildung 17 dargestellten phototoxischen Effekte der Substanzen 9, 10, 11 und 12 erklären. Im Konzentrationsbereich von 125 μM zeigten 1-Methylnaphthalin und 2-Methylnaphthalin einen Rückgang der Zellviabilität auf 10 % bzw. 13 % und wirkten so nochmals erheblich stärker zytotoxisch, als die Behandlung der nicht bestrahlten Proben (32 % und 23 % vitale Zellen).

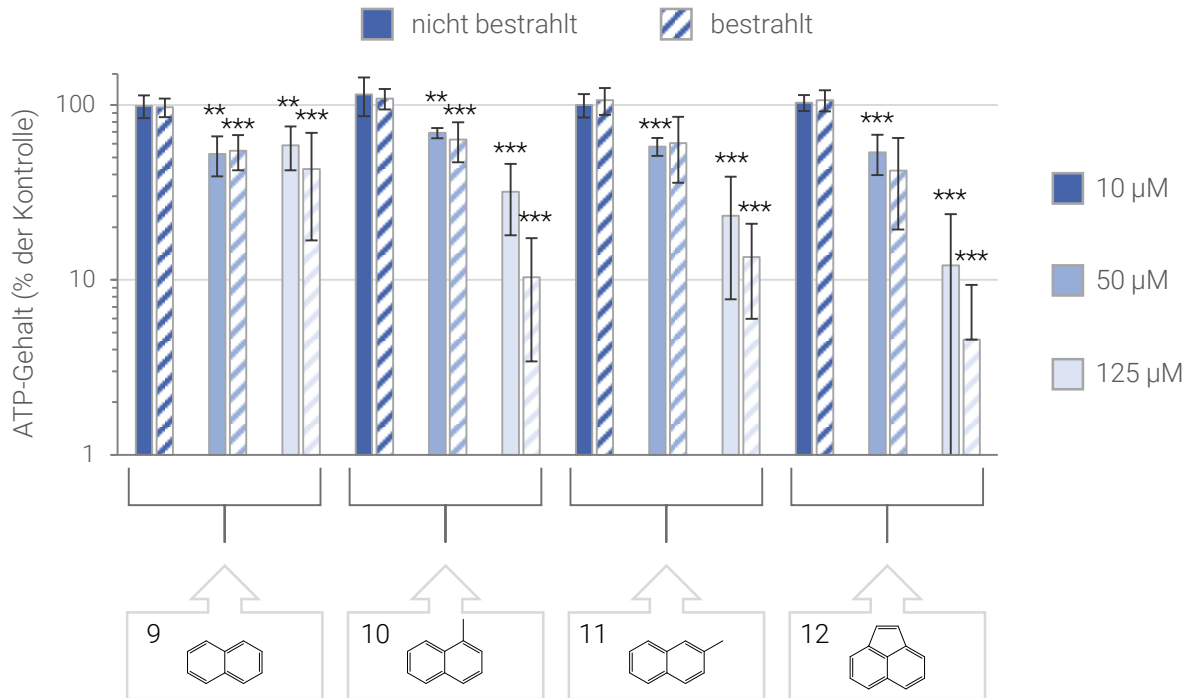


Abbildung 17: ATP-Gehalt der HaCaT Zellen nach Inkubation mit verschiedenen MOAH.

HaCaT Zellen wurden für 3 h mit den jeweiligen Inkubationslösungen vorbehandelt, wahlweise für 3,5 min in PBS bestrahlt und erneut für 3 h inkubiert. Abgebildet sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von drei Bestimmungen aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett's T Post-Hoc-Test: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$. Die Ergebnisse sind in Prozent der jeweiligen Kontrollen dargestellt. Substanz 9: Naphthalin, Substanz 10: 1-Methylnaphthalin, Substanz 11: 2-Methylnaphthalin, Substanz 12: Acenaphthalin wurden in 10 μM , 50 μM und 125 μM inkubiert. Die schraffierten Balken stellen die Kombinationsbehandlung der Bestrahlung, mit einem UVA-Anteil von 1,18 J/cm² und einem UVB-Anteil von 60 mJ/cm², dar.

Durch die delokalisierten π -Elektronensysteme der polyzyklischen Konfiguration, können Elektronen bereits im Spektralbereich des UVA und UVB in angeregte Zustände angehoben werden (Fu *et al.*, 2012). Sowohl die Chinonbildung als auch die Bildung reaktiver Aldehyde nach UV-Bestrahlung ist in Abbildung 18 dargestellt (Yu, 2002).

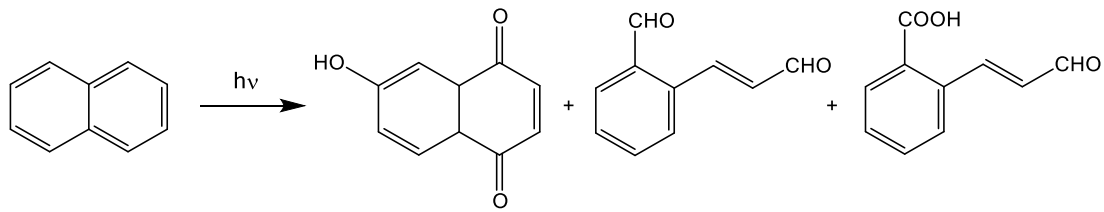


Abbildung 18: Bildung von Hydroxynaphthochinon und reaktiven Intermediaten nach UV-Bestrahlung.
(modifiziert nach Yu, 2002)

Die in Abbildung 19 dargestellten Toxizitätsuntersuchungen der Substanzen Phenanthren (Substanz 13), Octahydrophenanthren (Substanz 14) und B[a]P (Substanz 15) zeigten im Konzentrationsbereich von 10 μM und 50 μM keine zytotoxischen Effekte der Substanzen 13 und 14. Die Kobehandlung mit künstlichem Sonnenlicht wies in besagten Konzentrationen bei den Phenanthrenderivaten keine synergistischen Effekte auf.

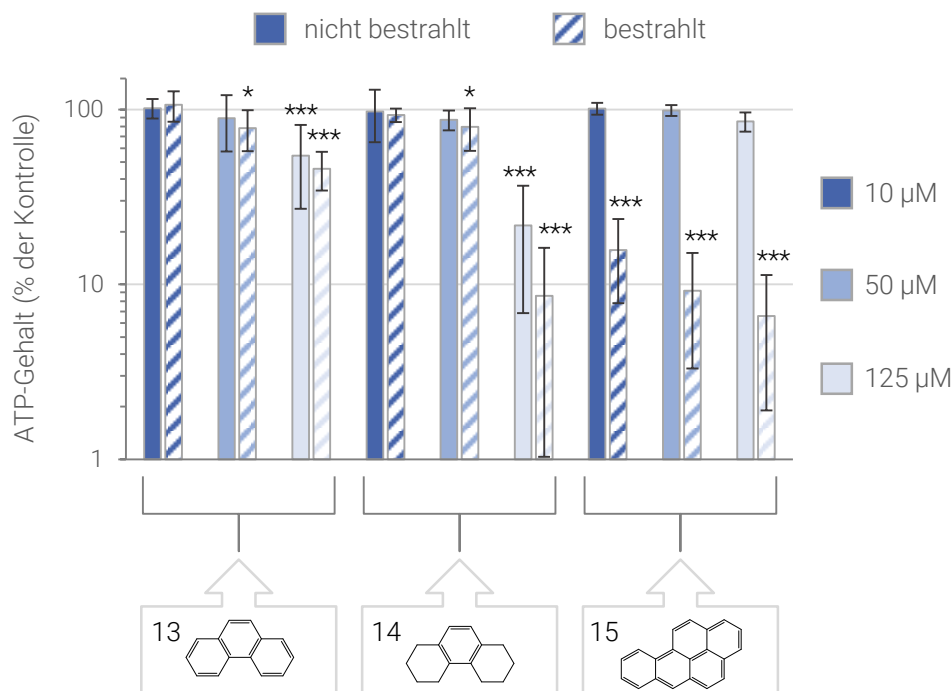


Abbildung 19: ATP-Gehalt der HaCaT Zellen nach Inkubation mit verschiedenen MOAH.

HaCaT Zellen wurden für 3 h mit den jeweiligen Inkubationslösungen vorbehandelt, wahlweise für 3,5 min in PBS bestrahlt und erneut für 3 h inkubiert. Abgebildet sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von drei Bestimmungen aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett's T Post-Hoc-Test: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$. Die Ergebnisse sind in Prozent der jeweiligen Kontrollen dargestellt. Substanz 13: Phenanthren, Substanz 14: Octahydro-phenanthren, Substanz 15: Benzo[a]pyren, wurden in 10 μM , 50 μM und 125 μM inkubiert. Die schraffierten Balken stellen die Kombinationsbehandlungen der Bestrahlung, mit einem UVA-Anteil von 1,18 J/cm² und einem UVB-Anteil von 60 mJ/cm², dar.

B[a]P gilt als bekannter Photosensibilisator und zeigte in allen getesteten Konzentrationen signifikante phototoxische Effekte. Bereits in der geringsten bestrahlten Behandlung von 10 μM wurden die ATP-

Gehalte um über 80 % gesenkt. Die starke Zytotoxizität ist dabei dem Fünfringsystem von B[a]P geschuldet, welches im Photonen im sichtbaren sowie im UV-Bereich absorbiert und das delokalisierte π -Elektronensystem in angeregte Zustände versetzt. Die unter Kapitel 2.3.7 angesprochene Chinonbildung führt zu einer erhöhten Bildung an ROS. Des Weiteren können durch Cytochrom-P450 gebildete Epoxide nicht wie sonst üblich an GSH konjugiert und detoxifiziert werden, da der zelluläre GSH-Pool durch UV-Bestrahlung bzw. die erhöhte Auslastung antioxidativer Schutzsysteme der Zelle bereits dezimiert vorliegt (LARSSON *et al.*, 2005; HOPF *et al.*, 2018).

5.1.2 GENEXPRESSIONSANALYSEN

Die Hochdurchsatz RT-qPCR ist eine aussagekräftige Methode, um Wirkmechanismen toxischer Verbindungen aufzuklären. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, zeitgleich in 96 Proben die Beeinflussung von 95 Genen verschiedener Gencluster quantitativ zu erfassen. Die Methode wurde im Rahmen vorausgegangener Arbeiten der Arbeitsgruppe Hartwig etabliert und validiert (FISCHER *et al.*, 2016). Für die Untersuchungen von Lungenzellen nach Partikelexposition wurden die Methode bereits erfolgreich angewandt (STRAUCH *et al.*, 2017; SCHMITZ UND DESEL, 2018; HUFNAGEL *et al.*, 2020). In der vorliegenden Arbeit soll die Anwendung der Hochdurchsatz RT-qPCR auf HaCaT Zellen der Epidermis und den Blutgefäß-auskleidenden EA.hy926 Zellen erweitert werden.

Die Veränderungen der Genexpressionsmuster von HaCaT Zellen sind nach Behandlung im Folgendem als *Heatmap* (Abbildung 20) dargestellt. Es handelt sich bei den Darstellungen um eine Auswahl an Genen, die konzentrationsabhängige Effekte zeigten und deren Transkriptmenge um den \log_2 -fachen Faktor ± 1 (Verdopplung oder Halbierung der Ausgangstranskriptmenge) erhöht oder verringert wurden. Als Referenz diente dabei die nicht bestrahlte HaCaT Kontrolle. Generell gilt zu erwähnen, dass die Bestrahlung zum Teil leichte Veränderungen der Genexpressionsmuster hervorrief. Die Übersicht der vollständigen Genexpressionsprofile ist in Anhang 8.9 aufgeführt.

5.1.2.1 BENZO[a]PYREN

Die Genexpressionsmuster von B[a]P sind in Abbildung 20 und Abbildung 24 dargestellt. Die nicht bestrahlten Kontrollen zeigten in den getesteten Konzentrationen nur im Falle von *CYP1A1* eine biologisch relevante Veränderung. 250 nM B[a]P führten zu einer Induktion des Gens um den \log_2 -fachen Wert von 1,71. Entsprechend der Zytotoxizitätsbestimmungen zeigte sich nach Koexpositionen von B[a]P und künstlichem Sonnenlicht der stark phototoxische Charakter von B[a]P.

HaCaT Zellen verfügen über einen aktiven Phase I und Phase II Mechanismus (BONIFAS *et al.*, 2010). Bereits in Kapitel 2.3.6 wurden die wichtigen Funktionen verschiedener Enzyme des Phase I und Phase II Metabolismus hinsichtlich der Biotransformation und mögliche metabolische Aktivierungen von MOAH diskutiert. Erst durch die Oxidation von aromatischen Ringsystemen entstehen elektrophile Verbindungen,

die an elektronenreiche Strukturen wie DNA binden können. Die Induktion von Phase I und Phase II Enzymen ist dabei über den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) gesteuert. Der AhR gehört zu den ligandenaktivierten Transkriptionsfaktoren und kann eine Vielzahl von strukturverschiedenen, planaren Substanzen binden. Durch Bindung kommt es zu einer Konformationsänderung und der Abspaltung der Proteine p23 und *AhR-Interacting Protein* (AIP), die mit einem HSP90 (*Heat Shock Protein 90*) Dimer einen sog. Chaperonkomplex bilden. Die Abdissoziation von AIP und p23 begünstigt die Translokation des AhR in den Zellkern, wo er mit ARNT (*AhR nuclear translocator*) einen Komplex ausbildet (Abbildung 21).

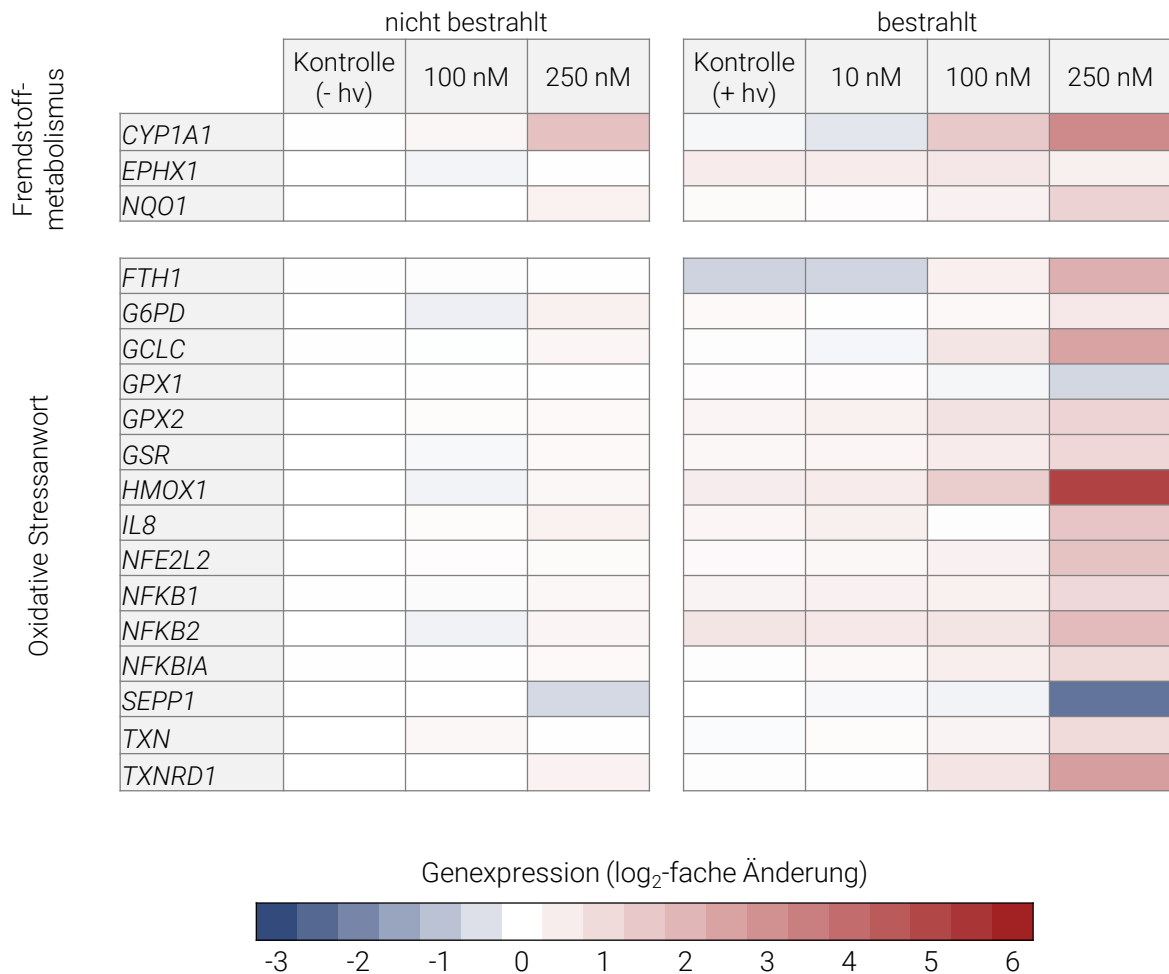


Abbildung 20: Beeinflussung der Genexpression des Fremdstoffmetabolismus und der oxidativen Stressantwort in HaCaT Zellen nach Behandlung mit Benzo[a]pyren und künstlichem Sonnenlicht.

UVA-Anteil von 1,18 J/cm², UVB-Anteil von 60 mJ/cm². 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.

Das AhR-ARNT Dimer bindet an zahlreiche Zielgene, die eine oder mehrere AhR-Bindungsstellen in ihren Promotorregionen aufweisen. Diese Bindungsstellen sind auch unter dem Begriff *AhR responsive elements* (AhRE) bekannt. Durch Bindung an die AhRE werden zum einen Histonacetylasen und Histonmethyltransferasen rekrutiert, die Modifikationen an den Histonen vornehmen, um so die Chromatinstruktur zu lockern und die DNA in eine weniger stark kondensierte Form zu überführen.

Weiterhin werden RNA-Polymerasen in 5'-Richtung der Zielgene rekrutiert, was zu einer erhöhten Transkriptionsrate der entsprechenden Gene führt (ESSER *et al.*, 2015). Eine schematische Darstellung der Induktion von Zielgenen des AhR findet sich in Abbildung 21.

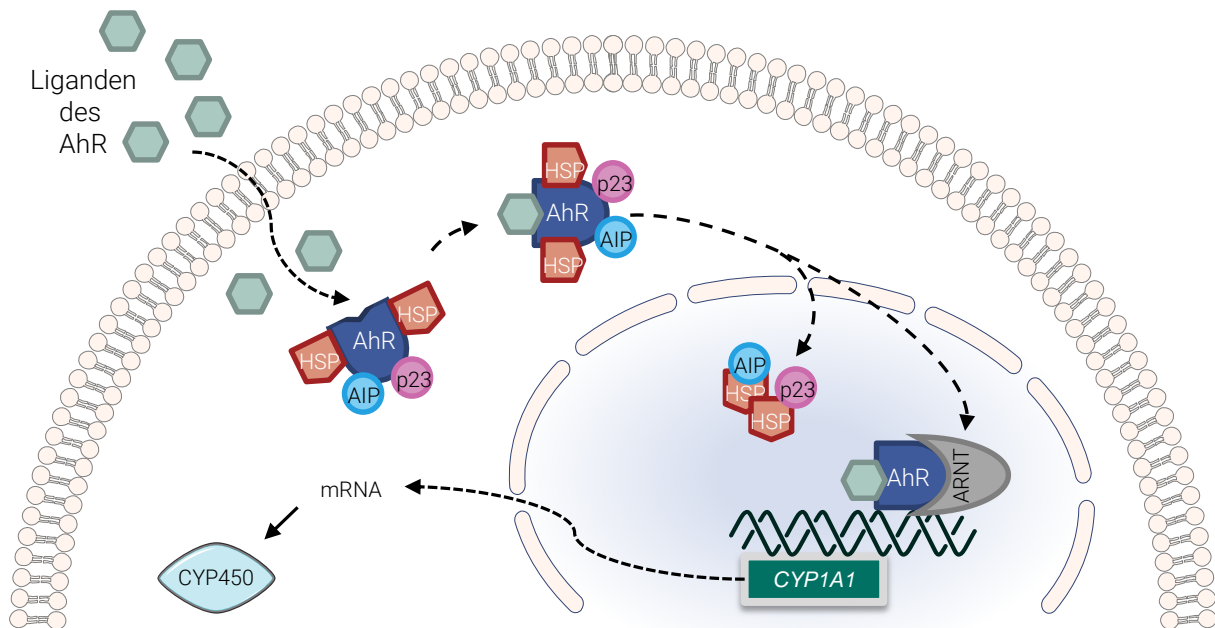


Abbildung 21: Schematische Darstellung des AhR-Signalweges zur Induktion von CYP1A1.

1: Nach Aufnahme von planaren, aromatischen Kohlenwasserstoffe binden diese im Zytosol an den Aryl-Hydrocarbon Rezeptor (AhR). 2: Dies führt zu einer Konformationsänderung und der Abdissoziation von *Heat Shock Protein 90* (HSP), *AhR-Interacting Protein* (AIP) und p23. 3: Durch Abspaltung bildet sich ein Heterodimer mit dem *AhR Nuclear Translocator* (ARNT) aus. Das Dimer bindet an Promotorregionen verschiedener Zielgene wie CYP1A1. 4: Die Transkriptionsrate steigt und das Expressionsniveau wird erhöht. 5: Somit steigt die Proteinexpression von CYP450 (modifiziert nach ESSER *et al.*, 2015).

Zu den Liganden des AhR gehören neben aromatischen Mineralölkohlenwasserstoffen und halogenierten PAK auch endogene Substrate wie beispielsweise das Tryptophanderivat 6-Formylindolo[3,2-b]carbazol (FICZ), welches sich nach UV-Bestrahlung aus Tryptophan und einigen Tryptophanmetaboliten bilden kann. FICZ stellt dabei einen Liganden mit einer hohen Bindungsaffinität zum AhR dar und induziert ebenfalls gezielt CYP1A1 (RANNUG UND RANNUG, 2018; FRITSCHKE *et al.*, 2007).

Neben der erhöhten Expression von CYP1A1 (\log_2 -fache Steigerung von 3,2) zeigten sich vor allem Veränderungen in Zielgenen des KEAP1-NRF2-Systems (KEAP1= *Kelch-like ECH-associated protein 1*, NRF2 = *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*). Der KEAP1-NRF2-Komplex ist eines der wichtigsten protektiven Schutzsysteme der Zelle gegenüber oxidativem Stress. Unter homöostatischen Bedingungen ist KEAP1 Teil einer E3-Ubiquitin-ligase, welche die Aktivität des Transkriptionsfaktors NRF2 durch proteasomalen Abbau streng reguliert (siehe Abbildung 22). Wird die Zelle oxidativem und/oder elektrophile Stress ausgesetzt, werden sog. Sensor-Cysteine an KEAP1 oxidiert und es kommt zu einer Abspaltung von NRF2. Ein Abbau des KEAP1-NRF2-Komplexes ist somit nicht mehr möglich, wodurch

NRF2 in der Zelle akkumuliert. Es gelangt in den Zellkern, wo es mit sMAF-Proteinen (*small musculoaponeurotic fibrosarcoma*) Heterodimere bildet und an Promotorregionen antioxidativer Gene, den sog. *Antioxidative Response Elements (ARE)*, bindet (BAIRD UND YAMAMOTO, 2020; TONELLI *et al.*, 2018). Einige Zielgene von NRF2 wurden im Rahmen der Genexpressionuntersuchungen nach Bestrahlung solarer UV-Strahlung und Inkubation mit B[a]P beeinflusst.

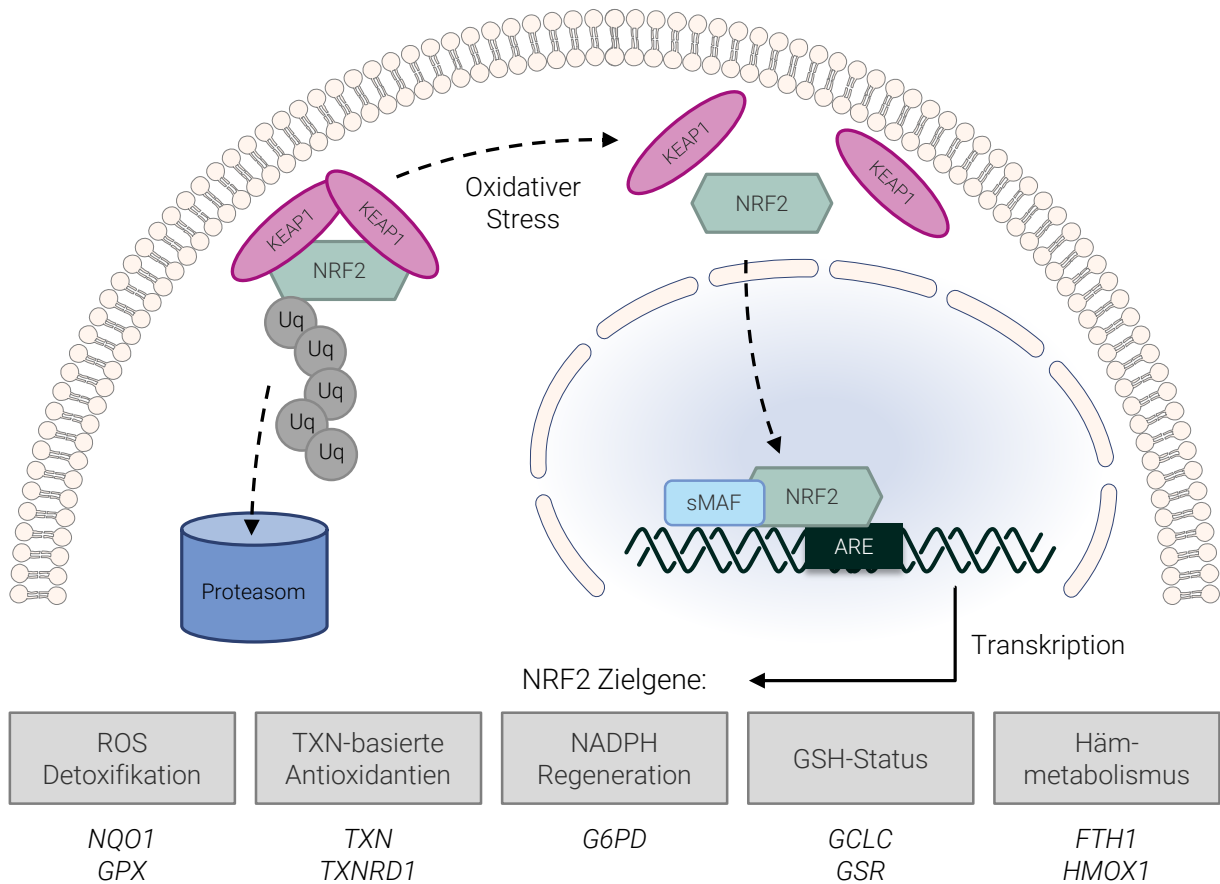


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Aktivierung von NRF2-Zielgenen durch oxidativen Stress.

Unter normalen Bedingungen wird NRF2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) durch KEAP1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) gebunden und Ubiquitin-vermittelt (Uq) proteasomal abgebaut. Ist die Zelle oxidativem und/oder elektrophile Stress ausgesetzt, werden sog. Sensor-Cysteine an KEAP1 oxidiert und es kommt zu einer Abspaltung von NRF2. Ein Abbau des KEAP1-NRF2-Komplexes ist somit nicht mehr möglich, wodurch NRF2 in der Zelle akkumuliert. Es gelangt in den Zellkern, wo es mit sMAF-Proteinen (*small musculoaponeurotic fibrosarcoma*) Heterodimere bildet und an Promotorregionen antioxidativer Gene, den sog. *Antioxidative Response Elements (ARE)*, bindet. Die Transkription von NRF2-Zielgenen wird induziert (modifiziert nach TONELLI *et al.*, 2018).

Das Gen der NAD(P)H-abhängigen Chinon-Oxidoreduktase 1 (*NQO1*) zeigte eine 1,23-fach erhöhte Transkriptionsrate bei 250 nM B[a]P-Behandlung in Kombination mit der Sonnenlichtbehandlung und auch *GPX2* (Glutathionperoxidase 2) wurde 1,21-fach höher exprimiert. Beide gleichnamigen Genprodukte fungieren detoxifizierend gegenüber oxidativem Stress. *NQO1* unterbindet die Entstehung von radikalbildenden Chinonen, während Selenoproteine, wie *GPX*, Elektronen auf Wasserstoffperoxid und organische Hydroperoxide übertragen und diese zu Wasser bzw. unreaktiven Alkoholen reduzieren

(BRIGELIUS-FLOHÉ UND MAIORINO, 2013). Im Gegensatz zu GPX1, welches für die Reaktion mit Hydroperoxiden das Reduktionsmittel GSH nutzt, katalysiert GPX2 den Elektronenübertrag mit Hilfe des Thioredoxin (TXN)-NADPH Systems (TANAKA *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2013).

Thioredoxine spielen, ähnlich wie GSH, eine wichtige Rolle bei der Regenerierung von oxidierten Proteinen. Abbildung 23 zeigt die Initiierung von TXN ausgehend der Cysteine an Position 32 und 35, welche einen nukleophilen Angriff auf die Disulfidbindung des Substratproteins durchführen. Im ersten Schritt dieser Reaktion bildet das N-terminale Cystein von TXN eine intermolekulare Disulfidbindung zwischen TXN und dem Substratprotein aus. Der zweite Schritt ist ein nukleophiler Angriff des C-terminalen Cysteins auf die intermolekulare Disulfidbindung. Dabei wird die Bindung zum Substratprotein gebrochen, was zur Bildung einer intramolekularen Disulfidbindung und zur Oxidation von TXN führt. Das Substratprotein liegt anschließend in der reduzierten Form vor (LEE *et al.*, 2013).

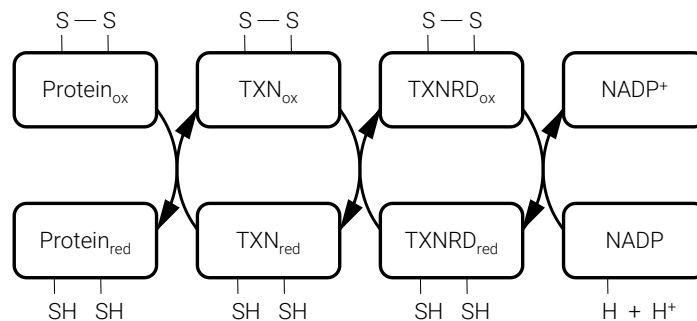


Abbildung 23: Regenerierung oxidierten Proteins mittels Thioredoxinkaskade.

Die Elektronen werden über Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH/H⁺) bereitgestellt. Es reduziert Thioredoxin-Reduktase (TXNRD) und überführt es in seine aktivierte Form. Oxidiertes Thioredoxin (TXN) kann daraufhin selektiv von TXNRD durch die Reduktion der oxidierten Disulfidbrücke (S-S) antioxidativen Prozessen der Zelle bereitgestellt werden (modifiziert nach LEE *et al.*, 2013).

TXN_{ox} kann durch die Thioredoxin-Reduktase 1 (TXNRD1) regeneriert werden. Die Elektronen hierfür werden über das Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH/H⁺) bereitgestellt. Beide Gene *TXN* und *TXNRD1* wurden nach B[a]P-Behandlung und Bestrahlung mit künstlichem Sonnenlicht induziert. *TXN* erfuhr nach der 250 nM-Behandlung eine Verdopplung der transkriptionell vorliegenden mRNA und *TXNRD1* wurde 2,64-fach (log₂) vermehrt exprimiert. Auch der erhöhte Bedarf an NADPH/H⁺ zeigte sich in den Genexpressionsprofilen. Die Ablesehäufigkeit des Gens *Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD)*, dessen gleichnamiges Protein für die Synthese von NADPH/H⁺ aus dem Pentosephosphatweg verantwortlich ist, war um den log₂-fachen Wert 0,63 erhöht. Eine Tendenz des erhöhten NADPH/H⁺ Bedarfes war somit feststellbar (LEE *et al.*, 2013).

Die Gegenwart von oxidativem Stress war auch an Genen abzulesen, die für die Aufrechterhaltung des GSH-Status der Zelle codieren. So wurde die Glutamat-Cystein-Ligase (*GCLC*) 2,5-fach vermehrt exprimiert und auch die Glutathion-S-Reduktase (*GSR*) erfuhr eine um den log₂-Faktor 1,1 erhöhte Expression nach

Kombinationsbehandlung von 250 nM B[a]P und Bestrahlung. GCLC katalysiert dabei den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der GSH-Synthese, indem es Cystein und Glutaminsäure an dessen terminale Carboxylgruppe verknüpft. Diese ungewöhnliche Verknüpfung über das γ -Kohlenstoffatom der Aminosäureseitenkette erhöht die Stabilität von GSH und macht es unempfindlich gegenüber zellulärer Peptidasen (NJÄLSSON UND NORGRÉN, 2005). GSR fungiert als Oxidoreduktase und sorgt für die Aufrechterhaltung des zellulären GSH-Pools. Oxidiertes Glutathiondimer (GSSG) wird dabei über die Übertragung von Elektronen einer Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) Untereinheit des GSR-Proteins unter NADPH/H⁺-Verbrauch zu zwei Moläquivalenten GSH reduziert und steht so wieder antioxidativen Prozessen der Zelle zur Verfügung (DEPONTE, 2013).

FTH1 (*Ferritin heavy chain 1*) und *HMOX1* (Hämoxygenase 1) unterliegen ebenfalls der Regulation des Transkriptionsfaktors NRF2 und zeigten eine veränderte Transkriptionsrate nach Koinkubation. *FTH1* codiert dabei für eine Untereinheit des Multiproteinkomplexes Ferritin, welches das wichtigste Eisenspeicherprotein in Pro- und Eukaryoten ausmacht. Änderungen der Expressionsrate auf Genebene können dabei Einfluss auf die zelluläre Proteinmenge von Ferritin haben und so die Geschwindigkeit und die Beständigkeit der Speicherung von Eisen beeinflussen. Eisen spielt, wie unter 2.4.3.1 erläutert, eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies über die Fenton-Reaktion (ORINO *et al.*, 2001). Die Hochregulation des Eisenspeicherproteins Ferritin um den \log_2 -Faktor von 2,2 nach Behandlung mit 250 nM ist eine mögliche Antwort auf das erhöhte oxidative Stresslevel, welches durch den Photosensibilisator B[a]P hervorgerufen wurde.

Das Gen *HMOX1* codiert für das Enzym Hämoxygenase 1, welches Häm zu Biliverdin, Kohlenmonoxid sowie Eisen(III) abbaut. Eine gesteigerte *HMOX1*-Expression wird weiterhin mit einem erhöhten oxidativen Stresslevel in Verbindung gebracht. *HMOX1* gilt als Sensorgen für ROS. Der Stressmarker *HMOX1* zeigte eine dosisabhängige gesteigerte Expression unter dem Einfluss von UV-Strahlung und 100 bzw. 250 nM B[a]P. Nach Behandlung von 100 nM wurde das Gen geringfügig um den \log_2 -Faktor von 1,4 und nach Behandlung von 250 nM um den Faktor 5,2 vermehrt exprimiert.

Neben transkriptionellen Änderungen von NRF2-Zielgenen äußerte sich die Koexposition auch in der erhöhten Expression von Entzündungsmarkern, wie *IL-8* (Abbildung 20) und *VEGFA* (Abbildung 24). *Interleukin 8* (*IL-8*) wurde dabei in der höchsten getesteten Konzentration 1,6-fach vermehrt exprimiert. *IL-8* codiert für ein Chemokin, welches insbesondere in Endothel- und Epithelzellen anzutreffen ist. Bei Entzündungsreaktionen und oxidativem/zellulärem Stress steigt die Syntheserate des Interleukins an den Ribosomen. IL-8 fördert die Chemotaxis (Motilität von Immunzellen) und lockt neutrophile Granulozyten in das betroffene Gewebe (TSUJI *et al.*, 2011). Das Genprodukt von *VEGFA* (*Vascular endothelial growth factor A*) ist der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor A. Das Protein VEGFA erhöht sowohl die Durchgängigkeit als auch die Angiogenese (Neubildung) von Gefäßen und erleichtert somit die Zellmigration von Immunzellen in entzündetes Gewebe. Aktuelle Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen der Dysregulation von Entzündungsmediatoren und eine Förderung einer inflammatorischen

Umgebung in B[a]P exponiertem Gewebe. Chronische Entzündungsreaktionen und damit einhergehende Veränderungen der Sekretion verschiedener Signalmoleküle wie Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Chemokinen bergen die Gefahr, eine krebsfördernde Mikroumgebung zu generieren, vor allem wenn DNA-schädigende Agenzien wie B[a]P und/oder UV-Strahlung zugegen sind (MALIK *et al.*, 2018).

Die geminderte Expression des für Selenoprotein P1 (Abbildung 20) codierenden Gens *SEPP1* wird ebenfalls mit inflammatorischen Bedingungen in Verbindung gebracht. Nach Koexposition sank die Ausgangstranskriptmenge um den \log_2 -Faktor 2,3. So konnte gezeigt werden, dass nach einer systemischen Inflammation, wie sie beispielsweise bei einer Sepsis vorkommt, eine erhöhte Konzentration von IL-6 in der Leber detektierbar ist. IL-6 scheint Einfluss auf die Expressionsrate von *SEPP1* zu haben (MARTITZ *et al.*, 2015). Auch zeigten Untersuchungen mit CuO NP in A549 Lungenepithelzellen reprimierenden Einfluss auf die Transkriptionsrate von *SEPP1* (HUFNAGEL *et al.*, 2020).

Eine Koinkubation mit künstlichem Sonnenlicht und der Behandlung von 250 nM B[a]P zeigte Einfluss auf die Genexpression des Clusters für apoptotische Faktoren und Zellzyklusregulatoren. Eine Unterbrechung des regulären Zellzyklus steht häufig in Verbindung mit der zellulären Schadensantwort. Die Abfolge der Phasen wird an sogenannten Kontrollpunkten (Checkpoints) überwacht. Die Progression des Zellzyklus kann nur erfolgen, wenn die vorausgehende Zellzyklusphase vollständig und korrekt durchlaufen wurde. Spezielle Zellzyklusproteine wie *Cycline Dependent Kinases* (CDK) aktivieren bzw. deaktivieren Zielproteine und orchestrieren so den Eintritt in die nächste Phase (SCHMITZ UND DESEL, 2018). Das Protein p21, für welches das Gen *CDKN1A* codiert, ist ein CDK-Inhibitor. Die konzentrationsabhängige Induktion um den \log_2 -fachen Wert von bis zu 3,2 suggerierte einen Zellzyklusarrest. Neben der Inhibierung des Zellzyklus wird auch die Beteiligung von p21 in der Apoptose vermutet. *PLK3* (*Polo-like Kinase 3*) zählt ebenfalls zu den inhibierenden Regulatoren des Zellzyklus. Die Expression des *PLK3* Gens wurde leicht, um den 1,2-fachen Wert vermehrt exprimiert (BAHASSI *et al.*, 2002).

Eine ähnliche Tendenz konnte für die Gene *MYC* und *JUN* aufgezeigt werden, welche für gleichnamigen Transkriptionsfaktoren codieren. Bei *MYC* wurde eine um den \log_2 -fachen Faktor 2,0 gesteigerte Expression beobachtet. *JUN* zeigte nach der höchsten Behandlung eine Induktion von 2,4. Sowohl *MYC* als auch *JUN* fungieren als Transkriptionsfaktoren, welche an der zellulären Progression und der Mitogenese beteiligt sind und ebenso potente Auslöser des programmierten Zelltods, der Apoptose, darstellen (AMATI *et al.*, 1993; IP UND DAVIS, 1998).

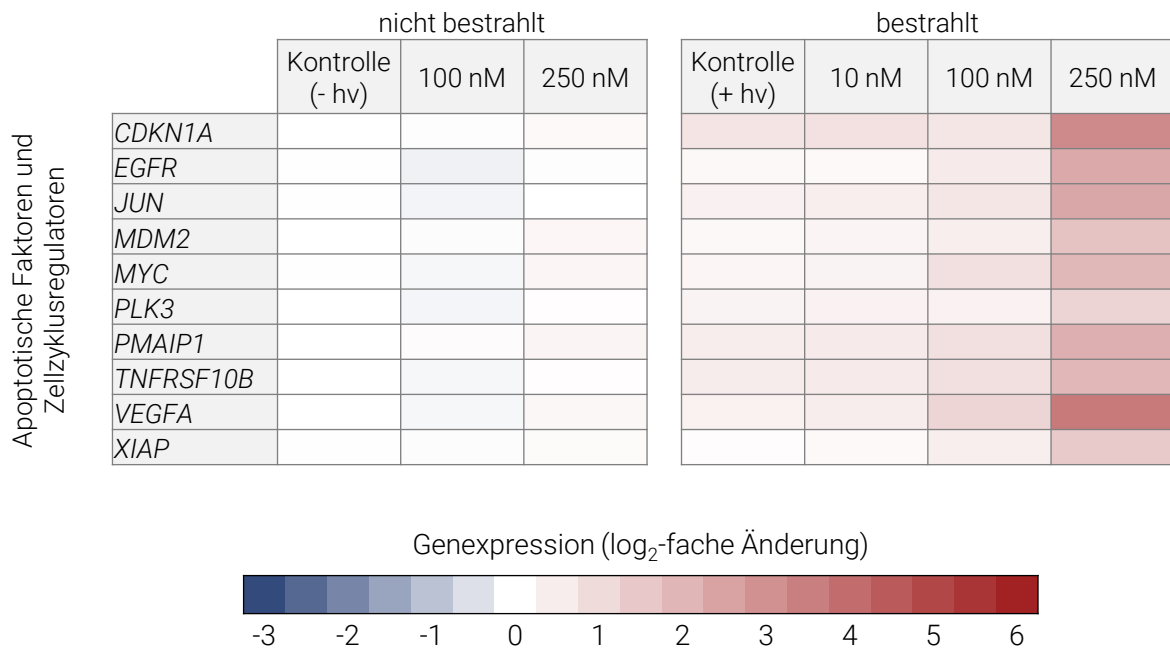


Abbildung 24: Beeinflussung der Genexpression apoptotischer Faktoren und Zellzyklusregulatoren in HaCaT Zellen nach Behandlung mit Benzo[a]pyren und künstlichem Sonnenlicht.

UVA-Anteil von 1,18 J/cm², UVB-Anteil von 60 mJ/cm². 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.

Neben Genen, die Einfluss auf den Zellzyklus haben, wurden auch Gene verstärkt exprimiert, die die eben erwähnte Apoptose initiieren. Die Gene *PMAIP* und *TNFRSF10B* wurden nach Behandlung in höchster Konzentration induziert und betragen im Falle von *PMAIP* den Faktor 2,2 und im Falle von *TNFRSF10B* 2,0. *PMAIP* codiert dabei für das Protein NOXA, welches einen Vertreter der pro-apoptotischen BCL-2 Familie darstellt und bei Überexpression die Cytochrom-C-abhängige Apoptose initiiert (PLONER *et al.*, 2008). *TNFRSF10B* codiert für das Protein KILLER, welches einen Todesrezeptor darstellt und nach Aktivierung durch entsprechende *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) eine Signalkaskade zur Induktion der Apoptose einleitet (WAJANT, 2019).

5.1.2.2 AROMATISCHE MINERALÖLKOHLENWASSERSTOFFE (MOAH)

Nach der Behandlung mit MOAH-Extrakten zeigten ausschließlich Gene des Fremdstoffmetabolismus eine Induktion über dem log₂-Wert 1. Die nicht bestrahlten Proben offenbarten eine konzentrationsabhängige Induktion des Gens *CYP1A1* bei 50 µM (log₂-Wert ca. 1,7) bis 3,1 bei 250 µM, was einer 8,5-fachen Ausgangstranskriptmenge entspricht. Die Bestrahlung führte zusätzlich zu der Behandlung mit MOAH zu einer Induktion von *CYP1A1*. Die basale Ausgangstranskriptmenge war um den log₂-fachen Wert von ca. 0,92 im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle erhöht. Die Expression von *CYP1A1* nahm durch die Behandlung von MOAH weiter zu und resultierte bei 250 µM in einer 3,4-fachen (log₂) Induktion.

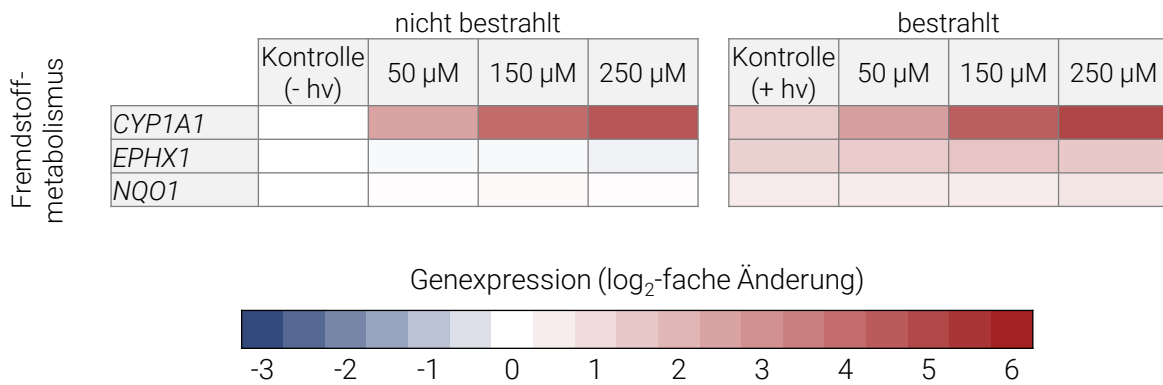


Abbildung 25: Beeinflussung der Genexpression von Genen des Fremdstoffmetabolismus in HaCaT Zellen nach Behandlung mit aromatischen Mineralölfractionen und künstlichem Sonnenlicht.

UVA-Anteil von 1,18 J/cm², UVB-Anteil von 60 mJ/cm². 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.

Die vorliegenden Genexpressionsprofile zeigen eine erhöhte Induktion des Gens *CYP1A1* durch die applizierten MOAH-Fractionen. Dies lässt darauf schließen, dass die analysierten Proben planare, aromatische Kohlenwasserstoffe enthalten, die als Substrate zu einer Aktivierung des AhR dienen. Eine am BfR durchgeführte GCxGC-TOF (*time of flight*) -Analyse (Arbeitsgruppe um Dr. Christoph Hutzler), sowie am CVUA Karlsruhe mittels Isofluoreszenzmessung durchgeführten Untersuchungen der MOAH-Fractionen des Gravex 913 Mineralöls zeigten, dass insbesondere ein- und zweikernige Aromaten mit niedrigem Alkylierungsgrad vorhanden waren. Neben mehrkernigen Aromaten vermögen auch Benzol- (YOON *et al.*, 2002) und Naphthalinderivate (GENTER *et al.*, 2006) an den AhR zu binden, um so die Induktion von *CYP1A1* zu induzieren. Neben den Effekten der Xenobiotika ließen die vorliegenden Untersuchungen darauf schließen, dass auch die Bildung von FICZ nach Bestrahlung mit künstlichem Sonnenlicht Einfluss auf die Genexpression von *CYP1A1* zu haben schien. In den bestrahlten Proben zeigte sich eine Erhöhung der Transkriptmenge von 0,92 (log₂-fach) im Vergleich zur nicht bestrahlten HaCaT Kontrolle, was einer Zunahme des *CYP1A1*-Transkriptes von 89,1 % entspricht. Zwar überschreitet dieser Wert nicht den Schwellenwert einer Verdopplung bzw. Halbierung der Ausgangstranskriptmenge, jedoch zeigten sich reproduzierbare Veränderungen der Genexpressionsmuster.

Zusätzlich zur Aktivierung des CYP450 codierenden Gens zeigten sich bei den bestrahlten Proben auch leichte Erhöhung der Gene *EPHX1* (Epoxidhydrolase 1) und *NQO1*, die dem Phase I / Phase II Metabolismus zugesprochen werden. *EPHX1* hydrolysiert dabei reaktive Epoxide und trägt so zu deren Detoxifizierung bei. Es fand eine nahezu konstante Induktion der Genexpression durch die Bestrahlung statt. Die (+hv)-Kontrolle zeigte eine Zunahme um den log₂-fachen Faktor von 0,86. 50 µM MOAH-Extrakt des Gravex 913 Mineralöls führten zu einer Erhöhung der Ausgangstranskriptmenge um den 0,95-fachen Wert und 150 µM bzw. 250 µM verdoppelten den Gehalt des Gentranskriptes (1,0 und 1,1-fach). Auch das Gen der NAD(P)H-abhängigen Chinon-Oxidoreduktase 1 (*NQO1*) zeigte eine leicht erhöhte Transkriptionsrate. Die enzymatische Aktivität dieses Proteins verhindert Ein-Elektronen-Reduktionen

gebildeter Chinone, wie sie nach UV-Bestrahlung entstehen und die die Bildung von Radikalen initiieren. NQO1 fungiert auf diese Weise durch Entgiftung der hochreaktiven Chinone als Wächter gegen oxidativen Stress. Bezogen auf die nicht bestrahlte Kontrolle war die Transkriptmenge von *NQO1* um den \log_2 -fachen Faktor von 0,38 (+hv-Kontrolle) bis 0,48 (250 μM MOAH) erhöht, was auf eine minimal erhöhte Detoxifizierung von Chinonen schließen lässt.

5.1.2.3 EINZELSUBSTANZEN (MOAH)

Von den in Tabelle 2 aufgeführten Einzelsubstanzen wurden vier alkylierte Benzole ausgewählt, die aufgrund ihrer Struktur mit je einem Aromaten und unterschiedlich verzweigten Alkylketten in kosmetischen Mitteln potentiell anzutreffen sind. Dabei wurde ihr Einfluss auf die Genexpression in Kombination mit Sonnenlichtbestrahlung untersucht (Abbildung 26). Die Substanzen wurden ausgewählt, weil sie als Stellvertreter für unterschiedliche (poly)substituierte MOAH gelten und so von Interesse sind.

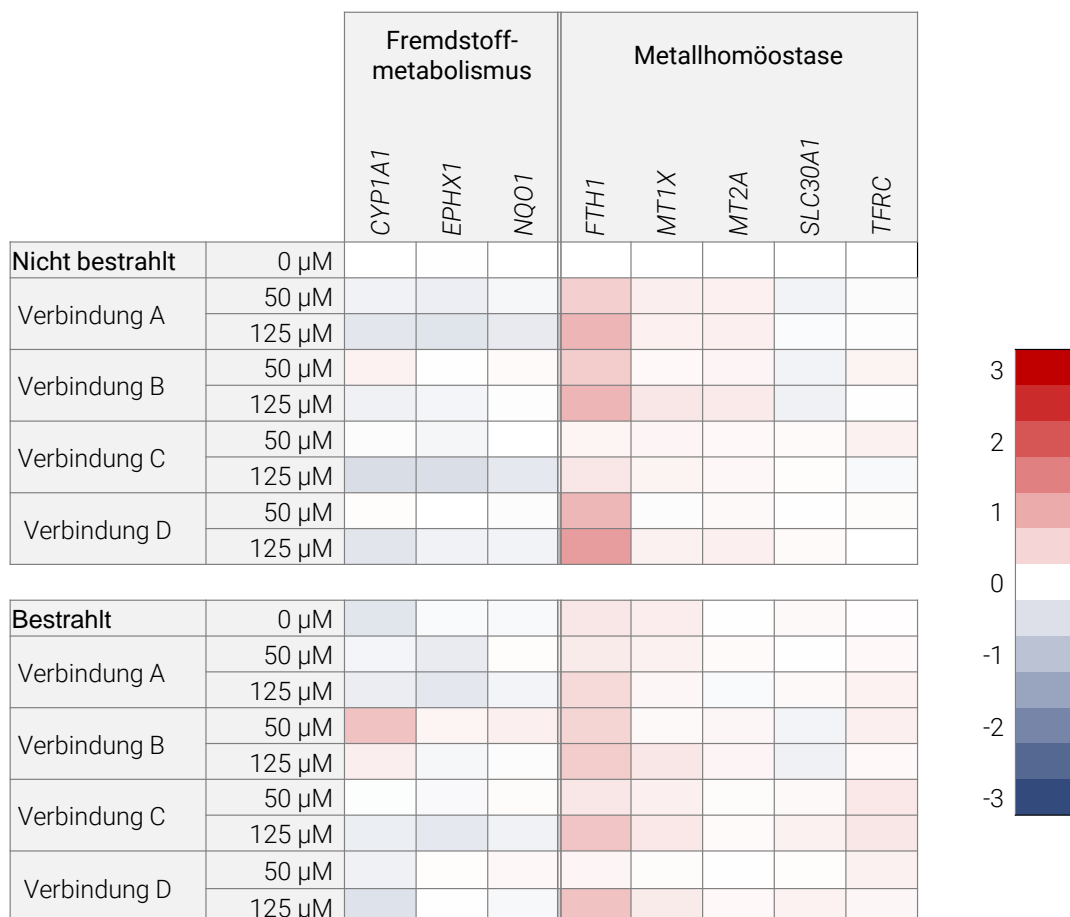


Abbildung 26: Beeinflussung der Expression von Genen des Fremdstoffmetabolismus und der Metallhomöostase in HaCaT Zellen nach Behandlung mit 50 μM und 125 μM Pentylbenzol (Verbindung A), 1,4-Di-n-Butylbenzol (Verbindung B), 1,4-Bis(2-ethylhexyl)benzol (Verbindung C) und 1,4-Bis(3,7-dimethyloctyl)benzol (Verbindung D) und der Bestrahlung mit künstlichem Sonnenlicht.

UVA-Anteil von 1,18 J/cm^2 , UVB-Anteil von 60 mJ/cm^2 . Eine rote Färbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine verminderte Genexpression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen.

Keine der Substanzen zeigte additive Effekte durch die Koinkubation. Auch sonst zeigten die Genexpressionsprofile kaum biologisch relevante Effekte, weshalb es bei der Analyse bei einer Doppeltbestimmung mit technischen Replikaten belassen wurde. Eine Tendenz der Induktion war bei einigen Genen zu erkennen. Einzig das Gen *FTH1* zeigte jedoch nach der 125 µM Behandlung von 1,4-Bis(3,7-dimethyloctyl)benzol eine biologisch relevante Induktion um den \log_2 -Faktor von 1,16.

5.1.2.4 DISKUSSION DER GENEXPRESSIONSERGEBNISSE

Basierend auf den Genexpressionsergebnissen konnten potentielle Antwortmechanismen von Keratinozyten nach Koexposition von nanomolaren B[a]P-Konzentrationen und solaren UV-Strahlen sowie von mikromolaren Konzentrationen an extrahierten MOAH-Fractionen nachvollzogen werden. Im Falle von B[a]P konnte gezeigt werden, dass die akute Toxizität nicht von den bekannten genotoxischen Wirkungen von B[a]P ausging, sondern sich in Form von oxidativen Stress äußerte und erst nach der Bestrahlung mit künstlichem Sonnenlicht messbar war.

Zeitgleich durchgeführte Untersuchungen, die an der Universität Grenoble mit primären Hautzellen durchgeführt wurden, zeigten analoge Resultate. In der von Frau Von Koschembahr durchgeführten Studie wurde die Bildung des DNA-Adduktes 8-Oxoguanin (8-OxoG) quantifiziert. 8-OxoG ist dabei ein hilfreicher Marker, um oxidativen Stress zu identifizieren. Sowohl B[a]P als auch künstliches Sonnenlicht erhöhten die oxidativen DNA-Addukte nicht. Auch die Bestrahlung mit anschließender B[a]P-Inkubation zeigten keinen Effekt auf die Bildung von 8-OxoG. Erst die Bestrahlung mit vorausgegangener B[a]P-Inkubation zeigte eine Zunahme der DNA-Addukte und somit die Entstehung von ROS (KOSCHEMBAHR *et al.*, 2020). Im drastischen Gegensatz zu den Daten, die mit Bestrahlung gewonnen wurden, standen die Ergebnisse aus den nicht bestrahlten Experimenten. Hierbei zeigten sich, bis auf die Induktion von *CYP1A1*, keine biologisch relevanten Änderungen der Genexpression. Die durchgeführten Bestrahlungsuntersuchungen weisen auf ein erhöhtes oxidatives Stressniveau in den Keratinozyten hin, die von inflammatorischen Reaktionen und in hohen Konzentrationen der Expression apoptotischer Markergene begleitet werden.

Für die Behandlung mit via LC-GC gewonnenen aromatischen Mineralölfractionen konnten keine synergistischen Effekte von Sonnenlicht auf MOAH-exponierte Hautzellen gezeigt werden. Vielmehr konnte nachvollzogen werden, wie die alleinige Bestrahlung mit künstlichem Sonnenlicht Gene, wie *CYP1A1*, induzierte und auf die Entstehung endogener AhR-Liganden schließen lässt. Es kam dadurch zu einer additiven Geninduktion, was sich auch auf zellulärer Ebene durch vermehrten (oxidativen) Stress und die potentielle Bildung oxidativer Schäden, wie der von Frau Von Koschembahr gezeigten 8-OxoG-Bildung manifestiert. Eine erhöhte Transkriptionsrate des Phase I Metabolismus Gens *CYP1A1* ist ein Hinweis dafür, dass die gewonnenen MOAH-Extrakte Liganden des AhR beinhalten und diese erfolgreich durch die LC-GC-Aufreinigung extrahiert wurden.

Biologisch relevante Änderungen der Genexpressionsmuster von vier untersuchten Einzelverbindungen, Pentylbenzol, 1,4-Di-n-Butylbenzol, 1,4-Bis(2-ethylhexyl)benzol und 1,4-Bis(3,7-dimethyloctyl)benzol

blieben aus. Einzig das NRF2-Zielgen *FTH1*, welches für die schwere Kette des Multiproteinkomplexes Ferritin codiert und Einfluss auf die Geschwindigkeit und die Beständigkeit der Speicherung von zweiwertigem Eisen besitzt, zeigte eine leicht erhöhte Expression und deutet dabei womöglich auf die Induktion durch 1,4-Bis(3,7-dimethyloctyl)benzol hin, welches in geringem Maße ROS hervorruft.

5.1.3 WESTERN BLOT

Um die erhaltenen Informationen aus den Genexpressionsuntersuchungen auf zellulärer Ebene zu verifizieren, wurden im Anschluss Western Blot-Analysen durchgeführt. Zunächst sollte untersucht werden, ob sich die Erhöhung des Expressionsniveaus von *CYP1A1* auf Proteinebene ebenfalls nachvollziehen lässt. Weiterhin wurde der Gehalt der Matrix Metalloprotease 1 (MMP1) bestimmt, welche als Kollagenase in der Haut vorkommt und einen geeigneten Marker für dermalen oxidativen Stress darstellt. Alle hier gezeigten Western Blot Analysen wurden im in Zusammenarbeit mit Frau M.Sc. Yanfang Xu im Rahmen Ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit durchgeführt.

5.1.3.1 CYP1A1

Der immunologische Nachweis von CYP1A1 erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung auf einer PVDF Membran. In Abbildung 27 sind die Ergebnisse nach Inkubation mit B[a]P und 18-stündiger Nachinkubation ohne B[a]P dargestellt. Auf der linken Seite der Membran sind die bestrahlten Proben zu sehen, auf der rechten Seite befinden sich die nicht bestrahlten Proben. Um eine quantitative Aussage über die detektierten Proteinmengen geben zu können, wurde die Ladekontrolle ERK2 (*Extracellular Signal-Regulated Kinase 2*) mit einem Molekulargewicht von 42 kDa eingesetzt. Detailinformationen zu den Antikörpern befinden sich im Anhang 8.1.4.

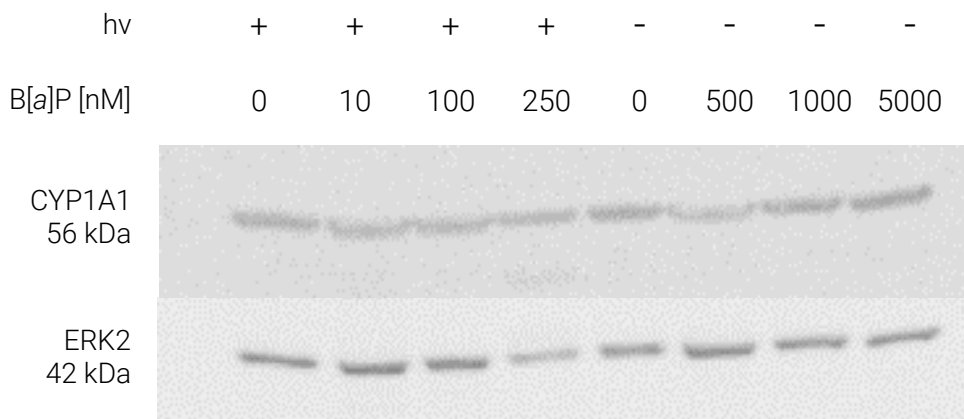


Abbildung 27: Nachweis von Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1) in HaCaT Zellen.

Die Zellen wurden für 3 h mit Benzo[a]pyren (B[a]P) inkubiert und für 3,5 min in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) mit künstlichem Sonnenlicht bestrahlt (+ hv). Die Inkubation der nicht bestrahlten Proben wurden ebenfalls für 3,5 min unterbrochen und die Zellen für die Dauer der Bestrahlung in PBS im Dunkeln gelagert (- hv). Anschließend wurden +/- hv-Proben nochmals für 3 h mit B[a]P inkubiert. Die dargestellten Banden sind repräsentative Aufnahmen einer Dreifachbestimmung.

Die Quantifizierung erfolgte mittels der Software Aida Image Analyzer v.3.27. Hierbei wurde die jeweiligen Flächen von Zielprotein und Ladekontrolle unter den Signalkurven ermittelt und anschließend die Verhältnisse zur nicht bestrahlten Kontrolle errechnet.

Für CYP1A1 zeigte sich dabei kein Unterschied der Bandenintensitäten nach B[a]P-Behandlung. Das Verhältnis der Proteinexpression von CYP1A1/ERK2 zeigte ein konstantes Niveau (siehe Abbildung 27). Ein synergistischer Effekt der Proteinexpression von CYP1A1 nach solarer UV-Strahlung und der Behandlung mit B[a]P, wie er auf Genexpressionsebene erkennbar war, konnte nicht gezeigt werden.

Da die Induktion von CYP1A1 selbst nach Behandlung mit B[a]P, einem hochaffinen Liganden des AhR, ausblieb, wurde auf weitere Etablierungsversuche mit den schwer zu generierenden MOAH-Fractionen verzichtet.

5.1.3.2 MMP1

Die Metalloproteasen (MMP) gehören zu den wichtigsten Enzymen für den Abbau von dermale Kollagen. ROS induzieren über verschiedene Wege die unter physiologischen Bedingungen strikt regulierte Kollagenase MMP1 und leiten so indirekt den Abbau von dermalen Kollagenfibrillen ein. Zum einen unterliegt die transkriptionelle Regulation von *MMP1* redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren, die ähnlich zu KEAP1 (siehe Abschnitt 5.1.2.1) über leicht oxidierbare Cysteinseitenketten in ihren aktiven Zentren verfügen. Zu nennen sind hierbei Signalwege der ERK (extrazellulär regulierte Kinasen) und JNK (c-Jun N-terminale Kinasen) -Kaskaden. Zum anderen kommt es ebenfalls zu einer posttranslationalen Aktivierung von MMP1 durch die Oxidation inhibitorischer Thiolgruppen an Präkursoren von MMP (KAR *et al.*, 2010). Der oben beschriebene Abbau strukturgebender Kollagenfibrillen ist auch unter dem Begriff *Photoaging*, dem UV-induzierten Verlust der Strukturintegrität der Haut, bekannt. Die Korrelationen zwischen oxidativem Stress und der MMP1-Expression machen MMP1 zu einem wichtigen dermalen Stressmarker (DONG *et al.*, 2008). Um die Erkenntnisse der Genexpressionsanalysen zu verifizieren und die Entstehung von ROS nach Kombinationsbehandlung von B[a]P/MOAH und künstlichem Sonnenlicht auf Proteinebene nachzuvollziehen, wurde MMP1 als Markerprotein für oxidativen Stress nachgewiesen.

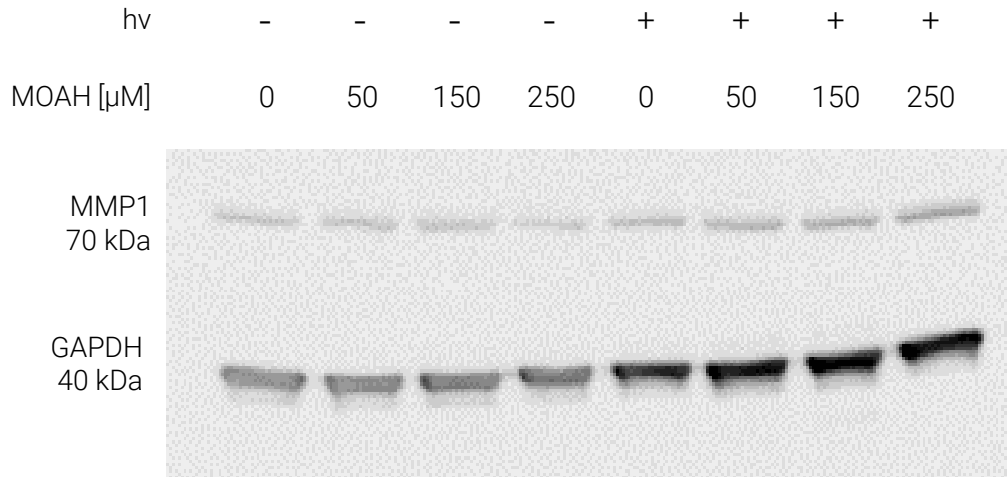


Abbildung 28: Nachweis von Matrix Metalloprotease 1 (MMP1) in HaCaT Zellen.

Die Zellen wurden für 3 h mit MOAH-Fraktionen (Gravex 913) bzw. B[a]P inkubiert und für 3,5 min in phosphatgepufferter Salzlösung mit künstlichem Sonnenlicht bestrahlt (+ hv). Die Inkubation der nicht bestrahlten Proben wurden ebenfalls für 3,5 min unterbrochen und die Zellen für die Dauer der Bestrahlung in PBS im Dunkeln gelagert (- hv). Anschließend wurden +/- hv-Proben erneut für 3 h mit B[a]P inkubiert. Die Zellen wurden nach einer 18-stündigen Nachinkubation geerntet und für Western Blot-Analysen aufgearbeitet. Die dargestellten Banden sind repräsentative Aufnahmen einer Dreifachbestimmung.

Für eine semiquantitative Auswertung der Proteinexpression wurde GAPDH als Ladekontrolle eingesetzt, welche als Bezugsgröße diente. Der Nachweis der Ladekontrolle erfolgte mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper. Sowohl Ladekontrolle als auch der Sekundärantikörper für GAPDH wurden über Nacht inkubiert. Detailinformationen zu den Antikörpern befinden sich im Anhang 8.1.4.

Es ist vorweg zu nehmen, dass aufgrund der im Jahr 2020 vorherrschenden SARS-CoV2 Pandemie und den damit einhergehenden Laborschließungen Experimente zu den Proteinexpressionsniveaus von MMP1 nicht in Triplikaten durchgeführt werden konnten.

Die einmalige Inkubation von humanen Keratinozyten mit B[a]P (nicht gezeigt) als auch mit MOAH-Fraktionen (Gravex 913) (siehe Abbildung 28) ließ eine leichte Induktion von MMP1 nach Bestrahlung erkennen. Die UV-Behandlung zeigte bereits in der unbehandelten Kontrolle einen tendenziell erhöhte MMP1-Expression. Das Expressionsniveau nahm auch mit steigenden MOAH-Konzentrationen nicht zu. Eine erhöhte ROS-Induktion und eine gesteigerte Aktivierung von MMP1 war somit durch die Koinkubation nicht feststellbar.

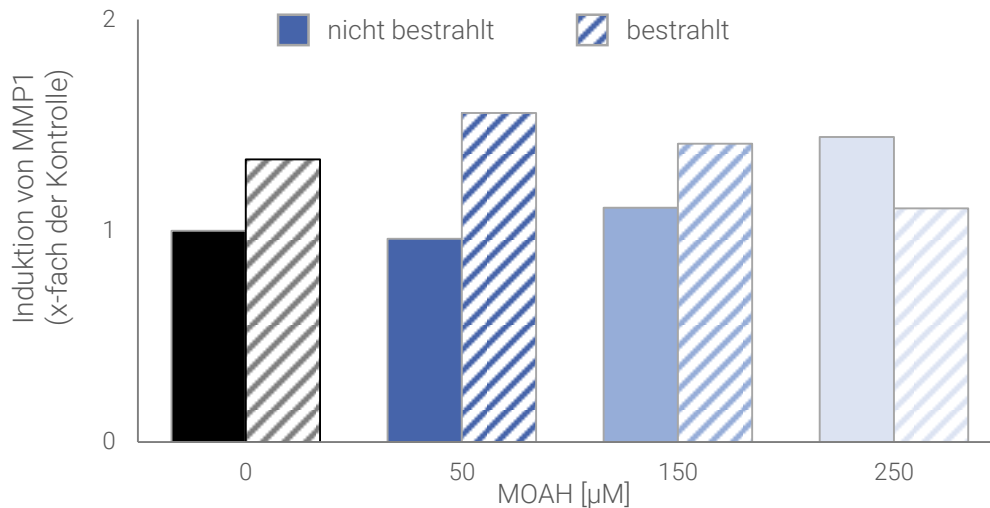


Abbildung 29: Induktion der Metalloprotease 1 (MMP1) nach Inkubation mit aromatischen Mineralölkohlenwasserstoffen (MOAH).

HaCaT Zellen wurden für 3 h in der MOAH-haltigen Inkubationslösungen vorbehandelt, wahlweise für 3,5 min in PBS bestrahlt und erneut für 3 h mit MOAH inkubiert. Die schraffierten Balken stellen die Kombinationsbehandlung von B[a]P und der Bestrahlung, mit einem UVA-Anteil von $1,18 \text{ J/cm}^2$ und einem UVB-Anteil von 60 mJ/cm^2 , dar.

5.1.3.3 DISKUSSION DER WESTERN BLOT-ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der Western Blot-Analysen von CYP1A1 zeigten nicht die erwartete Induktion von CYP450 1A1, wie sie auf Genexpressionsebene beobachtet wurde. In der Literatur finden sich unterschiedliche Erklärungen hierfür. Proteomdatenbanken, wie *The Human Protein Atlas* (proteinatlas.org) führen allgemein niedrige Proteinexpressionsniveaus für fremdstoffmetabolisierende Proteine in humaner Haut auf (UHLEN *et al.*, 2015). Ergänzend dazu zeigen vergleichende Studien, dass das *in-vitro*-Expressionsniveau in 2D-Zellkultur, explizit in HaCaT Zellen, unter dem Niveau von 3D-Zellkulturmodellen und nativen Keratinozyten liegt (WIEGAND *et al.*, 2014). Der Nachweis von Proteinen der CYP-Familie und anderen FME (fremdstoffmetabolisierende Enzyme) ist häufig schwer zu führen, da sich die Proteinniveaus nahe der Nachweisgrenze befinden und Einflüsse wie Alter, Geschlecht, Lebensgewohnheiten (Rauchen) sowie interindividuelle Enzymausstattungen eine Rolle spielen. Der PCR-Nachweis auf mRNA-Ebene hingegen gelingt im Vergleich zum Proteinnachweis deutlich häufiger (OESCH *et al.*, 2018).

Neben dem allgemein niedrigen Expressionsniveau von CYP1A1 in humanen Keratinozyten gibt es auch Hinweise auf eine zeitliche Diskrepanz der exprimierten Proteinmenge. So zeigte eine Arbeitsgruppe der *Medical University of South Carolina* bei Untersuchungen mit Mikrosomenextrakten aus HepG2 Leberzellen, dass die transkriptionell vorliegenden mRNA-Gehalte von 6 h bis 48 h konstant blieben. Die Proteinmenge von CYP1A1 in HepG2 Zellen zeigte hingegen bereits nach 24 h einen Abbau auf ein kaum quantifizierbares Niveau. Nach 48 h war die Proteinmenge von CYP1A1 nicht mehr detektierbar (WEN *et al.*, 2005). Es wird vermutet, dass die Proteinexpression von CYP1A1 ihr Maximum im Zeitraum von $\leq 24 \text{ h}$

besitzt. Der entsprechende Nachweis von CYP1A1 auf Proteinebene konnte jedoch aufgrund des allgemein niedrigen Expressionsniveaus der kultivierten Monokultur von HaCaT Zellen auch nach häufigen Wiederholungsversuchen nicht erbracht werden.

Der Nachweis der Proteinlevels von MMP1 war bei den durchgeführten Experimenten erst nach 48-stündiger Inkubation des spezifischen Antikörpers erfolgreich. Auch nach 48 h waren die Proteinbanden nur schwach sichtbar. Bereits die bestrahlte DMSO-Vehikelkontrolle zeigte eine leichte Induktion von MMP1 um den Faktor 1,3. Die applizierten MOAH-Extrakte zeigten keine Veränderungen des Stressmarkers auf Proteinebene. Eine Kombinationsbehandlung mit MOAH und künstlichem Sonnenlicht erhöhte die zellulären Gehalte an MMP1 maximal auf den Wert 1,6 und führten zu keiner erhöhten Proteinexpression. Da die Ergebnisse aus oben genannten Ergebnissen nicht wiederholt werden konnten, lassen sich keine fundierten Schlüsse daraus ziehen, ob eine Behandlung mit MOAH-Fractionen und temporärer Bestrahlung mit künstlichem Sonnenlicht zu einem erhöhten oxidativen Stressniveau in Keratinozyten führt.

Sowohl für Liganden des AhR, beispielsweise aus Zigarettenrauch (ONO *et al.*, 2013), als auch für UVB-Strahlung (LAHMANN *et al.*, 2001) ist bekannt, dass sie die MMP1 induzieren. Die durchgeführten Versuche des MMP1-Nachweises sollten daher in künftigen Untersuchungen reproduziert werden, um die oben dargestellten Ergebnisse zu verifizieren und beispielsweise mit angepassten Inkubationszeiten und/oder angepasster Bestrahlungsdauer erweitert werden.

5.1.4 NACHWEIS REAKTIVER SAUERSTOFFSPEZIES

Mit Hilfe des 2,7-Dichlorofluorescein-Diacetat (DCF-DA) Assays kann die intrazelluläre Bildung von ROS nachgewiesen werden. Als Substrat wird DCF-DA eingesetzt, welches über erleichterte Diffusion in die Zelle aufgenommen wird. Intrazelluläre Esterasen spalten die Acetatgruppen ab. Das geladene Molekül wird so an einem Wiederaustritt in den Extrazellulärraum gehindert. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der durch ROS-induzierten Oxidation des nicht fluoreszierenden Präkursormoleküls Dichlorofluorescein (DCFH), dessen Endprodukt 2,7-Dichlorofluorescein (DCF) mittels Fluoreszenzsignal detektierbar und proportional zur Menge an zellulärem ROS ist.

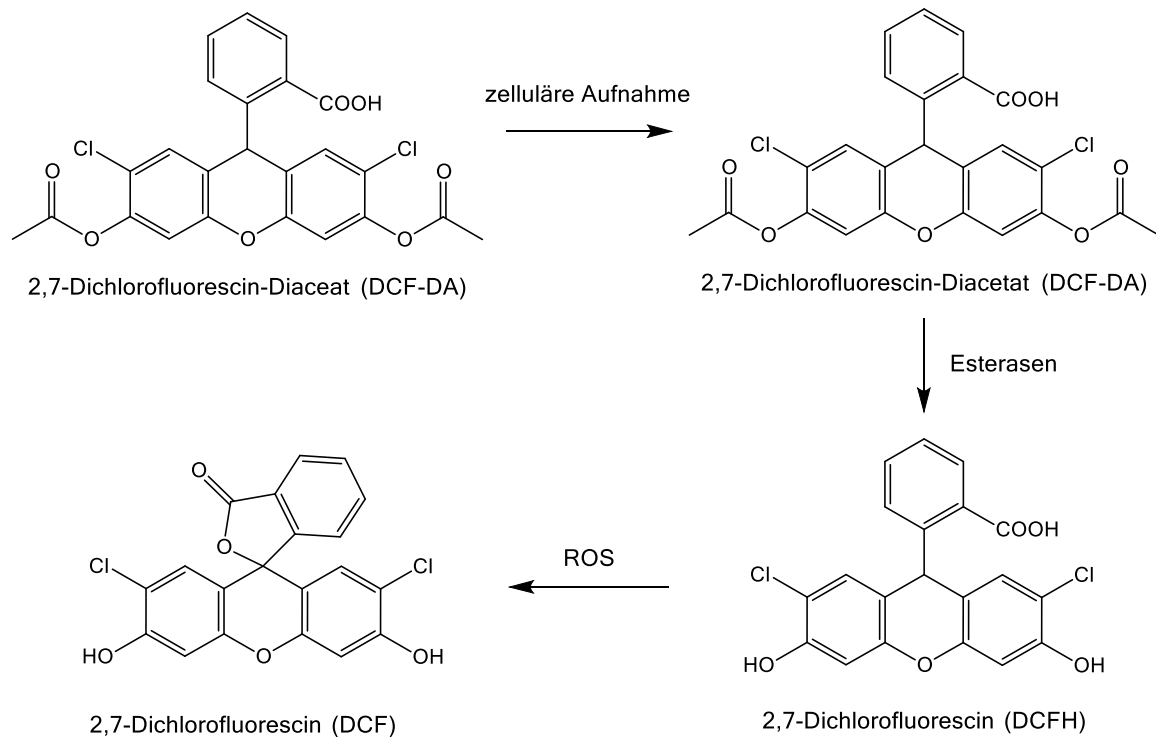


Abbildung 30: Funktionsprinzip des 2,7-Dichlorfluorescein-Diacetat Assays.

Nicht fluoreszierendes 2,7-Dichlorfluorescein-Diacetat (DCF-DA) durchdringt die Zellmembran. Zelluläre Esterasen spalten die Acetatgruppen ab und verhindern so den Wiederaustritt des Dichlorfluorescein (DCFH). Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oxidieren DCFH und abstrahieren das H-Atom an Stelle 9'. Durch diese Strukturänderung wird DCFH in seine fluoreszierende Form Dichlorfluorescein (DCF) überführt.

Sowohl die Genexpressionsanalysen als auch die Proteinexpressionsniveaus führten zu der Annahme, dass reaktive Sauerstoffspezies den Hauptteil der zytotoxischen Wirkung der Koinkubation mit solarer UV-Strahlung und der Behandlung von Mineralölkohlenwasserstoffen ausmachten. Wie unter 5.1.2.1 gezeigt, wurde eine Vielzahl an Genen, wie *GCLC*, *NQO1*, *TXN* und *TXNRD* induziert, deren Genprodukte ROS detoxifizieren und die antioxidative Kapazität der Zelle erhöhen. Um den Einfluss von UV-Strahlung sowie deren additiven Wirkung auf die ROS-Gehalte der Zellen zu überprüfen, wurden folgende Untersuchungen auf zellulärer Ebene durchgeführt.

Zum Nachweis von ROS wurde der fluorimetrische DCF-DA Assay an einem Multiplattenlesegerät etabliert. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass UV-Strahlen Einfluss auf die Stabilität des DCF-DA-Moleküls haben (CASTRO-ALFÉREZ *et al.*, 2016). Wie in Abbildung 31 erkennbar, wurden Absorptionsspektren nach unterschiedlichen Bestrahlungsdauern aufgenommen. Dabei war ersichtlich, dass nach 3,5 min bereits 24 % des Fluorophors degradiert wurden. Castro-Alférez und seine Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass es zu einer photolytischen Aktivierung des Farbstoffes kommt und Photoprodukte, wie DCF-Semichinon-Radikale, entstehen, welche ebenfalls zur Bildung von ROS beitragen können. Aufgrund der photolytischen Aktivierung von DCF-DA wurden die bestrahlten Versuche auf die bestrahlten Kontrollen bezogen. Die Positivkontrolle stellte das Oxidationsmittel tert-Butylhydroperoxid

(tBHP) dar, welches als wässrige Lösung eine Stunde vor Abbruch des Experimentes in einer Konzentration von 250 μM zugesetzt wurde.

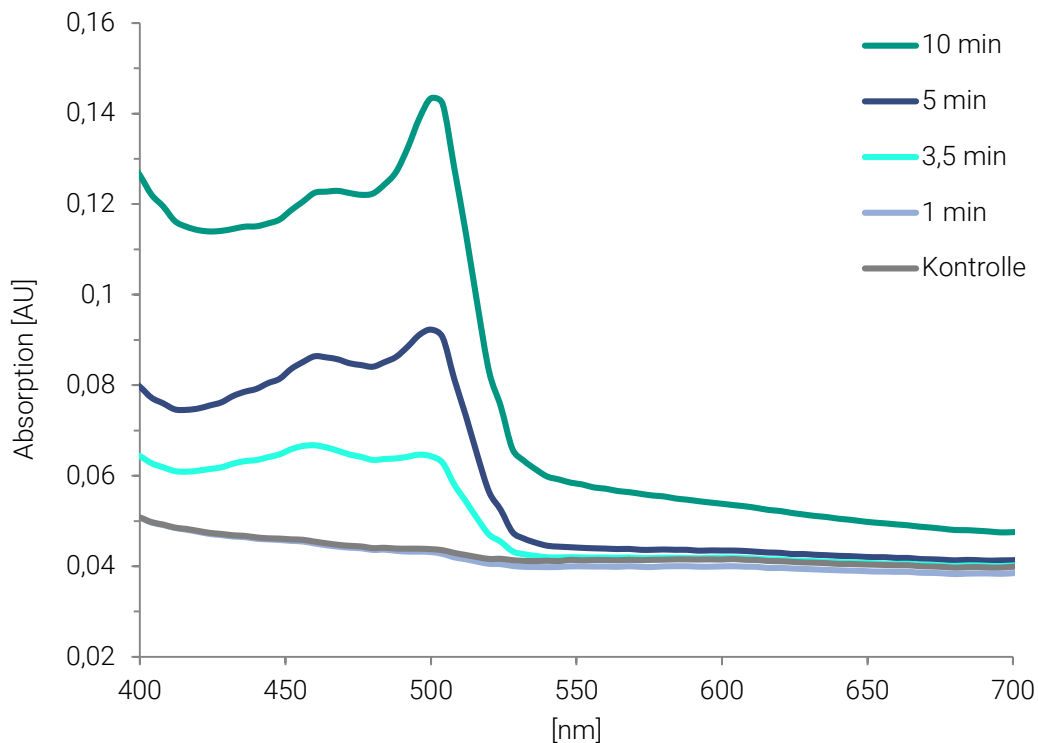


Abbildung 31: Absorptionsspektren von 2,7-Dichlorofluorescein-Diacetat (DCF-DA) nach Bestrahlung mit artifiziellem Sonnenlicht.

Die Absorptionsspektren einer 100 μM DCF-DA Lösung in *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) nach Bestrahlung mit künstlichem Sonnenlicht (1,18 J/cm^2 UVA-Anteil, UVB-Anteil 60 mJ/cm^2) zeigen eine Photodegradation von DCF-DA. Die Bestrahlung führt zur Abnahme der Stabilität des Fluorophors nach einer Bestrahlungsdauer von ≥ 1 min. Das gebildete DCF weist ein Absorptionsmaximum bei 500 nm auf.

Die Ergebnisse aus den B[a]P-Behandlungen sind in Abbildung 32 dargestellt. Deutlich zu erkennen war, dass die nicht bestrahlten Proben im Konzentrationsbereich von 250 nM bis 5000 nM keine Steigerung des intrazellulären ROS-Gehaltes aufwiesen. Für die bestrahlten B[a]P-Proben in den Konzentrationen von 10 nM bis 500 nM war, unter Berücksichtigung der Standardabweichungen, nur eine Tendenz zur Erhöhung des zellulären ROS-Gehaltes erkennbar.

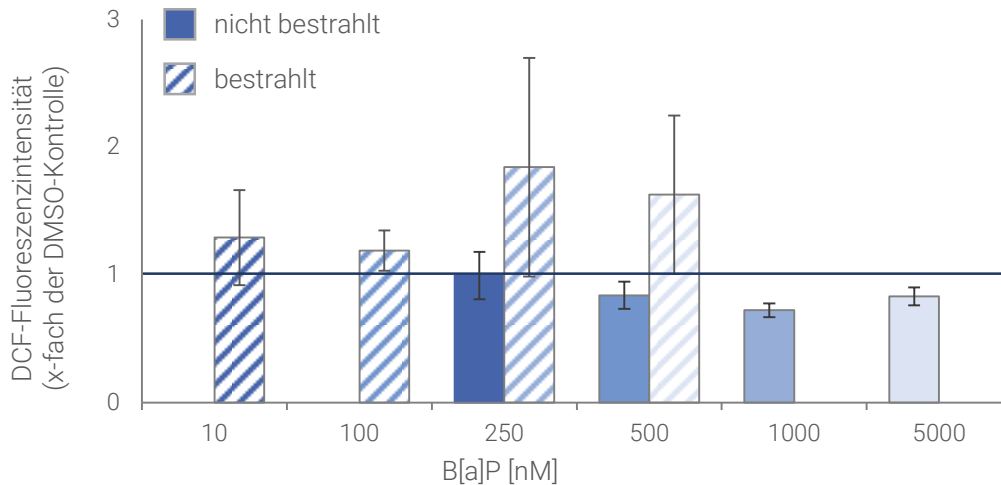


Abbildung 32: Relative DCF-Fluoreszenz nach Behandlung mit Benzo[a]pyren B[a]P in Kombination mit der Bestrahlung künstlicher solarer UV-Strahlung.

HaCaT wurden mit $100 \mu\text{M}$ DCF-DA in *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) für 1 h vorinkubiert. Die Proben wurden anschließend einer Koinkubation gegenüber Benzo[a]pyren B[a]P und UV-Bestrahlung ($1,18 \text{ J/cm}^2$ UVA-Anteil, UVB-Anteil 60 mJ/cm^2) exponiert. Die Ergebnisse wurden auf die entsprechende bestrahlte/nicht bestrahlte Vehikelkontrolle (horizontale Linie) bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen.

Die MOAH-behandelten Keratinozyten wiesen ein ähnliches Muster der DCF-Aktivierung auf. Die hier beschriebenen Ergebnisse sind der Abbildung 33 zu entnehmen. Auch hier zeigte sich eine leicht signifikante Erhöhung der gebildeten ROS nach Sonnenlichtexposition und der Behandlung mit $150 \mu\text{M}$ MOAH-Extrakt. Wie unter Abbildung 14 erkennbar, wirkte sich die Behandlung mit MOAH und anschließender Bestrahlung durch künstliches Sonnenlicht nicht negativ auf die Zytotoxizität der HaCaT Zellen aus. Aus diesem Grund konnten bei den Experimenten mit MOAH sowohl nicht bestrahlte als auch bestrahlte Proben mit denselben Konzentrationen an MOAH inkubiert werden.

Die Differenz der Intensitäten zwischen der Koexposition von B[a]P und MOAH und der UV-behandelten Kontrolle deutet drauf hin, dass durch die Koexposition mehr intrazelluläre ROS entstehen. Die Werte schwankten allerdings in einem nicht unerheblichen Maße. Auf eine sorgfältige Versuchsdurchführung in Möglichkeit unter Abwesenheit von Streulicht, z.B. in Fensternähe, ist daher zu achten.

Die Bildung von ROS nach solarer UV-Behandlung konnte mithilfe des DCF-DA Assays, neben dem indirekten Nachweis über Genexpressionsuntersuchungen und den Tendenzen der Markerproteinbestimmungen, auch direkt gezeigt werden. Der störende Hintergrund der photolytischen Aktivierung des Fluoreszenzfarbstoffes wurde unter Einbeziehung der UV-exponierten Kontrollen umgangen.

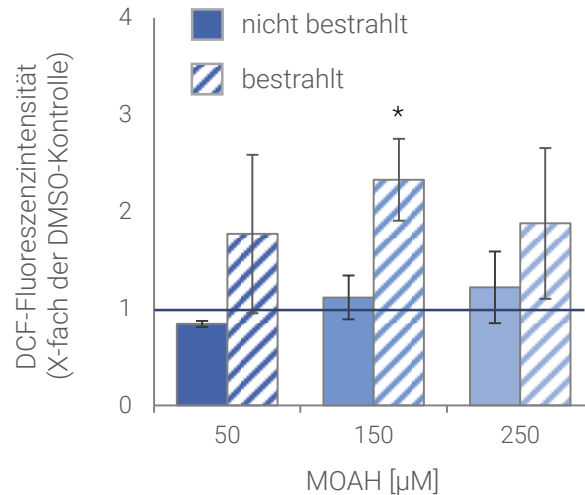


Abbildung 33: Relative DCF-Fluoreszenz bezogen auf die entsprechende Vehikelkontrollen.

Relative DCF-Fluoreszenz bezogen auf die entsprechende bestrahlte/nicht bestrahlte Kontrolle (horizontale Linie). HaCaT Zellen wurden mit einer 100 μM DCF-DA Lösung in *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) für 1 h vorinkubiert. Die Proben wurden anschließend einer Koinkubation gegenüber aromatischen Mineralölkohlenwasserstoffen (MOAH) und solarer UV-Bestrahlung (1,18 J/cm^2 UVA-Anteil) unterzogen. Als Positivkontrolle wurde 250 μM tert-Butylhydroperoxid (tBHP) eingesetzt. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett's T Post-Hoc-Test: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

Abschließend gilt zu sagen, dass exogene Eingriffe in den Oxidationszustand der Zelle immer die Gefahr bergen, oxidative Schäden, beispielweise an der DNA, zu verursachen. Trotz komplexer Kompensationsmechanismen kann es so zu einem Verlust der genomischen Stabilität und einer damit einhergehenden erhöhten Mutationsrate kommen. Gerade Mischexpositionen von verschiedenen Agenzien, genauso wie die zusätzliche Belastung der menschlichen Haut durch solare UV-Strahlung, spielen dabei eine wichtige Rolle und liegen weiter im Fokus der toxikologischen Risikobewertung. Weitere experimentelle Untersuchungen des Gefährdungspotentials sollen daher an diese Arbeit anschließen.

5.2 KUPFERVERBINDUNGEN

Im zweiten Teil dieser Dissertation werden mögliche adverse Effekte löslicher und partikulärer Cu- und Cr-Verbindungen hinsichtlich ihrer Zytotoxizität, der Beeinflussung von Genexpressionsmustern, der zellulären Aufnahme und der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies untersucht. Im Falle von Chrom wird neben den genannten Analysen zusätzlich die Einflussnahme auf das Epigenom betrachtet. Vor der zellulären Applikation der partikulären Metallverbindungen wurden diese mithilfe verschiedener physikalisch-chemischer Methoden charakterisiert.

5.2.1 PARTIKELCHARAKTERISIERUNG

Die Charakterisierung der CuO NP wurde weitestgehend in einer vorausgegangenen Arbeit von Frau Dr. Annetta Semisch durchgeführt. Die charakteristischen Parameter können dem Anhang 8.3 entnommen werden.

5.2.1.1 HYDRODYNAMISCHE GRÖßENVERTEILUNG

Für die Charakterisierung der CuO NP Suspensionen wurden Untersuchungen mittels DLS durchgeführt. Die Partikelsuspensionen wurden dabei mit monochromatischem Laserlicht bestrahlt. Partikel im Mikro- und Nanometerbereich werden in Lösung aufgrund der Brown'schen Molekularbewegungen durch die Bewegung der Flüssigkeitsmoleküle umhergestoßen. An diesen bewegten Partikeln wird das Licht gestreut, wodurch es zu Fluktuationen der Streuintensität kommt. Die Häufigkeit der Fluktuationen geben wiederum Aufschluss auf die hydrodynamischen Radien der gemessenen Partikelsuspension. Neben der Partikelgröße ist die Bewegungsgeschwindigkeit von der Viskosität, der Dichte und der Temperatur des Suspensionsmittels abhängig. Für runde Partikel einer monodispersen Lösung kann über die Stokes-Einstein-Beziehung auf den hydrodynamischen Radius der Partikel geschlossen werden (LAUTH UND KOWALCZYK, 2016).

Für das verwendete DMEM-HG, welches aufgrund seines höheren Glucoseanteils Abweichungen in seiner Viskosität aufweist, wurden entsprechende Messungen durchgeführt und die Berechnungsparameter angepasst. Für DMEM ohne erhöhten Zuckergehalt konnte auf bereits etablierte Daten zurückgegriffen werden. Die Bestimmung der Viskosität wurden unter Anleitung von Herrn M.Sc. Benjamin Bindereif am Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik durchgeführt. Bei dem verwendeten Rheometer handelte es sich um ein Physica MCR 301 (Anton Paar, Graz, Österreich). Die Datenanalyse erfolgte mithilfe der Software RHEOPLUS Multi 3 V3.40. Die Dichte von DMEM-HG wurde mittels einer pyknometrischen Methode ermittelt. Alle weiteren Parameter wurden der Betriebsvorschrift zur DLS-Messung von Frau Dr. Annetta Semisch entnommen.

Tabelle 13: Parameter zur Messung der dynamischen Lichtstreuung.

Dichte und Viskosität von DMEM und DMEM-HG mit und ohne FKS

	DMEM ohne FKS	DMEM mit FKS	DMEM-HG ohne FKS	DMEM-HG mit FKS
Dichte [g/cm ³]	1,00	1,01	1,00	1,01
Viskosität [mPas]	1,02	1,10	1,01	1,16

Mithilfe der ermittelten Parameter konnte der hydrodynamische Radius berechnet werden. Eine Stammsuspension von 1 mg/mL in bidest. Wasser wurde für 10 min sonifiziert und anschließend auf die Endkonzentrationen von 10 µg/mL, 20 µg/mL und 50 µg/mL mit DMEM-HG verdünnt. Die Messungen erfolgten bei 20 °C mittels Malvern Zetasizer NanoZS. Für die Datenanalyse kam die implementierte

Software DTS (Version 6.20) zum Einsatz. Die Ergebnisse der DLS-Messungen sind Tabelle 14 zu entnehmen.

Tabelle 14: Hydrodynamischer Radius von CuO NP in Wasser, DMEM (10 % FKS) und DMEM-HG (10 % FKS)
Gezeigt sind Mittelwerte der Größenverteilung (Z-Average) und deren Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen.

CuO NP [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	Wasser [nm]	DMEM 10 % FKS [nm]	DMEM-HG 10 % FKS [nm]
10	$243 \pm 2,8$	$163 \pm 6,5$	$180 \pm 1,7$
20	$251 \pm 4,1$	$184 \pm 2,5$	$193 \pm 5,6$
50	294 ± 74	$193 \pm 6,5$	$202 \pm 5,6$

In DMEM waren die hydrodynamischen Radien um ca. 5 % kleiner als in DMEM-HG. Die Homogenität der Partikelsuspensionen wurde anhand des Polydispersitätsindex (PDI) beurteilt. Der PDI, oder auch die Dispersität, ist eine dimensionslose Zahl zwischen 0 und 1, wobei 0 eine monodisperse Lösung beschreibt, in der alle Partikel den gleichen Radius besitzen und 1 eine polydisperse Partikelsuspension, in der alle Partikel verschieden groß sind (Malvern Instruments Ltd., 2013)

Tabelle 15: Polydispersitätsindex (PDI) von CuO NP in Wasser, DMEM (10% FKS) und DMEM-HG (10 % FKS)
Gezeigt sind Mittelwerte und deren Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen.

CuO NP [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	PDI Wasser	PDI DMEM 10 % FKS	PDI DMEM-HG 10 % FKS
10	$0,487 \pm 0,01$	$0,293 \pm 0,28$	$0,296 \pm 0,01$
20	$0,396 \pm 0,03$	$0,239 \pm 0,01$	$0,249 \pm 0,06$
50	$0,320 \pm 0,10$	$0,204 \pm 0,01$	$0,228 \pm 0,10$

Wie in Tabelle 14 aufgeführt, stieg die Homogenität der Suspensionen mit höher werdender Partikelkonzentration in den getesteten Medien. Verglichen zu den Wassersuspensionen wiesen DMEM und DMEM-HG eine niedrigere Dispersität auf (Tabelle 15).

5.2.2 ZYTOTOXIZITÄT DER KUPFERVERBINDUNGEN

Die Toxizität der getesteten Kupferverbindungen wurde mithilfe des unter Abschnitt 4.3 eingeführten ATP-Assays bestimmt. Nachfolgend sind die zytotoxischen Wirkungen von CuO NP und löslichem CuCl_2 aufgeführt. Die ATP-Gehalte wurden dabei auf die unbehandelte Kontrolle bezogen.

5.2.2.1 KERATINOZYTEN

Die HaCaT Zellen wurden mit $5 \mu\text{g}/\text{mL}$, $10 \mu\text{g}/\text{mL}$, $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ und $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ sowie den äquimolaren CuCl_2 -Konzentrationen von $63 \mu\text{M}$, $126 \mu\text{M}$, $252 \mu\text{M}$ und $630 \mu\text{M}$ für 24 h inkubiert. Dabei zeigten die

Keratinocyten eine erhöhte Sensitivität gegenüber der löslichen Kupferverbindung. Die Behandlung mit 126 μM führte zu einer Abnahme des ATP-Gehaltes um 13 %, wohingegen die Viabilität nach äquimolarer Behandlung mit 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ keine messbaren Änderungen des ATP-Gehaltes feststellen ließen. Nach der Inkubation mit 252 μM bzw. 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zeigten sich Unterschiede in den toxikologischen Eigenschaften der beiden Kupferverbindungen und führten zu einer Reduktion des ATP-Gehaltes auf 67,6 % respektive 95,0 %. Die Behandlung mit den höchsten Kupferkonzentrationen zeigte stark zytotoxische Wirkungen sowohl bei der löslichen als auch bei der partikulären Kupferverbindung. Eine Abnahme der Zellviabilitäten auf 32,4 % (CuCl_2 : 630 μM) bzw. 43,0 % (CuO : 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) waren die Folge.

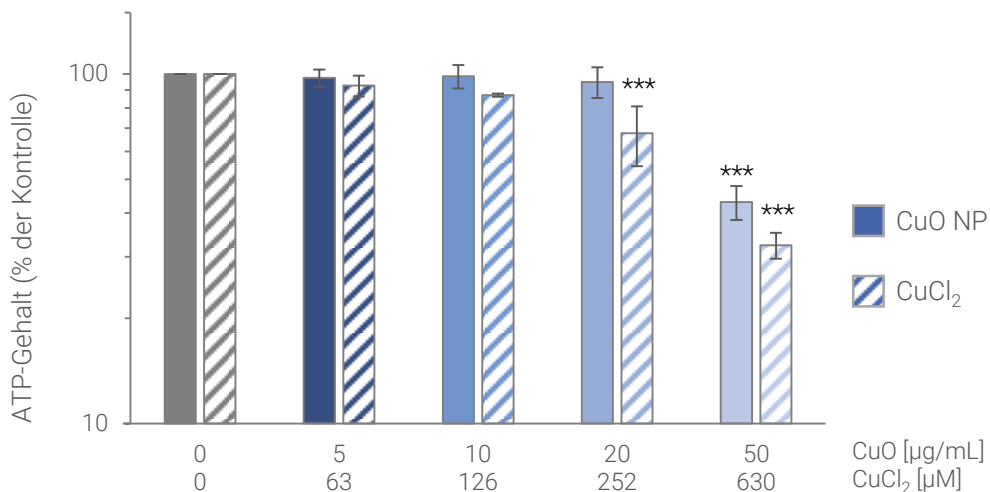


Abbildung 34: ATP-Gehalte von HaCaT Zellen nach Inkubation mit Kupfer(II)oxid und Kupfer(II)chlorid.

Die Keratinocyten wurden für 24 h mit CuO und CuCl_2 inkubiert. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von drei Bestimmungen aus drei unabhängigen Versuchen. Die Ergebnisse sind in Prozent der unbehandelten Kontrollen dargestellt. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett's T Post-Hoc-Test: *** $p \leq 0,001$. 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CuO entsprechen 630 μM Cu^{2+} im Falle kompletter Kupferfreisetzung.

Die Endothelzelllinie reagierte sensibler gegenüber partikulären Metallverbindungen als die robusten Keratinocyten (siehe Abbildung 35). Die Inkubationen erfolgten daher in einem angepassten Konzentrationsbereich von 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0,63 μM) bis 2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (25,2 μM) für die CuO NP und wurde für das lösliche CuCl_2 bis auf 252 μM erweitert. Bereits die niedrigste Inkubationskonzentration von 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ führte zu einer Abnahme der Zellviabilität um 15 %. Nach der Behandlung mit 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zeigte sich eine Reduktion des ATP-Gehaltes auf 83,4 %. Äquimolare CuCl_2 -Konzentrationen führten zu keiner Veränderung der zellulären ATP-Konzentration. Ab 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zeigten die EA.hy926 starke, konzentrationsabhängige zytotoxische Effekte und eine Reduktion der Zellviabilität auf 69,6 % bzw. 43,4 % (2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Konzentrationen größer 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ erwiesen sich als stark zytotoxisch und wurden daher für folgende Experimente nicht berücksichtigt. Die Inkubation mit CuCl_2 zeigte in genannten Konzentrationsbereichen keine signifikanten Änderungen der ATP-Gehalte. Erst bei einer Inkubation mit 252 μM wurde der ATP-Gehalt um 8,4 % auf 91,6 % verringert.

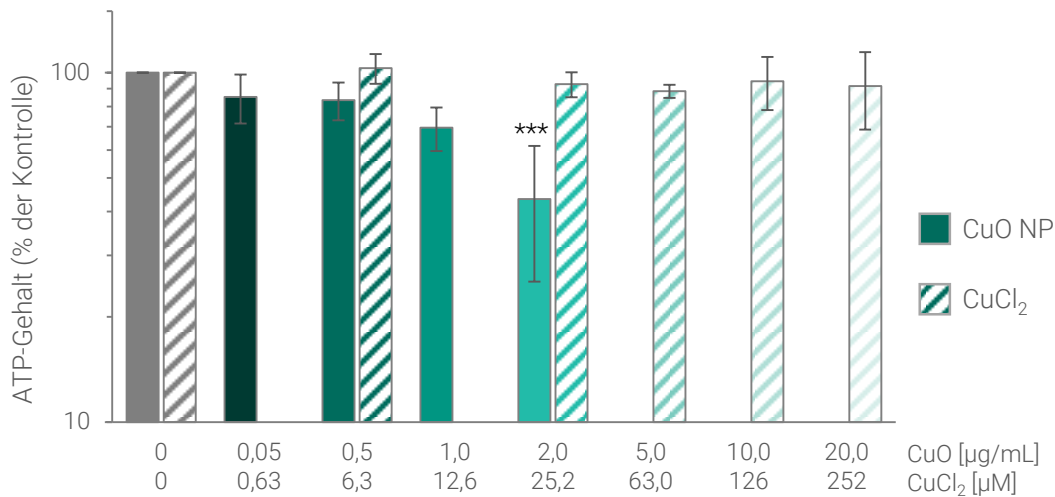


Abbildung 35: ATP-Gehalte von EA.hy926 Zellen nach Inkubation mit Kupfer(II)oxid und Kupfer(II)chlorid.

Die Endothelzelllinie EA.hy926 wurde für 24 h mit CuO und CuCl₂ inkubiert. Abgebildet sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen von drei Bestimmungen aus drei unabhängigen Versuchen. Die Ergebnisse sind in Prozent der unbehandelten Kontrolle dargestellt. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett's T Post-Hoc-Test: ***p ≤ 0,001. 2,0 µg/mL CuO entsprechen 25,2 µM Cu²⁺ im Falle kompletter Kupferfreisetzung.

5.2.2.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Keratinocyten und Endothelzellen zeigten stark abweichende Zellviabilitäten. In HaCaT Zellen erwiesen sich die löslichen Kupferverbindungen als toxischeres Agens. Sie tolerierten CuO NP bis in hohe Konzentrationen (20 µg/mL). Es wird daher postuliert, dass die Aufnahme der CuO NP in Keratinocyten retardiert stattfindet. Die dennoch einsetzende toxische Wirkung der CuO NP wurde neben der geringeren Partikellast in den Zellen mit der extrazellulären Löslichkeit der CuO NP erklärt: Atomabsorptionsmessungen von Überständen der Partikelsuspensionen (Tabelle 29) zeigten eine Löslichkeit der CuO NP (20 µg/mL) nach 24 h von 45 ± 4 %. Vorausgegangene, zeitabhängige Messungen der Löslichkeit von CuO NP in zellkulturrelevanten Medien ergaben eine Löslichkeit von 14 % nach 2 h und von 44 % nach 24 h in DMEM (10 % FKS) (SEMISCH *et al.*, 2014).

Endothelzellen scheinen eine gut funktionierende Kupferhomöostase aufzuweisen. Lösliches Kupfer zeigte nur schwach zytotoxische Wirkungen von ≤ 10 % in den getesteten Konzentrationsbereichen bis 252 µM. Nanopartikuläre Kupferverbindungen erwiesen sich dagegen als stark zytotoxisch. Um zu überprüfen, ob und inwieweit die endozytotische Aufnahme für die zytotoxischen Wirkungen der Metallnanopartikel verantwortlich ist, wurden Aufnahmestudien der Zelllinie durchgeführt (siehe 5.2.4). Neben der zellulären Kupferaufnahme 5.2.4.1 wurden unter 5.2.4.2 ebenfalls Untersuchungen zum Einfluss von Endozytoseinhibitoren durchgeführt.

5.2.3 GENEXPRESSIONSANALYSEN MIT KUPFERVERBINDUNGEN

Genexpressionsanalysen mittels Hochdurchsatz RT-qPCR wurden sowohl mit Keratinozyten als auch mit Endothelzellen angewandt, um potentielle Wirkmechanismen der Kupferverbindungen aufzuklären. Die Veränderungen der Genexpressionsmuster von HaCaT und EA.hy926 Zellen sind nach Applikation der Agenzien in Folgendem als *Heatmaps* dargestellt. Es handelt sich bei den Darstellungen um Ausschnitte einer globalen Heatmap, die in Anhang 8.9 aufgeführt ist. Gezeigt sind lediglich Gene, deren Induktion um den \log_2 -fachen Faktor ± 1 verstärkt exprimiert oder reprimiert wurden. Als Referenz dienten dabei die jeweiligen unbehandelten Kontrollen.

5.2.3.1 KERATINOZYTEN

Nach Exposition gegenüber beiden Kupferverbindungen zeigten Keratinozyten zum Teil starke Veränderungen der Genexpressionsprofile. Die ausgeprägtesten Effekte und eine starke Dosis-Wirkungsbeziehung erfuhren dabei die Gencluster der Metallhomöostase sowie der oxidativen Stressantwort. Zu beobachten war außerdem, dass sich die Genexpressionsmuster von löslichem CuCl_2 und dem nanopartikulärem CuO stark ähnelten und in Anbetracht der Standardabweichungen kaum Unterschiede feststellbar waren.

HaCaT Zellen zeigten eine leichte Aktivierung von NRF2-Zielgenen. So wies beispielsweise das Gen der NAD(P)H-abhängigen Chinon-Oxidoreduktase 1 (*NQO1*) eine erhöhte Transkriptionsrate auf, erreichte jedoch lediglich eine 0,8 – 1,0-fache Induktion durch hohe Kupferkonzentrationen. Die enzymatische Aktivität dieses Proteins verhindert Ein-Elektronen-Übergänge, wie sie in ROS-überladenen Zellen häufig ablaufen. *NQO1* fungiert auf diese Weise durch Entgiftung der hochreaktiven Verbindungen als Wächter gegen oxidativen Stress (BELINSKY UND JAISWAL, 1993).

Die Gene von Thioredoxin (*TXN*) und der Thioredoxinreduktase (*TXNRD*) erfuhren ebenfalls eine leichte Induktion. *TXN* spielt, ähnlich wie GSH, eine wichtige Rolle bei der Regeneration oxidierter Proteine. *TXNRD* rezykliert dabei oxidierte *TXN* und trägt so zum Erhalt der ROS-Homöostase bei (TANAKA *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2013).

Die stärkste Induktion nach Kupferbehandlung zeigte das Gen der Hämoxigenase-1 (*HMOX1*). Es wurde in hohen Konzentrationen durch CuCl_2 um den \log_2 -Wert von 7,6 und durch CuO NP um den \log_2 -Faktor 8,0 verstärkt exprimiert, was einer 194 bzw. 256-fachen Erhöhung der Ausgangstranskriptmenge entspricht. *HMOX1* unterliegt ebenfalls der Regulation des Transkriptionsfaktors NRF2. Eine gesteigerte *HMOX1*-Expression wird mit einem erhöhten oxidativen Stresslevel in Verbindung gebracht. Es gilt daher als Sensorgen für ROS (PRONK *et al.*, 2014).

Neben NRF2-regulierten Genen zeigten Gene der Metallhomöostase eine signifikante Veränderung in ihren Transkriptionsraten. Gene der Metallothioneinfamilie *MT1X* (*Metallothionein 1X*) und *MT2A* (*Metallothionein 2A*) zeigten ebenfalls eine starke Induktion um die \log_2 -Faktoren von 4,0 – 5,0.

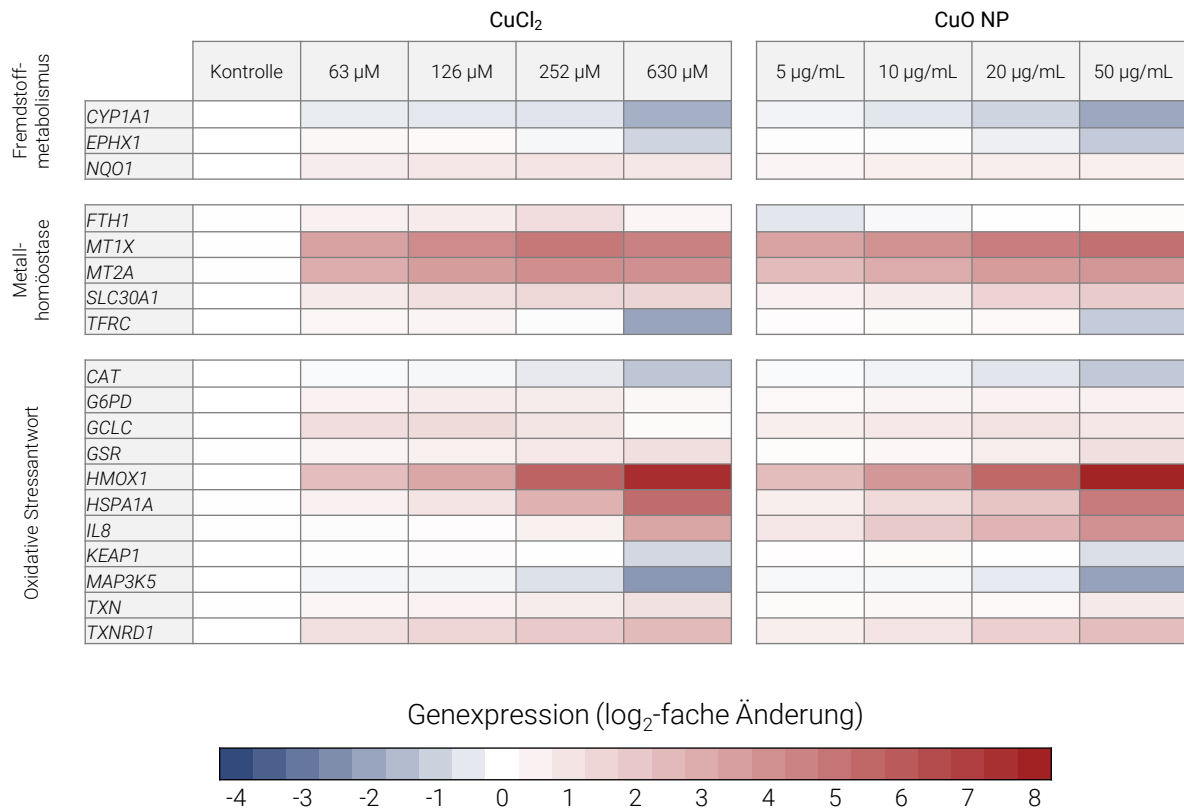


Abbildung 36: Beeinflussung der Genexpression von Genen des Fremdstoffmetabolismus, der Metallhomöostase und der oxidativen Stressantwort nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Kupferchlorid (CuCl₂) und Kupferoxidnanopartikeln (CuO NP) in HaCaT Zellen.

Eine Rotfärbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine verminderte Genexpression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

MTs sind kleine (ca. 10 kDa) Proteine mit einem hohen Cysteinanteil von ca. 15 – 30 %, deren Funktionen die Regulierung des Zinkhaushaltes sowie die Speicherung von Metallionen darstellen. Aufgrund der hohen Anzahl an Thiolgruppen sind jedoch auch antioxidative Eigenschaften dieser Proteingattung bekannt (KRĘŻEL UND MARET, 2017). Die Regulation von MT unterliegt der transkriptionellen Induktion des Metall-responsiven Transkriptionsfaktors-1 (MTF-1), welcher frei zwischen dem Zytosol und dem Zellkern migrieren kann. MTF-1 besitzt eine hohe Zinkaffinität. Bei Bindung von Zink an MTF-1 ist dessen Lokalisation in den Zellkern begünstigt, wo MTF-1 an sog. MRE (Metall-responsive Elemente) bindet. Durch die Bindung an MRE werden zum einen Histonacetyl- und Histonmethyltransferasen rekrutiert, welche verschiedene posttranslationale Modifikationen an Histonen vornehmen. Die Chromatinstruktur wird so gelockert und die DNA in eine weniger stark kondensierte Form überführt. Dies begünstigt die Ablesehäufigkeit nachgeschalteter Gensequenzen und führt zu einer erhöhten Transkriptionsrate (SPITZ

UND FURLONG, 2012). Die Behandlung mit Kupfer kann auf zwei verschiedene Arten zu einer intrazellulären Zinkfreisetzung führen: Zum einen kann es durch hohe Kupferkonzentrationen zu einer Konkurrenzsituation um die Bindungsstellen der MT kommen, wodurch Zinkionen freigesetzt werden.

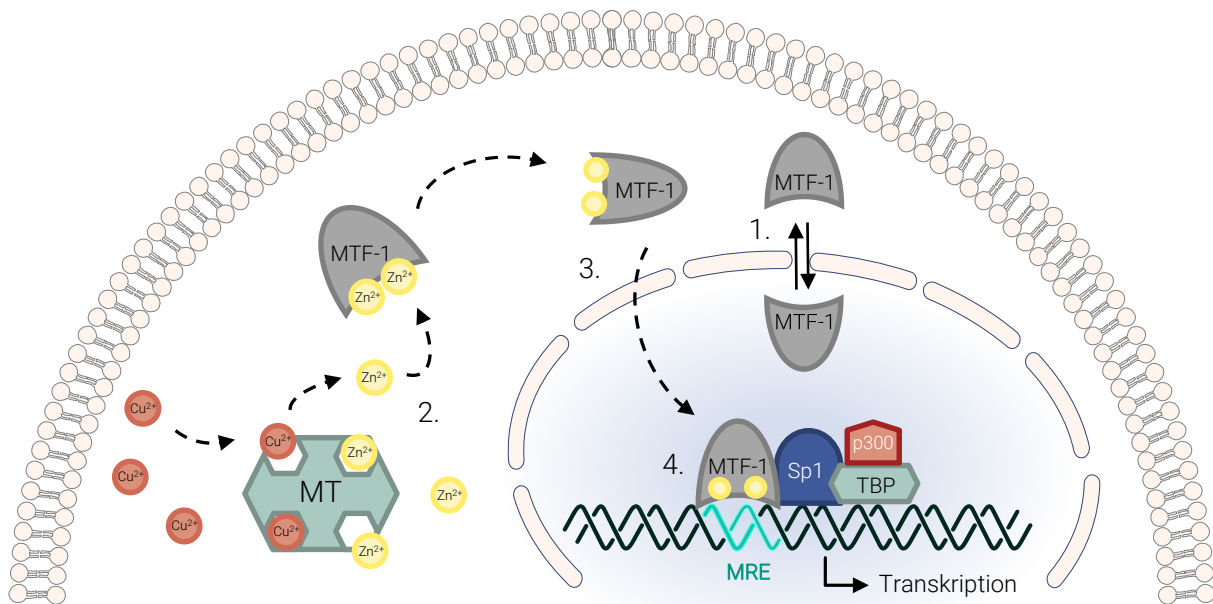


Abbildung 37: Aktivierung des Metall-responsiven Transkriptionsfaktors-1 (MTF-1) durch Kupfer.

1: Unter normalen Bedingungen kann MTF-1 ungehindert zwischen Zytosol und Kern zirkulieren. 2: Kommt es zu einer erhöhten Kupferlast, werden die sonst an Metallothioneine (MT) gebundene Zinkionen (gelb) frei und assoziieren an MTF-1. 3: Dadurch wird die Translokation von MTF-1 in den Kern begünstigt. 4: Dort bindet er an Zielproteine, wie SP1 und TATA-bindenden Proteine (TBP) sowie Koaktivatoren (p300) an Metall-responsive Elemente (MRE) der DNA bindet und die Transkription von Zielgenen initiiert (modifiziert nach GÜNTHER *et al.*, 2012).

Zum anderen können durch Kupfer katalysierte, Fenton-ähnliche Reaktionen ROS gebildet werden (siehe 2.4.3.1), die MT reversibel oxidieren und so die Komplexbildung der Zinkionen inhibieren. Als Folge kommt es ebenfalls zu einer Erhöhung des freien Zinkpools. Freigesetzte Zinkionen binden dabei an MTF-1 und begünstigen dessen Translokation in den Zellkern, wodurch die Expressionsrate von MTF-regulierten Genen erhöht wird (GÜNTHER *et al.*, 2012). Neben den MTs gehört auch *SLC30A1*, welches für den Zinktransporter ZnT-1 codiert, zu den MTF-regulierten Genen. *SLC30A1* zeigte bereits ab 126 μM eine Verdopplung der Expressionsrate. 50 $\mu\text{g/mL}$ CuO NP führten zu einer vierfach gesteigerten Transkription.

Eine konzentrationsabhängige Expressionsänderung war bei einem weiteren Sensorgen für oxidativen Stress, dem *Heat Shock Protein A 1A (HSPA1A)*, ersichtlich. *HSPA1A* gehört zu der Familie der HSP70 wird durch eine Vielzahl an Stressstimuli aktiviert. Es wird dabei für die Rückfaltung fehlgefalteter Proteine benötigt, welche unter oxidativem Stress vermehrt gebildet werden (SCIEGLINSKA *et al.*, 2011).



Abbildung 38: Beeinflussung der Genexpression verschiedener Transkriptionsfaktoren und Gene der DNA-Schadensreparatur und DNA-Schadensantwort nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Kupferchlorid (CuCl₂) und Kupferoxidnanopartikeln (CuO NP) in HaCaT Zellen.

Eine Rotfärbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine verminderte Genexpression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Neben der Expression auf Genebene sind weiterführende Studien von Li *et al.* durchgeführt worden, die HSPA1A auch auf Proteinebene als geeigneten Stress- und Entzündungsmarker in Keratinozyten hervorhoben (Li *et al.*, 2016).

Inflammatorische Reaktionen in kupferexponierten Hautzellen äußerten sich auch durch eine erhöhte Genexpression des Interleukins *IL-8* (SPITZ UND FURLONG, 2012). Dabei zeigte sich eine erhöhte Sensibilität der HaCaT Zellen gegenüber nanopartikulärem CuO. Inkubationen mit 0,5 µg/mL führten zu einer leichten Induktion des Gens um den 0,9-fachen Wert. 10 µg/mL hatten eine Vervierfachung der Ausgangstranskriptmenge zur Folge und wiesen den log₂-Wert von 1,9 auf. Die äquimolaren löslichen Kupferkonzentrationen zeigten erst bei 630 µM einen signifikanten Anstieg der Ausgangstranskriptmenge, wohingegen *IL-8* nach Behandlung mit CuO NP in den Konzentrationen von 20 µg/mL bzw. 50 µg/mL um den bis zu 4-fachen Wert, als proinflammatorische Antwort auf zellulären Stress, exprimiert wurde.

Neben Genen der oxidativen Stressantwort und der Metallhomöostase wurden auch Gene der Proliferation und der Zellzykluskontrolle in ihrer Expression moduliert. Das Protein p21, für welches das Gen *CDKN1A* codiert, ist neben der Initiation des Zellzyklusarrestes auch bei Signalwegen der DNA-Reparatur und -Replikation sowie der Apoptose beteiligt (DUTTO *et al.*, 2015). *CDKN1B*, welches für das Protein p27 codiert, stellt einen weiteren Zellzyklusinhibitor dar (SICINSKI *et al.*, 2007). Obwohl die transkriptionelle Regulation von *CDKN1B* im Vergleich zur Ubiquitin-vermittelten Regulierung des p27-Niveaus eine eher untergeordnete Rolle spielt, zeigten aktuelle Studien, dass sowohl der JUN-assoziierte Transkriptionsfaktor AP-1 als auch der Differenzierungsinhibitor 3 (*inhibitor of differentiation 3*, ID3) repressiv auf die Transkription von *CDKN1B* wirken (BACHS *et al.*, 2018). Der reprimierende Effekt von ID3 auf die Transkriptionsrate von *CDKN1B* wurde, in dermalen Fibroblasten, vor allem während der Wundheilung beobachtet (CHASSOT *et al.*, 2007). Es liegt daher nahe, dass während einer Exposition gegenüber Kupfer, durch die erhöhte Expression von *JUN* und dem Inflammationsmarker *IL-8*, zur Hemmung der Genexpression von *CDKN1B* kommt. *CDKN1A* wurde durch die Metallverbindungen ab einer Konzentration von 252 μM bzw. 20 $\mu\text{g/mL}$ induziert. *CDKN1B* erfuhr im selben Konzentrationsbereich eine Halbierung der Transkriptmenge. Auf transkriptioneller Ebene deuten die Veränderungen des Gens *CDKN1A* auf einen Zellzyklusarrest der Keratinozyten hin.

Das Gen *MYC* wurde mit steigender Dosis vermindert exprimiert. Das gleichnamige Genprodukt MYC spielt als Transkriptionsfaktor eine essentielle Rolle in der Expression wichtiger Gene der Zellzyklusprogression und Apoptose. Eine verminderte MYC-Konzentration führt häufig zum Stopp des Zellzyklus und dem Beginn der Apoptose (LIU *et al.*, 2008).

JUN, welches durch eine Vielzahl zellulärer Stimuli induziert werden kann, codiert für das Protein c-JUN und ist ein Teil des Transkriptionsfaktors AP-1. Dieser ist in diversen zellulären Prozessen, wie der Zellproliferation und Apoptose beteiligt (KARIN, 1995).

PMAIP1 codiert für das proapoptotische Protein NOXA und erfuhr eine dosisabhängige Induktion. Durch Behandlung mit den höchsten Kupferkonzentrationen wurde NOXA um den \log_2 -fachen Wert von 1,6 (CuCl_2) bzw. 1,7 (CuO NP) induziert, was als Indiz für apoptotische Prozesse der Keratinozyten gilt (ELMORE, 2007).

DNA-Schadensantwortgene sowie DNA-Reparaturgene zeigten, bis auf das Sensorgen *GADD45A*, eine reprimierte Expression. *GADD45A* codiert dabei für das Protein GADD45 α (*growth-arrest and DNA-damage inducible protein α*) der GADD-Familie. Gene dieser Familie werden durch genotoxischen Stress sowohl p53-abhängig als auch –unabhängig vermehrt transkribiert. Vertreter der GADD-Familie nehmen so Einfluss auf zelluläre Prozesse und sind entscheidende Regulatoren für die Zellzyklusprogression und die Apoptose (LIEBERMANN UND HOFFMAN, 2008).

Kupferkonzentrationen von 630 μM respektive 50 $\mu\text{g/mL}$ führten in 17 von 28 untersuchten Genen unterschiedlicher DNA-Schadensantwort- und -Reparaturmechanismen zu einer Repression. Die

gehemmte Transkription zeigte sich besonders ausgeprägt bei *DDB2* (*Damage Specific DNA Binding Protein 2*), welches für das Protein DDB2 codiert und auch unter dem Namen XPE (*Xeroderma pigmentosum complementation group E*) bekannt ist. Neben seiner Funktion in der Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) besitzt DDB2 wichtige Funktionen in der Modifikation von Histonen und hat so Einfluss auf die Transkription. Aktuelle Studien zeigen weiterhin, dass DDB2 an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist und zu einer Degradation von p27 führt (GILSON *et al.*, 2019). Hohe Kupferkonzentrationen hemmten jedoch auch weitere Gene der NER. Neben *DDB2* (*XPE*) zeigten auch *ERCC2*, *ERCC4* (*XPF*), *XPA* und *XPC* eine reprimierte Genexpression.

Die Gene *OGG1* und *LIG1*, die für Proteine der Basenexzisionsreparatur codieren, erfuhren ebenfalls eine Halbierung der Transkriptmenge. Das Genprodukt von *OGG1* ist essentiell für eine erfolgreiche Erkennung und Entfernung von 8-Oxoguanin (8-OxoG). Diese oxidative Modifikation von Guanin wird durch ROS gebildet und stellt einen der häufigsten DNA-Schäden dar (KANVAH *et al.*, 2010).

Neben Genen der NER und BER wurden auch Gene drei weiterer DNA-Reparatursysteme, der Mismatch-Reparatur, der Einzelstrangbruch- und der Doppelstrangbruchreparatur durch Kupfer transkriptionell inhibiert. Es zeigte sich keinerlei Spezifität in der Modulation der verschiedenen Reparaturmechanismen, was darauf schließen lässt, dass neben oxidativem Stress kein einzelnes Schadensmuster durch Kupfer hervorgerufen wurde, sondern vielmehr die Reparaturkapazität unter hohen Kupferkonzentrationen herunterreguliert wurde.

Mögliche Ursachen der deutlichen Herunterregulation sowie mechanistische Zusammenhänge werden unter 5.2.3.3 diskutiert.

5.2.3.2 ENDOTHELZELLEN

EA.hy926 Zellen zeigten im Gegensatz zu den HaCaT Zellen Unterschiede in den Genexpressionsmustern nach Behandlung mit beiden Kupferspezies. Partikuläres CuO führte zumeist zu wesentlich ausgeprägteren Effekten. Teilweise waren Induktionen von Genen bereits in sehr niedrigen Konzentration unter 1 µg/mL CuO NP zu beobachten.

CYP1A1 wurde durch CuO NP analog zu den Keratinozyten vermindert exprimiert und zeigte in der höchsten Partikelbehandlung eine Repression um den Log₂-fachen Wert -1,15.

Eine starke Dosis-Wirkungsbeziehung erfuhren die Gencluster der Metallhomöostase sowie der oxidativen Stressantwort. Vor allem die Gene *MT1X* und *MT2A* sprachen sensitiv auf die Partikelbehandlung an und zeigten eine Induktion um den log₂-Faktor von 1,7 bereits nach Inkubation mit 0,05 µg/mL CuO NP. Die Induktion von *MT1X* stieg konzentrationsabhängig bis um den log₂-Wert von 3,5 in der höchsten Konzentration. Lösliches CuCl₂ zeigte erst bei 25,2 µM eine biologisch relevante Veränderung der Transkriptmenge und führte bei 63,0 µM zu einer log₂-fachen Induktion von *MT1X* von 3,75 und übertraf dabei die partikuläre Kupferverbindung.

Für die Gene *MT2A*, *SLC30A1* und *HMOX1* zeigte sich ein ähnliches Bild. Die Expressionen stiegen bereits bei niedrigen Partikelexpositionen stark an, während sich bei der CuCl_2 -Behandlung erst nach der höchsten Konzentration Veränderungen in biologisch relevantem Ausmaß manifestierten.

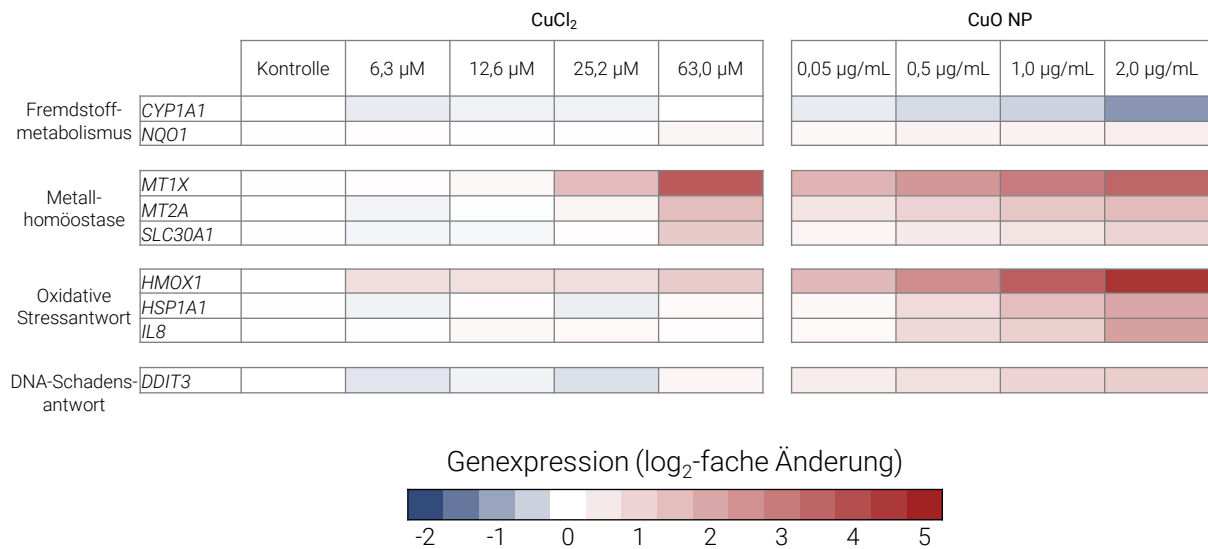


Abbildung 39: Beeinflussung der Genexpression des Fremdstoffmetabolismus, der Metallhomöostase, der oxidativen Stressantwort sowie der DNA-Schadensantwort nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Kupferchlorid (CuCl_2) und Kupferoxidnanopartikeln (CuO NP) in EA.hy926 Zellen.

Eine Rotfärbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine verminderte Genexpression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Der Entzündungsmarker *IL-8* wurde lediglich bei den partikelexponierten Endothelzellen aktiviert und zeigte bereits ab 1,0 µg/mL eine Verdopplung der Ausgangstranskriptmenge. 2,0 µg/mL führten zur Vervierfachung der Transkriptionsprodukte. Auch der proapoptotische Transkriptionsfaktor *DDIT3*, welcher der GADD-Familie zugehörig ist und durch oxidativen Stress induziert wird (JAUHAINEN *et al.*, 2012), zeigte explizit nach Partikelbehandlung eine konzentrationsabhängige Zunahme der Genexpressionsrate von 0,4 bis 1,15 (log₂-Faktor).

5.2.3.3 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Keratinocyten

Die Genexpressionsprofile der HaCaT Zellen zeigten keine erkennbaren Unterschiede zwischen den beiden eingesetzten Metallverbindungen. Die stärkste Induktion erfuhr sowohl nach CuCl_2 als auch nach nanopartikulärer CuO-Behandlung das NRF2-regulierte Gen *HMOX1*, welches ein Sensorgen für oxidativen Stress darstellt. Neben weiteren Genen, die die Gegenwart von ROS vermuten lassen und deren Transkription einer strengen Regulation durch NRF2 oder MTF-1 unterliegen, wurden auch Gene induziert, die an Zellzyklusregulation und Apoptose beteiligt sind. Vor allem nach Inkubation mit hohen

Kupferkonzentrationen zeichnete sich so deutlich vorherrschender oxidativer Stress in der Zelle ab, worauf die Keratinozyten den Zellzyklusarrest und die Apoptose auf transkriptioneller Ebene einleiteten.

DNA-Schadensantwortgene und DNA-Reparaturgene wurden nach 630 μM bzw. 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ unspezifisch in ihrer Expression gehemmt. Einzige Ausnahme stellte hier das Sensorgen *GADD45A* dar, welches bereits durch geringe Kupferkonzentrationen induziert wurde.

Eine Hypothese, wie es zu einer unspezifischen Repression der genannten Gene kam, beruhte auf der Beobachtung, dass Keratinozyten nach Behandlung der beiden höchsten löslichen und partikulären Kupferkonzentrationen vermehrt Gene der Apoptose exprimierten. Da dieser Zelltodmechanismus jedoch Energie in Form von ATP bedarf, wurden selektiv Mechanismen des Zellüberlebens, beispielsweise der DNA-Schadenserkennung und -Reparatur herunterreguliert, um ATP als wichtige Ressource einzusparen.

Ein weiterer Mechanismus, dessen Beteiligung an der Hemmung von DNA-Schadensantwortgenen diskutiert wird, ist epigenetischen Ursprungs. Epigenetik ist die Untersuchung vererbbarer genregulatorischer Merkmale, die während des Lebens eines Individuums als Reaktion auf umweltbedingte Stimuli ohne Veränderungen der DNA-Sequenz manifestiert werden. Der epigenetische Code steuert dabei die Genexpression, indem reversible chemische Modifikationen der Chromatinstruktur (Methylierung, Acetylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung), der DNA bzw. ganzen Chromosomenabschnitten (Methylierung, Demethylierung) sowie nicht-codierender RNA (z.B. microRNA) vorgenommen werden. Der Einfluss von Kupfer auf epigenetische Regulationsmechanismen wird derzeit diskutiert und ist Gegenstand aktueller Forschung. Es gibt Hinweise, dass Kupfer sowohl Einfluss auf die Modifikation von Histonen, als auch auf das Methylierungsmuster der DNA nimmt (GRUBMAN UND WHITE, 2017).

Aufgrund neuer Literaturdaten wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass die Herunterregulation von DNA-Schadensantwort- und DNA-Reparaturgenen epigenetische Veränderungen als Ursache haben können. Detaillierte Wirkmechanismen, wie Kupferionen in epigenetische Vorgänge eingreifen können, sind in Folgendem dargestellt.

Bei der Expression eines Gens hängt die Transkriptionsrate maßgeblich mit dem Grad der Kondensation der Nukleosomen zusammen. Als Nukleosom wird dabei die Einheit von DNA, einem *linker* Histon H1 und einem Histonoktamer bezeichnet. Das Histonoktamer besteht aus je zwei Exemplaren der Proteine H2A, H2B, H3 und H4. Die Histonproteine H2A und H2B lagern sich zu Dimeren zusammen. H3 und H4 bilden ebenfalls eine Dimerstruktur aus (siehe Abbildung 40).

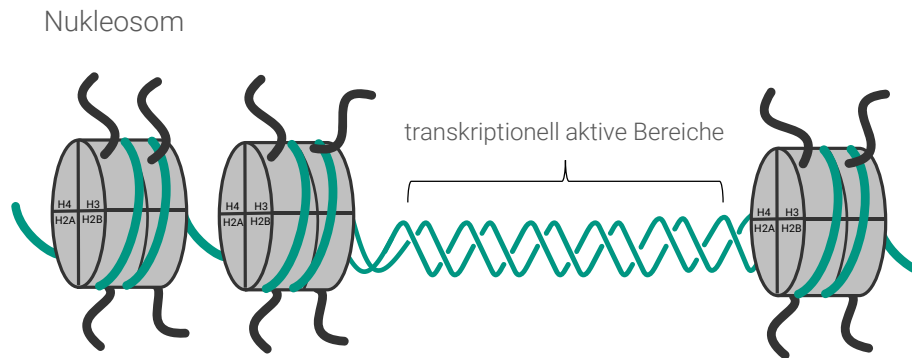


Abbildung 40: Aufbau der Nucleosomen.

DNA ist aufgrund ihres Phosphatrückgrats negativ geladen und in der Heterochromatinstruktur eng an das Histonoktamer gebunden, welches aus den Histonproteinen H2A, H2B, H3 und H4 besteht. Die Histonoktamere besitzen jeweils vier Proteinseitenketten. Das Histon H1 (nicht gezeigt) markiert die Positionen, an denen sich die DNA-Doppelhelix um das Histonoktamer schlingt. Zwischen den Nucleosomen liegen transkriptionell aktive Bereiche der DNA, in denen Gene exprimiert werden.

Zwei H3/H4-Dimere lagern sich zu einem Tetramer zusammen, an welches wiederum zwei H2A/H2B-Dimere angelagert werden. Die DNA ist mit 146 Basenpaaren als linksgängige Superhelix um die Histonoktamere gewunden und behält die Struktur aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen bei (GRAW, 2015). Das Histon H1 (nicht gezeigt in Abbildung 40) markiert die Position, an der sich die DNA-Doppelhelix um das Histonoktamer schlingt. H1 koordiniert die *linker* DNA, die sich zwischen den einzelnen Histonoktameren erstreckt und durch posttranskriptionelle Modifikationen den Grad der DNA-Kondensation beeinflussen (HERGETH UND SCHNEIDER, 2015).

DNA ist unter physiologischen Bedingungen aufgrund des Phosphatrückgrates negativ geladen. Histone besitzen einen hohen Anteil an Arginin und Lysin und tragen daher eine positive Ladung. Modifikationen der Histone führen zu einer Änderung der Histoneigenladung. Zu den wichtigsten Histonmodifikationen gehören Acetylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Methylierung. Sie bewirken eine Lockerung der Heterochromatinstruktur und führen dazu, dass die DNA weniger stark kondensiert vorliegt (siehe Abbildung 41). Gene in diesen aufgelockerten Euchromatinbereichen sind für Transkriptionsproteine, wie RNA-Polymerasen zugänglich und können so exprimiert werden (GRAW, 2015).

Es existieren Hinweise, dass die Deregulierung der Kupferhomöostase Funktionsstörungen auf epigenetischer Ebene hervorrufen. So zeigten Cheng und Kollegen/innen, dass Kupfer hemmende Wirkung auf die Acetylierung der Histone hat. Die Chromatinacetylierung ist streng über die beiden Enzyme HAT (Histonacetyltransferase) und HDAC (Histondeacetyltransferase) reguliert. Die Acetylierung der positiv-geladenen Histonseitenketten beeinträchtigt das DNA-Bindungsvermögen und führt zu einer Lockerung der Chromatinstruktur (siehe Abbildung 41). Kupferionen scheinen dabei die Aktivität der HAT zu inhibieren und führen so zu einem Ungleichgewicht. Eine Hypoacetylierung betroffener Genloci ist die

Folge, die mit einer verminderten Transkriptionsrate in diesen Abschnitten einhergehen (CHENG *et al.*, 2012).

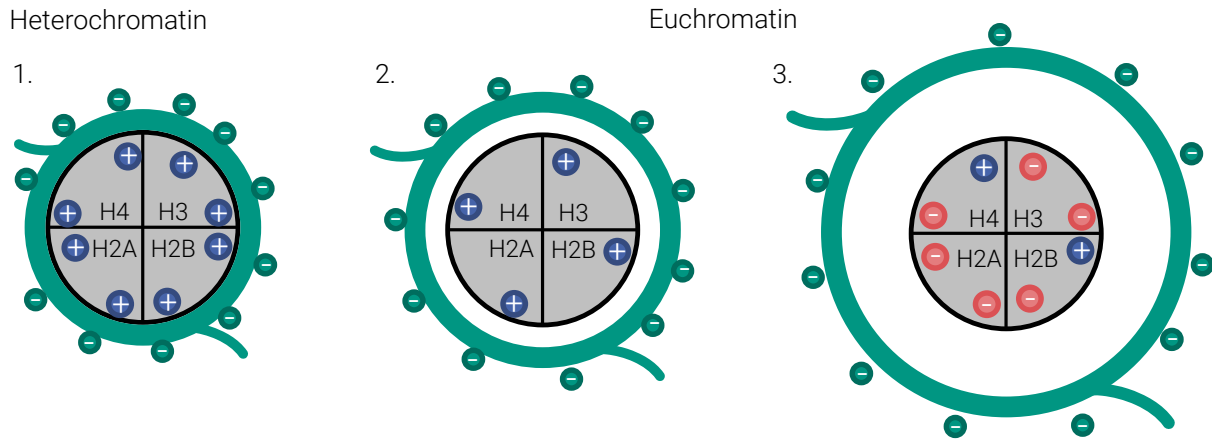


Abbildung 41: Grad der DNA-Kondensation an Nucleosom in Abhängigkeit der Histonmodifikationen.

DNA (grün) ist negativ geladen und in der Heterochromatinstruktur eng an das Histonoktamer gebunden (1). Durch Methylierung oder Ubiquitinierung wird die Eigenladung der Histonsteinketten (nicht gezeigt) überlagert. Das Nucleosom geht in die Euchromatinstruktur über (2). Eine Acetylierung bzw. eine Phosphorylierung der Histonsteinketten führt zu einer weiteren Änderung der Histoneigenladung. Die DNA liegt nun offen vor und ist für Transkriptionsproteine zugänglich (3).

Weiterhin gibt es Indizien, dass Kupfer eine Dysregulation der HDAC hervorrufen kann. Studien an der Leberzelllinie HepG2 zeigten eine Induktion der Gene *HDAC4* und *HDAC10* (SONG *et al.*, 2009). Untersuchungen zu Hypoacetylierungen in der Alzheimerdiagnostik zeigten ebenfalls, dass ein erhöhter Kupferplasmaspiegel mit der Serumkonzentration an HDAC korrelierte. Daher besteht Grund zur Annahme, dass Kupfer eine verstärkte Deacetylierung der Histone hervorruft (GRUBMAN UND WHITE, 2017).

Abgesehen von der Modulation der Histonacetylierung zeigten auch bestimmte Kinasen, welche an der Histonphosphorylierung beteiligt sind, bereits ab 40 μM CuCl_2 eine um 50 % gehemmte Histon H3-Phosphorylierungsaktivität (BARCIA-SANJURJO *et al.*, 2013). Die biologischen Folgen der H3-Phosphorylierung sind vielschichtiger als die der Histonacetylierung und können im zellulären Kontext unterschiedlich sein. Dennoch hat der Phosphorylierungsgrad der Histone generell Einfluss auf die DNA-Kondensierung und so auf die Genexpressionsrate (GRUBMAN UND WHITE, 2017). Eine Hemmung der Histonkinasen durch Kupferionen kann daher als möglicher Einflussfaktor der inhibierten Transkription in Betracht gezogen werden.

Endothelzellen

Die Veränderungen der Genexpressionsmuster aus den Endothelzellen zeigten im Gegensatz zu den Ergebnissen der Keratinozyten einen klaren Zusammenhang zwischen der applizierten Kupferspezies und der Intensität der jeweiligen Geninduktion. *CYP1A1* wurde als einziges Gen reprimiert, was auch in

Keratinocyten beobachtet werden konnte. Der Zusammenhang ist nicht gänzlich geklärt. Es gibt jedoch Studien mit HepG2 Leberzellen, die sowohl Gen- als auch Proteinexpressionen von *CYP1A1* nach Exposition mit mikromolaren Kupferkonzentrationen untersucht haben. Dabei wurden Indizien dafür gefunden, dass eine kupfervermittelte Modulation von *HMOX1* einen repressiven Einfluss auf die Expression von *CYP1A1* hat (KORASHY UND EL-KADI, 2004; ANWAR-MOHAMED *et al.*, 2009).

Nach Behandlung mit CuO NP wurden vorwiegend proapoptotische Gene und Gene der oxidativen Stressantwort induziert. Wasserlösliche Kupferionen zeigten nur in hohen, zytotoxischen Konzentrationen eine Veränderung der Expressionsprofile. Dies führte zu der Annahme, dass eine erhöhte Kupferlast in den partikelexponierten EA.hy926 Zellen durch eine unregulierte Aufnahme über Endozytose verursacht wird. Extrazelluläre Kupferionen wurden nicht im selben Maße aufgenommen. Ihre Aufnahme scheint dabei einer homöostatischen Regulation zu unterliegen. Es wurden daher weiterführende Untersuchungen mit der EA.hy926 Zelllinie durchgeführt, in denen die Aufnahme von Partikeln und der Einfluss von Endozytosehemmern untersucht wurden.

5.2.4 AUFNAHMESTUDIEN

Die Beobachtungen aus Zytotoxizitäts- sowie Genexpressionsanalysen wurden anschließend durch Experimente über die Beeinflussung verschiedener zellulärer Vorgänge auf funktioneller Ebene weiterverfolgt. Da sich die EA.hy926 Zellen als sensibles Modell des gefäßauskleidenden Endothelgewebes der menschlichen Haut herausstellten und die Membranzusammensetzungen der HaCaT Zellen eine Herausforderung für das angewandte Zellyseprotokoll darstellten, wurden Aufnahmestudien exemplarisch an der EA.hy926 Zelllinie durchgeführt.

5.2.4.1 ZELLULÄRE AUFNAHME

Zur Ermittlung der zellulären Aufnahme wurden EA.hy926 Zellen für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an CuO NP und CuCl₂ inkubiert. Der zelluläre Kupfergehalt wurde im Anschluss mittels GF-AAS bestimmt. Aufnahmestudien mit partikulären Substanzen bergen stets das Problem des Überbefundes, da Partikel nach der Inkubation durch Waschen nur zu gewissen Anteilen von extrazellulären Membranen entfernt werden können. Um diese potentielle Überbestimmung zu verhindern, wurde für die Aufarbeitung der Zellen eine in der Arbeitsgruppe etablierte Methode gewählt, die Kupferionen der löslichen Zellfraktion erfasst und alle membranhaftenden Partikeln abtrennt.

Für CuO NP wurde eine konzentrationsabhängige Akkumulation des intrazellulären Kupfergehaltes beobachtet. Bereits ab einer Exposition von 0,5 µg/mL CuO NP wurden millimolare Kupferkonzentrationen in der Zelle detektiert und der Basalgehalt um den Faktor 25 erhöht. Die Behandlungen mit 1,0 µg/mL und 2,0 µg/mL erhöhten die Kupferlast der Zelle nochmals um den 32- bzw. 39-fachen Wert. In der höchsten

CuO-Konzentration akkumulierten 6,8 mM in der Zelle, was der 111-fachen Menge an Kupfer im Vergleich zu der Kontrolle entspricht.

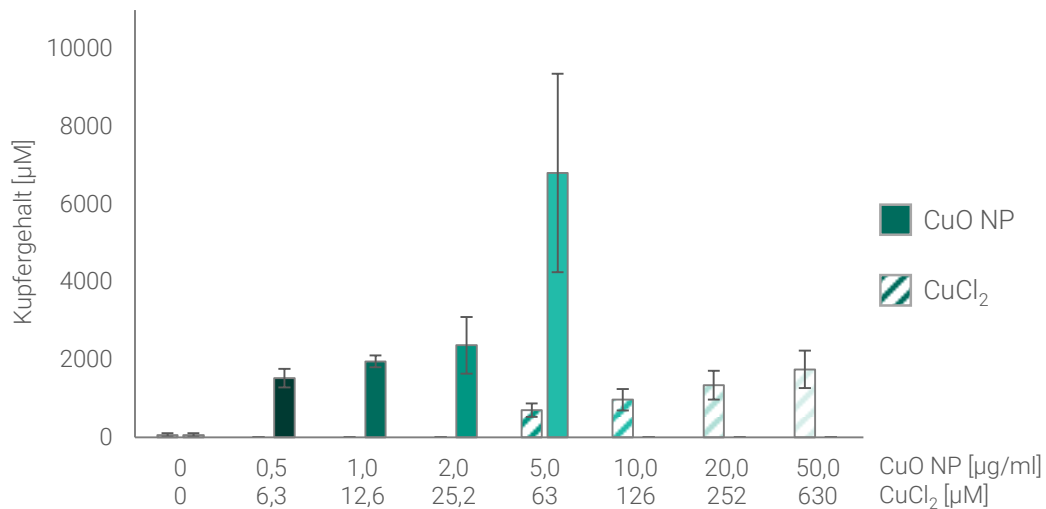


Abbildung 42: Zelluläre Aufnahme von Kupfer nach Behandlung mit Kupfer(II)oxid (CuO) und Kupfer(II)chlorid (CuCl₂).

Der Kupfergehalt in EA.hy926 Zellen wurde nach 24-stündiger Inkubation mittels Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen. 5,0 µg/mL CuO entsprechen 63 µM Cu²⁺ im Falle kompletter Kupferfreisetzung.

Die Inkubation mit CuCl₂ zeigte eine homöostatisch regulierte Kupferaufnahme bis 252 µM. Trotz der jeweiligen Verdopplungen der Inkubationskonzentrationen von 63 µM auf 126 µM sowie auf 252 µM zeigten die intrazellulären Kupfergehalte eine Akkumulation auf den 11-fach (63 µM), 16-fachen (126 µM) und 22-fachen (252 µM) Wert. 630 µM ließen die Kupferlast der Zelle auf 1,75 mM ansteigen, was einer um den Faktor 30 erhöhten Metallkonzentration entsprach.

Die konzentrationsabhängige Akkumulation von CuO NP gegenüber CuCl₂ bekräftigte die vermutete Aufnahme über Endozytose, die für CuO NP bereits in Lungenepithelzellen nachgewiesen wurde (STRAUCH *et al.*, 2017; SEMISCH *et al.*, 2014). Die Umgehung der homöostatisch regulierten Aufnahme von Kupfer wurde in sich anknüpfenden Untersuchungen mit Endozytoseinhibitoren nachvollzogen. Dabei wurde der Einfluss von verschiedenen Substanzen analysiert, welche sich negativ auf die Endozytoserate auswirken.

5.2.4.2 EINFLUSS VON ENDOZYTLOSEINHIBITOREN

Um den Einfluss der endozytotischen Aufnahme zu untersuchen, wurden pharmakologisch wirksame Inhibitoren eingesetzt, die an unterschiedlichen Prozessen der Endozytose eingreifen und diese hemmen. Diese Hemmstoffe wurden dabei in subtoxischen Konzentrationen eingesetzt, um nicht zu stark in die Physiologie der Zellen einzugreifen und unspezifische Nebeneffekte der Substanzen zu vermeiden. Die Etablierung geeigneter Konzentrationsbereiche und die Wirksamkeit in EA.hy926 Zellen erfolgten in entsprechenden Vorversuchen.

Die Endozytoseinhibitoren Hydroxydynasore (OH-Dyn) und Monodansylcadaverin (MDC) stellten sich als geeignete Verbindungen heraus, um endozytotische Aufnahmemechanismen zu untersuchen. OH-Dyn gilt als selektiver Inhibitor Dynamin-abhängiger Aufnahmemechanismen, zu denen sowohl die Clathrin- als auch die Caveolae-vermittelte Endozytose zählen. Die membrangebundene GTPase (Guanosintriphosphatase) Dynamin ist an wichtigen zellulären Abschnürungsprozessen, Teilung von Zellorganellen sowie der Vesikelbildung beteiligt. Als Beispiele sind hierfür die Internalisierung von membranständigen Rezeptoren und der Antigenpräsentation zu nennen. Neben der Beteiligung an Signaltransduktionsprozessen und der Immunantwort sind Dynamine auch für die Aufnahme von Pathogenen und Partikeln verantwortlich. Der Mechanismus der Dynaminhemmung durch OH-Dyn ist nicht vollständig geklärt. OH-Dyn vermag jedoch Dynamine zu inhibieren und führt somit zu einer verringerten Clathrin- und Caveolae-vermittelten Endozytoserate (McCLUSKEY *et al.*, 2013).

Auch das eingesetzte MDC wirkt sich hemmend auf die Clathrin-vermittelte Endozytose aus. Es inhibiert selektiv membranständige Transglutaminasen, die an Proteinquervernetzungen beteiligt sind. Durch diese Störung kommt es zu einer verminderten Clathrin-Clusterbildung, wodurch die Abschnürung von Clathrin-umschlossenen Vesikeln nicht vollständig ablaufen kann. Eine verminderte Endozytoserate ist die Folge (Guo *et al.*, 2015).

Um den Einfluss von OH-Dyn und MDC auf die Partikelaufnahme zu untersuchen, wurde auf EA.hy926 Zellen referenziert, die mit 1 µg/mL CuO NP für 24 h behandelt wurden (Abbildung 43). Die Endozytoseinhibitoren wurden in DMSO gelöst und entsprechend verdünnt. Die Endkonzentration betrug 50 µM und der DMSO-Anteil von 0,5 % im Zellkulturmedium wurde nicht überschritten. Die EA.hy926 wurden 1 h vor Inkubation mit den Metallverbindungen mit OH-Dyn und der Vehikelkontrolle (DMSO) vorkonditioniert. MDC wurde 10 min vor Inkubation mit den Kupferverbindungen dem Zellkulturmedium zugesetzt. Im Anschluss an die Vorkonditionierung wurden die Inkubationslösungen auf die Zellen appliziert. Erneut wurden OH-Dyn bzw. MDC für die Dauer der Behandlung dem Inkubationsmedium hinzugegeben. Da die Endozytoseinhibitoren Einfluss auf die Viabilität der Zellen haben, wurden die intrazellulären Kupfergehalte, aus Vergleichbarkeitsgründen, auf jeweils 10⁶ vitale Zellen normiert. Neben der Behandlung der vorkonditionierten Zellen mit CuO wurden ebenfalls Experimente mit löslichen Kupferverbindungen durchgeführt. Die Ergebnisse der Kupferaufnahme sind in Abbildung 43 dargestellt.

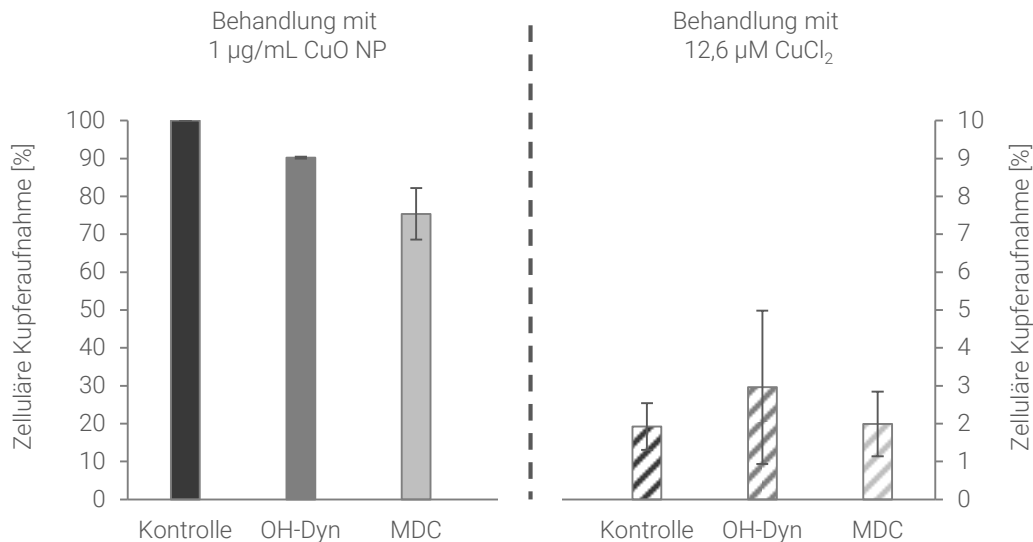


Abbildung 43: Zelluläre Aufnahme von Kupfer in Abhängigkeit der Endozytoseinhibitoren Hydroxydynamore (OH-Dyn) und Monodansylcadaverin (MDC).

Vor Behandlung mit Kupfer(II)oxid (CuO) und Kupfer(II)chlorid (CuCl₂) wurden die EA.hy926 Zellen mit 50 µM OH-Dyn oder 50 µM MDC vorbehandelt. Im Anschluss darauf erfolgte eine 24-stündige Exposition gegenüber den Metallverbindungen. Die Ergebnisse sind auf jeweils 10⁶ lebende Zellen normiert und auf die Behandlung mit 1 µg/mL CuO NP bezogen. Dargestellt sind Mittelwerte ± Range/2 aus zwei unabhängigen Versuchen.

OH-Dyn zeigte in 10⁶ vitalen Zellen eine um 10 % verminderte Aufnahme von CuO NP. MDC führte zu einer Reduktion der intrazellulären Kupferkonzentration von 25 %. Beide Endozytoseinhibitoren zeigten keinerlei Einfluss auf die Aufnahme von löslichen Kupferverbindungen. Die intrazellulären Kupferkonzentrationen betrugen unter Berücksichtigung der Standardabweichungen ca. 2 – 3 % der mit 1 µg/mL CuO NP inkubierten Vehikelkontrolle.

5.2.4.3 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Zusammenfassend konnte für CuO NP eine starke Akkumulation von Kupfer nach 24 h festgestellt werden. Diese war um ein Vielfaches ausgeprägter als für die lösliche Referenzverbindung. Während die intrazellulären Kupfergehalte mit steigender Applikationsmenge an CuO NP konzentrationsabhängig zunahmen, konnte für CuCl₂ eine regulierte Aufnahme beobachtet werden. Die Ergebnisse entsprechen den Beobachtungen vorausgegangener Arbeiten mit den Lungenepithelzelllinien A549 (SEMISCH *et al.*, 2014) und BEAS-2B (STRAUCH *et al.*, 2017). CuO NP führt sowohl in Lungengewebe, als auch in Endothelzellen der Haut zu einer Kupferüberladung der Zellen, die wahrscheinlich in erhöhten Mengen von freien reaktiven Kupferionen gemäß des von Limbach und Kollegen/innen diskutierten *trojan horse type* Aufnahmemechanismus resultiert, wodurch prooxidative und potentiell toxische Reaktionen ausgelöst werden können (LIMBACH *et al.*, 2007).

Der Einfluss von Endozytoseinhibitoren wurde vor allem bei MDC deutlich. Hier war eine um 25 % verminderte Aufnahme der Partikel die Folge. Die Verwendung der pharmakologischen Aufnahmehemmer

ist eine äußerst komplexe Disziplin, da die therapeutische Breite der Substanzen häufig gering ist und für die eingesetzte Zelllinie neu etabliert werden muss. Auch zeigten Endozytoseinhibitoren, die bei vorausgegangenen Versuchen als leicht zytotoxisch galten und erfolgreich die Endozytose hemmten, in EA.hy926 schwere zytotoxische Effekte und/oder keinen Einfluss auf die Aufnahme (STRAUCH *et al.*, 2020).

Ob sich die vermehrte Aufnahme von CuO NP in die Zelle in oxidativem Stress äußert, wurde anhand des DCF-DA Assays in Folgendem untersucht.

5.2.5 NACHWEIS REAKTIVER SAUERSTOFFSPEZIES

Sowohl die Zytotoxizitäts- und Genexpressionsuntersuchungen zeigten, dass in Endothelzellen bereits bei Konzentrationen unter 2 µg/mL zum Teil starke adverse Effekte auftraten und sie viel sensitiver gegenüber den Partikeln reagierten als die Keratinozyten. Für die löslichen Kupferverbindungen veranschaulichten die Zytotoxizitätsuntersuchungen, dass EA.hy926 robust gegenüber Kupferionen waren und die zelluläre Aufnahme des löslichen Kupfers verglichen zu den Inkubationen mit partikulären Verbindungen gering war. Ein großer Teil der zytotoxischen und genotoxischen Wirkung von Kupferpartikeln geht von ROS aus, die durch Fenton-ähnliche Reaktionen des Kupfers katalysiert werden (STRAUCH *et al.*, 2020). Zum direkten Nachweis der entstandenen ROS nach Inkubationen mit CuCl₂ und CuO NP wurde ein fluorimetrischer DCF-DA Assay angewendet.

Beide Zelllinien wurden 1 h vor Inkubation mit 100 µM DCF-DA beladen (*preloading*). Die Behandlung mit den Kupferverbindungen wurde nach 6 h bzw. 24 h abgebrochen, der Zellrasen mit HBSS gewaschen und die Fluoreszenz am Multiplattenlesegerät (TECAN® Infinite Pro M200) gemessen. Als Positivkontrolle wurde 1000 µM tBHP verwendet, welches eine Stunde vor der Messung direkt in das Inkubationsmedium hinzupipettiert wurde.

Abbildung 44 und Abbildung 45 zeigen die relative DCF-Fluoreszenz bezogen auf die unbehandelte Vehikelkontrollen nach CuO- und nach CuCl₂-Behandlung zu den Zeitpunkten 6 h (unterbrochene Linien) und 24 h (durchgezogene Linien). In den EA.hy926 ist eine rapide Entstehung von ROS nach 6 h zu sehen, was auf eine mögliche akzelerierte Aufnahme der CuO NP in die Zellen deutet. Zum selben Zeitpunkt zeigten die HaCaT Zellen nach Behandlung mit 5,0 µg/mL CuO ein 2,7-fach geringeres Level an oxidativem Stress. Eine Behandlung mit 10 µg/mL führte in HaCaT Zellen zu keiner Erhöhung der DCF-Fluoreszenz, wohingegen die EA.hy926 ein, im Vergleich zur Kontrolle, ein 6,1-fach höheres Signal aufwies.

Selbst hohe CuO NP Konzentrationen von 50 – 100 µg/mL führten nach 6 h in Keratinozyten maximal zu einer Steigerung des Fluoreszenzsignals auf den Wert 4,1. HaCaT Zellen zeigten ein gegensätzliches Verhalten auf das lösliche CuCl₂ (Abbildung 45). Das oxidative Stressniveau war bereits bei der niedrigsten getesteten Kupferkonzentration von 63,0 µM auf den 3,3-fachen Wert der Kontrolle angestiegen und nahm konzentrationsabhängig bis zu der Inkubation mit 1260 µM zu.

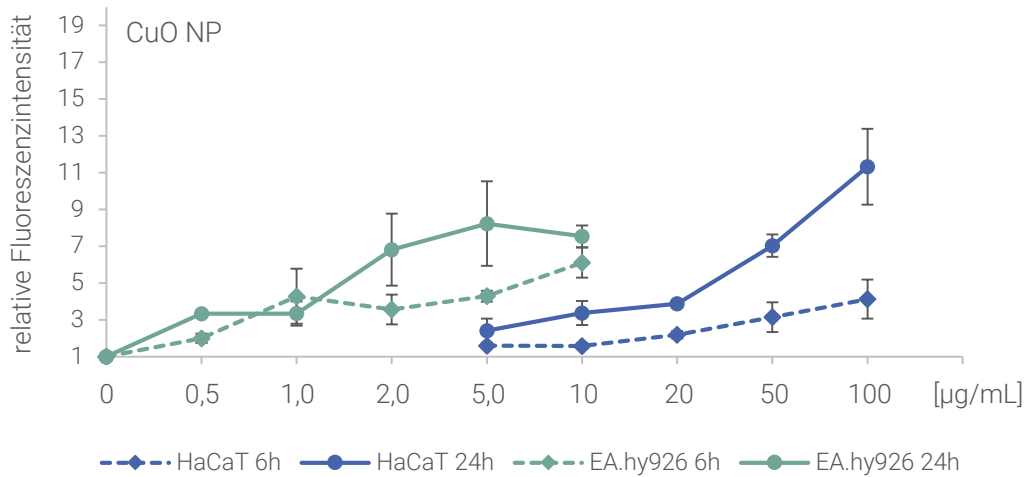


Abbildung 44: Relative DCF-Fluoreszenz bezogen auf die unbehandelte Vehikelkontrollen.

HaCaT und EA.hy926 Zellen wurden mit einer 100 μM DCF-DA Lösung in *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) für 1 h vorinkubiert. Die Proben wurden anschließend für 6 h (unterbrochene Linie) bzw. 24 h (durchgehende Linie) gegenüber Kupferoxidnanopartikeln (CuO NP) exponiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen.

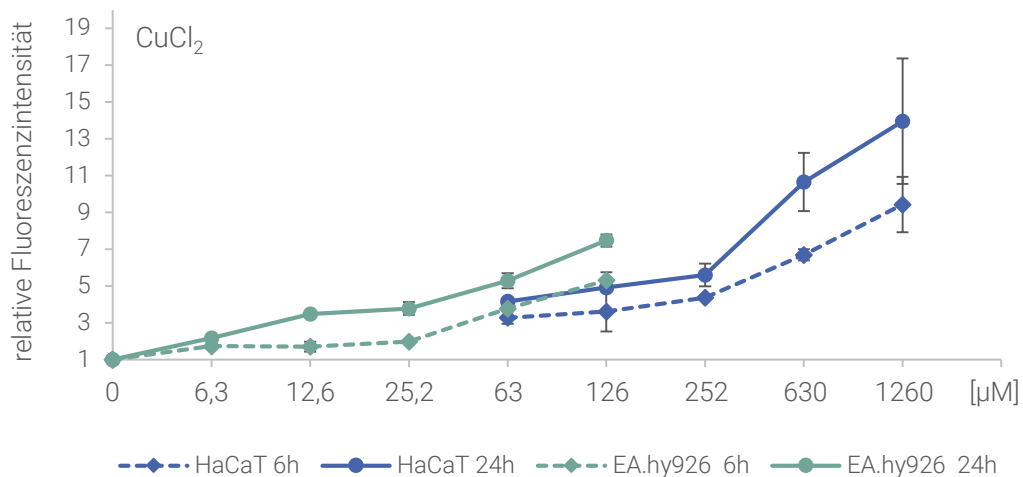


Abbildung 45: Relative DCF-Fluoreszenz bezogen auf die unbehandelte Vehikelkontrollen.

HaCaT und EA.hy926 Zellen wurden mit einer 100 μM DCF-DA Lösung in *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) für 1 h vorinkubiert. Die Proben wurden anschließend für 6 h (unterbrochene Linie) bzw. 24 h (durchgehende Linie) gegenüber Kupferchlorid (CuCl₂) exponiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen.

Nach 24 h (durchgezogene Linien) näherten sich die beiden Zelllinien in ihren DCF-Fluoreszenzsignalen an und die Unterschiede zwischen den Keratinozyten und dem Endothelgewebe waren weniger stark ausgebildet. Deutlich zu erkennen war das im Gegensatz zur 6 h-Inkubation erhöhte Signal der Partikelbehandlung in den HaCaT Zellen. Während nach 6 h das relative Fluoreszenzsignal nur um den Faktor von 2,2 (20 $\mu\text{g/mL}$), 3,1 (50 $\mu\text{g/mL}$) und 4,1 (100 $\mu\text{g/mL}$) gesteigert wurde, zeigte sich nach 24 h eine deutliche Zunahme von ROS und der Induktion des DCF-Signals um die Faktoren 3,9 (20 $\mu\text{g/mL}$), 7,0 (50 $\mu\text{g/mL}$) und 11,3 (100 $\mu\text{g/mL}$). Lösliche Kupferverbindungen zeigten nach 24 h ein nochmals

gesteigertes oxidatives Stresspotential in beiden Zelllinien und gipfelten in den 7,5- bzw. 14,0-fach erhöhten DCF-Fluoreszenzsignalen nach Behandlung mit den zytotoxischen CuCl_2 -Konzentrationen von $126 \mu\text{M}$ (EA.hy926) respektive $1260 \mu\text{M}$ (HaCaT).

Die große Diskrepanz der Fluoreszenzsignale beider Zelllinien kann nach 6-stündiger NP-Behandlung möglicherweise auf unterschiedliche Endozytoseraten der repräsentierten Gewebe zurückgeführt werden. Endothelzellen zeigten bereits nach 6 h eine doppelt bis dreifach so hohe intrazelluläre oxidative Stressantwort auf die Partikelbehandlungen, wie sie in den Keratinozyten mit den selben Behandlungskonzentrationen beobachtet wurde. Aus Aufnahmestudien von SiO_2 NP ging hervor, dass Keratinozyten (HaCaT) im Vergleich zu Lungenepithel (A549) und Monozyten (THP-1) eine deutlich geringere Partikelaufnahme zeigten. Neben der Partikelinternalisierung konnten auch Aussagen über die Aufnahmekinetik in den verschiedenen Zelllinien getroffen werden. Während A549 Zellen 15 nm große SiO_2 -Partikel bereits nach 2 h endozytierten, zeigten HaCaT Zellen keine Aufnahme der Nanopartikel in diesem Zeitraum. Erst nach 24-stündiger Behandlung waren SiO_2 NP in den Keratinozyten nachweisbar (HSIAO *et al.*, 2014). Ein analoges Bild ergab sich bei den hier durchgeführten Untersuchungen des oxidativen Stressniveaus. Beide Zelllinien zeigten nach 24 h nahezu identische DCF-Signale, was suggeriert, dass sich sowohl in HaCaT Zellen als auch in den Endothelzellen binnen 24 h ähnliche Mengen an ROS bildeten. Diese Beobachtung kann anhand der komplexen Membranbeschaffenheit der Keratinozyten erklärt werden. Die Zusammensetzung unterscheidet sich im Gegensatz zu anderen Zelltypen anhand einer Vielzahl hochvernetzter, schwerlöslicher Einlagerung von Prolin-reichen Proteinen wie Filaggrin, Involucrin und Loricrin. Es wird dabei vermutet, dass Keratinozyten der Aufnahmemechanismus der Clathrin-vermittelten Endozytose (CME) fehlt, welcher ein Hauptaufnahmeweg für die Internalisierung von Partikel mit einem Durchmesser von $60 - 200 \text{ nm}$ darstellt. Die CME ist ein rezeptorvermittelter Aufnahmeweg. Dabei identifizieren spezifische Rezeptoren Substrate oder Zielstrukturen und bilden Clathrin-beschichtete Einstülpungen der Zellmembran. Daraufhin kommt es zu einer Abschnürung dieser Vesikel, welche im späteren Verlauf der Endozytose mit Lysosomen verschmelzen und umschlossene Metallpartikel durch lysosomale Ansäuerung auflösen. Hohe intrazelluläre Metallkonzentrationen sind die Folge (HSIAO *et al.*, 2014; REJMAN *et al.*, 2004). Die CME findet vorzugweise in Endothelzellen, wie EA.hy926 statt. Ein dominanter Aufnahmeweg in Keratinozyten scheint dabei die Caveolae-vermittelte Endozytose zu sein. Dabei werden kleinere, flaschenförmige Abschnürungen ausgebildet, die Partikel mit einem Durchmesser von bis zu 100 nm erfassen. Eine anschließende Fusionierung mit Lysosomen findet im Verlauf der Endozytose zwar statt, es gibt jedoch Hinweise, dass ein gewisser Prozentsatz keine Ansäuerung erfährt (KISS UND BOTOS, 2009). Folglich ist die Freisetzung von Metallionen in HaCaT Zellen retardiert und die Toleranz gegenüber CuO NP größer.

Eine Fragestellung, welche nicht gänzlich geklärt werden konnte, betraf den ausgeprägten Effekt der löslichen Kupferverbindung auf die Endothelzellen. Weder die Ergebnisse aus den Zytotoxizitäts- oder den Genexpressionsuntersuchungen noch die Aufnahmestudien suggerierten, dass EA.hy926 in hohem Maße

sensitiv gegenüber CuCl_2 reagieren. Die starken Fluoreszenzsignale der DCF-Messungen zeigten jedoch, dass hohe Mengen von ROS bereits nach 6 h entstanden. Warum sich dieses hohe Schadpotential nicht in Genexpressionsmustern oder in einer hohen Letalität der Zellen äußerte, konnte nicht abschließend geklärt werden. Weitere Untersuchungen des intrazellulären ROS-Gehaltes in Bezug auf die Lebendzellzahl (zum Beispiel mittels Durchflusszytometer) sollten hierfür durchgeführt werden.

5.3 CHROMVERBINDUNGEN

In diesem Kapitel werden toxikologische Eigenschaften ausgewählter Cr(III)-Partikel charakterisiert und mit löslichen Cr(III)- und Cr(VI)-Verbindungen verglichen. Im Alltag erfolgt die dermale Exposition gegenüber partikulären Cr-Verbindungen zumeist durch Ledererzeugnisse wie Schuhe, Bekleidung, Schmuck und Möbel. Etwa 90 % aller Ledererzeugnisse sind dabei mit Cr-Salzen gegerbt und auch NP finden dabei im Gerbeprozess Anwendung (HEDBERG *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2019). Weiterhin werden Cr(III)-Oxid und Cr(III)-Hydroxid aufgrund ihrer Grünfärbung als Pigmente in Kosmetika und Tätowierfarben eingesetzt. (SCHREIVER *et al.*, 2017). Aus Literaturdaten geht hervor, dass starke Abweichungen bezüglich der toxikologischen Eigenschaften von partikulärem Cr(III)-Oxid postuliert werden. So zeigten Cr_2O_3 Partikel in Studien der Arbeitsgruppe von Horie und Kollegen/innen starke zytotoxische und ROS-generierende Effekte, die denen von hexavalentem Chrom stark ähnelten (HORIE *et al.*, 2013). In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, welchen Einfluss die Partikelgröße bei der toxikologischen Bewertung von Cr(III)-Oxid besitzt. Aus diesem Grund wurden neben den von Horie *et al.* verwendeten nanoskaligen Partikeln der Firma NanoAmor (Hersteller A) und den Cr_2O_3 NP der Fa. Sigma Aldrich (Hersteller B), die der Verifizierung der Ergebnisse aus den toxikologischen Untersuchungen dienten, auch höherskalige Mikropartikel der Fa. Lanxess (Hersteller C) eingesetzt.

Zunächst wurden die Cr_2O_3 Partikel der verschiedenen Hersteller mittels TEM und DLS charakterisiert und ihre Löslichkeit in Flüssigkeiten mit physiologisch relevanten pH-Werten untersucht. Im Anschluss wurden Zytotoxizitätsuntersuchungen der eingesetzten Cr-Verbindungen durchgeführt, woran sich Genexpressionsanalysen anschlossen. Die erlangten Ergebnisse wurden dann auf zellulärer Ebene mit entsprechenden Methoden nachvollzogen.

5.3.1.1 HYDRODYNAMISCHE GRÖßENVERTEILUNG

Für die Charakterisierung der Cr_2O_3 -Suspensionen wurden Untersuchungen mittels DLS durchgeführt. Die für die Berechnungen zugrundeliegenden Parameter der jeweiligen Zellkulturmedien wurden weitestgehend aus den Untersuchungen von CuO NP übernommen.

Tabelle 16: Hydrodynamischer Radius von Cr₂O₃ Partikeln in DMEM (10 % FKS) und DMEM-HG (10 % FKS).

Gezeigt sind Mittelwerte der Größenverteilung (Z-Average) und deren Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen, die in Dreifachbestimmung analysiert wurden.

Cr ₂ O ₃		10 µg/mL		20 µg/mL		50 µg/mL	
		DMEM	DMEM-HG	DMEM	DMEM-HG	DMEM	DMEM-HG
NanoAmor	[nm]	177 ± 16	280 ± 41	180 ± 11	240 ± 23	184 ± 10	249 ± 45
Sigma Aldrich	[nm]	433 ± n.b.	423 ± 43	531 ± 41	485 ± 28	575 ± 46	554 ± 34
Lanxess	[nm]	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

In DMEM waren die hydrodynamischen Radien der Partikel des Herstellers A um ca. 30 % kleiner als in DMEM-HG. Für die Partikel des Herstellers B zeigten sich größere hydrodynamische Radien im Keratinozyten-Medium (DMEM). Partikel des Herstellers C wiesen eine hohe Sedimentationsgeschwindigkeit auf und konnten daher nicht über das DLS-Verfahren analysiert werden, da dieses nur für stabile Lösungen geeignet ist.

Die Homogenität der Partikelsuspensionen wurde anhand des Polydispersitätsindex (PDI) beurteilt. Die Dispersität ist eine dimensionslose Zahl zwischen 0 und 1, wobei 0 eine monodisperse Lösung beschreibt, in der alle Partikel den gleichen Radius besitzen und 1 eine polydisperse Partikelsuspension, in der alle Partikel verschieden groß sind (Malvern Instruments Ltd., 2013).

Tabelle 17: Dispersität von Cr₂O₃ Partikeln in DMEM (10 % FKS) und DMEM-HG (10 % FKS).

Gezeigt sind Mittelwerte des Polydispersitätsindex (PDI) und dessen Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen, die in Dreifachbestimmung analysiert wurden.

Cr ₂ O ₃		10 µg/mL		20 µg/mL		50 µg/mL	
		DMEM	DMEM-HG	DMEM	DMEM-HG	DMEM	DMEM-HG
NanoAmor	[nm]	0,39 ± 0,02	0,44 ± 0,07	0,27 ± 0,01	0,31 ± 0,03	0,22 ± 0,00	0,29±0,07
Sigma Aldrich	[nm]	0,68 ± n.b.	0,37 ± 0,02	0,57 ± 0,00	0,53 ± 0,01	0,37 ± 0,00	0,40±0,04
Lanxess	[nm]	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Die Dispersität der gemessenen Proben hing stark von den verschiedenen Herstellern ab. Die Partikel A waren deutlich monodisperser als die Partikel B. Die Partikel C waren zu polydispers und sedimentierten zu schnell, als dass die Analysen verwertbare Ergebnisse lieferten. Die PDI der NP der Hersteller A und B nahmen mit steigender Partikelkonzentration ab. Aufgrund der zum Teil hohen Polydispersitäten wurden die erlangten Ergebnisse mithilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit anschließender Partikelgrößenverteilungsanalyse verifiziert.

5.3.1.2 ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN

Zur Charakterisierung der primären Partikelgröße, der Größenverteilung und der morphologischen Form wurden die Partikel mittels Transmissionselektronenmikroskopie untersucht (Philips CM 200 FEG/ST, Philips). Cr₂O₃ Partikel wurden entweder in sterilem Reinstwasser oder in entsprechenden Medien in

unterschiedlichen Konzentrationen suspendiert. Nach der Sonifizierung wurden die Partikelsuspensionen auf einem Kupfergitter (TEM-Grits) aufgetragen und anschließend vor der Analyse getrocknet. Zur Analyse des Durchmessers einzelner, nicht überlappender Partikel und ihrer Größenverteilung wurden die TEM-Bilder mittels Bildauswertesoftware *ImageJ* (U.S. National Institutes of Health, Maryland, USA) digital vermessen. Dabei wurden mindestens 300 - 500 Partikel ausgezählt.

Zwischen den getesteten Partikeln wurden keine Unterschiede in der Morphologie festgestellt. Die elementare Zusammensetzung der Cr_2O_3 Partikel wurde mittels XPS gemessen (siehe Abbildung 50). Ein Unterschied in der Partikelgröße der unterschiedlichen Testmaterialien war messbar. Sowohl die Partikel des Herstellers A als auch die Partikel des Herstellers B lagen mit einem gemittelten Durchmesser von 41,8 nm respektive 78,0 nm unter der durch die ISO/TS 80004 vorgesehenen Definitionsgrenze von 100 nm und galten somit als Nanopartikel. Die Partikel des Herstellers C konnten als Mikropartikel identifiziert werden und wiesen eine durchschnittliche Größe von 145,5 nm auf (siehe Abbildung 46).

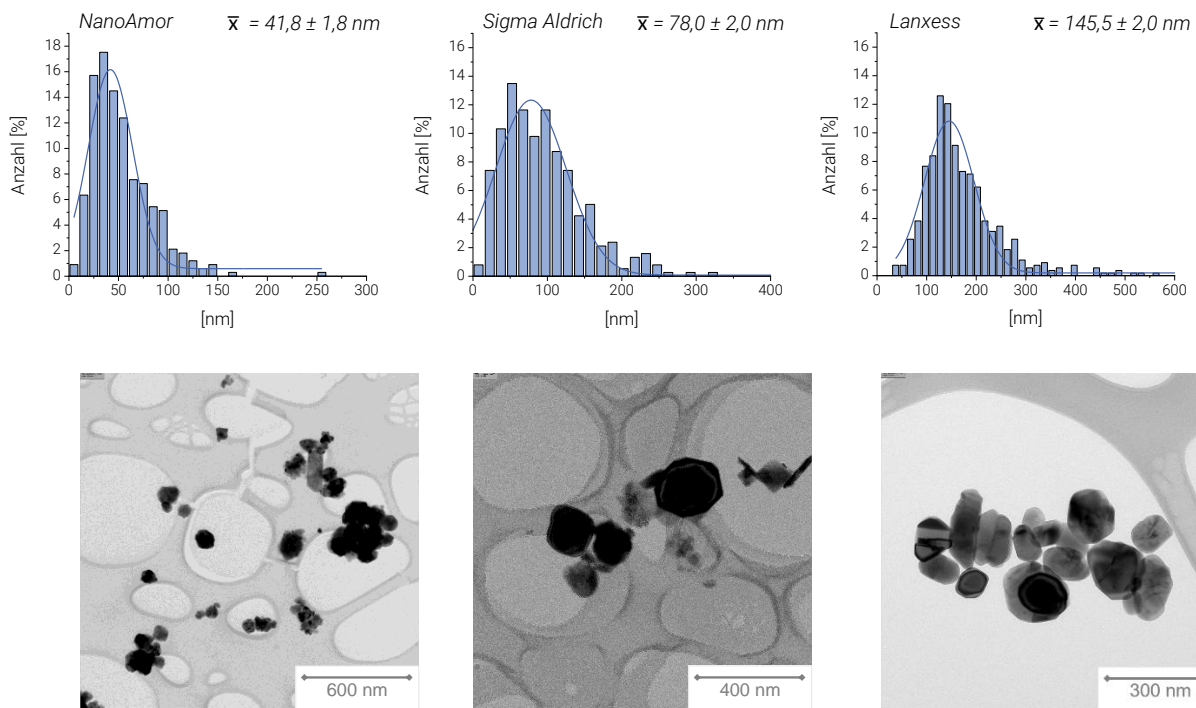


Abbildung 46: Prozentuale Partikelgrößenverteilung der verwendeten Chrom(III)-Oxid-Partikel.

Die Partikelsuspensionen wurden in Konzentrationen von 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Wasser hergestellt.

5.3.2 ZYTOTOXIZITÄT DER CHROMVERBINDUNGEN

Die Toxizität der getesteten Cr-Verbindungen wurde mithilfe des unter Abschnitt 4.3 eingeführten ATP-Assays bestimmt. Nachfolgend sind die zytotoxischen Wirkungen von Cr_2O_3 Partikeln sowie den löslichen Verbindungen CrCl_3 und $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ aufgeführt. Die ATP-Gehalte wurden dabei auf die der unbehandelten Keratinozyten bezogen.

5.3.2.1 ATP-ASSAY

Die HaCaT Zellen wurden mit 2 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL und 50 µg/mL sowie den äquimolaren Cr(III)- / Cr(VI)-Konzentrationen von 26,4 µM, 66 µM, 132 µM, 264 µM und 660 µM für 24 h inkubiert. Für $K_2Cr_2O_7$ wurde der Konzentrationsbereich um die Behandlungen mit 1,32 µM und 6,6 µM angepasst, da bereits bei 26,4 µM eine starke zytotoxische Wirkung zu beobachten war.

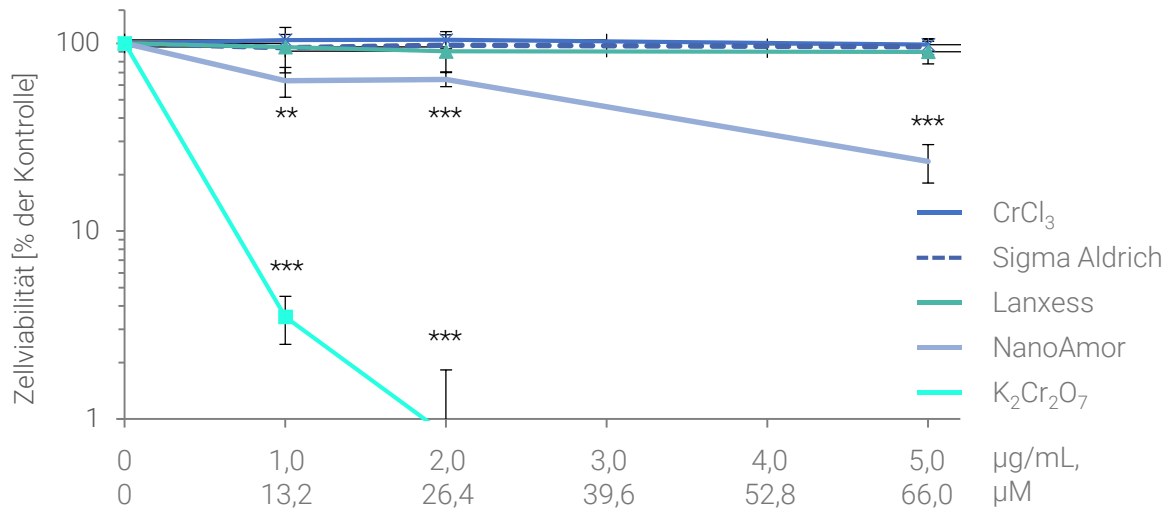


Abbildung 47: Logarithmische Darstellung der ATP-Gehalte von HaCaT Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Chrom(III)-Oxid (Cr_2O_3), Chrom(III)-Chlorid ($CrCl_3$) und Kaliumdichromat ($K_2Cr_2O_7$).

Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett's T Post-Hoc-Test: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$. 2,0 µg/mL Cr_2O_3 entsprechen 26,4 µM Cr^{3+}/Cr^{6+} bei vollständiger Freisetzung.

Sowohl die Partikel B, als auch die Partikel C und das lösliche $CrCl_3$ hatten wenig Einfluss auf die zellulären ATP-Gehalte. In den höchsten getesteten Konzentrationen wurde der ATP-Status der HaCaT Zellen um maximal 21,6 % \pm 10,3 % gesenkt ($CrCl_3$). 50 µg/mL der Partikel C führten zu einer Abnahme auf 97 % \pm 12,3 %. Der ATP-Gehalt der Keratinozyten zeigte eine leichte Zunahme nach Behandlung von 50 mg/mL auf 106,5 % \pm 8,6 %. Die Inkubation mit Partikeln des Herstellers A führte hingegen zu einer deutlichen Depletion der zellulären ATP-Konzentrationen ab 5 µg/mL auf 81,1 % \pm 4,4 %. Es zeichnete sich eine konzentrationsabhängige Reduktion der Zellviabilität auf 65,7 % (10 µg/mL) bzw. auf 48,4 % (20 µg/mL) ab, die bei einer Zellviabilität von 20,7 % (50 µg/mL) gipfelte und nur von löslichem Cr(VI) übertroffen wurde (siehe Abbildung 47).

5.3.2.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Während $K_2Cr_2O_7$ bereits in niedrigen mikromolaren Konzentrationen eine starke Reduktion der intrazellulären ATP-Gehalte hervorrief, zeigte $CrCl_3$ nur einen geringen Einfluss auf die Viabilität der Keratinozyten. Partikel der Hersteller B und C waren erst in hohen Konzentrationen zytotoxisch und wirkten sich in moderaten Partikelkonzentrationen nicht negativ auf den intrazellulären ATP-Gehalt aus.

Die Partikel des Herstellers A wiesen bereits in den niedrigsten Applikationsdosen eine Reduktion der Viabilität auf.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Cr(III) aufgrund seiner oktaedrischen Struktur als Hexaaquachrom(III)-Komplex $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ die Zellmembran nur langsam durchdringt. Die zelluläre Aufnahme von Cr(III) erfolgt, wie bei anderen Metallionen z.B. Al(III), In(III), Bi(III) und Fe(III), Transferrin-vermittelt und ist hundertfach geringer, als die von Cr(VI) (VINCENT UND LOVE, 2012; DENG *et al.*, 2015; PAVESI UND MOREIRA, 2020).

Cr(VI) liegt in Abhängigkeit des pH-Wertes in der tetraedrischen Koordination, als Chromat (CrO_4^{2-}) vor. Höhere pH-Werte ($\text{pH} > 6,0$) begünstigen die Kondensation zu Dichromaten ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$). Dabei bilden sich eckenverknüpfte Tetraeder aus. Der Transport in das Zytosol findet hierbei, aufgrund der Strukturähnlichkeit zu Sulfaten, über entsprechende Anionentransporter statt (ZHITKOVICH, 2011). Intrazellulär wird Cr(VI) durch Ascorbinsäure (Asc), Glutathion (GSH) und andere Thiolgruppen-tragende Proteine reduziert (Abbildung 48). Cr(VI) reagiert dabei nicht in einem Schritt zu Cr(III). In Abhängigkeit des Reduktionsmittels entstehen neben dem redoxaktiven Cr(V)-Intermediat und dem nicht oxidierenden Cr(IV) auch schwefel- und kohlenstoffbasierte Radikale. Die Depletion der zellulären antioxidativen Kapazität sowie die Entstehung von den Radikalen führen so letztendlich zu einem erhöhten ROS-Level der Zelle, was wiederum die Schädigung von Proteinen, Lipiden und DNA-Basen zur Folge hat und die hohe Zytotoxizität von Cr(VI) gegenüber von Cr(III) erklärt (DELOUGHERY *et al.*, 2014; ZHITKOVICH, 2011).

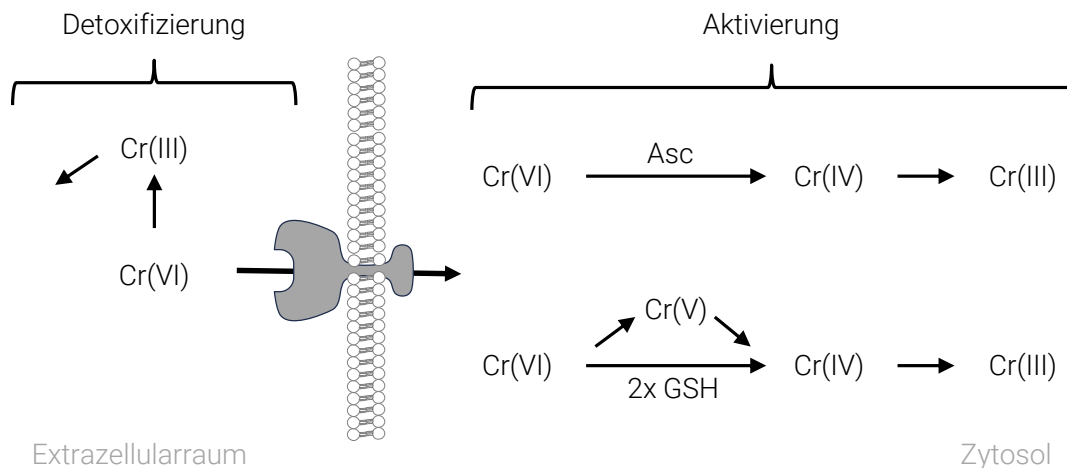


Abbildung 48: Intrazelluläre Reduktion von Chrom(VI) zu Chrom(III).

Extrazelluläre Reduktion von Cr(VI) zu Cr(III) führt zu einer Detoxifizierung, da Cr(III) die Zellmembran nur schlecht durchdringen kann. Cr(VI) hingegen tritt via Anionentransporter in das Zytosol, wo es durch Ascorbinsäure (Asc) in einer Zwei-Elektronenreduktion zu nicht oxidierendem Cr(IV) reduziert wird. Glutathion (GSH) reduziert Cr(VI) in zwei Schritten zu Cr(IV), wobei redoxaktives Cr(V) entsteht (modifiziert nach ZHITKOVICH, 2011).

In Keratinozyten zeigte sich eine stark ausgeprägte Zytotoxizität der Cr_2O_3 Partikel des Herstellers A im Vergleich zu den anderen Cr_2O_3 Verbindungen. Die Ergebnisse der DLS- und TEM-Messungen ergaben, dass die Partikel des Herstellers A mit einem hydrodynamischen Radius von ca. 180 nm und einer

mittleren Partikelgröße von $41,8 \text{ nm} \pm 1,8 \text{ nm}$ die kleinsten Partikel im Feld der getesteten Verbindungen waren. Aufgrund der geringen Größe wurde dabei von einer abweichenden Aufnahmekinetik ausgegangen. Auch Änderungen der Oberflächenreaktivität wurden bei den Cr_2O_3 NP vermutet.

NP besitzen im Gegensatz zu höherskaligen Partikeln und Feststoffen ein größeres Oberfläche-zu-Masse Verhältnis. Dadurch unterscheiden sie sich zum Teil maßgeblich in ihren physikochemischen Eigenschaften. Aus den genannten Gründen wurden daher Löslichkeitsstudien mit der in Kapitel 4.11 beschriebenen kolorimetrischen Methode durchgeführt. Die Partikelsuspensionen wurden dabei sowohl in bidestilliertem Wasser als auch in ALF hergestellt und deren Überstände analysiert. Die Messungen erfolgten direkt, nach 24 h, 48 h und 120 h (Abbildung 49). Die Löslichkeitsstudien wurden von Frau M.Sc. Franziska Fischer im Rahmen eines gemeinsamen Projektvorhabens realisiert.

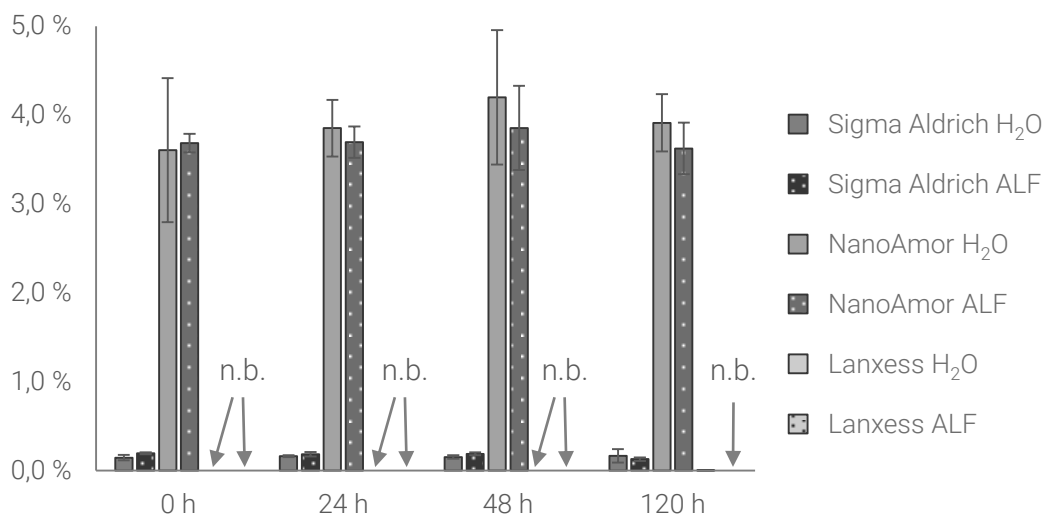


Abbildung 49: Kolorimetrischer Nachweis der prozentualen Chrom(VI)-Anteile in Chrom(III)-Oxid-Partikeln.

Die Messungen erfolgten nach 24 h, 48 h und 120 h mittels des spezifischen Komplexbildners Diphenylcarbazid (DPC) bei 540 nm. Die Partikelsuspensionen wurden mit einer Konzentration von 1 mg/mL in den Testflüssigkeiten Wasser und artifizierlicher lysosomaler Flüssigkeit (ALF) resuspendiert und für die o.g. Zeitspannen äquilibriert. Vor der Messung mittels DPC wurden die Proben einer Zentrifugation bei 4 °C und 16000 x g unterzogen und im Anschluss die Absorption des Chrom(VI)-DPC-Komplexes am Multiplattenlesegerät bei 540 nm gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

In beiden Testflüssigkeiten war eine initiale Freisetzung von Cr(VI)-Ionen aus den Partikeln des Herstellers A erkennbar. Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen konnte keine Steigerung des sechswertigen Chroms über die Dauer von 120 h nachgewiesen werden. Auch zeigten die unterschiedlichen pH-Werte der Testflüssigkeiten keinen Einfluss auf die Freisetzung des hexavalenten Chroms. Das Mittel an freiem Cr(VI) belief sich im gesamten Testzeitraum auf $3,72 \% \pm 0,10 \%$ in ALF und $3,89 \% \pm 0,24 \%$ in Wasser bezogen auf die jeweilige Einwaage. Die Partikel des Herstellers B wiesen einen Cr(VI)-Gehalt von $0,18 \% \pm 0,03 \%$ in ALF und $0,16 \% \pm 0,01 \%$ in Wasser auf. Auch hier war somit in Anbetracht der Standardabweichungen weder eine Zeitabhängigkeit der Freisetzung, noch eine

bevorzugte Löslichkeit in Abhängigkeit der Testlösung zu erkennen. Partikel des Herstellers C zeigten keinerlei Verschiebung des Absorptionsspektrums von DPC. Die Konzentrationen von Cr(VI) lag nach allen Messzeitpunkten unterhalb der Bestimmungsgrenze liegen laut Herstellerangaben bei maximal 5 ppm.

Zur Freisetzung von Cr(VI) aus Cr₂O₃ Partikeln existieren in der Literatur mehrere Theorien. Cr₂O₃ wird dabei als äußerst stabile und chemisch inerte Verbindung beschrieben, die im physiologischen Milieu unlöslich ist und für dessen Oxidation äußerst harsche Bedingungen herrschen müssen (JANIÁK *et al.*, 2018). Für Nanopartikelsuspensionen wurde jedoch diskutiert, dass aufgrund des erhöhten Redoxpotentials der Cr₂O₃ NP-Suspension zu Oxidationsreaktionen von Cr(III) zu höherwertigen Cr-Spezies, wie Cr(VI) möglich sind (COSTA *et al.*, 2016).

Eigene Beobachtungen sprechen jedoch gegen eine Freisetzung von Cr(III) aus den untersuchten Cr₂O₃ NP mit anschließender Oxidation zu Cr(VI). So zeigten sich keinerlei Veränderungen der freien Cr(VI)-Konzentrationen im Testzeitraum von über 120 h. Wäre die Quelle des freien Cr(VI) das aus Cr₂O₃ herausgelöste, oxidierte Cr(III), so sollten kontinuierlich weitere Cr-Ionen freigesetzt werden und somit eine zeitliche Zunahme des Cr(VI)-Gehaltes feststellbar sein.

Abschließende Klärung brachte die Analyse der Cr-Partikel mittels Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS), welche von Herrn Prof. Dr. Dirk Walter in den Gefahrstofflaboratorien des Universitätsklinikums Gießen durchgeführt wurde. Die XPS-Analysen der Partikel des Herstellers A zeigten einen für Cr(VI) charakteristischen Peak bei einer Bindungsenergie von 581 eV. Abweichende Spektren wurden für die Cr₂O₃ anderer Hersteller detektiert, wobei kein entsprechender Cr(VI)-Peak nachgewiesen werden konnte (Abbildung 50). Je nach Herstellungsverfahren kommt es bei der Synthese nanoskaliger Metallpartikel aufgrund der Kristallisationskinetik zu Fehlstellen in den ausgebildeten Kristallgittern. Das Keimwachstum wird beim Kristallisationsprozess gequench, wodurch metastabile Verbindungen entstehen. Im Inneren besitzen die Partikel eine höhere Ordnung, da hier mehr Zeit zur Ausbildung der Kristallstruktur zur Verfügung steht. Das Kristallgitter auf der Partikeloberfläche ist, aufgrund des abrupten Stoppens der Kristallisation, ungeordnet und besitzt Fehlstellen, die mit Metallionen anderer Valenz besetzt sind und sich bei Kontakt mit wässrigen Medien herauslösen. Es wird daher vermutet, dass diese Oberflächenbeschaffenheit auf die Partikel des Herstellers A zutrifft und die Freisetzung von Cr(VI) nach Kontakt mit Wasser für die Unterschiede hinsichtlich der Zytotoxizität sorgen.

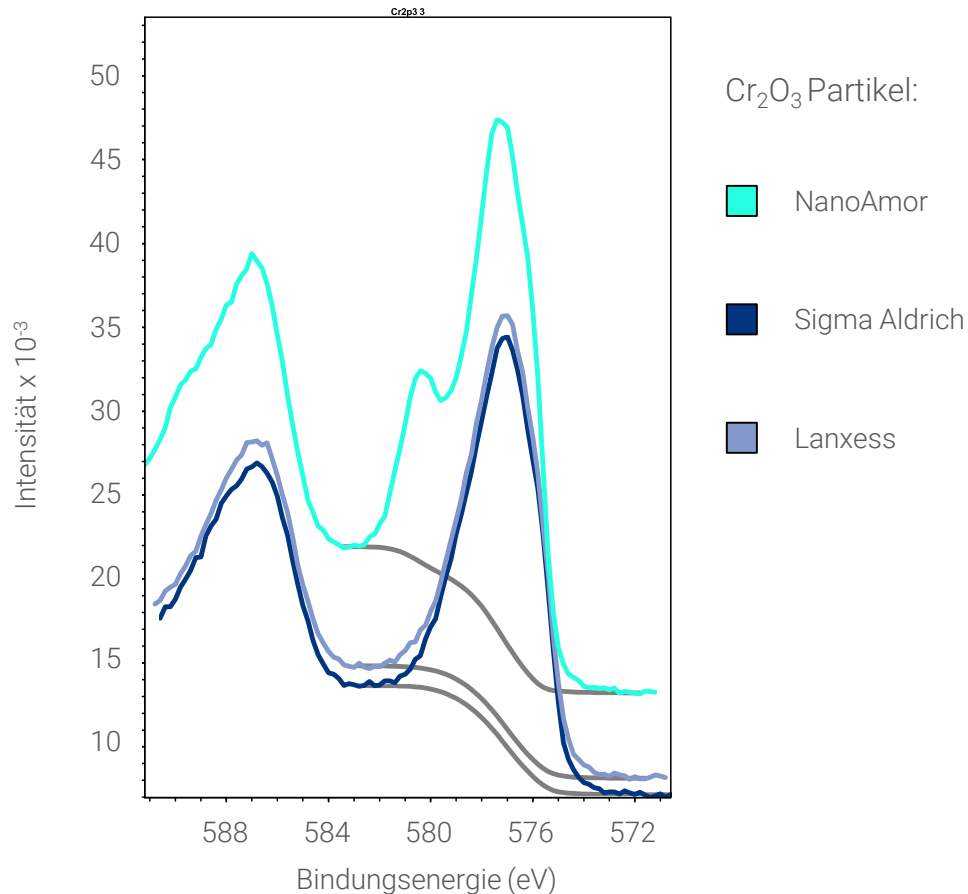


Abbildung 50: Spektren der Röntgenphotoelektronenspektroskopie von Chrom(III)-Oxid-Partikeln der Hersteller NanoAmor, Sigma Aldrich und Lanxess.

5.3.3 GENEXPRESSION

Die Genexpressionsanalysen wurden in Keratinozyten analog zu den Untersuchungen von Kupferverbindungen durchgeführt. Die HaCaT Zellen wurden für 24 h gegenüber den partikulären und den löslichen Cr-Verbindungen exponiert. Chromchlorid wurde als lösliche Cr(III)-Referenz untersucht. Die Konzentrationsbereiche wurden hierbei aufgrund der geringen Zytotoxizität bis in den niedrigen millimolaren Bereich gewählt, um eine zelluläre Schadensantwort auf Genexpressionsebene hervorzurufen. Als lösliche Cr(VI)-Referenzverbindung kam Kaliumdichromat zum Einsatz, dessen erhöhte Zytotoxizität ebenfalls eine Korrektur der Inkubationskonzentrationen erforderte. Konzentrationen von 2,64 μM (entsprechend 0,2 $\mu\text{g/mL}$ Cr₂O₃) bis 66 μM (entsprechend 5,0 $\mu\text{g/mL}$ Cr₂O₃) fanden hierbei Anwendung.

Ziel war es, potentielle Wirkmechanismen der Cr-Verbindungen anhand der Genexpressionsanalysen in Hautzellen aufzuklären. Die unterschiedlichen Genexpressionsmuster der HaCaT Zellen sind im Folgenden als *Heatmaps* dargestellt. Es handelt sich bei den Darstellungen um Zusammenfassungen aus den im Anhang 8.9 aufgeführten globalen Genexpressionsdaten, bei denen die Expressionsmuster aller

95 untersuchten Gene aufgeführt sind. Die untenstehende Auswahl umfasst lediglich Gene, deren Induktion um den \log_2 -fachen Faktor ± 1 verstärkt exprimiert oder reprimiert wurden. Als Referenz dienten dabei die unbehandelten Kontrollen.

Die Expositionen sowohl gegenüber den Partikeln B als auch den Partikeln des Herstellers C zeigten keine biologisch relevanten Effekte in den applizierten Konzentrationsbereichen. Nach Behandlung mit den Partikeln B zeigten die Gene *IL-8* und *VEGFA*, beides Gene der epithelialen Immunantwort, nach Inkubation mit hohen Partikelkonzentrationen die Tendenz einer Geninduktion. Sie blieben jedoch mit \log_2 -fachen Werten von 0,46 bzw. 0,86 unterhalb des Schwellenwertes von 1,0, der für eine relevante Beeinflussung der Genexpression festgelegt wurde. Die Partikel A riefen zum Teil starke Veränderungen der Genexpressionsprofile hervor. Ausgeprägte Dosis-Wirkungsbeziehungen und konzentrationsabhängige Reduktionen der Expressionsniveaus äußerten sich dabei in den Genclustern der oxidativen Stressantwort, der Zellzyklusregulation und der Apoptose.

In der höchsten Konzentration hemmten NP des Herstellers A die Genexpression antioxidativ wirkender Gene wie *CAT* (Katalase), *GCLC* und *GSR*. Eine konzentrationsabhängige Expressionsänderung war auch bei *HSPA1A* ersichtlich. Die Ausgangstranskriptmengen wurden bei der Behandlung mit 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ auf -0,97 und bei 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ auf -1,3 gesenkt. *NFKB1* und *NFKB2*, die für die Proteine p105 und p100 codieren und wichtige Präkursoren für den Transkriptionsfaktor NF κ B (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*) darstellen, wurden ebenfalls reprimiert. Der Proteinkomplex NF κ B wird dabei durch seinen Inhibitor NF κ BIA in einem negativen *Feedback-Loop* reguliert. In zellulären Stresssituationen, die sich in einem Anstieg an Inflammationsmarkern oder einem erhöhten ROS-Niveau manifestieren, kommt es zu einer Abspaltung von NF κ BIA und der Translokation des freien NF κ B in den Zellkern. Dort wirkt es als Transkriptionsfaktor für eine Vielzahl von Stress-assoziierten Genen (SAVINOVA et al., 2009). Die höchste Repression erfuhr das Gen *MAP3K5*, welches für ASK1 (*apoptosis signal regulating kinase 1*) codiert. Die Transkriptionsrate wurde nach 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ um -1,8, bei 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -3,5-fach und bei 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -4,2-fach reduziert.

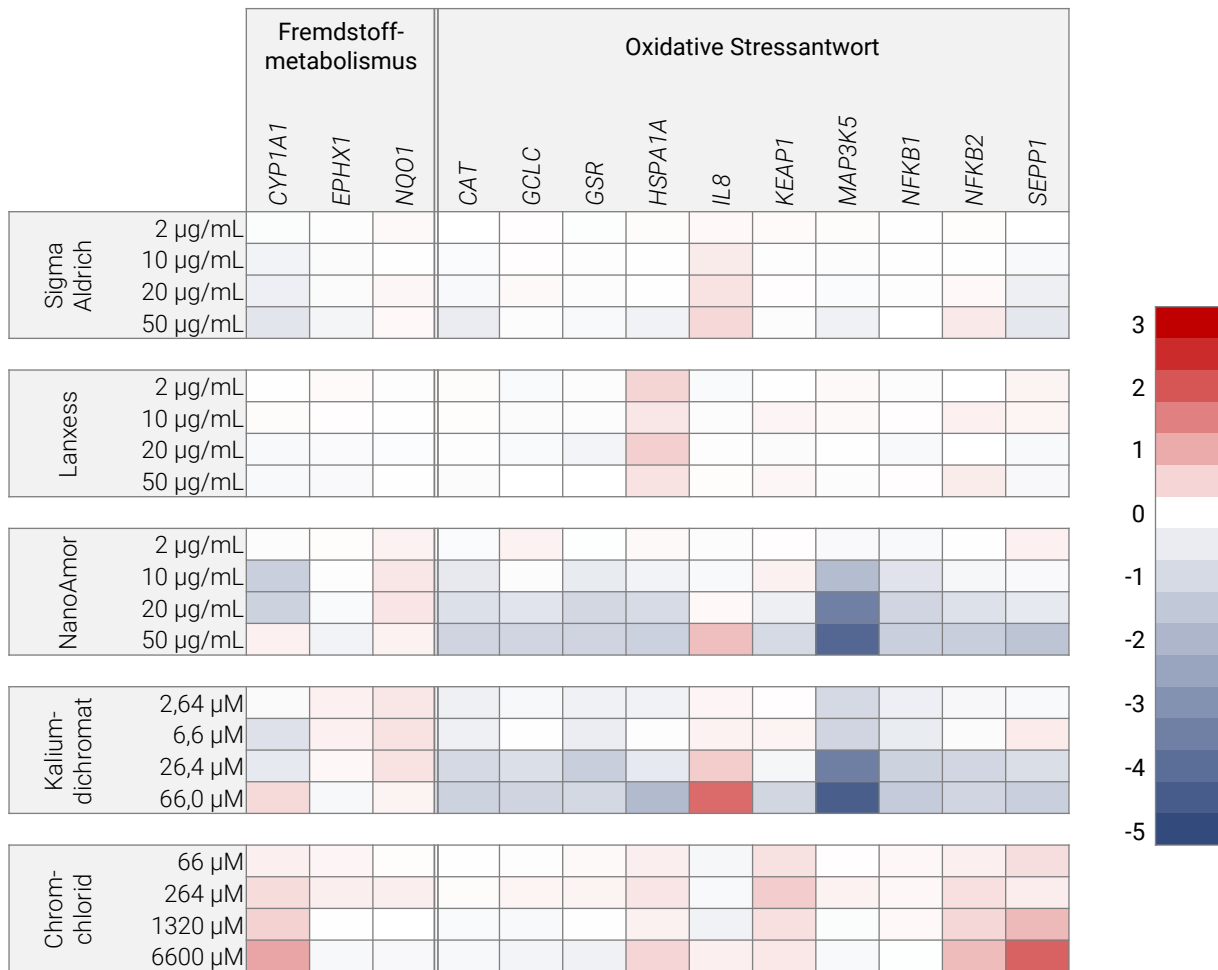


Abbildung 51: Beeinflussung der Genexpression von Genen des Fremdstoffmetabolismus und der oxidativen Stressantwort nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Chromoxid-Partikeln der Hersteller Sigma Aldrich, Lanxess und NanoArmor sowie den löslichen Chrom(VI)- und Chrom(III)-Verbindungen Kaliumdichromat und Chromchlorid in humanen Keratinozyten. Eine Rotfärbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine verminderte Genexpression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Damit lagen nach 24 h, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, noch 28,7 %, 8,8 % bzw. 5,4 % der Ausgangstranskriptmengen vor. Wie der Name bereits impliziert, spielt ASK1 eine entscheidende Rolle bei der Induktion der Apoptose. Nach schweren Schädigungen auf zellulärer Ebene wird als angemessene Reaktion der Zelltod eingeleitet. Dementsprechend führt eine Dysfunktion der apoptotischen Regulationswege zu einer Hemmung des programmierten Zelltods und zu einer Verschiebung hin zu unkontrollierten nekrotischen Zelltodmechanismen, die zum Teil schwere Entzündungsreaktionen zur Folge haben. Eine Vielzahl an Studien belegt, dass eine Herunterregulation von ASK1 mit einem Anstieg des zellulären Stressniveaus assoziiert wird und die Inzidenz einer Krebsentstehung erhöht ist (RYUNO et al., 2017).

Neben MAP3K5 erfuhren weitere Gene eine Repression, die an der Apoptose und der Zellzyklusregulation beteiligt sind (Abbildung 52). Hierzu gehörte das Gen *APAF1*, welches für den *apoptotic protease activating*

factor 1 codiert. APAF1 ist an der Cytochrom-C-abhängigen Apoptose beteiligt. Freigesetztes, mitochondriales Cytochrom-C wird durch APAF1 gebunden, worauf dieses eine Konformationsänderung (Oligomerisierung) erfährt und in nachgeschalteten Prozessen Procaspasen rekrutiert und so die Caspase-Kaskade aktiviert. APAF1 gilt dabei als zentraler Aktivator der intrinsischen Apoptose (SHAKERI et al., 2017).

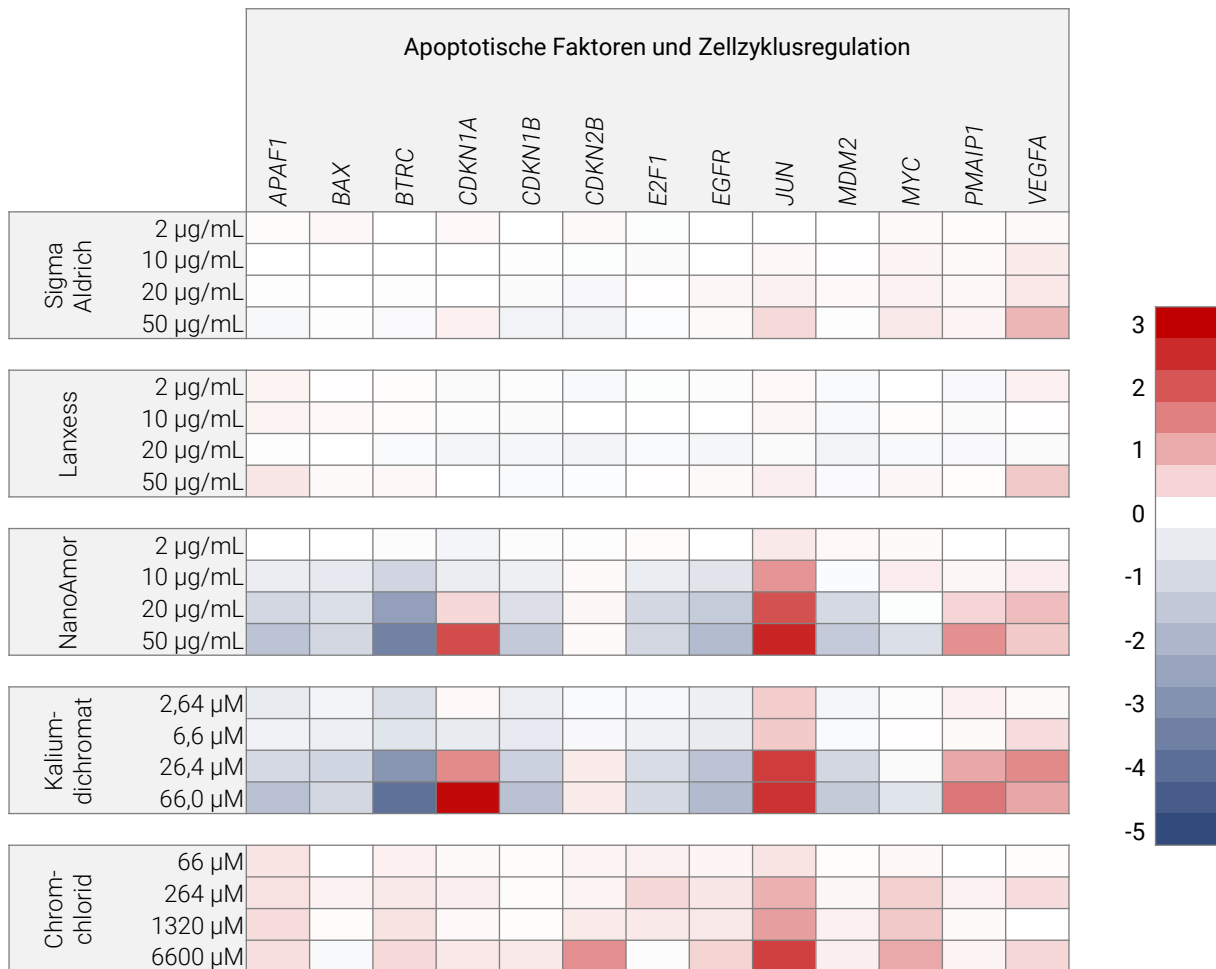


Abbildung 52: Beeinflussung der Genexpression von Genen apoptotischer Faktoren und Zellzyklusregulatoren nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Chromoxid-Partikeln der Hersteller Sigma Aldrich, Lanxess und NanoAmor sowie den löslichen Chrom(VI)- und Chrom(III)-Verbindungen Kaliumdichromat und Chromchlorid in humanen Keratinozyten.

Eine Rotfärbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine verminderte Genexpression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Eine weitere Schlüsselrolle der Apoptose nimmt dabei das stark reprimierte Gen *BTRC* (*beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase*) ein. Bereits 10 µg/mL NP des Herstellers A zeigten eine Minderung der Transkriptmenge um ca. 55 %. Die Behandlung in der höchsten Konzentration führte zu einer starken Inhibierung der Ableserate und einer relativen Transkriptmenge von 9,3 % bezogen auf die Kontrolle. *BTRC* codiert für eine E3-Ubiquitin-Ligase, die an der Ubiquitinierung und dem Abbau des NFκB-Inhibitors A (NFκBIA) beteiligt ist. Eine ausbleibende Inhibition von NFκB führt zu dessen Translokation in den Zellkern und der Induktion proapoptotischer Gene (VUCIC et al., 2011).

JUN zeigte im *Cluster* der Zellzyklusregulatoren die höchste Induktion. Nach Inkubation mit 10 µg/mL trat eine um den log₂-fachen Wert von 1,25 erhöhte Transkriptionsrate auf und diese wuchs mit steigender Cr₂O₃-Konzentration bis auf den Wert 2,57 an (50 µg/mL). Das Genprodukt c-JUN fungiert dabei als Transkriptionsfaktor, welcher an der zellulären Progression und Mitogenese beteiligt ist und ebenso als potenter Auslöser des programmierten Zelltods gilt (AMATI *et al.*, 1993; IP UND DAVIS, 1998). Eine Initiation des Genes lässt auf transkriptioneller Ebene eine erhöhte Apoptoserate vermuten.

Das Gen *CDKN1A*, welches für das Protein p21 codiert, ist neben der Initiation des Zellzyklusarrestes auch an Signalwegen der DNA-Reparatur und -Replikation sowie der Apoptose beteiligt (DUTTO *et al.*, 2015). Das Protein p27, für welches das Gen *CDKN1B* codiert, stellt einen Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen dar. p21 wurde durch die NP des Herstellers A in den HaCaT Zellen konzentrationsabhängig induziert. *CDKN1B* erfuhr nach Behandlung mit 50 µg/mL eine Minderung der Transkriptmenge um 60 % (Abbildung 52). Obwohl die transkriptionelle Regulation von *CDKN1B* im Vergleich zur Ubiquitin-vermittelten Regulierung des p27-Niveaus eine eher untergeordnete Rolle spielt, zeigten aktuelle Studien, dass sowohl der JUN-assoziierte Transkriptionsfaktor AP-1 als auch der Differenzierungsinhibitor 3 (*inhibitor of differentiation 3*, ID3) repressiv auf die Transkription von *CDKN1B* wirken (BACHS *et al.*, 2018). Der reprimierende Effekt von ID3 auf die Transkriptionsrate von *CDKN1B* wurde in dermalen Fibroblasten vor allem während der Wundheilung beobachtet (CHASSOT *et al.*, 2007). Es liegt daher nahe, dass es während einer Exposition gegenüber Cr-Ionen, durch die erhöhte Expression von *JUN* und dem Inflammationsmarker *IL-8*, zu einer Hemmung der Expression von *CDKN1B* kommt.

PMAIP1 codiert für das proapoptotische Protein NOXA und erfuhr eine dosisabhängige Induktion. Durch Behandlung mit den höchsten Konzentrationen wurde NOXA um den log₂-fachen Wert von 1,3 induziert, was als Indiz für apoptotische Prozesse der Keratinozyten gilt (ELMORE, 2007).

DNA-Schadensantwort- sowie DNA-Reparaturgene zeigten, bis auf das Sensorgen *GADD45A*, eine reprimierte Expression (Abbildung 53 und Abbildung 54). *GADD45A* codiert dabei für das Protein GADD45α der GADD-Familie. Gene dieser Familie werden durch genotoxischen Stress sowohl p53-abhängig als auch p53-unabhängig vermehrt transkribiert. Vertreter der GADD-Familie nehmen so Einfluss auf zelluläre Prozesse und sind entscheidende Regulatoren für die Zellzyklusprogression und die Apoptose (LIEBERMANN UND HOFFMAN, 2008). NP des Herstellers A führten in 23 von 28 untersuchten Genen unterschiedlicher DNA-Schadensantwort- und -Reparaturmechanismen zu einer Repression. Die gehemmte Transkription zeigte sich besonders ausgeprägt bei den Genen *ATR* (*ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*), *BRCA2* (*breast cancer 2, early onset*), *ERCC4/XPF* (*excision repair cross-complementation group 4*). Die Transkriptionsraten der genannten Gene wurden in den höchsten Konzentrationen um ca. 80 % reduziert.

Es zeigte sich keinerlei Spezifität in der Modulation der verschiedenen Reparaturmechanismen, was darauf schließen lässt, dass kein einzelnes Schadensmuster durch die Cr-Partikel hervorgerufen wurde,

sondern vielmehr die Reparaturkapazität unter hohen NanoAmor Partikelkonzentrationen herunterreguliert wurde. Im direkten Vergleich mit den Genexpressionsergebnissen der löslichen Cr(VI)-Verbindung fiel auf, dass sich die Genexpressionsmuster von $K_2Cr_2O_7$ und die der Cr_2O_3 NP des Herstellers A stark ähnelten und nahezu identische Induktionen bzw. Repressionen der einzelnen Gene zeigten.

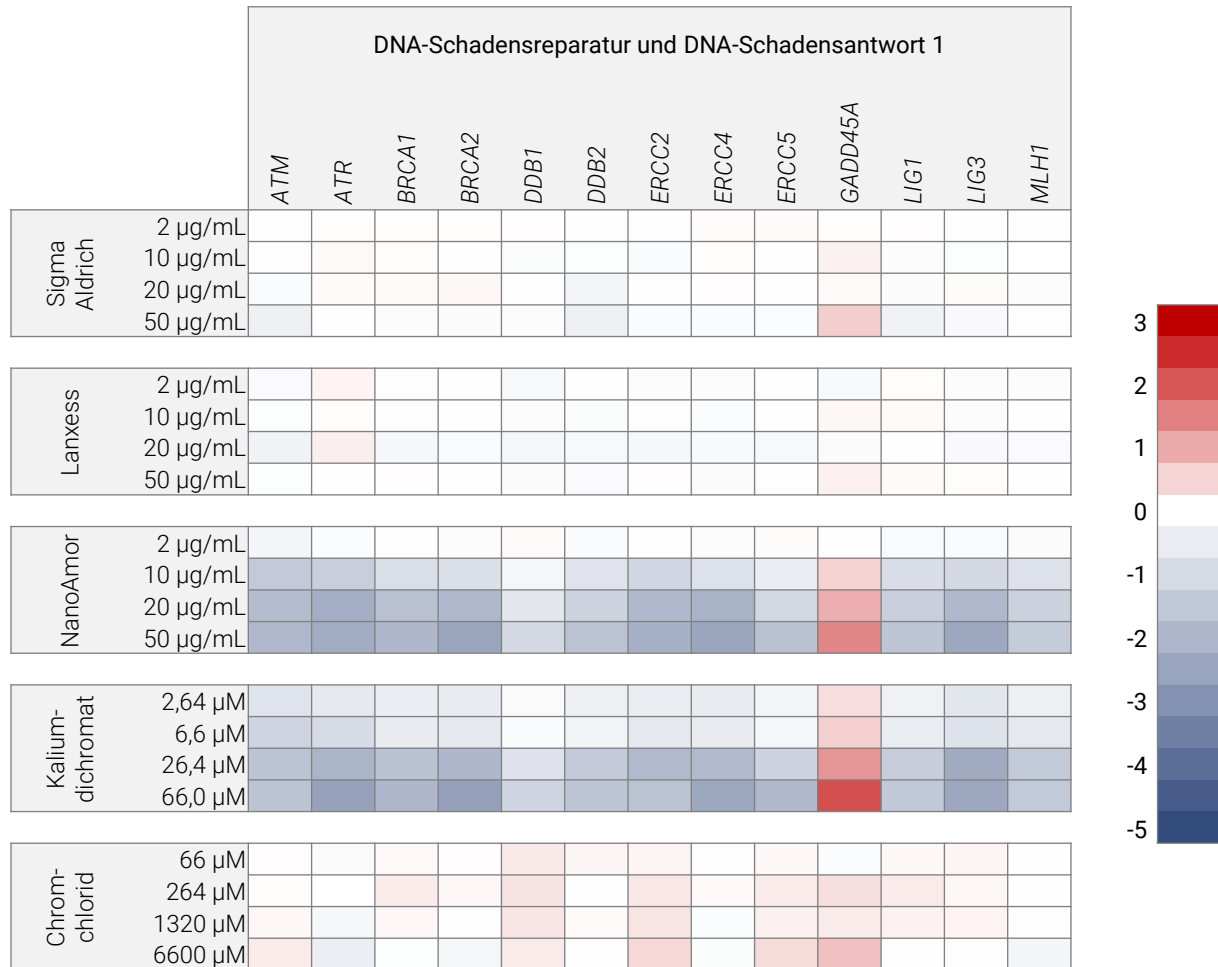


Abbildung 53: Beeinflussung der Genexpression von DNA-Schadensantwort- und DNA-Reparaturgenen (Teil 1) nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Chromoxid-Partikeln der Hersteller Sigma Aldrich, Lanxess und NanoAmor sowie den löslichen Chrom(VI)- und Chrom(III)-Verbindungen Kaliumdichromat und Chromchlorid in humanen Keratinozyten.

Eine Rotfärbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine verminderte Genexpression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Einige Gene erfuhren durch das wasserlösliche $K_2Cr_2O_7$ eine verstärkte Modulation der Expression. Die Tendenzen ähnelten sich stark und entsprechen den vorausgegangenen Beschreibungen. Aus diesem Grund wird hier auf die obenstehenden Beobachtungen der Cr_2O_3 NP des Herstellers A verwiesen.

Die Genexpressionsmuster von $CrCl_3$ wichen stark von denen der Cr-Partikel und von $K_2Cr_2O_7$ ab. Generell zeigten sub-millimolare Behandlungen mit Cr(III) keine biologisch relevanten Modulationen der untersuchten Gene. Auch nach der Inkubation mit 1,32 mM überschritt einzig das Gen JUN den

Schwellenwert der biologischen Relevanz (Abbildung 52). Dabei zeigte sich eine Induktion um den \log_2 -fachen Wert von 1,14. Erst 6,6 mM führten neben der Induktion von JUN auch zu erhöhten Transkriptlevels der zwei Zellzyklusregulatoren *CDKN2B* und *MYC* und dem Selenoprotein *SEPP1* (Abbildung 51). Letzteres wird mit inflammatorischen Bedingungen in Verbindung gebracht. Die erhöhte Genexpression von *CDKN2B* und *MYC* sind Anzeichen dafür, dass die Progression des Zellzyklus in den Keratinozyten gehemmt wurde.

Cr(III) zeigte keinerlei Einfluss auf Gene der DNA-Schadensantwort und der DNA-Reparatur (Abbildung 53 und Abbildung 54). Diese Ergebnisse geben den Konsens vorausgegangener Arbeiten wieder, die ebenfalls zeigten, dass Cr(III) in Konzentrationen bis 6 mM keine nachweisbaren DNA-Schäden in Form von DNA-Strangbrüchen und oxidativen Basenschädigungen hervorriefen (HININGER *et al.*, 2007).

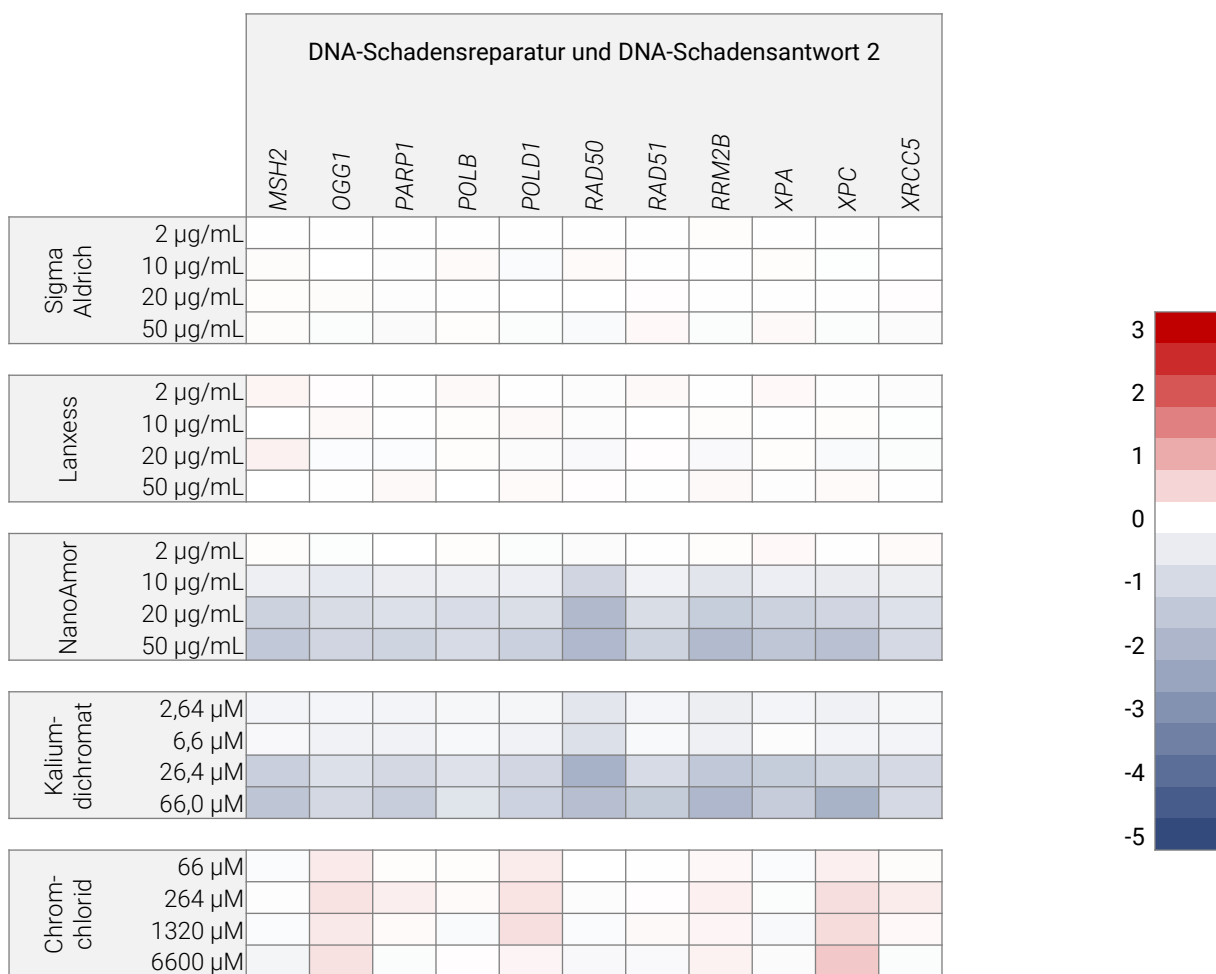


Abbildung 54: Beeinflussung der Genexpression von DNA-Schadensantwort- und DNA-Reparaturgenen (Teil 2) nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Chromoxid-Partikeln der Hersteller Sigma Aldrich, Lanxess und NanoAmor sowie den löslichen Chrom(VI)- und Chrom(III)-Verbindungen Kaliumdichromat und Chromchlorid in humanen Keratinozyten.

Eine Rotfärbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine verminderte Genexpression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

5.3.3.1 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Bei der Ergebnisbetrachtung wurde deutlich, dass Änderungen der Genexpressionsmuster nach Inkubation mit Partikeln des Herstellers A den Expressionsprofilen von Cr(VI) entsprachen und keine Übereinstimmungen mit den Expressionsmustern von Cr(III) vorlagen. Weiterhin zeigte sich, dass Keratinozyten nur dann auf die Cr-Oxid-Partikel reagierten, sofern diese, wie in Abbildung 49 dargestellt, Cr(VI) freisetzen. Die Cr(VI)-Konzentrationen der Partikel C beliefen sich unterhalb der Bestimmungsgrenze und laut Herstellerangaben bei maximal 5 ppm lagen. Entsprechend zeigte die Partikel der Fa. Lanxess keinerlei Veränderungen in den Expressionsprofilen.

NP des Herstellers B setzten in durchgeführten Löslichkeitsstudien ca. 0,17 % (w/w) an Cr(VI) frei, was nach Inkubation mit 50 µg/mL einer Cr(VI)-Konzentration von ca. 1,1 µM entspricht. Eine minimale, wenn auch biologisch nicht relevante Änderung der jeweiligen Ausgangstranskriptmengen waren in den inflammatorischen Genen *IL-8* und *VEGFA* detektierbar. Den DPC-Messungen aus Kapitel 5.3.2.2 zufolge enthielten Partikel des Herstellers A 3,8 % (w/w) lösliches Cr(VI), was nach einer Behandlung mit 50 µg/mL ca. 25,1 µM entspricht und mit den applizierten Konzentrationen von 26,4 µM $K_2Cr_2O_7$ korrelierte. Cr(VI) riefen vor allem in den Genclustern der oxidativen Stressantwort sowie bei Genen der Zellzyklusregulation und der Apoptose starke Veränderungen hervor. Daran war abzuleiten, dass die Keratinozyten nach Aufnahme des Chromates deutlich geschädigt wurden und bereits niedrige mikromolare Konzentrationen eine hohe Zytotoxizität aufwiesen. Die Genexpressionsmuster der NanoAmor NP und die des löslichen Cr(VI) waren nahezu identisch, was darauf schließen ließ, dass die adversen Effekte der Partikel dieses Herstellers einzig auf das Herauslösen des Chromates zurück zu führen waren. Auf die nahezu vollständige Repression der DNA-Schadensantwortgene und einigen apoptotischen Genen soll unter 5.3.5 eingegangen werden, da hierfür epigenetische Veränderungen vermutet und diese mithilfe der Analyse von DNA-Methylierungsmustern weiter untersucht wurden.

Während Sensorgene für den Zellzyklusarrest (*CDKN1A1*, *JUN*), der inflammatorischen Zellantwort (*IL-8*) und der DNA-Schadensantwort (*GADD45A*) induziert wurden, zeigten Gene, die bei oxidativem Stress aktiviert werden (*HMOX1* und *HSPA1A*) keine Erhöhung der Expressionslevel. ROS sind für eine Vielzahl an Cr(VI)-induzierten Schäden verantwortlich und tragen neben der akuten Zytotoxizität auch zur Genotoxizität von Cr(VI)-Verbindungen bei (DELOUGHERY *et al.*, 2014; PAN *et al.*, 2018; WISE *et al.*, 2018). Nach dermaletem Kontakt gibt es zusätzlich Hinweise, dass ROS an der Entstehung einer allergischen Kontaktdermatitis beteiligt sind (ADAM *et al.*, 2017). Aus diesem Grund wurde in Folgendem der Nachweis möglicher entstandener ROS mithilfe des DCF-DA Assays durchgeführt.

5.3.4 NACHWEIS REAKTIVER SAUERSTOFFSPEZIES

Zum direkten Nachweis möglicher entstandener ROS nach Inkubationen mit Cr(III)- und Cr(VI)-Verbindungen wurde der fluorimetrische DCF-DA Assay angewendet. Hierbei wurden jeweils die löslichen

Cr-Verbindungen CrCl_3 und $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ eingesetzt. Etablierungsexperimente mit den partikulären Cr-Verbindungen zeigten keinerlei Einfluss auf die Oxidierbarkeit von DCF-DA.

HaCaT Zellen wurden 1 h vor der Inkubation mit DCF-DA vorkonditioniert. Die Behandlungen mit den Cr(III)- und Cr(VI)-Verbindungen wurden nach 6 h bzw. 24 h abgebrochen. Die Keratinozyten wurden im Anschluss in HBSS gewaschen und die Fluoreszenz am Multiplattenlesegerät (TECAN® Infinite Pro M200) gemessen. Als Positivkontrolle wurde $1000 \mu\text{M}$ tBHP verwendet, welches eine Stunde vor der Messung direkt in das Inkubationsmedium hinzupipettiert wurde.

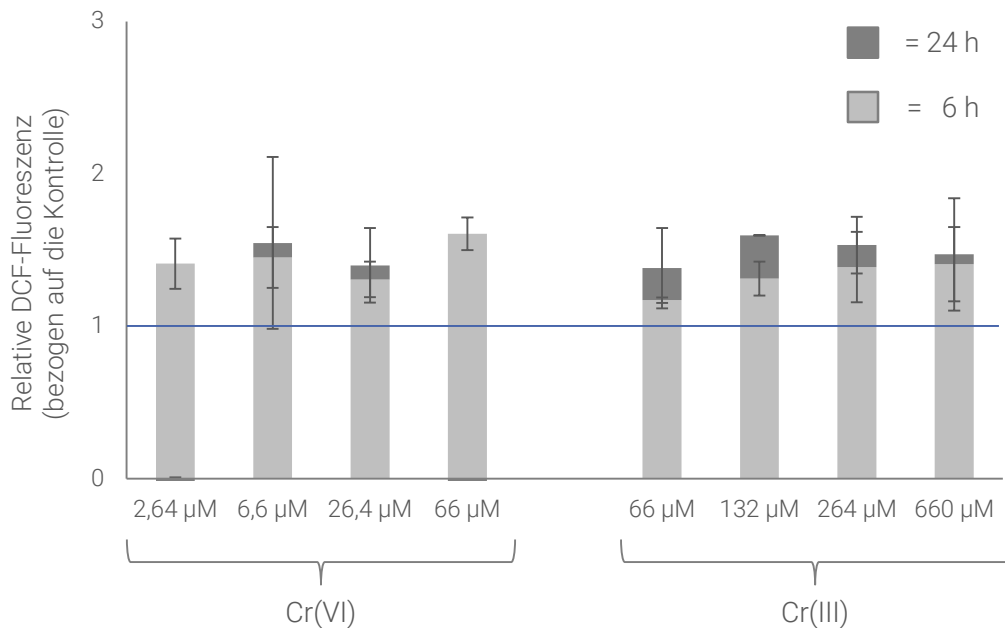


Abbildung 55: Relative DCF-Fluoreszenz bezogen auf die unbehandelte Vehikelkontrollen (horizontale Linie).

HaCaT wurden mit $100 \mu\text{M}$ DCF-DA in *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) für 1 h vorinkubiert. Die Proben wurden anschließend für 6 h bzw. 24 h gegenüber $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (links) und CrCl_3 (rechts) exponiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Range/2 aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen.

Die Ergebnisse des DCF-DA Assays zeigten, dass es zu einer marginalen Erhöhung des zellulären oxidativen Stressniveaus durch Behandlung mit den beiden löslichen Cr-Verbindungen kam. Eine valide Aussage über die Zeitabhängigkeit der ROS-Freisetzung ließ sich ebenso wenig treffen, wie eine gesicherte Unterscheidung der beiden Verbindungen. Zeitgleich durchgeführte DCF-DA Untersuchungen mit Kupferverbindungen zeigten, wie in Abbildung 44 und Abbildung 45 ersichtlich, eine deutliche gesteigerte Oxidation des Fluoreszenzfarbstoffes. Vor diesem Hintergrund wiesen weder Cr(III) noch Cr(VI) einen signifikanten Beitrag zu der Entstehung von ROS in humanen Keratinozyten auf.

Die retrospektive Betrachtung der ermittelten Ergebnisse führte zu einem Widerspruch existierender Literaturdaten. Die Arbeitsgruppe um Ke Jian Liu und Xianglin Shi postulierte bereits 2001 die Entstehung von ROS durch Fenton-ähnlicher Reaktionen mit Cr(V). Cr(VI) wird dabei nach Eintritt in die Zelle zu Cr(V) reduziert, wobei Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid gebildet werden. In nachgeschalteten

Reaktionen können aus Wasserstoffperoxid und Cr(V) hochreaktive Hydroxylradikale entstehen, die zelluläre Zielstrukturen, wie Proteine, Fettsäuren und DNA schädigen (LIU UND SHI, 2001). Weiterhin ist bekannt, dass Cr(VI) in dermalen Fibroblasten zu einer ROS-induzierten Minimierung an GSH führt, welche mit der Induktion des oxidativen Stressmarkers *HMOX1* in Korrelation stehen (JOSEPH *et al.*, 2008).

Dass die Entstehung von ROS in den untersuchten Keratinozyten nicht nachvollzogen werden konnten, lag womöglich darin begründet, dass der eingesetzte Fluoreszenzfarbstoff DCF-DA nur bedingt für die Detektion von Cr(VI)-induzierten Radikalen geeignet ist. Strukturbedingt kann DCF nur durch zwei aufeinanderfolgende Ein-Elektronen Oxidationen und der resultierenden Abstraktion des H-Atoms an Stelle 9' in seine fluoreszierende Form überführt werden. Freies Cr(V) ist hierzu in der Lage, jedoch liegen nur etwa 25 % des Cr-Intermediates ungebunden vor. Dreiviertel des gebildeten Cr(V) liegen unter physiologischen Bedingungen assoziiert an Thiolgruppen, beispielsweise als Cr(V)-GSH-Komplex vor. Cr(V)-GSH gilt als schwaches Oxidans und ist nicht in der Lage, DCF in seine fluoreszierende Struktur zu überführen. Beim Nachweis von Cr(VI)-induziertem oxidativem Stress mit DCF-DA kommt es daher zu signifikanten Unterbestimmungen (DELOUGHERY *et al.*, 2014).

Die Entstehung von ROS in Keratinozyten konnte somit nicht abschließend geklärt werden. Da jedoch die Aktivierung von Sensorgenen für oxidativem Stress ausblieben, ist zu erwarten, dass sich das zelluläre oxidative Stresslevel durch Cr(VI) auf einem niedrigeren Niveau befand, als nach analoger Behandlung mit den eingesetzten Kupferverbindungen.

Für zukünftige Untersuchungen der Bildung von ROS durch Cr(VI)-haltigen Verbindungen muss oben genanntes berücksichtigt werden. Die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen der *CellRox*-Familie wird dabei empfohlen (DELOUGHERY *et al.*, 2014).

5.3.5 DNA-METHYLIERUNGSMUSTER

Die DNA-Methylierung ist die häufigste und am besten untersuchte epigenetische Modifikation. Dabei werden Cytosinbasen des Zwei-Basen-Sequenzmotives einer Cytosin-Guanosin Basenpaarung am Kohlenstoff-5' des Pyrimidingrundgerüsts methyliert und 5-Methylcytosin (5-mC) gebildet. In Eukaryoten finden sich Ansammlungen dieser Cytosin-Phosphat-Guanin (CpG)-Dinukleotide als repetitive Sequenzen wieder und treten genomweit vor allem in Promotorregionen auf. Eine Methylierung dieser Sequenzabschnitte dient der Regulation von Genaktivitäten und spielt neben der Embryonalentwicklung vor allem in der gewebespezifischen Expression eine wichtige Rolle. Transkriptionsfaktoren binden dabei bevorzugt am Guanin- und Cytosin-reiche Erkennungssequenzen. Eine Methylierung dieser Regionen senkt die Affinität der Transkriptionsfaktoren und hindert sie so an deren Anlagerung. Die DNA-Methylierung, als wichtiger Regulationsmechanismus, ist jedoch anfällig für exogene Einflussfaktoren und ist beispielsweise häufig bei der Tumorentwicklung dysfunktional (CHRISTMANN UND KAINA, 2019).

Bereits nach Exposition gegenüber den Cu-Verbindungen zeigten die Keratinozyten eine Suppression DNA-Reparatur-assoziiierter Gene. Die Inkubation mit löslichem Cr(VI) verstärkte diesen Effekt nochmals und zeigte eine Repression von 22 der 27 Gene des DNA-Schadensantwort-Clusters. Die unspezifische Hemmung auf translationaler Ebene ist für einige kanzerogene Metallverbindungen, wie Ni, As, Cd und Cr bekannt. Als Ursachen hierfür werden Interaktionen mit Histon-modifizierenden Proteinen, DNA-Methyltransferasen und miRNA (mircoRNA) diskutiert. Änderungen des epigenetischen Codes über die genannten Wege haben dabei zum Teil erheblichen Einfluss auf die Genexpression (ARITA UND COSTA, 2009).

Die Beeinflussung epigenetischer Regulationsmechanismen durch Cr(VI) ist Gegenstand aktueller Forschung. Es gibt Hinweise, dass Cr(VI) sowohl Einfluss auf posttranslationale Modifikationen von Histonen, als auch auf das Methylierungsmuster der DNA nimmt. Die DNA-Methylierung ist die häufigste und am besten verstandene epigenetische Modifikation. Dabei werden Cytosinbasen des Zwei-Basen-Sequenzmotives einer Cytosin-Guanosin Basenpaarung methyliert. Eukaryoten weisen eine erhöhte Dichte dieser CpG (Cytosin-Phosphat-Guanin)-Dinukleotide als repetitive Sequenzen in Promotorregionen auf. Sofern > 400 solcher repetitiven Sequenzen vorkommen, werden diese als CpG-Inseln bezeichnet (ILLINGWORTH UND BIRD, 2009). Die Methylierung erfolgt dabei am Kohlenstoff-5' des Pyrimidingrundgerüsts (Abbildung 56) und wird über DNMT (DNA-Methyltransferasen) katalysiert. Die vorherrschenden Rollen der DNA-Methylierung scheinen dabei die Embryonalentwicklung und die gewebespezifische Expression von Genen zu sein.

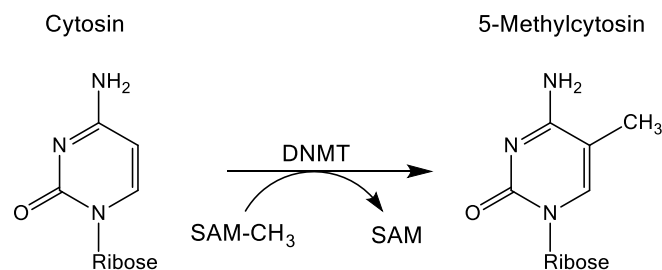


Abbildung 56: Transmethylierungen von Cytosin zu 5-Methylcytosin (5-mC).

Die Bildung von 5-Methylcytosin erfolgt ausgehend von Cytosin und wird über DNA-Methyltransferasen (DNMT) katalysiert. Die Methylgruppe entstammt dabei dem Sulfonium-Betain S-Adenosyl-Methionin (SAM).

5.3.5.1 NACHWEIS VON 5-METHYLCYTOSIN

Um der Frage nachzugehen, inwieweit Cr(VI) Einfluss auf das Methylierungsmuster der DNA nimmt und ob die Veränderungen der DNA-Methylierung bereits nach subchronischen Zeitpunkten detektierbar sind, wurden diesbezügliche Untersuchungen mithilfe eines *MethylFlash™ Global DNA Methylation ELISA* (EpiGentek) durchgeführt. HaCaT Zellen wurden dabei für 24 h und 48 h mit den Cr(VI)-Konzentrationen von 13,2 µM und 26,4 µM behandelt. Nach den genannten Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet, die

DNA mithilfe eines *FitAmp™ Blood and Cultured Cell DNA Extraction Kit* (EpiGentek) isoliert und quantifiziert. 100 ng DNA wurden für den kolorimetrischen ELISA verwendet.

Nach Auswertung der Ergebnisse, die entsprechend der Durchführungsvorschrift des Herstellers erfolgte, zeigten sich zeit- und konzentrationsabhängige Veränderungen der globalen 5-Methylcytosin (5-mC)-Gehalte. Der relative 5-mC-Gehalt sank nach einer 24-stündigen Behandlung mit 13,2 μM auf 74,0 % \pm 7,6 % respektive 44,6% \pm 14,4 % durch die Behandlung mit 26,4 μM . Nach 48 h schien sich diese globale Hypomethylierung bereits dem Normalniveau der Kontrollen anzunähern. Die mit 13,2 μM behandelten Zellen zeigten eine vollständige Wiederherstellung des 5-mC-Gehaltes auf 103,1 % \pm 1,0 %. Nach Inkubation mit 26,4 μM Cr(VI) wiesen die HaCaT Zellen einen relativen 5-mC-Gehalt von 88,4 % \pm 0,4 %, was einem 44 %igem Anstieg im Vergleich zu der 24 h-Inkubation entsprach (siehe Abbildung 57 A)

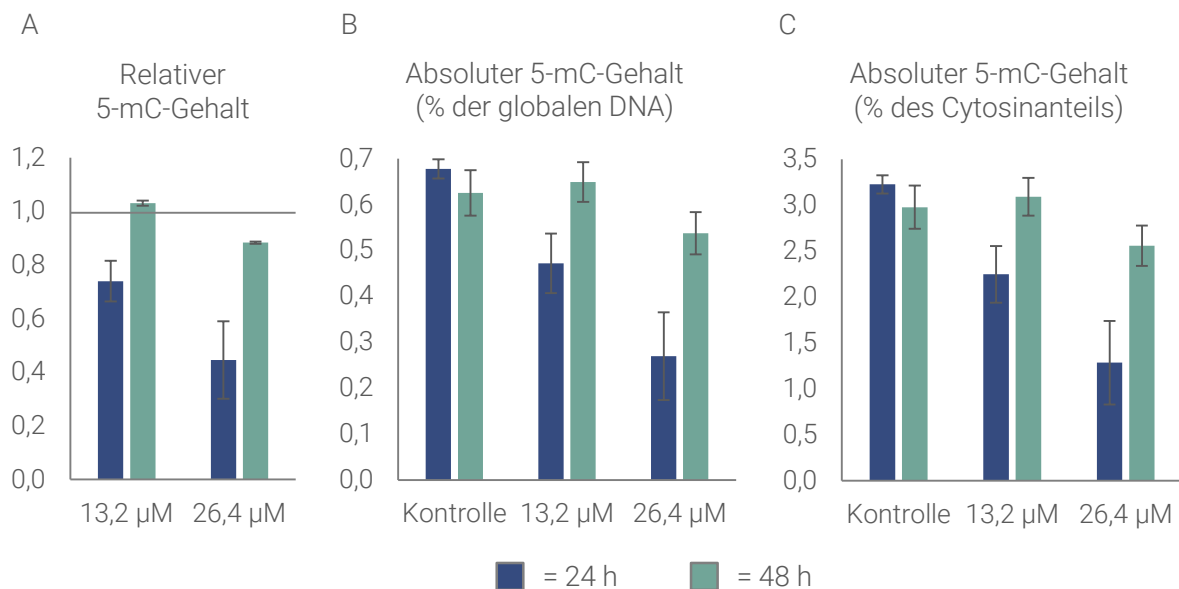


Abbildung 57: Gehalte an 5-Methylcytosin (5-mC) in HaCaT Zellen nach 24-stündiger (blau) und 48-stündiger (grün) Inkubation mit 13,2 μM und 26,4 μM Cr(VI).

(A) Relativer 5-mC-Gehalt bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (horizontale Linie). (B) Prozentualer Anteil an 5-mC im Humangenom. (C) 5-mC-Anteil der DNA-Base Cytosin, welche 21 % aller DNA-Basen ausmacht. Dargestellt sind die Mittelwerten \pm Range/2 aus zwei unabhängigen Versuchen.

Neben der relativen 5-mC-Menge wurde auch der prozentuale Anteil von 5-mC im gesamten Humangenom ermittelt. Dies gelangt über einen durch den Hersteller bereitgestellten 5-mC-Standard, mit dem es möglich war den Absolutgehalt an 5-mC zu identifizieren. Den Ergebnissen des ELISA zufolge lagen in den Kontrollen nach 24 h 0,68 % \pm 0,02 % bzw. nach 48 h 0,63 % \pm 0,05 % aller DNA-Basen als 5-mC vor (siehe Abbildung 57 B). Durch Chromat-Behandlung wurde dieser Prozentanteil nach 24 h durch 13,2 μM auf 0,47 % \pm 0,07 % gesenkt. Eine Inkubationsdauer von 48 h ließ den 5-mC Gehalt wieder auf das Ausgangsniveau ansteigen. Eine verdoppelte Cr(VI)-Konzentration hatte eine Verringerung des

5-mC-Anteils auf $0,27\% \pm 0,10\%$ zur Folge. Nach 48 h zeigte sich erneut eine Erholung der Hypomethylierung von $0,54\% \pm 0,05\%$.

Teil C der Abbildung 57 stellt die Anteile an 5-mC bezogen auf den Cytosinanteil im Humangenom von 21 % dar (ILLINGWORTH UND BIRD, 2009). Entsprechend beliefen sich die 5-mC-Gehalte der Kontrollen auf $3,23\% \pm 0,10\%$ nach 24 h und $2,98\% \pm 0,24\%$ nach 48 h. Die Behandlung von $13,2\ \mu\text{M}$ führte zu einer Verringerung des 5-mC-Gehaltes auf $2,25\% \pm 0,31\%$ nach 24 h, wohingegen die Hypomethylierung nach 48 h nicht mehr erkennbar war. $26,4\ \mu\text{M Cr(VI)}$ führten nach 24 h zu einem Abfall der 5-mC-Konzentration auf $1,29\% \pm 0,46\%$, welcher sich nach 48 h auf den Wert von $2,56\% \pm 0,22\%$ erholte.

5.3.5.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Da genomweite 5-mC-Gehalte extrem gewebespezifisch sind und kultivierte Zellen ein stark abweichendes Methylierungsmuster aufweisen können, fällt eine Einordnung im Bezug zu Literaturdaten schwer. Ergebnissen aus Sequenzierungsanalysen zufolge sind ca. 70 % aller CpG-Inseln methyliert, was einem Methylierungsgrad von ca. 1 % des gesamten Genoms entspricht (DAHL *et al.*, 2011). Studien an immortalen Zelllinien zeigen dabei zum Teil deutlich geringere 5-mC-Gehalte von 0,2 % – 0,3 % (LOU *et al.*, 2013). Der mittels ELISA ermittelte Methylierungsgrad in unbehandelten HaCaT Zellen betrug ca. 0,63 % - 0,68 % und konnte daher als normal angesehen werden und stand nicht in Widerspruch mit publizierten Literaturdaten.

Eine zeit- und konzentrationsabhängige Hypomethylierung der DNA nach Behandlung mit $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ wurde nach aktuellem Kenntnisstand im Rahmen dieser Dissertation erstmalig in HaCaT Zellen nachgewiesen. Aus anderen Zelllinien sind ähnliche Effekte bekannt. So wiesen Lou *et al.* in A549 Zellen und humanen B-Lymphoblasten eine Reduktion der 5-mC-Gehalte nach einer 2-stündigen $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ Inkubation des Konzentrationsbereichs von $5\ \mu\text{M}$ – $15\ \mu\text{M}$ um ca. 60 % (A549) bzw. 40 % (B-Lymphoblasten) nach. Analog zu den hier aufgeführten Ergebnissen zeigte sich eine Erholung des Methylierungsstatus nach einer Expositionsdauer von 24 h. Die 5-mC-Gehalte in den untersuchten Zelllinien gingen nach den $5\ \mu\text{M}$ Behandlungen auf ihr Ausgangsniveau zurück. Der 5-mC-Status in den hohen $10\ \mu\text{M}$ und $15\ \mu\text{M}$ Konzentrationen der 24-stündigen Behandlung ließ im Vergleich zu den Kurzzeitbehandlungen der von Lou *et al.* durchgeführten Studie (2 h) ebenfalls eine weniger stark reduzierte DNA-Methylierung erkennen. Die besagte Arbeitsgruppe veröffentlichte weiterhin Daten zu Methylierungsanalysen von partikulärem Blei(II)chromat (PbCrO_4) in den Konzentrationen von $1,25\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ bis $10,0\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Als Zeitpunkte wurden hierfür 4 h und 24 h gewählt. Die Ergebnisse aus A549 Zellen entsprachen denen der Inkubationen mit $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Eine 2-stündige Behandlung zeigte eine genomweite Hypomethylierung und eine Reduktion des 5-mC-Anteils von ca. 80 %, wohingegen die 24-stündige Exposition eine weniger stark ausgeprägte Demethylierung der DNA (max. 60 %) aufwies (Lou *et al.*, 2013).

Die durch Cr(VI) induzierte Hypomethylierung konnte 2016 in Nagerstudien nachvollzogen werden. In der Studie von Wang *et al.* wurde das Trinkwasser von Sprague Dawley Ratten für 28 Tage mit $K_2Cr_2O_7$ supplementiert. Eine signifikante Hypomethylierung, die aus dem Blut gewonnenen DNA stellte sich in den Tieren mit einer hohen Cr(VI)-Belastung ein (WANG *et al.*, 2016).

Die Ursachen für eine globale DNA-Hypomethylierung nach Cr(VI)-Exposition sind komplex und nicht gänzlich nachvollzogen. In der Literatur existieren verschiedene Hypothesen, wie Cr(VI) zu einer DNA-Hypomethylierung führen kann. Es scheint dabei eine Korrelation des oxidativen Stressniveaus der Zelle und der DNA-Methylierung zu geben. Untersuchungen zeigten, dass sich die Bildung von 8-OxoG, wie sie unter oxidativen Bedingungen vermehrt stattfindet, negativ auf den genomweiten 5-mC-Status auswirkten. In CpG-Inseln vorkommendes 8-OxoG verhindert effizient die Bindung von DNMT und inhibiert somit die Methylierung der gegenüberliegenden Cytosinbasen (FRANCO *et al.*, 2008; DA SILVA *et al.*, 2015). Neben der verringerten DNA-Methylierung kommt es unter oxidativen Stressbedingungen auch zu einer gesteigerten DNA-Demethylierungsrate. Die Demethylierung von 5-mC bedarf zunächst der Oxidation von 5-mC zu 5-hmC (5-Hydroxymethylcytosin), welche über Oxygenasen der TET-Familie (Ten-Eleven-Translocation) katalysiert werden. Das gebildete 5-hmC wird vermutlich über spezifische DNA-Glykosylasen erkannt und gegen Cytosin ersetzt (JIN *et al.*, 2011; DAHL *et al.*, 2011). Es gibt Hypothesen, dass ROS die Bildung von 5-hmC begünstigt, was wiederum vermehrt entsprechende Glykosylasen rekrutiert und so eine genomweite Hypomethylierung zur Folge hat (WU UND NI, 2015; GUO *et al.*, 2019).

Weitere postulierte Mechanismen, die zu einer verminderten DNA-Methylierung führen, umfassen Wechselwirkungen mit Cr(III) und Proteinen, die an Methylierungsprozessen beteiligt sind. Schenkenburger *et al.* zeigten, dass es zu einer Quervernetzung der DNMT1 an Histone durch Cr(III) kommt und so die DNA-Methylierungsaktivität herabgesetzt wurde. Ähnliche Effekte konnten auch für die Histondeacetylase 1 (HDAC1) nachgewiesen werden, welche die Chromatinstruktur durch Deacetylierung in eine kondensierte Form überführt (SCHNEKENBURGER *et al.*, 2007). Weiterhin wurde gezeigt, dass GADD45a inhibierend auf die DNMT1 wirkt. Die Expression von GADD45a wurde auf funktioneller Ebene in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Es zeigte sich jedoch eine signifikante Steigerung der Expression von *GADD45A* nach Behandlung mit Cr(VI), was nach erfolgreicher Translation in das Genprodukt eine Hypomethylierung erklären könnte. Der genaue Wirkmechanismus der inhibitorischen Wirkung von GADD45a auf DNMT1 ist nicht bekannt (LEE *et al.*, 2012A; CHRISTMANN UND KAINA, 2019).

Die unter 5.3.3 dargestellten Repressionen der DNA-Schadensantwort- und DNA-Reparaturgene lassen sich durch die verringerte DNA-Methylierung nicht erklären. Tendenziell gilt, dass vor allem Hypermethylierungen in Promotorregionen reprimierende Effekte auf die jeweiligen Gensequenzen haben. Die Bindungsaffinität von Transkriptionsfaktoren an Genloci wird durch einen hohen Gehalt an 5-mC verringert und es kommt so zu einer verminderten Transkriptionsrate (*Gene Silencing*) (Abbildung 58).

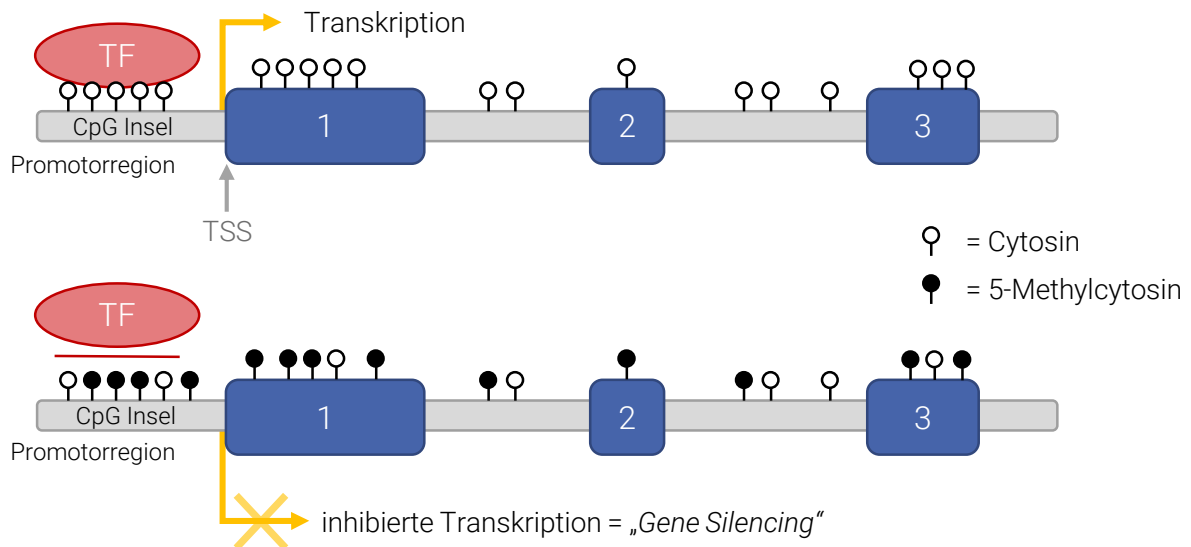


Abbildung 58: *Gene Silencing* begünstigt durch die Hypermethylierung von CpG-Inseln in Promotorregionen.

Hypomethylierte Promotorregionen ermöglichen es Transkriptionsfaktoren (TF) zu binden und induzieren die Translation nachstehender Genabschnitte (1, 2, 3). Der Ort des Transkriptionsbeginns wird dabei als *transcription starting site* bezeichnet (TSS). Durch eine Hypermethylierung der CpG-Inseln in Promotorregionen sinkt die Affinität der TF an entsprechende Genloci und die Transkription wird inhibiert (BAYLIN, 2005)

Dennoch konnte in Studien gezeigt werden, dass Hypomethylierungen der globalen DNA mit einer sequenzspezifischen Hypermethylierung der CpG-Inseln, vor allem in Promotorregionen von Tumorsuppressorgenen und DNA-Reparatur-assoziierten Genen, einhergehen (SUN *et al.*, 2009A; ILLINGWORTH UND BIRD, 2009).

Tatsächlich führen Chromate vor allem durch Histonmodifikationen zu einer verminderten Transkriptionsrate, wie sie unter Kapitel 5.3.3 beobachtet wurde. In einer von Sun *et al.* durchgeführten Studie brachte die Exposition von A549 und BEAS2B Zellen gegenüber Cr(VI) eine Verringerung der Histonmodifikation H3K27Me3 und Erhöhung der Modifikationen H3K4Me3, H3K9Me2 und H3K9Me3 mit sich (SUN *et al.*, 2009A). Vor allem die Methylierung an H3K9 oder H3K27 sind dabei eng mit einer transkriptionellen Repression assoziiert (ARITA UND COSTA, 2009). Die Methylierung der Lysinseitenketten erfolgte dabei über die Histon-Methyltransferase G9a, welche durch Cr(VI) verstärkt induziert wurde. H3K9-Modifikationen rekrutieren DNMT1 an entsprechende Promotorregionen und begünstigen deren Hypermethylierung. Sowohl in BEAS2B als auch in 16HBE Zellen führte die sequenzspezifische Hypermethylierung zu einer Herunterregulation von DNA-Reparaturgenen (HU *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2018).

Das vermehrte Auftreten einer defekten Mismatch-Reparatur und der dadurch hervorgerufenen Mikrosatelliteninstabilität im Lungengewebe Cr(VI)-exponierter Arbeiter wurde mit einer Hypermethylierung im *MLH1*-Gen in Verbindung gebracht. (IMAI UND YAMAMOTO, 2008; TAKAHASHI *et al.*, 2005). Inwieweit die Herunterregulation anderer DNA-Reparaturgene durch hypermethylierte Promotorregionen hervorgerufen wird, ist nicht abschließend geklärt. Kürzlich veröffentlichte

Transkriptom-Studien bekräftigen jedoch die Hypothese, dass Cr(VI) über eine Vielzahl epigenetischer Modifikationen massiv auf die transkriptionelle Schadensantwort der Zelle einwirkt und so an der Krebsentstehung beteiligt ist (RAGER *et al.*, 2019) (Abbildung 59).

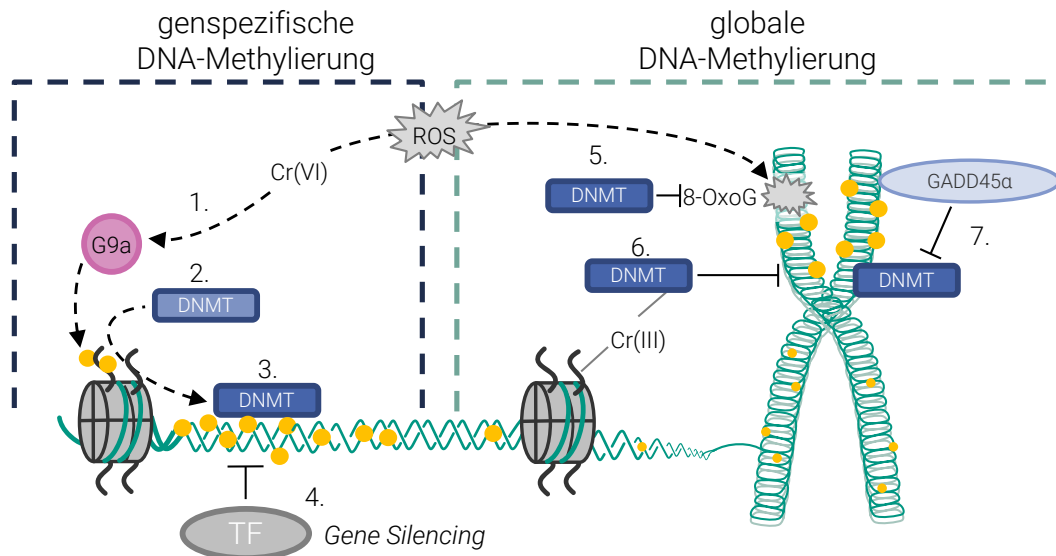


Abbildung 59: Potentielle Einflüsse von Chromverbindungen auf Mechanismen der genspezifischen DNA-Hypermethylierung sowie der genomweiten (globalen) Hypomethylierung.

1: Cr(VI) induziert über einen noch unbekanntem Mechanismus die Histon-Methyltransferase G9a, welche die Aminogruppe von Lysin 9 im Histon 3 (H3K9) methyliert. 2: Die Methylierung an H3K9 führt zu einer Rekrutierung von DNA-Methyltransferasen (DNMT). 3: DNMT methylieren Cytosin- und Guanin-reiche Sequenzen der DNA (CpG-Inseln), welche vermehrt in Promotorregionen induzierbarer Gene vorkommen und führt so zu einer genspezifischen DNA-Hypermethylierung. 4: Transkriptionsfaktoren besitzen eine geringere Affinität zu methylierten CpG-Inseln und können nicht binden, was die Transkription hindert und zu sog. *gene silencing* führt. 5: Cr(VI)-induzierte reaktive Sauerstoffspezies führen zur Oxidation von Guaninbasen (8-OxoG) des CpG-Motifs, worauf DNMT nicht mehr binden können und eine Hypomethylierung die Folge ist. 6: Weiterhin kann Cr(III) Quervernetzungen zwischen Histonen und DNMT verursachen, was deren Aktivität hindert. 7: Über noch unbekannte Wege wirkt GADD45 α , welches durch Cr(VI) vermehrt induziert wird, inhibierend auf DNMT. Die letzten drei beschriebenen Mechanismen (5., 6., 7.) können zu einer genomweiten Hypomethylierung führen.

Die DNA-Reparaturkapazität ist zu einem großen Teil durch die Expressionsniveaus der Reparaturgene reguliert. Die Unterdrückung dieser Gene durch Wechselwirkung mit Proteinen und die Beeinflussung des Epigenoms durch Cr-Verbindungen haben häufig schwerwiegende Folgen und tragen nicht selten zur Krebsentstehung bei (CHRISTMANN UND KAINA, 2019; HU *et al.*, 2018). Die hier gezeigten Ergebnisse der DNA-Hypomethylierung konnten zwar die umfassenden Repressionen DNA-Schadensassoziierten-Genen nicht hinreichend erklären, zeigten jedoch, dass Cr(VI) bereits nach einer kurzen Expositionsdauer epigenotoxische Effekte in Keratinozyten hervorriefen. Sequenzspezifische Untersuchungen der betroffenen DNA-Reparaturgene sollen an diese Arbeit anknüpfen und sind Gegenstand aktueller Forschung.

6 ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der toxikologischen Bewertung von partikulären Kupfer- und Chromverbindungen sowie Mineralölkohlenwasserstoffen, die in kosmetischen Mitteln Einsatz finden und deren dermale Exposition mit potentiell adversen Effekten einhergehen kann. Für die toxikologischen Untersuchungen kamen Modellzelllinien der Haut zum Einsatz, die verschiedene Gewebestrukturen nachempfinden sollten. Die humane Keratinozytenzelllinie HaCaT repräsentierte dabei die robuste äußere Zellschicht der Epidermis, die während ihres Differenzierungsprozesses zu Korneozyten einen starken Zell-Zell-Verband ausbilden. Zudem stellt ihre Zellmembran durch die Einlagerungen von *small proline rich proteins* (SPR) wie Filaggrin, Involucrin und Loricrin sowie der Quervernetzung durch Desmosomen eine protektive Barriere gegenüber mechanischen, physikalischen und chemischen Umwelteinflüssen dar (McGRATH *et al.*, 2010). Aufgrund sog. Depoteffekte, bei denen auf die Haut applizierte Substanzen in Haarfollikeln, Schweiß- und Talgdrüsen aufgenommen werden, können Fremdstoffe wie Partikel, aber auch hydrophobe Flüssigkeiten sukzessive in ein darunterliegendes, engmaschiges Netz aus Blutgefäßen abgegeben werden (GULSON *et al.*, 2010; LADEMANN *et al.*, 2006; VOGT *et al.*, 2006). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich die Zelllinie EA.hy926 modellhaft als gefäßauskleidendes Endothelgewebe von subkutanen Lymph- und Blutgefäßen verwendet, wodurch mögliche adverse Effekte in diesem Gewebe untersucht werden konnten.

Als vereinende Untersuchungsmethode aller eingesetzten Zelllinien und Agenzien, fand dabei eine quantitative Hochdurchsatz *Real-Time* PCR (*High-Throughput RT-qPCR*) Anwendung. Diese Methode stellt eine aussagekräftige Möglichkeit dar, um Wirkmechanismen toxischer Verbindungen aufzuklären. Dabei ist es möglich, zeitgleich in 96 Proben die Beeinflussung von 95 Genen verschiedener Gencluster quantitativ zu erfassen. Die Methode wurde im Rahmen vorausgegangener Arbeiten der Arbeitsgruppe etabliert und validiert (FISCHER *et al.*, 2016).

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden zunächst Untersuchungen bezüglich toxischer Effekte von Mineralölkohlenwasserstoffen durchgeführt. Mineralöle werden aufgrund ihrer konsistenzgebenden Eigenschaften, ihrem geringen allergenen Potential und ihrer hohen Hautverträglichkeit in vielerlei kosmetischen Mitteln eingesetzt. Zu den Produkten mit hohen Gehalten an Mineralölen zählen beispielsweise Lippenpflegekosmetika, Hautcremes, Haarpflegemitteln, Körperlotionen und Babyöl. Für die Verwendung in Kosmetika im Sinne der Verordnung (EU) Nr. 1223/2009 sind nur solche Rohstoffe auf Mineralölbasis zulässig, deren Raffinationsprozesse vollständig bekannt und deren Ausgangsstoffe nicht kanzerogen sind. Trotz des hohen Raffinationsgrades der Rohstoffe standen mineralöhlhaltige Kosmetika in der Vergangenheit häufiger in der Kritik, potentiell krebserregende Stoffe zu enthalten (Stiftung Warentest, 2015; CVUA, 2019). Aufgrund von Strukturanalogien zu polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) wurde dabei vermutet, dass auch andere Verbindungen der Gruppe der MOAH (*Mineral Oil Aromatic Hydrocarbons*) enthalten sind, für deren abschließende toxikologische

Risikobewertung weitere Daten benötigt werden (BfR, 2018). Aus diesem Grund wurden sowohl einzelne Vertreter der MOAH als auch mittels einer *online*-gekoppelten LC-GC gewonnene aromatische Mineralölgemische auf ihr zytotoxisches Potential untersucht und Genexpressionsuntersuchungen in Keratinozyten durchgeführt. Aktuelle Studien zeigen, dass von einer Koexposition mit PAK und solarer UV-Strahlung aufgrund der Bildung redoxaktiver Chinone, der photolytischen Fragmentierung von aromatischen Verbindungen sowie der erhöhten dermalen Membranpermeabilität, zum Teil massive Zellschädigungen ausgehen (HOPF *et al.*, 2018; FU *et al.*, 2012). Aus diesem Grund wurden die MOAH-behandelten Hautzellen ebenfalls auf synergistische Effekte der beiden Noxen untersucht.

Unter den aromatischen Einzelverbindungen erwiesen sich die Benzolderivate Pentylbenzol und Diphenylmethan zwar als zytotoxisch, die simultane Behandlung mit künstlichem Sonnenlicht führte jedoch zu keiner Verstärkung des Effektes. Erst bei MOAH mit konjugierten π -Elektronensystemen, wie Naphthalin, 1- und 2-Methylnaphthalin, zeigten sich phototoxische Effekte. Es wird davon ausgegangen, dass sowohl die Bildung von Chinonen als auch die Entstehung reaktiver Aldehyde für die gesteigerte Zytotoxizität sorgen (FU *et al.*, 2012). Die reaktiven Photolyseprodukte führen zu einer Depletion des zellulären Glutathion (GSH)-Status und senken so die antioxidative Kapazität (Yu, 2002). Die stärksten zytotoxischen Wirkungen gingen von den Drei- und Fünfringsystemen Acenaphthalin und Benzo[a]pyren (B[a]P) aus. Hier zeigten sich vor allem bei B[a]P die starken phototoxischen Effekte bereits in niedrigen mikromolaren Konzentrationen. Während 10 μ M B[a]P keinerlei Einfluss auf den ATP-Gehalt der Zellen hatten, war eine nahezu 80 %ige Reduzierung des zellulären ATP-Gehaltes durch Koexposition mit künstlichem Sonnenlicht die Folge.

Basierend auf den Genexpressionsergebnissen konnten potentielle Antwortmechanismen von Keratinozyten nach Koexposition von B[a]P und solarer UV-Bestrahlung sowie von extrahierten MOAH-Fractionen abgeleitet werden. Es konnte gezeigt werden, dass die akute Toxizität nicht von den bekannten genotoxischen Wirkungen von B[a]P ausging, sondern diese sich in Form von oxidativem Stress äußerten und erst nach der Bestrahlung mit künstlichem Sonnenlicht messbar waren. So wurde nach Koexposition eine Vielzahl an Zielgenen induziert, die eng mit der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NRF2 in Verbindung gebracht werden. Beispielsweise erfuhren die Thioredoxin-basierenden Antioxidantien *TXN* und *TXNRD* eine konzentrationsabhängige Induktion. Die Gegenwart von oxidativem Stress war auch an Genen abzulesen, die für die Aufrechterhaltung des GSH-Status der Zelle codieren. So wurde die Glutamat-Cystein-Ligase (*GCLC*) 2,5-fach vermehrt exprimiert und auch das Gen der Glutathion-S-Reduktase (*GSR*) erfuhr eine um den \log_2 -Faktor 1,1 erhöhte Expression nach Kombinationsbehandlung mit B[a]P und Bestrahlung. Neben transkriptionellen Änderungen von NRF2-Zielgenen äußerte sich die Koexposition auch in der erhöhten Expression von Entzündungsmarkern, wie *IL-8* und *VEGFA*. Eine Exposition mit künstlichem Sonnenlicht und B[a]P zeigte weiterhin Einfluss auf die Expression des Genclusters für apoptotische Faktoren und Zellzyklusregulatoren. Die Progression des Zellzyklus kann nur erfolgen, wenn die vorausgehende Zellzyklusphase vollständig und korrekt durchlaufen wurde. Spezielle

Zellzyklusproteine wie *Cycline Dependent Kinases* (CDK) aktivieren bzw. deaktivieren Zielproteine und orchestrieren so den Eintritt in die nächste Zellzyklusphase. Das Protein p21, für welches das Gen *CDKN1A* codiert, ist ein CDK-Inhibitor. Die konzentrationsabhängige Induktion um den \log_2 -fachen Wert 3,2 suggerierte einen Zellzyklusarrest durch die Koinkubation. *PLK3* (*Polo-like Kinase 3*) zählt ebenfalls zu den inhibierenden Regulatoren des Zellzyklus. Die Expression des *PLK3* Gens wurde leicht, um den 1,2-fachen Wert, erhöht. Eine ähnliche Tendenz konnte für die Gene *MYC* und *JUN* aufgezeigt werden, welche für gleichnamigen Transkriptionsfaktoren codieren. Bei *MYC* wurde eine um den \log_2 -fachen Faktor 2,0 gesteigerte Expression beobachtet. *JUN* zeigte nach der höchsten Behandlung eine Induktion von 2,4. Sowohl *MYC* als auch *JUN* fungieren als Transkriptionsfaktoren, welche an der zellulären Progression und der Mitogenese beteiligt sind und ebenso potente Auslöser des programmierten Zelltods, der Apoptose, darstellen (AMATI *et al.*, 1993; IP UND DAVIS, 1998). Neben Genen, die Einfluss auf den Zellzyklus haben, wurden auch Gene verstärkt exprimiert, die an der Initiation der Apoptose beteiligt sind. *PMAIP* und *TNFRSF10B* wurden nach Behandlung in hohen B[a]P-Konzentration induziert und wiesen mindestens 4-fach erhöhte Ausgangstranskriptmengen auf. *PMAIP* codiert dabei für das Protein NOXA, welches einen Vertreter der apoptotisch-wirkenden BCL-2 Familie darstellt und bei Überexpression die Cytochrom-C-abhängige Apoptose einleitet (PLONER *et al.*, 2008).

Durch die Behandlung mit MOAH-Extrakten zeigten ausschließlich Gene des Fremdstoffmetabolismus eine Induktion. Vor allem das für Cytochrom-P450 codierende Gen *CYP1A1* erfuhr eine konzentrationsabhängige Steigerung der Transkriptionsrate, welche bei den nicht bestrahlten Proben eine 8,5-fache- und bei den UV-bestrahlten Proben eine 9,2-fache Ausgangstranskriptmenge zur Folge hatte. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass in den analysierten MOAH-Fractionen planare, aromatische Kohlenwasserstoffe enthalten waren, die als Substrate zu einer Aktivierung des Arylhydrocarbon-Rezeptors (AhR) führten. Die Liganden des AhR wurden somit erfolgreich durch die LC-GC-Aufreinigung extrahiert. Zusätzlich zur Aktivierung des CYP450 codierenden Gens zeigten sich bei den bestrahlten Proben auch eine leichte Erhöhung der Genexpression von *EPHX1* (Epoxidhydrolase 1) und *NQO1* (NAD(P)H-abhängigen Chinon-Oxidoreduktase 1). *EPHX1* hydrolysiert dabei reaktive Epoxide und trägt so zu deren Detoxifizierung bei. *NQO1* verhindert Ein-Elektronen-Reduktionen gebildeter Chinone, die durch UV-Bestrahlung entstehen und bei der Radikalbildung beteiligt sind. Somit fungiert *NQO1* durch die Entgiftung der hochreaktiven Chinone als Wächter gegen oxidativen Stress. Synergistische oder additive Effekte der untersuchten MOAH-Fractionen mit künstlichem Sonnenlicht konnten nicht identifiziert werden. Auf Genexpressionsebene ließ dies darauf schließen, dass nur ein geringer Anteil der Verbindungen ausgedehnte Aromatensysteme besitzen, von denen keine phototoxischen Effekte ausgingen. Auf Proteinebene konnte keine Zunahme der Expressionsrate von CYP450 1A1 beobachtet werden, wobei die allgemein niedrigen Proteinexpressionsniveaus für fremdstoffmetabolisierende Enzyme (FME) in humaner Haut den Nachweis erschwerten. Analoge Studien von Wiegand *et al.* zeigten

zusätzlich ein nochmals geringeres *in-vitro*-Expressionsniveau von FME in HaCaT Zellen im direkten Vergleich zu 3D-Zellkulturmodellen und/oder nativen Keratinozyten (WIEGAND *et al.*, 2014).

Die aus den Genexpressionsanalysen gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Bildung von ROS konnten anhand des fluorimetrischen DCF-DA Assays bestätigt werden. Der zelluläre ROS-Gehalt nahm nach der Inkubation mit MOAH-Fractionen und der Bestrahlung mit künstlichem Sonnenlicht um den Faktor zwei im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle zu.

Der zweite Teil der vorgelegten Arbeit beschäftigte sich mit möglichen adversen Effekten löslicher und partikulärer Kupferverbindungen hinsichtlich ihrer Zytotoxizität, ihrer Beeinflussung von Genexpressionsmustern, ihrer zellulären Aufnahme und der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. Kupferoxidnanopartikel (CuO NP) gelten dabei als vielversprechende Alternative zu chemischen Bakteriziden und sind aufgrund ihrer Hitzebeständigkeit, der Lagerstabilität sowie ihres verhältnismäßig geringem allergenen Potentials favorisiert für die Anwendung in Bedarfsgegenständen, kosmetischen Mitteln sowie Pharmazeutika (GAWANDE *et al.*, 2016). Eine dermale Exposition gegenüber CuO ist dabei nicht auszuschließen und muss bei entsprechender Verwendung der Partikel berücksichtigt werden.

Die entsprechenden CuO NP wurden vor Verwendung bezüglich der Partikelgröße, ihrer Morphologie und ihrer Löslichkeit in physiologisch relevanten Flüssigkeiten charakterisiert. Die durchschnittliche Partikelgröße, welche mithilfe von TEM-aufnahmen bestimmt wurde, konnte einer vorausgegangenen Arbeit entnommen werden und betrug 55 nm (Semisch *et al.* 2014). Der hydrodynamische Radius der sphärischen CuO NP betrug bei 20 µg/mL in FKS-supplementiertem DMEM 184 nm in DMEM-HG und war abhängig von der eingesetzten Partikelkonzentration. Die jeweiligen Polydispersitätsindizes lagen für 20 µg/mL bei 0,239 (DMEM) bzw. 0,249 (DMEM-HG) und zeigten eine Verringerung mit ansteigender Partikelkonzentration. Die Löslichkeitsuntersuchungen der Partikelsuspensionen (20 µg/mL) mittels Atomabsorptions-spektrometrie ergaben eine Löslichkeit in DMEM (10 % FKS) von 45 ± 4 % nach 24 h.

Aus den durchgeführten Zytotoxizitätsstudien wurde ersichtlich, dass die Keratinozyten sensitiver auf die lösliche Kupferverbindung reagierten als auf das nanopartikuläre CuO. Gegenteilige Effekte ließen sich bei den Endothelzellen beobachten. Hier führten die CuO NP zu einer starken Reduktion der Zellviabilität, wohingegen die Inkubationen mit CuCl₂ in den entsprechenden Konzentrationsbereichen keine signifikanten Änderungen des ATP-Gehaltes mit sich brachten. Endothelzellen schienen demnach eine gut funktionierende Kupferhomöostase aufzuweisen. Als Ursache der unterschiedlichen Zytotoxizitäten in den beiden Zelltypen wurden abweichende Aufnahmemechanismen vermutet. Zur Unterstützung der aufgestellten Hypothese wurden Aufnahmestudien der CuO NP durchgeführt. Da die Membranzusammensetzungen der HaCaT Zellen eine Herausforderung für das angewandte Zellyseprotokoll darstellten und sich die EA.hy926 als sensibles *Target* der Haut herausstellte, wurden atomabsorptionsspektrometrische Analysen exemplarisch an der EA.hy926 Zelllinie durchgeführt. Zusammenfassend konnte für CuO NP eine starke Akkumulation von Kupferionen nach 24 h festgestellt

werden. Bereits ab einer Exposition von 0,5 µg/mL CuO NP wurden millimolare Kupferkonzentrationen in der Zelle detektiert und der zelluläre Gehalt im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle 25-fach erhöht. Die Behandlungen mit 1,0 µg/mL und 2,0 µg/mL erhöhten die Kupferlast der Zelle nochmals um den 32- bzw. 39-fachen Wert. In der höchsten CuO-Konzentration akkumulierten 6,8 mM in der Zelle, was der 111-fachen Menge an Kupfer im Vergleich zur Kontrolle entsprach. Die Inkubation mit CuCl₂ hingegen zeigte eine homöostatisch regulierte Kupferaufnahme bis 252 µM. Erst hohe Konzentrationen ließen die Kupferlast der Zelle auf 1,75 mM ansteigen, was einer um den Faktor 30 erhöhten Metallkonzentration entsprach. Die Ergebnisse spiegelten dabei die Beobachtungen vorausgegangener Arbeiten der beiden Lungenepithelzelllinien A549 (SEMISCH *et al.*, 2014) und BEAS-2B (STRAUCH *et al.*, 2017) wider. Zur Identifizierung des Aufnahmemechanismus wurden Untersuchungen zum Einfluss von Endozytoseinhibitoren angestellt. Eine Aufnahmehemmung der Partikel von 25 % respektive 10 % wurde durch die Endozytoseinhibitoren Monodansylcadaverin (MDC) und Hydroxydynasore (OH-Dyn) nachgewiesen. Sowohl MDC als auch OH-Dyn hemmten dabei die Clathrin- bzw. die Caveolea-vermittelte endozytotische Aufnahme, die neben der Macropinozytose und der Phagozytose die bedeutendsten Aufnahmewege von Partikel darstellen.

Aufbauend auf vorausgegangenen Untersuchungen wurden Genexpressionsanalysen der beiden Zelllinien nach Inkubation mit CuO NP sowie CuCl₂ durchgeführt. In den Keratinozyten zeigte sich dabei eine dosisabhängige und vielseitige Beeinflussung der Genexpressionsprofile vor allem in den Genclustern der Metallhomöostase und der oxidativen Stressantwort nach Behandlung mit beiden Kupferverbindungen. Hervorzuheben waren bei den Genexpressionsanalysen die Gene *MT1X* (*Metallothionein 1X*) und *MT2A* (*Metallothionein 2A*) der Metallothioneinfamilie, welche eine starke Induktion um die log₂-Faktoren von 4,0 – 5,0 erfuhren. MTs sind kleine Proteine, deren Funktionen die Regulierung des Zinkhaushaltes sowie die Speicherung von Metallionen darstellen. Aufgrund der hohen Anzahl an Thiolgruppen sind jedoch auch antioxidative Eigenschaften dieser Proteingattung bekannt (KREŻEL UND MARET, 2017). Die stärkste Induktion nach Kupferbehandlung zeigte das Gen der Hämoxygenase-1 (*HMOX1*). Es wurde in hohen Konzentrationen durch CuCl₂ um den log₂-Wert von 7,6 und durch CuO NP um den log₂-Faktor 8,0 verstärkt exprimiert. *HMOX1* unterliegt der Regulation des Transkriptionsfaktors NRF2. Eine gesteigerte Expression von *HMOX1* wird mit einem erhöhten oxidativen Stresslevel in Verbindung gebracht. Aufgrund der äußerst empfindlichen Geninduktion gilt *HMOX1* als Sensorgen für ROS (PRONK *et al.*, 2014). Eine konzentrationsabhängige Expressionsänderung war bei einem weiteren Sensorgen für oxidativen Stress, dem *Heat Shock Protein A 1A* (*HSPA1A*), ersichtlich. *HSPA1A* gehört zu der Familie der HSP70 und wird durch eine Vielzahl an Stressstimuli aktiviert. Es wird dabei für die Rückfaltung fehlstrukturerter Proteine benötigt, deren Bildung unter oxidativen Stressbedingungen vermehrt stattfindet (SCIEGLINSKA *et al.*, 2011). Inflammatorische Reaktionen in kupferexponierten Hautzellen äußerten sich auch durch eine erhöhte Genexpression des Interleukins *IL-8* (SPITZ UND FURLONG, 2012).

Neben Genen der oxidativen Stressantwort und der Metallhomöostase wurden auch Gene der Proliferation und der Zellzykluskontrolle in ihrer Expression moduliert. Das Protein p21, für welches das Gen *CDKN1A* codiert, spielt neben der Initiation des Zellzyklusarrestes auch bei Signalwegen der DNA-Reparatur und -Replikation sowie der Apoptose eine Rolle (DUTTO *et al.*, 2015). Die Induktion des Gens *CDKN1A* deutet nach Exposition gegenüber CuO NP bzw. CuCl₂ auf einen Zellzyklusarrest der Keratinozyten hin. *PMAIP1* codiert für das proapoptotische Protein NOXA und erfuhr eine dosisabhängige Induktion. Durch Behandlung mit den höchsten Kupferkonzentrationen wurde *PMAIP1* um den log₂-fachen Wert von 1,6 (CuCl₂) bzw. 1,7 (CuO NP) induziert, was als Indiz für apoptotische Prozesse der Keratinozyten gilt (ELMORE, 2007). DNA-Schadensantwortgene und DNA-Reparaturgene wurden durch hohe Kupferkonzentrationen unspezifisch in ihrer Expression gehemmt. Die einzige Ausnahme stellte hier das Sensorgen *GADD45A* dar, dessen Induktion bereits durch geringe Kupferkonzentrationen stattfand. Aufgrund aktueller Literaturdaten wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Herunterregulation von DNA-Schadensantwort- und DNA-Reparaturgenen epigenetische Veränderungen als Ursache haben könnten. So konnte bereits gezeigt werden, dass Kupfer eine hemmende Wirkung auf die Acetylierung der Histone ausübt. Die Chromatinacetylierung ist streng über die beiden Enzyme HAT (Histonacetyltransferase) und HDAC (Histondeacetyltransferase) reguliert. Die Acetylierung der positiv geladenen Histonseitenketten beeinträchtigt das DNA-Bindungsvermögen und führt zu einer Lockerung der Chromatinstruktur. Kupferionen scheinen dabei die Aktivität der HAT zu inhibieren und führten so zu einem Ungleichgewicht an Acetylierung und Deacetylierung sowie einer damit einhergehenden verminderten Transkriptionsrate betroffener Genloci (CHENG *et al.*, 2012). Abgesehen von der Modulation der Histonacetylierung zeigten auch bestimmte Kinasen, welche an der Histonphosphorylierung beteiligt sind, bereits ab 40 µM CuCl₂ eine um 50 % gehemmte Histon H3-Phosphorylierungsaktivität (BARCIA-SANJURJO *et al.*, 2013). Die biologischen Folgen der H3-Phosphorylierung sind vielschichtiger als die der Histonacetylierung und können im zellulären Kontext unterschiedlich sein. Generell hat der Phosphorylierungsgrad der Histone Einfluss auf die DNA-Kondensierung und so auf die Genexpressionsrate (GRUBMAN UND WHITE, 2017). Eine Hemmung der Histonkinasen durch Kupferionen kann daher als möglicher Einflussfaktor der inhibierten Transkription in Betracht gezogen werden.

Die Veränderungen der Genexpressionsmuster aus den Endothelzellen zeigten, im Gegensatz zu den Ergebnissen der Keratinozyten, einen klaren Zusammenhang zwischen der applizierten Kupferspezies und der Intensität der jeweiligen Geninduktion. Es wurden vorwiegend proapoptotische Gene und Gene der oxidativen Stressantwort induziert. Wasserlösliche Kupferionen zeigten nur in hohen, zytotoxischen Konzentrationen eine Veränderung der Expressionsprofile, während nanopartikuläres CuO bereits in niedrigen Konzentrationen starke Expressionsunterschiede hervorrief. Die Ergebnisse waren somit deckungsgleich zu den Untersuchungen der zytotoxischen Eigenschaften und der zellulären Aufnahme der Kupferverbindungen. Die erhöhte Kupferlast der partikelexponierten EA.hy926 Zellen deutete auf eine

unregulierte, endozytische Aufnahme hin, während extrazelluläre Kupferionen nicht im selben Maße aufgenommen wurden und einer effektiven homöostatischen Regulation unterlagen.

Ein großer Teil der zytotoxischen und genotoxischen Wirkung von Kupferpartikeln geht von ROS aus, deren Entstehung durch Fenton-ähnliche Reaktionen katalysiert werden (STRAUCH *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2012; HANAGATA *et al.*, 2011). Bei der Quantifizierung der gebildeten ROS wurde deutlich, dass die Endothelzellen bereits nach 6 h eine dreifach höhere Oxidationsfähigkeit des Fluoreszenzfarbstoffes nach Partikelbehandlungen offenbarten, als dies in Keratinozyten mit denselben Behandlungskonzentrationen beobachtet wurde. Somit führten sowohl die Zytotoxizitäts- und Genexpressionsuntersuchungen als auch die Aufnahmestudien sowie der ROS-Nachweis zu der Annahme, dass die Endothelzellen gegenüber Partikeln sensitiver reagierten als die Keratinozyten.

Es wurde daher gefolgert, dass die unterschiedlich stark induzierten Effekte maßgeblich mit den entsprechenden Aufnahmemechanismen des jeweiligen Zelltyps korrelieren. Die Keratinozyten erwiesen sich in allen durchgeführten Analysen als robuste Zelllinie, die zum Teil 10-fach höhere Partikelkonzentrationen duldeten, bevor vergleichbare zellulären Antwortmechanismen hervorgerufen wurden. Aus vorangegangenen Studien war bekannt, dass HaCaT Zellen nanopartikuläre Metallverbindungen internalisieren (NABESHI *et al.*, 2011; HORIE *et al.*, 2009), dies jedoch in einem geringeren Ausmaß stattfindet (HSIAO *et al.*, 2014). Zelllinienübergreifende Aufnahmeuntersuchungen zeigten, dass Keratinozyten (HaCaT) im Vergleich zu Lungenepithelzellen (A549) und Monozyten (THP-1) eine deutlich geringere Aufnahme von SiO₂ NP aufwiesen. Neben quantitativen Analysen der aufgenommenen Partikelmenge wurden auch kinetische Untersuchungen durchgeführt. Diesbezüglich konnte die Erkenntnis gewonnen werden, dass Lungenepithelzellen 15 nm große SiO₂ Partikel bereits nach 2 h internalisierten, wohingegen zu diesem Zeitpunkt in HaCaT Zellen keine Partikel detektiert werden konnten. Weiterhin ging aus Studien hervor, dass Keratinozyten vorzugsweise kleinere Partikel endozytieren (HSIAO *et al.*, 2014). Diese Beobachtung kann anhand der komplexen Membranbeschaffenheit der Keratinozyten erklärt werden (Abbildung 60). Die Zusammensetzung unterscheidet sich im Gegensatz zu anderen Zelltypen anhand einer Vielzahl hochvernetzter, schwerlöslicher Einlagerung von Prolin-reichen Proteinen wie Filaggrin, Involucrin und Loricrin, die im Verhornungsprozess der Keratinozyten eine wichtige Rolle spielen. Zudem stellen sie während der Zelldifferenzierung eine physiologische Barriere der Haut gegenüber Umwelteinflüssen dar. Es wird derzeit vermutet, dass Keratinozyten nicht über die Clathrin-vermittelte Endozytose (CME) verfügen, welche einen Hauptaufnahmeweg für die Internalisierung von Partikeln in der Größenordnung von 100 - 200 nm darstellt. Während der CME werden Clathrin-beschichtete Einstülpungen um membranständige Partikel gebildet, die nach Abschnürung in die Zelle gelangen. Diese Vesikel fusionieren im Laufe der endozytotischen Reifung mit Lysosomen und erfahren so eine Änderung des pH-Wertes.

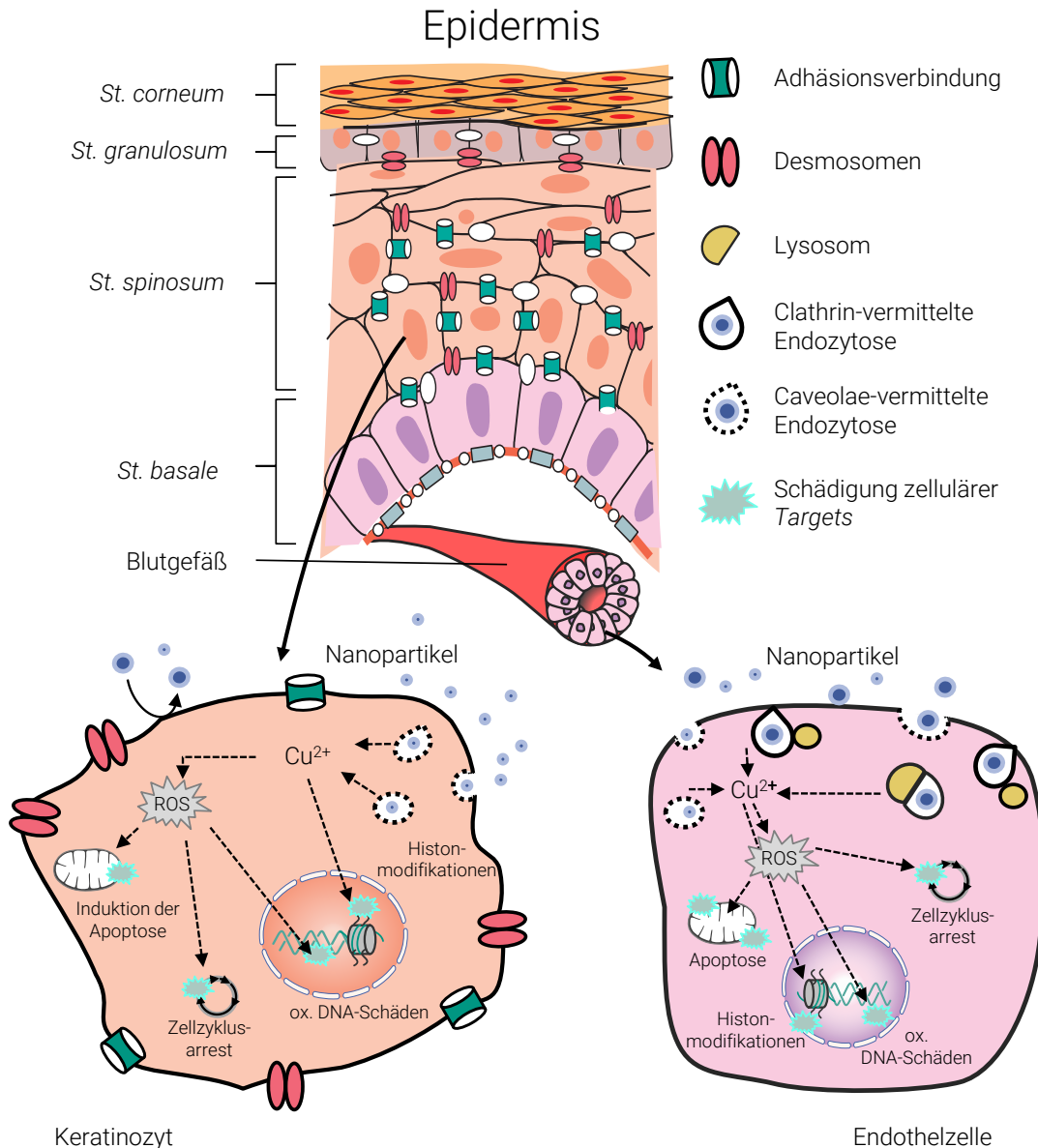


Abbildung 60: Unterschiedliche Aufnahmemechanismen von Nanopartikeln in Keratinozyten und Epithelzellen.

Der Querschnitt der Epidermis verdeutlicht den starken Zell-Zell-Verband, der sich ab dem *Stratum spinosum* ausbildet. Intermediärfilamente, die sog. Desmosomen, sorgen neben weiteren Adhäsionsverbindungen für die physiologische Barrierefunktion der Epidermis. Keratinozyten verfügen über die Caveolae-vermittelte Endozytose und nehmen Nanopartikel (NP) < 100 nm auf. Im Intrazellularraum lösen sich die NP und setzen Kupferionen frei. Gefäßauskleidende Endothelzellen besitzen eine erhöhte Endozytoserate. Neben der Caveolae-vermittelten Internalisierung verfügt Endothelgewebe auch über den Clathrin-vermittelten Endozytosemechanismus. Über diesen Aufnahmeweg können auch Partikel mit bis zu 200 nm Durchmesser die Zellmembran durchtreten. Die Clathrin-beschichteten Vesikel fusionieren im Zellinneren mit Lysosomen. Durch eine Senkung des pH-Wertes werden säurelabile Metallverbindungen, wie CuO, gelöst und Kupferionen (Cu^{2+}) treten aus. Cu^{2+} stören das Gleichgewicht antioxidativer Schutzmechanismen der Zelle und setzen in nachgeschalteten Reaktionen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) frei. ROS führen zum Arrest der Zellzyklusprogression und initiieren die Apoptose. Im Zellkern sind ROS an der Entstehung von oxidativen Basenschäden beteiligt. Kupferionen schädigen weiterhin eine Vielzahl von Proteinen und nehmen so beispielsweise Einfluss auf epigenetische Modifikationen von Histonen (modifiziert nach McGRATH *et al.*, 2010).

Enthaltene Metallpartikel werden dabei durch lysosomale Ansäuerung aufgelöst, wobei hohe intrazelluläre Metallkonzentrationen die Folge sind (HSIAO *et al.*, 2014; REJMAN *et al.*, 2004) Die CME findet vorzugsweise in Endothelzellen, wie den EA.hy926 Zellen statt. In Keratinozyten scheint dagegen die Caveolae-vermittelte Endozytose der bevorzugte Aufnahmeweg zu sein. Dabei werden kleinere, flaschenförmige Abschnürungen ausgebildet, die Partikel mit einem Durchmesser von maximal 100 nm erfassen. Eine anschließende Fusionierung mit Lysomen findet im Verlauf der Endozytose zwar statt, es gibt jedoch Hinweise, dass ein gewisser Prozentsatz keine Ansäuerung erfährt (KISS UND BOTOS, 2009). Folglich ist die Freisetzung von Metallionen in HaCaT Zellen retardiert und die Toleranz gegenüber CuO NP größer.

Im Anschluss an die toxikologischen Untersuchungen der Kupferverbindungen wurden mögliche adverse Effekten löslicher und partikulärer Chromverbindungen analysiert. Im Alltag erfolgt die dermale Exposition gegenüber partikulären Cr-Verbindungen zumeist durch Ledererzeugnisse wie Schuhe, Bekleidung, Schmuck und Möbel. Etwa 90 % aller Ledererzeugnisse sind dabei mit Cr-Salzen gegerbt und auch NP finden dabei im Gerbeprozess Anwendung (HEDBERG *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2019). Weiterhin werden Cr(III)-Oxid und Cr(III)-Hydroxid aufgrund ihrer Grünfärbung als Pigmente in Kosmetika und Tätowierfarben eingesetzt (SCHREIVER *et al.*, 2017).

In den Untersuchungen wurden Chrom(III)-Oxid-Partikel drei unterschiedlicher Hersteller hinsichtlich ihrer Zytotoxizität, ihrer Beeinflussung von Genexpressionsmustern, der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und möglicher epigenetischer Effekte auf das Methylierungsmuster der DNA untersucht. Vor der Exposition gegenüber Zellen wurden die Cr₂O₃ Partikel bezüglich ihrer Partikelgröße, ihrer Morphologie und der Löslichkeit in physiologisch relevanten Flüssigkeiten charakterisiert. Die mithilfe von TEM-Aufnahmen ermittelten Durchschnittswerte der Partikelgrößenverteilungen betragen für die Partikel des Herstellers A 41,8 nm, für die Partikel des Herstellers B 78,0 nm und 145,5 nm für die Partikel des Herstellers C. Der hydrodynamische Radius der sphärischen Cr₂O₃ Partikel betrug in der Konzentration von 20 µg/mL 180 nm in DMEM bzw. 240 nm in DMEM-HG für die Partikel A und 513 nm (DMEM) bzw. 485 nm (DMEM-HG) für die Partikel B. Der hydrodynamische Radius der Partikel C konnte aufgrund ihrer hohen Sedimentationsgeschwindigkeit nicht über das DLS-Verfahren analysiert werden, da dieses nur für stabile Lösungen geeignet ist. Neben der Partikelgröße wurden auch Untersuchungen bezüglich der Löslichkeit durchgeführt. Dabei lag ein gesonderter Fokus auf der Freisetzung von Cr(VI). Hierbei fand eine kolorimetrische Nachweismethode Anwendung, die selektiv, unter der Reduktion von Cr(VI), einen farbigen Cr(III)-Diphenylcarbazon-Komplex ausbildet. Die Bestimmungsgrenze der Methode betrug dabei gemäß DIN 32645 37 µg/L. Partikel C zeigten keinerlei Verschiebung des Absorptionsspektrums von DPC. Eine Freisetzung von Cr(VI) fand somit nicht statt. Die Partikel des Herstellers B wiesen einen Cr(VI)-Gehalt von 0,18 % ± 0,03 % in künstlicher lysosomaler Flüssigkeit (ALF) und 0,16 % ± 0,01 % in Wasser auf. Der gemittelte Gehalt an Cr(VI) belief sich bei den Partikeln A auf 3,72 % ± 0,10 % in ALF und 3,89 % ± 0,24 % in Wasser. Die Prozentangaben entsprachen dabei dem errechneten Massenanteil bezogen auf die jeweiligen Partikeleinwaagen. Die Gegenwart von nennenswerten Cr(VI)-Konzentrationen in den Partikeln

des Herstellers A konnte im Anschluss durch Analysen mittels Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS) verifiziert werden.

Während die Partikel der Hersteller B und C lediglich schwache bis keine zytotoxischen Eigenschaften aufwiesen, führten die Partikel A bereits in niedrigen Konzentrationen von 5 µg/mL zu einer 20 %igen Depletion des zellulären ATP-Gehaltes und reduzierten die Vitalität der HaCaT Zellen. Als Referenz zu den partikulären Cr-Verbindungen wurden analoge Untersuchungen mit dem wasserlöslichen, trivalenten Chromchlorid und dem hexavalentem Kaliumdichromat durchgeführt. Dabei konnten Rückschlüsse über die zelluläre Schadensantwort der jeweiligen Cr-Spezies gewonnen werden.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Cr(III) aufgrund seiner oktaedrischen Struktur als Hexaaquachrom(III)-Komplex $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ die Zellmembran nur langsam durchdringt. Die zelluläre Aufnahme von Cr(III) erfolgt dabei, wie bei anderen dreiwertigen Metallionen, Transferrin-vermittelt und ist hundertfach geringer als die von Cr(VI) (VINCENT UND LOVE, 2012; DENG *et al.*, 2015; PAVESI UND MOREIRA, 2020). Cr(VI) liegt in Abhängigkeit des pH-Wertes in der tetraedrischen Koordination als Chromat (CrO_4^{2-}) vor. Der Transport in das Zytosol findet hierbei, aufgrund der Strukturähnlichkeit zu Sulfaten, über entsprechende Anionentransporter statt (ZHITKOVICH, 2011). Die unterschiedlichen Eintrittsraten in zelluläre Systeme der Cr(III)- und Cr(VI)-Verbindungen machten sich in den durchgeführten Zytotoxizitätsuntersuchungen bemerkbar. Während CrCl_3 auch in hohen mikromolaren Konzentrationen kaum Einfluss auf die Zellviabilität der HaCaT Zellen hatte, erwiesen sich $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -Konzentrationen von unter 10 µM bereits als stark zytotoxisch.

Besonders eindrucksvoll zeigten sich die Analogien der Schadensantwortmuster in angeschlossenen Genexpressionsuntersuchungen. Während die Genexpressionsprofile der Keratinozyten nach Behandlung mit Partikeln der Hersteller B und C keine biologisch relevanten Änderungen aufwiesen und auch CrCl_3 keine nennenswerten Modulationen der Genexpression hervorrief, hatten sowohl die Partikel des Herstellers A als auch die lösliche Cr(VI)-Referenz einen starken Einfluss auf die transkriptionelle Regulation der Zelle. Ausgeprägte Dosis-Wirkungsbeziehungen der beiden Verbindungen äußerten sich dabei in den Genclustern der oxidativen Stressantwort, der Zellzyklusregulation und der Apoptose. In hohen Konzentrationen hemmten NP des Herstellers A und $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ die Genexpression von Zielgenen des Transkriptionsfaktors NRF2. Zu den betroffenen Zielgenen gehörten *CAT* (Katalase), *GCLC* (Glutamin-Cystein-Ligase) und *GSR* (Glutathion-S-Reduktase). Diese Repression der genannten Gene entsprach dabei nicht den Beobachtungen aus der Literatur, welche beschrieben, dass zellulär aufgenommenes Cr(VI) durch endogene Reduktionsmittel zu Cr(III) reduziert wird und dabei ROS entstehen, die NRF2 aktivieren. Für eine Repression der obenstehenden Gene muss Cr(VI) Einfluss auf NRF2-Effektorsysteme nehmen, die der Transkription vorgeschaltet sind. Chen *et al.* wiesen dabei nach, dass es in Tumorzellen zu einer modulierten Acetylierung von NRF2 kommt und so dessen Bindung an die DNA gehemmt wird (CHEN *et al.*, 2017; HAYES UND DINKOVA-KOSTOVA, 2017). Diese posttranslationale Proteinmodifikation wird durch die beiden Koaktivatoren CBP (*CREB binding protein*) und p300 katalysiert, welche auch an der Acetylierung von Histonen beteiligt sind (SUN *et al.*, 2009B). Die Wechselwirkungen von Cr(VI) mit

CBP/p300 sind bekannt. Untersuchungen in der Leberzelllinie Hepa-1 zeigten eine Hemmung des ebenfalls CBP/p300-abhängigen Transkriptionsfaktors AhR und führten nach 30-minütiger Exposition gegenüber 50 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ zu einer verminderten Transkriptionsrate in dessen Zielgenen (WEI *et al.*, 2004). Somit ist anzunehmen, dass für NRF2 ein ähnlicher Mechanismus der CBP/p300-Hemmung zu Grunde lag. Eine ausbleibende Acetylierung hätte so negativen Einfluss auf die Funktionalität und das Bindungsvermögen des wichtigen Transkriptionsfaktors und könnte die Repression wichtiger Gene der oxidativen Stressantwort erklären. Weitere Untersuchungen sind jedoch erforderlich, um die aufgestellte Hypothese zu überprüfen. Neben Genen der oxidativen Stressantwort wurden zusätzlich Gene der Zellzyklusprogression sowie des programmierten Zelltodes in ihrer Expressionsrate beeinflusst. So wurde beispielsweise das Gen *CDKN1A*, welches für p21 codiert, konzentrationsabhängig durch $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ und NP des Herstellers A induziert. Auf transkriptioneller Ebene deuten die Expressionsänderungen von *CDKN1A* auf einen Zellzyklusarrest in den Keratinozyten hin.

Die höchste Repression im Cluster der apoptotischen Gene erfuhr *MAP3K5*, welches für *ASK1* (*apoptosis signal regulating kinase 1*) codiert. Die Transkriptionsrate wurde nach einer Behandlung mit 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ um bis zu 95 % reduziert. ASK1 spielt eine entscheidende Rolle bei der Induktion der Apoptose. Nach schweren Schädigungen auf zellulärer Ebene wird als angemessene Reaktion der Zelltod eingeleitet. Dementsprechend führt eine Dysfunktion der apoptotischen Regulationswege zu einer Hemmung des programmierten Zelltods und so zu einer Verschiebung hin zu unkontrollierten, nekrotischen Zelltodmechanismen, die zum Teil schwere Entzündungsreaktionen zur Folge haben (RYUNO *et al.*, 2017). Neben ASK1 erfuhren weitere Gene eine Repression, die an der Apoptose und der Zellzyklusregulation beteiligt sind. Hierzu gehörte das Gen *APAF1* (*apoptotic protease activating factor 1*) welches für das gleichnamige Protein codiert. APAF1 ist an der Cytochrom-C-abhängigen Apoptose beteiligt und gilt dabei als zentraler Aktivator des intrinsischen Apoptosewegs (SHAKERI *et al.*, 2017). *PMAIP1* codiert für das proapoptische Protein NOXA und erfuhr eine dosisabhängige Induktion. Durch Behandlung mit den höchsten Konzentrationen wurde *PMAIP1* um den \log_2 -fachen Wert von 1,3 induziert, was als Indiz für apoptotische Prozesse der Keratinozyten gilt (ELMORE, 2007). Eine weitere Schlüsselrolle der Apoptose nimmt dabei das stark reprimierte Gen *BTRC* (*beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase*) ein. Bereits niedrige Konzentrationen von 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ der NP des Herstellers A zeigten eine Minderung der Transkriptmenge um 55 %. Die Behandlung in der höchsten Konzentration führte zu einer starken Inhibierung der Ableserate und einer relativen Transkriptmenge von < 10 % bezogen auf die Kontrolle. *BTRC* codiert für eine E3-Ubiquitin-Ligase, die an der Ubiquitinierung und dem Abbau des oben erwähnten NF κ B-Inhibitors A (NF κ BIA) beteiligt ist. Eine ausbleibende Inhibition von NF κ B führt zu dessen Translokation in den Zellkern und der Induktion proapoptischer Gene (VUCIC *et al.*, 2011). *JUN* zeigte im Cluster der Zellzyklusregulatoren die höchste Induktion und stieg mit zunehmender Konzentration an Cr(VI)-Ionen bis auf den etwa dreifachen \log_2 -Wert an. Das Genprodukt c-JUN fungiert dabei als Transkriptionsfaktor, welcher an der zellulären Progression und Mitogenese beteiligt ist und ebenso als

potenter Auslöser des programmierten Zelltods gilt (AMATI *et al.*, 1993; IP UND DAVIS, 1998). Die aufgeführten Änderungen der Genexpressionsmuster ließen auf die Initiation eines Zellzyklusarrestes schließen. Höhere Cr(VI)-Konzentrationen zeigten auf transkriptioneller Ebene eine erhöhte Apoptoserate.

Die Gene der DNA-Schadensantwort sowie der DNA-Reparatur zeigten, bis auf das Sensorgen *GADD45A*, eine reprimierte Expression nach Behandlung mit NP des Herstellers A und der löslichen Cr(VI)-Verbindung. *GADD45A* codiert dabei für das Protein GADD45 α der GADD-Familie. Gene dieser Familie werden durch genotoxischen Stress vermehrt transkribiert. Vertreter der GADD-Familie nehmen so Einfluss auf zelluläre Prozesse und sind entscheidende Regulatoren für die Zellzyklusprogression und die Apoptose (LIEBERMANN UND HOFFMAN, 2008). NP des Herstellers A führten in 23 von 28 untersuchten Genen unterschiedlicher DNA-Schadensantwort- und -Reparaturmechanismen zu einer Repression. Die Transkriptionsraten der genannten Gene wurden dabei in den höchsten Konzentrationen um bis zu 80 % reduziert. Die Genexpressionsveränderungen einzelner Reparaturmechanismen zeigten in ihrer Repression keinerlei Selektivität, was darauf schließen ließ, dass kein einzelnes Schadensmuster durch freies Cr(VI) hervorgerufen, sondern vielmehr die Reparaturkapazität unter hohen Cr(VI)-Konzentrationen herunterreguliert wurde.

Aktuelle Studien bezüglich der Herunterregulation von DNA-Reparaturgenen suggerieren dabei, dass Cr(VI) Einfluss auf das Epigenom nimmt und über posttranslationale Histonmodifikationen sowie Änderungen des DNA-Methylierungsmusters maßgeblich an der Chromatin-induzierten Krebsentstehung beteiligt sind. Aus diesem Grund wurden Studien der genomweiten DNA-Methylierung durchgeführt. Zur Quantifizierung der DNA-Methylierung wurde hierbei ein für 5-Methylcytosin (5-mC)-spezifischer ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) eingesetzt. Im Rahmen dieser Dissertation konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Exposition gegenüber Cr(VI) zu einer konzentrationsabhängigen und zeitabhängigen Hypomethylierung der DNA in humanen Keratinozyten führte. Der relative 5-mC-Gehalt sank dabei nach 24-stündiger Behandlung mit 13,2 μ M Cr(VI) um 36 %. Die Behandlung mit 26,4 μ M verringerte den 5-mC-Gehalt um 55,4 %. Verglichen mit der äquimolaren 48 h-Inkubation kam es zu einer Erholung des DNA-Methylierungsgrades auf das Ausgangsniveau. Auch eine höhermolare Inkubation mit 26,4 μ M zeigte nach 48 h eine Wiederherstellung des 5-mC-Gehaltes; so nahm der Grad der DNA-Methylierung von 22 % (24 h) auf 88 % (48 h) des Kontrollniveaus zu. Diese Dynamik der DNA-Methylierung war bereits Untersuchungen mit Lungenepithelzellen und B-Lymphoblasten bekannt. Hierbei zeigten sich nach bereits 2 h zum Teil starke Senkungen der 5-mC-Gehalte von ca. 40 - 60 % nach Inkubation mit Cr(VI), während eine 24-stündige Behandlung eine vergleichsweise weniger stark ausgeprägte DNA-Hypomethylierung erkennen ließ (LOU *et al.*, 2013).

Die Ursachen für eine unspezifische, globale DNA-Hypomethylierung nach Cr(VI)-Exposition sind komplex und nicht gänzlich nachvollzogen. In der Literatur existieren verschiedene Hypothesen, wie Cr(VI) zu einer DNA-Hypomethylierung führen kann. Die Bildung von ROS nach Cr(VI)-Exposition scheint dabei ebenso

eine Rolle zu spielen wie Cr(III)-Quervernetzungen von Proteinen, die an Methylierungsprozessen beteiligt sind (FRANCO *et al.*, 2008; DA SILVA *et al.*, 2015).

Auch wenn eine globale DNA-Hypomethylierung mit sequenzspezifischen Hypermethylierungen in Guanin- und Cytosin-reichen Regionen (CpG-Inseln) einhergehen (SUN *et al.*, 2009A; ILLINGWORTH UND BIRD, 2009), so sind es erst Hypermethylierungen in den Promotorregionen der jeweiligen Gensequenzen, die eine Verringerung der Transkription hervorrufen. Dabei nimmt die Bindungsaffinität von Transkriptionsfaktoren an Promotorregionen mit hohen Gehalten an 5-mC ab und es kommt so zum sog. *gene silencing*. Das Verständnis um den Einfluss von Cr(VI) auf das Epigenom ist noch immer lückenhaft. Es wird derzeit jedoch davon ausgegangen, dass viele der noch immer nicht gänzlich verstandenen toxischen Effekte von Cr(VI), wie beispielsweise der Cr(VI)-induzierten Ausbildung von DNA-Reparaturdefizienten Zellen oder der Cr(VI)-verursachten genomischen Instabilität, auf epigenetische Veränderungen zurück zu führen sind (WISE *et al.*, 2018; RAGER *et al.*, 2019).

Die hier dargestellten Analysen des globalen 5-mC-Gehaltes machen abschließende mechanistische Erklärung nicht möglich. Zu vielfältig sind die hervorgerufenen Effekte. Für eine Detailbetrachtung der Wirkmechanismen sind genspezifische Untersuchungen der jeweiligen reprimierten Gene notwendig. Neben Analysen sequenzspezifischer Methylierungsmuster sollte Augenmerk auf dem Einfluss von Cr(VI) auf verschiedene Histonmodifikationen gelegt werden. Untersuchungen an Lungenepithelzellen konnten bereits zeigen, dass die Methylierung von Lysin in Histonsseitenketten des Histons H3 durch Cr(VI) bevorzugt ablief. Eine Induzierbarkeit der DNA-Methyltransferase (DNMT) G9a konnte durch Cr(VI) identifiziert werden. H3K9-Modifikationen (Histon 3, Lysinrest 9) rekrutieren DNMT an entsprechende Promotorregionen und leiten die Hypermethylierung der Sequenzen ein und führten so zu einer Herunterregulation von DNA-Reparaturgenen (WANG *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2018).

Die starke Repression DNA-Reparatur-assoziiierter Gene, die aus den Genexpressionsanalysen hervorgingen, können in Kombination mit den bekannten direkt und indirekt genotoxischen Wirkungen von Chromaten beschleunigend auf die Tumorgenese wirken. Durch die verringerte Erkennungs- und Reparaturkapazität können oxidative Schädigungen der DNA sowie binäre und ternäre DNA-Addukte nicht oder nur unzureichend beseitigt werden. Mögliche Mechanismen zur Abwehr der genannten Schäden wurden auf translationaler Ebene jedoch ebenfalls aktiviert. Durch das Einleiten des Zellzyklusarrestes werden DNA-Schäden nicht an Tochtergenerationen weitergegeben und Mutationen so verhindert. Stark geschädigte HaCaT Zellen zeigten bei hohen Cr(VI)-Konzentrationen eine Änderung von Genen apoptotischer Signalwege, was darauf schließen ließ, dass kontrollierte Zelltodmechanismen eingeleitet wurden. Dennoch geht von der Exposition gegenüber Chromat-verunreinigten Pigmenten, Chemikalien der Ledergerbung und Tätowierfarben minderer Qualität ein erhebliches Gefährdungspotential für den Verbraucher aus. Zwar besitzt die Haut eine Vielzahl an Thiolgruppen-tragenden Proteinen, die in der Lage sind Cr(VI) zu Cr(III) zu reduzieren und so zu binden, jedoch zeigten sowohl *in-vitro*- als auch in *in-vivo*-Studien, dass die reduktive Kapazität der Epidermis nicht ausreicht, um eine dermale Penetration von

gelöstem Cr(VI) und die damit einhergehende systemische Aufnahme zu verhindern (FRANKEN *et al.*, 2015; BARANOWSKA-DUTKIEWICZ, 1981; GAMMELGAARD *et al.*, 1992). Daher muss bei der Verwendung von nanopartikulären Cr(III)-Salzen in kosmetischen Mitteln oder in Kollagenquervernetzern für die Lederherstellung ein Höchstmaß an Sorgfalt bei der Auswahl der eingesetzten Rohstoffe getroffen werden.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- ADAM, C.; Wohlfarth, J.; Haußmann, M.; Sennefelder, H.; Rodin, A.; Maler, M.; Martin, S. F.; Goebeler, M.; Schmidt, M. (2017): Allergy-Inducing Chromium Compounds Trigger Potent Innate Immune Stimulation Via ROS-Dependent Inflammasome Activation. *The Journal of Investigative Dermatology* 137 (2), S. 367–376.
- AMATI, B.; Littlewood, T. D.; Evan, G. I.; Land, H. (1993): The c-Myc protein induces cell cycle progression and apoptosis through dimerization with Max. *The EMBO Journal* 12 (13), S. 5083–5087.
- ANWAR-MOHAMED, A.; Elbekai, R. H.; El-Kadi, A. O. S. (2009): Regulation of CYP1A1 by heavy metals and consequences for drug metabolism. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 5 (5), S. 501–521.
- ARITA, A.; Costa, M. (2009): Epigenetics in metal carcinogenesis. Nickel, arsenic, chromium and cadmium. *Metallomics* 1 (3), S. 222–228.
- BACHS, O.; Gallastegui, E.; Orlando, S.; Bigas, A.; Morante-Redolat, J. M.; Serratosa, J.; Fariñas, I.; Aligué, R.; Pujol, M. J. (2018): Role of p27Kip1 as a transcriptional regulator. *Oncotarget* 9 (40), S. 26259–26278.
- BAHASSI, E. M.; Conn, C. W.; Myer, D. L.; Hennigan, R. F.; McGowan, C. H.; Sanchez, Y.; Stambrook, P. J. (2002): Mammalian Polo-like kinase 3 (Plk3) is a multifunctional protein involved in stress response pathways. *Oncogene* 21 (43), S. 6633–6640.
- BAIRD, L.; Yamamoto, M. (2020): The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway. *Molecular and cellular biology* 40 (13).
- BARANOWSKA-DUTKIEWICZ, B. (1981): Absorption of hexavalent chromium by skin in man. *Archives of Toxicology* 47 (1), S. 47–50.
- BARCIA-SANJURJO, I.; Vázquez-Cedeira, M.; Barcia, R.; Lazo, P. A. (2013): Sensitivity of the kinase activity of human vaccinia-related kinase proteins to toxic metals. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 18 (4), S. 473–482.
- BARP, L.; Biedermann, M.; Grob, K.; Blas-Y-Estrada, F.; Nygaard, U. C.; Alexander, J.; Cravedi, J.-P. (2017): Accumulation of mineral oil saturated hydrocarbons (MOSH) in female Fischer 344 rats. Comparison with human data and consequences for risk assessment. *The Science of the Total Environment* 575, S. 1263–1278.
- BAYLIN, S. B. (2005): DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nature clinical practice. Oncology* 2 Suppl 1, S4-11.
- BELINSKY, M.; Jaiswal, A. K. (1993): NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 (DT-diaphorase) expression in normal and tumor tissues. *Cancer metastasis reviews* 12 (2), S. 103–117.
- BENEDIX, R. (2015): *Bauchemie*. Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden.
- BEYTH, N.; Hourri-Haddad, Y.; Domb, A.; Khan, W.; Hazan, R. (2015): Alternative antimicrobial approach. Nano-antimicrobial materials. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2015, S. 246012.
- BIEDERMANN, M.; Grob, K. (2012): On-line coupled high performance liquid chromatography-gas chromatography for the analysis of contamination by mineral oil. Part 1. Method of analysis. *Journal of chromatography. A* 1255, S. 56–75.
- BOLTON, J. L.; Trush, M. A.; Penning, T. M.; Dryhurst, G.; Monks, T. J. (2000): Role of Quinones in Toxicology. *Chemical Research in Toxicology* 13 (3), S. 135–160.
- BONIFAS, J.; Hennen, J.; Dierolf, D.; Kalmes, M.; Blömeke, B. (2010): Evaluation of cytochrome P450 1 (CYP1) and N-acetyltransferase 1 (NAT1) activities in HaCaT cells. Implications for the development of in vitro techniques for predictive testing of contact sensitizers. *Toxicology in Vitro* 24 (3), S. 973–980.

- BOUKAMP, P.; Petrussevska, R. T.; Breitzkreutz, D.; Hornung, J.; Markham, A.; Fusenig, N. E. (1988): Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of Cell Biology* 106 (3), S. 761–771.
- BRADFORD, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, S. 248–254.
- BREGNBAK, D.; Johansen, J. D.; Jellesen, M. S.; Zachariae, C.; Menné, T.; Thyssen, J. P. (2015): Chromium allergy and dermatitis. Prevalence and main findings. *Contact dermatitis* 73 (5), S. 261–280.
- BRIEHL, H. (2014): Chemie der Werkstoffe. Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden.
- BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; Maiorino, M. (2013): Glutathione peroxidases. *Biochimica et biophysica acta* 1830 (5), S. 3289–3303.
- BROWNING, C. L. a. S. R. M. a. W. J. P. (2017): Molecular Mechanisms of Chromium-Induced Carcinogenesis. In: Mudipalli, A. a. Z. J. T. (Hg.): Essential and Non-essential Metals: Carcinogenesis, Prevention and Cancer Therapeutics. Cham: Springer International Publishing, S. 143–180. Online verfügbar unter https://doi.org/10.1007/978-3-319-55448-8_7.
- BUNDESAMT FÜR STRAHLENSCHUTZ (2017): Sonne und Sonnenschutz. Strahlenschutz konkret. Unter Mitarbeit von Melanie Bartholomäus. D-38201 Salzgitter, zuletzt aktualisiert am Januar 2017.
- BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG (BfR) (2018): Stellungnahme Nr. 008/2018. Aktualisierte Stellungnahme Nr. 008/2018 des BfR vom 19. Februar 2018. Online verfügbar unter <http://www.bfr.bund.de/cm/343/hochraffinierte-mineraloele-in-kosmetika-gesundheitliche-risiken-sind-nach-derzeitigem-kenntnisstand-nicht-zu-erwarten.pdf>.
- BUNDESZENTRALE FÜR GESUNDHEITLICHE AUFKLÄRUNG (BZgA) (2007): Naphthalin/Naphthole und Human-Biomonitoring. Stellungnahme der Kommission Human-Biomonitoring des Umweltbundesamtes. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 50 (10), S. 1357–1364.
- BUSTIN, S. A.; Benes, V.; Garson, J. A.; Hellemans, J.; Huggett, J.; Kubista, M.; Mueller, R.; Nolan, T.; Pfaffl, M. W.; Shipley, G. L.; Vandesompele, J.; Wittwer, C. T. (2009): The MIQE guidelines. Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry* 55 (4), S. 611–622.
- BUTERS, J.; Biedermann, T. (2017): Chromium(VI) Contact Dermatitis. Getting Closer to Understanding the Underlying Mechanisms of Toxicity and Sensitization! *The Journal of Investigative Dermatology* 137 (2), S. 274–277.
- CANTON, I.; Battaglia, G. (2012): Endocytosis at the nanoscale. *Chemical Society Reviews* 41 (7), S. 2718–2739.
- CARRILLO, J.-C.; van der Wiel, A.; Danneels, D.; Kral, O.; Boogaard, P. J. (2019): The selective determination of potentially carcinogenic polycyclic aromatic compounds in lubricant base oils by the DMSO extraction method IP346 and its correlation to mouse skin painting carcinogenicity assays. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 106, S. 316–333.
- CASTRO-ALFÉREZ, M.; Polo-López, M. I.; Fernández-Ibáñez, P. (2016): Intracellular mechanisms of solar water disinfection. *Scientific Reports* 6, S. 38145.
- CHASSOT, A.-A.; Turchi, L.; Virolle, T.; Fitsialos, G.; Batoz, M.; Deckert, M.; Dulic, V.; Meneguzzi, G.; Buscà, R.; Ponzio, G. (2007): Id3 is a novel regulator of p27kip1 mRNA in early G1 phase and is required for cell-cycle progression. *Oncogene* 26 (39), S. 5772–5783.
- CHEMISCHES UND VETERINÄRUNTERSUCHUNGSAMT KARLSRUHE (CVUA) (2019): Mineralölanalytik in Lippenpflegeprodukten – erste Ergebnisse des Forschungsprojekts MOSH/MOAH in Kosmetika. Online verfügbar unter https://www.ua-bw.de/pub/beitrag.asp?subid=0&Thema_ID=4&ID=2976&Pdf=No&lang=DE.
- CHEN, D.; Tavana, O.; Chu, B.; Erber, L.; Chen, Y.; Baer, R.; Gu, W. (2017): NRF2 Is a Major Target of ARF in p53-Independent Tumor Suppression. *Molecular cell* 68 (1), 224-232.e4.

- CHENG, T.-F.; Choudhuri, S.; Muldoon-Jacobs, K. (2012): Epigenetic targets of some toxicologically relevant metals. A review of the literature. *Journal of applied toxicology* 32 (9), S. 643–653.
- CHRISTMANN, M.; Kaina, B. (2019): Epigenetic regulation of DNA repair genes and implications for tumor therapy. *Mutation research* 780, S. 15–28.
- CONCAWE (1994): The use of the DMSO extract by the IP346 method as an indicator of the carcinogenicity of lubricant base oils and distillate aromatic extracts. Unter Mitarbeit von B. Simpson J. R. J. Ellision. Brüssel.
- COSTA, C. H. d.; Perreault, F.; Oukarroum, A.; Melegari, S. P.; Popovic, R.; Matias, W. G. (2016): Effect of chromium oxide (III) nanoparticles on the production of reactive oxygen species and photosystem II activity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Science of The Total Environment* 565, S. 951–960.
- DA SILVA, R. A.; Sammartino Mariano, F.; Planello, A. C.; Line, S. R. P.; Souza, A. P. de (2015): HaCaT anchorage blockade leads to oxidative stress, DNA damage and DNA methylation changes. *Biochemistry and biophysics reports* 2, S. 94–102.
- DAHL, C.; Grønbaek, K.; Guldborg, P. (2011): Advances in DNA methylation. 5-hydroxymethylcytosine revisited. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 412 (11-12), S. 831–836.
- DELOUGHERY, Z.; Luczak, M. W.; Zhitkovich, A. (2014): Monitoring Cr Intermediates and Reactive Oxygen Species with Fluorescent Probes during Chromate Reduction. *Chemical Research in Toxicology* 27 (5), S. 843–851.
- DENG, G.; Wu, K.; Cruce, A. A.; Bowman, M. K.; Vincent, J. B. (2015): Binding of trivalent chromium to serum transferrin is sufficiently rapid to be physiologically relevant. *Journal of inorganic biochemistry* 143, S. 48–55.
- DEPONTE, M. (2013): Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et biophysica acta* 1830 (5), S. 3217–3266.
- DONG, K. K.; Damaghi, N.; Picart, S. D.; Markova, N. G.; Obayashi, K.; Okano, Y.; Masaki, H.; Grether-Beck, S.; Krutmann, J.; Smiles, K. A.; Yarosh, D. B. (2008): UV-induced DNA damage initiates release of MMP-1 in human skin. *Experimental dermatology* 17 (12).
- DOUKI, T.; Sage, E. (2016): Dewar valence isomers, the third type of environmentally relevant DNA photoproducts induced by solar radiation. *Photochemical & Photobiological Sciences* 15 (1), S. 24–30.
- DUTTO, I.; Tillhon, M.; Cazzalini, O.; LA STIVALA; Prosperi, E. (2015): Biology of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A). Molecular mechanisms and relevance in chemical toxicology. *Archives of Toxicology* 89 (2).
- EDGELL, C. J.; McDonald, C. C.; Graham, J. B. (1983): Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80 (12), S. 3734–3737.
- ELMORE, S. (2007): Apoptosis. A review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* 35 (4), S. 495–516.
- ENVIRONMENTAL WORKING GROUP (Hg.) (2020): Skin Deep® Database.
- ESSER, C.; Rannug, A.; Ma, Q. (2015): The Aryl Hydrocarbon Receptor in Barrier Organ Physiology, Immunology, and Toxicology. *Pharmacological Reviews* 67 (2), S. 259–279.
- EUROPÄISCHES PARLAMENT (2009): Verordnung (EG) Nr. 1223/2009 über kosmetische Mittel. VO (EG) Nr. 1223/2009. Fundstelle: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2009/1223/oj/deu>.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2012): Scientific Opinion on Mineral Oil Hydrocarbons in Food.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2014): Scientific Opinion on Dietary Reference Values for chromium.

- FISCHER, B. M.; Neumann, D.; Piberger, A. L.; Rines, S. F.; Köberle, B.; 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), S. 2745–2761.
- FRANCO, R.; Schoneveld, O.; Georgakilas, A. G.; Panayiotidis, M. I. (2008): Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer letters* 266 (1), S. 6–11.
- FRANKEN, A.; Eloff, F. C.; Du Plessis, J.; Du Plessis, J. L. (2015): In Vitro Permeation of Metals through Human Skin. A Review and Recommendations. *Chemical Research in Toxicology* 28 (12), S. 2237–2249.
- FRIEBOLIN, H.; THIELE, C. M. (2013): Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie. Eine Einführung. 5., vollst. überarb. und aktualisierte Aufl. Weinheim: Wiley-VCH.
- FRITSCHKE, E.; Schäfer, C.; Calles, C.; Bernsmann, T.; Bernshausen, T.; Wurm, M.; Hübenthal, U.; Cline, J. E.; Hajimiragha, H.; Schroeder, P.; Klotz, L.-O.; Rannug, A.; Fürst, P.; Hanenberg, H.; Abel, J.; Krutmann, J. (2007): Lightening up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmatic target for ultraviolet B radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (21), S. 8851–8856.
- FU, P. P.; Xia, Q.; Sun, X.; Yu, H. (2012): Phototoxicity and Environmental Transformation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)—Light-Induced Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation, and DNA Damage. *Journal of Environmental Science and Health, Part C* 30 (1), S. 1–41.
- GAMMELGAARD, B.; Fullerton, A.; Avnstorp, C.; Menné, T. (1992): Permeation of chromium salts through human skin in vitro. *Contact dermatitis* 27 (5), S. 302–310.
- GAWANDE, M. B.; Goswami, A.; Felpin, F.-X.; Asefa, T.; Huang, X.; Silva, R.; Zou, X.; Zboril, R.; Varma, R. S. (2016): Cu and Cu-Based Nanoparticles. Synthesis and Applications in Catalysis. *Chemical Reviews* 116 (6), S. 3722–3811.
- GENTER, M. B.; Marlowe, J.; Kevin Kerzee, J.; Dragin, N.; Puga, A.; Dalton, T. P.; Nebert, D. W. (2006): Naphthalene toxicity in mice and aryl hydrocarbon receptor-mediated CYPs. *Biochemical and biophysical research communications* 348 (1), S. 120–123.
- GILSON, P.; Drouot, G.; Witz, A.; Merlin, J.-L.; Becuwe, P.; Harlé, A. (2019): Emerging Roles of DDB2 in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 20 (20).
- GRAW, J. (2015): Genetik. 6., überarbeitete und aktualisierte Auflage. Berlin: Springer Spektrum (Lehrbuch).
- GRUBMAN, A.; White, A. R. (2017): Copper and Molecular Aspects of Cell Signaling. In: *Molecular, Genetic, and Nutritional Aspects of Major and Trace Minerals*: Elsevier, S. 85–99.
- GULSON, B.; McCall, M.; Korsch, M.; Gomez, L.; Casey, P.; Oytam, Y.; Taylor, A.; McCulloch, M.; Trotter, J.; Kinsley, L.; Greenoak, G. (2010): Small amounts of zinc from zinc oxide particles in sunscreens applied outdoors are absorbed through human skin. *Toxicological Sciences* 118 (1), S. 140–149.
- GÜNTHER, V.; Lindert, U.; Schaffner, W. (2012): The taste of heavy metals. Gene regulation by MTF-1. *Biochimica et biophysica acta* 1823 (9), S. 1416–1425.
- GUO, S.; Zhang, X.; Zheng, M.; Zhang, X.; Min, C.; Wang, Z.; Cheon, S. H.; Oak, M.-H.; Nah, S.-Y.; Kim, K.-M. (2015): Selectivity of commonly used inhibitors of clathrin-mediated and caveolae-dependent endocytosis of G protein-coupled receptors. *Biochimica et biophysica acta* 1848 (10 Pt A), S. 2101–2110.
- GUO, X.; Feng, L.; Lemos, B.; Lou, J. (2019): DNA methylation modifications induced by hexavalent chromium. *Journal of environmental science and health. Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews* 37 (3), S. 133–145.
- HANAGATA, N.; Zhuang, F.; Connolly, S.; Li, J.; Ogawa, N.; 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), S. 9326–9338.
- HARTEN, U. (Hg.) (2009): Physik. Einführung für Ingenieure und Naturwissenschaftler. 4., bearb. und erw. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch).

- HARZDORF, C. (1990): Spurenanalytik des Chroms. 8 Tabellen. Stuttgart: Thieme (Analytische Chemie für die Praxis).
- HAYES, J. D.; Dinkova-Kostova, A. T. (2017): Epigenetic Control of NRF2-Directed Cellular Antioxidant Status in Dictating Life-Death Decisions. *Molecular cell* 68 (1), S. 5–7.
- HEDBERG, Y. S.; Lidén, C.; Odnevall Wallinder, I. (2015): Chromium released from leather - I. Exposure conditions that govern the release of chromium(III) and chromium(VI). *Contact dermatitis* 72 (4), S. 206–215.
- HERGETH, S. P.; Schneider, R. (2015): The H1 linker histones. Multifunctional proteins beyond the nucleosomal core particle. *EMBO reports* 16 (11), S. 1439–1453.
- HININGER, I.; Benaraba, R.; Osman, M.; Faure, H.; Marie Roussel, A.; Anderson, R. A. (2007): Safety of trivalent chromium complexes. No evidence for DNA damage in human HaCaT keratinocytes. *Free Radical Biology and Medicine* 42 (12), S. 1759–1765.
- HOLA, E.; Pilch, M.; Galek, M.; Ortyl, J. (2020): New versatile bimolecular photoinitiating systems based on amino- m -terphenyl derivatives for cationic, free-radical and thiol–ene photopolymerization under low intensity UV-A and visible light sources. *Polymer Chemistry* 11 (2), S. 480–495.
- HOPF, N. B.; Spring, P.; Hirt-Burri, N.; Jimenez, S.; Sutter, B.; Vernez, D.; Berthet, A. (2018): Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) skin permeation rates change with simultaneous exposures to solar ultraviolet radiation (UV-S). *Toxicology Letters* 287, S. 122–130.
- HORIE, M.; Nishio, K.; Endoh, S.; Kato, H.; Fujita, K.; Miyauchi, A.; Nakamura, A.; Kinugasa, S.; Yamamoto, K.; Niki, E.; Yoshida, Y.; Iwahashi, H. (2013): Chromium(III) oxide nanoparticles induced remarkable oxidative stress and apoptosis on culture cells. *Environmental Toxicology* 28 (2), S. 61–75.
- HORIE, M.; Nishio, K.; Fujita, K.; Kato, H.; Nakamura, A.; Kinugasa, S.; Endoh, S.; Miyauchi, A.; Yamamoto, K.; Murayama, H.; Niki, E.; Iwahashi, H.; Yoshida, Y.; Nakanishi, J. (2009): Ultrafine NiO particles induce cytotoxicity in vitro by cellular uptake and subsequent Ni(II) release. *Chemical Research in Toxicology* 22 (8), S. 1415–1426.
- HSIAO, I.-L.; Gramatke, A. M.; Jokisimovic, R.; Sokolowski, M.; Gradzielski, M.; Haase, A. (2014): Size and Cell Type Dependent Uptake of Silica Nanoparticles. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology* 05 (06).
- HU, G.; Li, P.; Cui, X.; Li, Y.; Zhang, J.; Zhai, X.; Yu, S.; Tang, S.; Zhao, Z.; Wang, J.; Jia, G. (2018): Cr(VI)-induced methylation and down-regulation of DNA repair genes and its association with markers of genetic damage in workers and 16HBE cells. *Environmental pollution* 238, S. 833–843.
- HUFNAGEL, M.; Schoch, S.; Wall, J.; Strauch, B. M.; Hartwig, A. (2020): Toxicity and Gene Expression Profiling of Copper- and Titanium-Based Nanoparticles Using Air-Liquid Interface Exposure. *Chemical Research in Toxicology* 33 (5), S. 1237–1249.
- ILLINGWORTH, R. S.; Bird, A. P. (2009): CpG islands--'a rough guide'. *FEBS letters* 583 (11), S. 1713–1720.
- IMAI, K.; Yamamoto, H. (2008): Carcinogenesis and microsatellite instability. The interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis* 29 (4), S. 673–680.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) (1990): Chromium, nickel and welding. ... views and experts opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, which met in Lyon 5 - 13 June 1989. Lyon (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 49).
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) (2012): IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, volume 100 F, chemical agents and related occupations. This publication represents the views and expert opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, which met in Lyon, 20 - 27 October 2009. Lyon: WHO Press.
- IP, Y. T.; Davis, R. J. (1998): Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) – from inflammation to development. *Current Opinion in Cell Biology* 10 (2), S. 205–219.

- JABLONSKI, N. G.; Chaplin, G. (2000): The evolution of human skin coloration. *Journal of Human Evolution* 39 (1), S. 57–106.
- JANIAK, C.; MEYER, H.-J.; GUDAT, D.; KURZ, P.; RIEDEL, E. (2018): Riedel Moderne Anorganische Chemie. Berlin, Boston: de Gruyter.
- JANSOHN, M.; ROTHHÄMEL, S. (2012): Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. 5. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- JAUHAINEN, A.; Thomsen, C.; Strömbom, L.; Grundevik, P.; Andersson, C.; Danielsson, A.; Andersson, M. K.; Nerman, O.; Rökvist, L.; Ståhlberg, A.; Åman, P.; Gibas, C. (2012): Distinct Cytoplasmic and Nuclear Functions of the Stress Induced Protein DDIT3/CHOP/GADD153. *PLoS ONE* 7 (4), e33208.
- JIN, B.; Li, Y.; Robertson, K. D. (2011): DNA Methylation. Superior or Subordinate in the Epigenetic Hierarchy? *Genes & Cancer* 2 (6), S. 607–617.
- JOSEPH, P.; He, Q.; Umbright, C. (2008): Heme-oxygenase 1 gene expression is a marker for hexavalent chromium-induced stress and toxicity in human dermal fibroblasts. *Toxicological Sciences : An official Journal of the Society of Toxicology* 103 (2), S. 325–334.
- KANVAH, S.; Joseph, J.; Schuster, G. B.; Barnett, R. N.; Cleveland, C. L.; Landman, U. (2010): Oxidation of DNA. Damage to nucleobases. *Accounts of chemical research* 43 (2), S. 280–287.
- KAR, S.; Subbaram, S.; Carrico, P. M.; Melendez, J. A. (2010): Redox-control of matrix metalloproteinase-1. A critical link between free radicals, matrix remodeling and degenerative disease. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 174 (3), S. 299–306.
- KARIN, M. (1995): The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *Journal of Biological Chemistry* 270 (28), S. 16483–16486.
- KARLSSON, H. L.; Cronholm, P.; Gustafsson, J.; Möller, L. (2008): Copper oxide nanoparticles are highly toxic. A comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chemical Research in Toxicology* 21 (9), S. 1726–1732.
- KELLY, R. A.; Leedale, J.; Calleja, D.; Enoch, S. J.; Harrell, A.; Chadwick, A. E.; Webb, S. (2019): Modelling changes in glutathione homeostasis as a function of quinone redox metabolism. *Scientific Reports* 9 (1), S. 6333.
- KHAN, I.; Saeed, K.; Khan, I. (2019): Nanoparticles. Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry* 12 (7), S. 908–931.
- KIELHORN, J.; MELCHING-KOLLMUSS, S.; MANGELSDORF, I. (2006): Dermal absorption. Geneva: World Health Organization (Environmental health criteria, 235).
- KISS, A. L.; Botos, E. (2009): Endocytosis via caveolae. Alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation? *Journal of cellular and molecular medicine* 13 (7), S. 1228–1237.
- KORASHY, H. M.; El-Kadi, A. O.S. (2004): Differential effects of mercury, lead and copper on the constitutive and inducible expression of aryl hydrocarbon receptor (AHR)-regulated genes in cultured hepatoma Hepa 1c1c7 cells. *Toxicology* 201 (1-3), S. 153–172.
- KOSCHEMBAHR, A. von; Youssef, A.; Béal, D.; Gudimard, L.; Giot, J.-P.; Douki, T. (2020): Toxicity and DNA repair in normal human keratinocytes co-exposed to benzoapyrene and sunlight. *Toxicology in Vitro* 63, S. 104744.
- KREŽEL, A.; Maret, W. (2017): The Functions of Metamorphic Metallothioneins in Zinc and Copper Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences* 18 (6).
- KULSHRESHTHA, A. K. (Hg.) (2002): Handbook of polymer blends and composites. Shawbury, Shrewsbury, Shropshire: Rapra Technology Limited.
- LACHENMEIER, D. W.; Mildau, G.; Rullmann, A.; Marx, G.; Walch, S. G.; Hartwig, A.; Kuballa, T. (2017): Evaluation of mineral oil saturated hydrocarbons (MOSH) and mineral oil aromatic hydrocarbons (MOAH) in pure

- mineral hydrocarbon-based cosmetics and cosmetic raw materials using ¹H NMR spectroscopy. *F1000Research* 6, S. 682.
- LADEMANN, J.; Richter, H.; Schaefer, U. F.; Blume-Peytavi, U.; Teichmann, A.; Otberg, N.; Sterry, W. (2006): Hair follicles - a long-term reservoir for drug delivery. *Skin Pharmacology and Physiology* 19 (4), S. 232–236.
- LAHMANN, C.; Young, A. R.; Wittern, K.-P.; Bergemann, J. (2001): Induction of mRNA for Matrix Metalloproteinase 1 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1 in Human Skin in vivo by Solar Simulated Radiation. *Photochem Photobiol* 73 (6), S. 657.
- LARSSON, P.; Andersson, E.; Johansson, U.; Ollinger, K.; Rosdahl, I. (2005): Ultraviolet A and B affect human melanocytes and keratinocytes differently. A study of oxidative alterations and apoptosis. *Experimental dermatology* 14 (2), S. 117–123.
- LAUTH, G. J.; KOWALCZYK, J. (2016): Einführung in die Physik und Chemie der Grenzflächen und Kolloide. 1. Aufl. 2016. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
- LAUX, P.; Tentschert, J.; Riebeling, C.; Braeuning, A.; Creutzenberg, O.; Epp, A.; Fessard, V.; Haas, K.-H.; Haase, A.; Hund-Rinke, K.; Jakubowski, N.; Kearns, P.; Lampen, A.; Rauscher, H.; Schoonjans, R.; Störmer, A. et al. (2018): Nanomaterials. Certain aspects of application, risk assessment and risk communication. *Archives of Toxicology* 92 (1), S. 121–141.
- LEE, B.; Morano, A.; Porcellini, A.; Muller, M. T. (2012A): GADD45 α inhibition of DNMT1 dependent DNA methylation during homology directed DNA repair. *Nucleic acids research* 40 (6), S. 2481–2493.
- LEE, J.-C.; Son, Y.-O.; Pratheeshkumar, P.; Shi, X. (2012B): Oxidative stress and metal carcinogenesis. *Free Radical Biology & Medicine* 53 (4), S. 742–757.
- LEE, S.; Kim, S. M.; Lee, R. T. (2013): Thioredoxin and thioredoxin target proteins. From molecular mechanisms to functional significance. *Antioxidants & redox signaling* 18 (10), S. 1165–1207.
- LEMIRE, J. A.; Harrison, J. J.; Turner, R. J. (2013): Antimicrobial activity of metals. Mechanisms, molecular targets and applications. *Nature Reviews. Microbiology* 11 (6), S. 371–384.
- LEVINA, A.; Harris, H. H.; Lay, P. A. (2006): Binding of chromium(VI) to histones. Implications for chromium(VI)-induced genotoxicity. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 11 (2), S. 225–234.
- LI, H.; Toh, P. Z.; Tan, J. Y.; Zin, M. T.; Lee, C.-Y.; Li, B.; Leolukman, M.; Bao, H.; Kang, L. (2016): Selected Biomarkers Revealed Potential Skin Toxicity Caused by Certain Copper Compounds. *Scientific Reports* 6 (1), S. 1699.
- LI, K.; Yu, R.; Zhu, R.; Liang, R.; Liu, G.; Peng, B. (2019): pH-Sensitive and Chromium-Loaded Mineralized Nanoparticles as a Tanning Agent for Cleaner Leather Production. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 7 (9), S. 8660–8669.
- LIEBERMANN, D. A.; Hoffman, B. (2008): Gadd45 in stress signaling. *Journal of molecular signaling* 3, S. 15.
- LIMBACH, L. K.; Wick, P.; Manser, P.; Grass, R. N.; Bruinink, A.; Stark, W. J. (2007): Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells. Influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. *Environmental science & technology* 41 (11), S. 4158–4163.
- LIU, K. J.; Shi, X. (2001): In vivo reduction of chromium (VI) and its related free radical generation. *Molecular and Cellular Biochemistry* 222 (1/2), S. 41–47.
- LIU, Y.-C.; Li, F.; Handler, J.; Huang, C. R. L.; Xiang, Y.; Neretti, N.; Sedivy, J. M.; Zeller, K. I.; Dang, C. V.; Jin, D.-Y. (2008): Global Regulation of Nucleotide Biosynthetic Genes by c-Myc. *PLoS ONE* 3 (7), e2722.
- LIVAK, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods* 25 (4), S. 402–408.
- LOHANI, A.; Verma, A.; Joshi, H.; Yadav, N.; Karki, N. (2014): Nanotechnology-based cosmeceuticals. *International Scholarly Research Notices: Dermatology* 2014, S. 843687.

- LOU, J.; Wang, Y.; Yao, C.; Jin, L.; Wang, X.; Xiao, Y.; Wu, N.; Song, P.; Song, Y.; Tan, Y.; Gao, M.; Liu, K.; Zhang, X. (2013): Role of DNA methylation in cell cycle arrest induced by Cr (VI) in two cell lines. *PLoS ONE* 8 (8), e71031.
- LUNOV, O.; Zablotskii, V.; Syrovets, T.; Röcker, C.; Tron, K.; Nienhaus, G. U.; Simmet, T. (2011): Modeling receptor-mediated endocytosis of polymer-functionalized iron oxide nanoparticles by human macrophages. *Biomaterials* 32 (2), S. 547–555.
- MACKERER, C. R.; Griffis, L. C.; Grabowski, J. S.; Reitman, F. A. (2003): Petroleum mineral oil refining and evaluation of cancer hazard. *Applied occupational and environmental hygiene* 18 (11), S. 890–901.
- MALIK, D.-E.-S.; David, R. M.; Gooderham, N. J. (2018): Mechanistic evidence that benzoapyrene promotes an inflammatory microenvironment that drives the metastatic potential of human mammary cells. *Archives of Toxicology* 92 (10), S. 3223–3239.
- MALVERN INSTRUMENTS LTD. (Hg.) (2013): Zetasizer Nano User Manual. MAN0485 Issue 1.1 April 2013.
- MARTITZ, J.; Becker, N.-P.; Renko, K.; Stoedter, M.; Hybsier, S.; Schomburg, L. (2015): Gene-specific regulation of hepatic selenoprotein expression by interleukin-6. *Metallomics* 7 (11), S. 1515–1521.
- MCCCLUSKEY, A.; Daniel, J. A.; Hadzic, G.; Chau, N.; Clayton, E. L.; Mariana, A.; Whiting, A.; Gorgani, N. N.; Lloyd, J.; Quan, A.; Moshkanbaryans, L.; Krishnan, S.; Perera, S.; Chircop, M.; Kleist, L. von; McGeachie, A. B. et al. (2013): Building a better dynasore. The dyngo compounds potently inhibit dynamin and endocytosis. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 14 (12), S. 1272–1289.
- MCGRATH, J.; Eady, R.; Pope, F. M. (Hg.) (2010): Chapter 3 Anatomy and Organization of Human Skin. *Rook's Textbook of Dermatology*, 8th edition.
- MICHLER, G. H. (2019): *Kompakte Einführung in die Elektronenmikroskopie*. Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden.
- MONAKHOVA, Y. B.; Kohl-Himmelseher, M.; Kuballa, T.; Lachenmeier, D. W. (2014): Determination of the purity of pharmaceutical reference materials by ¹H NMR using the standardless PULCON methodology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 100, S. 381–386.
- MORTENSEN, L. J.; Oberdörster, G.; Pentland, A. P.; Delouise, L. A. (2008): In vivo skin penetration of quantum dot nanoparticles in the murine model. The effect of UVR. *Nano Letters* 8 (9), S. 2779–2787.
- NABESHI, H.; Yoshikawa, T.; Matsuyama, K.; Nakazato, Y.; Tochigi, S.; Kondoh, S.; Hirai, T.; Akase, T.; Nagano, K.; Abe, Y.; Yoshioka, Y.; Kamada, H.; Itoh, N.; Tsunoda, S.-i.; Tsutsumi, Y. (2011): Amorphous nanosilica induce endocytosis-dependent ROS generation and DNA damage in human keratinocytes. *Particle and Fibre Toxicology* 8, S. 1.
- NATARAJAN, V. T.; Ganju, P.; Ramkumar, A.; Grover, R.; Gokhale, R. S. (2014): Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation. *Nature chemical biology* 10 (7), S. 542–551.
- NATUSCH, D. F. S.; Tomkins, B. A. (2002): Isolation of polycyclic organic compounds by solvent extraction with dimethyl sulfoxide. *Analytical Chemistry* 50 (11), S. 1429–1434.
- NEL, A.; Xia, T.; Mädler, L.; Li, N. (2006): Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311 (5761), S. 622–627.
- NJÄLSSON, R.; Norgren, S. (2005): Physiological and pathological aspects of GSH metabolism. *Acta paediatrica* 94 (2), S. 132–137.
- OBERDÖRSTER, G.; Oberdörster, E.; Oberdörster, J. (2005): Nanotoxicology. An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environmental Health Perspectives* 113 (7), S. 823–839.
- O'BRIEN, T. J.; Ceryak, S.; Patierno, S. R. (2003): Complexities of chromium carcinogenesis. Role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutation research* 533 (1-2), S. 3–36.

- OESCH, F.; Fabian, E.; Landsiedel, R. (2018): Xenobiotica-metabolizing enzymes in the skin of rat, mouse, pig, guinea pig, man, and in human skin models. *Archives of Toxicology* 92 (8), S. 2411–2456.
- ONO, Y.; Torii, K.; Fritsche, E.; Shintani, Y.; Nishida, E.; Nakamura, M.; Shirakata, Y.; Haarmann-Stemmann, T.; Abel, J.; Krutmann, J.; Morita, A. (2013): Role of the aryl hydrocarbon receptor in tobacco smoke extract-induced matrix metalloproteinase-1 expression. *Experimental Gerontology* 22 (5), S. 349–353.
- ORINO, K.; Lehman, L.; Tsuji, Y.; Ayaki, H.; Torti, S. V.; Torti, F. M. (2001): Ferritin and the response to oxidative stress. *The Biochemical journal* 357 (Pt 1), S. 241–247.
- PAN, C.-H.; Jeng, H. A.; Lai, C.-H. (2018): Biomarkers of oxidative stress in electroplating workers exposed to hexavalent chromium. *Journal of exposure science & environmental epidemiology* 28 (1), S. 76–83.
- PAVESI, T.; Moreira, J. C. (2020): Mechanisms and individuality in chromium toxicity in humans. *Journal of applied toxicology*.
- PETRY, T.; Bury, D.; Fautz, R.; Hauser, M.; Huber, B.; Markowetz, A.; Mishra, S.; Rettinger, K.; Schuh, W.; Teichert, T. (2017): Review of data on the dermal penetration of mineral oils and waxes used in cosmetic applications. *Toxicology Letters* 280, S. 70–78.
- PIROW, R.; Blume, A.; Hellwig, N.; Herzler, M.; Huhse, B.; Hutzler, C.; Pfaff, K.; Thierse, H.-J.; Tralau, T.; Vieth, B.; Luch, A. (2019): Mineral oil in food, cosmetic products, and in products regulated by other legislations. *Critical Reviews in Toxicology* 49 (9), S. 742–789.
- PLONER, C.; Kofler, R.; Villunger, A. (2008): Noxa. At the tip of the balance between life and death. *Oncogene* 27 Suppl 1, S84-92.
- PROMEGA CORPORATION (2015): CellTiter-Glo Luminescent. Cell Viability Assay.
- PRONK, T. E.; van der Veen, J. W.; Vandebriel, R. J.; van Loveren, H.; Vink, E. P. de; Pennings, J. L. A. (2014): Comparison of the molecular topologies of stress-activated transcription factors HSF1, AP-1, NRF2, and NF- κ B in their induction kinetics of HMOX1. *Bio Systems* 124, S. 75–85.
- RAGER, J. E.; Suh, M.; Chappell, G. A.; Thompson, C. M.; Proctor, D. M. (2019): Review of transcriptomic responses to hexavalent chromium exposure in lung cells supports a role of epigenetic mediators in carcinogenesis. *Toxicology Letters* 305, S. 40–50.
- RANCAN, F.; Gao, Q.; Graf, C.; Troppens, S.; Hadam, S.; Hackbarth, S.; Kembangan, C.; Blume-Peytavi, U.; Rühl, E.; Lademann, J.; Vogt, A. (2012): Skin penetration and cellular uptake of amorphous silica nanoparticles with variable size, surface functionalization, and colloidal stability. *ACS nano* 6 (8), S. 6829–6842.
- RANNUG, A.; Rannug, U. (2018): The tryptophan derivative 6-formylindolo[3,2-b]carbazole, FICZ, a dynamic mediator of endogenous aryl hydrocarbon receptor signaling, balances cell growth and differentiation. *Critical Reviews in Toxicology* 48 (7), S. 555–574.
- REJMAN, J.; Oberle, V.; Zuhorn, I. S.; Hoekstra, D. (2004): Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *The Biochemical journal* 377 (Pt 1), S. 159–169.
- RIGEL, D. S. (2008): Cutaneous ultraviolet exposure and its relationship to the development of skin cancer. *Journal of the American Academy of Dermatology* 58 (5 Suppl 2), S129-32.
- ROOK, A.; BURNS, T. (2010): Rook's textbook of dermatology. 8th ed. Chichester, West Sussex, UK, Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.
- RYUNO, H.; Naguro, I.; Kamiyama, M. (2017): ASK family and cancer. *Advances in Biological Regulation* 66, S. 72–84.
- SAVINOVA, O. V.; Hoffmann, A.; Ghosh, G. (2009): The Nfkb1 and Nfkb2 proteins p105 and p100 function as the core of high-molecular-weight heterogeneous complexes. *Molecular cell* 34 (5), S. 591–602.
- SCHMITZ, S.; DESEL, C. (2018): Der Experimentator Zellbiologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

- SCHNEKENBURGER, M.; Talaska, G.; Puga, A. (2007): Chromium cross-links histone deacetylase 1-DNA methyltransferase 1 complexes to chromatin, inhibiting histone-remodeling marks critical for transcriptional activation. *Molecular and cellular biology* 27 (20), S. 7089–7101.
- SCHNUCH, A.; Lessmann, H.; Geier, J.; Uter, W. (2006): White petrolatum (Ph. Eur.) is virtually non-sensitizing. Analysis of IVDK data on 80 000 patients tested between 1992 and 2004 and short discussion of identification and designation of allergens. *Contact dermatitis* 54 (6), S. 338–343.
- SCHREIVER, I.; Hesse, B.; Seim, C.; Castillo-Michel, H.; Villanova, J.; Laux, P.; Dreiack, N.; Penning, R.; Tucoulou, R.; Cotte, M.; Luch, A. (2017): Synchrotron-based v-XRF mapping and μ -FTIR microscopy enable to look into the fate and effects of tattoo pigments in human skin. *Scientific Reports* 7 (1), S. 395.
- SCHWARZ, K.; Mertz, W. (1959): Chromium(III) and the glucose tolerance factor. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 85 (1), S. 292–295.
- SCIEGLINSKA, D.; Piglowski, W.; Chekan, M.; Mazurek, A.; Krawczyk, Z. (2011): Differential expression of HSPA1 and HSPA2 proteins in human tissues; tissue microarray-based immunohistochemical study. *Histochemistry and Cell Biology* 135 (4), S. 337–350.
- SEMISCH, A.; Ohle, J.; Witt, B.; Hartwig, A. (2014): Cytotoxicity and genotoxicity of nano- and microparticulate copper oxide. Role of solubility and intracellular bioavailability. *Particle and Fibre Toxicology* 11, S. 10.
- SHAKERI, R.; Kheirollahi, A.; Davoodi, J. (2017): Apaf-1. Regulation and function in cell death. *Biochimie* 135, S. 111–125.
- SHIM, H.; Harris, Z. L. (2003): Genetic defects in copper metabolism. *The Journal of Nutrition* 133 (5 Suppl 1), 1527S-31S.
- SICINSKI, P.; Zacharek, S.; Kim, C. (2007): Duality of p27Kip1 function in tumorigenesis. *Genes & Development* 21 (14), S. 1703–1706.
- SOBOTTA, J.; Welsch, U. (Hg.) (2009): Lehrbuch Histologie. Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie. 2., völlig überarb. Aufl., 4. Nachdr. München: Elsevier Urban & Fischer.
- SONG, M. O.; Li, J.; Freedman, J. H. (2009): Physiological and toxicological transcriptome changes in HepG2 cells exposed to copper. *Physiological genomics* 38 (3), S. 386–401.
- SPITZ, F.; Furlong, E. E. M. (2012): Transcription factors. From enhancer binding to developmental control. *Nature Reviews Genetics* 13 (9), S. 613–626.
- SREERAM, K.J.; Ramasami, T. (2003): Sustaining tanning process through conservation, recovery and better utilization of chromium. *Resources, Conservation and Recycling* 38 (3), S. 185–212.
- STIFTUNG WARENTEST (2015): Mineralöle in -Kosmetika. Kritische Stoffe in Cremes, Lippen-pfle-geprodukten und Vaseline. *Stiftung Warentest*, 26.05.2015 (06/2015), S. 28–32. Online verfügbar unter https://download.test.de/filestore/4855968_t201506028.pdf?path=/protected/51/34/cb54f99a-84cd-4f78-8f82-ad27d9064681-protectedfile.pdf&key=F5C16F6057D0DB570F24E01538E3434A44749D4C.
- STRAUCH, B. M.; Hubele, W.; Hartwig, A. (2020): Impact of Endocytosis and Lysosomal Acidification on the Toxicity of Copper Oxide Nano- and Microsized Particles. Uptake and Gene Expression Related to Oxidative Stress and the DNA Damage Response. *Nanomaterials* 10 (4).
- STRAUCH, B. M.; Niemand, R. K.; Winkelbeiner, N. L.; 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 and Fibre Toxicology* 14 (1), S. 28.
- SUN, H.; Zhou, X.; Chen, H.; Li, Q.; Costa, M. (2009A): Modulation of histone methylation and MLH1 gene silencing by hexavalent chromium. *Toxicology and applied pharmacology* 237 (3), S. 258–266.
- SUN, Z.; Chin, Y. E.; Zhang, D. D. (2009B): Acetylation of Nrf2 by p300/CBP augments promoter-specific DNA binding of Nrf2 during the antioxidant response. *Molecular and cellular biology* 29 (10), S. 2658–2672.

- TAKAHASHI, Y.; Kondo, K.; Hirose, T.; Nakagawa, H.; Tsuyuguchi, M.; Hashimoto, M.; Sano, T.; Ochiai, A.; Monden, Y. (2005): Microsatellite instability and protein expression of the DNA mismatch repair gene, hMLH1, of lung cancer in chromate-exposed workers. *Molecular Carcinogenesis* 42 (3), S. 150–158.
- TANAKA, T.; Izawa, S.; Inoue, Y. (2005): GPX2, encoding a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase homologue, codes for an atypical 2-Cys peroxiredoxin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 280 (51), S. 42078–42087.
- THYSSEN, J. P.; Menné, T. (2010): Metal Allergy—A Review on Exposures, Penetration, Genetics, Prevalence, and Clinical Implications. *Chemical Research in Toxicology* 23 (2), S. 309–318.
- TONELLI, C.; Chio, I. I. C.; Tuveson, D. A. (2018): Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxidants & redox signaling* 29 (17), S. 1727–1745.
- TROUBA, K. J.; Geisenhoffer, K. M.; Germolec, D. R. (2002): Sodium arsenite-induced stress-related gene expression in normal human epidermal, HaCaT, and HEL30 keratinocytes. *Environmental Health Perspectives* 110 Suppl 5, S. 761–766.
- TSUJI, G.; Takahara, M.; Uchi, H.; Takeuchi, S.; Mitoma, C.; Moroi, Y.; Furue, M. (2011): An environmental contaminant, benzo(a)pyrene, induces oxidative stress-mediated interleukin-8 production in human keratinocytes via the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway. *Journal of dermatological science* 62 (1), S. 42–49.
- UHLEN, M.; Fagerberg, L.; Hallstrom, B. M.; Lindskog, C.; Oksvold, P.; Mardinoglu, A.; Sivertsson, A.; Kampf, C.; Sjostedt, E.; Asplund, A.; Olsson, I.; Edlund, K.; Lundberg, E.; Navani, S.; Szigartyo, C. A.-K.; Odeberg, J. et al. (2015): Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347 (6220), S. 1260419.
- VINCENT, J. B.; Love, S. (2012): The binding and transport of alternative metals by transferrin. *Biochimica et biophysica acta* 1820 (3), S. 362–378.
- VOGT, A.; Combadiere, B.; Hadam, S.; Stieler, K. M.; Lademann, J.; Schaefer, H.; Autran, B.; Sterry, W.; Blume-Peytavi, U. (2006): 40 nm, but not 750 or 1,500 nm, nanoparticles enter epidermal CD1a+ cells after transcutaneous application on human skin. *The Journal of Investigative Dermatology* 126 (6), S. 1316–1322.
- VOGT, A.; Rancan, F.; Ahlberg, S.; Nazemi, B.; Choe, C. S.; Darvin, M. E.; Hadam, S.; Blume-Peytavi, U.; Loza, K.; Diendorf, J.; Epple, M.; Graf, C.; Rühl, E.; Meinke, M. C.; Lademann, J. (2014): Interaction of dermatologically relevant nanoparticles with skin cells and skin. *Beilstein Journal of Nanotechnology* 5, S. 2363–2373.
- VUCIC, D.; Dixit, V. M.; Wertz, I. E. (2011): Ubiquitylation in apoptosis. A post-translational modification at the edge of life and death. *Nature reviews. Molecular cell biology* 12 (7), S. 439–452.
- WAJANT, H. (2019): Molecular Mode of Action of TRAIL Receptor Agonists-Common Principles and Their Translational Exploitation. *Cancers* 11 (7).
- WANG, S.; Sheng, Y.; Feng, M.; Leszczynski, J.; Wang, L.; Tachikawa, H.; Yu, H. (2007): Light-induced cytotoxicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons on the US EPA priority pollutant list in human skin HaCaT keratinocytes. Relationship between phototoxicity and excited state properties. *Environmental Toxicology* 22 (3), S. 318–327.
- WANG, Y.; Wu, W.; Yao, C.; Lou, J.; Chen, R.; Jin, L.; Wu, N.; Gao, M.; Song, P.; Tan, Y.; Liu, K. (2016): Elevated tissue Cr levels, increased plasma oxidative markers, and global hypomethylation of blood DNA in male Sprague-Dawley rats exposed to potassium dichromate in drinking water. *Environmental Toxicology* 31 (9), S. 1080–1090.
- WANG, Z.; Li, N.; Zhao, J.; White, J. C.; Qu, P.; Xing, B. (2012): CuO nanoparticle interaction with human epithelial cells. Cellular uptake, location, export, and genotoxicity. *Chemical Research in Toxicology* 25 (7), S. 1512–1521.

- WANG, Z.; Wu, J.; Humphries, B.; Kondo, K.; Jiang, Y.; Shi, X.; Yang, C. (2018): Upregulation of histone-lysine methyltransferases plays a causal role in hexavalent chromium-induced cancer stem cell-like property and cell transformation. *Toxicology and applied pharmacology* 342, S. 22–30.
- WEBER, S.; Schmidt, T.; Schumacher, P.; Kuballa, T.; Mildau, G.; Walch, S. G.; Hartwig, A.; Lachenmeier, D. W. (2019): Quantification of Mineral Oil Aromatic Hydrocarbons (MOAH) in Anhydrous Cosmetics Using ¹H NMR. *Journal of Chemistry* 2019, S. 1–10.
- WEBER, S.; Schrag, K.; Mildau, G.; Kuballa, T.; Walch, S. G.; Lachenmeier, D. W. (2018): Analytical Methods for the Determination of Mineral Oil Saturated Hydrocarbons (MOSH) and Mineral Oil Aromatic Hydrocarbons (MOAH)-A Short Review. *Analytical chemistry insights* 13, 1177390118777757.
- WEI, Y.-D.; Tepperman, K.; Huang, M.-y.; Sartor, M. A.; Puga, A. (2004): Chromium inhibits transcription from polycyclic aromatic hydrocarbon-inducible promoters by blocking the release of histone deacetylase and preventing the binding of p300 to chromatin. *Journal of Biological Chemistry* 279 (6), S. 4110–4119.
- WEN, X.; Walle, U. K.; Walle, T. (2005): 5,7-Dimethoxyflavone downregulates CYP1A1 expression and benzo(a)pyrene-induced DNA binding in Hep G2 cells. *Carcinogenesis* 26 (4), S. 803–809.
- WIEGAND, C.; Hewitt, N. J.; Merk, H. F.; Reisinger, K. (2014): Dermal xenobiotic metabolism. A comparison between native human skin, four in vitro skin test systems and a liver system. *Skin Pharmacology and Physiology* 27 (5), S. 263–275.
- WISE, S. S.; Aboueissa, A. E.-M.; Martino, J.; Wise, J. P. (2018): Hexavalent Chromium-Induced Chromosome Instability Drives Permanent and Heritable Numerical and Structural Changes and a DNA Repair-Deficient Phenotype. *Cancer research* 78 (15), S. 4203–4214.
- WU, Q.; Ni, X. (2015): ROS-mediated DNA methylation pattern alterations in carcinogenesis. *Current drug targets* 16 (1), S. 13–19.
- YOKOYAMA, H.; Mizutani, R. (2014): Structural biology of DNA (6-4) photoproducts formed by ultraviolet radiation and interactions with their binding proteins. *International Journal of Molecular Sciences* 15 (11), S. 20321–20338.
- YOON, B.-I.; Hirabayashi, Y.; Kawasaki, Y.; Kodama, Y.; Kaneko, T.; Kanno, J.; Kim, D.-Y.; Fujii-Kuriyama, Y.; Inoue, T. (2002): Aryl hydrocarbon receptor mediates benzene-induced hematotoxicity. *Toxicological Sciences: An official Journal of the Society of Toxicology* 70 (1), S. 150–156.
- YU, H. (2002): Environmental carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. Photochemistry and phototoxicity. *Journal of Environmental Science and Health, Part C* 20 (2), S. 149–183.
- ZASTROW, L.; Meinke, M. C.; Albrecht, S.; Patzelt, A.; Lademann, J. (2017): From UV Protection to Protection in the Whole Spectral Range of the Solar Radiation. New Aspects of Sunscreen Development. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 996, S. 311–318.
- ZHITKOVICH, A. (2011): Chromium in drinking water. Sources, metabolism, and cancer risks. *Chemical Research in Toxicology* 24 (10), S. 1617–1629.

8 ANHANG

8.1 VERWENDETE MATERIALIEN

8.1.1 VERWENDETE CHEMIKALIEN

Bezeichnung	Hersteller
20x DNA Binding Dye Sample Loading Reagent	Fluidigm (San Francisco, USA)
2x Assay Loading Reagent	Fluidigm (San Francisco, USA)
2x TaqMan® PreAmp Master Mix	Applied Biosystem (Foster City, USA)
Aceton 100 %	VWR (Radnor, USA)
Acrylamid (Rotiphorese® Gel 37,5:1)	Roth (Karlsruhe, DE)
Albumin Fraktion V Roth	Roth (Karlsruhe, DE)
Ammoniumperoxodisulfat (APS, ≥98 %)	Roth (Karlsruhe, DE)
Bafilomycin A1	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)
Benzo[a]pyren >96 %	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Calciumchlorid-Dihydrat ≥95 %	Roth (Karlsruhe, DE)
CASY-TON®	OMNI Life Science (Bremen, DE)
Chromchlorid-Hexahydrat ≥97 %	Roth (Karlsruhe, DE)
Chromium Assay Kit (MAK 130)	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Chromoxid-Nanopartikel >99 %, 60 nm	Nanostructured & Amorphous Material (Texas, USA)
Chromoxid-Nanopartikel 98 %, <100 nm	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Chromoxid-Partikel, Colortherm Green GN-M	LANXESS (Krefeld, DE)
Chromstandard für AAS 1000 mg/L	Roth (Karlsruhe, DE)
Desoxycholat	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Detektionsreagenzien für Western Blot-Analysen	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
Dimethylsulfoxid ≥99,9 %	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
di-Natriumhydrogenphosphat ≥99 %	Roth (Karlsruhe, DE)
Diphenylcarbazid ≥99 %	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
DNA Away	Roth (Karlsruhe, DE)
DNA-Suspensionspuffer	TEKnova (Hollister, USA)
EDTA ≥99 %	Roth (Karlsruhe, DE)

Ethanol (reinst), 99,9 %	Roth (Karlsruhe, DE)
Ethanol (vergällt), 96 %	BrüggemannAlcohol (Heilbronn, DE)
Exonuklease I, 20 U/μl	New England (Massachusetts, USA)
Exonuklease Reaktionspuffer	New England (Massachusetts, USA)
Fötale Kälberserum	Gibco (Carlsbad, USA)
Primer-Paare	Fluidigm (San Francisco, USA), Eurofins Scientific (Luxemburg)
Giemsa-Stammlösung für die Mikroskopie	Roth (Karlsruhe, DE)
GlutaMAX™	Gibco (Calsbad, USA)
Glycin ≥99,5 %	Roth (Karlsruhe, DE)
Gravex 913	Shell (Den Haag, NLD)
HEPES ≥99,5 %	Roth (Karlsruhe, DE)
Hydroxy-Dynasore	Merck (Darmstadt, DE)
Kaliumdichromat ≥99,5 %	Roth (Karlsruhe, DE)
Kupferoxid-Nanopartikel, <50 nm	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Kupferstandard für AAS 1000 mg/L	Roth (Karlsruhe, DE)
Ladepuffer Roti®-Load 1 redu. 4x Konz.	Roth (Karlsruhe, DE)
Magnesiumchlorid ≥98,5 %	Roth (Karlsruhe, DE)
Methanol ≥99,5 %	Roth (Karlsruhe, DE)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumchlorid ≥99,5 %	Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumdodecylsulfat (SDS) 10 %	PamReac AppliChem (Darmstadt, D)
Natriumhydroxid ≥99,5 %	Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumlactat ≥99 %	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Natriumpyruvat ≥99 %	Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumsulfat ≥99 %	Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumtetrat-Dihydrat ≥99 %	Roth (Karlsruhe, DE)
PCR-zertifiziertes Wasser	TEKnova (Hollister, USA)
Penicillin/Streptomycin-Lösung (Penicillin: 5.000 U/ml; Streptomycin: 5 mg/l)	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Protease-Inhibitor-Cocktail (cOmplete Mini™)	Roche (Basel, CH)
RNase A	Roche (Basel, CH)
Salpetersäure 69 %	Roth (Karlsruhe, DE)
Salzsäure 30 %	Roth (Karlsruhe, DE)

SsoFast™ EvaGreen® Supermix with Low ROX	BioRad (San Francisco, USA)
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat ≥99 %	Roth (Karlsruhe, DE)
Triton X-100 10 %	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Trypsin	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck (Darmstadt, DE)
Zitronensäure ≥99,5 %	Roth (Karlsruhe, DE)

8.1.2 VERWENDETE LÖSUNGEN UND PUFFER

Tabelle 18: Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)

PBS	Einwaage	Substanzname
1,0 L bidest. H ₂ O pH 7,4	5,844 g	NaCl (100 mM)
	0,335 g	KCl (4,5 mM)
	0,993 g	Na ₂ HPO ₄ (7 mM)
	0,408 g	KH ₂ PO ₄ (3 mM)

Tabelle 19: Artificielle lysosomale Flüssigkeit (ALF)

ALF	Molarität	Substanzname
0,5 L bidest. H ₂ O pH 4,5 – 5,0	1,6 g	NaCl
	3,0 g	NaOH
	10,4 g	Zitronensäure
	64,3 mg	Calciumchlorid-Dihydrat
	19,5 mg	Natriumsulfat
	23,8 mg	Magnesiumsulfat
	29,5 mg	Glycin
	38,5 mg	Tri-Natriumcitrat-Dihydrat
	45,0 mg	Natriumtetrat-Dihydrat
	42,5 mg	Natriumlactat
43,0 mg	Natriumpyruvat	

Tabelle 20: Zellysepuffer

Lysepuffer	Konzentration	Substanzname
250 mL bidest. H ₂ O	50 mM	Tris-HCl
	250 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	1 % (v/v)	Triton-X100

Tabelle 21: Trenngel (10 %)

Trenngel	Konzentration	Substanzname
5 mL	1250 µL	Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8)
	50 µL	SDS (10 %)
	100 µL	EDTA (0,1 M)
	50 µL	Glycerin
	2245 µL	H ₂ O bidest.
	1250 µL	Acrylamid (37 %)
	50 µl	APS
	5 µL	TEMED

Tabelle 22: Sammelgel (4 %)

Sammelgel	Konzentration	Substanzname
4 mL	500 µL	Tris-HCl 1 M (pH 6,8)
	40 µL	SDS (10 %)
	80 µL	EDTA (0,1 M)
	2930 µL	H ₂ O bidest.
	400 µL	Acrylamid (37 %)
	40 µl	APS
	10 µL	TEMED

Tabelle 23: Laufpuffer (10x)

Laufpuffer	Konzentration	Substanzname
1 L bidest. H ₂ O	30,3 g	Tris-HCl 0,25 M
	144,1 g	Glycin 1,92 M

Tabelle 24: Transferpuffer

Transferpuffer	Konzentration	Substanzname
1 L	100 mL	Laufpuffer 10x
	700 mL	H ₂ O bidest.
	200 mL	Methanol

Tabelle 25: Ladepuffer (4x)

Ladepuffer	Konzentration	Substanzname
	200 mM	Tris-HCl
	8 %	SDS
	0,1 %	Glycerin
	0,1 %	Bromphenolblau
	4 %	β-Mercaptoethanol

Tabelle 26: Radioimmunpräzipitationsassay-Puffer (RIPA)

RIPA Puffer	Konzentration	Substanzname
1 mL	100 µL	Tris-HCl, 100 mM, pH 7,6
	150 µL	NaCl 1 M
	100 µL	EDTA 10 mM
	100 µL	Triton-X100 10 %ig
	100 µL	Desoxycholat 10 %ig
	10 µL	SDS
	100 µL	Protease-Inhibitor Lsg., cOmplete mini™
	340 µL	bidest. H ₂ O

8.1.3 VERWENDETE VERBRAUCHSMATERIALIEN

Bezeichnung	Hersteller
12-Well Platten	TPP (Trasadingen, CH)
24-Well Platten	TPP (Trasadingen, CH)
6-Well Platten TPP	TPP (Trasadingen, CH)
96-Well Platten TPP	TPP (Trasadingen, CH)
96-Well-Platten, transparenter Boden Nunc™ MicroWell™	Thermo Scientific (Langenselbold, DE)
CASY®-Cups	Roche (Mannheim, DE)
Dynamic Array™ IFC	Fluidigm (San Francisco, USA)
Einmalspritzen	B. Braun (Melsungen, DE)
Eppendorf-Reaktionsgefäße, 1,5 mL und 2 mL	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Glasfilterfritte 0,7 cm	Whatman (Maidstone, UK)
HPLC-Gewindeglasflasche mit Schraubkappe	Schott (Mainz, DE)
Kanülen 1,2 x 40 mm	B. Braun (Melsungen, DE)
Kryoröhrchen mit Gewinde, 1,8 ml	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Küvetten, Polystyrol (#64-754)	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Objektträger	Marienfeld (Lauda-Königshofen, DE)
Parafilm	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Pipettenspitzen 10 µL	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Pipettenspitzen 100-1000 µL	Brandt (Wertheim, DE)
Pipettenspitzen 10-200 µL	Ratiolab (Deieck, DE)
Pipettenspitzen 5 mL	Eppendorf (Hamburg, DE)
Plastik-Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Plastik-Zentrifugenröhrchen, 15 mL und 50 mL	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
qPCR 8er Deckelkette	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
qPCR 8er Streifen 0,2 ml	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Rollrandgläser mit Schnappdeckel (20 mL und 50 mL)	Roth (Karlsruhe, DE)
TEM-Gitternetz (Formvar-Film auf Cu-Netz, 200 mesh)	Plano (Wetzlar, DE)
Wägeschiffchen	Roth (Karlsruhe, DE)
Whatman-Papier, 3 mm	Whatman (Maidstone, UK)
Zellkulturschalen (ø 15 cm, ø 10 cm, ø 6 cm)	Sarstedt (Nümbrecht, DE)

8.1.4 VERWENDETE ANTIKÖRPER

Bezeichnung	Hersteller
CYP1A1 Primärantikörper	CYP1A1-B4, SC-25304, Lot# A1518, Mouse Monoclonal IgG, Santa Cruz
MMP1 Primärantikörper	MMP-1(3B6), SC-21731, Lot# H0619, Mouse Monoclonal IgG, Santa Cruz
Sekundärantikörper CYP1A1/MMP1	Rabbit Anti-Mouse, SC-516102, Lot# 11317, HRP conjugated, Santa Cruz
ERK2 Primärantikörper	ERK2-C14, SC-154, Lot# B1508, Rabbit Polyclonal IgG, Santa Cruz
GAPDH Primärantikörper	GAPDH (14C10), Lot# 10, Rabbit Polyclonal IgG, Cell Signaling Technology
Sekundärantikörper ERK2/GAPDH	Mouse anti-Rabbit, SC-2357, Lot# 1218, HRP conjugated, Santa Cruz

8.1.5 VERWENDETE KITS

Bezeichnung	Hersteller
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega (Madison, USA)
FitAmp Blood and Cultured Cell DNA Extraction Kit	EpiGentek (New York, USA)
i/qScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad (München, DE)
NucleoSpin® RNA Plus Kit	Macherey-Nagel (Düren, DE)
MethylFlash Global DNA Methylation ELISA (Colorimetric)	EpiGentek (New York, USA)

8.1.6 INSTRUMENTE UND SOFTWARE

Bezeichnung	Hersteller
Atomabsorptionsspektrometer PinAAcle 900 T	Perkin Elmer (Waltham, USA)
Autoklav D-150	Systeme GmbH (Linden, DE)
Biomark	Fluidigm (San Francisco, USA)
Brutschrank Heracell 150i	Thermo Scientific (Langenselbold, DE)
CASY® TTC Cell Couter & Analyser System	Roche (Mannheim, DE)
Centrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg, DE)
Colony Counter BZG-30	WTW (Weilheim, DE)
Cryo 1°C Cooler	VWR International (Darmstadt, DE)
Feinwaage BP 61 S	Sartorius (Göttingen, DE)

Glaspipetten 5, 10, 20 ml	Roth (Karlsruhe, DE)
Heißluftsterilisator	Memmert (Büchenbach, DE)
Heizschüttler Thermomixer C	Eppendorf (Hamburg, DE)
IFC Controller HX	Fluidigm (San Francisco, USA)
LAS-3000 Luminescent Image Analyzer	Fujifilm (Tokio, JPN)
Megafuge 1.0	Heraeus (Hanau, DE)
Mikroskop Axiovert 40C	Carl Zeiss AG (Feldbach, DE)
Multipipette 20 – 200 µL	Eppendorf (Hamburg, DE)
Multipipette RANIN Pipet Lite XLS® 0,5-10 µl	Mettler Toledo (Gießen, DE)
NanoQuant Platte	Tecan Group (Crailsheim, DE)
PCR Workstation Pro	Peqlab (Erlangen, DE)
pH-Meter 3210	WTW (Weilheim, DE)
Physica MCR 51 Modular Compact Rheometer	Anton Paar Group AG (Graz, AT)
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, D)
Pipette 1000-5000 µl	Eppendorf (Hamburg, DE)
Pipette 100-1000 µl	Eppendorf (Hamburg, DE)
Pipette 10-100 µl	Eppendorf (Hamburg, DE)
Pipette 2,5-10 µl	Eppendorf (Hamburg, DE)
Pipette 20-200 µl	Eppendorf (Hamburg, DE)
Software „AIDA Imaga Analyzer“	Raytest (Straubenhardt, DE)
Software „Image J“	National Institutes of Health (Maryland, USA)
Software „Rheoplus Multi3 V3.40“	Anton Paar Group AG (Graz, AT)
Software „SPSS Statistics, Version 27“	IBM (New York, USA)
Software „TopSpin 4.0.6“	Bruker (Massachusetts, USA)
Software „Zeta Sizer Software 7.12“	Malvern Panalytical (Malvern, UK)
Sterilwerkbank HERAsafeKS	Thermo Scientific (Langenselbold, DE)
Suntest CPS+	ATLAS MTT GmbH (Linsengericht, DE)
T100 Thermal Cycler	BioRad (München, DE)
Tecan Infinite M200 PRO	Tecan Group (Crailsheim, DE)
Ultraschallbad Sonorex Super RK 255 H	Bandelin (Berlin, DE)
Vortex-Genie 2T	Scientific Industries (New York, USA)
Waage VWR 1502	Sartorius (Göttingen, DE)
Zetasizer Nano ZS	Malvern Panalytical (Malvern, UK)

8.2 UNTERSUCHTE GENE

In Tabelle 27 sind die Gene des verwendeten Gensets der eingesetzten HT RT-qPCR-Methode dargestellt. Die Primer-Sequenzen können Fischer *et al.* entommen werden (FISCHER *et al.*, 2016).

Tabelle 27: Übersicht über die untersuchten Gene und deren codierte Proteine.

Gen	Codiertes Protein
<i>ABCB1</i>	<i>multidrug resistance protein 1 (MDR1)</i>
<i>ABCC1</i>	<i>multidrug resistance associated protein 1 (MRR1)</i>
<i>ACTB</i>	<i>B-actin (ACTB)</i>
<i>ADH1B</i>	<i>alcohol dehydrogenase subunit beta (ADH)</i>
<i>ALDH1A1</i>	<i>aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1)</i>
<i>APAF1</i>	<i>apoptotic protease activating factor (APAF1)</i>
<i>APEX1</i>	<i>apurinic-apyrimidinic endonuclease 1 (APEX1/Ref-1)</i>
<i>ATM</i>	<i>ataxia telangiectasia mutated (ATM)</i>
<i>ATR</i>	<i>ataxia telangiectasia and Rad3-related protein (ATR)</i>
<i>AXIN2</i>	<i>axin 2 (AXIN2)</i>
<i>B2M</i>	<i>beta-2-microglobin (B2M)</i>
<i>BAX</i>	<i>bcl2-associated x protein (BAX)</i>
<i>BBC3</i>	<i>p53 up-regulated modulator of apoptosis (PUMA)</i>
<i>BCL2</i>	<i>b-cell cll/lymphoma 2 (BCL-2)</i>
<i>BCL2L1</i>	<i>bcl2-like 1 (BCL-XL)</i>
<i>BRCA1</i>	<i>breast cancer 1, early onset (BRCA1)</i>
<i>BRCA2</i>	<i>breast cancer 2, early onset (BRCA2)</i>
<i>BTRC</i>	<i>transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase, beta (β-TrCP)</i>
<i>CAT</i>	<i>catalase (CAT)</i>
<i>CCND1</i>	<i>cyclin D1 (CCND1)</i>
<i>CDKN1A</i>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21)</i>
<i>CDKN1B</i>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27)</i>
<i>CDKN2B</i>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15)</i>
<i>CYP1A1</i>	<i>cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1 (CYP1A1)</i>
<i>DDB1</i>	<i>damage-specific DNA binding protein 1 (DDB1)</i>
<i>DDB2</i>	<i>damage-specific DNA binding protein 2 (DDB2)</i>
<i>DDIT3</i>	<i>growth arrest and DNA damage-inducible protein (GADD153)</i>
<i>E2F1</i>	<i>E2F transcription factor 1 (E2F1)</i>
<i>EGFR</i>	<i>epidermal growth factor receptor (EGFR)</i>
<i>EPHX1</i>	<i>epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic) (EPHX1)</i>
<i>ERCC1</i>	<i>excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1)</i>
<i>ERCC2</i>	<i>excision repair cross-complementation group 2 (XPD)</i>

<i>ERCC4</i>	<i>excision repair cross-complementation group 4 (XPF)</i>
<i>ERCC5</i>	<i>excision repair cross-complementation group 5 (XPG)</i>
<i>FTH1</i>	<i>ferritin, heavy polypeptide 1 (FTH1)</i>
<i>G6PD</i>	<i>glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)</i>
<i>GADD45A</i>	<i>growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha (GADD45A)</i>
<i>GAPDH</i>	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)</i>
<i>GCLC</i>	<i>glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit (GCL)</i>
<i>GPX1</i>	<i>glutathione peroxidase 1 (GPX1)</i>
<i>GPX2</i>	<i>glutathione peroxidase 2 (GPX2)</i>
<i>GSR</i>	<i>glutathione reductase (GSR)</i>
<i>GSTP1</i>	<i>glutathione S-transferase pi 1 (GSTP1)</i>
<i>GUSB</i>	<i>glucuronidase, beta (GUSB)</i>
<i>HMOX1</i>	<i>heme oxygenase (decycling) 1 (hMO-1)</i>
<i>HPRT1</i>	<i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1)</i>
<i>HSPA1A</i>	<i>heat shock 70kDa protein 1A (HSP70)</i>
<i>IL8</i>	<i>interleukin 8 (IL8)</i>
<i>JUN</i>	<i>jun proto-oncogene (c-JUN)</i>
<i>KEAP1</i>	<i>kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1)</i>
<i>LIG1</i>	<i>ligase I, DNA, ATP-dependent (LIG1)</i>
<i>LIG3</i>	<i>ligase III, DNA, ATP-dependent (LIG3)</i>
<i>MAP3K5</i>	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5 (MAP3K5/ASK1)</i>
<i>MDM2</i>	<i>Mouse double minute 2 homolog proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase (MDM2)</i>
<i>MGMT</i>	<i>O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)</i>
<i>MLH1</i>	<i>mutL homolog 1 (MLH1)</i>
<i>MSH2</i>	<i>mutS homolog 2 (MSH2)</i>
<i>MT1X</i>	<i>metallothionein 1X (MT1X)</i>
<i>MT2A</i>	<i>metallothionein 2A (MT2A)</i>
<i>MYC</i>	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog (c-MYC)</i>
<i>NAT1</i>	<i>N-acetyltransferase 1 (arylamine N-acetyltransferase) (NAT1)</i>
<i>NFE2L2</i>	<i>nuclear factor, erythroid 2-like 2 (NRF2)</i>
<i>NFKB1</i>	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p50/p105)</i>
<i>NFKB2</i>	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)</i>
<i>NFKBIA</i>	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha (IKBA)</i>
<i>NQO1</i>	<i>NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1 (NQO1)</i>
<i>OGG1</i>	<i>8-oxoguanine DNA glycosylase (hOGG1)</i>
<i>PARP1</i>	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1)</i>
<i>PCNA</i>	<i>proliferating cell nuclear antigen (PCNA)</i>
<i>PLK3</i>	<i>polo-like kinase 3 (PLK3)</i>

<i>PMAIP1</i>	<i>phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (NOXA)</i>
<i>POLB</i>	<i>polymerase (DNA directed), beta (POLB)</i>
<i>POLD1</i>	<i>polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit (POLD1)</i>
<i>PPM1D</i>	<i>protein phosphatase, mg²⁺/Mn²⁺ dependent, 1D (PPM1D)</i>
<i>PRDX1</i>	<i>peroxiredoxin 1 (PRX1)</i>
<i>RAD50</i>	<i>RAD50 homolog (S. cerevisiae) (RAD50)</i>
<i>RAD51</i>	<i>RAD51 recombinase (RAD51)</i>
<i>RRM2B</i>	<i>ribonucleotide reductase M2B (TP53 inducible) (p53R2)</i>
<i>SEPP1</i>	<i>selenoprotein P, plasma, 1 (SEPP1)</i>
<i>SIRT2</i>	<i>sirtuin 2 (SIRT2)</i>
<i>SLC30A1</i>	<i>solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1 (ZnT1)</i>
<i>SOD1</i>	<i>superoxide dismutase 1, soluble (SOD1)</i>
<i>SOD2</i>	<i>superoxide dismutase 2, mitochondrial (SOD2/MnSOD)</i>
<i>SULT1A</i>	<i>sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 1 (SULT1A1)</i>
<i>TFR</i>	<i>transferrin receptor (TFR)</i>
<i>TNFRSF10B</i>	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b (DR5)</i>
<i>TP53</i>	<i>tumor protein p53 (p53)</i>
<i>TXN</i>	<i>thioredoxin (TXN)</i>
<i>TXNRD1</i>	<i>thioredoxin reductase 1 (TXNRD)</i>
<i>UGT1A1</i>	<i>UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1 (UGT1A1)</i>
<i>VEGFA</i>	<i>vascular endothelial growth factor A (VEGFA)</i>
<i>XIAP</i>	<i>X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)</i>
<i>XPA</i>	<i>xeroderma pigmentosum, complementation group A (XPA)</i>
<i>XPC</i>	<i>xeroderma pigmentosum, complementation group C (XPC)</i>
<i>XRCC5</i>	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5 (XRCC5)</i>

8.3 EIGENSCHAFTEN DER KUPFEROXID-NANOPARTIKEL

Die Kupferoxid-Nanopartikel (Sigma Aldrich, Lotnummer: 544868, MKAA0633) wiesen eine Größe von ca. 20 bis 200 nm auf. Der statistische Modus der Partikelgrößenverteilung betrug 55 nm und wurde mithilfe von TEM-Aufnahmen ermittelt (SEMISCH *et al.*, 2014).

Tabelle 28: Hydrodynamischer Radius von Kupferoxid-Nanopartikel.

Hydrodynamischer Radius in Nanometern [nm] von CuO NP in Wasser, DMEM ohne fetales Kälberserum (FKS) und mit 5 bzw. 10 % Serumanteilen. Gezeigt sind Mittelwerte der Größenverteilung aus zwei unabhängigen Versuchen mit je zehn Bestimmungen und deren Standardabweichungen. Die Daten wurden von Frau Dr. Anetta Semisch im Rahmen ihrer Dissertation erhoben.

	Wasser	DMEM ohne FKS	DMEM 5 % FKS	DMEM 10 % FKS
CuO NP 50 µg/mL	488 ± 56	205 ± 12	148 ± 20	146 ± 6
CuO NP 100 µg/mL	447 ± 126	250 ± 25	141 ± 19	144 ± 6
CuO NP 150 µg/mL	345 ± 87	290 ± 65	154 ± 15	139 ± 12

Tabelle 29: Löslichkeit von Kupferoxidnanopartikeln nach 24 h in DMEM.

Partikelkonzentration	Löslichkeit nach 24 Stunden [%]
20 µg/mL	45,0 ± 4,0
50 µg/mL	57,7 ± 8,9

8.4 NACHWEIS-, BESTIMMUNGS- UND ERFASSUNGSGRENZE DER KUPFERBESTIMMUNG

Die Nachweisgrenze (NG), Erfassungsgrenze (EG) und Bestimmungsgrenze (BG) wurden mit der Leerwertmethode entsprechend der DIN 32645 bestimmt. Dabei wurden fünf Blindwerte hergestellt und deren Kupfergehalt jeweils zehnmal bestimmt.

Die Nachweisgrenze betrug dabei $\chi_{NG} = 0,14 \mu\text{g/L}$. Für die Erfassungsgrenze ergab sich ein Wert von $\chi_{EG} = 0,29 \mu\text{g/L}$. Die Bestimmungsgrenze betrug $\chi_{BG} = 0,43 \mu\text{g/L}$.

Die Ermittlung der NG, EG und BG wurden von Frau Dr. Bettina Strauch im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführt.

8.5 KOLONIEBILDUNGSFÄHIGKEIT NACH B[a]P-BEHANDLUNG

Angeschlossen an die Bestimmung der Lebendzellzahl waren Untersuchungen zum klonogenen Langzeitüberleben der HaCaT Zellen nach Behandlung mit B[a]P mittels Kolonieformationsassay. Aufgrund der erhöhten Sensitivität wurden nach einigen Vorversuchen Konzentrationen im nanomolaren Bereich für die sonnenlichtexponierten Zellen und niedrige mikromolare Konzentrationen für die nicht bestrahlten Proben gewählt.

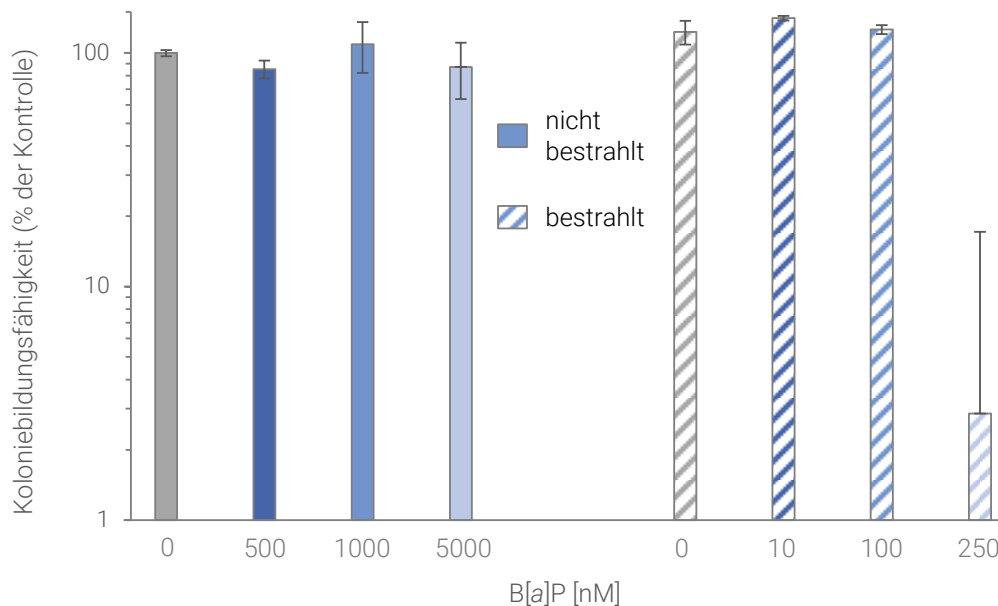


Abbildung 61: Koloniebildungsfähigkeit der HaCaT Zellen nach Inkubation mit Benzo[a]pyren.

HaCaT Zellen wurden für 3 h in der B[a]P-haltigen Inkubationslösungen vorbehandelt, wahlweise für 3,5 min in PBS bestrahlt und erneut für 3 h mit B[a]P inkubiert. Abgebildet sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei Bestimmungen aus drei unabhängigen Versuchen. Die Ergebnisse sind in Prozent der jeweiligen Kontrollen dargestellt. Die schraffierten Balken stellen die Kombinationsbehandlung von B[a]P und der Bestrahlung, mit einem UVA-Anteil von 1,18 J/cm² und einem UVB-Anteil von 60 mJ/cm², dar.

Die Fähigkeit zur Koloniebildung (Abbildung 61) wurde durch B[a]P-Konzentrationen bis 5 μ M nicht wesentlich beeinflusst und belief sich in etwa auf Niveau der Vehikelkontrolle. Die UV-Bestrahlung in Kombination mit der B[a]P zeigte bei 250 nM einen Einfluss auf das klonogene Wachstum und hinderte es nahezu vollständig. Für Genexpressionsuntersuchungen und die Analyse des ROS-Gehaltes in HaCaT Zellen nach Koinkubation wurden daher mit moderat zytotoxischen Konzentrationen gearbeitet (10 nM, 50 nM, 150 nM).

8.6 PARAMETER DER ^1H -NMR-SPEKTROSKOPIE

Die ^1H -NMR Messungen erfolgten an einem Bruker Ascend 400 *spectrometer* (Bruker Biospin, Rheinstetten, DE), ausgerüstet mit einer 5 mm SEI *probe* PA BBI 400S1 mit Z-Gradienten Spulen und einem *automatic sample changer* (Sample Xpress, Bruker Biospin). Zur Quantifizierung des Gehaltes an *Mineral Oil Aromatic Hydrocarbons* (MOAH) wurde der Bereich von $\delta = 9,2 - 6,5$ ppm integriert. Für Nebenbestandteile wurde der Bereich von $\delta = 6,5 - 3,0$ ppm herangezogen. Die Protonensignale der *Mineral Oil Saturated Hydrocarbons* (MOSH) fanden sich im Spektrum zwischen $\delta = 3,0$ und $0,2$ ppm (WEBER *et al.*, 2019). Die Messungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Frau M.Sc. Tamina Schmidt und dem NMR-Team des CVUA unter Anleitung von Frau Dr. Sandra Weber und Herrn Prof. Dr. Thomas Kuballa.

Tabelle 30: Parameter zur Aufnahme der ^1H -NMR-Spektren in CDCl_3

Messung in CDCl_3	
Pulsprogramm	zg30
Temperatur (T) [K]	298,0
Datenpunkte (DP)	65536
Puls (P)	30°
Relaxations Delay [s]	60
Acquisitionszeit [s]	3,99
Dummy Scans	2
Scanzahl	32
Receiver Gain (RG)	45,2

Tabelle 31: Parameter zur Aufnahme der ^1H -NMR-Spektren in Cyclohexan/Aceton- d_6

Messung in Cyclohexan/Aceton- d_6 (80:20)	
Pulsprogramm	noesygppr1d_d7eba
Temperatur (T) [K]	300,0
Datenpunkte (DP)	65536
Puls (P)	90°
OP1 [ppm]	1,537
Relaxations Delay [s]	4
Acquisitionszeit [s]	3,98
Dummy Scans	2
Scanzahl	32
Receiver Gain (RG)	45,2

8.7 MIGRATIONSSTUDIEN VON LABORWARE IN DMSO

Im Herstellungsprozess von Plastikmaterialien werden diverse Additive eingesetzt. Hierzu zählen aromatische Verbindungen wie Weichmacher (z.B. Phthalate), Alterungsschutzmittel (z.B. Benzotriazole) und Kunststofffarbstoffe (KULSHRESHTHA, 2002). Mittels Bruker Ascend 400 MHz NMR Spektrometer erfolgten Migrationsstudien über verschiedene Zeiträume, um zu gewährleisten, dass sich durch das organische Lösungsmittel DMSO keine der genannten Stoffklassen aus den verwendeten Plastikmaterialien herauslösen und die Messung stören. Die verwendeten Zellkulturgefäße wurden mit DMSO-d₆ befüllt und für 24 h, 48 h, 12 und 26 Tage bei Raumtemperatur gelagert. Im Anschluss daran wurde das DMSO-d₆ mittels ¹H-NMR analysiert und auf spektrale Unterschiede verglichen. Die Migrationsstudien wurden in Rahmen einer wissenschaftlichen Abschlussarbeit in Zusammenarbeit mit Herrn M.Sc. Marcel Kuntz und dem NMR-Team um Herrn Prof. Dr. Thomas Kuballa am CVUA Karlsruhe durchgeführt.

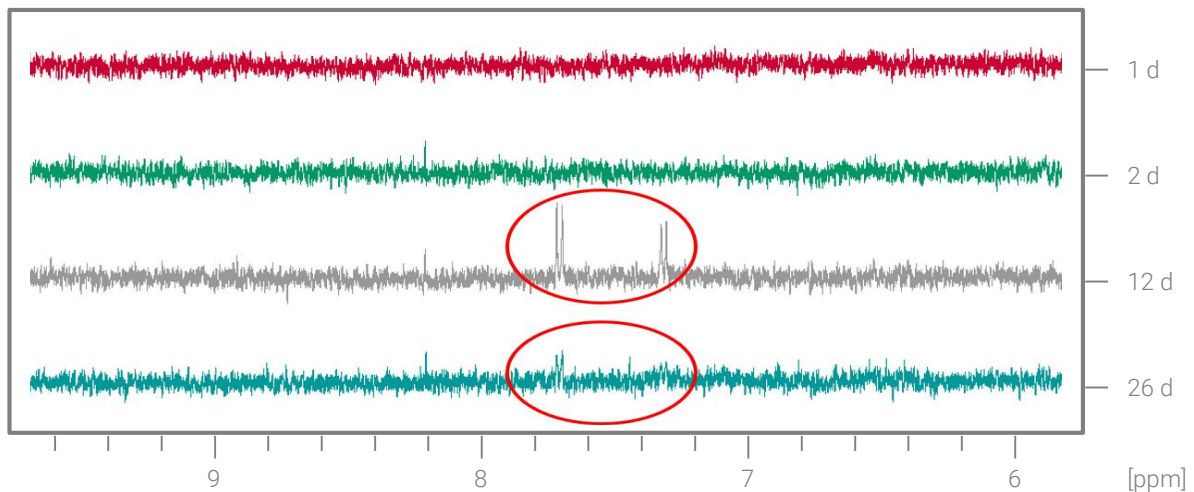


Abbildung 62: Nach 1 d, 2 d, 12 d und 26 d mittels NMR- Bruker Ascend 400 MHz NMR-Spektrometer aufgenommene Spektren der PCR-Gefäße.

Aus den Spektren ging hervor, dass nach 12 und 26 Tagen Signale aromatischer Protonen von Weichmachern zu identifizieren waren. Die getesteten Plastikwaren waren somit nicht zur Aufbewahrung der MOAH-Fractionen bzw. Einzelsubstanzen geeignet.

8.8 ZYTOTOXIZITÄT DER ENDOZYTLOSEINHIBITOREN

Da Endozytoseinhibitoren mitunter einen großen Einfluss auf zelluläre Stoffwechselprozesse besitzen und als zytotoxisch gelten, wurden die Inkubationskonzentrationen im Rahmen der wissenschaftlichen Abschlussarbeit von Frau M.Sc. Duc Bao Mach für die EA.hy926 Zelllinie etabliert. EA.hy926 wurden dafür in den Konzentrationen von 50 μM und 100 μM für 24 h mit OH-DYN bzw. MDC inkubiert. Nach der Zellernte wurden sowohl die Zellzahl sowie die Zellviabilität mittels Casy® TT Zellzählgerätes bestimmt. Aufgrund der hohen Zytotoxizität von OH-Dyn wurden für Aufnahmeuntersuchungen stets auf die Lebendzellzahl bezogen.

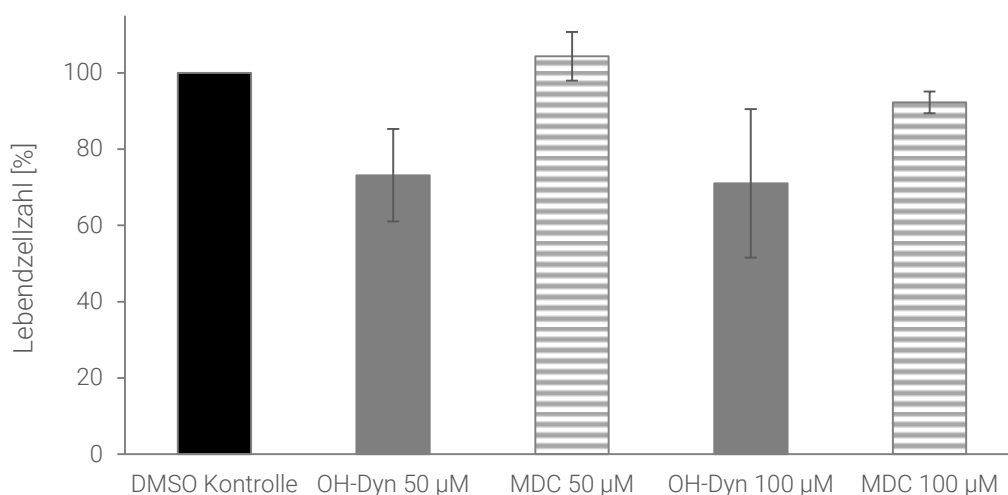


Abbildung 63: Lebendzellzahl der EA.hy926 Zellen nach Inkubation mit den Endozytoseinhibitoren Hydroxydynasore (OH-Dyn) und Monodansylcadaverin (MDC).

EA.hy926 Zellen wurden für 60 min mit OH-Dyn bzw. für 10 min mit MDC behandelt. Abgebildet sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die Ergebnisse sind in Prozent der unbehandelten Kontrolle dargestellt.

8.9 DETAILLIERTE DARSTELLUNG ZUR BEEINFLUSSUNG DER GENEXPRESSION

8.9.1 BEHANDLUNG MIT B[a]P

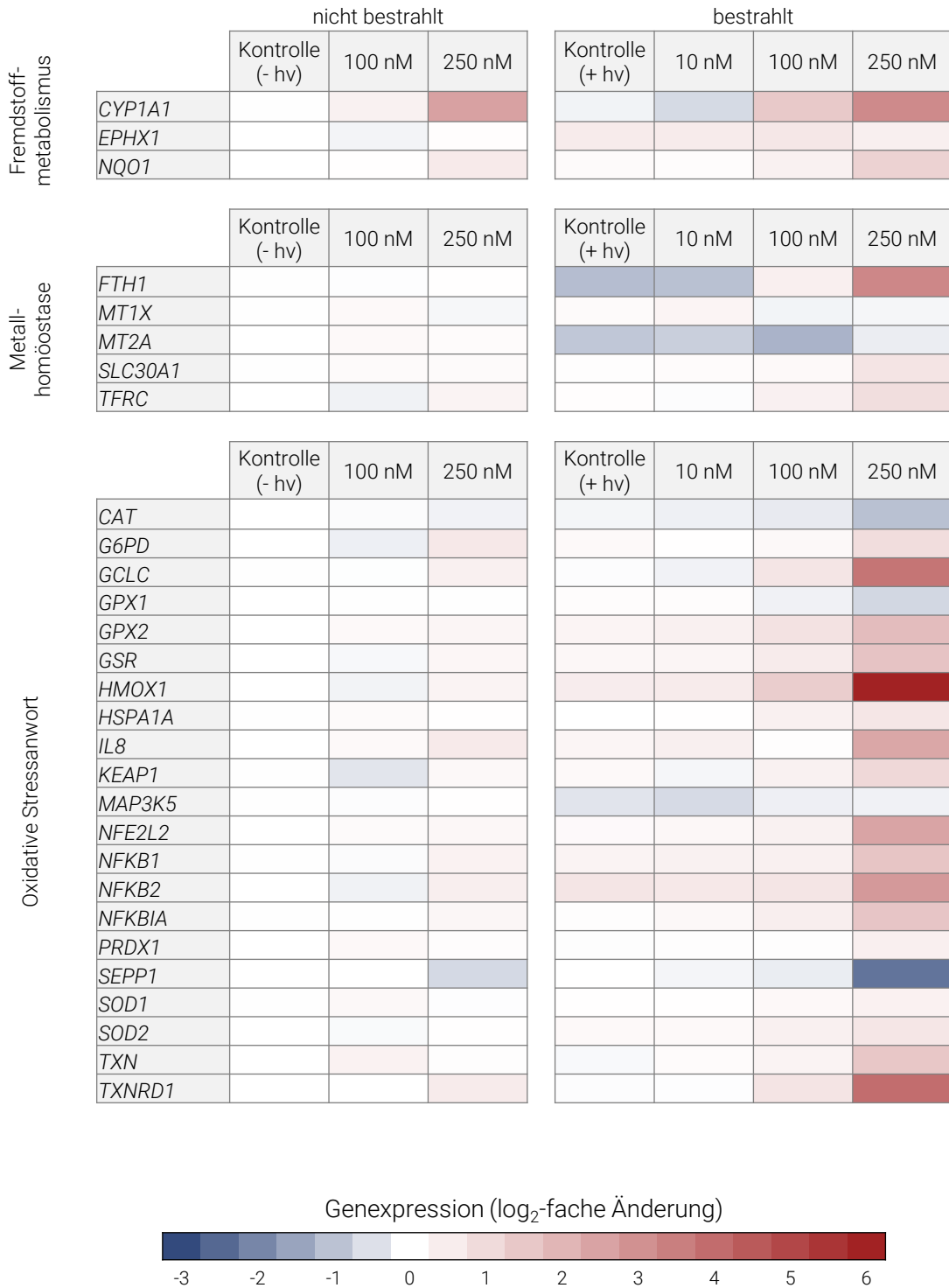


Abbildung 64: Beeinflussung der Expression von Genen des Fremdstoffmetabolismus, der Metallhomöostase und der oxidativen Stressantwort in HaCaT Zellen nach B[a]P-Behandlung.

Die Intensität der Bestrahlung mit künstl. Sonnenlicht betrug: UVA 1,18 J/cm², UVB 60 mJ/cm².

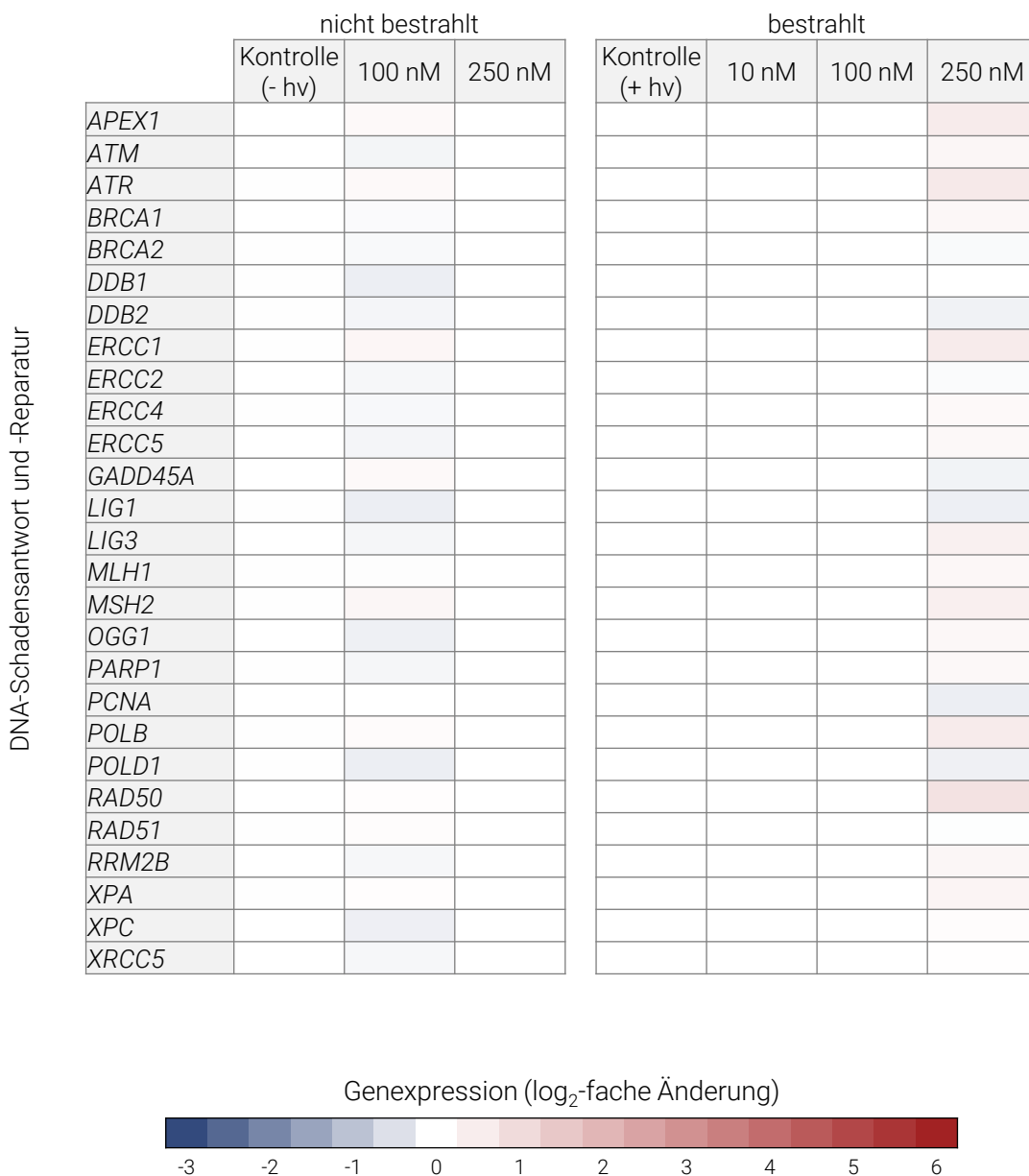


Abbildung 65: Beeinflussung der Expression von Genen der DNA-Schadensantwort und der DNA-Reparatur in HaCaT Zellen nach B[a]P-Behandlung.

Gezeigt sind die Ergebnisse der Exposition gegenüber B[a]P (links) sowie die Koexposition mit B[a]P und künstlichem Sonnenlicht (rechts). Die Bestrahlungsintensität belief sich auf 1,18 J/cm² (UVA) und 60 mJ/cm² (UVB). Eine Rotfärbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine verminderte Genexpression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

8.9.2 BEHANDLUNG MIT MOAH (GRAVEX 913 EXTRAKTE)

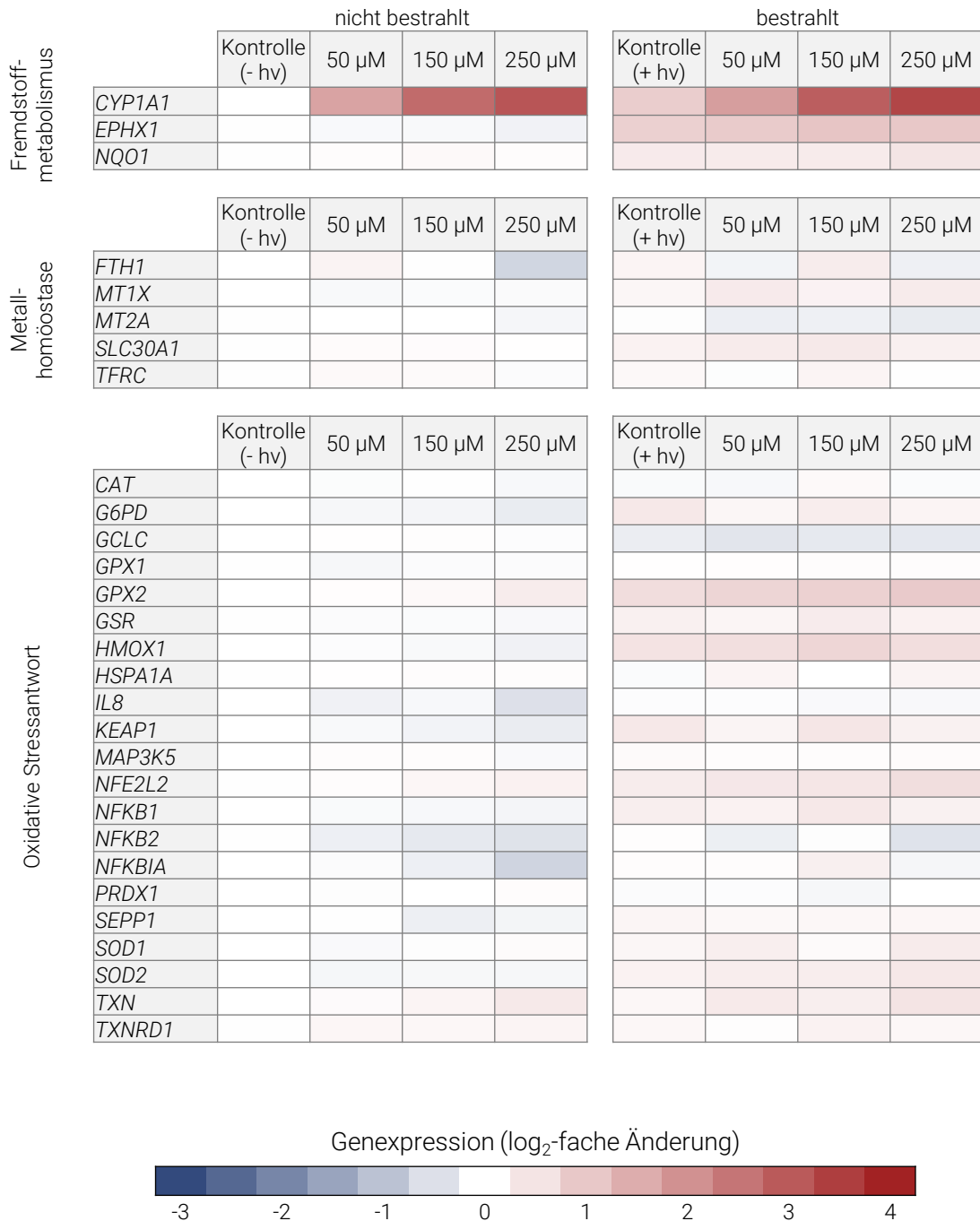


Abbildung 66: Beeinflussung der Expression von Genen des Fremdstoffmetabolismus, der Metallhomöostase und der oxidativen Stressantwort in HaCaT Zellen nach Behandlung mit Extrakten des naphthenischen Mineralöls Gravex 913.

Gezeigt sind die Ergebnisse der Exposition gegenüber MOAH-Extrakten (links) sowie die Koexposition mit MOAH-Extrakten und künstlichem Sonnenlicht (rechts). Die Bestrahlungsintensität belief sich auf 1,18 J/cm² (UVA) und 60 mJ/cm² (UVB). Eine Rotfärbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine verminderte Genexpression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

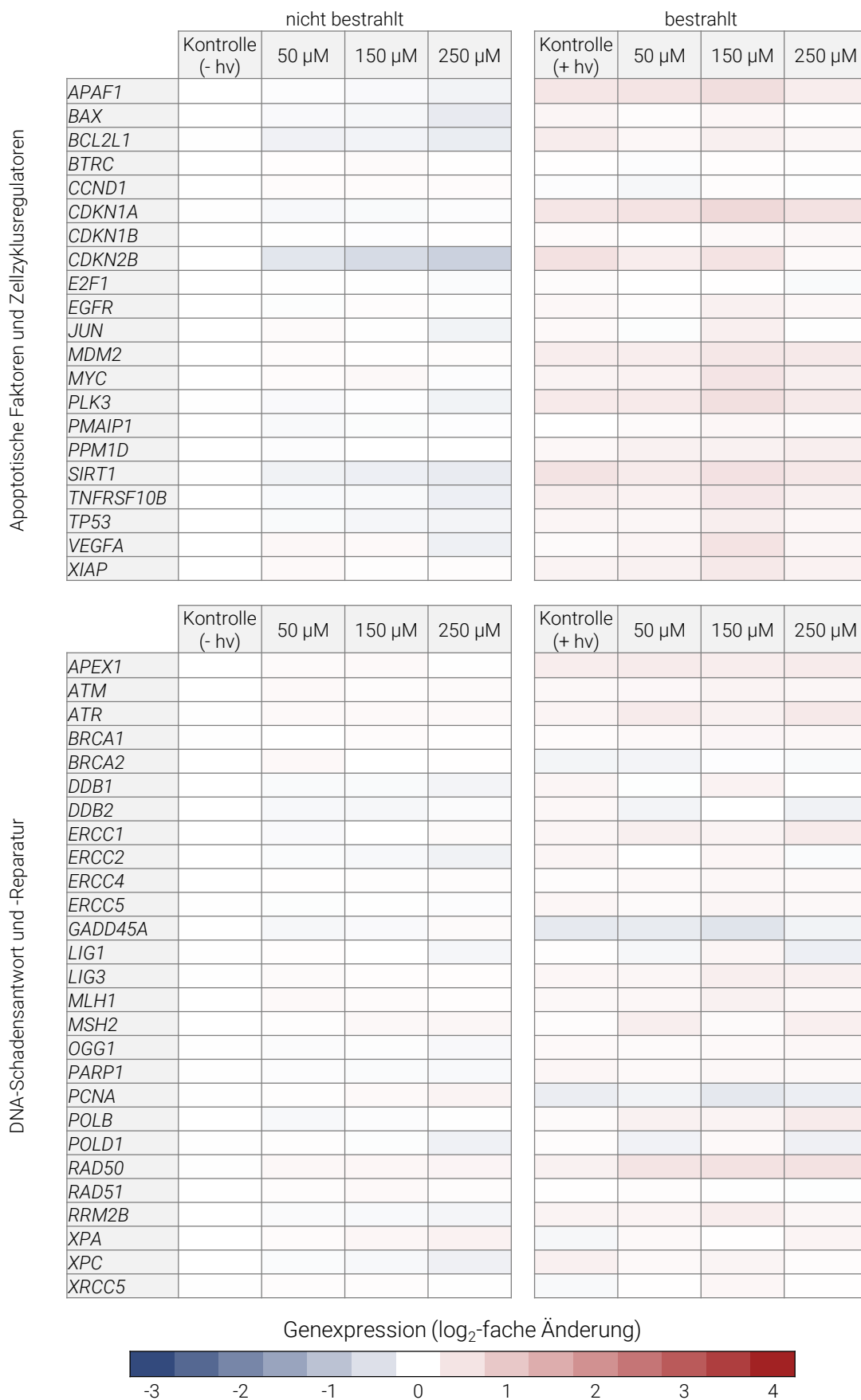


Abbildung 67: Beeinflussung der Expression von Genen der DNA-Schadensantwort und der DNA-Reparatur in HaCaT Zellen nach Behandlung mit Extrakten des naphthenischen Mineralöls Gravex 913. Gezeigt ist die Bestrahlung mit künstlichem Sonnenlicht (UVA 1,18 J/cm², UVB 60 mJ/cm²)

8.9.3 BEHANDLUNG MIT EINZELSUBSTANZEN (MOAH)

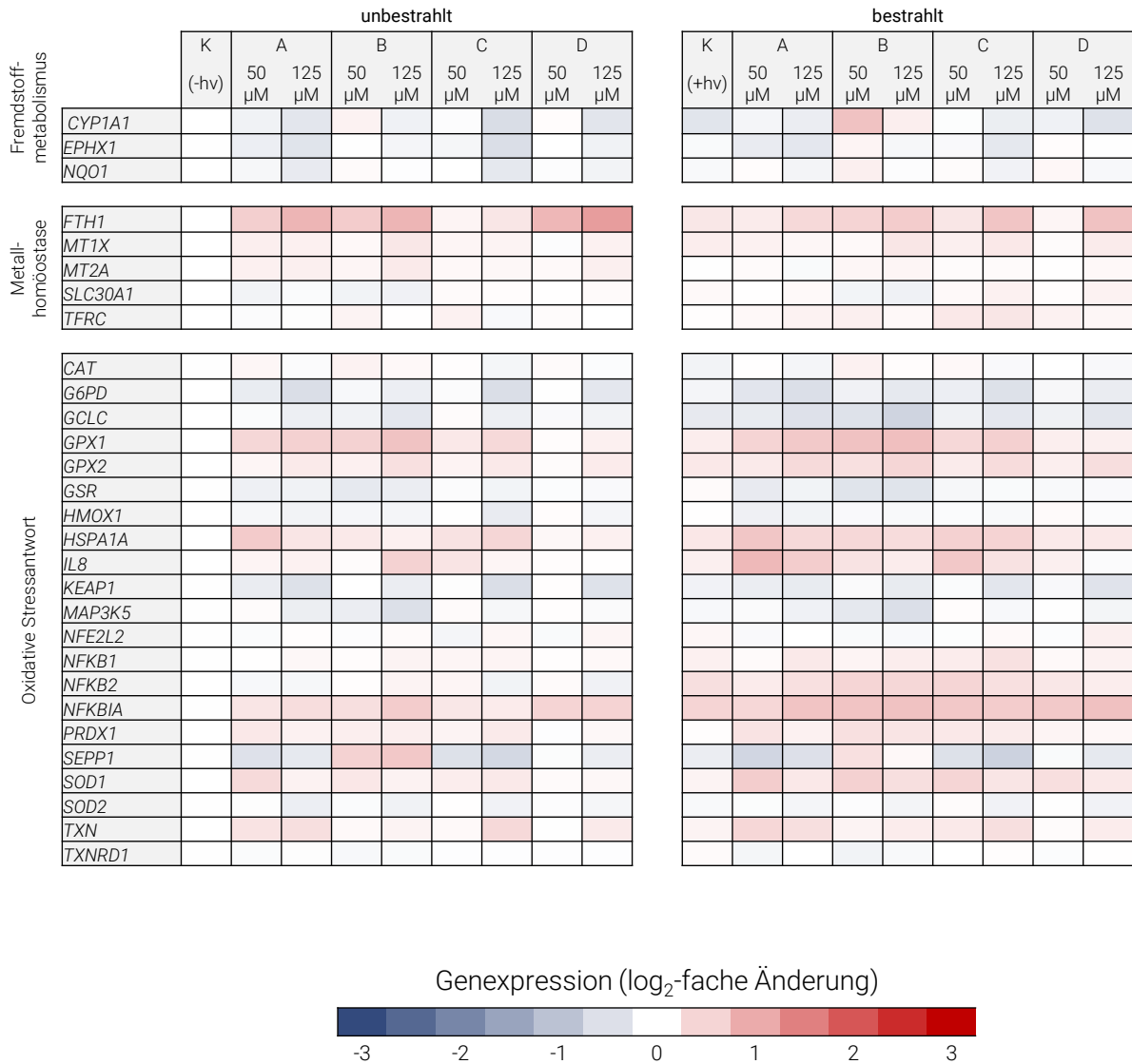


Abbildung 68: Beeinflussung der Expression von Genen des Fremdstoffmetabolismus, der Metallhomöostase und der oxidativen Stressantwort in HaCaT Zellen nach Behandlung mit:

K = Kontrolle; A = Pentylbenzol; B = 1,4-Di-n-Butylbenzol; C = 1,4-Bis(2-ethylhexyl)benzol; D = 1,4-Bis(3,7-dimethyloctyl)benzol; (-hv) = nicht bestrahlt; (+hv) = bestrahlt mit künstlichem Sonnenlicht (UVA 1,18 J/cm², UVB 60 mJ/cm²). Eine Rotfärbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine verminderte Genexpression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.



Abbildung 69: Beeinflussung der Genexpression verschiedener Transkriptionsfaktoren und Genen der DNA-Schadensreparatur und DNA-Schadensantwort nach Behandlung mit:

K = Kontrolle; A = Pentylbenzol; B = 1,4-Di-n-Butylbenzol; C = 1,4-Bis(2-ethylhexyl)benzol; D = 1,4-Bis(3,7-dimethyloctyl)benzol; (-hv) = nicht bestrahlt; (+hv) = bestrahlt mit künstlichem Sonnenlicht (UVA 1,18 J/cm², UVB 60 mJ/cm²). Eine Rotfärbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine verminderte Genexpression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

8.9.4 BEHANDLUNG MIT KUPFERVERBINDUNGEN (HACAT)

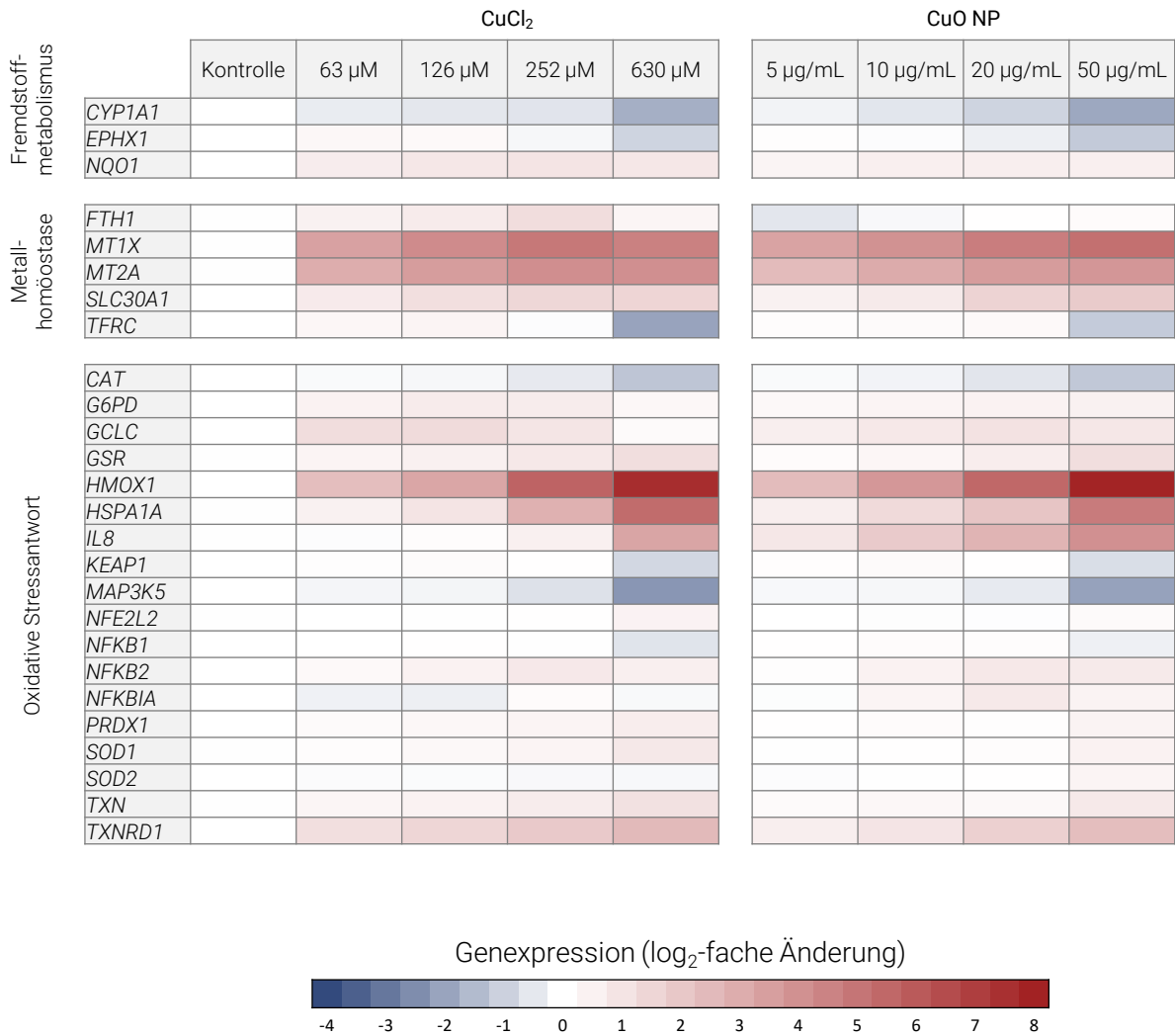


Abbildung 70: Beeinflussung der Genexpression von Genen des Fremdstoffmetabolismus, der Metallhomöostase und der oxidativen Stressantwort nach 24-stündiger Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Kupferchlorid (CuCl₂) und Kupferoxidnanopartikeln (CuO NP) in HaCaT Zellen.

Eine Rotfärbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine verminderte Genexpression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

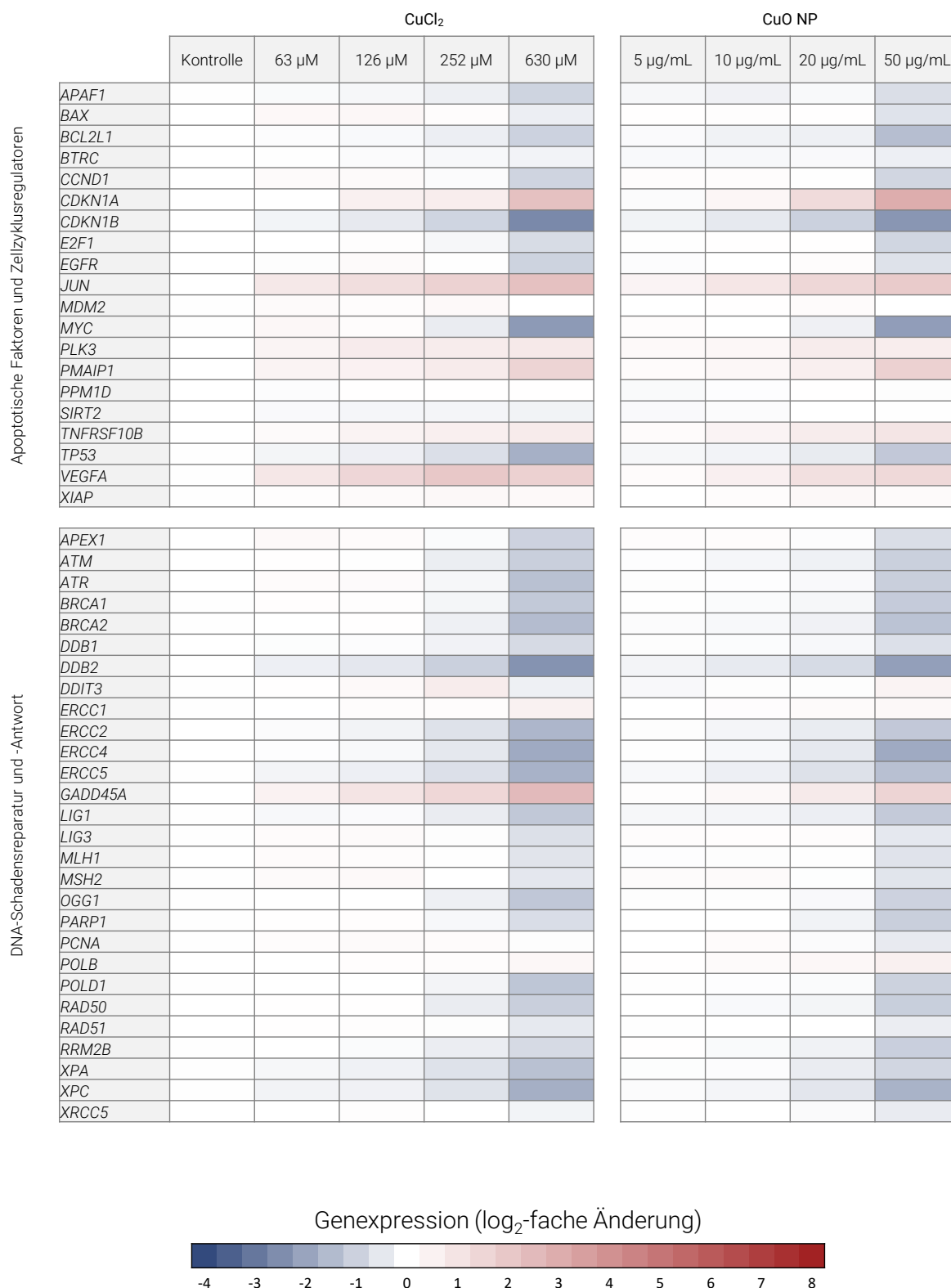


Abbildung 71: Beeinflussung der Genexpression verschiedener Transkriptionsfaktoren und Genen der DNA Schadensreparatur und DNA-Schadensantwort nach 24-stündiger Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Kupferchlorid (CuCl₂) und Kupferoxidnanopartikeln (CuO NP) in HaCaT Zellen.

Eine Rotfärbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine verminderte Genexpression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

8.9.5 BEHANDLUNG MIT KUPFERVERBINDUNGEN (EA.HY926 ZELLEN)

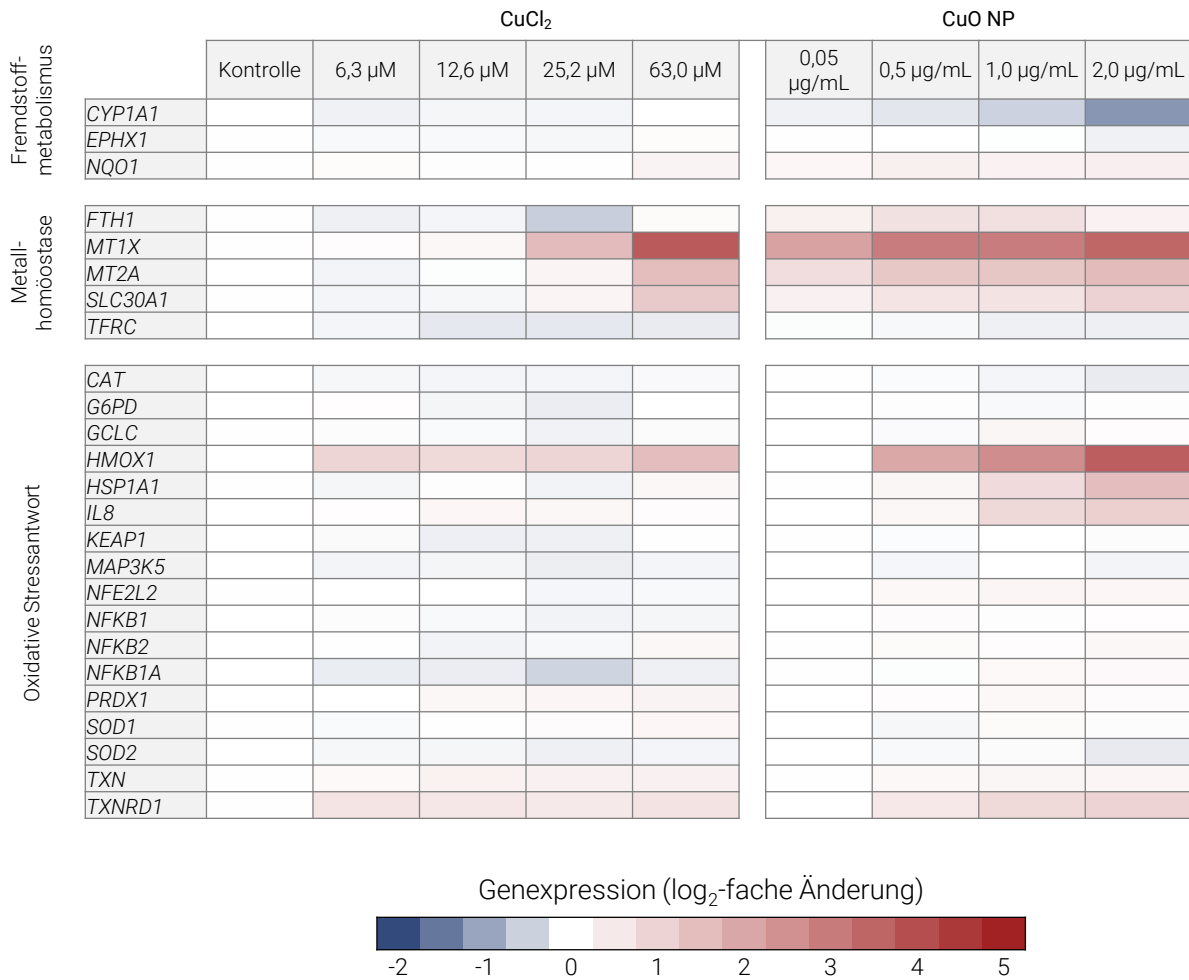


Abbildung 72: Beeinflussung der Genexpression von Genen des Fremdstoffmetabolismus, der Metallhomöostase und der oxidativen Stressantwort nach 24-stündiger Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Kupferchlorid (CuCl₂) und Kupferoxidnanopartikeln (CuO NP) in EA.hy926 Zellen.

Eine Rotfärbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine verminderte Genexpression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

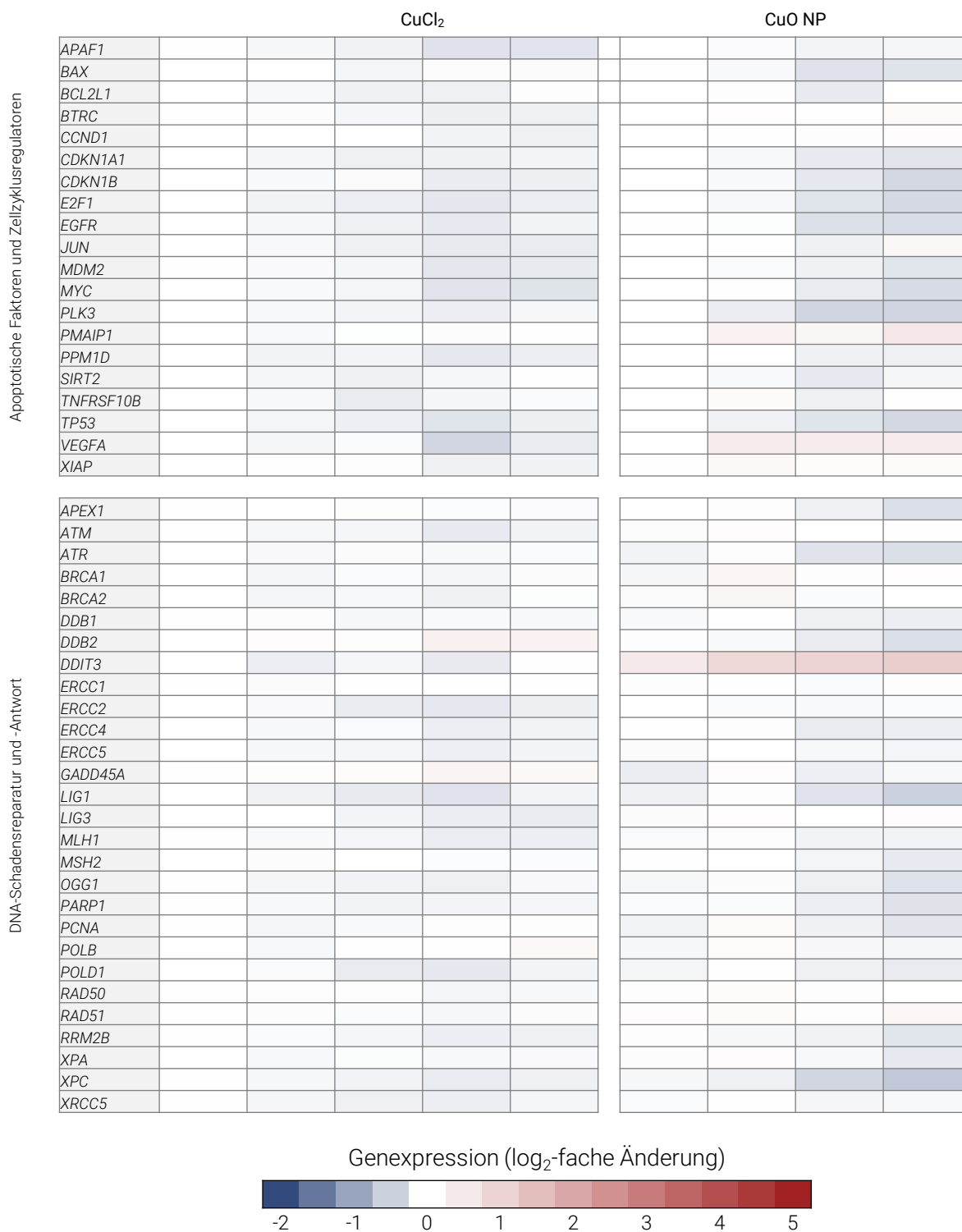


Abbildung 73: Beeinflussung der Genexpression von Genen verschiedener Transkriptionsfaktoren und Genen der DNA Schadensreparatur und DNA-Schadensantwort nach 24-stündiger Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Kupferchlorid (CuCl₂) und Kupferoxidnanopartikeln (CuO NP) in EA.hy926 Zellen.

Eine Rotfärbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine verminderte Genexpression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

8.9.6 BEHANDLUNG MIT CHROMVERBINDUNGEN

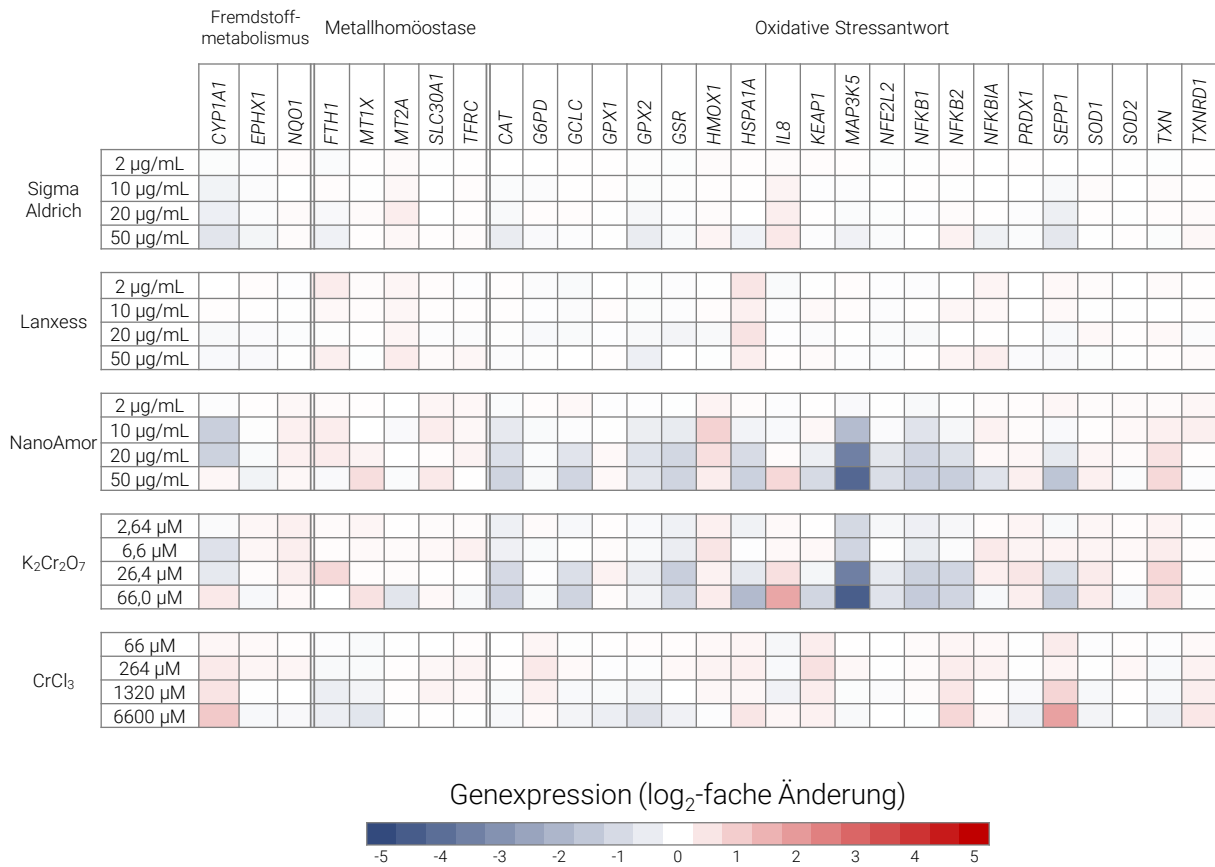


Abbildung 74: Beeinflussung der Genexpression von Genen des Fremdstoffmetabolismus, der Metallhomöostase und der oxidativen Stressantwort nach 24-stündiger Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Chromoxid (Cr₂O₃), Kaliumdichromat (K₂Cr₂O₇) und Chromchlorid (CrCl₃) in HaCaT Zellen.

Eine Rotfärbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine verminderte Genexpression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

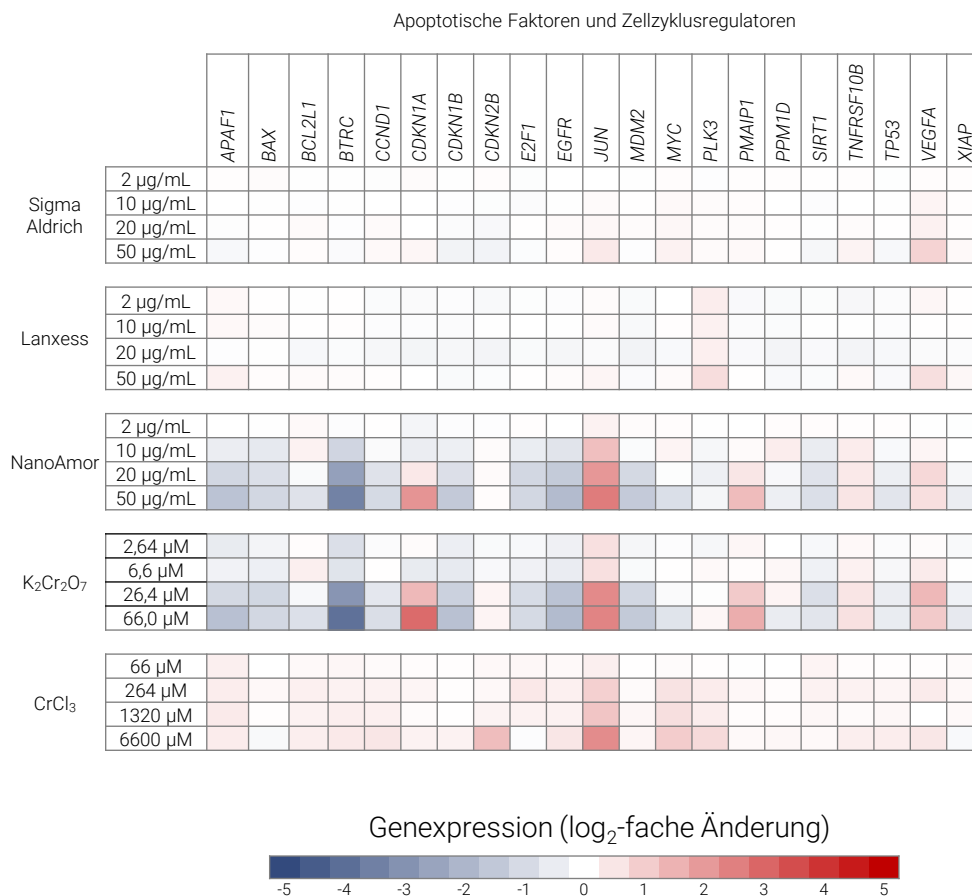


Abbildung 75: Beeinflussung der Genexpression von apoptotischen Faktoren und Genen der Zellzyklusregulation nach 24-stündiger Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Chromoxid (Cr₂O₃), Kaliumdichromat (K₂Cr₂O₇) und Chromchlorid (CrCl₃) in HaCaT Zellen.

Eine Rotfärbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine verminderte Genexpression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

DNA-Schadensreparatur und DNA-Schadensantwort

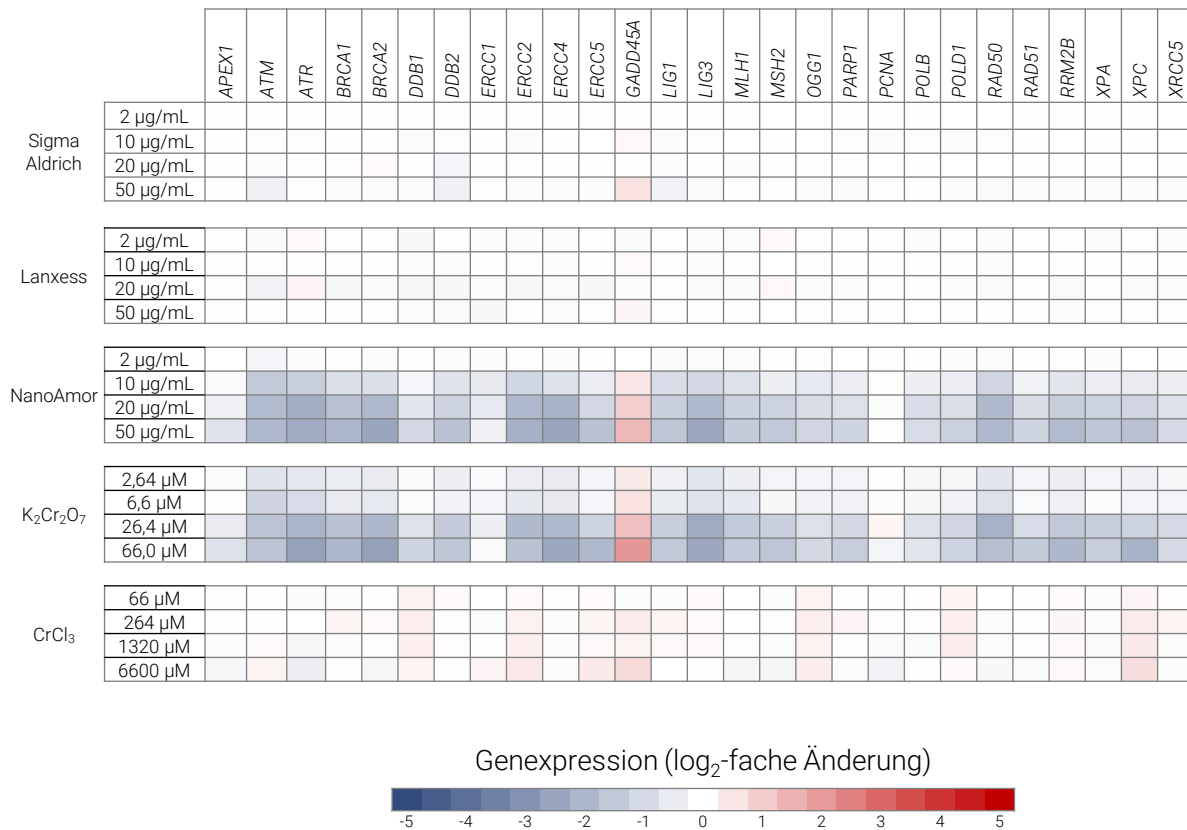


Abbildung 76: Beeinflussung der Genexpression von Genen der DNA-Schadensantwort und DNA-Reparatur nach 24-stündiger Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Chromoxid (Cr₂O₃), Kaliumdichromat (K₂Cr₂O₇) und Chromchlorid (CrCl₃) in HaCaT Zellen.

Eine Rotfärbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine verminderte Genexpression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

8.10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5-hmC	5-Hydroxymethylcytosin
5-mC	5-Methylcytosin
8-OxoG	8-Oxoguanin
Å	Ångström = 0,1 nm
AhR	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
AhRE	<i>AhR responsive elements</i>
AIP	<i>AhR interacting protein</i>
ALF	künstliche lysosomale Flüssigkeit
ANOVA	analysis of variance
AP-1	Aktivator Protein 1
ARE	<i>antioxidant response element</i>
ARNT	<i>AhR nuclear translocator</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BaP	Benzo[a]pyren
BER	Basenexzisionsreparatur
bidest.	bidestilliert
BS	<i>binding solution</i>
BSA	Rinderserumalbumin
BZgA	Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung
CBP	CREB binding protein
CCD	<i>charge-coupled device</i>
cDNA	komplementäre DNA
CFA	Kolonieformationsassay
CME	Clathrin-vermittelte Endozytose
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CpG-Islands	Bereiche im Genom mit erhöhter CpG-Dinukleotid-Dichte
Cq	<i>cycle of quantification</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CYP1A1	CYP450 1A1
DCF-DA	2,7-Dichlorofluorescein-Diacetat
DCF-DA	2,7-Dichlorofluorescein-Diacetat
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMEM HG	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferasen
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ERETIC	<i>electronic reference to access in-vivo concentrations</i>
ERK2	<i>mitogen-activated protein kinase 1, (MAPK1)</i>
Exo I	Exonuklease I
Fa.	Firma
FICZ	6-Formylindolo[3,2-b]carbazol (Tryptophanderivat)
FKS	fetales Kälberserum
FME	Fremdstoff-metabolisierende Enzyme

g	Gravitationskraft
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GC	Gaschromatographie
GF-AAS	Graphitrohr-Atomabsorptionsspektroskopie
GSH	Glutathion
GSR	Glutathionreduktase
GSSG	Glutathiondisulfid (oxidiertes Glutathiondimer)
h	Stunden
H3K9	Lysin 9 der Histonseitenkette des Histons 3
HaCaT	<i>human adult low calcium high temperature</i>
HAT	Histonacetyltransferase
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HDAC	Histondeacetyltransferase
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSP90	<i>heat shock protein 90</i>
IARC	<i>international agency for research on cancer</i>
ID3	<i>inhibitor of differentiation 3</i>
IFC	<i>integrated fluidic circuits</i>
KHz	Kilohertz
LBP	Lysepuffer
LC	Flüssigchromatographie
LG-GC	Online-Kopplung der chromatographischen Trenntechniken Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) und Gaschromatographie (GC)
M	Molar
MDC	Monodansylcadaverin
min	Minuten
miRNA	microRNA
mJ	Millijoule
MMP1	Matrix Metalloprotease-1
MMR	Mismatch-Reparatur
MOAH	<i>mineral oil aromatic hydrocarbons</i>
MOSH	<i>mineral oil saturated hydrocarbons</i>
MRE	<i>metall responsive elements</i>
mRNA	messenger RNA
MT	Metallothionein
MW	Mittelwert
NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphat
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NF-κB	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
nm	Nanometer
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NoRT	<i>no reverse transcriptase</i>
NP	Nanopartikel
NRC	<i>no reaction control</i>
NTC	<i>no template control</i>
OH-Dyn	Hydroxy-Dynasore
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

PARP1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PVDF	Polyvinylidenfluorid
q	<i>quantitative</i>
R/2	halbe Spannweite (Statistik)
RLU	relative Licht-Einheit
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>revolutions per minute</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	reverse Transkriptase
s	Sekunden
SAM	Sulfonium Betain S-Adenosyl-Methionin
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SMAF	<i>small musculoaponeurotic fibrosarcoma</i>
SOD	Superoxiddismutase
STA	<i>specific target amplification</i>
tBHP	Tert-Butylhydroperoxid
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TET	<i>ten-eleven-translocation methylcytosine dioxygenase</i>
TRAIL	<i>tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>
TSS	<i>transcription starting site</i>
Uq	Ubiquitin
UV	Ultraviolett
WB	<i>wash buffer</i>
XPS	Röntgenphotoelektronenspektroskopie

8.11 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Querschnittszeichnung der Haut und Unterhaut. _____	5
Abbildung 2:	Spektrum elektromagnetischer Strahlung. _____	7
Abbildung 3:	Bildung von UV-induzierten DNA-Schäden. _____	8
Abbildung 4:	Steigende Affinität von Dimethylsulfoxid (DMSO) auf die delokalisierten π -Elektronensysteme polyzyklischer Aromaten. _____	13
Abbildung 5:	Vereinfachtes Jablónski-Schema polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe. _____	16
Abbildung 6:	Bildung von 9,10-Antrachinon nach photolytischer Aktivierung. _____	17
Abbildung 7:	Bildung von Photooxidationsprodukten ausgehend von Benzo[a]pyren. _____	17
Abbildung 8:	Schematischer Überblick der Chrom-induzierten Genotoxizität. _____	24
Abbildung 9:	Inkubationsschema der bestrahlten Mineralölkohlenwasserstoffe. _____	32

Abbildung 10:	Schematischer Aufbau eines Fluidigm <i>dynamic arrays</i> .	43
Abbildung 11:	¹ H-NMR-Spektrum des naphthenbasischen Mineralöls Gravex 913 der Fa. Shell.	51
Abbildung 12:	Reaktionsmechanismus des ATP-Assays.	53
Abbildung 13:	Lebendzellzahl der HaCaT Zellen nach Inkubation mit Benzo[a]pyren.	54
Abbildung 14:	ATP-Gehalt der HaCaT-Zellen nach Inkubation mit MOAH-Fractionen (Gravex 913).	55
Abbildung 15:	ATP-Gehalt der HaCaT-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen MOAH.	56
Abbildung 16:	ATP-Gehalt der HaCaT Zellen nach Inkubation mit verschiedenen MOAH.	57
Abbildung 17:	ATP-Gehalt der HaCaT Zellen nach Inkubation mit verschiedenen MOAH.	58
Abbildung 18:	Bildung von Hydroxynaphthochinon und reaktiven Intermediaten nach UV-Bestrahlung.	59
Abbildung 19:	ATP-Gehalt der HaCaT Zellen nach Inkubation mit verschiedenen MOAH.	59
Abbildung 20:	Beeinflussung der Genexpression des Fremdstoffmetabolismus und der oxidativen Stressantwort in HaCaT Zellen nach Behandlung mit Benzo[a]pyren und künstlichem Sonnenlicht.	61
Abbildung 21:	Schematische Darstellung des AhR-Signalweges zur Induktion von <i>CYP1A1</i> .	62
Abbildung 22:	Schematische Darstellung der Aktivierung von NRF2-Zielgenen durch oxidativen Stress.	63
Abbildung 23:	Regenerierung oxidierte Proteine mittels Thioredoxinkaskade.	64
Abbildung 24:	Beeinflussung der Genexpression apoptotischer Faktoren und Zellzyklusregulatoren in HaCaT Zellen nach Behandlung mit Benzo[a]pyren und künstlichem Sonnenlicht.	67
Abbildung 25:	Beeinflussung der Genexpression von Genen des Fremdstoffmetabolismus in HaCaT Zellen nach Behandlung mit aromatischen Mineralölfractionen und künstlichem Sonnenlicht.	68
Abbildung 26:	Beeinflussung der Expression von Genen des Fremdstoffmetabolismus und der Metallhomöostase in HaCaT Zellen nach Behandlung mit 50 µM und 125 µM Pentylbenzol (Verbindung A), 1,4-Di-n-Butylbenzol (Verbindung B), 1,4-Bis(2-ethylhexyl)benzol (Verbindung C) und 1,4-Bis(3,7-dimethyloctyl)benzol (Verbindung D) und der Bestrahlung mit künstlichem Sonnenlicht.	69
Abbildung 27:	Nachweis von Cytochrom P450 1A1 (<i>CYP1A1</i>) in HaCaT Zellen.	71
Abbildung 28:	Nachweis von Matrix Metalloprotease 1 (<i>MMP1</i>) in HaCaT Zellen.	73
Abbildung 29:	Induktion der Metalloprotease 1 (<i>MMP1</i>) nach Inkubation mit aromatischen Mineralölkohlenwasserstoffen (MOAH).	74
Abbildung 30:	Funktionsprinzip des 2,7-Dichlorofluorescein-Diacetat Assays.	76
Abbildung 31:	Absorptionsspektren von 2,7-Dichlorofluorescein-Diacetat (DCF-DA) nach Bestrahlung mit artifiziellm Sonnenlicht.	77
Abbildung 32:	Relative DCF-Fluoreszenz nach Behandlung mit Benzo[a]pyren B[a]P in Kombination mit der Bestrahlung künstlicher solarer UV-Strahlung.	78

Abbildung 33:	Relative DCF-Fluoreszenz bezogen auf die entsprechende Vehikelkontrollen. _____	79
Abbildung 34:	ATP-Gehalte von HaCaT Zellen nach Inkubation mit Kupfer(II)oxid und Kupfer(II)chlorid. _____	82
Abbildung 35:	ATP-Gehalte von EA.hy926 Zellen nach Inkubation mit Kupfer(II)oxid und Kupfer(II)chlorid. _____	83
Abbildung 36:	Beeinflussung der Genexpression von Genen des Fremdstoffmetabolismus, der Metallhomöostase und der oxidativen Stressantwort nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Kupferchlorid (CuCl_2) und Kupferoxidnanopartikeln (CuO NP) in HaCaT Zellen. _____	85
Abbildung 37:	Aktivierung des Metall-responsiven Transkriptionsfaktors-1 (MTF-1) durch Kupfer. _____	86
Abbildung 38:	Beeinflussung der Genexpression verschiedener Transkriptionsfaktoren und Gene der DNA-Schadensreparatur und DNA-Schadensantwort nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Kupferchlorid (CuCl_2) und Kupferoxidnanopartikeln (CuO NP) in HaCaT Zellen. _____	87
Abbildung 39:	Beeinflussung der Genexpression des Fremdstoffmetabolismus, der Metallhomöostase, der oxidativen Stressantwort sowie der DNA-Schadensantwort nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Kupferchlorid (CuCl_2) und Kupferoxidnanopartikeln (CuO NP) in EA.hy926 Zellen. _	90
Abbildung 40:	Aufbau der Nukleosomen. _____	92
Abbildung 41:	Grad der DNA-Kondensation an Nukleosome in Abhängigkeit der Histonmodifikationen. _____	93
Abbildung 42:	Zelluläre Aufnahme von Kupfer nach Behandlung mit Kupfer(II)oxid (CuO) und Kupfer(II)chlorid (CuCl_2). _____	95
Abbildung 43:	Zelluläre Aufnahme von Kupfer in Abhängigkeit der Endozytoseinhibitoren Hydroxydynamore (OH-Dyn) und Monodansylcadaverin (MDC). _____	97
Abbildung 44:	Relative DCF-Fluoreszenz bezogen auf die unbehandelte Vehikelkontrollen. _____	99
Abbildung 45:	Relative DCF-Fluoreszenz bezogen auf die unbehandelte Vehikelkontrollen. _____	99
Abbildung 46:	Prozentuale Partikelgrößenverteilung der verwendeten Chrom(III)-Oxid-Partikel. _	103
Abbildung 47:	Logarithmische Darstellung der ATP-Gehalte von HaCaT Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Chrom(III)-Oxid (Cr_2O_3), Chrom(III)-Chlorid (CrCl_3) und Kaliumdichromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). _____	104
Abbildung 48:	Intrazelluläre Reduktion von Chrom(VI) zu Chrom(III). _____	105
Abbildung 49:	Kolorimetrischer Nachweis der prozentualen Chrom(VI)-Anteile in Chrom(III)-Oxid-Partikeln. _____	106
Abbildung 50:	Spektren der Röntgenphotoelektronenspektroskopie von Chrom(III)-Oxid-Partikeln der Hersteller NanoAmor, Sigma Aldrich und Lanxess. _____	108
Abbildung 51:	Beeinflussung der Genexpression von Genen des Fremdstoffmetabolismus und der oxidativen Stressantwort nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Chromoxid-Partikeln der Hersteller Sigma Aldrich, Lanxess	

	und NanoAmor sowie den löslichen Chrom(VI)- und Chrom(III)-Verbindungen Kaliumdichromat und Chromchlorid in humanen Keratinozyten. _____	110
Abbildung 52:	Beeinflussung der Genexpression von Genen apoptotischer Faktoren und Zellzyklusregulatoren nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Chromoxid-Partikeln der Hersteller Sigma Aldrich, Lanxess und NanoAmor sowie den löslichen Chrom(VI)- und Chrom(III)-Verbindungen Kaliumdichromat und Chromchlorid in humanen Keratinozyten. _____	111
Abbildung 53:	Beeinflussung der Genexpression von DNA-Schadensantwort- und DNA-Reparaturgenen (Teil 1) nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Chromoxid-Partikeln der Hersteller Sigma Aldrich, Lanxess und NanoAmor sowie den löslichen Chrom(VI)- und Chrom(III)-Verbindungen Kaliumdichromat und Chromchlorid in humanen Keratinozyten. _____	113
Abbildung 54:	Beeinflussung der Genexpression von DNA-Schadensantwort- und DNA-Reparaturgenen (Teil 2) nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Chromoxid-Partikeln der Hersteller Sigma Aldrich, Lanxess und NanoAmor sowie den löslichen Chrom(VI)- und Chrom(III)-Verbindungen Kaliumdichromat und Chromchlorid in humanen Keratinozyten. _____	114
Abbildung 55:	Relative DCF-Fluoreszenz bezogen auf die unbehandelte Vehikelkontrollen (horizontale Linie)._____	116
Abbildung 56:	Transmethylierungen von Cytosin zu 5-Methylcytosin (5-mC). _____	118
Abbildung 57:	Gehalte an 5-Methylcytosin (5-mC) in HaCaT Zellen nach 24-stündiger (blau) und 48-stündiger (grün) Inkubation mit 13,2 µM und 26,4 µM Cr(VI). _____	119
Abbildung 58:	<i>Gene Silencing</i> begünstigt durch die Hypermethylierung von CpG-Inseln in Promotorregionen. _____	122
Abbildung 59:	Potentielle Einflüsse von Chromverbindungen auf Mechanismen der genspezifischen DNA-Hypermethylierung sowie der genomweiten (globalen) Hypomethylierung. _____	123
Abbildung 60:	Unterschiedliche Aufnahmemechanismen von Nanopartikeln in Keratinozyten und Epithelzellen._____	131
Abbildung 61:	Koloniebildungsfähigkeit der HaCaT Zellen nach Inkubation mit Benzo[a]pyren. ____	162
Abbildung 62:	Nach 1 d, 2 d, 12 d und 26 d mittels NMR- Bruker Ascend 400 MHz NMR-Spektrometer aufgenommene Spektren der PCR-Gefäße. _____	164
Abbildung 63:	Lebendzellzahl der EA.hy926 Zellen nach Inkubation mit den Endozytoseinhibitoren Hydroxydynasore (OH-Dyn) und Monodansylcadaverin (MDC). _____	165
Abbildung 64:	Beeinflussung der Expression von Genen des Fremdstoffmetabolismus, der Metallhomöostase und der oxidativen Stressantwort in HaCaT Zellen nach B[a]P-Behandlung. _____	166
Abbildung 65:	Beeinflussung der Expression von Genen der DNA-Schadensantwort und der DNA-Reparatur in HaCaT Zellen nach B[a]P-Behandlung. _____	167
Abbildung 66:	Beeinflussung der Expression von Genen des Fremdstoffmetabolismus, der Metallhomöostase und der oxidativen Stressantwort in HaCaT Zellen nach Behandlung mit Extrakten des naphthenischen Mineralöls Gravex 913. _____	168

- Abbildung 67: Beeinflussung der Expression von Genen der DNA-Schadensantwort und der DNA-Reparatur in HaCaT Zellen nach Behandlung mit Extrakten des naphthenischen Mineralöls Gravex 913. Gezeigt ist die Bestrahlung mit künstlichem Sonnenlicht (UVA 1,18 J/cm², UVB 60 mJ/cm²) _____ 169
- Abbildung 68: Beeinflussung der Expression von Genen des Fremdstoffmetabolismus, der Metallhomöostase und der oxidativen Stressantwort in HaCaT Zellen nach Behandlung mit: _____ 170
- Abbildung 69: Beeinflussung der Genexpression verschiedener Transkriptionsfaktoren und Genen der DNA-Schadensreparatur und DNA-Schadensantwort nach Behandlung mit: _____ 171
- Abbildung 70: Beeinflussung der Genexpression von Genen des Fremdstoffmetabolismus, der Metallhomöostase und der oxidativen Stressantwort nach 24-stündiger Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Kupferchlorid (CuCl₂) und Kupferoxidnanopartikeln (CuO NP) in HaCaT Zellen. _____ 172
- Abbildung 71: Beeinflussung der Genexpression verschiedener Transkriptionsfaktoren und Genen der DNA Schadensreparatur und DNA-Schadensantwort nach 24-stündiger Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Kupferchlorid (CuCl₂) und Kupferoxidnanopartikeln (CuO NP) in HaCaT Zellen. _____ 173
- Abbildung 72: Beeinflussung der Genexpression von Genen des Fremdstoffmetabolismus, der Metallhomöostase und der oxidativen Stressantwort nach 24-stündiger Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Kupferchlorid (CuCl₂) und Kupferoxidnanopartikeln (CuO NP) in EA.hy926 Zellen. _____ 174
- Abbildung 73: Beeinflussung der Genexpression von Genen verschiedener Transkriptionsfaktoren und Genen der DNA Schadensreparatur und DNA-Schadensantwort nach 24-stündiger Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Kupferchlorid (CuCl₂) und Kupferoxidnanopartikeln (CuO NP) in EA.hy926 Zellen. _____ 175
- Abbildung 74: Beeinflussung der Genexpression von Genen des Fremdstoffmetabolismus, der Metallhomöostase und der oxidativen Stressantwort nach 24-stündiger Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Chromoxid (Cr₂O₃), Kaliumdichromat (K₂Cr₂O₇) und Chromchlorid (CrCl₃) in HaCaT Zellen. _____ 176
- Abbildung 75: Beeinflussung der Genexpression von apoptotischen Faktoren und Genen der Zellzyklusregulation nach 24-stündiger Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Chromoxid (Cr₂O₃), Kaliumdichromat (K₂Cr₂O₇) und Chromchlorid (CrCl₃) in HaCaT Zellen. _____ 177
- Abbildung 76: Beeinflussung der Genexpression von Genen der DNA-Schadensantwort und DNA-Reparatur nach 24-stündiger Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Chromoxid (Cr₂O₃), Kaliumdichromat (K₂Cr₂O₇) und Chromchlorid (CrCl₃) in HaCaT Zellen. _____ 178

8.12 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Auswahl an Mineralölkohlenwasserstoffen, die in gesättigte (<i>mineral oil saturated hydrocarbons, MOSH</i>) und ungesättigte/aromatische (<i>mineral oil aromatic hydrocarbons, MOAH</i>) Kohlenwasserstoffe unterteilt sind. _____	9
Tabelle 2:	Liste der eingesetzten Mineralölkohlenwasserstoffe. _____	31
Tabelle 3:	Dosisangaben von partikulären und löslichen Kupferverbindungen. _____	33
Tabelle 4:	Dosisangaben von partikulären und löslichen Chrom(III)-Verbindungen. _____	33
Tabelle 5:	Dosisangaben von partikulären und löslichen Chrom(VI)-Verbindungen. _____	34
Tabelle 6:	Temperaturprogramm der Kupferbestimmung mittels Graphitrohr AAS. _____	36
Tabelle 7:	Eingesetzte Inkubations- und Vorkonditionierungsparameter der Endozytoseinhibitoren. _____	37
Tabelle 8:	Temperaturprogramm cDNA-Synthese _____	41
Tabelle 9:	Reaktionsansatz <i>Pooled Primer Mix</i> _____	42
Tabelle 10:	Temperaturprogramm der Präamplifikation _____	42
Tabelle 11:	Temperaturprogramm Exonuklease I Verdau _____	42
Tabelle 12:	Temperaturprogramme qPCR und Schmelzkurvenanalyse _____	44
Tabelle 13:	Parameter zur Messung der dynamischen Lichtstreuung. _____	80
Tabelle 14:	Hydrodynamischer Radius von CuO NP in Wasser, DMEM (10 % FKS) und DMEM-HG (10 % FKS). _____	81
Tabelle 15:	Polydispersitätsindex (PDI) von CuO NP in Wasser, DMEM (10% FKS) und DMEM-HG (10 % FKS). _____	81
Tabelle 16:	Hydrodynamischer Radius von Cr ₂ O ₃ Partikeln in DMEM (10 % FKS) und DMEM-HG (10 % FKS). _____	102
Tabelle 17:	Dispersität von Cr ₂ O ₃ Partikeln in DMEM (10 % FKS) und DMEM-HG (10 % FKS). _____	102
Tabelle 18:	Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) _____	152
Tabelle 19:	Artifizielle lysosomale Flüssigkeit (ALF) _____	152
Tabelle 20:	Zellysepuffer _____	153
Tabelle 21:	Trenngel (10 %) _____	153
Tabelle 22:	Sammelgel (4 %) _____	153
Tabelle 23:	Laufpuffer (10x) _____	153
Tabelle 24:	Transferpuffer _____	154
Tabelle 25:	Ladepuffer (4x) _____	154
Tabelle 26:	Radioimmunpräzipitationsassay-Puffer (RIPA) _____	154
Tabelle 27:	Übersicht über die untersuchten Gene und deren codierte Proteine. _____	158
Tabelle 28:	Hydrodynamischer Radius von Kupferoxid-Nanopartikel. _____	161

Tabelle 29:	Löslichkeit von Kupferoxidnanopartikeln nach 24 h in DMEM. _____	161
Tabelle 30:	Parameter zur Aufnahme der ^1H -NMR-Spektren in CDCl_3 _____	163
Tabelle 31:	Parameter zur Aufnahme der ^1H -NMR-Spektren in Cyclohexan/Aceton- d_6 _____	163

9 PUBLIKATIONSLISTE

Publikationen in Fachzeitschriften

Weber, Sandra; Schmidt, Tamina; **Schumacher, Paul**; Kuballa, Thomas; Mildau, Gerd; Walch, Stephan G.; Hartwig, Andrea; Lachenmeier, Dirk W. (2019):
„Quantification of mineral oil aromatic hydrocarbon (MOAH) in anhydrous cosmetics using ¹H-NMR.“
Hindawi Journal of Chemistry, Volume 2019, Article ID 1680269.

Publikationen in Vorbereitung

Schumacher, Paul; Weber, Sandra, Kuballa, Thomas; Mildau, Gerd; Walch, Stephan G.; Hartwig, Andrea
„Assessment of various toxicological endpoints using IP346-based extracts of mineral oil aromatic hydrocarbon (MOAH) on an in-vitro skin modell“

Schumacher, Paul; Fischer, Franziska; Walter, Dirk; Hartwig, Andrea
„Effects of different chromium(III) oxide particles on human keratinocytes“

Schumacher, Paul; Lichter, Jutta; Hertz, Kaja; Neuberger, Ronja; Blömeke, Brunhilde; Hartwig, Andrea
„Copper oxide nanoparticles and their sensitizing potential in a coculture system composed of THP-1 cells and human keratinocytes“

Schumacher, Paul, Kuntz, Marcel; Xu, Yanfang; Weber, Sandra; Kuballa, Thomas; Mildau, Gerd; Walch, Stephan G.; Hartwig, Andrea
„Evaluation of phototoxic effects in human keratinocytes caused by different mineral oil aromatic hydrocarbons (MOAH) using high throughput RT-qPCR“

Vorträge auf Fachtagungen

Schumacher, Paul; Kuntz, Marcel; Weber, Sandra; Paulick, Renate; Mildau, Gerd, Kuballa, Thomas; Hartwig, Andrea

„*Toxikologische Studien von MOAH aus Fraktionen kosmetisch relevanter Mineralöl-Rohstoffe*“,

Seminar der DGF (Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft e.V.):

Mineralölbestandteile in Lebensmitteln und Kosmetika, 26.-27.03.2019, Berlin

Schumacher, Paul; Kuntz, Marcel; Weber, Sandra; Paulick, Renate; Mildau, Gerd, Kuballa, Thomas; Hartwig, Andrea

„*Toxikologische Studien von MOAH aus Fraktionen von Mineralöl-Rohstoffen für Kosmetika*“,

Karlsruher Kosmetiktage 2019, Sicherheit kosmetischer Mittel, 26.-27.03.2019, Karlsruhe

Posterbeiträge auf Fachtagungen

Schumacher, Paul; Kuntz, Marcel; Weber, Sandra; Mildau, Gerd, Kuballa, Thomas; Hartwig, Andrea

„*Untersuchung phototoxischer Effekte von MOAH in Keratinozyten*“,

48. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 16.-18. September 2019, Dresden (DE)

Schumacher, Paul; Kuntz, Marcel; Weber, Sandra; Mildau, Gerd, Kuballa, Thomas; Hartwig, Andrea

„*Toxikologische Untersuchungen von MOAH - Update*“,

Regionalverbandstagung Südwest, Arbeitstagung 2019, 05.-06. März 2019, Hohenheim (DE)

Schumacher, Paul; Neuberger, Ronja; Lichter, Jutta; Blömeke, Brunhilde; Hartwig, Andrea

„*Gene expression profiling of soluble copper and copper oxide nanoparticles in skin cells*“

DNA-Repair 2018 – 15th Biennial Meeting of the DGDR, 9.-12. September 2018, Karlsruhe (DE)

Schumacher, Paul; Kuntz, Marcel; Weber, Sandra; Mildau, Gerd, Kuballa, Thomas; Hartwig, Andrea

„*Toxikologische Untersuchungen von MOAH*“,

47. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 17.-19. September 2018, Berlin (DE)

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich ganz persönlich bei Menschen bedanken, die mir auf unterschiedliche Art und Weise in den letzten vier Jahren unterstützend zur Seite standen und mich begleitet haben.

Allem voran danke ich meiner Doktormutter Prof. Dr. Andrea Hartwig für die freundliche Aufnahme in ihren Arbeitskreis, das spannende Promotionsthema, den großzügigen wissenschaftlichen Freiraum sowie die immer offenstehende Tür. Vielen Dank für Dein Vertrauen der letzten vier Jahre und für die bevorstehende Postdoc Zeit in Karlsruhe!

Ein besonderer Dank gilt außerdem den Trierer Kolleginnen und Kollegen um Frau Prof. Dr. Brunhilde Blömeke und Frau Dr. Jutta Lichter, die mir während meiner Promotion bei Fragen, rund um das Thema Haut, jederzeit Rede und Antwort standen und mir die Trier-Besuche stets äußerst abwechslungsreich und spannend gestaltet haben.

Auch möchte ich mich bei den Projektpartnerinnen und Partnern am CVUA Karlsruhe für die tolle Zusammenarbeit bedanken. Herrn Dr. Gerd Mildau danke ich für die Heranführung in die Welt der Kosmetik und das entgegengebrachte Vertrauen bei den Karlsruher Kosmetiktage. Herrn Prof. Dr. Thomas Kuballa danke ich für das „Möglichmachen“ von vielen kleinen Projekten und Messungen, die auch nach Abschluss des MOSH/MOAH-Vorhabens anstanden sowie für die Übernahme des Korreferenten-Amtes.

Weiterhin gilt mein Dank den lieben Menschen vor Ort am CVUA, die mir trotz des aufwartenden Tagesgeschäftes stets Zeit eingeräumt haben, um Fragestellungen zu klären und Analysen zu realisieren. Stellvertretend zu erwähnen sind hierbei Frau Straub, Herr Cammann und Herr Geisser.

Das MOSH/MOAH-Projekt wäre vermutlich nie so reibungslos verlaufen, wenn nicht eine gewisse Frau Dr. Sandra Weber als Projektleiterin ihre tatkräftige Unterstützung angeboten hätte. Es hat mir eine Menge Spaß gemacht, liebe Sandra, mit Dir zu forschen, Studenten*innen zu betreuen und auf diverse Veranstaltungen zu fahren, um gemeinsame Ergebnisse vorzutragen.

Ein besonderer Dank gilt an dieser Stelle auch meinen ehemaligen Master- und Diplomstudierenden, die mich im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeiten tatkräftig unterstützt haben. Ich denke es ist durchaus erwähnenswert, dass aus den Arbeiten eine Vielzahl interessanter Erkenntnisse hervorgingen, die zum Teil auch hier Erwähnung fanden. Danke Ronja, Yvonne, Marcel, Franziska, Duc Bao und Yanfang. Ein weiteres großes Dankeschön gebührt natürlich auch den beiden Masterandinnen des CVUA Tamina und Renate, die im Rahmen des MOSH/MOAH-Projektes tätig waren.

Außerdem möchte ich dem ganzen AK Hartwig für die tolle Zusammenarbeit und die vielen unvergesslichen Momente an und abseits der Universität danken. Das betrifft sowohl die aktuelle Riege Alexandra, Franziska, Johanna, Ronja, Martin, Tatjana, Sandra als auch die ehemaligen Kolleginnen Barbara, Betty, Doro, Nadin, Rebecca und Sarah. Allen Angehörigen des Arbeitskreises von Herrn Prof. Dr. Mirko Bunzel möchte ich für den herzlichen Umgang und die Kollegialität danken. Auch hier betrifft dies die aktuellen und ehemaligen Vertreter*innen des EGs und OGs: Caro, Julia, Jan S., Daniela, Beate, Hendrik, Martin, Andi und Daniel sowie die Bewohner des IAB Nordpols Antje und Flo. Auch dem AK Scherf soll an dieser Stelle mein Dank ausgesprochen werden; schließlich hat die Umsetzung der *Tour de Chambre* auf Antrieb bestens geklappt.

Ein besonderer Dank gilt meinem ehemaligen Bürokollegen und Freund Felix, mit dem sich das erste Jahr äußerst lehrreich und spannend gestaltete und der mich in die Welt des urbanen Campings einführen durfte. Meiner lieben Lea, die mit mir beinahe drei Jahre die Plätze am „Lagerfeuer“ warmgehalten hat,

danke ich für ihr immer offenes Ohr, den Saarländisch-Grundkurs und die wichtigen Gespräche über die Lichtstreuung des Abendrotes, welches wir nahezu täglich aus dem Bürofenster zu sehen bekamen.

Hervorzugeben sind weiterhin die treuen Anhängerinnen und Anhänger diverser Vespergruppen-Konstellationen: Vivi, Wera, Jan, Antje, Sabine, Lea und Tizi, die es selbst unter den widrigsten Bedingungen einer vorherrschenden Pandemie geschafft haben, die Pausen sowohl kulinarisch attraktiv als auch horizontweiternd zu gestalten.

Ein weiteres großes Dankeschön gebührt weiterhin Sonya Schlander und Doris Honig, die mir stets mit ihrer Hilfsbereitschaft zur Seite standen und mir über aufkommende organisatorische, bürokratische sowie technische Hürden geholfen haben.

Frau PD Dr. Beate Köberle danke ich für die kritische Durchsicht meines Manuskriptes und ihren wertvollen Ratschlägen. Die netten Gespräche von Weltpolitik bis hin zum Weinbau in Baden-Württemberg möchte ich definitiv nicht missen. Mein nächster Gruß geht an Dr. Johanna Ebmeyer in den hohen Norden: Vielen Dank auch an dieser Stelle für die hilfreichen Korrekturen und Anmerkungen sowie deinen Blick von außen auf das Ganze.

Bei meinem Freund des gepflegten Rasensportes Matze, welcher ein würdiger Träger der Kapitänsbinde sowohl bei den Corner-Kumpels als auch am BioMark™ darstellt, möchte ich mich für die vergangenen acht Jahre Freundschaft und Kollegialität auf dem Rasen und im Labor bedanken.

Neben den wichtigen Gesprächen, deinem Verständnis, deinen Ratschlägen sowie der Stockwerk-übergreifenden Versorgung mit Koffein, danke ich dir, liebe Tizi, für deine aufopfernden Bemühungen das hier geschriebene in das richtige Format zu prügeln und deine Nachsicht, wenn ich auch einmal etwas anders machen wollte.

Meinen beiden Studienfreunden Alex und Lukas möchte ich an dieser Stelle für ihre Anteilnahme sowohl wissenschaftlicher als auch privater Natur herzlichst danken. Ihr habt gerade in der Schlussphase des letzten Jahres nochmals maßgeblich zum Gelingen beigetragen. Mareike und Flo möchte ich danken, dass sie mir mit ihrer freien Couch in München, trotz Beherbergungsverboten und dergleichen, stets ein erstaunlich hohes Maß an Urlaubsgefühlen verschafft haben.

Allen lieb gewonnenen Menschen, die mit mir das Studium der Lebensmittelchemie und die Zeit in Karlsruhe so unvergesslich gemacht haben, möchte ich ebenfalls danken. Die unzähligen tollen Abende, die aufregenden Urlaube und spannenden Erfahrungen werden mir für immer in Erinnerung bleiben. Meinem Freund Max und der lieben Judith danke ich für den Rückhalt aus dem heimischen Berghausen.

Ein besonderer Dank gilt meinem langjährigen Freund Anton Huber und der wunderbaren Tonja Čuić, die mich in den letzten Jahren auch in schwierigen Phasen stets unterstützt haben und die dafür sorgen, dass die Lachnerstraße noch immer ein Zuhause ist. Den Jungs von der Pui-Tour sei gesagt: „*War eh kei Tour-eh ned!*“

Zuletzt gilt der Dank den weltbesten Geschwistern Tamy und Till, ihren Partnern David und Charlotte sowie meinen Eltern, die mich von Kindesbeinen an zu einem neugierigen, interessierten, offenen und wissbegierigen Menschen geformt haben. Jeder von euch hat mich, auf seine ganz besondere Art und Weise, nicht nur in den letzten Jahren, unterstützend begleitet. Danke für eure motivierende Art, die Zuversicht und euren Rückhalt.

