

Untersuchung der Toxizität von Carbonfaser- und Quarzstäuben durch Exposition über ein *air-liquid interface*

Zur Erlangung des Akademischen Grades einer

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

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

DISSERTATION

von
Alexandra Friesen
aus
Sankt Petersburg

1. Referentin: Prof. Dr. Andrea Hartwig
 2. Referent: PD Dr. Carsten Weiss
- Tag der mündlichen Prüfung: 22.07.2022

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 31.05.2022

Alexandra Friesen

*Deep in the human unconscious is a pervasive need for a logical universe that makes sense.
But the real universe is always one step beyond logic.*
- Muad-dib

INHALTSVERZEICHNIS

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	7
2.1	Inhalatorische Toxizität von Partikel- und Faserstäuben	7
2.1.1	Kristalliner α -Quarz	8
2.1.2	Carbonfasern und andere biobeständige Materialien	9
2.1.3	Mechanismen der inhalatorischen Toxizität	13
2.2	Modelle zur Untersuchung lungentoxischer Materialien	18
2.2.1	<i>Air-liquid interface</i> -Exposition von Lungenzellmodellen	21
3	Fragestellung	23
4	Material und Methoden	25
4.1	Material	25
4.2	Methoden	25
4.2.1	Materialcharakterisierung und -vorbereitung	25
4.2.1.1	Testsubstanzen: Min-U-Sil5 und Carbonfasern	25
4.2.1.2	Quarz-Partikelvorbereitung mittels NANOGENOTOX-Protokoll	26
4.2.1.3	Bestimmung der Größenverteilung durch Dynamische Licht- streuung	26
4.2.1.4	Transmissionselektronenmikroskopie	26
4.2.2	Zellkulturexperimente	27
4.2.2.1	Zellkultur: A549	27
4.2.2.2	Zellkultur: BEAS-2B	28
4.2.2.3	Zellkultur: THP-1	28
4.2.2.4	Zellkultur: CCD-33Lu	29
4.2.2.5	Kryokonservierung und Inkulturnahme	29
4.2.2.6	Exposition mit Min-U-Sil5 an der Vitrocell® <i>Cloud</i>	30
4.2.2.7	Submerse Exposition mit Min-U-Sil5	32
4.2.2.8	Exposition an der Vitrocell® Automated Exposure Station	32
4.2.3	Zytotoxizitätsstudien	35
4.2.3.1	Zellzahlbestimmung	35
4.2.3.2	Lactatdehydrogenase-Assay (LDH)	35
4.2.4	Genexpressionsanalysen	36
4.2.5	Zytokinfreisetzung durch <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>	40
4.2.6	Ermittlung von DNA-Strangbrüchen durch Alkalische Entwindung	40
4.2.7	Statistische Auswertung	42
5	Ergebnisse und Diskussion	43
5.1	Vergleich unterschiedlicher Lungenzellmodelle in Hinblick auf die Toxizität von α -Quarz	44
5.1.1	Physikochemische Charakterisierung der Testsubstanz Min-U-Sil5	45

5.1.2	Betrachtung der Zytotoxizität nach Exposition gegenüber Quarz . . .	46
5.1.3	Genexpressionsprofile nach Exposition gegenüber Quarz	48
5.1.3.1	Konzentrationsabhängige Genexpressionsprofile	48
5.1.3.2	Zeitabhängige Genexpressionsprofile	55
5.1.4	Zytokinfreisetzung nach Exposition gegenüber Quarz	57
5.1.5	Bildung von DNA-Schäden nach ALI-Exposition gegenüber Quarz . .	59
5.2	Untersuchung der Toxizität von aufgearbeiteten Carbonfasern an einem <i>air-liquid interface</i>	62
5.2.1	Physikochemische Charakterisierung der Carbonfasern	63
5.2.2	Betrachtung der Zytotoxizität nach Exposition gegenüber aufgearbei- teten Carbonfasern	64
5.2.3	Genexpressionsprofile nach Exposition gegenüber Carbonfasern . . .	67
5.2.4	Zytokinfreisetzung nach Exposition gegenüber Carbonfasern	77
5.2.5	Induktion von DNA-Strangbrüchen nach Exposition gegenüber Car- bonfasern	79
5.2.6	Exposition einer Triplekultur gegenüber mechanisch vorbehandelten Carbonfasern	82
5.2.6.1	Betrachtung der Zytotoxizität	82
5.2.6.2	Genexpressionsprofile	83
5.2.6.3	Zytokinfreisetzung	86
5.2.6.4	Bildung von DNA-Strangbrüchen	87
5.2.6.5	Eignung des Modells zur Verwendung im Rahmen von ALI- Expositionen	89
6	Zusammenfassende Diskussion	91
6.1	Vergleich verschiedener Zellkulturmodelle und Expositionsarten am Beispiel α -Quarz	92
6.2	Toxizität von Carbonfasern nach mechanischer und thermisch-mechanischer Behandlung	97
6.3	Schlussfolgerung	103
7	Literaturverzeichnis	105
A	Chemikalien und Instrumente	123
A.1	Chemikalien	123
A.2	Puffer und Lösungen	124
A.3	Kits	125
A.4	Instrumente und Software	125
A.5	Verbrauchsmaterialien	128
B	Ergänzende Daten	131
B.1	Differenzierung von THP-1-Zellen	131
B.2	Genliste der HT RT-qPCR	131
B.3	Detaillierte Ergebnisse der Genexpressionsanalysen	133
B.3.1	Genexpressionsanalysen nach Quarz-Exposition	133
B.3.2	Genexpressionsanalysen nach Carbonfaser-Exposition	135
C	Publikationsliste	141

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ALI	<i>Air-liquid interface</i>
AP-1	Aktivator-Protein 1
AU	Alkalische Entwindung
BSA	Bovines Serumalbumin
CAC	<i>Clean air control</i> (Reinluftkontrolle)
CB	<i>Carbon Black</i>
CF	Carbonfasern
CFK	Carbonfaser-verstärkte Kunststoffe
CNT	<i>Carbon nanotubes</i>
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinases</i>
dTHP-1	Differenzierte THP-1-Zellen
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FKS	Fetales Kälberserum
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HG	<i>High glucose</i>
HM	<i>High modulus</i> (Hohe Steifigkeit)
HT RT-qPCR	<i>High throughput</i> RT-qPCR
IK	Inkubatorkontrolle
IL	Interleukin
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
KGM	<i>Keratinocyte Growth Medium</i>
LDH	Lactatdehydrogenase
MAPK	<i>Mitogen activated protein-Kinase</i>
MWCNT	<i>Multi-walled CNT</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NLRP3	<i>NLR family pyrin domain containing 3-Inflammasom</i>

NM	Nanomaterialien
NP	Nanopartikel
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDI	Polydispersitätsindex
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
QCM	Quarzkristall-Mikrowaage
qPCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RCC	<i>Relative cell count</i>
RPMI(-1640)	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640 (Medium)</i>
ROS	Reaktive Sauerstoff-Spezies
RT	Reverse Transkriptase
SD	Standardabweichung
SOD	Superoxiddismutase
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor

KAPITEL 1

ZUSAMMENFASSUNG

In den letzten Jahrzehnten kam es zu einer zunehmenden industriellen Entwicklung und Verwendung von Nano- und Mikropartikeln sowie faserförmigen Materialien, die insbesondere bei Inhalation zur Ausbildung besorgniserregender Lungenpathologien wie Inflammationen, Fibrosen und Lungenkrebs führen können. Dieses Risiko in Hinblick auf die Exposition von Arbeitskräften und Konsumenten erfordert eine umfassende Charakterisierung der Materialien in Hinblick auf deren Materialeigenschaften und Toxikologie. Im Rahmen der toxikologischen Untersuchungen wird angestrebt, die Verwendung von *in-vivo*-Experimenten möglichst zu reduzieren und alternative Methoden im *in-vitro*-Bereich zu entwickeln, die eine möglichst realistische Nachstellung der physiologischen Antwort liefern. Aus diesem Grund kommen vermehrt Zellkulturmodelle an der Luft-Flüssigkeitsgrenzschicht (engl. *air-liquid interface*: ALI) zum Einsatz, bei denen Lungenepithelzellen auf einer porösen Membran kultiviert werden, sodass sie apikal gegenüber der Umgebungsluft und Aerosolen ausgesetzt werden können. In einer Weiterentwicklung der ALI-Modelle können unterschiedliche Zellarten der Lunge zur Nachstellung der Kommunikation zwischen Lungenzellen integriert werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde ein Vergleich unterschiedlicher Zellkulturmodelle mithilfe des bereits detailliert erforschten Quarzes Min-U-Sil5 durchgeführt. Hierzu wurde die Alveolarepithelzelllinie A549 im Rahmen einer klassischen Kultivierung submers sowie an einem ALI in der Vitrocell® *Cloud* gegenüber Quarzpartikeln exponiert. Zusätzlich wurden Cokulturen aus A549-Zellen und Makrophagen-ähnlichen dTHP-1-Zellen aufgebaut, die ebenfalls submers und am ALI mit Quarzpartikeln behandelt wurden. Für ein vertieftes Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen wurde zusätzlich eine submerser dTHP-1-Monokultur mitgeführt. Die fünf Modelle wurden hinsichtlich einer Zytotoxizität, Änderungen der Genexpression, Inflammation und Genotoxizität nach Quarzexposition untersucht. Es wurde festgestellt, dass die submersen Modelle empfindlicher gegenüber Quarzpartikeln reagierten als die ALI-Modelle, sowohl im Falle der A549-Mono- als auch im Falle der A549/dTHP-1-Cokultur. Dies wurde durch eine verstärkte Zytotoxizität und eine höhere Inflammationsantwort auf Ebene der Genexpression und Zytokinfreisetzung ersichtlich. Dieser Effekt konnte mutmaßlich auf Unterschiede in der Partikelvorbereitung sowie die Ausbildung von protektivem *Surfactant* durch A549-Zellen zurückgeführt werden. Die Integration von dTHP-1-Zellen als Teil der Cokultur führte zu einer Verstärkung der inflammatorischen Antwort und zu einer Zytokinfreisetzung, die höher als die kom-

binierten Effekte der jeweiligen Monokulturen war. Dies spricht für eine erfolgreiche Kommunikation zwischen Epithelzellen und Makrophagen. Als zugrunde liegende toxikologische Mechanismen wurden die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und des NLRP3-Inflammasoms postuliert, welche für die umfassende inflammatorische Antwort zuständig sind und mutmaßlich durch Endozytose der Partikel und nachfolgende Bildung von ROS an der Partikeloberfläche induziert wurden. Eine zeitaufgelöste Betrachtung hob die Bedeutsamkeit hervor, eine Zeitabhängigkeit zellulärer Antworten zu berücksichtigen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden Carbonfasern (CF) als innovatives und in der Industrie relevantes Material mithilfe von ALI-Modellen unter Verwendung der gleichen toxikologischen Endpunkte untersucht. Hierbei wurden die CF nicht in ihrer nativen Form untersucht, sondern zuvor einer mechanischen Behandlung bzw. einer thermisch-mechanischen Behandlung unterzogen. Dies sollte mechanischen und thermischen Stress replizieren, dem CF im Laufe ihres Lebenszyklus ausgesetzt sind. Für die Experimente mit CF kamen Zellkulturmodelle auf Basis der Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B zum Einsatz: es wurden BEAS-2B-Monokulturen, BEAS-2B/dTHP-1-Cokulturen und Triplekulturen durch Zusatz der Fibroblastenzelllinie CCD-33Lu verwendet. Die Exposition fand in der Vitrocell® *Automated Exposure Station* statt. Der Fokus lag auf der zeitabhängigen Betrachtung der CF-Toxizität, sodass Expositionen lediglich mit einer Dosis durchgeführt, jedoch variierende Nachinkubationszeiträume von 0, 3 oder 23 h angeschlossen wurden. Während mechanisch behandelte CF keine Zytotoxizität auslösten, kam es bei Exposition gegenüber thermisch-mechanisch behandelten CF zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl bei gleich bleibender LDH-Freisetzung. Da im Verlauf der Experimente eine starke Agglomeration der thermisch-mechanisch behandelten CF beobachtet worden war, wurde vermutet, dass ein Teil der Zellen durch Adhärenz an die CF-Agglomerate verloren ging, ohne dass Membranschäden entstanden und eine LDH-Freisetzung erfolge. Dieser Effekt hatte zusätzliche Auswirkungen auf andere Endpunkte. Beispielsweise kam es in der Cokultur zu einer Repression der für Makrophagen spezifischen Gene *TNF-A* und *CCL22*, was für einen primären Verlust der dTHP-1-Zellen durch eine potenzielle Bindung dieser Zellen an Faseragglomerate spricht. Daneben wurden sowohl in der Mono- als auch in der Cokultur diverse Gene der Inflammation und Apoptose verstärkt exprimiert, während die Exposition gegenüber mechanisch behandelten CF nur zu Änderungen in einzelnen Genen dieser Cluster führte. In vergleichbarer Weise wurde für die thermisch-mechanisch behandelten CF eine höhere Zytokinfreisetzung detektiert. Die beobachteten Effekte wiesen erneut auf die Bedeutung von NF- κ B und des Inflammasoms hin, sowie auf eine Beteiligung diverser Bestandteile der MAPK-Signalkaskade, die für eine Regulation des Zellzyklus, der Apoptose und Proliferation der Zellen zuständig ist. Eine Genotoxizität konnte nicht eindeutig bestätigt werden, da nur eine schwache Induktion von DNA-Strangbrüchen durch mechanisch behandelte CF ermittelt werden konnte und lediglich einzelne Gene des Clusters "DNA-Schadensantwort" induziert wurden. Die Triplekultur erwies sich durch widersprüchliche Ergebnisse in den Genexpressionsanalysen und Schwierigkeiten bei der Anwendung als instabil, zeigte jedoch durch eine außergewöhnlich hohe Zytokinfreisetzung und die Induktion einer sekundären Genotoxizität Potential für eine zukünftige Anwendung.

Es kann zusammengefasst werden, dass es sich bei ALI-Zellkulturmodellen um ein nützliches Werkzeug für die Weiterentwicklung der Partikel- und Fasertoxikologie handelt. Es handelt sich bei dem ersten Teil der Arbeit um einen systematischen Vergleich verschiedener *in-vitro*-Modelle in Hinblick auf Mechanismen der Quarztoxizität. Die Expositionen zeigten, dass toxikologische Effekte durch Verwendung submerser Kulturen potenziell überschätzt und durch die alleinige Verwendung von Monokulturen unterschätzt werden können. Die Verwendung von Cokulturen mit Makrophagen-ähnlichen Zellen erwies sich als besonders gut geeignet für eine Betrachtung inflammatorischer Prozesse. Der zweite Teil dieser Arbeit stellt die erste umfassende toxikologische Charakterisierung von CF in komplexeren *in-vitro*-Systemen dar. Aus den Ergebnissen wird die toxikologische Relevanz von CF sowie die Abhängigkeit toxikologischer Antworten von der Behandlungsart und Beschaffenheit der resultierenden Strukturen deutlich.

ABSTRACT

The use of nano- and microparticles as well as fibrous materials has been extended by industry in recent years. The inhalation of materials such as nanofibres or nanoparticles is associated with a number of concerning lung pathologies such as inflammation, fibrosis and lung cancer. In order to protect workers and the general population from a potential risk due to an increased use of nanomaterials, a comprehensive characterization regarding the physicochemical properties and toxicology of such materials needs to be conducted. In the course of toxicological investigation there is a growing need to reduce animal testing and to establish alternative *in vitro* methods, which are able to reproduce the physiological responses in the lung as closely as possible. For this purpose, cellular models cultured at an air-liquid interface (ALI) on a porous membrane with the option of exposure to air or aerosols can be employed. These ALI models can be further improved by the incorporation of different types of lung cells to mimic lung physiology and communication between the cells more closely.

Within the first part of this thesis different cell culture models were compared with respect to the toxicity of a well-known substance, the quartz Min-U-Sil5. To this end, the alveolar epithelial cell line A549 was cultured and exposed to quartz particles via a classical submerged approach as well as via Vitrocell® Cloud at an ALI. Additionally, cocultures comprising A549 cells and macrophage-like dTHP-1 cells were established and exposed to quartz particles under submerged and ALI conditions. For a deeper understanding of the underlying mechanisms submerged dTHP-1 monocultures were exposed to quartz particles as well. The five models were evaluated with regard to cytotoxicity, altered gene expression patterns, inflammation and genotoxicity after exposure to the particles. One key observation was the higher sensitivity of submerged cell culture models compared to ALI models for A549 monocultures. This effect was evident due to a higher cytotoxicity and a stronger inflammatory response at the levels of gene expression and cytokine release. These results could be attributed to differences in particle preparation and the production of surfactant by the ALI-cultured A549 cells, which can protect the cells from adverse effects. The integration of dTHP-1 cells as part of the coculture models enhanced the inflammatory response and cytokine release to a degree that was greater than the combined effects from the respective monocultures. This implies communication between epithelial cells and macrophages. Activation of the transcription factor NF- κ B and NLRP3 inflammasome, which are known to trigger a broad inflammatory response, were identified as possible underlying mechanisms following particle uptake via endocytosis and formation of ROS at the particle surface. Furthermore, the time dependency of cellular responses was demonstrated by taking different incubation periods into account.

Within the second part of this thesis the toxicological responses of ALI models were investigated after exposure to carbon fibres (CF), an advanced material of great relevance to various industries. Prior to toxicological testing, the CF were subjected to mechanical or thermo-mechanical treatment, which simulates mechanical and thermal stress that CF are exposed to throughout their life cycle. For experiments with CF, cell culture models were based on the bronchial epithelial cell line BEAS-2B in the form of BEAS-2B monocultures, BEAS-2B/dTHP-1 cocultures and triplecultures with the addition of the fibroblast cell line CCD-33Lu. Exposures took place in the Vitrocell® Automated Exposure Station. The focus was set on a time-dependent investigation of CF toxicity as the cells were exposed to a single dose of CF dusts but underwent varying post-incubation periods of 0, 3 or 23 h. While mechanically treated CF did not induce a cytotoxic response, exposure to thermo-mechanically treated CF resulted in a significant decrease in cell number without a corresponding LDH release. Since thermo-mechanically treated CF exhibited strong agglomeration in the course of the experiments, a share of the cells might presumably be lost through adherence to the agglomerates without subsequent damage to the cellular membranes and a corresponding LDH release. This effect of cell loss due to adhesion to agglomerated material was also apparent in other toxicological responses. Thus, a repression of macrophage-specific genes such as *TNF-A* and *CCL22* was noted in the coculture, suggesting a primary loss of dTHP-1 cells. Moreover, an induction of several genes related to inflammation and apoptosis was observed after exposure to thermo-mechanically treated CF, whereas treatment with mechanically treated CF resulted in the induction of a few individual genes. Accordingly, exposure to thermo-mechanically treated CF resulted in a higher cytokine release. The observed responses indicate the role of NF- κ B and inflammasome activation, as well as the involvement of several components of the MAPK signalling pathways, which are responsible for cell cycle regulation, apoptosis and proliferation of the cells. It is not clear whether CF elicit genotoxicity, as a mild induction of DNA strand breaks was detected after exposure to mechanically treated CF, whereas only single genes from the cluster "DNA damage and repair" were induced. The tripleculture proved to be unstable due to conflicting results in gene expression analysis and general difficulties during handling. Nevertheless, an exceptionally high release of cytokines and the induction of secondary genotoxicity emphasize the potential of tripleculture models for future applications.

In summary, ALI cell culture models are valuable tools to drive particle and fibre toxicology forward in the objective of reducing animal testing. The first part of this thesis represents a systematical comparison between different *in vitro* models with regard to mechanisms of quartz toxicity. The exposure to quartz particles demonstrated that toxicological effects may potentially be overestimated by submerged exposure, but underestimated by the application of single cell lines as monocultures. The use of cocultures with macrophage-like cells proved to be particularly well-suited for the assessment of inflammatory processes. The second part of this thesis represents the first comprehensive toxicological investigation of CF in advanced *in vitro* models. The results reflect the high relevance of assessing CF based dusts as well as the dependence of toxicological responses on pre-treatment and the composition of the resulting fragments.

KAPITEL 2

EINLEITUNG

2.1 Inhalatorische Toxizität von Partikel- und Faserstäuben

Die menschliche Lunge ist kontinuierlich einer Vielzahl unterschiedlichster Substanzen aus der Umwelt ausgesetzt, darunter Gase, Aerosole und partikel- sowie faserhaltige Stäube. Insbesondere kleinste Partikel und Fasern im Mikro- und Nanometerbereich sind bekannt für ihr toxikologisches Potenzial und die Auslösung adverser Effekte nach Inhalation. Die Herkunft einatembare Partikel ist hierbei vielfältig: neben natürlichen Quellen wie Sandstürmen, Vulkanausbrüchen und Waldbränden stellen insbesondere anthropogene Quellen wie Automobilabgase, Zigarettenrauch und Hausstaub potentiell ein hohes toxikologisches Risiko dar. Zusätzlich kommt es zu einem gezielten Einsatz partikel- und faserhaltiger Materialien durch die Industrie, beispielsweise in Kosmetika oder medizinischen Produkten. (Buzea *et al.*, 2007)

Partikel mit einem Durchmesser von maximal 2,5 µm können durch Inhalation auch die Alveolen erreichen und mit den dort befindlichen Zellen interagieren. Ein geringer Anteil dieser Partikel kann darüber hinaus die Epithelschicht passieren und ist damit systemisch verfügbar (Krug & Wick, 2011). Diese Prozesse sind durch direkte Einwirkung auf die Zellen und Architektur der Lunge mit einer Vielzahl verschiedener Pathologien assoziiert, beispielsweise mit Asthma, Bronchitis und Lungenkrebs. Zusätzlich kann es zu systemischen Auswirkungen in Form von kardiovaskulären und neurologischen Erkrankungen kommen (J. Li *et al.*, 2010).

Für die Ausprägung unterschiedlicher Partikel-induzierter adverser Effekte spielen verschiedene Parameter eine Rolle, etwa die Form, Größe, Löslichkeit und chemische Zusammensetzung sowie der Agglomerationszustand der betrachteten Materialien (Buzea *et al.*, 2007). Eine Klassifikation kann anhand der Größe erfolgen: als Nanomaterialien (NM) gelten Materialien, die in mindestens einer Dimension eine Größe zwischen 1 und 100 nm aufweisen. Globuläre Partikel in diesem Größenbereich werden als Nanopartikel (NP) bezeichnet (Singh *et al.*, 2020). Als Fasern werden Materialien bezeichnet, die ein Verhältnis von Länge zu Durchmesser über 3:1 aufweisen. Laut *World Health Organization* (WHO) sind allerdings insbesondere Fasern bedenklich, die zusätzlich die Bedingungen einer minimalen Länge von 5 µm und eines maximalen Durchmessers von 3 µm erfüllen. Diese

Fasern werden aus diesem Grund als WHO-Fasern bezeichnet. Ein Beispiel für WHO-Fasern stellen Asbestfasern dar (WHO *et al.*, 1997). Es kann darüber hinaus zwischen organischen, anorganischen und Carbon-basierten Materialien unterschieden werden (Singh *et al.*, 2020).

2.1.1 Kristalliner α -Quarz

Bei α -Quarz, im folgenden als Quarz bezeichnet, handelt es sich um eine kristalline Form des Siliciumdioxids (SiO_2) mit hoher Reinheit, welche in Hinblick auf natürliches Vorkommen und industrielle Nutzung die bedeutendste Form des Silica darstellt. Mit einem Anteil von 12,6% in der Erdkruste gehört Quarz zu den häufigsten gesteinsbildenden Mineralien (Götze, 2017). Eine erhöhte Exposition gegenüber Quarzstäuben kommt vor allem bei industriellen Prozessen zustande, beispielsweise bei dem Abbau von Silica-haltigem Gestein und bei Verwendung von Sandstrahlern zum Schleifen, Reinigen und Entfärben von Oberflächen oder Textilien (Hoy & Chambers, 2020).

Die inhalatorische Toxizität von Quarz und Entwicklung assoziierter Pathologien ist bereits seit vielen Jahren bekannt (King & Belt, 1938). Neben der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und einer anhaltenden Inflammation durch Freisetzung diverser Zytokine (Donaldson *et al.*, 2001) besitzt Quarz ein hohes genotoxisches Potenzial (Borm *et al.*, 2018). Seit 1997 ist das Material durch die *International Agency for Research on Cancer* (IARC) als humanes Karzinogen der Gruppe 1 klassifiziert (IARC, 1997). Durch Inhalation von Silica-Stäuben kann es darüber hinaus zu einer Silikose kommen, einer potenziell tödlichen Form der Staublung, die unter anderem zur Ausbildung einer Lungenfibrose führen kann (Hoy & Chambers, 2020).

Die Toxizität von kristallinem Quarz wird allgemein auf die reaktiven Silanolgruppen auf der Quarzoberfläche zurückgeführt, die zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beitragen (Pavan *et al.*, 2019). In einer *in-vivo*-Studie wurde die Oberfläche von Quarzpartikeln durch Polyvinylpyridin-N-oxid und Aluminiumlactat maskiert, was zu einer verringerten Zytotoxizität und Inflammation in Mäusen führte (Albrecht *et al.*, 2007). Die gebildeten ROS und direkten Schäden der Lungenzellen führen zur Aktivierung redoxaktiver Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise *Nuclear factor- κ B* (NF- κ B) und Aktivatorprotein-1 (AP-1). Diese induzieren die Transkription diverser Gene, die für inflammatorisch aktive Proteine wie Zytokine und Chemokine kodieren, und dadurch eine umfassende sekretorische Inflammationsantwort. Die anhaltende Entzündung der Lunge durch Quarzexposition kann schließlich auch zur Ausbildung einer Fibrose führen (Castranova, 2004). Die Induktion einer Apoptose durch verstärkte ROS-Produktion nach Quarz-Exposition wurde ebenfalls bereits beschrieben (Fubini & Hubbard, 2003).

Da die Toxizität von Quarzpartikeln bereits gut untersucht ist, werden sie in vielen *in-vitro*-Studien, in denen andere Materialien in Hinblick auf ihre Inhalationstoxizität untersucht werden, als Positivkontrolle herangezogen, insbesondere zur Betrachtung inflammatorischer Veränderungen. Borm und Kollegen fassten beispielsweise in einer Liste 141 Publikationen zusammen, in denen allein das genotoxische Potenzial von α -Quarz untersucht wurde. In einem Großteil davon wurde der Quarz als Positivkontrolle zum

Vergleich mit anderen Substanzen eingesetzt. Die häufigste Verwendung als Positivkontrolle findet Dörentrup Quarz 12 (DQ12) (Borm *et al.*, 2018). In der Literatur finden sich jedoch auch andere Standardmaterialien, wie z.B. der in dieser Arbeit verwendete Quarz Min-U-Sil5 (Fenoglio *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2006; Warheit *et al.*, 2007) oder die Referenzmaterialien SRM 1878a und 1878b des *National Institute of Standards and Technology* (NIST) (Lauvås *et al.*, 2019; Roursgaard *et al.*, 2011). Die verschiedenen Materialien unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Herkunft, Partikelgröße, Kristallinität und Reinheit und sind somit für unterschiedliche Anwendungen geeignet (Verma & Shaw, 2001).

2.1.2 Carbonfasern und andere biobeständige Materialien

Carbonfasern

Carbonfasern stellen ein innovatives Material dar, welches zu 92-100 % aus Kohlenstoff besteht und durch seine außergewöhnlichen Eigenschaften eine kontinuierlich wachsende Verwendung in der Industrie findet. Carbonfasern (CF) und Carbonfaser-verstärkte Polymer-Verbundwerkstoffe (*Carbon fibre reinforced polymer*: CFRP) weisen ein geringes Gewicht bei hoher Belastbarkeit, Zugfestigkeit und Stabilität auf. Dies hebt sie gegenüber anderen Materialien wie Aluminium oder Stahl hervor und liefert ein breites Anwendungsfeld. Für die Herstellung von CFRP werden die Fasern in eine Matrix eingebettet, zumeist ein Epoxidharz, um ein durchgehendes Werkstück zu erhalten. Um die Bindung von CF und Matrix zu verbessern, werden die nativen CF bei der Herstellung mit einem Überzug versehen, einer sogenannten Schlichte, die die Oberflächeneigenschaften der CF verändert (Lengsfeld *et al.*, 2020; Park, 2015). Es wird zumeist zwischen Polyacrylnitril- (PAN) und Pech-basierten Fasern unterschieden. Die Wahl des Ausgangsstoffes hat einen hohen Einfluss auf die physikalischen Eigenschaften der resultierenden Fasern und hergestellten Verbundwerkstoffe sowie auf deren Bruchverhalten (Park, 2015). Aufgrund der zuvor genannten Eigenschaften sind CF und CFRP in diversen Zweigen der Industrie gut geeignet, in der eine Gewichtsreduktion bei gleichbleibender Stabilität des Materials von Interesse ist, etwa in der Automobil-, Luft- und Raumfahrt und Windkraftindustrie. Darüber hinaus weisen manche Arten von CF auffallende elektrische Eigenschaften auf (Forintos & Czigany, 2019).

Native Carbonfasern besitzen einen Durchmesser von 5-10 μm und fallen damit nicht in die Kategorie der inhalierbaren Materialien. Es kann jedoch bei Ausübung von mechanischem oder thermischem Stress auf die Fasern zu Brüchen längs und quer zur Faserachse und dadurch zur Freisetzung inhalierbarer, toxikologisch relevanter Fragmente kommen (J. Wang *et al.*, 2017). Neben der Freisetzung bei Verwendung von CFRP kommt es insbesondere bei Produktion, Entsorgung und Recycling zu einer verstärkten thermischen und mechanischen Belastung durch Prozesse wie Pyrolyse und das Mahlen der Fasern (Zhang *et al.*, 2020). Mithilfe von Simulationen konnte die Deposition von CF verschiedener Abmessungen in Lungenmodellen berechnet werden. Eine Ablagerung von Fasern im Tracheobronchialraum ist vor allem für Fasern mit einer maximalen Länge von 100 μm

wahrscheinlich und erhöht sich durch Verringerung des Faserdurchmessers, etwa durch Oxidation (Inthavong *et al.*, 2013).

Die Toxizität von CF oder CF-Fragmenten bei Inhalation ist bislang wenig untersucht. Es liegen nur wenige Studien vor, von denen die meisten bereits vor mehreren Jahrzehnten durchgeführt wurden. Nach Exposition von Ratten gegenüber Pech-basierten CF mit einem Durchmesser von 1-4 μm und unbekannter Länge konnte eine transiente inflammatorische Antwort festgestellt werden. PAN-Fasern mit einem Durchmesser von 4,4 μm und unbekannter Länge zeigten keine relevanten Veränderungen und gelangten aufgrund ihrer Größe mutmaßlich nicht in die Lunge (Warheit *et al.*, 1994). In einer anderen Studie wurden Ratten gegenüber PAN-Fasern mit einem Durchmesser von 7 μm und einer Länge von 20-60 μm exponiert, was ebenfalls nicht zu einer Entwicklung pathologischer Veränderungen führte. Ein Teil der Fasern wurde von Makrophagen durch Phagozytose aufgenommen (Owen *et al.*, 1986). Mechanisch in einer Hammermühle behandelte PAN-Fasern lösten ebenso keine adversen Effekte nach Inhalation in Meerschweinchen aus. In den generierten CF-Stäuben wurde darüber hinaus ein geringer Faseranteil von 1 % detektiert, der Rest des generierten Staubs nahm die Form von Partikeln an (P. Holt & Horne, 1978). Eine neuere Studie behandelte die toxikologischen Auswirkung nativer und thermisch behandelter CF nach intratrachealer und intraperitonealer Instillation von Mäusen: einzelne Gene, die für Proteine der DNA-Reparatur kodieren, wurden induziert. Nach thermischer Behandlung der Fasern wurden zusätzlich Gene der DNA-Remodellierung verstärkt exprimiert (Moriyama *et al.*, 2019).

Die begrenzte Studienlage in Bezug auf die Toxizität von CF erschwert eine toxikologische Einordnung des Materials. Aufgrund der chemischen Zusammensetzung und der Ähnlichkeit zu anderen Carbon-basierten Materialien kann für die Fasern eine Biobeständigkeit angenommen werden (Jiang *et al.*, 2012). Allgemein sind lange biobeständige Fasern bekannt für ihre hohe toxikologische Relevanz im Kontext der Lungeninflammation, -fibrose und -kanzerogenese, während kurze Fasern leichter durch die Clearance-Mechanismen der Lunge entfernt werden können (Krug & Wick, 2011). Je nach Behandlungsarten und daraus resultierenden Fragmentformen und -größen können CF demnach durchaus eine inhalatorische Toxizität aufweisen.

Im Folgenden wird auf andere faserförmige bzw. Carbon-basierte Materialien eingegangen, die für einen toxikologischen Vergleich mit CF genutzt werden können.

Carbon Nanotubes

Bei Kohlenstoffnanoröhren (*Carbon Nanotubes*: CNTs) handelt es sich um röhrenförmige Gebilde aus Kohlenstoff mit einem Durchmesser im Nanometerbereich und Längen von 100 nm bis 100 μm , wodurch sie als faserförmige NM klassifiziert werden können. CNTs können einwandig vorliegen (*Single-walled CNTs*: SWCNTs) oder aus mehreren zylinderförmig gestapelten Schichten bestehen (*Multi-walled CNTs*: MWCNTs). Je nach Struktur besitzen CNTs außerordentliche mechanische, elektrische und thermische Eigenschaften und können unter anderem in der Nanoelektronik und zur Verstärkung anderer Materialien verwendet werden (Popov, 2004).

Zur Toxizität von CNTs wurde bereits eine Vielzahl von Studien durchgeführt. Es besteht dabei eine starke Abhängigkeit der Toxizität von der Länge der CNTs, deren Form (MWCNTs und SWCNTs), Funktionalisierungen der Oberfläche und integrierten Metallverunreinigungen aus dem Herstellungsprozess (Yuan *et al.*, 2019). Allgemein gelten CNTs als biobeständig. In einer Studie zum Vergleich der Biobeständigkeit verschiedener faserförmiger Materialien in Mäusen wurden CNTs in einem geringeren Maße abgebaut als Asbest- oder Glasfasern, was in einer erhöhten Pathogenität resultierte (Osmond-McLeod *et al.*, 2011). Gleichzeitig wurde bereits ein Abbau von CNTs durch Makrophagen und die Entstehung von CNT-Bruchstücken in deren Lysosomen demonstriert, was eine Veränderung der toxikologischen Eigenschaften zur Folge hatte (Yang & Zhang, 2019).

CNTs zeigen ein hohes inflammatorisches Potenzial. In einer Studie mit MWCNT-exponierten Arbeitskräften konnte nach Exposition eine erhöhte Konzentration der Zytokine Interleukin-4, -6, -8, -10 und Tumornekrosefaktor- α in Sputum und Serum der Testpersonen festgestellt werden (Fatkhutdinova *et al.*, 2016). In einer ähnlichen Studie wurden eine Beeinflussung der Genexpression in Lungen MWCNT-exponierter Arbeitskräfte erfasst. Bei stark exponierten Personen wurden diverse Expressionsänderungen in Genen beobachtet, die an Inflammation und Apoptose beteiligt sind. Darüber hinaus kam es bei diesen Individuen auch zur Bildung von Granulomen und einer verstärkten Expression von Markern für Bronchoalveolarkarzinome, Adenokarzinome und andere Lungentumore (Shvedova *et al.*, 2016). Diese Lungenschäden können, vergleichbar zu anderen Carbon-basierten Nanomaterialien wie Fullerenen, Nanographit und Carbonnanohörnern, auf die Bildung von ROS zurückgeführt werden. Ein weiterer Mechanismus liegt in der lysosomalen Dysfunktion nach Endo- oder Phagozytose der CNTs. Sowohl die Bildung von ROS als auch die lysosomalen Schäden gehen mit einer Induktion von Apoptose, Nekrose und Pyroptose einher (Yuan *et al.*, 2019).

Asbest

Bei Asbest handelt es sich um ein Material, das aus kristallisierten Silikat-Fasern besteht (Luus, 2007). Obwohl die Inhalationstoxizität von Asbestfasern bereits seit vielen Jahrzehnten bekannt ist (Cooke, 1924), wurden sie bis in die 1980er Jahre aufgrund ihrer hervorragenden isolierenden und feuerbeständigen Eigenschaften als Bausubstanz in Gebäuden verwendet (Luus, 2007). Trotz des Verbots von fünf der sechs existierenden Asbestformen durch die Europäische Union im Jahr 1991 bietet die inhalatorische Exposition gegenüber Asbest aufgrund langer Latenzzeiten eine anhaltende Gesundheitsproblematik (Alpert *et al.*, 2020). Eine Freisetzung inhalierbarer Fasern ist zusätzlich nach Reparaturarbeiten an Gebäuden möglich, in denen Asbest bereits vor dem Verbot als Baumaterial verwendet wurde (R. Lee & Van Orden, 2008).

Charakteristische Auswirkungen der Asbestexposition sind die Ausbildung von Mesotheliomen, bösartigen und potenziell tödlichen Tumoren des Brustfells, Lungentumoren und der Asbestose, einer Form der Lungenfibrose (Manning *et al.*, 2002). Asbest zeigt in seiner Struktur und der Größe der Fasern eine hohe Heterogenität: im Durchmesser kann ein Größenbereich von unter 0,25 bis über 3 μm und Längen von unter 1,5 bis über 40 μm

abgedeckt werden. Die Exposition gegenüber langen, dünnen Fasern korreliert hierbei mit einem hohen Risiko für Lungenkrebs (Loomis *et al.*, 2010). Die starke kanzerogene Aktivität von Asbest ist in seiner hohen Genotoxizität begründet. Eine signifikante Induktion von chromosomalen Abberationen und DNA-Schäden wurde in Asbest-exponierten Arbeitskräften festgestellt (Dusinska *et al.*, 2004). Neben der direkten Interaktion mit der DNA und Chromosomen, werden auch ROS-basierte Mechanismen postuliert, sowie eine Adsorption anderer Schadstoffe an Asbestfasern in der Lunge und deren subsequente Akkumulation. Die Bildung von ROS kann hierbei sowohl durch Makrophagen vonstatten gehen, die nicht in der Lage sind, die Fasern komplett aufzunehmen und daraufhin in einem Prozess der frustrierten Phagozytose vermehrt ROS und Zytokine freisetzen, als auch durch Verunreinigungen mit redoxaktivem Eisen (Toyokuni, 2009). Die akute Aspiration von Asbestfasern durch Mäuse resultierte in einem erhöhten Influx von Neutrophilen, Lymphozyten und Eosinophilen sowie einer starken Freisetzung diverser inflammatorischer Zytokine nach wenigen Tagen. Subchronisch wurde eine anhaltende Inflammation sowie die Bildung von Granulomen und Fibrosen beobachtet (Yanamala *et al.*, 2018).

Carbon Black

Bei *Carbon Black*-Partikeln (CB), auch als Industrieruß bekannt, handelt es sich um ein industriell hergestelltes Nanomaterial, das durch Pyrolyse bzw. unvollständige Verbrennung von Kohlenwasserstoffen entsteht. CB wird vor allem als Füllstoff für Gummiprodukte und als schwarzes Farbpigment verwendet. Die Partikel bestehen zu mehr als 97 % aus elementarem Kohlenstoff, besitzen eine Graphit-ähnliche Struktur und treten in Größenbereichen zwischen 10 und mehreren 100 nm auf (M. Wang *et al.*, 2000).

CB-Partikel sind als sogenannte schlecht lösliche Partikel mit geringer Toxizität klassifiziert (Borm & Driscoll, 2019). Dennoch ist CB nach Bewertung durch die IARC als womöglich karzinogen im Menschen (Kategorie 2B) eingestuft (IARC, 2010). Dieser Einstufung liegt die unzureichende Studienlage zugrunde, da nur wenige epidemiologische Untersuchungen zur Karzinogenität von CB existieren und diese für eine geringe bis nicht vorhandene Kanzerogenität im Menschen sprechen. Gleichzeitig beschreiben diverse Studien eine Kanzerogenität im Tierversuch, insbesondere bei Ratten unter *overload*-Bedingungen. Die Relevanz dieser Studien und eine Übertragbarkeit auf den Menschen wird jedoch kontrovers diskutiert. Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass die Toxizität von CB *in-vivo* vergleichbar mit der anderer biobeständiger Stäube ist und damit nicht von der Oberflächenchemie der Partikel abhängt (Valberg *et al.*, 2006).

In einer *in-vivo*-Studie mit Ratten, Mäusen und Hamstern wurden nach CB-Exposition dosis-, zeit- und speziesabhängige Antworten im Bereich der oxidativen Stressantwort und Inflammation beobachtet. Ein Zusammenhang zwischen anhaltender Inflammation und Tumorigenese wurde ebenfalls postuliert (Carter *et al.*, 2006). In anderen Studien beruht die Toxizität von CB-Partikeln primär auf der Induktion von ROS und einer dadurch ausgelösten inflammatorischen Antwort (Niranjan & Thakur, 2017). In diesem Zusammenhang wird in Bezug auf die Kanzerogenese ein Mechanismus der sekundären Genotoxizität angenommen (Schins & Knaapen, 2007).

2.1.3 Mechanismen der inhalatorischen Toxizität

Die meisten partikulären und faserförmigen Materialien werden über einen Mechanismus der Endozytose in Lungenzellen aufgenommen. Darüber hinaus findet durch die in der Lunge vorhandenen Zellen des Immunsystems, z.B. Makrophagen, vermehrt Phagozytose statt, die die Aufnahme und Elimination großer Mengen an Partikeln ermöglicht (Kafshgari *et al.*, 2015). Hierbei ist auch die Form und Größe der aufgenommenen Materialien ausschlaggebend. Beispielsweise erfolgt zumeist eine vollständige Aufnahme von Asbestfasern in Mesothel- und Endothelzellen durch Endozytose, während lange, dünne und rigide CNTs die Membran auch direkt durchstechen können (Nagai & Toyokuni, 2012). Speziell für lange biobeständige Fasern ist darüber hinaus ein Mechanismus der frustrierten Phagozytose bekannt. Dieser ist dadurch charakterisiert, dass Makrophagen die zu langen Fasern nicht komplett durch Phagozytose aufnehmen können, was zum Zelltod und einer hohen Freisetzung inflammatorischer Mediatoren führt. Solche Effekte wurden bereits für Asbestfasern und MWCNTs mit einer Länge von mehr als 20 µm beschrieben (Boyles *et al.*, 2015).

Eine Erkennung von Partikeln und anderen Fremdstoffen in der Lunge kann darüber hinaus durch *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) zustande kommen und resultiert zumeist ebenfalls in einer Aktivierung verschiedener inflammatorischer Signalwege und der Freisetzung von Zytokinen (Aghasafari *et al.*, 2019). Für bestimmte Arten von Partikeln, z.B. Quarz oder Titandioxid, ist zusätzlich eine Beteiligung sogenannter *Scavenger*-Rezeptoren (SR) bekannt, welche insbesondere in Zellmembranen von Makrophagen lokalisiert sind und extrazelluläre Bindestellen für Partikel besitzen. SR-vermittelte Signalwege können zu einer Vielzahl intrazellulärer Reaktionen führen, unter anderem zur Induktion der Apoptose über die Aktivierung von Caspasen, zu einer verstärkten inflammatorischen Antwort und zu einer Steigerung der Endozytose (Thakur *et al.*, 2008).

Biobeständige Nanomaterialien induzieren nach ihrer Internalisierung insbesondere inflammatorische Signalkaskaden. Wie zuvor beschrieben, kann dieser Prozess Rezeptorvermittelt beginnen. Eine hohe Bedeutung besitzt auch die Bildung von ROS. Diese ist durch reaktive funktionelle Gruppen auf der Partikel- und Faseroberfläche, z.B. Silanolgruppen bei Quarzpartikeln, durch Einwirkung von redoxaktiven Heteroatomen wie Eisen aus Verunreinigungen oder durch Wechselwirkung mit zellulären Bestandteilen wie Zellmembranen oder Mitochondrien möglich (Øvrevik *et al.*, 2015).

Eine Schlüsselrolle im Vorgang der Inflammation nimmt der Transkriptionsfaktor NF-κB ein, der durch eine Reihe extra- und intrazellulärer Stimuli induziert werden kann, insbesondere jedoch über oxidativen Stress (Tripathi & Aggarwal, 2006). Bei NF-κB handelt es sich um ein Dimer, das bei entsprechender Aktivierung in den Zellkern transloziert wird, an spezifische Bindestellen in den Promotorregionen unterschiedlicher Gene bindet und deren Transkription verstärkt. Dabei wird primär zwischen dem kanonischen und dem nicht-kanonischen Weg unterschieden. Bei dem kanonischen Weg besteht das NF-κB-Dimer aus den beiden Monomeren p50 und RelA, welche im inaktiven Zustand an den Inhibitor IκB gebunden sind. Bei Aktivierung durch ein Rezeptor-vermitteltes Signal oder ROS wird IκB phosphoryliert und infolgedessen proteasomal abgebaut, wodurch das

aktive Dimer in den Nukleus gelangen kann. Bei dem nicht-kanonischen Weg besteht das inaktive Dimer aus den beiden Monomeren p100 und RelB. Durch Phosphorylierung und posttranslationale Prozessierung von p100 bildet sich das Monomer p52, welches als aktives Dimer mit RelB ebenfalls in den Zellkern gelangt (Gilmore, 2006). Die Translokation von NF- κ B in den Zellkern resultiert in der verstärkten Transkription zahlreicher Gene, die für Proteine der Inflammation und oxidativen Stressantwort kodieren. Darunter finden sich diverse Interleukine (IL), wie beispielsweise IL-1 α und IL-1 β , IL-6 und IL-8, welche durch ihre Freisetzung die Kommunikation und Rekrutierung verschiedener Zellen des Immunsystems ermöglichen (Tripathi & Aggarwal, 2006). Speziell bei IL-8 handelt es sich um ein Chemokin, ein Zytokin, welches direkt die Chemotaxis von Leukozyten, Endothel- und Epithelzellen beeinflusst (Raman *et al.*, 2011). Die Expression der proinflammatorischen Zytokine Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Cyclooxygenase-2 (COX2) ist ebenfalls abhängig von NF- κ B, ebenso wie die Expression diverser Zelladhäsionsmoleküle (Tripathi & Aggarwal, 2006).

Ein weiterer Schlüsselmechanismus bei der Partikel- und Faser-vermittelten Inflammation ist die Aktivierung des *NLR family pyrin domain containing*-Inflammasoms (NLRP3). Dabei handelt es sich um einen Multiproteinkomplex, der sehr empfindlich auf unterschiedliche Stimuli reagiert, beispielsweise ROS oder auf die Freisetzung von Cathepsin B aus Lysosomen bei Membranschädigung durch Substanzen wie Quarz oder Asbest. In einem ersten Schritt, dem *Priming*, wird die Expression der Vorläufermoleküle pro-IL-18 und pro-IL-1 β initialisiert, beispielsweise durch IL-1 α . Die Induktion des Inflammasom-Komplexes führt daraufhin in einem zweiten Schritt zur Aktivierung der Caspase-1, die pro-IL-18 und pro-IL-1 β in ihre aktiven Formen IL-18 und IL-1 β prozessiert. Bei beiden handelt es sich um proinflammatorische Zytokine, die nach ihrer Freisetzung durch Bindung an den IL-1-Rezeptor anderer Zellen die Freisetzung weiterer Zytokine bewirken (Sayan & Mossman, 2015). Weiterhin ist das NLRP3-Inflammasom an der Pyroptose beteiligt, einer Form des Zelltodes, die sowohl Charakteristika der Nekrose als auch der Apoptose aufweist und sich durch eine starke inflammatorische Antwort auszeichnet (Kesavardhana *et al.*, 2020).

Die Induktion unterschiedlicher Signalwege wie NF- κ B und NLRP3-Inflammasom durch Partikel und Fasern kann zu einer Amplifikation der inflammatorischen Antworten führen. Beispielsweise kommt es nach der Inflammasomaktivierung zu einer Bindung von IL-1 β an den IL-1-Rezeptor, was in Effektorzellen eine Aktivierung des NF- κ B-Weges zur Folge haben und zu einer weiteren Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen führen kann. Diese Effekte können mit einer dauerhaften positiven Rückkopplung verglichen werden (Øvrevik *et al.*, 2015).

Die inflammatorische Antwort besitzt eine enge Verbindung zu anderen Pathologien der Lunge, beispielsweise Lungenfibrosen oder der Ausbildung von Lungenkarzinomen. Die Zusammenhänge zwischen Inflammation und Fibrose sind in Abbildung 2.1 dargestellt.

In der frühen akuten Phase der Exposition kommt es zu einer proinflammatorischen Typ 1-Antwort, die primär durch sogenannte M1-Makrophagen vermittelt wird. Die erhöhte Produktion von IL-1 und IL-6 über NF- κ B- und Inflammasom-vermittelte Signalwege, die charakteristisch für M1-Makrophagen ist, führt zu einer umfassenden akuten Inflammation

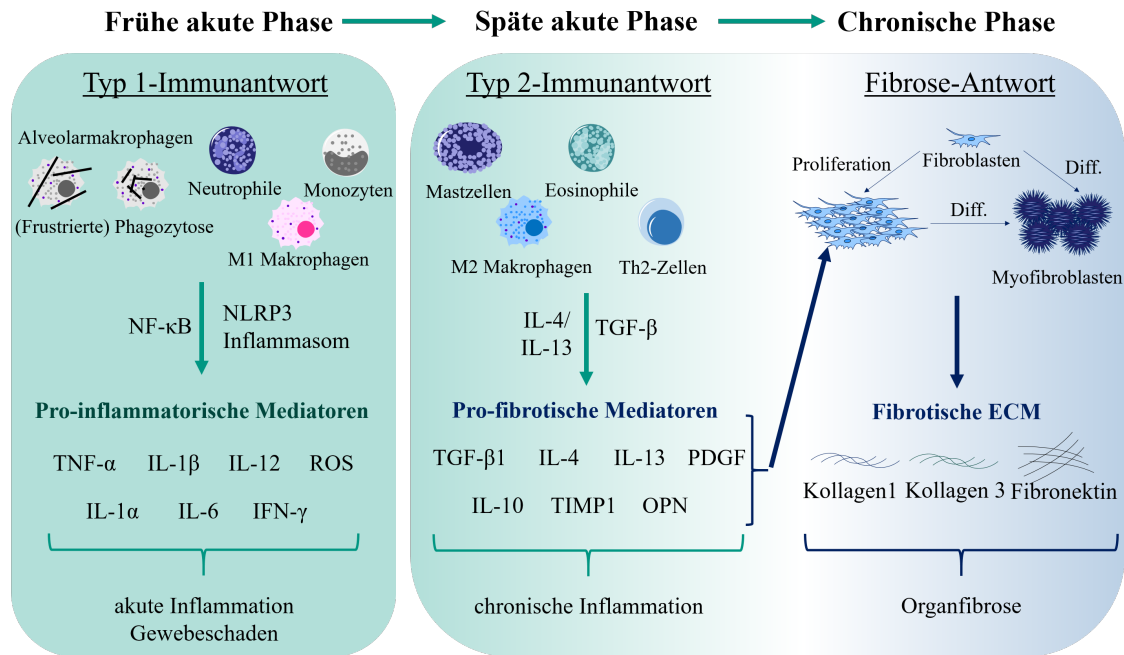


Abbildung 2.1: Stadien der pulmonalen Toxizität nach Exposition gegenüber Partikeln und Fasern. Die frühe Phase beginnt mit der Typ 1-Immunantwort, welche primär von M1-Makrophagen vermittelt wird. Es kommt zur Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren. Die späte akute Phase wird primär von M2-Makrophagen vermittelt, wodurch es zur Ausschüttung antiinflammatorischer und profibrotischer Faktoren kommt, was direkt die fibrotische Antwort zur Folge hat. Fibroblasten proliferieren und differenzieren zu Myofibroblasten, was zur verstärkten Produktion von ECM-Komponenten und dadurch zur Fibrose führt. Diff.: Differenzierung, ECM: Extrazelluläre Matrix, IFN: Interferon, IL: Interleukin, OPN: Osteopontin, PDGF: *Platelet-derived growth factor*, ROS: Reaktive Sauerstoffspezies, TGF: *transforming growth factor*, Th2: T-Helferzellen Typ 2, TIMP: *Tissue inhibitor of metalloproteinase*. Modifiziert nach (Dong & Ma, 2019).

unter Bildung anderer Zytokine, ROS und Gewebeschäden. Bei Übergang in die späte akute Phase überwiegt eine durch M2-Makrophagen vermittelte antiinflammatorische Antwort, die zur Inhibition proinflammatorischer Mediatoren führt. Charakteristisch für den Übergang in die späte akute Phase ist die vermehrte Bildung des Transformierenden Wachstumsfaktors- β (*Transforming Growth factor- β* : TGF- β), welcher über IL-17 von IL-1 induziert wird, und damit ein Bindeglied zwischen akuter und chronischer Inflammation darstellt. Darüber hinaus kommt es zur Bildung antiinflammatorischer Zytokine wie IL-4, IL-13 und IL-10 durch T-Helferzellen des Typs 2 sowie zu einer ersten Induktion profibrotischer Proteine, beispielsweise *Platelet derived growth factor* (PDGF), Osteopontin (OPN) und des *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1* (TIMP1). Diese wirken direkt auf die extrazelluläre Matrix und sind in der gesunden Lunge für die Wundheilung verantwortlich. Bei Ausbildung einer chronischen Inflammation durch Partikel- oder Fasereinwirkung degeneriert jedoch dieser Prozess und führt zur Proliferation und Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten. Dies hat eine vermehrte Ablagerung von Komponenten der extrazellulären Matrix, wie der Kollagene 1 und 3 sowie Fibronectin, zur Folge, führt zu einer Versteifung und Vernarbung der Lungenarchitektur und schlussendlich zur Ausbildung einer Fibrose. (Dong & Ma, 2019)

Während dieser Verlauf in erster Linie über die Wirkung von Immunzellen stattfindet, ist ebenfalls eine direkte Wirkung von Partikeln und Fasern auf Fibroblasten bekannt. So induzieren CNTs nach Aufnahme in Fibroblasten stark die Bildung von ROS und führen über eine Aktivierung verschiedener Signalwege direkt zur Proliferation, Differenzierung und verstärkten Kollagenproduktion durch Fibroblasten (Vietti *et al.*, 2016). Insbesondere die Signalkaskaden der Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK), welche die Zellzyklusprogression und Differenzierung von Zellen sowie die Einleitung der Apoptose regulieren, spielen hierbei eine tragende Rolle (Pearson *et al.*, 2001). Darüber hinaus tragen Epithelzellen als Effektorzellen der Makrophagen und durch die direkte Entstehung von ROS und Membranschäden zur Verstärkung der inflammatorischen und anschließenden fibrotischen Antwort bei, indem sie ebenfalls Zytokine wie IL-6, IL-8, IL-18, IL-1 β und TGF- β freisetzen (Vietti *et al.*, 2016). Für Epithelzellen wird zusätzlich der Mechanismus der Epithelial-Mesenchymalen Transition (EMT) beschrieben, welcher eine Transdifferenzierung der Epithelzellen zu Mesenchymzellen mit einem Fibroblasten-ähnlichen Phänotyp umfasst. Dieser Prozess geht ebenfalls mit der Bildung von Kollagen 1 und Fibronektin sowie mit der Freisetzung fibrotischer Mediatoren einher, was zur Entstehung von Myofibroblasten beiträgt (Dong & Ma, 2016).

Eine weitere Auswirkung der Inhalation biobeständiger partikel- und faserhaltiger Stäube liegt in der Bildung von Tumoren der Lunge und angrenzender Organe wie des Mesothels. Für Asbestfasern ist eine starke karzinogene Wirkung in Form der Bildung von Lungenkrebs und Mesotheliomen bekannt und wurde in diversen epidemiologischen Studien festgestellt (Manning *et al.*, 2002). Für andere Materialien, wie z.B. CNTs und CB, liegen weniger epidemiologische Studien vor. Die Einschätzung dieser Materialien als mögliche Karzinogene durch die IARC beruht vermehrt auf *in-vivo*-Studien, in denen jedoch häufig eine Kanzerogenität im Versuchstier detektierbar war (Barbarino & Giordano, 2021; Valberg *et al.*, 2006).

Während insbesondere für faserförmige Materialien eine direkte Interaktion mit der DNA bzw. dem Spindelapparat für eine ausgeprägte Genotoxizität sorgen kann, ist auch die Beteiligung von ROS an einer steigenden genomischen Instabilität postuliert. Demzufolge liegt der Faser-vermittelten Genotoxizität ein primärer und sekundärer Wirkmechanismus zugrunde (Nagai & Toyokuni, 2010). Für biobeständige Partikel wird dagegen eher von einer sekundären Genotoxizität ausgegangen (Schins & Knaapen, 2007). Einen weiteren Beitrag zur Tumorentstehung liefern auch Inflammation und Fibrose. Die Zusammenhänge zwischen diesen drei toxikologischen Endpunkten sind in Abbildung 2.2 dargestellt.

Es wurde bereits dargestellt, dass eine chronische Inflammation als Ausgangspunkt der Lungenfibrose dient. Zusätzlich kann von der Inflammation auch eine tumorbildende Aktivität ausgehen, welche insbesondere durch Bildung von ROS in einer erhöhten Genotoxizität und dadurch in einer genomischen Instabilität resultieren kann (Asanov *et al.*, 2021). Eine vermehrte Bildung von ROS kann beispielsweise durch den respiratorischen *Burst* von Makrophagen nach Aufnahme von Partikeln oder Fasern stattfinden, was von großer Bedeutung für die Signalweiterleitung ist (Gwinn & Vallyathan, 2006). Im Umkehrschluss kommt es durch die Tumorumgebung ebenfalls zu einer Freisetzung von Zytokinen, Wachstumsfaktoren sowie zu einer Entstehung Tumor-assoziiertes Makrophagen

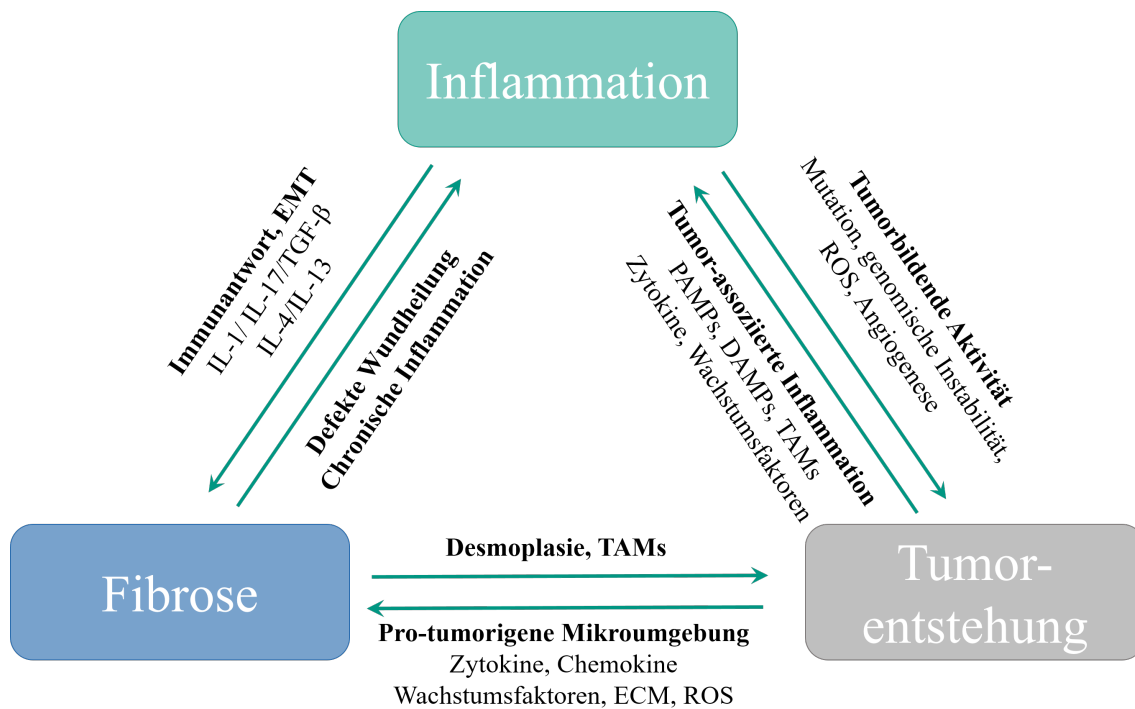


Abbildung 2.2: Verbindung der Inflammation, Fibrose und Tumorentstehung bei inhalativer Exposition gegenüber Partikeln und Fasern. Durch eine anhaltende Inflammation und Freisetzung von TGF- β kann eine Lungenfibrose entstehen. Die daraus resultierende defekte Wundheilung resultiert in der weiteren Verstärkung der Inflammation. Gleichzeitig kann durch eine chronische Inflammation und Bildung von ROS die genomische Stabilität abnehmen und zur Bildung von Mutationen führen, die eine tumorpromovierende Wirkung besitzen. Die Tumorentstehung geht mit der Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren einher, die eine induzierende Wirkung in Hinblick auf Inflammation und Fibrose haben kann. DAMP: *Damage-associated molecular patterns*, ECM: Extrazelluläre Matrix, EMT: Epithelial-Mesenchymale Transition, IL: Interleukin, PAMP: *Pathogen-associated molecular patterns*, ROS: Reaktive Sauerstoffspezies, TAM: Tumor-assoziierte Makrophagen, TGF: *transforming growth factor*. Modifiziert nach (Dong & Ma, 2019).

(TAMs). Dies hat erneut eine Verstärkung der Inflammation zur Folge und bildet so einen sich permanent wiederholenden und selbst verstärkenden Kreislauf (Asanov *et al.*, 2021). Die Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren, ROS und Wachstumsfaktoren trägt neben Veränderungen in der extrazellulären Matrix ebenso zur Progression der Fibrose bei. Aus diesen Zusammenhängen wird deutlich, dass diese drei Lungenpathologien eine enge Verbindung aufweisen und sich auf vielfältige Weise gegenseitig beeinflussen und verstärken (Dong & Ma, 2019).

2.2 Modelle zur Untersuchung lungentoxischer Materialien

Der Untersuchung lungentoxischer Materialien können unterschiedliche Methoden zugrunde liegen. Obwohl epidemiologische Studien die verlässlichsten Ergebnisse liefern können, da sie direkte Effekte *in-vivo* in der richtigen Spezies darstellen, vergehen gegebenenfalls lange Zeiträume, bis adverse Effekte erkennbar sind, was den Einfluss anderer Faktoren auf die beobachteten Effekte erhöht. Demzufolge sind aussagekräftige epidemiologische Studien häufig nicht verfügbar (Kuh *et al.*, 2003). Probandenstudien sind nur dann vertretbar, wenn schwache und reversible Wirkungen, wie beispielsweise Hautreizungen, untersucht werden, was die Anwendung in der Inhalationstoxikologie kaum möglich macht (Frazier, 1992). *In-vivo* Studien an Tieren ermöglichen dagegen eine Betrachtung der Toxizität über den gesamten Lebenszyklus. Allerdings ist eine Übertragbarkeit der beobachteten Effekte vom Tier auf den Menschen durch Unterschiede in Metabolismus und Physiologie erschwert. Zusätzlich wird die Durchführung von Tierversuchen aus ethischen Gründen kontrovers diskutiert, weswegen bei der Durchführung toxikologischer Untersuchungen nach dem 3 R-Prinzip (*replace, reduce, refine*) vorgegangen werden soll (Guhad, 2005).

Mit diesem Ziel kam es zur Entwicklung unterschiedlicher *in-vitro*-Lungenmodelle. In klassischen submersen Zellkulturexperimenten werden bestimmte Zellarten, beispielsweise Epithelzellen, auf einer Oberfläche und von Medium bedeckt kultiviert und durch Zugabe einer Suspension in Medium gegenüber Fasern oder Partikeln exponiert. Es handelt sich hierbei um eine Methode, die ohne komplexes Vorwissen unkompliziert umzusetzen und kostengünstig ist, jedoch nicht verlässlich die physiologischen Gegebenheiten widerspiegelt (Lacroix *et al.*, 2018). Die Epithelzellen in der Lunge sind für die Funktion des Gasaustausches von apikaler Seite gegenüber Luft ausgesetzt, während sich auf der basalen Seite andere Zellen, z.B. Endothelzellen der ableitenden Blutgefäße oder Fibroblasten, befinden. Demnach besitzen Epithelzellen einen polarisierten Phänotyp, der bei einer submersen Kultur verloren geht (Fröhlich & Salar-Behzadi, 2014). Zusätzlich verfälscht die Zugabe von Partikeln und Fasern in Suspension den regulären Expositionsweg, da Fremdstoffe unter physiologischen Bedingungen als Aerosol auf die Epithelschicht treffen. Bestandteile des Kulturmediums wie fetales Kälberserum beeinflussen darüber hinaus die Oberfläche, Größe und somit die Toxizität der Partikel durch Ausbildung einer Proteincorona (Lacroix *et al.*, 2018). Eine Abschätzung der effektiv auf den Zellen deponierten Dosis ist insbesondere für unlösliche NP ebenfalls erschwert, da diese gegebenenfalls nicht vollständig sedimentieren (Lison & Huaux, 2011).

Um ein physiologisch exakteres Bild der Lungenepithelschicht zu zeichnen, kann die Kultivierung der Zellen an einer Luft-Flüssigkeitsgrenzschicht erfolgen, einem sogenannten *air-liquid interface* (ALI). Dabei befinden sich die Zellen in einem Zellkultureinsatz auf einer porösen Membran und werden von basolateraler Seite mit Kulturmedium versorgt, während eine Exposition gegenüber der Umgebungsluft und Aerosolen von apikaler Seite möglich ist (Lacroix *et al.*, 2018). Eine schematische Darstellung der ALI-Kultivierung sowie weitere Möglichkeiten für Zellkulturmodelle der Lunge sind in Abbildung 2.3 dargestellt.

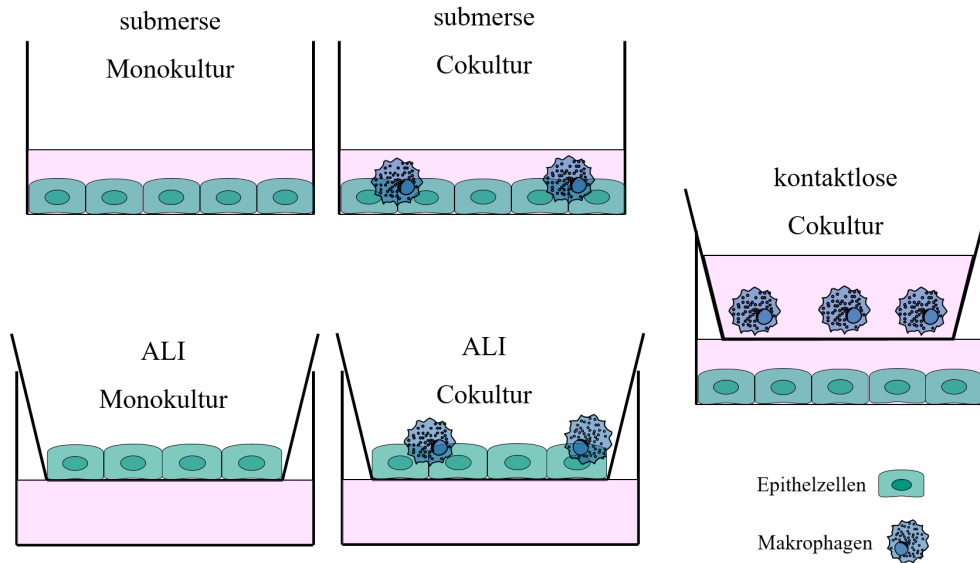


Abbildung 2.3: Unterschiedliche Arten von Mono- und Cokulturen zur Untersuchung der Inhalationstoxizität. Es wird zwischen klassischer Kultivierung (submers), *air-liquid interface*-Kultivierung (ALI) und diversen Zwischenformen unterschieden. Eine Verwendung von Makrophagen ist in Kontakt- und kontaktlosen Szenarien möglich.

In toxikologischen Studien an einem ALI wird häufig die Alveolarepithelzelllinie A549 verwendet, so beispielsweise zur Untersuchung der Toxizität von Holzrauch und Dieselabgasen (Mülhopt *et al.*, 2016), Zigarettenrauch (X. Li, 2016) oder Polystyrenpartikeln und CNTs (Fröhlich *et al.*, 2013). Zur Modellierung des Bronchialepithels können BEAS-2B oder Calu-3-Zellen verwendet werden. Vor allem Calu-3-Zellen treten durch ihre Fähigkeit der Bildung einer stabilen und langlebigen Epithelbarriere und die Ausbildung von *tight junctions* hervor (BéruBé *et al.*, 2010). Durch ihren malignen Status sind A549 und Calu-3-Zellen hinsichtlich ihrer Kultivierung und der Reproduzierbarkeit von Forschungsergebnissen robust. Allerdings sind durch diesen Status Abweichungen in metabolischer Aktivität und gegebenenfalls eine erhöhte Resistenz gegenüber Testsubstanzen gegeben, welche die Übertragung auf physiologische und *in-vivo*-Bedingungen erschweren. Beispielsweise ist eine konstitutive Überexpression des Transkriptionsfaktors *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) in A549-Zellen bekannt und kann zu Änderungen der oxidativen Stressantwort führen (Kweon *et al.*, 2006). Aus diesem Grund müssen toxikologische Daten mit Zellen malignen Ursprungs besonders differenziert betrachtet werden. Um diese Problematik zu umgehen, können Primärzellen der Lunge verwendet werden, z.B. *Normal human bronchial epithelial cells* (NHBE) oder *Small airway epithelial cells* (SAEC) (Bhowmick & Gappa-Fahlenkamp, 2016). Für beide ist bereits die Anwendung im Kontext eines ALI bekannt, unter anderem bei Exposition gegenüber Feinstaub (Ghio *et al.*, 2013; Lan *et al.*, 2021).

Eine Erweiterung von Epithelzellmonokulturen kann durch die Integration anderer Zellarten erfolgen. Insbesondere bei Exposition gegenüber Fasern und Partikeln nehmen Makrophagen eine bedeutende Rolle in der *Clearance* der Fremdsubstanzen aus der Lunge ein, was zumeist mit der Induktion einer inflammatorischen Antwort einhergeht (Lehnert *et al.*, 1989). Im Kontext der Cokultur mit Epithelzellen werden vermehrt THP-1-Monozyten

verwendet, welche nach Differenzierung einen Makrophagen-ähnlichen Phänotyp annehmen können (Upadhyay & Palmberg, 2018). Die erfolgreiche Verwendung von Cokulturen aus Epithelzellen und differenzierten THP-1-Zellen wurde bereits mehrfach demonstriert, beispielsweise bei Exposition gegenüber Feinstaub unter submersen Bedingungen und an einem ALI (G. Wang *et al.*, 2020), bei Exposition gegenüber Silber-NP an einem ALI (Kletting *et al.*, 2018) oder bei Exposition gegenüber CeO₂ und TiO₂ unter beiden Expositionsbedingungen (Loret *et al.*, 2016).

Die Verwendung kontaktloser Cokulturen ist eine weitere Option zur Untersuchung von Zell-Zell-Interaktionen und kann andere Ergebnisse hervorbringen als eine direkte Cokultur, da das von Epithelzellen gebildete *Surfactant* einen (inhibitorischen) Einfluss auf Makrophagen-Zellen haben kann (Kanj *et al.*, 2006). Eine weitere indirekte Variante des Lungenzellmodells ist ein sogenannter *conditioned media*-Ansatz. Bei dieser Herangehensweise werden Monokulturen einer Zellart, beispielsweise Makrophagen, gegenüber einer Testsubstanz exponiert. Nach einer definierten Inkubationszeit wird das Medium entnommen und auf eine andere Zellart transferiert, was ähnlich zur kontaktlosen Cokultur eine indirekte Zell-Zell-Kommunikation allein über sezernierte Signalmoleküle gewährleistet (D. Holt *et al.*, 2010). Für die Untersuchung der Toxizität von Quarz und CNTs wurde die Umsetzung dieses Konzepts bereits demonstriert (Hindman & Ma, 2018; van Berlo *et al.*, 2010). Beide indirekten Verfahren bieten den Vorteil einer Auflösung und genauen Zuordnung bestimmter zellulärer Reaktionen zu einem Zelltyp (D. Holt *et al.*, 2010). Eine Nutzung am ALI ist für beide Modelle nicht möglich, was einen Nachteil gegenüber der direkten Cokultur darstellt.

Eine weitere Stufe der Komplexität bieten Cokulturen, die die Wechselwirkung von mehr als zwei Zellarten erfassen. Dies ist durch eine Kultivierung von Fibroblasten im basolateralen Kompartiment oder an der Unterseite der porösen Membran bei Verwendung von Zellkultureinsätzen möglich, wie in Triplekulturen aus A549-, THP-1- und MRC-5-Zellen gezeigt wurde (Barosova *et al.*, 2020b; Hilton *et al.*, 2019). Alternativ zu Fibroblasten können auch Endothelzellen verwendet werden, um die physiologische Barriere zwischen Lunge und Blutkreislauf nachzustellen (Dohle *et al.*, 2018; Skuland *et al.*, 2020). Der Aufbau solch komplexer Modelle ist zeitaufwändig und technisch anspruchsvoll. Mit kommerziell erhältlichen Modellen auf Basis von Primärzellen wie EpiAlveolar™, SmallAir™ und MucilAir™ kann die experimentelle Durchführung erleichtert werden, was jedoch mit höheren Kosten verbunden ist (Barosova *et al.*, 2020a; Huang *et al.*, 2017).

Eine finale Weiterentwicklung mit hoher physiologischer Relevanz bieten Modelle, die eine Nachbildung der Lunge als komplexes Gewebe ermöglichen. Eine Möglichkeit hierfür sind Organoide, bei denen es sich um selbst-organisierende 3D-Gewebe aus differenzierten Vorläuferzellen der Lunge oder Stammzellen handelt. Für den Aufbau dieser Modelle ist eine Isolation von Zellen aus dem Lungengewebe von Tieren oder Menschen notwendig (Barkauskas *et al.*, 2017). Der Einsatz von Lungenorganoiden in der Fasertoxikologie wurde bereits mit Expositionen gegenüber Mikroplastik-Fasern demonstriert (Winkler *et al.*, 2022). Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von *Lung-on-a-chip*-Modellen. Diese bestehen aus einem Mikrofluidik-System, das mit Epithel- und Endothelzellen ausgekleidet ist, die eine Luft-Flüssigkeitsgrenzschicht ausbilden. Von der Seite des Endothels ist eine Versor-

gung der Zellen mit Kulturmedium möglich, während die Epithelzellen der Luft ausgesetzt sind und gegenüber Testsubstanzen exponiert werden können. Eine Integration von Zellen des Immunsystems, z.B. Neutrophilen oder Makrophagen, ist ebenfalls möglich (Shrestha *et al.*, 2020). Mithilfe von Silica-NP wurde die Eignung solcher Modelle für die Partikeltoxikologie bereits beschrieben (Huh *et al.*, 2010). Neben Lungenmodellen sind weitere *Organ-on-a-chip*-Modelle kommerziell verfügbar, beispielsweise für Herz und Leber. Eine funktionelle Verkettung unterschiedlicher Modelle ermöglicht hierbei die Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Organen und soll in Zukunft zu einer ganzheitlichen Betrachtung in Form von *Body-on-a-chip*-Modellen beitragen (Sung *et al.*, 2018).

2.2.1 *Air-liquid interface*-Exposition von Lungenzellmodellen

Die Verwendung von *in-vitro*-Modellen an einem ALI für die Partikeltoxikologie erfordert die Möglichkeit einer Exposition von Zellen gegenüber Aerosolen und Stäuben, die Partikel und Fasern enthalten. Kommerziell erhältliche Systeme der Firmen CULTEX® und Vitrocell® ermöglichen dies. Allgemein wird zwischen diskontinuierlichen und kontinuierlichen Expositionssystemen unterschieden

Eine diskontinuierliche ALI-Exposition ist beispielsweise durch die Vitrocell® *Cloud* möglich, die auch für die in dieser Arbeit dargestellten Expositionen mit Quarzpartikeln verwendet wurde. Die Generierung eines Aerosols erfolgt durch die Vibration einer porösen Membran im Aerosolgenerator, die in der Bildung von Flüssigkeitströpfchen aus einer partikel- oder faserhaltigen Suspension resultiert (Dhand, 2004). Das gesamte gebildete Aerosol wird in einem Zeitfenster von 10 Minuten auf der Zell- und Kammeroberfläche deponiert. Das Depositionsverhalten der gebildeten Aerosole ist durch eine reine Sedimentation und die Brown'sche Molekularbewegung charakterisiert. Dies entspricht einer physiologischen Situation, wie sie bei einem Anhalten der Luft in der Lunge vorliegt, da keine Strömung vorhanden ist, die eine Impaktion der Partikel verursacht (Secondo *et al.*, 2017). Die Erfassung der deponierten Dosis ist durch eine Quarzkristallmikrowaage (*quartz crystal microbalance*: QCM) möglich. Der in der Waage integrierte Quarzkristall verändert seine Schwingungsfrequenz mit der Masse, die sich auf der Oberfläche abgesetzt hat, was mit einer entsprechenden Software erfasst werden kann (Ding *et al.*, 2020). Eine parallele Exposition von Zellen gegenüber gepufferten Salzlösungen ist durch Kompartimentierung der Expositionskammer gewährleistet und ermöglicht eine nahezu identische Behandlung von Negativkontrollen. Durch den einfachen Gebrauch und die kompakte Größe ist die Vitrocell® *Cloud* besonders für Expositionen im kleinen Labormaßstab gut geeignet. Dieses Expositionssystem wurde bereits in diversen Studien zur Exposition gegenüber Partikeln oder Fasern, unter anderem für CNTs (Barosova *et al.*, 2020b; Barosova *et al.*, 2020a), ZnO (Ding *et al.*, 2020), CuO und TiO₂ (Hufnagel *et al.*, 2020) und Automobil- und Flugzeugabgase (He *et al.*, 2020), verwendet.

Eine kontinuierliche Exposition ermöglicht die Deposition von Fasern und Partikeln über einen längeren Zeitraum und spiegelt so eine physiologisch realistischere Art der Exposition wieder, als mit der diskontinuierlichen Methode beschrieben wurde. Unterschiede in der Aerosoldeposition der beiden Expositionsarten sind in Abbildung 2.4 dargestellt.

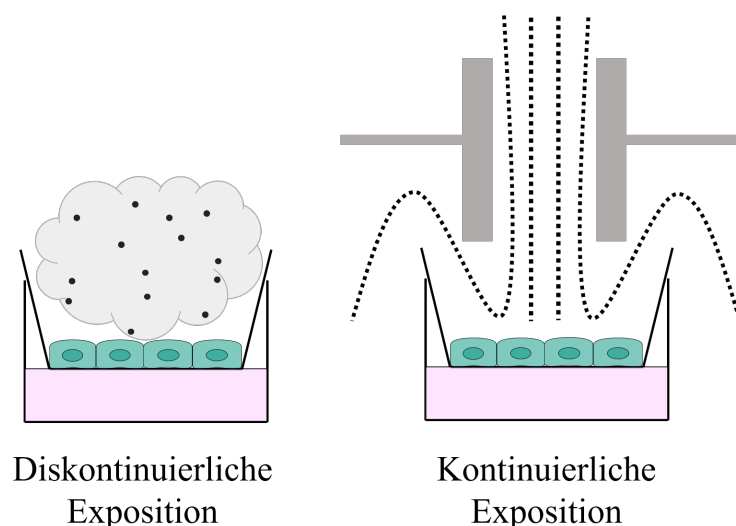


Abbildung 2.4: Partikelbewegung in diskontinuierlichen und kontinuierlichen Expositionssystemen. Bei der diskontinuierlichen Exposition gelangen Flüssigkeitströpfchen, in denen Partikel suspendiert sind, durch Sedimentation und Diffusion auf die Zellen. Bei der kontinuierlichen Exposition werden die Partikel über einen senkrechten laminaren Strom auf die Zellen gebracht, wodurch die Impaktion überwiegt. Modifiziert nach (Secondo *et al.*, 2017).

Das *Radial Flow System* der Firma CULTEX® (Tsoutsouloupoulos *et al.*, 2019) sowie die *Automated Exposure Station* (AES) der Firma Vitrocell® sind Beispiele für solche Systeme und kommerziell erhältlich (Braakhuis *et al.*, 2020). Die AES wird zur Exposition gegenüber CF-Stäuben auch in der vorliegenden Arbeit verwendet. Vor Deposition auf den Zellen passiert das zuvor generierte Aerosol einen Filter, sodass Partikel- und Faserfraktionen, die eine inhalierbare Größe überschreiten, abgeschieden werden. Nach Befeuchtung des Aerosols zur Vermeidung einer Austrocknung der Zellen und Temperierung auf 37 °C wird dieses in einem senkrechten laminaren Strom auf die Zellen geleitet (Mülhopt *et al.*, 2016). Dies ermöglicht eine Absetzung der Partikel und Fasern durch Impaktion (Secondo *et al.*, 2017). Das Anlegen einer Hochspannung an eine Elektrode unterhalb der Zellkultureinsätze ermöglicht eine signifikante Erhöhung der Deposition für geladene Partikel und dadurch eine Variation der deponierten Dosis (Mülhopt *et al.*, 2016). Die Erfassung der Dosis erfolgt, vergleichbar zu diskontinuierlichen Experimenten, über eine QCM (Mülhopt *et al.*, 2009). Parallel kann eine Exposition von Gitternetzen für die Transmissionselektronenmikroskopie stattfinden, wodurch eine mikroskopische Betrachtung der deponierten Partikel und eine weitere Methode zur Dosisbestimmung vorliegt (Mülhopt *et al.*, 2020). Um eine gute Vergleichbarkeit zu gewährleisten, kann in einem abgetrennten Teil der AES die Exposition von Negativkontrollen gegenüber filtrierter, befeuchteter Reinluft erfolgen (Mülhopt *et al.*, 2016). Die Bedienung der AES ist technisch anspruchsvoller als die der *Cloud* und erfordert durch ihre Größe viel Platz in einem Labor. Dieses Expositionssystem hat ebenfalls in unterschiedlichen Studien seine Eignung für die Betrachtung der Partikel- und Fasertoxizität unter Beweis gestellt, unter anderem bei Exposition gegenüber dem Quarz DQ12 (Braakhuis *et al.*, 2020), Lüftungsaerosolen aus Flugzeugen (He *et al.*, 2021a), CeO₂ und TiO₂ (Diabaté *et al.*, 2021), Verbrennungsabgasen von Schiffsdiesel (Mülhopt *et al.*, 2016) und Verbrennungsaerosolen von Nanokompositen (Hufnagel *et al.*, 2021b).

KAPITEL 3

FRAGESTELLUNG

Carbonfasern (CF) und Carbonfaser-verstärkte Kunststoffe (CFK) finden eine stetig steigende Anwendung in diversen Bereichen der Industrie, etwa der Automobil- und Windkraftindustrie. Eine Freisetzung von Faserfragmenten und Stäuben ist durch mechanische und thermische Beanspruchung während des gesamten Lebenszyklus von Carbonfasern möglich, insbesondere jedoch bei der Herstellung und Entsorgung von CF und faserhaltigen Materialien. Dennoch ist die Freisetzung und Toxizität dieser Faserfragmente und Stäube bis heute kaum untersucht. Dies war ein Bestandteil des BMBF-geförderten Drittmittelprojektes CarbonFibreCycle (CFC), in dessen Rahmen die vorliegende Arbeit durchgeführt wurde. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung der Toxizität von CF *in-vitro*.

Zu diesem Zweck werden zunächst *air-liquid interface*-Zellkulturmodelle (ALI-Modelle) auf Basis von Alveolarepithelzellen und Makrophagen-ähnlichen Zellen in Mono- und Cokultur etabliert. Durch Exposition mit einem Standardmaterial, dem α -Quarz Min-U-Sil5, wird die Eignung dieser Modelle und der anschließend untersuchten Endpunkte überprüft. Die Kulturen werden hinsichtlich ihrer Viabilität, genomischen Stabilität, Genexpression und Zytokinfreisetzung untersucht. Analog werden die gleichen Modelle auch durch klassische submerse Exposition gegenüber dem Testmaterial ausgesetzt. Ziel der Expositionen mit Min-U-Sil5 ist es, Unterschiede zwischen den verschiedenen Modellen (Mono- vs. Cokultur und ALI vs. submers) festzustellen und zu quantifizieren. Dies erfolgt sowohl durch Betrachtung unterschiedlicher Quarzkonzentrationen als auch durch Berücksichtigung einer Zeitabhängigkeit. Auf Basis dieser Ergebnisse sollen geeignete und gut charakterisierte Modelle für Expositionen gegenüber CF verwendet werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird die Toxizität einer innovativen Carbonfaser betrachtet. Hierzu wird die Faser durch mechanische Behandlung in einer Kugelmühle und thermisch-mechanische Behandlung in einem Rohrreaktor mit anschließendem Mahlvorgang vorbehandelt, um unterschiedliche Phasen im Lebenszyklus der Faser zu simulieren. Basierend auf den Ergebnissen der vorangegangenen Expositionsstudien mit Quarz werden Zellkulturmodelle auf Basis bronchialer Lungenepithelzellen, Makrophagen-ähnlicher Zellen und zusätzlich Fibroblasten in der Vitrocell® *Automated Exposure Station* verwendet, in der die CF-Expositionen erfolgen. Die Zellen werden hierbei in Form von Mono-, Co- und Triplekulturen eingesetzt. Die Herstellung und Charakterisierung der CF-Stäube sowie die Bestimmung von Dosis und Faseranzahl erfolgt durch das Institut für Technische Chemie (ITC) am KIT. Die Exposition der Lungenzellen erfolgt ebenfalls in den Laboren

des ITC. Die Zellkulturvor- und -nachbereitung sowie die toxikologischen Untersuchungen werden in den Laboren des Instituts für Biologische und Chemische Systeme (IBCS) und des IAB durchgeführt. Als toxikologisch relevante Endpunkte werden erneut die Viabilität, die genomische Stabilität, Genexpressionsanalysen sowie die Freisetzung inflammatorischer Mediatoren betrachtet. Bei diesen Experimenten liegt ein besonderer Fokus auf der zeitaufgelösten Betrachtung möglicher toxikologischer Antworten. Aus diesem Grund findet die Exposition jeweils nur mit einer Dosis vorbehandelter CF statt, worauf variierende Nachinkubationszeiträume folgen.

Die ermittelten Ergebnisse sollen im Rahmen des CFC-Projektes in eine Risikobewertung der untersuchten CF einfließen. Aus diesem Grund ist es das Hauptziel dieser Arbeit, eine umfassende toxikologische Charakterisierung der vorliegenden Carbonfaser durchzuführen. Der Fokus liegt auf der Herausarbeitung unterschiedlicher toxikologischer Antworten in Abhängigkeit des Zellkultur-Modells, der Behandlungsarten der CF sowie entlang der Zeitachse. Weiterhin sollen durch die erstellten Genexpressionsprofile Rückschlüsse auf die toxikologischen Mechanismen bei CF-Exposition gezogen werden.

KAPITEL 4

MATERIAL UND METHODEN

4.1 Material

Eine detaillierte Darstellung der verwendeten Chemikalien, Lösungen, Geräte und Kits ist tabellarisch im Anhang (s. A Chemikalien und Instrumente) zusammengefasst.

4.2 Methoden

4.2.1 Materialcharakterisierung und -vorbereitung

4.2.1.1 Testsubstanzen: Min-U-Sil5 und Carbonfasern

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Substanzen betrachtet. Bei Min-U-Sil5 handelt es sich um einen α -Quarz mit einem mittleren Partikeldurchmesser von $1,6 \mu\text{m}$ und einer Kristallinität von über 99 %. Die Partikel wurden freundlicherweise von Sonja Mülhopt (Institut für Technische Chemie, KIT) zu Verfügung gestellt. Die Exposition von Zellen gegenüber Min-U-Sil5 erfolgte ausschließlich über die Vitrocell® *Cloud* (s. 4.2.2.6 Exposition mit Min-U-Sil5 an der Vitrocell® *Cloud*).

Bei der verwendeten Carbonfaser handelt es sich um eine PAN-basierte HM-Faser (engl. *high modulus*, hohe Steifigkeit), für welche unter Anderem eine Verwendung in der Automobil-, Luftfahrt- und Windkraftindustrie vorgesehen ist (Herstellerangaben). Die Vorbereitung und Charakterisierung der Fasern sowie die Exposition der Zellen wurde im Rahmen des BMBF-geförderten Projektes CarbonFibreCycle (CFC) von Mitarbeitern des Instituts für Technische Chemie (ITC, KIT) durchgeführt. Der Fokus der Arbeit lag auf der Untersuchung toxikologischer Endpunkte nach zwei verschiedenen Bearbeitungsarten der gleichen Fasern: mechanische Behandlung und thermisch-mechanische Behandlung. Bei der mechanischen Behandlung wurden die CF in 1 cm lange Stücke geschnitten und für 8 Minuten in einer Planetenkugelmühle bei 400 Umdrehungen pro Minute gemahlen. Bei der thermisch-mechanischen Behandlung wurden die Fasern nach dem Schneiden im Muffelofen für 4 h bei 400°C entschlichtet, anschließend im Rohrreaktor für 30 Minuten bei 800°C erhitzt und in der Planetenkugelmühle für 2 Minuten bei 500 Umdrehungen pro Minute gemahlen. Die Exposition von Zellen gegenüber Carbonfaserfragmenten erfolgte ausschließlich über die Vitrocell® Automated Exposure Station (s. 4.2.2.8 Exposition an

der Vitrocell® Automated Exposure Station). Nach Abscheidung nicht inhalierbarer Fasern durch einen Filter wurden die Fragmente temperiert und befeuchtet, bevor sie als Aerosol auf die Zellen deponiert wurden. Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahmen der CF-Stäube nach Deposition in der Expositionsstation wurden freundlicherweise von Sonja Mühlhopt zur Verfügung gestellt.

Die nachfolgenden Kapitel zur Materialcharakterisierung beziehen sich ausschließlich auf Min-U-Sil5.

4.2.1.2 Quarz-Partikelvorbereitung mittels NANOGENOTOX-Protokoll

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Quarz-Partikel wurden unmittelbar vor den Experimenten nach dem NANOGENOTOX Dispersions-Protokoll vereinzelt (Jensen *et al.*, 2017). Hierzu wurden die Partikel zur Herstellung von 6 mL Partikelsuspension in der gewünschten Konzentration in 10 ml Schraubdeckelgläser eingewogen. 30 μ L 96 %-iges Ethanol wurden zum *Pre-Wetting* auf die Partikel gegeben, anschließend 970 μ L 0,05 %-ige Bovine Serumalbumin-Lösung (BSA). Ungefähr eine Minute wurde das geschlossene Glas leicht auf eine Oberfläche geklopft, dabei gedreht und geschüttelt, um eine gute Verteilung der Partikel zu gewährleisten. Danach wurde mit BSA-Lösung auf das Zielvolumen aufgefüllt. Die Partikel wurden 13 Minuten und 25 Sekunden an einer Ultraschallspitze mit 10 % Amplitude sonifiziert. Dies entspricht einem Energieeintrag von 7056 ± 103 J. Nach der Sonifizierung wurden die Suspensionen sofort verwendet oder aliquotiert und bei -20 °C für weitere Experimente eingefroren. Nach dem Auftauen konnten die Suspensionen nach Sonifizierung in einem Ultraschallbad für 10 Minuten erneut verwendet werden. Für die submersen Experimente am IBCS wurden Quarz-Suspensionen mit einer Konzentration von 10 mg/mL in sterilem Wasser hergestellt und 15 Sekunden an der Ultraschallspitze sonifiziert.

4.2.1.3 Bestimmung der Größenverteilung durch Dynamische Lichtstreuung

Zur Bestimmung der Durchschnittsgröße sowie der Größenverteilung und Dispersität der verwendeten Materialien wurde Dynamische Lichtstreuung (DLS) mithilfe des Zetaser Nano ZS (Malvern) bestimmt. Nach erfolgter Partikelvorbereitung (s. 4.2.1.2 Quarz-Partikelvorbereitung mittels NANOGENOTOX-Protokoll) wurde 1 mL der Partikelsuspension in eine Küvette gegeben und der hydrodynamische Durchmesser der Partikel sowie der Polydispersitätsindex (PDI) bestimmt. Der PDI ist ein Maß für die Breite der Größenverteilung einer Partikelsuspension und liegt in einem Bereich von 0 (monodispers) bis 1 (polydispers) (Nobbmann & Morfesis, 2009).

4.2.1.4 Transmissionselektronenmikroskopie

Zur Erstellung von Aufnahmen der Materialien mit Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurden 1-2 μ L der Partikelsuspensionen nach Aufbereitung auf die TEM-Gitternetze gegeben. Um die Partikel nach Verneblung mit der Vitrocell® *Cloud* zu prüfen, wurde jeweils ein TEM-Gitternetz in die Expositions-kammer der *Cloud* gelegt und nach erfolgter

Exposition entnommen. Die Aufnahmen wurden freundlicherweise von Silvia Andraschko (Institut für Biologische und Chemische Systeme, KIT) an einem EM910-Mikroskop (Zeiss) erstellt.

4.2.2 Zellkulturexperimente

Alle Zellkulturexperimente wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt, mit Ausnahme der Expositionen in den Expositionsstationen. Die verwendeten Lösungen, Verbrauchsmaterialien und Geräte wurden vor Gebrauch jeweils autoklaviert, heißluftsterilisiert oder sterilfiltriert. Für Zellkulturarbeiten wurde eine *Laminar Flow* Sicherheitswerkbank der Stufe 2 verwendet und alle Materialien zuvor mit ca. 80 % Ethanol zum Sterilisieren abgewischt. Die Expositionen an den Expositionsstationen fanden unter semi-sterilen Bedingungen statt.

Für die Zellkultur benötigte Lösungen wurden unmittelbar vor ihrer Benutzung in einem Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt, mit Ausnahme von Accutase®, welche auf Raumtemperatur gebracht wurde.

Alle verwendeten Zelllinien wurden im Inkubator bei einer Temperatur von 37 °C, einer Luftfeuchte von 100 % und 5 % CO₂ kultiviert.

4.2.2.1 Zellkultur: A549

Basis vieler Experimente in dieser Arbeit ist die Zelllinie A549 (*American Type Culture Collection*: ATCC® CCL-185). Bei dieser-Zelllinie handelt es sich um Alveolarepithelzellen Typ II, welche an der Sekretion von *Surfactant* beteiligt sind und bei größeren Lungenschäden zu Epithelzellen Typ I differenzieren können. Die Zellen wurden dem Lungenkrebs eines 58-jährigen männlichen Patienten entnommen (Foster *et al.*, 1998; Giard *et al.*, 1973). A549-Zellen zählen als Standardzelllinie und werden in vielen Studien als Modell zur Erfassung des toxikologischen Potenzials von Partikel- und Faserstäuben in der Lunge verwendet (Bhowmick & Gappa-Fahlenkamp, 2016; Hiemstra *et al.*, 2018). Die Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Roel Schins (Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung fand in *Roswell Park Memorial Institute Medium* (RPMI-1640), supplementiert mit 10 % Fetalem Kälberserum (FKS) und 100 U/mL Penicillin sowie 100 µg/mL Streptomycin, statt. Eine Subkultivierung wurde zwei bis drei Mal in der Woche durchgeführt. Hierzu wurde das Medium vom Zellrasen entfernt, die Zellen mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) gewaschen und mit 0,25 %-iger Trypsin-EDTA-Lösung für drei Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von Medium wurde die Reaktion angehalten und die Zellen resuspendiert. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mithilfe des CASY® TT Zellzählgerätes. Zuletzt wurde eine definierte Zellzahl in eine neue Zellkulturflasche oder -schale übertragen.

Für Experimente wurden Zellen der Passagen 14 bis 35 verwendet.

4.2.2.2 Zellkultur: BEAS-2B

Als weitere Epithelzelllinie wurden die BEAS-2B-Zellen als Basis für die Experimente mit Partikel-Exposition verwendet (ATCC® CRL-9609). Die Zellen wurden freundlicherweise von PD Dr. Carsten Weiss (Institut für Biologische und Chemische Systeme, KIT) bereitgestellt. Es handelt sich hierbei um gesunde Zellen des Bronchialepithels, die nach Entnahme mit einem Adenovirus 12-SV40 Virus-Hybrid infiziert und dadurch immortalisiert wurden (Reddel *et al.*, 1988). Auch diese Zelllinie gilt als Standardzelllinie für Toxizitätsstudien, zeichnet sich jedoch durch einige Charakteristika aus, die sie von A549-Zellen unterscheidet. Obwohl es sich um Bronchialepithelzellen handelt, weisen BEAS-2B morphologische Merkmale sowohl von Bronchial- als auch Alveolarepithel auf. Vor allem ihr Status als nicht maligne Zellen macht sie besonders geeignet für Untersuchungen maligner Entwicklungen und DNA-Schäden (Bhowmick & Gappa-Fahlenkamp, 2016; Sun *et al.*, 2011). Die Kultivierung fand in Keratinocyte Growth Medium (KGM) statt (KGM-2 Bullet Kit). Alle Oberflächen, auf denen BEAS-2B-Zellen kultiviert wurden, mussten zuvor mit einer *Coating*-Lösung aus 10 µg/mL Fibronectin, 30 µg/mL Kollagen und 10 µg/mL BSA beschichtet werden. Die Lösung wurde 30 bis 60 Minuten bei 37 °C auf der Schale belassen und die Oberfläche nach beendeter Inkubation mit PBS gespült. Anschließend konnten die Zellen subkultiviert werden, dies fand ein bis zwei Mal in der Woche statt. Nach Waschen der Zellen mit PBS wurde Accutase® auf die Zellen gegeben und 6-8 Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von frischem Medium wurde der Ablösungsvorgang unterbrochen und die Zellsuspension in einem Zentrifugenröhrchen zur Entfernung der Accutase® zentrifugiert (1300 rpm, 3 min). Das entstandene Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert und nach einer Zellzählung eine definierte Zellanzahl in eine neue Zellkulturflasche oder -schale übertragen.

Für Experimente wurden Zellen der Passagen 40 bis 70 verwendet.

4.2.2.3 Zellkultur: THP-1

Zur Konstruktion von Co- und Triplekulturen und Erfassung einer möglichen inflammatorischen Antwort, wurde die THP-1 Zelllinie hinzugezogen (ATCC® TIB-202). Die Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Richard Gminski (Albert-Ludwig-Universität Freiburg, Abteilung für Umweltmedizin und Hygiene) zur Verfügung gestellt. Hierbei handelt es sich um eine Monozyten-Zelllinie, die einem Patienten mit akuter monozytärer Leukämie entnommen wurde (Tsuchiya *et al.*, 1980). Es kann durch Behandlung mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) eine Differenzierung zu einem Makrophagen-ähnlichen Phänotyp herbeigeführt werden (Tsuchiya *et al.*, 1982). Undifferenziert liegen die Zellen in Suspension vor, durch Differenzierung werden sie adhärent und führen keine Zellteilung mehr durch. Die Kultivierung fand analog zur A549-Zelllinie in RPMI-1640 mit 10 % FKS und 100 U/mL Penicillin sowie 100 µg/mL Streptomycin in T75-Zellkulturflaschen statt. Die Subkultivierung erfolgte einmal in der Woche und umfasste die Bestimmung der Zellzahl sowie die Übertragung von 5×10^5 Zellen in eine neue Zellkulturflasche. Vor Verwendung in einem Experiment mussten die Zellen mit 30 ng/mL PMA differenziert werden. Eine genaue Darstellung der verwendeten Zellzahlen und Volumina ist im Anhang (B Ergänzende

Daten) zu finden. Zur Differenzierung wurde eine definierte Zellzahl der Kulturflasche entnommen, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (1300 rpm, 3 min, Raumtemperatur). Das Zellpellet wurde in frischem Medium mit 30 ng/mL PMA resuspendiert und in eine Zellkulturschale oder -flasche überführt. Die Zelldichte sollte hierbei bei ca. $0,94 \times 10^5$ Zellen/cm² liegen. Nach vier Tagen Kultivierung mit PMA wurden die Zellen adhärent und es erfolgte eine dreitägige Inkubation mit Medium ohne PMA. Nach dieser konnten die differenzierten THP-1-Zellen (im Folgenden dTHP-1 genannt) für Experimente genutzt werden. Hierzu wurden die Zellen durch Inkubation mit Accutase® bei 37 °C für 10-15 Minuten abgelöst, eine Zellzählung durchgeführt und eine definierte Zellzahl ausgestreut.

Für Experimente wurden Zellen der Passagen 3 bis 30 verwendet.

4.2.2.4 Zellkultur: CCD-33Lu

Zur Erfassung einer fibrotischen Antwort auf Testmaterialien wurden CCD-33Lu-Zellen verwendet (ATCC® CRL-1490). Diese Fibroblasten wurden zu Beginn der Arbeiten bei ATCC erworben. Es handelt sich hierbei um Primärzelllinien, d.h. um Zellen, die gesunden menschlichen Geweben entnommen wurden und nicht immortalisiert sind. Dadurch zeichnen sie sich durch ein unregelmäßiges Wachstumsverhalten und eine kurze Kultivierungsdauer aus. Die Kultivierung fand in Dulbecco's Modified Eagle's Medium, *high glucose* (DMEM-HG) mit 10 % FKS und 100 U/mL Penicillin sowie 100 µg/mL Streptomycin statt. Eine Subkultivierung wurde zwei bis drei Mal in der Woche durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 0,05 % Trypsin-EDTA-Lösung zwei Minuten bei 37 °C inkubiert und eine definierte Zellzahl in eine neue Zellkulturschale oder -flasche gegeben. Eine Ablösung mithilfe von Accutase® ist ebenfalls möglich und wurde analog durchgeführt.

Für Experimente wurden Zellen der Passagen 3 bis 7 verwendet.

4.2.2.5 Kryokonservierung und Inkulturnahme

Zur Konservierung in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen nach den bereits beschriebenen Methoden abgelöst und gezählt. Hiernach wurden 3×10^6 Zellen in 1 mL frisch hergestelltem FKS mit 10 % DMSO in einem 2 mL Kryogefäß eingefroren. Für eine schonende Prozedur wurden die Zellen zunächst zwei bis vier Stunden bei -20 °C eingefroren, über Nacht bei -80 °C gelagert und am darauf folgenden Tag in flüssigen Stickstoff überführt. Zur Inkulturnahme wurde das Kryogefäß im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen mit frischem Medium oder PBS übertragen. Nach Zentrifugation zur Entfernung des DMSO (1300 rpm, 3 min) wurde das entstehende Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturschale oder -flasche überführt. Nach 24 h wurde die Kultur lichtmikroskopisch auf Konfluenz geprüft und gegebenenfalls subkultiviert oder einem Mediumswechsel unterzogen.

4.2.2.6 Exposition mit Min-U-Sil5 an der Vitrocell® Cloud

Expositionen an der Vitrocell® Cloud wurden in mehreren Schritten durchgeführt. Die Vorbereitung der benötigten Zellkulturen in Zellkultureinsätzen (sog. *Transwells*) wurde unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Die Expositionen selbst fanden unter semi-sterilen Bedingungen statt. Die Expositionsapparatur befand sich zum Schutz des Experimentators unter einer Abzugshaube.

Zellkulturvorbereitung

Die Zellen mussten vor Exposition in der *Cloud* an eine Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht (engl. *air-liquid interface*, ALI) gesetzt werden. Hierzu kamen *Transwell*-Platten zum Einsatz.

24 Stunden vor Start der Exposition wurden A549-Zellen in das apikale Kompartiment des *Transwells* ausgestreut. Hierzu wurde in das basolaterale Kompartiment 1 mL Medium gegeben und die *Transwells* bei 37 °C vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach den jeweiligen Protokollen abgelöst und einer Zellzählung unterzogen. Es wurden $2,2 \times 10^5$ Zellen in das apikale Kompartiment gegeben und das Volumen mit Medium auf 500 µL aufgefüllt. Am nächsten Tag wurde die Adhärenz und Konfluenz der Zellen lichtmikroskopisch geprüft. Voraussetzung für weitere Experimente war ein dichter Zell-*Monolayer*. Eine Stunde vor Start der Exposition wurde das apikale Medium entfernt und der Zellrasen mit PBS gewaschen, um das ALI herzustellen.

Cokultur

Zur Erfassung unterschiedlicher toxikologischer Antworten kamen in dieser Arbeit Co- und Triplekulturen zum Einsatz, in denen verschiedene Zelltypen interagieren können. Hierbei wurden Epithelzellen und Makrophagen jeweils in apikalen Kompartiment der *Transwells* cokultiviert, und im Falle der Experimente an der *Automated Exposure Station* ggfs. um Fibroblasten im basolateralen Kompartiment auf der Unterseite der *Transwell*-Membran ergänzt. Die Vorschrift für die Triplekultur ist in dem entsprechenden Kapitel zu finden. Die Zellkulturmodelle sind in Abbildung 4.1 dargestellt.

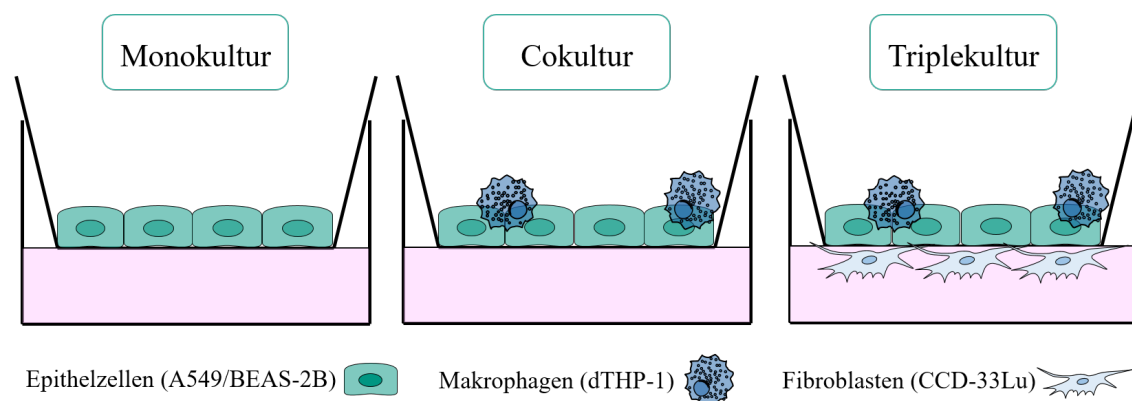


Abbildung 4.1: Darstellung der drei verwendeten Zellkultur-Modelle zur Erfassung der Partikel- und Fasertoxizität. Es wurden Lungeneithelzellen, Makrophagen-ähnliche Zellen sowie Fibroblasten für die drei *air-liquid interface*-Kulturen verwendet.

Zur Herstellung einer A549/dTHP-1-Cokultur wurden, wie bereits beschrieben, zunächst $2,2 \times 10^5$ A549-Zellen im apikalen Kompartiment ausgestreut. Nach ungefähr 4 bis 6 Stunden war ein Großteil der Zellen bereits adhärent angewachsen. Auf die A549-Zellen wurden daraufhin $3,3 \times 10^4$ dTHP-1-Zellen gegeben, um zum Zeitpunkt der Exposition eine Cokultur mit einem Verhältnis von 10:1 (Epithelzellen/Makrophagen) zu schaffen. Dies entspricht einem physiologischen Verhältnis von Epithelzellen zu Makrophagen im Alveolarbereich einer gesunden Lunge (Crapo *et al.*, 1982). Am nächsten Tag wurde eine Stunde vor Exposition das apikale Medium entfernt.

Vorbereitung des Expositionssystems und der Partikelsuspensionen

Am Tag vor der Exposition wurden die Inkubationskammer, die benötigten Aerosolgeneratoren und der Heizblock mit 80 %-igem Ethanol sterilisiert. Am Tag der Exposition wurde der Heizblock vorgewärmt, die Software zur Erfassung der Partikelsystem durch die QCM gestartet und so eingestellt, dass alle 3 Sekunden ein Datenpunkt für die deponierte Masse aufgezeichnet wurde. Die Partikelsuspensionen wurden wie zuvor beschrieben hergestellt (s. 4.2.1.2 Quarz-Partikelvorbereitung mittels NANOGENOTOX-Protokoll) bzw. aufgetaut, 10 Minuten im Ultraschallbad sonifiziert und mit der Pipette resuspendiert. Bevor die Zellkultureinsätze in die *Cloud* überführt wurden, wurden die Kavitäten mit 3,3 mL Medium oder bei Nichtbenutzung zur einfacheren Reinigung mit destilliertem Wasser gefüllt.

Exposition

Die Zellkultureinsätze wurden mithilfe einer sterilen Transportbox in die Kavitäten der *Cloud* überführt. Als Negativkontrolle wurde ein Teil der Zellkulturen in der Nebenkammer gegenüber $66,7 \mu\text{L}$ 1 %-igem PBS exponiert. Anschließend wurden die Zellen in der Hauptkammer mit $200 \mu\text{L}$ Partikelsuspension der gewünschten Konzentration bedampft. Während die Sedimentation der generierten Aerosole in den Kammern stattfand, erfolgte ein Mediumswechsel in den Zellkulturplatten. Nach 10 Minuten wurden die Kammern geöffnet und die Zellkultureinsätze in das frische Medium und den Inkubator überführt. Die Erfassung der deponierten Masse wurde nach Entfernung der Einsätze ca. 40 Minuten fortgesetzt, sodass mögliche Flüssigkeitsreste verdampfen und eine konstante Masse detektiert werden konnte. Die Deposition wurde aus dem Mittelwert der letzten 100 Datenpunkte ermittelt.

Abbruch der Nachinkubation

Die Zellkulturen wurden einer Nachinkubation von 24 Stunden ab Beginn der Exposition unterzogen. Im Falle der Cokultur wurden jedoch auch Experimente mit kürzeren Nachinkubationszeiten von 1, 3 und 6 Stunden durchgeführt. Nach diesen Zeiträumen wurde das Zellkulturmedium für weiterführende Untersuchungen, wie beispielsweise den LDH-Assay, in Eppendorf-Gefäße überführt und die Zellen apikal und basolateral mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden von den Einsätzen abgelöst. Hierzu wurden in der Monokultur apikal $200 \mu\text{L}$ und basolateral $500 \mu\text{L}$ 0,25 % Trypsin-EDTA appliziert und für jeweils 3 Minuten bei 37°C inkubiert. Für die Cokultur wurden analoge Volumina Accutase® verwendet.

Nach erfolgreicher Ablösung wurden die Zellen in 1 mL Medium aufgenommen und die Zellsuspensionen für weitere Untersuchungen verwendet.

4.2.2.7 Submerse Exposition mit Min-U-Sil5

Für die Durchführung submerse Expositionsexperimente wurden die Zellkulturen analog zu den ALI-Expositionen ausgestreut, jedoch in 24- und 12-Well-Platten sowie in 5 cm-Zellkulturschalen im Falle der dTHP-1-Zellen. Bei A549-Monokulturen wurden die Epithelzellen in einer Zelldichte von $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ in die jeweiligen Well-Platten gegeben. Zur Konstruktion einer Cokultur wurden nach 4-6 h dTHP-1-Zellen in einer Zelldichte von $3 \times 10^4/\text{cm}^2$ auf die bereits adhärennten A549-Zellen gegeben. Im Falle der dTHP-1-Monokultur wurden dTHP-1-Zellen in der gleichen Zelldichte direkt in 5 cm-Zellkulturschalen gegeben. Alle Kulturen wurden daraufhin über Nacht im Inkubator belassen.

Für die Inkubation mit Quarz wurden die Partikel in sterilem Wasser aufgenommen, resuspendiert und 15 Sekunden an der Ultraschallspitze sonifiziert. Anschließend wurden sie in vollständigem Zellkulturmedium auf die Zielkonzentrationen verdünnt. Das überstehende Medium wurde von den Zellen entfernt und die Partikelsuspensionen aufgegeben. Die A549-Mono- und A549/dTHP-1-Cokulturen wurden mit Quarzkonzentrationen von 15, 30 und $60 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ inkubiert. Bei dTHP-1-Monokulturen wurden mit 1,5, 3 und $6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ auch niedrigere Quarzkonzentrationen eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurde das Zellkulturmedium für die weiterführenden Untersuchungen gesammelt und die Zellen mit 0,25 % Trypsin-EDTA (A549-Monokulturen) oder Accutase® (A549/dTHP-1-Cokulturen und dTHP-1-Monokulturen) abgelöst.

4.2.2.8 Exposition an der Vitrocell® Automated Exposure Station

Expositionen an der Vitrocell® Automated Exposure Station wurden ähnlich zur Vitrocell® Cloud in drei Schritten durchgeführt, die im Folgenden geschildert sind.

Zellkulturvorbereitung

Die Vorbereitung der Zellkulturen fand analog zu den Expositionen in der Vitrocell® Cloud statt (s. 4.2.2.6 Exposition mit Min-U-Sil5 an der Vitrocell® Cloud). Allerdings wurden für diese Expositionsstation Zellkultureinsätze im 6-Well-Format und damit auch höhere Zellzahlen benötigt. Da für die Exposition an der Automated Exposure Station nur RPMI-1640-Medium verwendet werden kann, wurden die Zellen auch darin ausgestreut und nachinkubiert. Der Transport zur Expositionsstation sowie die Exposition erfolgten in 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)-gepuffertem Medium, da keine Pufferung durch CO_2 möglich war. Die Nachinkubation fand in FKS-freiem RPMI-1640 statt, um Interferenzen in den nachfolgenden Assays zu verhindern. Die verwendeten Medien sind in Tabelle 4.1 dargestellt.

Für die **BEAS-2B-Monokultur** wurden am Tag vor der Exposition die 6-Well-Zellkultureinsätze analog zur BEAS-2B-Zellkultur für zwei Stunden mit der zuvor genannten Coating-Mixtur überzogen. Nach Abnahme der Coating-Mischung und Waschen mit PBS wurden

Tabelle 4.1: Verwendete Medien bei Exposition von Lungenzellen an der Vitrocell® Automated Exposure Station Die jeweiligen Medien wurden mit Fetalem Kälberserum (FKS), Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep), L-Glutamin (L-Gln) und HEPES supplementiert.

Versuchsschritt	Medium
Ausstreuen	RPMI-1640 + 10 % FKS + 1 % Pen/Strep + L-Gln
Exposition	RPMI-1640 + HEPES + 1 % Pen/Strep + L-Gln
Nachinkubation	RPMI-1640 + 1 % Pen/Strep + L-Gln

$9,2 \times 10^5$ Zellen pro Einsatz in das apikale Kompartiment ausgestreut und 1,5 mL Medium in das basolaterale Kompartiment gegeben.

Um eine **BEAS-2B/dTHP-1-Cokultur** zu erhalten, wurden nach drei bis vier Stunden $1,84 \times 10^5$ dTHP-1-Zellen pro Einsatz auf die bereits vorhandenen BEAS-2B-Zellen ausgestreut.

Für eine **BEAS-2B/dTHP-1/CCD-33Lu-Triplekultur**, im Folgenden Triplekultur oder 3D-Kultur genannt, mussten nach dem *Coating*, jedoch vor Ausstreuen der BEAS-2B-Zellen, die CCD-33Lu-Zellen ausgestreut werden. Hierzu wurden die mit *Coating* überzogenen Einsätze invertiert in 10 cm-Petrischalen gestellt und $4,2 \times 10^5$ CCD-33Lu-Zellen in 1 mL Medium vorsichtig auf die Membran pipettiert. Die Zellen wurden für eine Stunde unter der Sterilbank inkubiert und anschließend das Medium bei leichtem Kippen der Einsätze entfernt. Daraufhin wurden die Einsätze in die Ausgangslage zurückgebracht und in vorgewärmte 6-Well-Platten mit jeweils 1,5 mL Medium transferiert sowie 500 μ L Medium in das apikale Kompartiment gegeben. Hiernach konnte mit dem Ausstreuen der BEAS-2B und dTHP-1-Zellen wie bereits beschrieben fortgefahren werden.

Nach Abschluss des Ausstreuens wurden die Zellen über Nacht im Inkubator belassen. In Abbildung 4.2 ist ein Beispiel für die Probenaufteilung für ein Experiment an der Expositionsstation dargestellt.

Vorbereitung, Exposition und Nachbereitung

Am Tag der Exposition wurde das Expositionsmedium in eine sterile Glasflasche überführt und zusammen mit zwei Wärmeelementen bei 37 °C aufgewärmt. Eine Pinzette wurde desinfiziert und die benötigten Pipettenspitzen in sterile Aluminiumfolie gewickelt. Das Medium im apikalen Kompartiment der Zellkultureinsätze wurde vorsichtig entfernt und das Medium im basolateralen Kompartiment durch Expositionsmedium ersetzt. Die Inkubator-kontrollen wurden in einen CO₂-freien Inkubator überführt, während die restlichen Proben mit dem aufgewärmten Medium und den Wärmeelementen in einem Transportbehälter zur Expositionsstation am ITC transportiert wurden. In jedes *Well* der Expositionsmodule wurden 6,3 mL Medium gegeben und die Einsätze in die jeweilige Position transferiert, auf etwaige Luftblasen überprüft und gegebenenfalls Medium nachgefüllt. Die verwendeten Module wurden geschlossen und die Exposition durch Mitarbeiter des ITC gestartet.

Nach einer Stunde wurde die Exposition beendet und die Einsätze mit den Zellen in die 6-Well-Platten transferiert. Das Medium wurde in 15 mL-Röhrchen gegeben und Zellen sowie Medium zurück ins Zellkultur-Labor transportiert. Das Medium wurde bei 4 °C für eine mögliche Kontrolle der Exposition aufbewahrt. Es erfolgte bei allen Zell-Proben daraufhin

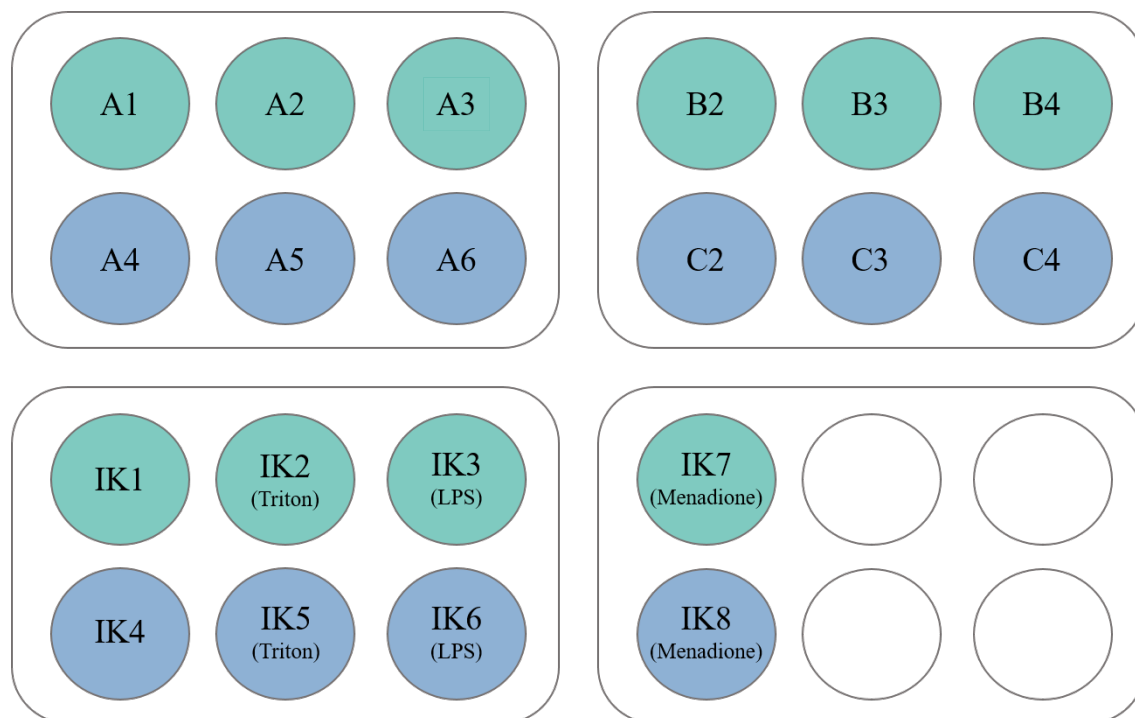


Abbildung 4.2: Position und Behandlungsarten für ein Beispiexperiment an der Vitrocell® Automated Exposure Station In blau sind die Proben einer BEAS-2B-Monokultur dargestellt, in grün die Proben einer BEAS-2B/dTHP-1-Cokultur. Die Einsätze des A-Moduls wurden als *Clean Air Control* reiner Luft ausgesetzt, die Einsätze des B- und C-Moduls wurden gegenüber Carbonfasern exponiert. Die Inkubator-Kontrollen (IK) wurden für die Dauer der Exposition in einem CO₂-freien Inkubator belassen und jeweils mit 0,1 % Triton X-100 (IK2, IK5), 10 µg/mL LPS (IK3, IK6) oder 100 µM Menadion (IK7, IK8) inkubiert.

ein Mediumswechsel. Dafür wurde das HEPES-gepufferte Medium auf der basolateralen Seite entfernt und frisches RPMI-1640 ohne FKS für die Nachinkubation zugegeben. Eine Inkubator-Kontrolle wurde vor Start der Nachinkubation mit 10 µg/mL LPS versetzt. Falls keine Nachinkubation erfolgte, wurde ohne Mediumswechsel mit dem nächsten Schritt fortgefahren (s. Abbruch der Nachinkubation). Zur Verwendung als Blindwert für den LDH-Assay sowie den Interleukin-8 ELISA und zum Auffüllen der Proben wurde reines Medium in T25-Flaschen gegeben und in den Inkubator gestellt. Die exponierten Zellen wurden für 0, 3 oder 23 Stunden im Inkubator nachinkubiert.

Abbruch der Nachinkubation

Eine Stunde vor Abbruch der Nachinkubation wurde eine Inkubator-Kontrolle mit 100 µM Menadion inkubiert, eine halbe Stunde vor Abbruch eine weitere Inkubator-Kontrolle mit 0,1 % Triton X-100 versetzt. Nach Ende des Nachinkubationszeitraums wurde das Medium abgenommen und für den LDH-Assay sowie den IL-8 ELISA aufbewahrt. Apikal und basolateral wurde 0,05 % Trypsin-EDTA-Lösung zum Ablösen der Zellen hinzugefügt und fünf Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Falle der Triplekultur wurde anstelle von Trypsin-EDTA-Lösung Accutase® verwendet. Der Ablösevorgang wurde durch Zugabe von RPMI-1640 mit FKS terminiert und die Zellen in 15 mL-Röhrchen übertragen. Hiernach erfolgte eine Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer. Ein Aliquot der Zellen (3×10^5 Zellen)

wurde für die Alkalische Entwindung abgenommen, der Rest der Zellen wurde zentrifugiert und in Form von Pellets für Genexpressionsanalysen bei -80°C eingefroren.

Nach Durchführung der Alkalischen Entwindung wurden die Proben für die nachfolgende Chromatographie sowie die Pellets für die Genexpressionsanalysen gekühlt zu den Laboren am IAB transportiert.

4.2.3 Zytotoxizitätsstudien

Um eine mögliche zytotoxische Antwort festzustellen, wurden in dieser Arbeit verschiedene Methoden angewandt, welche unterschiedliche Parameter beleuchten. Die Zytotoxizitätsstudien wurden jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt.

4.2.3.1 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung bzw. die Bestimmung des *relative cell count* (RCC) gibt erste Hinweise auf die mögliche zytotoxische Wirkung einer Substanz. Falls die Anzahl der Zellen im Vergleich zu einer Negativkontrolle reduziert ist, liegt dies zumeist an einem vermehrten Absterben der Zellen oder einer verminderten Proliferation. Für diese Methode wurde, wie für andere Zellzahlbestimmungen, das CASY® TT Zellzählgerät verwendet. Je nach Zelltyp wurden unterschiedliche *Gating*-Strategien verwendet, die es ermöglichen, neben der absoluten Zellzahl auch eine relative Viabilität in Prozent zu messen, indem bestimmte Größenbereiche für abgestorbene Zellen oder Zelltrümmer definiert werden.

Hierzu wurden aus den erstellten Zellsuspensionen $50\ \mu\text{L}$ in ein mit $5\ \text{mL}$ *Casy-Ton* gefülltes *Casy-Cup* gegeben. Aus dem *Casy-Cup* wird anschließend durch eine Kapillare Zellsuspension ins Messgerät gezogen und die Zählung durch Streulichtmessung durchgeführt.

In den Laboren des IBCS am Campus Nord wurden Neubauer-Zählkammern für die Zellzählung verwendet. Dazu wurde ein Aliquot der abgelösten Zellen abgenommen, $10\ \mu\text{L}$ der Zellsuspension in die Kammer pipettiert und die Zellzahl mithilfe eines Lichtmikroskops bestimmt.

4.2.3.2 Lactatdehydrogenase-Assay (LDH)

Bei dem Lactatdehydrogenase-Assay (LDH-Assay) wird die Freisetzung von LDH aus den Zellen in das umgebende Medium detektiert. LDH ist ein im Zytosol lokalisiertes Enzym, welches nur bei Schädigung der Zellmembran in den extrazellulären Raum freigesetzt wird. Die Membranschäden stellen hier das Maß für die Zytotoxizität dar.

Bei Arbeiten am IAB wurde für die Quarz-Experimente der CytoTox-ONE™-Assay verwendet. Er basiert auf der LDH-abhängigen Umsetzung des Substrates Resazurin zum Produkt Resorufin, welches durch Fluoreszenzmessung detektiert werden kann. $100\ \mu\text{L}$ des frisch abgenommenen Mediums wurden in eine 96-Well-Platte vorgelegt. $100\ \mu\text{L}$ Substratlösung wurden zugegeben und die Platte 10 Minuten bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von $50\ \mu\text{L}$ Stopp-Lösung wurde die Reaktion angehalten und der entstandene Farbstoff für mehrere Stunden stabilisiert. Die Detektion erfolgte durch Fluoreszenzmessung mithilfe eines Plattenlesegerätes (Absorption: $560\ \text{nm}$, Emission: $590\ \text{nm}$).

Als Positivkontrolle wurden Zellen im *Transwell* für fünf Minuten apikal mit einer 2 %-igen Triton X-100-Lösung inkubiert. Der ermittelte Wert für die Positivkontrolle wurde mit 100 % LDH-Freisetzung gleichgestellt. Als Negativkontrolle wurde neben PBS- bzw. Reinluftkontrollen auch Medium ohne Zellen verwendet und die Zytotoxizität aus den Fluoreszenzwerten (F) mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zytotoxizität [\%]} = 100 * \frac{F(\text{Probe}) - F(\text{Medium})}{F(100\% \text{ LDH-Freisetzung}) - F(\text{Medium})} \quad (4.1)$$

Bei Arbeiten am IBCS wurde für die Carbonfaser-Experimente das LDH Test Kit (Roche) verwendet. Die Durchführung fand analog zum CytoTox-ONE-Assay statt. Lediglich die Positivkontrolle mit Triton X-100 wurde auf andere Weise angesetzt: es wurde 30 Minuten mit einer 0,1 %-igen Triton-Lösung inkubiert. Die Detektion erfolgte durch Absorptionsmessung bei 490 nm.

4.2.4 Genexpressionsanalysen

Die Genexpressionsanalysen wurden mithilfe einer quantitativen Hochdurchsatz-PCR unter Verwendung der Reversen Transkriptase (HT RT-qPCR) durchgeführt, welche zuvor im Arbeitskreis etabliert wurde (Fischer *et al.*, 2016). Hierbei wird die mRNA aus Zellproben isoliert, in DNA transkribiert und einer quantitativen PCR unterzogen. Auf diese Weise ist es möglich, die Menge an Gentranskripten bestimmter Gene im Vergleich zu einer Negativkontrolle zu quantifizieren. Dies gibt Aufschluss über eine mögliche Aktivierung oder Repression bestimmter Gene. Da es sich um eine Hochdurchsatz-Methode handelt, ist es möglich, die Expression von 95 Genen in 96 unterschiedlichen Proben zeitgleich zu messen. Das ursprünglich etablierte Genset wurde im Rahmen des CFC-Projektes um 16 neue Gene erweitert, die Signalwege der Inflammation und Fibrose abdecken. Eine Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Gene ist im Anhang zu finden (s. B Ergänzende Daten).

Die nach der jeweiligen Exposition generierten Zellsuspensionen wurden einer Zentrifugation unterzogen (1300 rpm, 4 min, 4 °C), der Rückstand in kaltem PBS resuspendiert und erneut bei gleichen Einstellungen zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die entstandenen Zellpellets bei -80 °C aufbewahrt, bis die Genexpressionsanalyse durchgeführt wurde.

Die Arbeiten für die HT RT-qPCR wurden in Werkbänken durchgeführt, welche je nach Arbeitsschritt RNA- bzw. DNA-frei gehalten und mit 80 % Ethanol gesäubert wurden.

RNA-Isolierung und –Quantifizierung

Für die Isolierung der RNA aus den Zellpellets wurde das NucleoSpin® RNA Plus Kit (Macherey-Nagel) verwendet.

Die Zellpellets wurden in 350 µL Lysepuffer aufgenommen, mithilfe eines Vortexmischers gemischt und auf die *gDNA Removal*-Säule überführt. Es erfolgte eine Zentrifugation (11000 g, 30 s), woraufhin mit dem Durchgang weitergearbeitet wurde. Das Lysat wurde mit 100 µL *Binding Solution* auf eine zweite, RNA-bindende Säule gegeben, wonach eine

weitere Zentrifugation stattfand (11000 g, 30 s). Es folgten drei Waschschr tte mit jeweils 200 μL *Washing buffer 1* (WB1), 600 μL *Washing buffer 2* (WB2) und 250 μL WB2. Zwischen den Waschschr tten erfolgten jeweils Zentrifugationen bei 11000 g für 20 Sekunden und zuletzt für zwei Minuten. In einem letzten Schritt wurde die Säule mit der aufgereinigten RNA auf ein Eppendorf-Gefäß gegeben und die RNA nach Zugabe von 30 μL Nukleinsäure-freiem Wasser durch Zentrifugation (11000 g, 1 min) eluiert. Die isolierte mRNA konnte bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert werden.

Bevor die mRNA in cDNA transkribiert werden konnte, musste die RNA-Konzentration bestimmt werden. Hierzu wurden die Proben aufgetaut, durchmischt und 2 μL der RNA-Lösung auf eine NanoQuant-Platte gegeben. Durch Messung der Absorption bei 260 nm konnte die RNA-Konzentration bestimmt werden. Darüber hinaus wurde durch Bildung der Quotienten zwischen der Absorption bei 260 und 280 nm die Reinheit der Proben gewährleistet. Hierbei durfte ein Wert von 2,0 nicht unterschritten werden.

Umschreibung in cDNA durch Reverse Transkription

Die Transkription der mRNA in cDNA wurde unter Verwendung des *qScript cDNA Synthesis Kit* (QuantaBio) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Hierzu wurde das Volumen der mRNA-Lösung, welches 1 μg RNA entspricht, mit 5 μL Mastermix (1 μL Reverse Transkriptase, 4 μL *5x Reaction Mix*) in einer Kavitt t eines 8er PCR-Streifens vermengt und das Volumen mit Nuklease-freiem Wasser auf 20 μL ergänzt. Die Proben wurden durch mehrere Zentrifugations- und Mischschritte mithilfe eines Vortexmischers gut durchmischt. Die Streifen wurden anschließend in einen Thermocycler überführt. Die Transkription fand mithilfe des in Tabelle 4.2 dargestellten Temperaturprogramms statt. Die cDNA konnte mehrere Wochen bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt werden.

Tabelle 4.2: Temperaturprogramm für die cDNA-Synthese.

Zeit[min]	Temperatur [$^\circ\text{C}$]
5	25
30	42
5	85
∞	4

Präamplifikation

Vor Durchführung der RT-PCR musste eine ausreichende Menge an cDNA für eine erfolgreiche Detektion gewährleistet werden. Hierzu wurde eine Präamplifikation der Zielgene über 12 PCR-Zyklen durchgeführt. Zuvor musste ein *Pooled Primer Mix* (PPM) hergestellt werden, in dem alle Primer in einer PCR-Kavitt t gesammelt wurden (Endkonzentration: 500 nM). Dieser konnte für mehrere Ansätze hergestellt und zwischendurch bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert werden.

Pro Ansatz wurden daraufhin 2,5 μL TaqMan PreAmp Master Mix (2x), 0,5 μL PPM, 0,75 μL Nukleinsäure-freies Wasser und 1,25 μL der cDNA-Probe vermischt. Die Proben

wurden in mehreren Zentrifugations- und Mischschritten sorgfältig durchmischt und in einen Thermocycler überführt. Es wurden zusätzlich zwei Kontrollproben mitgeführt, jeweils ohne DNA (NTC-STA) und mit nicht transkribierter RNA (noRT). Die Proben wurden dem in Tabelle 4.3 dargestellten Temperaturprogramm unterzogen.

Tabelle 4.3: Temperaturprogramm für die Präamplifikation.

Zeit	Temperatur [°C]
10 min	95
15 sek (12 Zyklen)	95
4 min (12 Zyklen)	60
∞	4

Exonuklease-Verdau

Nach Abschluss der Präamplifikation wurde sofort ein Exonukleaseverdau der amplifizierten DNA-Proben durchgeführt. Zu jeder Probe wurden 2 µL Exonuklease I-Lösung gegeben (0,4 µL Exonuklease I zu 20 Einheiten/µL, 0,2 µL Exonuklease I *Reaction buffer* und 1,4 µL Nukleinsäure-freies Wasser) und vorsichtig vermengt. Im Thermocycler erfolgte der Verdau nach dem in Tabelle 4.4 dargestellten Temperaturprogramm.

Tabelle 4.4: Temperaturprogramm für den Exonukleaseverdau.

Zeit [min]	Temperatur [°C]
40	37
15	80
∞	4

Nach Beendigung des Verdau wurden die Proben durch Zugabe von TRIS-EDTA-Puffer fünffach verdünnt, gründlich gemischt und zentrifugiert. Die Proben wurden über Nacht bei -20 °C gelagert.

Primerverdünnung und Vorbereitung der Proben

Die verwendeten Primer wurden vor Durchführung der qPCR auf eine Konzentration von 5 µM gebracht. Hierzu wurden zu 2,5 µL *forward* und *reverse* Primer (jeweils 100 µM) 25 µL *Assay Loading Reagent* (2x) und 22,5 µL DNA-Suspensionspuffer gegeben. Darüber hinaus wurde eine *no reagent control* (NRC) mit 2,5 µL Nukleinsäure-freiem Wasser mitgeführt. Die so verdünnten Primer konnten bei -20 °C gelagert werden.

Zur Probenvorbereitung wurden je 2,25 µL der verdauten Proben mit je 2,5 µL *SsoFast EvaGreen Supermix with Low ROX* (2x) und 0,25 µL *DNA Binding Dye Sample Loading Reagent* (20x) gründlich vermischt und zentrifugiert. Es wurde zusätzlich zu den Kontrollen aus der Präamplifikation und dem Exonukleaseverdau eine weitere *no template control* (NTC) mitgeführt, in der die verdaute Probe mit Nukleinsäure-freiem Wasser ersetzt wurde.

96 x 96 Dynamic Array IFC qPCR Analyse

Für die qPCR wurde ein *Dynamic Array integrated fluidic circuit* (IFC) verwendet, nachfolgend als Chip bezeichnet. Beide Akkumulatoren des Chips wurden mit *Control Line Fluid* befüllt und dieser nach Entfernung der Schutzfolie in den *IFC Controller HX* überführt. Es folgte das sogenannte *Priming* des Chips, bei welchem das *Control Line Fluid* in das Mikrofluidik-System geleitet wird. Nach Beendigung des *Priming* wurde der Chip innerhalb von zwei Stunden beladen.

Dazu wurden luftblasenfrei auf der *Assay*-Seite jeweils 5 µl eines Primers und auf der *Sample*-Seite jeweils 5 µl einer Probe in eine Kavität gegeben. Die Proben und Primer wurden durch ein weiteres Programm im *IFC Controller HX* in die Reaktionskammern des Chip geleitet und dort durchmischt. Anschließend wurden mögliche Staubpartikel vom Chip entfernt. Zum Schluss konnte der Chip in das BioMark™-System überführt werden, in welchem die qPCR nach dem in Tabelle 4.5 dargestellten Temperaturprogramm durchgeführt wurde.

Tabelle 4.5: Temperaturprogramm für die qPCR.

Zeit	Temperatur [°C]
40 min	70
30 s	60
60 s	95
5 s (30 Zyklen)	96
20 s (30 Zyklen)	60
3 s	60
1 °C/3 s	bis 95

Datenauswertung

Die in der qPCR generierten Schmelzkurven der Proben wurden zunächst mithilfe der Software *Fluidigm Real-Time PCR Analysis* analysiert. Die C_q -Werte wurden mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffes EvaGreen® bestimmt, welcher in die DNA interkaliert und so eine Änderung des Fluoreszenzsignals herbeiführt. Mithilfe der Software wurde eine Basislinienkorrektur zur Präzisierung der C_q -Werte durchgeführt. Eine erste Überprüfung der Messwerte konnte durch eine Darstellung als *Heatmap* oder durch genauere Betrachtung der einzelnen Schmelzkurven erfolgen.

Nach abgeschlossener Datenverarbeitung wurden die prozessierten Daten exportiert und weiter mit der *GenEx*-Software ausgewertet. Es wurden mehrere Prozessierungsschritte durchgeführt (Fischer *et al.*, 2016). Unter anderem wurde ein *Cutoff* der C_q -Werte von 28 festgelegt, da bei einer höheren Anzahl an Zyklen die Genauigkeit der PCR nicht mehr gewährleistet ist. Mithilfe der Funktionen *geNorm* und *Normfinder* wurde eine optimale Auswahl an Referenzgenen vorgenommen. Zur Ermittlung der effektiven C_q -Werte wurde die $\Delta\Delta C_q$ -Methode verwendet. Zunächst fand eine Normierung mithilfe der ausgewählten Referenzgene statt:

$$\Delta C_q = C_q (\text{Zielgen}) - C_q (\text{Referenzgen}) \quad (4.2)$$

Anschließend wurden die Negativkontrollen subtrahiert:

$$\Delta\Delta C_q = \Delta C_q (\text{Probe}) - \Delta C_q (\text{Negativkontrolle}) \quad (4.3)$$

Die Expression der Negativkontrollen wurde im Verlauf der Auswertung auf einen relativen Wert von 1 festgelegt, sodass bei den Proben eine relative Veränderung berechnet werden konnte. Da in der Software mit den \log_2 -Werten der berechneten C_q -Werte umgegangen wird, wurde gegebenenfalls eine Umrechnung in den Numerus durchgeführt:

$$\text{Veränderung} = 2^{-\Delta\Delta C_q} \quad (4.4)$$

Als relevant für diese Arbeit wurden Veränderungen der Genexpression in der Größenordnung von Verdopplungen/Halbierungen betrachtet.

4.2.5 Zytokinfreisetzung durch *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

Zur Ermittlung einer möglichen inflammatorischen Antwort nach Quarz- bzw. Carbonfaserexposition wurde ein *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) zur quantitativen Bestimmung des Chemokins Interleukin-8 (IL-8) durchgeführt.

Der ELISA basiert auf einer Detektion von Proteinen durch spezifische Antikörper. Es handelt sich hierbei um eine weit verbreitete Standardmethode. Hierbei wird der Sandwich-ELISA häufig verwendet, bei welchem das Zielprotein zunächst an einen immobilisierten Antikörper im *Well* bindet und ein zweiter Antikörper an das gebundene Antigen bindet. An diesen Primärantikörper bindet ein spezifischer Sekundärantikörper, welcher mit einem Enzym markiert ist. Das Enzym setzt daraufhin ein abschließend zugegebenes Substrat um, was zu einem Fluoreszenz- oder Chemilumineszenz-Signal führt, welches mit einem Plattenlesegerät detektiert werden kann. Die Fluoreszenz ist hierbei proportional zur Menge an gebundenem Protein. (Uotila *et al.*, 1981)

In dieser Arbeit wurde das IL-8 Human Uncoated ELISA Kit (ThermoFisher Scientific) nach Herstellerangaben verwendet. Hierzu wurde eine 96-*well*-Platte über Nacht bei 4 °C mit einem *capture*-Antikörper beschichtet. Nach Blockieren der Platte mit ELISASPOT-Puffer für 1 h bei RT wurden die Standards sowie die ggfs. verdünnten Proben aufgetragen. Die Platte wurde 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde der *detection*-Antikörper sowie ein Konjugat aus Avidin und der Meerrettichperoxidase (HRP: engl. *horse radish peroxidase*) zugesetzt und eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Zum Schluss wurde die Substratlösung (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) in die Platte gegeben und für ca. 15 Minuten bei RT inkubiert. Die Farbintensität des Produktes konnte bei 650 nm verfolgt werden. Bei einer ausreichenden Farbstoffkonzentration wurde die Reaktion mit 2 N H₂SO₄ gestoppt. Die Detektion erfolgte durch Messung der Absorption bei 450 nm.

4.2.6 Ermittlung von DNA-Strangbrüchen durch Alkalische Entwindung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte auch der Einfluss von partikulären und faserförmigen Substanzen auf die genomische Stabilität untersucht werden. Hier wurde die Alkalische

Entwindung (AU) zur Detektion von DNA-Strangbrüchen verwendet (Hartwig *et al.*, 1996). Die Methode basiert auf der Entwindung der genomischen DNA an DNA-Strangbrüchen durch eine alkalische Lösung. Durch eine anschließende Säulenchromatographie kann einzelsträngige von doppelsträngiger DNA getrennt und mithilfe einer interkalierenden Substanz photometrisch detektiert werden.

Für die Durchführung der Alkalischen Entwindung (AU) wurden den Zellsuspensionen, die durch Ablösung der Zellen vom *Transwell* generiert wurden, jeweils 3×10^5 Zellen für zwei technische Replikate entnommen.

Als Positivkontrolle wurde eine 30 mm-Schale mit unbehandelten, submers kultivierten Zellen für eine Stunde mit $100 \mu\text{M}$ Menadion in Medium inkubiert. Für Arbeiten am IBCS wurde die Positivkontrolle analog zu den anderen Proben im Zellkultureinsatz angesetzt und apikal mit 1 mL sowie basolateral mit 1,5 mL $100 \mu\text{M}$ Menadion für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgelöst und analog zu den exponierten Proben behandelt.

Alle Schritte wurden unter Lichtausschluss durchgeführt. Die Zellsuspensionen wurden einer Zentrifugation unterzogen (1300 rpm, 4 min, 4°C) und die entstandenen Pellets in $30 \mu\text{L}$ kaltem PBS resuspendiert, sodass eine Zellkonzentration von $1,5 \times 10^4$ Zellen/ μL erreicht wurde. Die Suspensionen wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt.

Die benötigte alkalische Lösung musste frisch am Tag vor Durchführung des Experimentes hergestellt und auf einen für jede Zelllinie spezifischen pH-Wert gebracht werden (A549/BEAS-2B: 12,1; CCD-33Lu: 11,8). Auf $15 \mu\text{L}$ der Zellsuspension wurden $1500 \mu\text{L}$ alkalische Lösung gegeben und zur Entwindung der DNA eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine Neutralisation auf $\text{pH}=6,8$ mit $0,1 \text{ N}$ HCl und eine Sonifizierung mithilfe einer Ultraschallspitze für 15 Sekunden (10 % Amplitude, konstante Sonifizierung). Die entwundene und fragmentierte DNA wurde durch Zugabe von $15 \mu\text{L}$ 10 % Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS) stabilisiert und konnte bis zur chromatographischen Trennung bei -20°C gelagert werden.

Säulenchromatographische Trennung und Fluoreszenz-Messung

Die chromatographische Trennung erfolgte unter Lichtausschluss und bei einer Temperatur von 60°C . Die genaue Zusammensetzung der Puffer ist im Anhang in Tabelle A.2 zu finden. Zur Trennung der DNA wurden Hydroxylapatit-Säulen verwendet. Hydroxylapatit wurde hierfür in einer Konzentration von $0,1 \text{ g/mL}$ in $0,01 \text{ M}$ NaP-Puffer suspendiert und 30 Minuten bei 60°C inkubiert. Es wurden 1 mL Hydroxylapatit-Suspension für jede Säule zwischen zwei Glasfaserfilter gegeben und im Anschluss zur Entfernung von DNA-Verunreinigungen mit $0,5 \text{ M}$ KP-Puffer gewaschen. Eine Äquilibrierung der Säulen erfolgte mit $0,01 \text{ M}$ NaP-Puffer, wonach die auf 60°C vorgewärmten DNA-Proben auf die Säulen gegeben wurden. Nach weiterer Zugabe von $0,01 \text{ M}$ NaP-Puffer wurde einzelsträngige DNA zunächst durch Zugabe von $0,15 \text{ M}$ KP-Puffer, und anschließend doppelsträngige DNA durch Zugabe von $0,35 \text{ M}$ KP-Puffer in eine 24-Well-Platte eluiert.

Die DNA wurde durch Zugabe des Höchst-Farbstoffes H33258 angefärbt ($7,5 \times 10^{-7} \text{ M}$). Nach 20 Minuten wurde die Fluoreszenzintensität am Plattenlesegerät bestimmt (Absorption: 360 nm , Emission: 455 nm).

Berechnung des Anteils doppelsträngiger DNA

Die Anzahl der DNA-Strangbrüche sollte in Vergleich zu einer unbehandelten PBS- oder Reinluftkontrolle sowie der Positivkontrolle Menadion gesetzt werden. Maß hierfür ist der Anteil an doppelsträngiger DNA nach Entwindung mit der alkalischen Lösung. Von der Fluoreszenz (F) der Proben wurde die Fluoreszenz der Blindwerte (KP-Puffer) subtrahiert:

$$F \text{ (bereinigt)} = F \text{ (Probe)} - F \text{ (Blindwert)} \quad (4.5)$$

Der Höchst-Farbstoff interkaliert aufgrund der unterschiedlichen Strukturen stärker in doppelsträngige als in einzelsträngige DNA, was mithilfe eines Korrekturfaktors berücksichtigt wird (Korrekturfaktor = 2,1) (Hartwig *et al.*, 1996):

$$\text{Anteil dsDNA [\%]} = \frac{F \text{ (dsDNA)}}{F \text{ (dsDNA)} + 2,1 * F \text{ (ssDNA)}} \quad (4.6)$$

Der prozentuale Anteil an doppelsträngiger DNA gibt Aufschluss über die Integrität der DNA in den Zellen. Mit Menadion behandelte Zellen sollten einen Anteil von 10 bis 20 % aufweisen, unbehandelte Zellen sollten zwischen 60 und 80 % intakte DNA besitzen.

4.2.7 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse werden jeweils als Mittelwerte mit ermittelter Standardabweichung dargestellt.

Um signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Ergebnissen zu ermitteln, wurden statistische Analysen durchgeführt. Hierzu wurde bei Bezug einer Probe auf eine Kontrolle und zur Bestimmung von Unterschieden zwischen verschiedenen Modellen der Student's T-Test angewandt. Bei Bezug mehrerer Proben auf eine Kontrolle wurde ein einfaktorieller ANOVA mit anschließendem Dunnett's Post-Hoc Test durchgeführt. Hierzu wurde die Real Statistics Resource Pack Software verwendet (Version 7.6). *p*-Werte unter 0,05 (*), 0,01 (**), und 0,005 (***) wurden als signifikant betrachtet.

KAPITEL 5

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Verwendung innovativer Materialien wie Nanopartikel, CNTs, Metallnanodrähte (engl. *Nanowire*) und auch Carbonfasern wird stetig vorangetrieben und die Verwendung ebendieser Materialien in der Industrie nimmt aufgrund ihrer zahlreichen vielversprechenden Eigenschaften zu. Es ist von größter Bedeutung, neuartige Materialien toxikologisch zu untersuchen, um so mögliche Gefahren für Arbeitskräfte und konsumierende Bevölkerung zu erkennen und diese zu minimieren. In diesem Kontext sollen in dieser Arbeit zwei Materialien, der α -Quarz Min-U-Sil5 und Carbonfasern als innovatives Material, toxikologisch untersucht werden. Im Fokus steht hier die Inhalation, da es sich dabei um den primären Expositionsweg bei industrieller Verarbeitung der beiden Materialien handelt. Die Materialien werden mithilfe von *in-vitro*-Expositionsmethoden auf verschiedene Lungenzellen-basierte Modellsysteme aufgebracht und die Zellen daraufhin hinsichtlich relevanter toxikologischer Endpunkte begutachtet. Als physiologisch realistischere Modelle werden neben klassischen submersen Monokultur-Szenarien auch Cokultur-Modelle, in denen mehrere Zelltypen zusammen kultiviert werden und miteinander wechselwirken können, und ALI-Modelle eingesetzt. Im ersten Teil dieser Arbeit werden diese verschiedenen Modelle gegenübergestellt und deren Eignung zur Untersuchung dieser Fragestellung mithilfe des gut untersuchten Min-U-Sil5-Quarzes überprüft. Ziel ist es, geeignete Modelle zu identifizieren und detaillierte toxikologische Mechanismen beim Zusammenspiel verschiedener Zellarten aufzuschlüsseln. Im zweiten Teil der Arbeit werden vergleichbare Modelle hinsichtlich ihrer toxikologischen Antwort auf unterschiedlich vorbehandelte Carbonfasern untersucht. Hierbei soll ein spezielles Augenmerk auf die verschiedenen Arten der physikalischen Vorbehandlung und dadurch veränderte toxikologische Profile gelegt werden.

5.1 Vergleich unterschiedlicher Lungenzellmodelle in Hinblick auf die Toxizität von α -Quarz

Um die Empfindlichkeit unterschiedlicher Zellkulturmodelle zu untersuchen, wurden diese gegenüber dem α -Quarz Min-U-Sil5 exponiert. Min-U-Sil5 ist ein toxikologisch gut charakterisiertes Material und dient in diversen Studien als Positivkontrolle, insbesondere für inflammatorische Prozesse (Fenoglio *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2006; Warheit *et al.*, 2007). Für die Untersuchungen wurde die Alveolarepithelzelllinie A549 submers und an einem ALI kultiviert. Darüber hinaus wurden Cokulturen mit differenzierten THP-1-Zellen (dTHP-1) etabliert und ebenfalls gegenüber Quarzpartikeln exponiert. Die Cokulturen wurden so konstruiert, dass zum Zeitpunkt der Exposition das Verhältnis von Epithelzellen zu Makrophagen-ähnlichen Zellen 10:1 betrug, was den Zellverhältnissen in einer gesunden menschlichen Lunge entspricht (Crapo *et al.*, 1982). Eine äquivalente submerser Cokultur wurde im Arbeitskreis bereits zur Untersuchung der Toxizität von Kupfer-Nanopartikeln verwendet (Hufnagel *et al.*, 2021a). Zur besseren mechanistischen Eingrenzung der beobachteten Effekte auf bestimmte Zellarten wurden auch dTHP-1-Zellen in Monokultur submers untersucht.

Die Quarzpartikel wurden für alle Kulturen in drei Dosen eingesetzt: ca. 15, 30 und 60 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, mit Ausnahme der dTHP-1-Monokultur, die aufgrund einer erhöhten Zytotoxizität mit niedrigeren Konzentrationen von 1,5, 3 und 6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ behandelt wurde. Für die submersen Expositionen wird davon ausgegangen, dass die applizierte Dosis der deponierten Dosis entspricht, da sich Quarzpartikel aufgrund ihrer Größe in biologischen Medien innerhalb kürzester Zeit komplett absetzen (Hinderliter *et al.*, 2010). Bei ALI-Expositionen fand die Ermittlung der deponierten Dosis über eine Quarzkristallmikrowaage statt. Aufgrund leichter Variationen zwischen einzelnen Versuchen wird die deponierte Dosis als Mittelwert dreier Experimente mit Standardabweichung dargestellt. Nach Exposition und Nachinkubation der Zellen wurden die Zytotoxizität, Änderungen der Genexpression, die Genotoxizität und die Inflammation untersucht.

Die Toxizitätsuntersuchungen des α -Quarzes Min-U-Sil5 wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biologische und Chemische Systeme (IBCS) am KIT durchgeführt, insbesondere mit Dr. Susanne Fritsch-Decker aus der Arbeitsgruppe von PD Dr. Carsten Weiss. In diesem Zuge wurden die submersen Expositionen sowie die Bestimmung des Inflammationsmediators IL-8 vom IBCS durchgeführt. ALI-Expositionen und alle weiteren Endpunkte wurden durch die Autorin dieser Arbeit am IAB durchgeführt.

Ein Großteil der in diesem Kapitel beschriebenen Ergebnisse wurde bereits im *International Journal of Molecular Sciences* publiziert. Die Publikationen "Comparing α -quartz induced cytotoxicity and interleukin-8 release in pulmonary mono- and co-cultures exposed under submerged and air-liquid interface conditions" (Friesen *et al.*, 2022a) und "Gene expression profiling of mono- and co-culture models of the respiratory tract exposed to crystalline quartz under submerged and air-liquid interface conditions" (Friesen *et al.*, 2022b) sind im Volltext auf der Journal-Homepage verfügbar.

5.1.1 Physikochemische Charakterisierung der Testsubstanz Min-U-Sil5

Zunächst wurden die physikochemischen Eigenschaften der Quarzpartikel bestimmt. Hierzu wurden die Partikel, wie bereits beschrieben, vorbereitet und einer Messung durch *Dynamic light scattering* (DLS) unterzogen sowie Aufnahmen an einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) angefertigt. Die Ergebnisse der Größenbestimmung sind in Abbildung 5.1, TEM-Aufnahmen in Abbildung 5.2 und weitere Charakteristika des Quarzes in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

Tabelle 5.1: Physikochemische Eigenschaften von Min-U-Sil5. ¹Untersuchung mithilfe von DLS nach Vorbereitung der Partikel in 0,05 % BSA mithilfe des NANOGENOTOX-Protokolls (Jensen *et al.*, 2017), ²Herstellerinformation, PDI: Polydispersitätsindex.

Durchmesser (μm)	PDI	Median-Durchmesser (μm)	Reinheit (%)
0,96 ¹	0,462 ¹	1,6 ²	99,4 ²

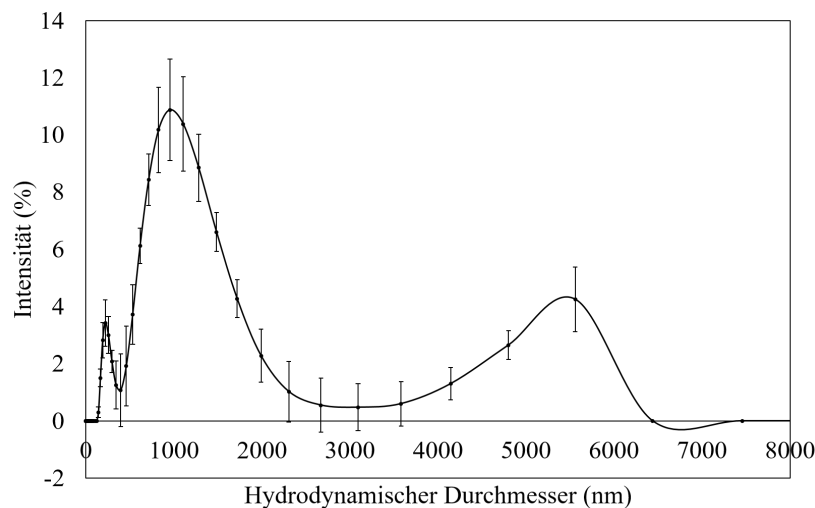


Abbildung 5.1: Größenverteilung des Quarzes Min-U-Sil5 nach Partikelvorbereitung nach dem NANOGENOTOX-Protokoll (Jensen *et al.*, 2017). Die Quarzpartikel wurden in 0,05 % BSA aufgenommen und für 13:25 Minuten an der Ultraschallspitze sonifiziert. Die Bestimmung der Partikelgrößen fand durch DLS statt. Dargestellt sind die Mittelwerte zweier unabhängiger Versuche in Dreifachbestimmung \pm SD.

Bei Min-U-Sil5 handelt es sich um einen Quarz hoher Reinheit (99,4 %), mit nur einem geringen Anteil an Verunreinigungen, und einem nominalen Durchmesser von 1,6 μm . Bei der Größenbestimmung mittels DLS wurde ein Hauptpeak mit einem Maximum bei ca. 0,96 μm ermittelt, was leicht unter dem nominalen Massenmedian lag. Durch die große Breite des Peaks und den hohen PDI von 0,462 wurde ersichtlich, dass die Partikel eine hohe Polydispersität aufweisen und damit einen breiten Größenbereich abdecken, der die in den Herstellerangaben genannte Größe einschließt. Zusätzlich war bei ca. 5,6 μm ein sekundärer Peak zu erkennen, bei dem es sich vermutlich um Partikelagglomerate handelte. Die TEM-Aufnahmen nach Verneblung in der Vitrocell® *Cloud* (Abbildung 5.2B) unterstützen diese Beobachtung: die Größe der Partikel zeigte starke Variationen und eine Tendenz zur Agglomeration. Vor allem im Vergleich zu den in den submersen Studien verwendeten Suspensionen (s. Abbildung 5.2A), die mit einer anderen Methode hergestellt

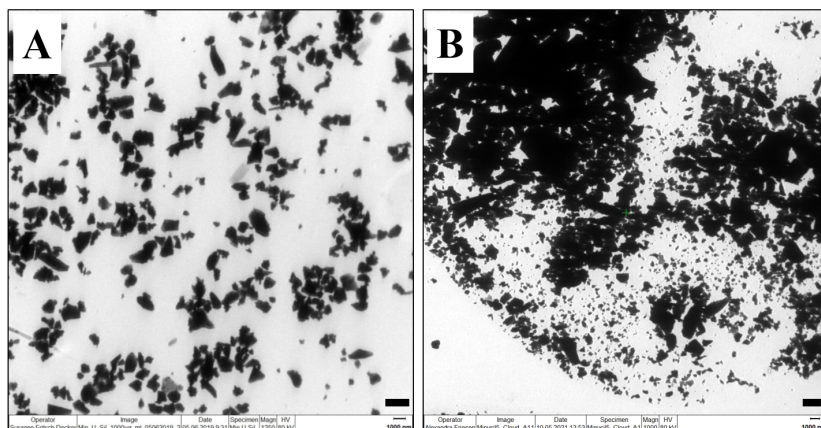


Abbildung 5.2: Transmissionselektronenmikroskopie-Aufnahmen (TEM) von Min-U-Sil5 nach Vorbereitung für submerse Inkubation (A) und nach ALI-Exposition in der Vitrocell® Cloud (B). (A) Quarzpartikel wurden in sterilem bidestilliertem Wasser suspendiert, sonifiziert und als Suspension auf ein TEM-Grid gegeben. (B) Quarzpartikel wurden in 0,05 % BSA aufgenommen und für 13:25 Minuten an der Ultraschallschallspitze sonifiziert. Die Partikelsuspension wurde anschließend in den Vernebler der Vitrocell® Cloud gegeben und als Aerosol in die Kammer und auf das TEM-Grid übertragen. Maßstab: 2000 nm.

wurden, zeigte sich die große Heterogenität der Partikel. Es ist unklar, ob die Unterschiede in den TEM-Aufnahmen erst durch die Verneblung oder durch das abweichende Vorgehen bei der Partikelvorbereitung zustande kamen. Es kann geschlossen werden, dass die Methode der Partikelvorbereitung einen großen Einfluss auf die Größenverteilung der Partikel hat.

5.1.2 Betrachtung der Zytotoxizität nach Exposition gegenüber Quarz

Als erste toxikologische Untersuchung wurde die Zytotoxizität nach Quarzexposition in den Zellkulturmodellen mithilfe des LDH-Assays betrachtet (Abbildung 5.3).

Die dTHP-1-Zellen zeigten mit einer konzentrationsabhängigen Zunahme der LDH-Freisetzung die höchste Empfindlichkeit gegenüber Min-U-Sil5. Eine signifikante zytotoxische Wirkung war bereits ab einer Dosis von $6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ zu erkennen. Die maximale LDH-Freisetzung war bei $60 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ mit ca. 58 % erreicht. Die vergleichsweise niedrige Freisetzung von LDH durch die dTHP-1-Monokulturen im Vergleich zu den anderen Zellkulturmodellen ist durch die geringe Zelldichte und dadurch geringere relative Konzentration der LDH im umgebenden Medium zurückzuführen. Eine hohe Zytotoxizität der Quarze Min-U-Sil5 und DQ12 wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben und wurde im Allgemeinen auf die erhöhte Internalisierung der Quarzpartikel durch Phagozytose in Makrophagen zurückgeführt (Albrecht *et al.*, 2007; Grytting *et al.*, 2021; Iyer *et al.*, 1996). Ein weiterer mehrfach postulierter Effekt ist die darauf folgende Destabilisierung und der Bruch von Lysosomen durch die aufgenommenen Quarzpartikel, deren reaktive Oberfläche durch den sauren pH-Wert von einer möglichen Proteincorona befreit wird. Dies hat eine Freisetzung der Partikel und des Lysosomeninhalts ins Zytoplasma und die Bildung von ROS zur Folge (Leinardi *et al.*, 2020; Øvrevik *et al.*, 2015).

Nach ALI-Exposition konnte keine signifikante Induktion einer Zytotoxizität beobachtet werden. Alle Proben wiesen eine konstante LDH-Freisetzung von 16-20 % auf. Gleichzeitig

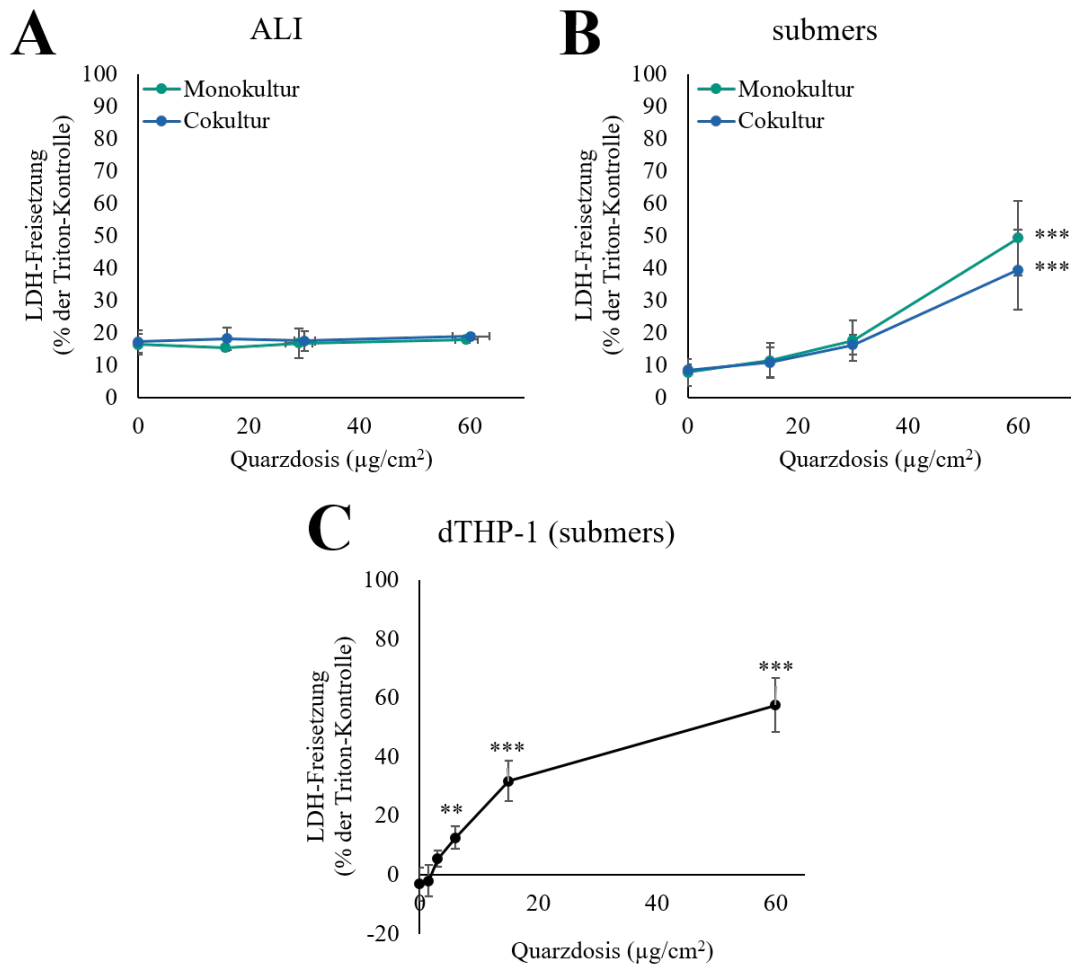


Abbildung 5.3: LDH-Freisetzung nach ALI- (A) und submerser Exposition (B) von A549-Mono- und A549/dTHP-Cokulturen und submerser Exposition von dTHP-1-Zellen (C) gegenüber Min-U-Sil5. A549-Zellen in Monokultur und Cokultur mit dTHP-1-Zellen wurden am ALI für 10 min gegenüber Quarzpartikeln exponiert und 24 h nachinkubiert. Die submerser Inkubation der A549- und dTHP-1-Mono- sowie A549/dTHP-1-Cokulturen fand über 24 h statt. Die Zellkulturüberstände wurden hinsichtlich ihres LDH-Gehaltes analysiert und auf die Positivkontrolle Triton X-100 (100 %) bezogen. Die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente \pm SD sind dargestellt. Signifikanz zur Negativkontrolle (ANOVA-Dunett's): */**/** (p < 0,05/0,01/0,005).

zeigten sowohl Mono- als auch Cokultur nach submerser Inkubation eine konzentrationsabhängige und signifikante LDH-Freisetzung von jeweils ca. 50 bzw. 40 % bei der höchsten Quarzdosis. Dieses Ergebnis impliziert, dass die submersen Zellkulturen empfindlicher gegenüber Quarzpartikeln sind als die ALI-Kulturen.

Eine geringe bzw. nicht vorhandene Zytotoxizität von submers auf A549 applizierten Quarzstäuben wurde bereits in einer Vielzahl von Publikationen festgestellt, sowohl für Min-U-Sil5 (Vuong *et al.*, 2017; R. Wu *et al.*, 2020) als auch für andere Quarzarten wie Norquartz-45 und DQ12 (Clouter *et al.*, 2001; Hetland *et al.*, 2001). Gleichzeitig wurde in einigen Studien eine erhöhte Toxizität ab 15 oder 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ beschrieben (Freyria *et al.*, 2012; Williams & Zosky, 2019). Demnach sind in der Literatur berichtete Ergebnisse nicht einheitlich und stark abhängig von der verwendeten Methode und Zelllinie. Die

Vorbehandlung der Partikel und das verwendete Suspensionsmedium spielen ebenfalls eine tragende Rolle.

In nur wenigen Studien werden Vergleiche zwischen submerser und ALI-Exposition mit Partikeln angestellt. Allerdings wurden vergleichbare Ergebnisse in Arbeiten nach Exposition mit Silica-NP (Panas *et al.*, 2014) und Quarzpartikeln (Öhlinger *et al.*, 2019) erzielt: beide zeigten eine höhere Empfindlichkeit von submersen Modellen gegenüber Silica. In der vorliegenden Arbeit kann dieser Effekt damit erklärt werden, dass die Partikel für die ALI-Exposition mit BSA aufgearbeitet wurden und dadurch eine Proteincorona aufwiesen, die die Reaktivität der Quarzoberfläche abschwächt (Leibe *et al.*, 2019). Andererseits kann sich durch die submerse Exposition im Beisein von FKS ebenfalls eine Proteincorona ausbilden, deren Proteinzusammensetzung zwar variiert, die dennoch eine abschwächende Wirkung aufweist (Hu *et al.*, 2011). Darüber hinaus ist durch Kultivierung von A549-Zellen an einem ALI die Produktion von *Surfactant* möglich, welches eine protektive Wirkung gegenüber Partikeln besitzen kann (Blank *et al.*, 2006).

5.1.3 Genexpressionsprofile nach Exposition gegenüber Quarz

Zur Untersuchung des Einflusses von Quarzpartikeln auf die Genexpression in verschiedenen Zellkulturmodellen wurden Genexpressionsprofile mit Hilfe einer HT RT-qPCR erstellt. Diese Methode ermöglicht die quantitative Untersuchung von 95 Genen in 96 Proben zugleich (Fischer *et al.*, 2016). Die entsprechenden Gene können unterschiedlichen Gruppen zugeordnet werden: Fremdstoffmetabolismus, Inflammation, Fibrose, Metallhomöostase, oxidative Stressantwort, apoptotische Faktoren und Zellzyklusregulatoren sowie DNA-Schadensantwort und -Reparatur. In diesem Kapitel wird nur auf die Gene eingegangen, bei denen eine Änderung von $\log_2 = +1$ oder -1 zu beobachten war, was einer Verdopplung bzw. Halbierung der detektierten Transkriptmenge entspricht und damit eine biologisch relevante Wirkung indiziert. Ein solches Vorgehen wurde bereits in anderen Studien beschrieben, in denen Untersuchungen der Genexpression durchgeführt wurden (Izzotti *et al.*, 2002; J. Ye & Shi, 2001) und ist im Arbeitskreis auf diese Weise etabliert (Gajewski & Hartwig, 2020; Hufnagel *et al.*, 2021a; Schumacher *et al.*, 2022). Detaillierte Ergebnisse finden sich im Anhang (s. Anhang B Ergänzende Daten: Abbildung B.1 für die A549-Monokultur, Abbildung B.2 für die dTHP-1-Monokultur, Abbildung B.3 für die A549/dTHP-1-Cokultur und Abbildung B.4 für die zeitabhängigen Genexpressionsstudien).

5.1.3.1 Konzentrationsabhängige Genexpressionsprofile

Zunächst wurde eine mögliche konzentrationsabhängige Toxizität untersucht. Hierzu wurden die Zellkulturmodelle gegenüber drei verschiedenen Dosen Min-U-Sil5 exponiert und für 24 h nachinkubiert. A549-Mono- und A549/dTHP-1-Cokulturen wurden gegenüber höheren Dosen (ca. 15, 30 und 60 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) exponiert als die dTHP-1-Monokultur (1,5, 3 und 6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Grund hierfür ist die zuvor demonstrierte erhöhte Zytotoxizität der Quarzpartikel in den Makrophagen-ähnlichen Zellen, was stark verringerte mRNA-Konzentrationen zur Folge hatte und eine Durchführung der qPCR-Methode bei höheren Quarzkonzentrationen nicht möglich machte. Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen sind für die

5.1. VERGLEICH UNTERSCHIEDLICHER LUNGENZELLMODELLE IN HINBLICK AUF DIE TOXIZITÄT VON α -QUARZ

verschiedenen Kultursysteme zunächst als Heatmaps und für ausgewählte Gene im Detail dargestellt.

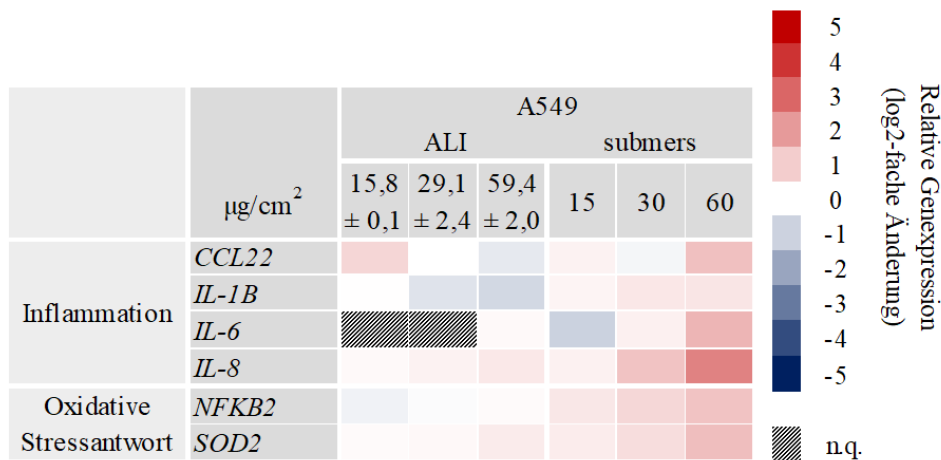


Abbildung 5.4: Schematische Darstellung der Genexpressionsprofile von A549-Monokulturen nach ALI- und submerser Exposition gegenüber Min-U-Sil5 und 24 h Nachinkubation als Heatmap. Eine rote Färbung signalisiert eine Induktion, eine blaue Färbung eine Repression. Für die Dosisbestimmung bei ALI-Deposition ist der Mittelwert \pm SD aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt. n.q.: nicht quantifizierbar.

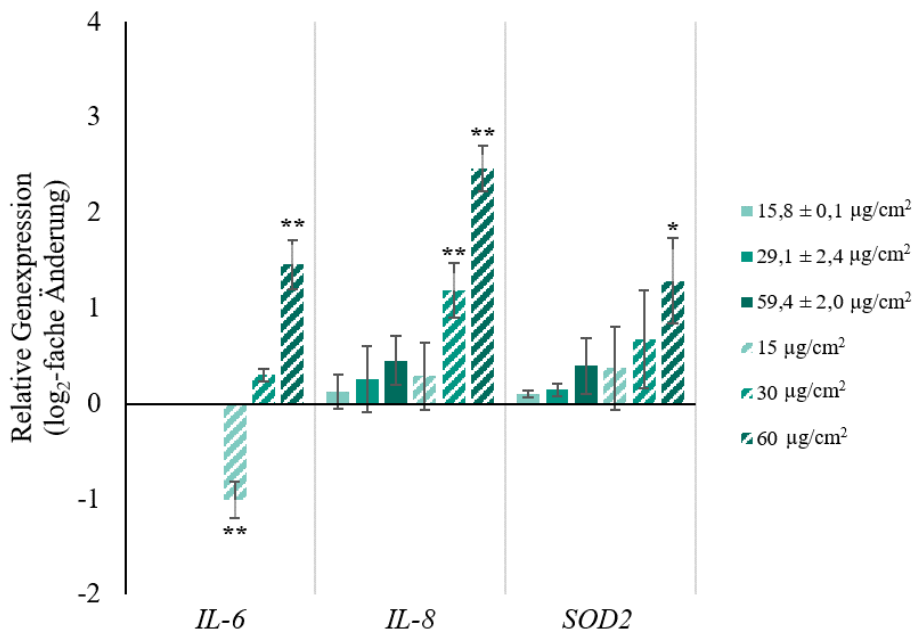


Abbildung 5.5: Einfluss von Min-U-Sil5 auf die Expression der Gene *IL-6*, *IL-8* und *SOD2* durch A549-Monokulturen. A549-Zellen wurden an einem ALI für 10 Minuten gegenüber drei Dosen Quarzpartikel exponiert (durchgängige Färbung) bzw. submers inkubiert (schraffierte Färbung). Anschließend erfolgte eine Nachinkubation für 24 h. Es ist der Mittelwert \pm SD dreier unabhängiger Experimente dargestellt. Signifikanz (Student's T-Test): * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$).

Bei der A549-Monokultur wurden grundsätzlich nur wenige Gene beeinflusst, wie aus der Heatmap ersichtlich wird (Abbildung 5.4). Biologisch relevante Effekte wurden darüber hinaus nur nach submerser Inkubation mit Quarzpartikeln festgestellt, insbesondere im

Bereich der Inflammation und oxidativen Stressantwort. Die Daten für drei der auffälligsten Gene, *IL-8*, *IL-6* und *SOD2*, sind in Abbildung 5.5 im Detail dargestellt. Hierbei zeigte *IL-8*, welches für das gleichnamige Chemokin kodiert, eine konzentrationsabhängig ansteigende Expression mit signifikanten Veränderungen bei der mittleren (ca. 2-fach) und hohen Dosis (ca. 6-fach) nach submerser Exposition.

IL-6 konnte bei ALI-Exposition lediglich bei der höchsten Konzentration detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigte dieses Gen nach submerser Exposition eine signifikante Halbierung der Expression bei der niedrigen Dosis und eine signifikante Induktion um das dreifache bei der hohen Dosis. Dies spricht für eine anfängliche Induktion antiinflammatorischer Mediatoren, wie z.B. *IL-4*, bei niedrigen Quarzkonzentrationen, welche bei höheren Konzentrationen durch proinflammatorische Signalwege abgelöst wurden (te Velde *et al.*, 1990).

Analog zu den Zytotoxizitätsstudien fiel die höhere Empfindlichkeit der submersen Kultur gegenüber Partikeln auf, möglicherweise durch eine verstärkte Internalisierung der Partikel durch Endozytose unter submersen Bedingungen. Eine höhere Partikelaufnahme in A549-Zellen unter submersen Bedingungen im Vergleich zu einer ALI-Exposition wurde bereits für TiO_2 -NP beschrieben (Medina-Reyes *et al.*, 2020).

Darüber hinaus wurden die Gene *NFKB2* und *SOD2* jeweils um das 2,5- und 3-fache aktiviert, was für eine Beteiligung des NF- κ B-Signalwegs spricht. *NFKB2* kodiert hierbei für das p52-Monomer des NF- κ B-Transkriptionsfaktors, welches nach Translokation in den Zellkern die Transkription diverser Gene der Inflammation und oxidativen Stressantwort moduliert, etwa *IL-8*, *IL-6* und auch *SOD2*. Die gesteigerte Expression von *NFKB2* kann auf die verstärkte Aktivierung des nicht-kanonischen NF- κ B-Wegs hindeuten. Allerdings spiegelt die Induktion des Gens nicht notwendigerweise auch eine starke Beteiligung an der Signalweiterleitung wieder, da die NF- κ B-Dimere in vielen Zellen konstitutiv exprimiert werden und nicht erst auf Ebene der Genexpression induziert werden müssen, um eine möglichst schnelle Antwort auf exogene Reize zu gewährleisten (Tripathi & Aggarwal, 2006). Die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs durch Quarz wurde bereits für Rattenepithelzellen nachgewiesen (van Berlo *et al.*, 2010), auch die Induktion von *IL-6* und *IL-8* in A549-Zellen auf Proteinebene (Hetland *et al.*, 2001; Williams & Zosky, 2019). Die Freisetzung von Zytokinen als Reaktion auf Quarzpartikel wird in einem späteren Kapitel näher beleuchtet (s. 5.1.4 Zytokinfreisetzung nach Exposition gegenüber Quarz).

Neben den Analysen von A549-Monokulturen wurden Genexpressionsprofile von dTHP-1-Zellen erstellt. Eine Übersicht der relevanten Veränderungen ist in Abbildung 5.6 dargestellt, Details für die Gene *IL-8* und *SOD2* in Abbildung 5.7.

Es wird ersichtlich, dass Min-U-Sil5 in dTHP-1-Zellen eine größere Bandbreite inflammatorischer Gene induziert. Während erneut *IL-8* mit einem konzentrationsabhängigen Verlauf und einer maximalen Induktion um das 24-fache die größte Effektstärke aufwies, wurden in geringerem Maße auch andere inflammatorische Gene induziert, beispielsweise *COX2*, *IL-1A* und *IL-1B*. Dies, sowie die Hochregulation der NF- κ B-assoziierten Gene *NFKB1*, *NFKB2*, *NFKBIA* und *SOD2*, suggeriert die Bedeutung dieses Signalwegs bei der Quarz-vermittelten Inflammation auch für die Makrophagen-ähnlichen Zellen (Witkamp

5.1. VERGLEICH UNTERSCHIEDLICHER LUNGENZELLMODELLE IN HINBLICK AUF DIE TOXIZITÄT VON α -QUARZ

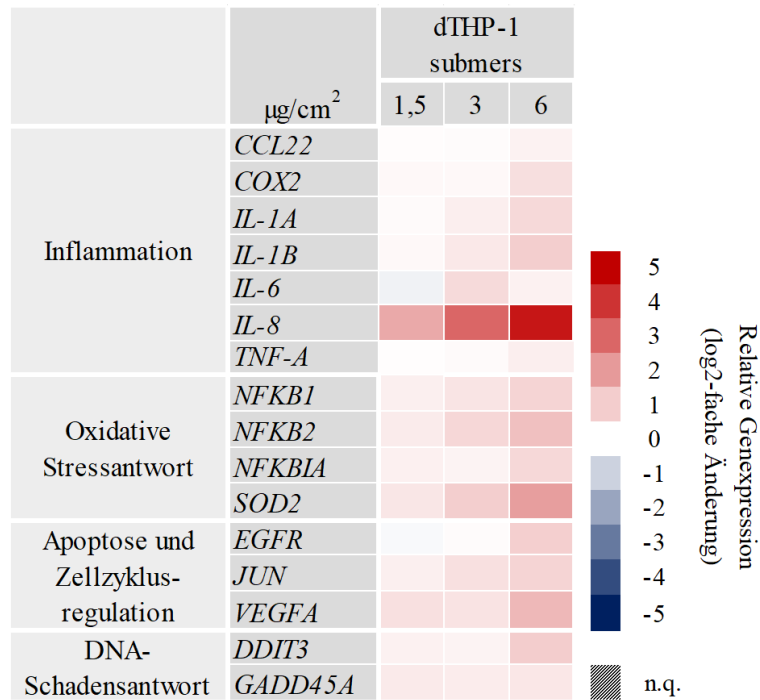


Abbildung 5.6: Schematische Darstellung der Genexpressionsprofile von dTHP-1-Monokulturen nach submerser Exposition gegenüber Min-U-Sil5 und 24 h Nachinkubation als Heatmap. Eine rote Färbung signalisiert eine Induktion, eine blaue Färbung eine Repression. n.q.: nicht quantifizierbar.

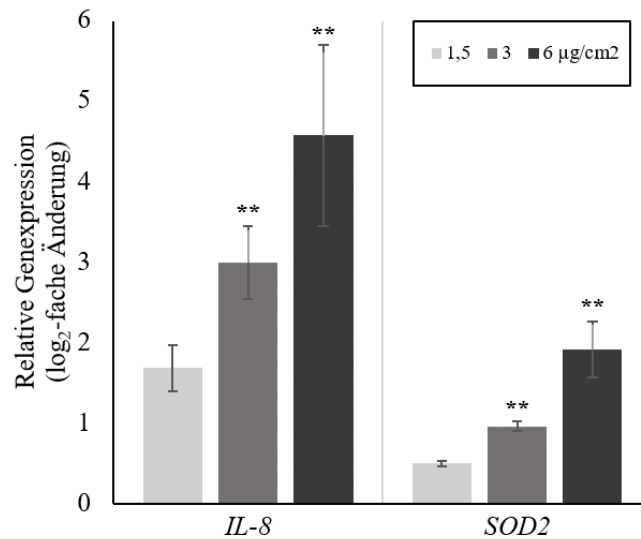


Abbildung 5.7: Einfluss von Min-U-Sil5 auf die Expression der Gene *IL-8* und *SOD2* durch dTHP-1-Monokulturen. dTHP-1-Zellen wurden submers mit 1,5, 3 und 6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Quarz exponiert und 24 h nachinkubiert. Es ist der Mittelwert \pm SD dreier unabhängiger Experimente dargestellt. Signifikanz zur Negativkontrolle (ANOVA-Dunett's): * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$).

& Monshouwer, 2000). Der Zusammenhang zwischen dem NF- κ B-Transkriptionsfaktor und reaktiven Sauerstoffspezies als Folge der Quarzexposition von Makrophagen wurde mechanistisch im Detail von Castranova *et al.* (2004) zusammengefasst. Darüber hinaus können der Beteiligung inflammatorischer Gene auch andere Signalwege zugrunde liegen:

Die Induktion von *IL-1B* impliziert ebenfalls eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms (Sayan & Mossman, 2015). *COX2* und *IL-1A* werden daneben durch den Transkriptionsfaktor AP-1 verstärkt exprimiert. Hierfür ist insbesondere die leichte Erhöhung des Gens *JUN* ein Indiz, welches für c-Jun, ein Monomer des Heterodimers AP-1, kodiert (Hess & Schorpp-Kistner, 2004). Demzufolge kann für die inflammatorische Antwort in dTHP-1-Zellen eine Beteiligung mehrerer verschiedener Signalwege und deren Zusammenspiel postuliert werden. Die Bedeutung der NF- κ B- und Inflammasom-vermittelten Antwort nach Quarzexposition wurde bereits für THP-1-Zellen untersucht (Cui *et al.*, 2020). Das volle Ausmaß der inflammatorischen Antwort ist für die dTHP-1-Zellen in der vorliegenden Arbeit nicht bekannt, da gerade diese einer starken Zeitabhängigkeit unterliegt. Beispielsweise ist die Abwesenheit einer Antwort bei dem Gen *TNF-A*, welche sehr charakteristisch für Makrophagen ist, auffallend (J. Sethi & Hotamisligil, 2021). Bei TNF- α und IL-1, die ebenso nur ein geringes Maß an Induktion aufweisen, handelt es sich um sogenannte *early response*-Zytokine, welche für ihre schnelle Freisetzung und Wirkungsweise bekannt sind (Toews, 2001). Aus diesem Grund könnte durch die Wahl einer Nachinkubationszeit von 24 h die initiale Antwort bestimmter Zytokine bereits vorüber sein. Zeitabhängige Veränderungen der Genexpression durch die Wahl kürzerer Nachinkubationszeiträume wurden in dieser Arbeit lediglich in der A549/dTHP-1-Cokultur an einem ALI betrachtet (s. 5.1.3.2 Zeitabhängige Genexpressionsprofile).

Um ein realistischeres Modell der Lunge im Rahmen einer A549/dTHP-1-Cokultur zu untersuchen, wurden Genexpressionsanalysen bei Exposition mit vergleichbaren Dosen Min-U-Sil5 wie in der Monokultur erstellt. Eine Übersicht relevanter Gene ist in Abbildung 5.8 dargestellt. Eine detaillierte Betrachtung einzelner Gene der Inflammation und oxidativen Stressantwort findet sich in Abbildung 5.9 und Abbildung 5.10.

In der Cokultur war die Aktivierung einer größeren Anzahl von Genen als in den Monokulturen zu beobachten. Insbesondere im Bereich der Inflammation war diese im Vergleich zur Monokultur verstärkt. Hier zeigte, ähnlich zur Monokultur, *IL-8* die höchste Induktion, wobei der Effekt erneut nach submerser Inkubation (16-fach) stärker war als in der ALI-Kultur (7-fach). Ähnliche Effekte wurden für die Gene *COX2* (submers 3-fach, ALI 2,5-fach) und *IL-1B* (submers 6,5-fach, ALI 2-fach) festgestellt. *IL-6*, *TNF-A* und *CCL22* wurden hingegen nach ALI-Exposition stärker induziert, was für eine verstärkte Aktivität der dTHP-1-Zellen am ALI spricht. Vor allem bei *CCL22* und TNF- α handelt es sich hauptsächlich um Marker für Makrophagen-Aktivität (Godiska *et al.*, 1997; J. Sethi & Hotamisligil, 2021). Eine mögliche Hypothese bezüglich des beobachteten Effekts besteht darin, dass die dTHP-1-Zellen durch die ALI-Kultivierung einem höheren Stress ausgesetzt und dadurch empfindlicher gegenüber exogenen Reizen sind.

Auch die Induktion von *SOD2* war im Vergleich zur Monokultur verstärkt, und auf ähnliche Weise bei submerser Exposition höher (10-fach) als bei ALI-Exposition (5-fach). Zusätzlich zur Induktion von *NFKBIA*, *NFKB2* sowie der für Zytokine kodierenden Gene *IL-6*, *IL-8*, *IL-1A/B* und *COX2* ist dies erneut ein Hinweis auf Beteiligung des NF- κ B-Signalweges bei der toxikologischen Antwort auf Quarz. *NFKBIA* kodiert hierbei für den Inhibitor I κ B α ,

5.1. VERGLEICH UNTERSCHIEDLICHER LUNGENZELLMODELLE IN HINBLICK AUF DIE TOXIZITÄT VON α -QUARZ

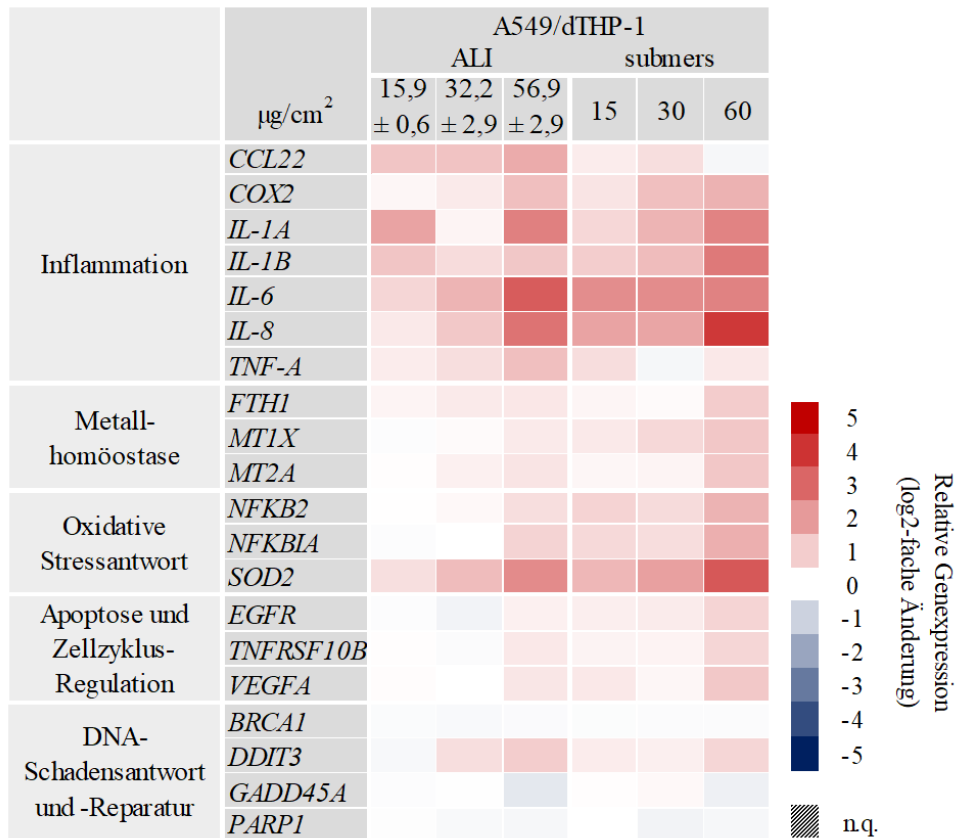


Abbildung 5.8: Schematische Darstellung der Genexpressionsprofile von A549/dTHP-1-Cokulturen nach ALI- und submerser Exposition gegenüber Min-U-Sil5 als Heatmap. Eine rote Färbung signalisiert eine Induktion, eine blaue Färbung eine Repression. Für die Dosisbestimmung bei ALI-Deposition ist der Mittelwert \pm SD aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt. n.q.: nicht quantifizierbar.

der in einem *negative feedback*-Prozess durch das aktivierte NF- κ B-Dimer induziert wird (Prescott *et al.*, 2021).

Eine verstärkte Inflammationsantwort von Cokultur-Modellen nach Quarzexposition wurde bereits in verschiedenen Studien erfasst. In einem 3D-Modell aus A549-, dTHP-1- und Ea.hy926-Zellen wurden nach Exposition mit Min-U-Sil5 IL-6, IL-8, IL-1 und TNF- α auf Ebene der Genexpression und Proteinebene in hohem Maße (100 bis 400-fach) induziert. Allerdings wurde in dieser Studie ein geringeres Verhältnis von Epithelzellen zu Makrophagen gewählt (ca. 2,5:1), was die inflammatorische Antwort verstärkt, sowie höhere Quarzdosen von bis zu 192 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ eingesetzt (Skuland *et al.*, 2020). In einem vergleichbaren Modell wurden IL-6, IL-1 β und COX2 ab einer Quarzkonzentration von 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ sowohl in einem Kontaktszenario als auch in einer kontaktlosen Cokultur freigesetzt (Herseth *et al.*, 2009). Im Kontrast dazu steht eine Studie mit A549-Mono- und A549/dTHP-1-Cokulturen an einem Pseudo-ALI, die gegenüber dem Quarz DQ12 exponiert wurden. Hier zeigten die Monokulturen durchgehend eine höhere Freisetzung von IL-6 und IL-8 (Meldrum *et al.*, 2022). Ein Zusammenhang zwischen Quarz und dem NF- κ B-Signalweg wurde ebenso in Cokulturen aus Rattenepithelzellen und -makrophagen beschrieben (van Berlo *et al.*, 2010).

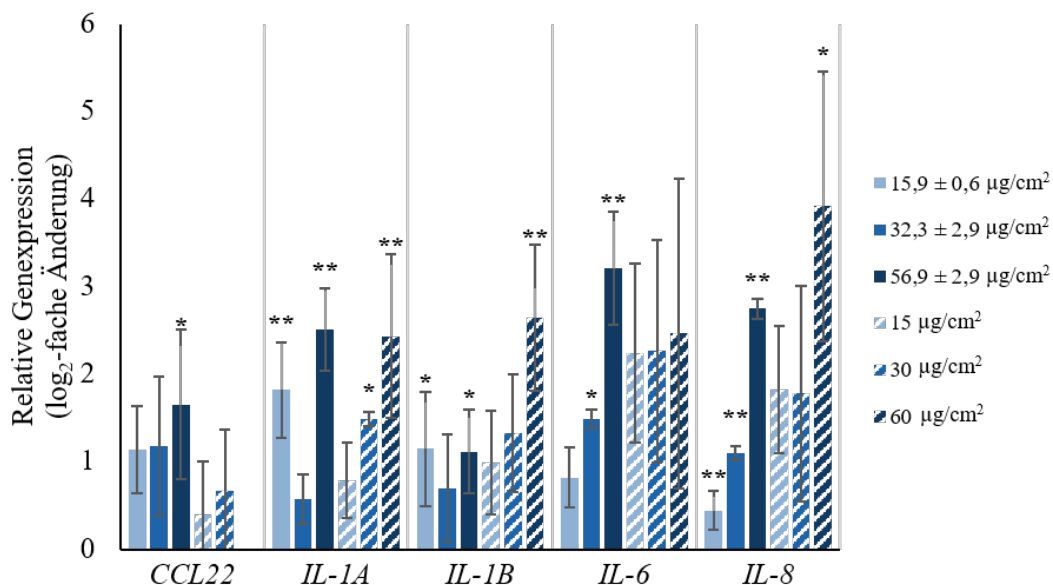


Abbildung 5.9: Einfluss von Min-U-Sil5 auf die Expression inflammatorischer Gene durch A549/dTHP-1-Cokulturen. Cokulturen wurden an einem ALI für 10 Minuten gegenüber drei Dosen Quarzpartikel exponiert (durchgängige Färbung) bzw. submers inkubiert (schraffierte Färbung). Anschließend erfolgte eine Nachinkubation für 24 h. Es ist der Mittelwert \pm SD dreier unabhängiger Experimente dargestellt. Signifikanz zur Negativkontrolle (ANOVA-Dunett's): * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$).

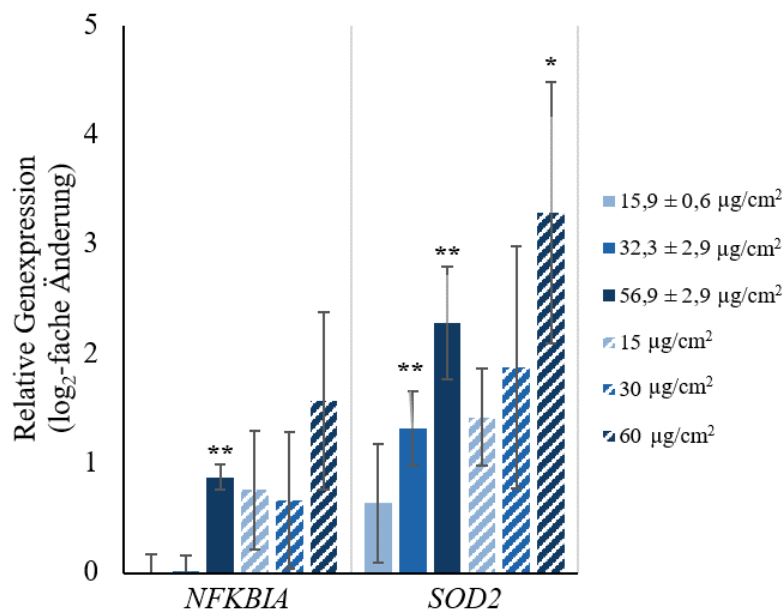


Abbildung 5.10: Einfluss von Min-U-Sil5 auf die Expression von Genen der oxidativen Stressantwort durch A549/dTHP-1-Cokulturen. Cokulturen wurden an einem ALI für 10 Minuten gegenüber drei Dosen Quarzpartikel exponiert (durchgängige Färbung) bzw. submers inkubiert (schraffierte Färbung). Anschließend erfolgte eine Nachinkubation für 24 h. Es ist der Mittelwert \pm SD dreier unabhängiger Experimente dargestellt. Signifikanz zur Negativkontrolle (ANOVA-Dunett's): * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$).

Darüber hinaus spricht die verstärkte Expression von *IL-1B* in diesem Modell auch für die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms, was die Inflamationsantwort weiterhin verstärkt. Das sekretierte IL-1 β kann an den IL-1-Rezeptor benachbarter Zellen binden und dadurch weitere inflammatorische Signalwege aktivieren (Broz & Dixit, 2016). Hierfür spricht ebenfalls die verstärkte Expression von *COX2*, welche ebenfalls durch IL-1 β induziert wird (Simmons *et al.*, 2004). Das Zusammenspiel von Quarzexposition und Inflammasom-Aktivität wurde bereits in diversen Studien postuliert, darunter in A549- und 16HBE14o- (R. Wu *et al.*, 2020), BEAS-2B- und THP-1- (Peeters *et al.*, 2014) und NHBE-Zellen (Peeters *et al.*, 2013).

Neben Genen der Inflammation und oxidativen Stressantwort wurden auch Gene der Metallhomöostase mit steigender Quarzdosis induziert, insbesondere nach submerser Exposition. Da es sich bei Min-U-Sil5 um einen Quarz hoher Reinheit handelt, kann eine Einwirkung metallischer Verunreinigungen weitgehend ausgeschlossen werden. Wahrscheinlicher ist eine Induktion durch oxidativen Stress. *MT1X* und *MT2A* kodieren für Metallothioneine, die neben ihrer Funktion als Metall-bindende Proteine durch ihre Thiol-Gruppen auch ROS binden können und auf Ebene der Genexpression durch oxidativen Stress und diverse Zytokine induziert werden können (Kumari *et al.*, 1998; Ruttkay-Nedecky *et al.*, 2013).

Es kann für die konzentrationsabhängigen Genexpressionsanalysen zusammengefasst werden, dass die Art und das Ausmaß der beobachteten Antworten deutlich von Zellkulturmodell und Expositionsart abhängen. Die beobachteten Effekte können zum Großteil den beiden Clustern "Inflammation" und "Oxidative Stressantwort" zugeordnet werden. Die ROS- und Rezeptor-vermittelte NF- κ B-Antwort stellt vermutlich den Hauptsignalweg für alle Zellkulturmodelle dar. In der dTHP-1-Monokultur traten Hinweise auf eine zusätzliche Beteiligung des NLRP3-Inflammasoms auf. In den Cokulturen konnte eine Amplifikation der inflammatorischen Effekte beobachtet werden, die die Summe der in den Monokultur beobachteten Antworten um ein Vielfaches übersteigt, was eine Kommunikation zwischen den beiden Zelltypen bestätigt. Mit wenigen Ausnahmen wurde für die A549-Mono- und A549/dTHP-1-Cokulturmodelle darüber hinaus eine höhere Empfindlichkeit der submersen Modelle mit einer einhergehenden verstärkten inflammatorischen Antwort festgestellt.

5.1.3.2 Zeitabhängige Genexpressionsprofile

Die Zeitabhängigkeit der intrazellulären Signalwege als Reaktion auf toxische Reize wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben, auch nach Quarzexposition (Skuland *et al.*, 2020). Aus diesem Grund wurden nach ALI-Exposition der Cokultur mit der höchsten Dosis Quarz ($56,9 \pm 2,94 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) mehrere Nachinkubationszeiträume gewählt und Änderungen der Genexpression nach 1, 3, 6 und 24 h untersucht. Eine Auswahl relevanter Gene ist in Abbildung 5.11 dargestellt.

Für die Inflammationsgene war ein deutlicher zeitabhängiger Verlauf zu beobachten. Bei den Genen *COX2*, *IL-1A*, *IL-1B*, *IL-6* und *IL-8* war nach 6 h ein Maximum der Expression erreicht. Die deutlichsten Veränderungen zeigten hierbei *IL-1A* und *IL-1B*, welche nach 6 h jeweils 125- und 38-fach induziert waren, nach 24 h jedoch nur noch 6- bzw. 2-fach. Die starke Aktivierung dieser beiden Gene spricht für die wichtige Rolle IL-1-basierter

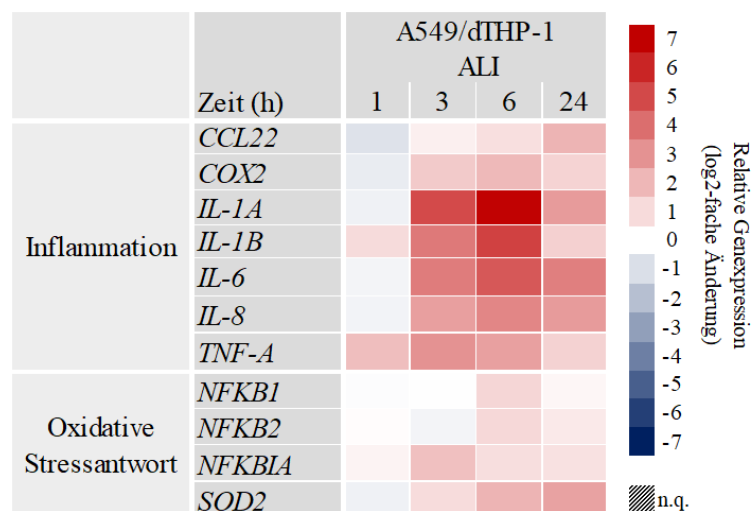


Abbildung 5.11: Schematische Darstellung der zeitabhängigen Genexpressionsprofile von A549/dTHP-1-Cokulturen nach ALI-Exposition gegenüber $56,9 \pm 2,94 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Min-U-Sil5 als Heatmap. Eine rote Färbung signalisiert eine Induktion, eine blaue Färbung eine Repression. n.q.: nicht quantifizierbar.

Signalwege bei der Quarz-vermittelten Toxizität und betont eine mögliche Beteiligung des Inflammasoms. Parallel dazu wurden die NF- κ B-assoziierten Gene *NFKB1*, *NFKB2* und *NFKBIA* nach jeweils 6 bzw. 3 h ebenfalls maximal aktiviert.

CCL22 und *TNF-A* zeigten erneut abweichende Ergebnisse mit Expressionsmaxima nach respektive 24 und 3 h. Die frühe Aktivierung von *TNF-A* signalisiert die frühe Beteiligung des Zytokins an inflammatorischen Vorgängen und betont erneut seine Rolle als *early response*-Protein (Toews, 2001). Vermutlich gehört TNF- α zur initialen Antwort der Zelle und verstärkt die Expression anderer Zytokine, die dann zu einem späteren Zeitpunkt aktiv werden. Ein Großteil dieser Reaktion kann mutmaßlich auf die Makrophagen im Cokultur-Modell zurückgeführt werden (G. Sethi *et al.*, 2008).

Durch die große Überzahl der A549-Zellen gegenüber den dTHP-1-Zellen muss ein Großteil der detektierten Gentranskripte aus den Epithelzellen stammen. Demzufolge lässt sich für die Quarztoxizität im Cokultur-Modell ein Mechanismus ableiten, der vermutlich bei den dTHP-1-Zellen beginnt und in einer umfassenden Wirkung auf die Genexpression der Epithelzellen resultiert. Die dTHP-1-Zellen treten, auf dem *Monolayer* der Epithelzellen befindlich, als erste in Kontakt mit den Quarzpartikeln und internalisieren sie verstärkt durch Phagozytose, ein Effekt der bereits in mehreren Studien beschrieben wurde (Albrecht *et al.*, 2007; Leinardi *et al.*, 2020). Die Quarzpartikel werden aus den Phagosomen und nachfolgend gebildeten Lysosomen durch Bruch der umgebenden Membranen gemeinsam mit dem lysosomalen Inhalt freigesetzt, was eine Induktion proinflammatorischer Signalwege mit einer einhergehenden Bildung von ROS zur Folge hat (Øvrevik *et al.*, 2015). Des Weiteren wurde bereits eine Bindung des Quarzes an sogenannte *Scavenger*-Rezeptoren in der Makrophagen-Membran beschrieben, die ebenfalls an der inflammatorischen Signalweiterleitung beteiligt sind (Iyer *et al.*, 1996). Diese Reize führen gemeinsam zu einer Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs und des Inflammasoms, was die Expression und Freisetzung inflammatorischer Mediatoren (IL-8, IL-6, IL-1, COX2) zur Folge hat. Die Zytokine und

Chemokine binden an Membranrezeptoren benachbarter Zellen (Epithelzellen und anderer Makrophagen) und lösen weitere Inflammationskaskaden aus. Die Aufnahme von Quarzpartikeln in Epithelzellen durch Endozytose wurde ebenfalls bereits beschrieben (Höhr *et al.*, 2002), spielt jedoch bei der Ausbildung der inflammatorischen Antwort vermutlich eine eher untergeordnete Rolle. Dies wird aus der geringen beobachteten Antwort in der Monokultur deutlich. Demnach ist die kombinierte Wirkung der Quarzpartikel und von Makrophagen sezernierten Zytokine auf die Epithelzellen für die höhere inflammatorische Wirkung in der Cokultur ausschlaggebend.

Dadurch, dass sich die Genexpressionsprofile nach Exposition gegenüber unterschiedlichen Konzentrationen von Quarzpartikeln für submers und am ALI kultivierte Zellen nicht stark in der Art der induzierten Gene unterscheiden, wird davon ausgegangen, dass die zugrundeliegenden Mechanismen für beide Kulturarten die gleichen sind. Sie unterscheiden sich lediglich im Ausmaß der beobachteten Antwort. In der submersen Kultur, als physiologisch weniger realistisches Modell, kann es demnach zum Teil zu einer Überschätzung der toxikologischen Antwort kommen, was insbesondere im Vergleich mit *in-vivo* Effekten berücksichtigt werden muss. In der Literatur wurden bereits einige Vergleichsstudien zwischen *in-vivo*- und *in-vitro*-Expositionen gegenüber Quarzpartikeln beschrieben. Eine Vergleichbarkeit der Dosis, Kulturbedingungen der Zellen und des zeitlichen Verlaufs ist jedoch zumeist nicht gewährleistet. Qualitativ wurde allerdings *in-vivo* ebenfalls eine starke inflammatorische Antwort festgestellt, beispielsweise in Form eines Einstroms von Neutrophilen in Rattenlungen (Sayes *et al.*, 2007) oder durch die Induktion über 300 inflammationsrelevanter Gene, unter anderem assoziiert mit NF- κ B (Sellamuthu *et al.*, 2011).

Die Erstellung zeitabhängiger Genexpressionsprofile bestätigt die zuvor vermutete Beteiligung des NF- κ B-Signalwegs an der Quarz-vermittelten Inflammation und legt durch die starke Induktion von IL-1 eine Beteiligung des NLRP3-Inflammasoms nahe. Darüber hinaus wird die Zeitabhängigkeit zellulärer und insbesondere inflammatorischer Prozesse deutlich demonstriert.

5.1.4 Zytokinfreisetzung nach Exposition gegenüber Quarz

Um die inflammatorische Antwort von Lungenzellen zusätzlich zur Ebene der Genexpression auch auf Proteinebene zu untersuchen, wurde die Freisetzung von IL-8 in das umgebende Medium bestimmt. Hierbei wurden erneut A549-Mono- und A549/dTHP-1-Cokulturen submers und an einem ALI und dTHP-1-Zellen submers gegenüber drei Dosen Min-U-Sil5 exponiert und 24 h nachinkubiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.12 dargestellt.

Nach submerser Exposition zeigte die IL-8-Freisetzung sowohl in der A549-Mono- als auch in der A549/dTHP-1-Cokultur einen konzentrationsabhängigen Verlauf mit einem Maximum der Freisetzung bei der höchsten Quarzdosis. Dabei wurde in der Cokultur mit 23 ng/mL ca. 7 mal so viel IL-8 freigesetzt wie in der Monokultur (3,4 ng/mL), was mit der höheren Immunaktivität der dTHP-1-Zellen erklärt werden kann (Suzuki *et al.*, 2008). Ein ähnliches Ergebnis wurde bei ALI-Exposition erzielt: bei der Monokultur wurde keine signifikante Freisetzung von IL-8 detektiert, während die Cokultur eine konzentrationsabhängige

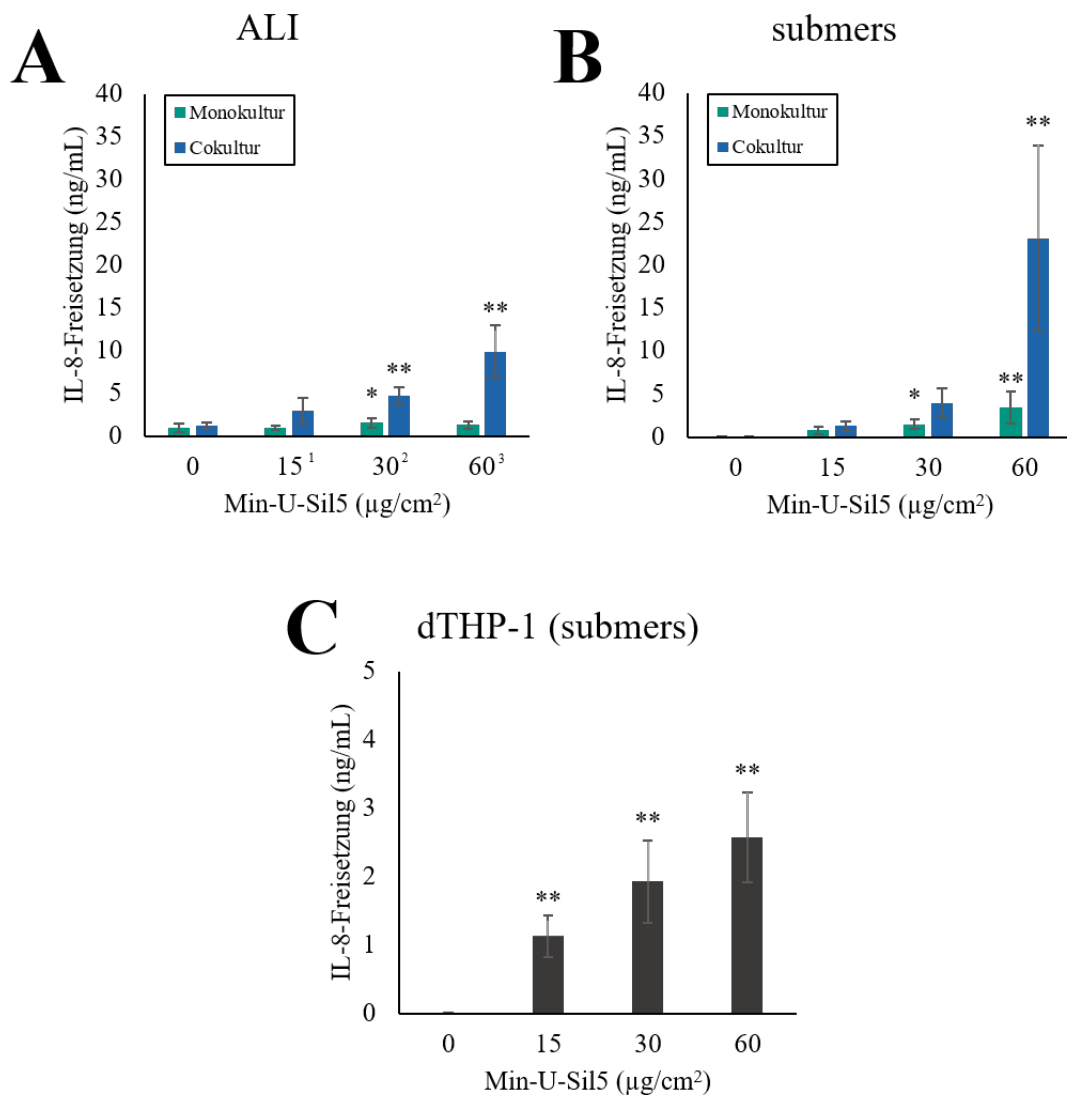


Abbildung 5.12: Freisetzung von IL-8 nach ALI-Exposition (links oben) und submerser Exposition (rechts oben und unten) von Lungenzellmodellen gegenüber Min-U-Sil5. A549-Zellen in Monokultur und Cokultur mit dTHP-1-Zellen sowie dTHP-1-Monokulturen wurden gegenüber Quarzpartikeln exponiert und die IL-8-Freisetzung mithilfe eines ELISA bestimmt. Mit folgenden Dosen wurde am ALI exponiert: Monokulturen (µg/cm²): ¹: 15,8 ± 0,8, ²: 29,1 ± 2,4, ³: 59,4 ± 2,0; Cokulturen (µg/cm²): ¹: 15,9 ± 0,6, ²: 32,2 ± 2,9, ³: 56,9 ± 2,9. Die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente ± SD sind dargestellt. Signifikanz zur Negativkontrolle (ANOVA-Dunett's): */** (p < 0,05/0,01).

Freisetzung aufwies. Allerdings demonstrierten die ALI-exponierten Cokulturen mit einem Maximum von 10 ng/mL IL-8 bei der höchsten Quarzdosis auch in der Zytokinfreisetzung eine geringere Empfindlichkeit als submers exponierte Zellen, was die Beobachtungen aus den Zytotoxizitätsstudien und Genexpressionsprofilen bekräftigt. Die dTHP-1-Monokulturen wiesen ebenfalls einen konzentrationsabhängigen Verlauf der IL-8-Freisetzung auf, der bereits bei der niedrigsten Konzentration signifikant war. Die totale Freisetzung war jedoch mit einem Maximum von ca. 2,6 ng/mL bei der höchsten Konzentration insbesondere im Vergleich zu den zuvor behandelten Cokulturen gering, obwohl Makrophagen ein höheres inflammatorisches Potenzial aufweisen (Suzuki *et al.*, 2008). Dies steht ebenfalls in einem

Widerspruch zu den ermittelten Genexpressionsergebnissen, die gerade für *IL-8* eine besonders starke Induktion auch bei zehnfach niedrigeren Quarzdosen aufzeigten. Es muss hierbei beachtet werden, dass die dTHP-1-Zellen in einer deutlich geringeren Zelldichte eingesetzt wurden als die A549-Zellen, weswegen hier vermutlich ein Verdünnungseffekt durch das Medium die Freisetzung vermeintlich verringert. Eine Ermittlung der totalen *IL-8*-Freisetzung ohne Bezug auf das Mediumvolumen würde die inflammatorische Antwort womöglich realistischer widerspiegeln. Darüber hinaus wurde gerade bei höheren Konzentrationen bereits eine signifikante zytotoxische Antwort detektiert, was möglicherweise die *IL-8*-Freisetzung ebenfalls beeinträchtigt.

Die Freisetzung von *IL-8* nach submerser Exposition mit Min-U-Sil5 wurde bereits umfassend in der Literatur untersucht, sowohl für A549-Zellen (Herseith *et al.*, 2008; Øvrevik *et al.*, 2006) als auch für THP-1-Zellen (Grytting *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2003). Ebenso wurde die höhere Sensitivität von Cokulturen gegenüber Quarzpartikeln im Vergleich zu A549-Monokulturen beschrieben, sowohl in einem Kontaktszenario (Wottrich *et al.*, 2004) als auch in einem kontaktlosen Cokultur-Szenario (Herseith *et al.*, 2008). In nur wenigen Studien wird die *IL-8*-Sekretion von ALI- und submers exponierten Zellen verglichen. Die meisten Vergleichsstudien zeigen eine höhere Sensitivität der Zellen nach ALI-Exposition, beispielsweise nach Behandlung mit *engineered nanoparticles* (Bessa *et al.*, 2021), $PM_{2.5}$ (G. Wang *et al.*, 2020), TiO_2 -Nanopartikeln (Loret *et al.*, 2016) oder CeO_2 -Nanopartikeln (Cappellini *et al.*, 2020; Diabaté *et al.*, 2021). Zwei zuvor aufgeführte Studien beschreiben eine höhere Sensitivität von A549-Zellen nach submerser Exposition, nach Exposition mit Silica-Nanopartikeln (Panas *et al.*, 2014) und mit Min-U-Sil5 (Öhlinger *et al.*, 2019). Da für die Studien mit anderen Nanomaterialien ebenfalls A549-Zellen eingesetzt wurden, könnte es sich bei dem in dieser und den Arbeiten von Öhlinger *et al.* und Panas *et al.* beobachteten Effekt um eine Besonderheit der Silica-Exposition handeln.

Die *IL-8*-Freisetzung der verschiedenen Zellkulturmodelle bekräftigt die bereits diskutierte höhere Sensitivität submerser Modelle gegenüber Quarzpartikeln. Insgesamt kann dem Chemokin *IL-8* anhand seiner signifikanten Freisetzung und der deutlichen Induktion auf Genexpressionsebene eine bedeutende Rolle in der Signalweiterleitung nach Quarzexposition zugeschrieben werden. Insbesondere in Cokulturen, sowohl submers als auch an einem ALI, hat *IL-8* eine große Bedeutung für die Zell-Zell-Kommunikation zwischen Epithelzellen und Makrophagen-ähnlichen Zellen. Diese Zusammenhänge wurden bereits in Cokulturen aus A549-Zellen und Alveolarmakrophagen beschrieben und zeigen neben seiner Rolle als Chemokin für die Rekrutierung von Neutrophilen ebenso die Relevanz *IL-8*-vermittelter Kommunikation zwischen anderen Zellen der Lunge (Standiford *et al.*, 1990).

5.1.5 Bildung von DNA-Schäden nach ALI-Exposition gegenüber Quarz

Abschließend wurde nach Quarzexposition der ALI-Zellkulturmodelle die genomische Integrität der Zellen mithilfe der Alkalischen Entwindung untersucht. Der Anteil doppelsträngiger DNA in den verschiedenen Proben ist in Abbildung 5.13 dargestellt. Dieser korreliert in direkter Weise mit der Anzahl induzierter DNA-Strangbrüche, da die DNA

während der Durchführung entwunden wird und an Bruchstellen nach Entwindung einzelsträngig vorliegt. Demnach ist eine Induktion von Strangbrüchen durch eine Verringerung des Anteils doppelsträngiger DNA zu erkennen.

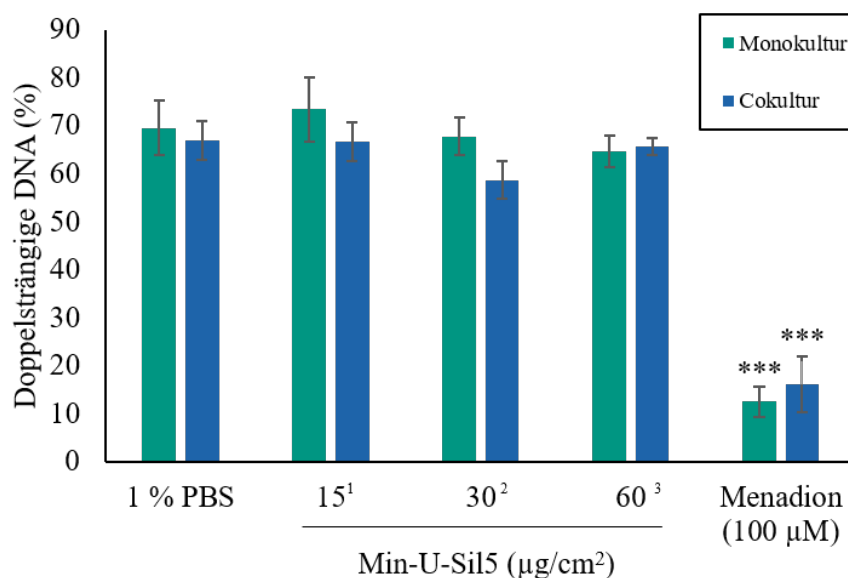


Abbildung 5.13: Anteil doppelsträngiger DNA nach ALI-Exposition von Lungenzellmodellen gegenüber Min-U-Sil5. A549-Zellen in Monokultur und Cokultur mit dTHP-1-Zellen wurden gegenüber Quarzpartikeln exponiert und der Gehalt an doppelsträngiger DNA mithilfe der Alkalischen Entwindung bestimmt. ALI-Exposition fand innerhalb von 10 Minuten in der Vitrocell® Cloud statt, mit 24 h Nachinkubation. Mit folgenden Dosen wurde am ALI exponiert: Monokulturen ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$): ¹: $15,8 \pm 0,8$, ²: $29,1 \pm 2,4$, ³: $59,4 \pm 2,0$; Cokulturen ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$): ¹: $15,9 \pm 0,6$, ²: $32,2 \pm 2,9$, ³: $56,9 \pm 2,9$. Die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente \pm SD sind dargestellt. Signifikanz zur Negativkontrolle (ANOVA-Dunett's): */**/** (p < 0,05/0,01/0,005).

Es konnte sowohl in der Mono- als auch Cokultur keine signifikante Verringerung der doppelsträngigen DNA beobachtet werden. Alle Proben, mit Ausnahme der Positivkontrolle Menadion, wiesen einen Anteil doppelsträngiger DNA von 60-75 % auf. Dieses Ergebnis stimmt mit den Genexpressionsanalysen und der weitestgehend ausbleibenden Beeinflussung des Clusters "DNA-Schadensantwort und -Reparatur" überein.

In der Literatur finden sich zur Genotoxizität von Quarzpartikeln eindeutige Ergebnisse. Viele Studien beschreiben eine Induktion oxidativer DNA-Schäden in Epithelzellen nach Quarzinkubation (Fanizza *et al.*, 2007; H. Li *et al.*, 2008; Schins *et al.*, 2002a; R. Wu *et al.*, 2020). Darüber hinaus ist Quarz bereits seit 1997 als humanes Karzinogen klassifiziert (IARC, 1997) und verursachte ebenso DNA-Schäden in diversen *in-vivo*-Studien (Daniel *et al.*, 1993; Nemmar *et al.*, 2016; Yamano *et al.*, 1995). Eine moderate Bildung von Mikrokerneln wurde durch Quarzexposition in einem A549/dTHP-1-Cokultur-Modell am Pseudo-ALI demonstriert, nicht jedoch in der korrespondierenden A549-Monokultur (Meldrum *et al.*, 2022). Demnach ist die Evidenz für die DNA-schädigende Wirkung von Quarzstäuben hoch und für diverse Modellsysteme nachgewiesen. Dennoch zeigt diese Arbeit keine Induktion von Strangbrüchen durch Quarzexposition der beiden ALI-Modelle. Ein zu beachtender Faktor ist die Zeitabhängigkeit des Auftretens und der Reparatur von DNA-Strangbrüchen. R. Wu *et al.* beleuchteten eine Bildung von DNA-Schäden 30 Minuten nach Start der Inku-

bation mit Quarz, Fanizza *et al.*, Schins *et al.* und Li *et al.* nach 4 Stunden. Demnach war die in dieser Arbeit gewählte Nachinkubationszeit von 24 Stunden möglicherweise zu lang, DNA-Schäden sind zu einem früheren Zeitpunkt entstanden und wurden bereits repariert. Die Ergebnisse der zeitabhängigen Genexpressionsanalysen weisen jedoch zumindest in der Cokultur ebenfalls nicht auf eine frühere Induktion von DNA-Schäden oder deren Reparatur hin.

Es ist darüber hinaus möglich, dass hier erneut die Ummantelung der Partikel mit einer Proteincorona durch den Einsatz von BSA und FKS bei der Partikelvorbereitung und Exposition eine Rolle spielen und die reaktive Partikeloberfläche maskieren (Leibe *et al.*, 2019). Ein weiterer Aspekt ist der Prozess der Quarzalterung. Durch längeren Kontakt mit der Umgebungsluft und unsachgemäße Lagerung kann die Oberfläche des Quarzes in ihrer Reaktivität abnehmen und somit auch ihre biologische Wirksamkeit verlieren (Guthrie, 1997). In der zuvor genannten Studie mit DQ12-Partikeln an einem Pseudo-ALI wurde ebenfalls demonstriert, dass die Alterung von Quarzpartikeln Auswirkungen auf die Quarztoxizität haben kann: durch das neuerliche Mahlen der Partikel wurde gerade die inflammatorische Antwort grundlegend verändert (Meldrum *et al.*, 2022). Das genaue Alter der in dieser Arbeit verwendeten Quarzpartikel ist nicht bekannt, jedoch wurden die Partikel bereits vor vielen Jahren im Rahmen anderer Forschungsprojekte erworben. Eine aus der Quarzalterung resultierende weniger reaktive Quarzoberfläche kann ebenfalls Grund für eine abgeschwächte genotoxische Antwort sein.

Insgesamt konnte die in der Literatur beschriebene umfassende Genotoxizität von Quarzpartikeln in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Dies hebt die Bedeutsamkeit einer zeitaufgelösten Betrachtung unterschiedlicher toxikologischer Endpunkte zusätzlich hervor. Überdies müssen andere Faktoren im experimentellen Vorgehen, etwa die Partikelvorbereitung sowie Herkunft und Alter der Partikel berücksichtigt werden.

5.2 Untersuchung der Toxizität von aufgearbeiteten Carbonfasern an einem *air-liquid interface*

Nach Validierung der zu verwendenden Methoden und Kulturen mit Min-U-Sil5 wurden ALI-Expositionen von Lungenzellmodellen gegenüber mechanisch und thermisch-mechanisch behandelten Carbonfasern (CF) durchgeführt. A549-Zellen erwiesen sich trotz ihrer erfolgreichen Verwendung in der Vitrocell® *Cloud* aufgrund einer erhöhten LDH-Freisetzung als nicht geeignet für die Exposition in der Vitrocell® *Automated exposure station* (im Folgenden Expositionsstation genannt), weswegen auf die Bronchialepithelzellen BEAS-2B zurückgegriffen wurde. Diese konnten stabil über einen Zeitraum von 24 h am ALI kultiviert und in der Expositionsstation verwendet werden (Daten nicht dargestellt). Darüber hinaus zeigte eine Studie zur Verteilung von Carbonfasern in zwei verschiedenen anatomischen Lungenmodellen für Fasern mit einem Durchmesser von 3,66 µm und variablen Längen eine primäre Deposition im extrathorakalen und tracheobronchialen Raum, und in geringerem Maße im Alveolarraum (Zhou *et al.*, 2007). Aus diesem Grund ist die Wahl der Bronchialepithelzellen BEAS-2B auch aus physiologischen Gründen angemessener als die Wahl der Alveolarepithelzellen A549. Die Verwendung von BEAS-2B-Zellen, bei denen es sich nicht um Zellen malignen Ursprungs handelt, umgeht zusätzlich die Problematik der Überexpression des Transkriptionsfaktors Nrf2 in A549-Zellen, die zu einer veränderten oxidativen Stressantwort führen kann (Kweon *et al.*, 2006; X. Wang *et al.*, 2008).

Auf Basis der BEAS-2B-Zellen wurden drei verschiedene ALI-Modelle verwendet: ein Monokultur-Modell, das nur aus BEAS-2B-Zellen besteht, eine Cokultur mit dTHP-1-Zellen, die äquivalent zu den zuvor verwendeten Cokulturen aufgebaut war, sowie eine Triplekultur mit zusätzlichen CCD-33Lu-Zellen an der basalen Seite der *Transwell*-Membran.

Da die zuvor durchgeführten Experimente mit Min-U-Sil5 eine hohe Zeitabhängigkeit gezeigt hatten, wurde für die Expositionen mit CF ein Schema gewählt, in dem eine konstante Dosis auf die Zellkulturen gegeben, dagegen jedoch variable Nachinkubationszeiträume untersucht wurden (0, 3 und 23 h). Durch Unterschiede zwischen den Experimenten wies die deponierte Dosis Schwankungen auf und betrug 2-7 µg/cm². Zeitgleich zu den Expositionen mit vorbehandelten Carbonfasern wurden identische Zellkulturen gegenüber gefilterter Reinluft exponiert und konnten so als Negativkontrollen behandelten werden. Diese Proben werden im Folgenden als CAC (engl. *Clean air control*) bezeichnet.

Da die Datenlage zur toxikologischen Untersuchung von CF derzeit noch gering ist, werden die generierten Daten mit Literatur verglichen, in der andere, vergleichbare Substanzen untersucht werden. Vor allem MWCNTs, Asbestfasern und CB stehen durch ihre Ähnlichkeiten im Bezug auf Struktur, Größe und chemische Zusammensetzung im Fokus dieser Arbeit.

Die Experimente zur Untersuchung der CF-Toxizität wurden in enger Zusammenarbeit mit dem IBCS und dem Institut für Technische Chemie (ITC) durchgeführt. Die Zellkulturvor- und -nachbereitung fand in den Laboren des IBCS statt, die Faservorbereitung und Exposition in den Laboren des ITC. Die Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahmen (REM) der behandelten Carbonfasern und wurden freundlicherweise von Sonja Mühlhopt

erstellt und für die Arbeit zur Verfügung gestellt. Ein Teil der Arbeiten im Bereich Zellkultur, LDH-Assay und IL-8 ELISA wurde durch Dr. Susanne Fritsch-Decker aus der Arbeitsgruppe von PD Dr. Carsten Weiss durchgeführt. Darüber hinaus umfasst dieser Teil der Arbeit auch Ergebnisse aus der Abschlussarbeit von Caroline Quarz.

5.2.1 Physikochemische Charakterisierung der Carbonfasern

Die Eigenschaften der verwendeten Faser sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst. Bei der betrachteten Carbonfaser handelt es sich um eine PAN-basierte HM-Faser (engl. *high modulus*) mit einer hohen Steifigkeit. Die Faser wurde bei der Herstellung mit Polyurethan und einer Schlichte aus Bisphenol-A-Epichlorhydrin ummantelt, die die Matrixanhaftung der Faser verbessern soll (Park, 2015). Der Durchmesser der nativen Faser beträgt 4,9 μm , was die Faser unter unbehandelten Umständen als nicht respirabel klassifiziert. Allerdings kann die mechanische oder thermische Bearbeitung der Fasern zu Faserbrüchen und dadurch zur Freisetzung inhalierbarer, toxikologisch relevanter Fragmente führen (J. Wang *et al.*, 2017). Tatsächlich wurde diese Faser aufgrund ihres hohen Bruchverhaltens und starken Masseverlustes bei thermischer Behandlung für die weitergehenden Studien im Rahmen des CFC-Projektes ausgewählt (Daten nicht dargestellt).

Tabelle 5.2: Zusammenfassung der Eigenschaften der verwendeten Carbonfasern. Alle Daten wurden den Herstellerangaben entnommen. PAN: Polyacrylnitril, HM: *high modulus*, PU: Polyurethan, BPA: Bisphenol-A.

Material	Typ	Durchmesser (μm)	Präparation	Schlichte
PAN	HM	4,9	PU(1 %)	BPA-Epichlorhydrin

Die Vorbehandlung der CF erfolgte auf zwei verschiedene Weisen: die mechanisch behandelten CF wurden durch Mahlen in einer Planetenkugelmühle für 8 Minuten generiert. Die thermisch-mechanisch behandelten CF wurden in einem Rohrreaktor für 30 Minuten auf 800 °C erhitzt und anschließend für 2 Minuten in der Planetenkugelmühle gemahlen. Vor der Deposition erfolgte eine Abscheidung der Fragmente, die für eine Inhalation zu groß wären, durch einen PM₁₀-Filter. Mikroskopische Bilder der Faserstäube, aufgenommen durch REM nach Deposition im Expositionssystem, sind in Abbildung 5.14 dargestellt. Diese Aufnahmen stellen die Fasern genau so dar, wie sie auch auf den Zellen deponiert wurden. Es sind diverse unterschiedlich geformte Bruchstücke bei beiden Proben zu erkennen. Brüche der Fasern sind sowohl entlang als auch quer zur Faserachse entstanden und resultierten in partikulären, faser- und keilförmigen Fragmenten verschiedener, respirabler Größen. Insbesondere nach thermisch-mechanischer Behandlung ist die zusätzliche Bildung kleinerer Partikel im Submikrometerbereich sehr ausgeprägt, was für die folgenden toxikologischen Untersuchungen berücksichtigt werden muss. Es kam darüber hinaus durch die thermische Behandlung zu einer Entschlichtung der Fasern, was gegebenenfalls die Oberflächeneigenschaften der CF-Stäube verändern kann.

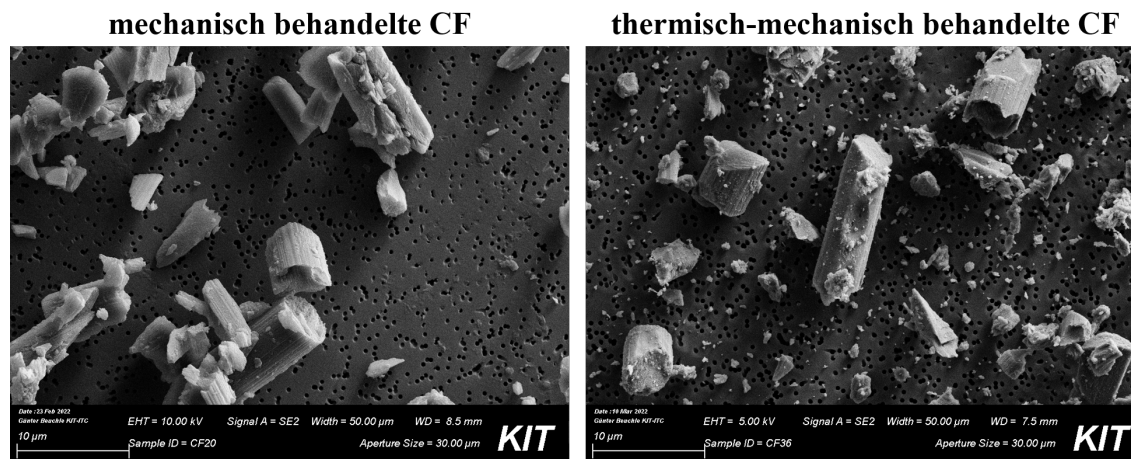


Abbildung 5.14: Mikroskopische Aufnahmen der CF-Stäube nach mechanischer (links) und thermisch-mechanischer Behandlung (rechts) und Deposition in der Expositionsstation. Die Aufnahmen wurden am Rasterelektronenmikroskop generiert und von Sonja Mülhopt vom ITC zur Verfügung gestellt. Maßstab: 10 µm.

5.2.2 Betrachtung der Zytotoxizität nach Exposition gegenüber aufgearbeiteten Carbonfasern

Zunächst wurde eine mögliche zytotoxische Wirkung der Faserstäube in BEAS-2B-Mono- und BEAS-2B/dTHP-1-Cokulturen untersucht (Abbildung 5.15). Hierzu wurden die Zellzahlen und LDH-Freisetzung der Kulturen nach den jeweiligen Nachinkubationszeiträumen betrachtet.

Bei den mechanisch behandelten CF-Stäuben konnte keine signifikante Veränderung der LDH-Freisetzung oder der Zellzahl festgestellt werden. Sowohl Mono- als auch Cokulturen wiesen nach Exposition gegenüber Reinluft und CF eine LDH-Freisetzung zwischen 2 und 10 % auf. Die absolute Zellzahl stieg ebenfalls bei allen Proben vergleichbar von ca. $8,5 \times 10^5$ nach 1 h auf $12-14 \times 10^5$ nach 24 h an. Im Gegensatz dazu zeigte die Behandlung mit thermisch-mechanisch behandelten CF zwar ebenso keine signifikanten Änderungen im LDH-Assay, jedoch war die Zellzahl sowohl in der Mono- als auch in der Cokultur an allen Zeitpunkten signifikant verringert. Hierbei fiel die absolute Zellzahl auf $4,5-6 \times 10^5$ in der CF-exponierten Monokultur und auf $6-7 \times 10^5$ in der Cokultur, während die CACs vergleichbare Ergebnisse zur mechanischen Behandlung aufwiesen. Diese Beobachtung erscheint zunächst widersprüchlich, da ein Verlust der Zellen auf eine Zytotoxizität hindeutet, diese hingegen nicht durch eine simultane LDH-Freisetzung bekräftigt werden konnte. Eine Einschränkung der Proliferation kann nicht der Grund für diesen Effekt sein, da bei Beendigung der Experimente weniger Zellen vorhanden waren als zu Beginn ausgestreut wurden. Ein zusätzlicher Effekt, der bei Experimenten mit thermisch-mechanisch behandelten CF aufgetreten ist, war die starke Agglomeration der Fasern bei Ablösung der Zellen und Überführen der Zell-Faser-Mischung in Suspension. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass ein Teil der Zellen in den CF-Agglomeraten eingeschlossen, allerdings nicht zerstört wurde, was den Zellverlust bei mangelnder LDH-Freisetzung erklären könnte. Grund für die starke Agglomeration der Fasern könnte die Entschlichtung sein, die für thermisch behandelte Fasern zuvor beschrieben wurde, und eine konsequente Veränderung

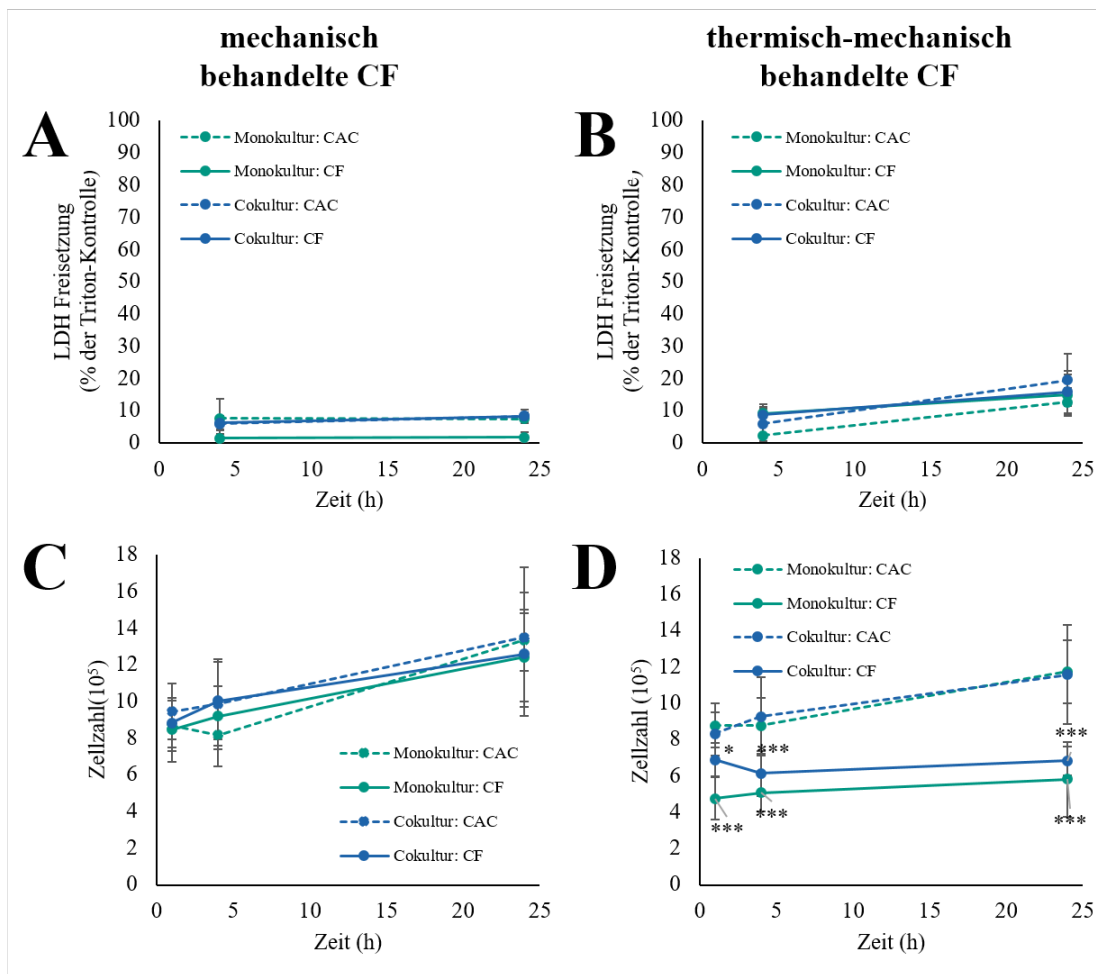


Abbildung 5.15: LDH-Freisetzung (A, B) und Zellzahlen (C, D) nach ALI-Exposition von Lungenzellmodellen gegenüber mechanisch (A, C) und thermisch-mechanisch (B, D) behandelten Carbonfasern (CF) und der zugehörigen Clean Air Controls (CAC). BEAS-2B-Monokulturen und BEAS-2B/dTHP-1-Cokulturen wurden für 1 h gegenüber CF-Stäuben exponiert und für 0, 3 oder 23 h nachinkubiert. Die Mittelwerte dreier Experimente \pm SD sind dargestellt. Signifikanz (Student's T-Test): */**/** (p < 0,05/0,01/0,005).

der Oberflächeneigenschaften der Fasern, die anschließend als reiner Kohlenstoff vorliegen. Eine starke Fähigkeit zur Agglomeration wurde für CB-Partikel, bei denen es sich ebenfalls um reinen Kohlenstoff handelt, bereits in der Literatur beschrieben. Diese ging, ähnlich zu den hier ermittelten Ergebnissen, ebenfalls nicht mit einer erhöhten Zytotoxizität oder zellulären Schäden einher, sowohl in ALI-exponierten A549-Zellen (Dilger *et al.*, 2016), als auch in einem *in-vivo*-Experiment mit Ratten (Kang *et al.*, 2013). Eine Affinität von CB-Partikeln zu Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), das einen Hauptbestandteil biologischer Membranen repräsentiert, die Inkorporation von CB-Partikeln in DPPC-Vesikel und konsekutive Änderung der Membraneigenschaften wurde auch in einem subzellulären System nachgewiesen (Guzmán *et al.*, 2015). Demzufolge könnten auch die thermisch-mechanisch behandelten CF, die in ihrer chemischen Zusammensetzung und Oberflächenstruktur CB-Partikeln ähneln könnten, eine Affinität zu zellulären Membranen aufweisen und den beobachteten Effekt auslösen.

In einer Studie mit Kaninchenmakrophagen wurde die Zytotoxizität von fünf verschiedenen CF-Kompositen in Epoxidharz mit der Toxizität von Quarz verglichen. In dieser Arbeit zeigte Quarz die höchste Zytotoxizität. Zwei der Komposite, von denen eines aus PAN- und eines aus Pech-Fasern aufgebaut war, zeigten dagegen eine moderate Zytotoxizität, während die restlichen Proben keine Zytotoxizität aufwiesen. Zusätzlich wurde ein hohes Maß an Phagozytose beobachtet (Martin *et al.*, 1989). Dieses Ergebnis stimmt mit den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen überein, da in der vorliegenden Arbeit Quarzpartikel lediglich eine moderate Zytotoxizität nach submerser Inkubation aufwiesen, CF wiederum als weniger akut toxische Substanzen keine Zytotoxizität im herkömmlichen Sinne auslösten. Es muss beachtet werden, dass es sich bei den verwendeten CF-Stäuben nicht um native, sondern um vorbehandelte Stäube handelt. In einer subchronischen Studie, in der Ratten gegenüber nativen PAN-Fasern mit einem Durchmesser von 7 μm exponiert wurden, konnten keine adversen Effekte festgestellt werden (Owen *et al.*, 1986). In einer weiteren Studie wurden RAW264.7-Zellen gegenüber thermisch behandelten Kompositen aus Graphenoxid und CF exponiert. Dabei wurde lediglich bei einer hohen Konzentration von 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ eine moderate Zytotoxizität festgestellt (Chapple *et al.*, 2022). Demnach handelt es sich bei CF, sowohl nativ als auch mechanisch oder thermisch-mechanisch vorbehandelt, nicht um ein *in-vitro* zytotoxisches Material.

Im Kontrast dazu stehen andere faserförmige Materialien, wie z.B. MWCNTs und Asbest. Diverse Studien beschreiben die zytotoxische Wirkung der beiden Materialien, auch bei geringen Dosen zwischen 3 und 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, beispielsweise in Rattenmakrophagen (Westphal *et al.*, 2019) und BEAS-2B oder THP-1-Zellen (M. Li *et al.*, 2012). Hierbei spielt die Vorbehandlung der Materialien eine untergeordnete Rolle: bei thermischer Vorbehandlung von Mitsui-7 MWCNTs wiesen diese in BEAS-2B- und SAEC-Zellen eine unveränderte bzw. leicht verringerte Zytotoxizität auf (Siegrist *et al.*, 2019). Gleichzeitig nimmt die Art der Kultivierung einen starken Einfluss auf die beobachtete Antwort. Bei vergleichender Exposition von submersen A549/dTHP-1-Cokulturen und Triplekulturen aus A549-Zellen, dTHP-1-Zellen und Fibroblasten an einem ALI zeigte das submerse Modell eine höhere Empfindlichkeit gegenüber diversen MWCNTs mit einer stärkeren Zytotoxizität (Di Ianni *et al.*, 2021). In einer weiteren Studie wurden gegenüber Mitsui-7 und Asbest exponierte A549-Monokulturen und kontaktlose A549/dTHP-1-Cokulturen hinsichtlich ihrer Zytotoxizität gegenüber gestellt. Hierbei zeigte die Cokultur eine verringerte Zytotoxizität, was auf protektive Wechselwirkungen zwischen den Zellen hindeutet (Ventura *et al.*, 2020a). Eine solche Beobachtung konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. In Hinblick auf die Zytotoxizität wurden keine Unterschiede zwischen Mono- und Cokulturen festgestellt.

Im Vergleich zu anderen Materialien lässt sich schließen, dass die mechanisch behandelten CF in ihrer fehlenden Zytotoxizität eher CB-Partikeln ähneln als faserförmigen Materialien. Dies kann mit dem hohen partikulären und geringen faserförmigen Anteil am CF-Staub erklärt werden. Währenddessen zeigten thermisch-mechanisch behandelte CF einen noch in der Literatur unbeschriebenen Mechanismus, der zwar keine Zytotoxizität im herkömmlichen Sinne umschließt, jedoch eine starke Adhärenz der Zellen an die entschlichteten CF. Bei der Einschätzung weiterer behandelter CF-Materialien muss

somit immer die Form und Größe der resultierenden Fragmente berücksichtigt werden: ein höherer Anteil an partikulären Fragmenten resultiert in vergleichbar geringen zytotoxischen Auswirkungen wie CB, während ein höherer Anteil an faserförmigen Fragmenten auch ein den MWCNTs und Asbestfasern ähnlicheres Verhalten auslösen könnte. Der Zustand der Faseroberfläche in Hinblick auf eine vorhandene bzw. fehlende Schlichte hat hierbei ebenfalls einen wesentlichen Einfluss.

5.2.3 Genexpressionsprofile nach Exposition gegenüber Carbonfasern

Um die toxikologische Antwort auf die unterschiedlich vorbehandelten Fasern auf transkriptioneller Ebene zu bewerten und mögliche Toxizitätsmechanismen abzuleiten, wurden Genexpressionsanalysen mithilfe einer Hochdurchsatz-RT-qPCR durchgeführt. Im Folgenden wird auf eine Auswahl relevanter Gene eingegangen. Eine Übersicht der verändert exprimierten Gene ist in Abbildung 5.16 als Heatmap dargestellt. Die Ergebnisse der vollen Gensets finden sich im Anhang (s. Anhang B Ergänzende Daten: Abbildung B.5 (mechanisch behandelte CF) und Abbildung B.6 (thermisch-mechanisch behandelte CF)).

Insgesamt wurden nach Exposition mit thermisch-mechanisch behandelten CF deutlich stärkere Effekte beobachtet als nach Exposition mit mechanisch behandelten CF, insbesondere im Bereich der Inflammation, der oxidativen Stressantwort und der Apoptose. Es konnten Kultur-spezifische Wirkungsweisen ermittelt werden. Beispielsweise hielt die Induktion inflammatorischer Gene bei der Cokultur nach Exposition mit mechanisch behandelten CF über einen längeren Zeitraum an, vermutlich durch die über einen längeren Zeitraum aktivierten dTHP-1-Zellen. Gleichzeitig zeigte die Monokultur nach Exposition gegenüber thermisch-mechanisch behandelten CF eine stärkere transkriptionelle Antwort als die Cokultur, beispielsweise für die Gene *IL-8*, *IL-6* und *DDIT3*. Im Cluster der Inflammation wurde darüber hinaus deutlich, dass sich die induzierten Veränderungen nicht nur in ihrer Stärke unterscheiden, sondern dass auch der zeitliche Aspekt unterschiedlich ist. Während bei mechanisch behandelten CF die höchste Induktion der inflammatorischen Gene unmittelbar nach Exposition stattfand, zeigten die gleichen Gene nach Exposition gegenüber thermisch-mechanisch behandelten Fasern ein Maximum nach 3 h Nachinkubation. Demnach war hier entweder die Aufnahme der Fasern in die Zellen oder die zelluläre Antwort deutlich verzögert.

Dennoch macht die Genexpressionsanalyse deutlich, dass bei den verschiedenen Behandlungsarten von CF ähnliche Gene verstärkt exprimiert werden, wenn auch in unterschiedlichem Maße und zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass die zugrunde liegenden toxikologischen Mechanismen für beide Behandlungsarten vergleichbar sind und sich nur in der Stärke der induzierten Antwort und dem Zeitpunkt unterscheiden, beispielsweise durch ein unterschiedliches Maß bei der Internalisierung der CF-Stäube. Da sich auch die verschiedenen Kultursysteme nur in einzelnen Genen unterscheiden, wird in der nachfolgenden Diskussion weniger auf Unterschiede zwischen den Kulturen und Behandlungsarten als auf einen allgemeinen Mechanismus der Toxizität von CF eingegangen.

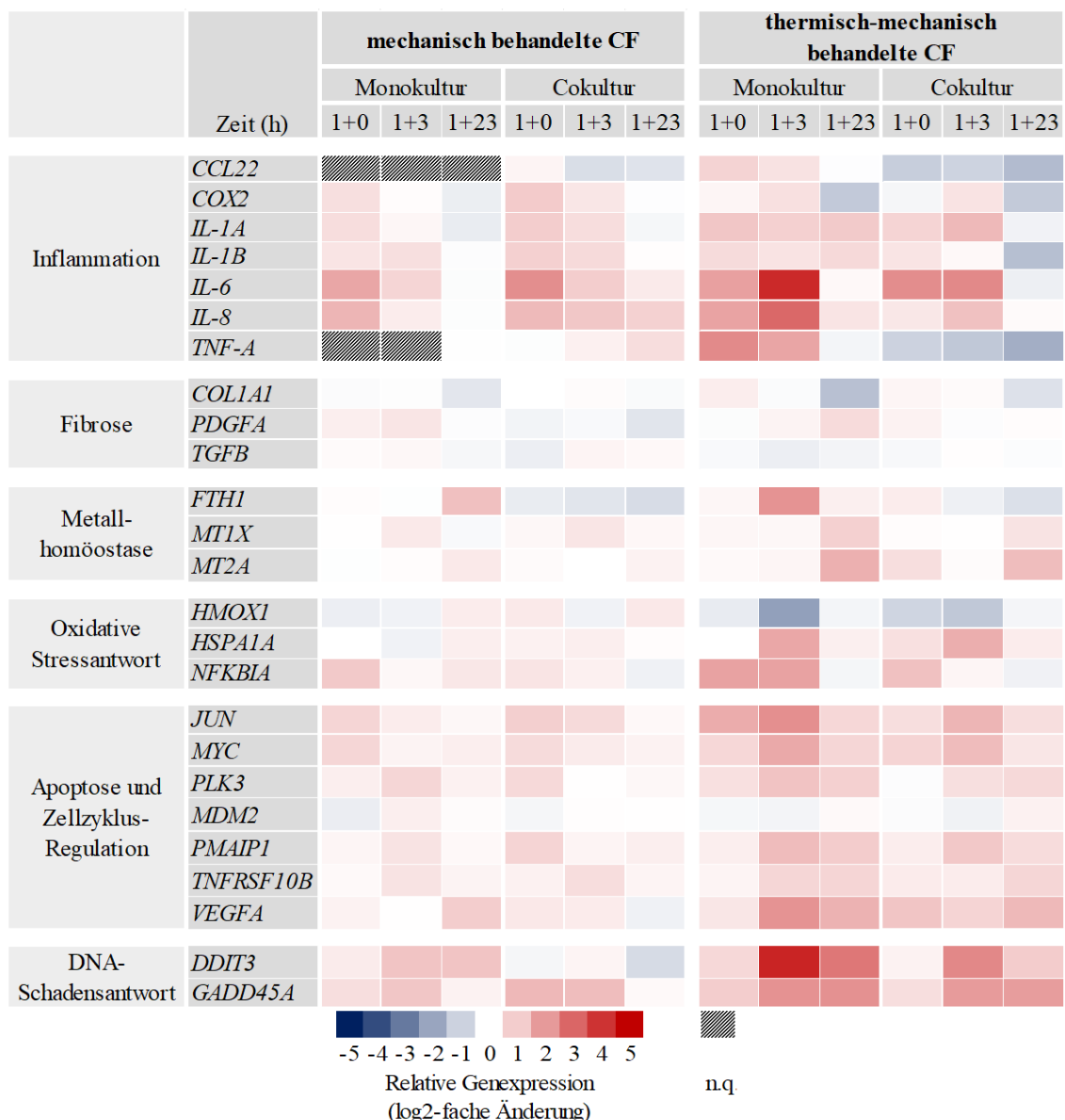


Abbildung 5.16: Schematische Darstellung der Genexpressionsprofile von BEAS-2B-Mono- und BEAS-2B/dTHP-1-Cokulturen nach ALI-Exposition gegenüber mechanisch und thermisch-mechanisch behandelten CF als Heatmap. Die Zellen wurden 1 h mit CF exponiert und 0, 3 oder 23 h nachinkubiert. Eine rote Färbung signalisiert eine Induktion, eine blaue Färbung eine Repression. n.q.: nicht quantifizierbar.

Beeinflussung der inflammatorischen Antwort

Eine detaillierte Betrachtung der drei Inflammationsgene *IL-6*, *IL-8* und *TNF-A* ist in Abbildung 5.17 dargestellt.

Hier werden die oben genannten Punkte besonders deutlich: *IL-6* zeigte in der Monokultur eine maximale Induktion von ca. 3,5-fach nach 1 h bei Exposition gegenüber mechanisch behandelten CF. Ein vergleichbarer Effekt wurde zu diesem Zeitpunkt auch nach Exposition mit thermisch-mechanisch behandelten CF erzielt, dieser stieg anschließend jedoch auf eine Induktion von ca. 18-fach nach 4 Stunden an. Die in der Cokultur beobachteten Veränderungen waren dagegen zumeist nicht signifikant. Ähnliche Effekte wurden für *IL-8* beobachtet. Das Gen *TNF-A* zeigt dagegen einen abweichenden Verlauf. Während das Gen

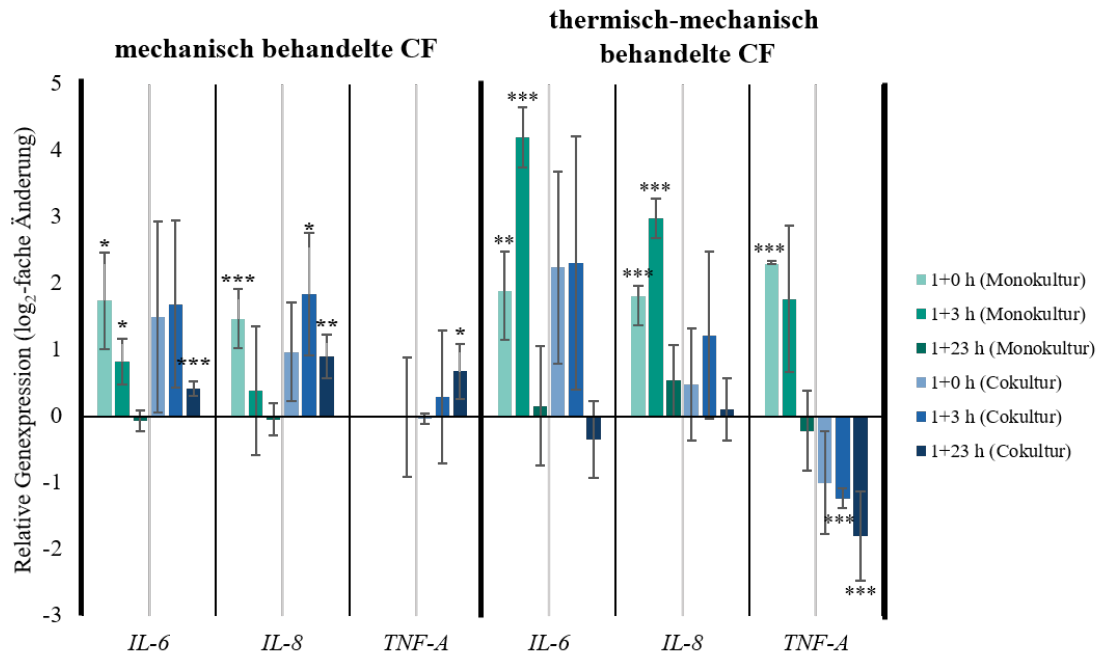


Abbildung 5.17: Einfluss von mechanisch und thermisch-mechanisch behandelten CF auf die inflammatorische Genexpression von BEAS-2B-Mono- und BEAS-2B/dTHP-1-Cokulturen nach ALI-Exposition. Die Zellen wurden 1 h mit CF exponiert und 0, 3 oder 23 h nachinkubiert. Es ist der Mittelwert \pm SD dreier unabhängiger Experimente dargestellt. Signifikanz zur Negativkontrolle (Student's T-Test): * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,005$).

nach Exposition gegenüber mechanisch behandelten CF nicht detektierbar war bzw. nur schwach induziert wurde, wurde *TNF- α* in der Monokultur nach 1 h Exposition gegenüber thermisch-mechanisch behandelten CF ca. 6-fach induziert, in der Cokultur allerdings mit steigender Nachinkubationszeit signifikant bis zu 3,5-fach reprimiert. Ein vergleichbarer Effekt wurde auch für *CCL22* in abgeschwächtem Maße festgestellt.

Die einzige Studie, in der ein Einfluss von CF auf die Inflammation untersucht wurde, behandelt die Freisetzung von *TNF- α* in RAW264.7-Mausmakrophagen nach Exposition gegenüber thermisch behandelten Kompositen aus Graphenoxid (GO) und CF. Hierbei wurde durch CF-Rückstände konzentrationsabhängig *TNF- α* freigesetzt. Es kam zu einem zusätzlich verstärkenden Effekt durch Kombinationswirkung von GO und CF (Chapple *et al.*, 2022).

Die Induktion inflammatorischer Signalwege durch andere faserförmige Materialien wurde bereits vertieft behandelt. Eine Studie, in der verschiedene Carbon-basierte Materialien in Hinblick auf die inflammatorische Antwort nach Instillation in Mäusen verglichen wurden, darunter CB-Partikel, MWCNTs und GO-Platten, zeigte die Induktion von *IL-6* und *TNF* als Reaktion auf alle drei Materialien. Im Falle der MWCNTs und GO wurde eine Rolle zweier TLR als Sensoren für die beiden Materialien und die nachfolgende inflammatorische Signalweiterleitung postuliert. Bei der Exposition gegenüber CB wiesen TLR keine so große Bedeutung auf (Danielsen *et al.*, 2021). Auch induzierten MWCNTs in Rattenmakrophagen *TNF- α* und *TGF- β* sowohl auf Ebene der Genexpression als auch die Freisetzung der beiden Zytokine in das umliegende Medium (Westphal *et al.*, 2019). Zudem wurde in Makrophagen sowie dendritischen Zellen die Sekretion von *TNF- α* und *IL-8* sowohl durch

Crocidolit-Asbest als auch durch MWCNTs verstärkt (Clift *et al.*, 2014). Gleichzeitig zeigte eine Genexpressionsanalyse mit der gleichen Auswahl an Genen, wie es in dieser Arbeit verwendet wurde, bei Mitsui-7-exponierten A549-Zellen keine relevanten Effekte. Dieses Ergebnis kann mit der geringen deponierten Dosis von ca. 23 ng/cm² und der starken thermischen Behandlung der CNTs vor Applikation auf die Zellen zusammenhängen, so dass diese nicht mehr in Faserform vorlagen (Hufnagel *et al.*, 2021b). In einer anderen Genexpressionsanalyse mit Asbest-exponierten primären humanen Alveolarepithelzellen wurde eine signifikante Induktion diverser für Zytokine kodierende Gene, darunter *IL-8*, *IL-6*, *COX2* und *TNF-A*, nach 24 h Exposition beschrieben. Dieses Ergebnis deckt sich mit den in dieser Arbeit detektierten inflammatorischen Genen, zeigt jedoch einen anderen zeitlichen Verlauf der Inflammation. Duncan *et al.* führten zudem einen Teil der Effekte auf Verunreinigungen der Asbestfasern mit Eisen zurück (Duncan *et al.*, 2014). Eine Studie, in der die Toxizität von CNTs und CB in RAW264.7-Zellen verglichen wird, demonstrierte eine konzentrationsabhängige Freisetzung von ROS für beide Materialien, für die CNTs jedoch in höherem Maße. Gleichzeitig wurde auch TNF- α durch CNTs freigesetzt, durch CB jedoch nicht, was das höhere Potenzial einer inflammatorischen Wirkung durch CNTs zeigt (Figarol *et al.*, 2015).

Die dargestellten Studien suggerieren einen starken Einfluss von TNF- α bei der Faser-vermittelten Signalweiterleitung. Dieser Effekt kann in der vorliegenden Arbeit lediglich für mit thermisch-mechanisch behandelten CF exponierte Monokulturen bestätigt werden. Dabei nehmen diese möglicherweise eine Rolle ein, die toxikologisch zwischen CB und CNTs liegt. In den Cokulturen stellte sich, konträr dazu, eine Repression des kodierenden Gens dar, obwohl es sich dabei und auch bei CCL22 um für Makrophagen charakteristische Gene und Proteine handelt (Godiska *et al.*, 1997; J. Sethi & Hotamisligil, 2021). Dies und die allgemein geringere Aktivität der Cokultur kann eventuell mit dem zuvor beschriebenen Phänomen des Zellverlusts erklärt werden. Die stark agglomerierenden thermisch-mechanisch behandelten Fasern verursachten mutmaßlich eine verstärkte Adsorption der Zellen an die Fasern. Da die dTHP-1-Zellen auf dem Epithel-Monolayer liegend vor den Epithelzellen mit den Fasern in Kontakt traten, liegt die Vermutung nahe, dass sie auch zuerst an den Fasern hafteten und dadurch verloren gingen. Somit wurde die vermeintliche Repression der Gene dadurch vermittelt, dass die dTHP-1-Zellen in den CF-exponierten Proben vermindert und in den CACs in voller Zahl vorhanden waren. Ein solcher Effekt wurde in der Literatur bislang noch nicht beschrieben. Eine Abschätzung davon, wie sich solche Effekte in einem *in-vivo*-System auswirken würden, ist schwierig. Allerdings kann eine solch starke Agglomeration und Adhärenz an Zellen in Hinblick auf die mögliche Internalisierung der Testsubstanz und Schäden der Zellmembran und extrazellulären Matrix kritisch sein, wie bereits für Graphen-basierte NM zusammengefasst wurde (Ou *et al.*, 2016).

Die Induktion der Inflammationsgene und des Gens *NFKBIA* kann mechanistisch auf den NF- κ B-Signalweg zurückgeführt werden, der, ähnlich zu den in Quarz-Experimenten erzielten Effekten, auch bei CF eine wichtige Rolle zu spielen scheint (Tripathi & Aggarwal, 2006). Auch in Asbest-exponierten transgenen Mäusen wurde die Bedeutung dieses Signalwegs bei der Faser-vermittelten Inflammationsantwort festgestellt, beispielsweise durch

die Freisetzung der Zytokine IL-6, IL-1 β und *Macrophage chemotactic protein-1*. Zusätzlich wurde durch die Mutation von I κ B α eine dauerhafte Unterdrückung des Signalwegs herbeigeführt, was in einer verringerten inflammatorischen Antwort auf Asbest-Fasern resultierte (Haegens *et al.*, 2007). Die Induktion von IL-1 β wurde ebenfalls in einer kontaktlosen Cokultur aus A549 und dTHP-1-Zellen nach Exposition mit Mitsui-7 MWCNTs und Asbestfasern beschrieben (Ventura *et al.*, 2020a). In einer weiteren Studie, in der THP-1-Zellen mit CB-Nano- und Mikropartikeln behandelt wurden, wurde ebenfalls eine Freisetzung von IL-1 β festgestellt, wobei der Effekt durch Nanopartikel ausgeprägter war. Ebenso wurden *COX2* und *CCL2* auf Ebene der Genexpression induziert (Sahu *et al.*, 2014).

Neben dem NF- κ B-Signalweg kann eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms als möglicher Mechanismus betrachtet werden, was durch die Induktion von *IL-1B*, *IL-1A* und *COX2* auch für die mechanisch und thermisch-mechanisch behandelten Fasern in Frage kommt (Broz & Dixit, 2016; Simmons *et al.*, 2004). In einer Studie mit gegenüber Chrysotyl-Asbest exponierten BEAS-2B- und dTHP-1-Zellen in einem *conditioned media*-Szenario wurde die Inflammasom-Aktivierung aufgrund der starken Induktion von IL-1 β und Caspase-1 ebenfalls als grundlegender Mechanismus vorgeschlagen. Gleichzeitig wurde in dieser Studie auch die Induktion des NF- κ B-Dimers p65 sowie die verstärkte DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors AP-1 vorgeschlagen. Diese Ergebnisse suggerieren eine enge Verbindung der drei Signalwege (M. Li *et al.*, 2012).

Beeinflussung der oxidativen Stressantwort und Fibrose

Da der NF- κ B-Signalweg sowie das Inflammasom neben der Aktivierung durch Zytokine auch durch oxidativen Stress induziert werden, liegt ein ROS-vermittelter Mechanismus auch bei den behandelten CF nahe (Schreck *et al.*, 1992). Allerdings wurden nur wenige Gene dieses Clusters durch Exposition mit den CF-Stäuben beeinflusst. In Abbildung 5.18 sind die Transkriptionsänderungen des Gens *HMOX1* dargestellt.

HMOX1 kodiert für die Hämoxygenase 1 und damit für einen der empfindlichsten ROS-Marker. Durch Exposition gegenüber mechanisch behandelten CF kam es zu keiner biologisch relevanten Beeinflussung dieses Gens. Im Gegensatz dazu wurde nach Exposition gegenüber thermisch-mechanisch behandelten CF eine durchgehende Repression des Gens vermerkt. Besonders auffallend war die signifikante Repression um das 4,5-fache durch BEAS-2B-Monokulturen nach 4 h. Dies zeigt, dass der Transkriptionsfaktor Nrf2 vermutlich nicht an der toxikologischen Antwort beteiligt ist bzw. sogar herunterreguliert wird, wobei der Mechanismus hierfür unklar ist (Loboda *et al.*, 2016). Für CB wurde ebenfalls eine fehlende Induktion der *HMOX1* auf Proteinebene in BEAS-2B-Zellen beschrieben (Diabaté *et al.*, 2011). Die Induktion der Metallothionein-kodierenden Gene *MT1X* und *MT2A* könnte hierbei auch ein zusätzliches Zeichen für oxidativen Stress sein, wie es auch zuvor für Quarz beschrieben wurde. Es ist jedoch auch eine Induktion durch die verstärkt exprimierten Zytokine möglich (Ruttkey-Nedecky *et al.*, 2013).

Eine fibrotische Antwort konnte für die CF-exponierten Zellen in dieser Arbeit nicht festgestellt werden, obwohl diese für faserförmige Substanzen bereits in diversen Studien postuliert wurde. Im Falle des Gens *COL1A1* kam es sogar zu einer leichten Repression. In einer Studie wurden nach Exposition von Mäusen gegenüber MWCNTs durch Aspiration Un-

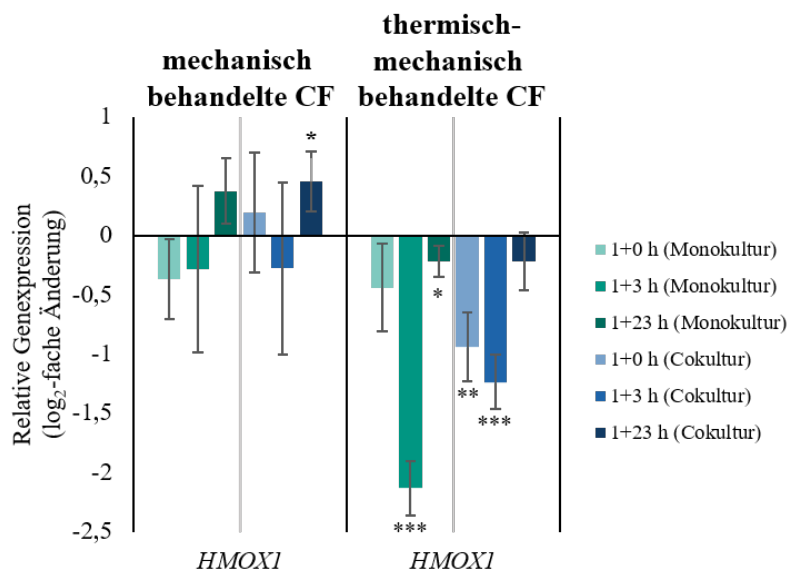


Abbildung 5.18: Einfluss von mechanisch und thermisch-mechanisch behandelten CF auf die Expression des Gens *HMOX1* von BEAS-2B-Mono- und BEAS-2B/dTHP-1-Cokulturen nach ALLI-Exposition. Die Zellen wurden 1 h mit CF exponiert und 0, 3 oder 23 h nachinkubiert. Es ist der Mittelwert \pm SD dreier unabhängiger Experimente dargestellt. Signifikanz zur Negativkontrolle (Student's T-Test): * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,005$).

tersuchungen des Peptidoms durchgeführt. Neben einer signifikanten Induktion mehrerer Zytokine, darunter erneut TNF- α und TGF- β , wurden auch Mediatoren wie Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und deren Inhibitor TIMP1 sowie Adhäsionsproteine verstärkt exprimiert, was fibrotische Veränderungen der extrazellulären Matrix indiziert (Mostovenko *et al.*, 2019). Eine fibrotische Antwort mit einer nachfolgenden Akkumulation von Collagen wurde in einer weiteren Studie mit Mäusen demonstriert, in der die Toxizität von SWCNTs, Asbestfasern und CB mit einer Proteomics-Methode untersucht wurde. Diese war bei Exposition gegenüber SWCNTs deutlich stärker als nach Exposition gegenüber Asbestfasern und CB. Auf ähnliche Weise wurde durch die SWCNTs eine deutlich stärkere inflammatorische und auch apoptotische Antwort induziert (Teegarden *et al.*, 2011). Grund für die in dieser Arbeit ausbleibende fibrotische Antwort sind womöglich zu kurze Inkubationszeiten, da die Expression profibrotischer Marker und das Einsetzen der epithelial-mesenchymalen Transition in verschiedenen Lungenzellen (A549, SAEC, BEAS-2B) erst nach drei Tagen Inkubation mit Asbest beschrieben wurde (Tamminen *et al.*, 2012).

Beeinflussung der Apoptose und Zellzyklusregulation

Aus der Heatmap wird deutlich, dass mehrere Gene der apoptotischen Antwort durch vorbehandelte CF verändert exprimiert wurden. Insbesondere für thermisch-mechanisch behandelte CF konnte eine deutliche Induktion der Gene *JUN*, *MYC*, *PLK3*, *PMAIP1* UND *VEGFA* beobachtet werden, welche nach Exposition gegenüber mechanisch behandelten CF weniger ausgeprägt war.

Eine Beteiligung der Apoptose an der zellulären Antwort wurde sowohl für faserförmige als auch für Carbon-basierte Materialien in der Literatur beschrieben. Bei Untersuchung von A549-Mono- und A549/dTHP-1-Cokulturen nach Exposition mit Mitsui-7 und Crocidolit-

5.2. UNTERSUCHUNG DER TOXIZITÄT VON AUFGEARBEITETEN CARBONFASERN AN EINEM AIR-LIQUID INTERFACE

Asbestfasern wurde eine leichte Induktion der Apoptose indirekt über eine gesteigerte Aktivität der Caspasen 3 und 7 nachgewiesen, allerdings nur nach Asbest-Inkubation (Ventura *et al.*, 2020a). Diese beiden Caspasen werden sowohl als Teil der extrinsischen als auch der intrinsischen Apoptose-Antwort aktiviert (Salvesen, 2002). In einer ähnlichen Studie wurde die Änderung von microRNAs durch die gleichen Materialien in A549-Zellen untersucht und diese Veränderungen verschiedenen zellulären Antworten zugeordnet. Für beide Materialien wurden als Hauptantworten eine Veränderungen der Expression p53-regulierter Gene, verschiedene im Krebs relevante Signalwege sowie TGF- β identifiziert. Bei Mitsui-7 waren zusätzlich Änderungen des Zytoskeletts und der extrazellulären Matrix präsent, bei Asbest auch Zellzyklus-regulierende Antworten (Ventura *et al.*, 2020b). Darüber hinaus lösten auch CB-Partikel in Bronchialepithelzellen eine Apoptose aus, die mutmaßlich auf einem intrinsischen Mechanismus beruhte und durch die ROS-vermittelte Freisetzung von Cytochrom c ausgelöst wurde (Hussain *et al.*, 2010). Eine weitere Studie postulierte eine Induktion der Pyroptose, einer Art des Inflammasom-vermittelten Zelltodes, in RAW264.7-Zellen durch CB-Partikel, was eine zusätzliche Verbindungsstelle zwischen der inflammatorischen Antwort und einem programmierten Zelltod darstellt. Der Prozess der Pyroptose geht jedoch ebenfalls mit einer erhöhten LDH-Freisetzung einher, weswegen er für die CF-Stäube weitgehend ausgeschlossen werden kann (Reisetter *et al.*, 2011).

Im Folgenden wird die Beteiligung bestimmter Signalwege an der apoptotischen Antwort mechanistisch diskutiert. Hierzu sind in Abbildung 5.19 exemplarisch Transkriptionsänderungen der apoptotischen Gene *JUN*, *MYC* und *VEGFA* dargestellt.

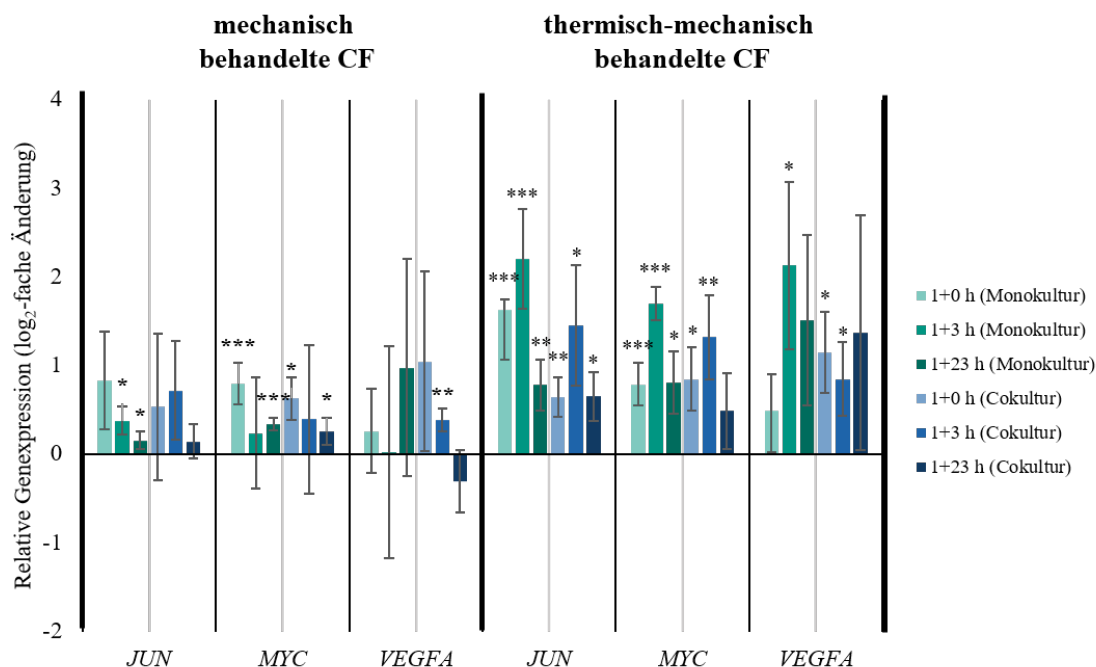


Abbildung 5.19: Einfluss von mechanisch und thermisch-mechanisch behandelten CF auf Gene der Apoptose und Zellzyklusregulation von BEAS-2B-Mono- und BEAS-2B/dTHP-1-Cokulturen nach ALI-Exposition. Die Zellen wurden 1 h mit CF exponiert und 0, 3 oder 23 h nachinkubiert. Es ist der Mittelwert \pm SD dreier unabhängiger Experimente dargestellt. Signifikanz zur Negativkontrolle (Student's T-Test): * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,005$).

JUN, welches für ein Monomer des AP-1-Heterodimers kodiert, wurde nach Exposition gegenüber thermisch-mechanisch behandelten Fasern sowohl in der Mono- (ca. 5-fach) als auch in der Cokultur (ca. 3-fach) induziert (Hess & Schorpp-Kistner, 2004). AP-1 ist über seine Verbindung mit dem JNK/MAPK-Signalweg direkt an der Zellzyklusregulation, Apoptose und Differenzierung beteiligt (Ameyar *et al.*, 2003). Auch andere in dieser Arbeit ermittelte Antworten können größtenteils verschiedenen Bestandteilen der MAPK-Kinase-Signalkaskade zugeordnet werden. Vor allem das Gen *VEGFA*, das für den *vascular endothelial growth factor* α kodiert, fällt durch seine signifikante und biologisch relevante Induktion nach Exposition gegenüber thermisch-mechanisch behandelten CF auf. VEGF-A reguliert den MAPK/ERK-Signalweg, indem es an den VEGF-Rezeptor bindet und eine intrazelluläre Signalkaskade auslöst (L. Wu *et al.*, 2000). Darüber hinaus kann das Protein über den p38/MAPK-Signalweg die Zellmigration beeinflussen (Kobayashi *et al.*, 2006). Zusätzlich ist für TNF- α ebenfalls eine induzierende Wirkung auf die MAPK-Signalwege bekannt (J. Shi & Sun, 2018). Bei *MYC*, welches verstärkt nach Exposition gegenüber thermisch-mechanisch behandelten CF exprimiert wird, handelt es sich um ein Gen, das durch die MAPK/ERK-Kaskade induziert wird (Zhu *et al.*, 2008). Der gleichnamige Transkriptionsfaktor c-Myc ist direkt an der Regulation diverser Gene der Zellzyklusregulation, Apoptose und Proliferation beteiligt und als Proto-Onkogen bekannt (Dang *et al.*, 1999). Es kann für die Exposition gegenüber CF keine verstärkte Tendenz zu pro- oder antiapoptotischen Mechanismen abgeleitet werden: während der MAPK/ERK-Signalweg eher die Proliferation moduliert, hat der p38/MAPK-Signalweg zumeist proapoptotische Wirkungsweisen (Cargnello & Roux, 2011). Zusätzlich wurde auch eine Induktion der Gene *PMAIP1* und *PLK3* beobachtet. Diese kodieren jeweils für die proapoptotischen Proteine Noxa und *Polo-like kinase 3* (Plk3), welche in engem Kontext mit dem Tumorsuppressor p53 stehen und dadurch Zellzyklusarrest und Apoptose induzieren können. Insbesondere Plk3 stellt hierbei eine funktionelle Verbindung zwischen DNA-Schäden und Apoptose dar (Oda *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2001). Für das Gen *MDM2*, welches für das gleichnamige Protein kodiert, konnte andererseits keine Änderung in der Genexpression festgestellt werden. MDM2 reprimiert in einem Mechanismus der negativen Rückkopplung p53 durch Ubiquitinierung und stellt dadurch einen empfindlichen Sensor für p53-Aktivität dar (D. Shi & Gu, 2012). Dieser Effekt widerspricht der Hypothese einer Beteiligung von p53 an der CF-vermittelten Signalweiterleitung und Apoptose.

Sowohl für CNTs als auch für Asbestfasern wurde die Beteiligung der MAPK-Signalwege und auch p53 in Lungenzellen bereits ausführlich diskutiert (Donaldson *et al.*, 2013; Dong & Ma, 2015; Kamp & Weitzman, 1999; Tamminen *et al.*, 2012). Eine Induktion diverser Zielgene des JNK/AP-1-Signalwegs konnte bei Untersuchung des Peptidoms MWCNT-exponierter Mäuse ebenfalls festgestellt werden (Mostovenko *et al.*, 2019). Gerade bei der Einleitung der Apoptose und bei malignen Entwicklungen nach Faserexposition von Lungen- und Mesothelzellen spielen diese Signalwege eine entscheidende Rolle. Für CB wurde ebenfalls eine Beteiligung der MAPK-Signalwege, sowohl MAPK/ERK, p38 als auch JNK, in primären Rattenepithelzellen beschrieben (Totlandsdal *et al.*, 2010). Eine Rolle von p53 bei der CB-vermittelten Toxizität konnte jedoch nicht festgestellt werden (Belade

et al., 2015). Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass die CF-Stäube toxikologisch eine Zwischenrolle zwischen faserförmigen CNTs und partikulären CB-Partikeln annehmen.

Beeinflussung der DNA-Schadensantwort und -reparatur

Im Cluster "DNA-Schadensantwort und Reparatur" wurden lediglich die beiden Gene *GADD45A* und *DDIT3* in einem biologisch relevanten Maß induziert. Eine detaillierte Betrachtung dieser beiden Gene ist in Abbildung 5.20 dargestellt.

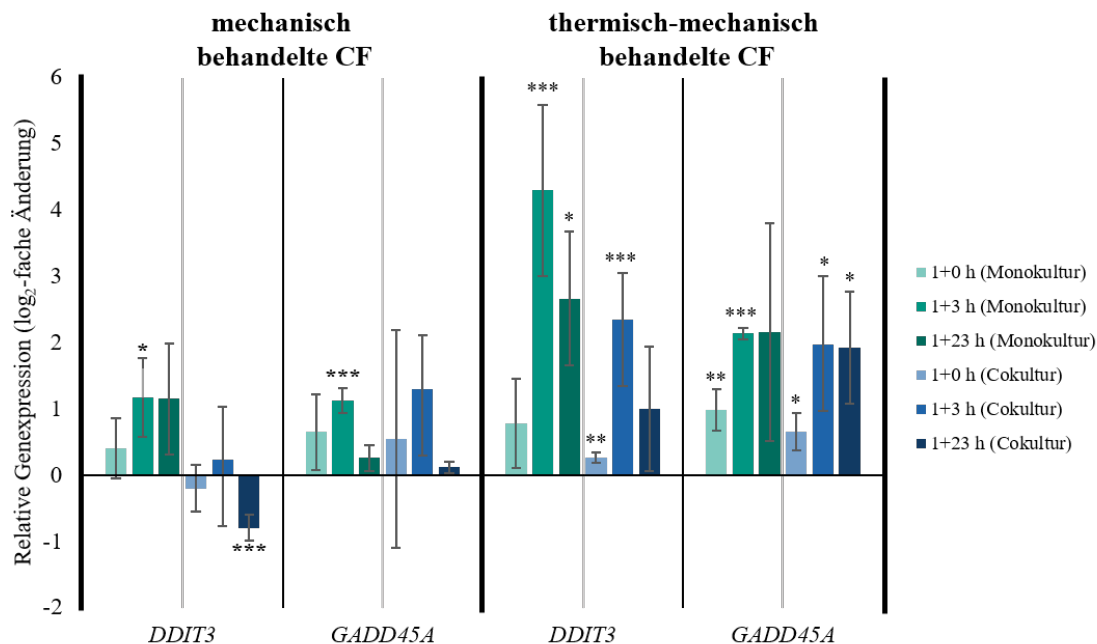


Abbildung 5.20: Einfluss von mechanisch und thermisch-mechanisch behandelten CF auf die Expression des DNA-Schadensmarkers *DDIT3* von BEAS-2B-Mono- und BEAS-2B/dTHP-1-Cokulturen nach ALI-Exposition. Die Zellen wurden 1 h mit CF exponiert und 0, 3 oder 23 h nachinkubiert. Es ist der Mittelwert \pm SD dreier unabhängiger Experimente dargestellt. Signifikanz zur Negativkontrolle (Student's T-Test): * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,005$).

Bei Exposition gegenüber mechanisch behandelten CF wurden nur wenige signifikante und biologisch relevante Veränderungen bei beiden Genen festgestellt. Die maximale Aktivierung überschritt hierbei nur selten den Grenzwert einer Verdopplung oder Halbierung der Transkriptmenge. Neben *IL-6* zeigte das Gen *DDIT3* allerdings die stärksten Veränderungen im ganzen Genset, beispielsweise eine Induktion um den Faktor 23 nach Exposition der Monokultur gegenüber thermisch-mechanisch behandelten CF und einer Nachinkubationszeit von 4 h. Hierbei waren die Effekte in der Monokultur ausgeprägter als in der Cokultur. *GADD45A* zeigte insgesamt eine geringere Effektstärke mit einer maximalen Induktion um den Faktor 4,5 in der Monokultur nach 4 h. Allerdings konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Mono- und Cokultur beobachtet werden. Bei *GADD45A* bzw. dem gleichnamigen *Growth arrest and DNA-damage-inducible protein* handelt es sich um ein Molekül, das neben der Induktion durch DNA-Schäden auch durch diverse andere Faktoren verstärkt exprimiert wird, beispielsweise durch Wachstumsarrest, UV-Strahlung oder Hypoxie. Die Aktivierung von *GADD45A* wird auch durch p53 vermittelt (Zhan, 2005). Unter den vielen von *GADD45A* verstärkend regulierten Signalwegen finden sich erneut

die JNK- sowie p38/MAPK-Signalwege (Takekawa & Saito, 1998). Das Gen *DDIT3* (*DNA damage induced transcript 3*) kodiert ebenfalls für ein Protein, welches durch unterschiedliche zelluläre Reize induziert werden kann, etwa DNA-Schäden, Stress des Endoplasmatischen Retikulums oder Hypoxie. Es ist an der Regulation diverser Gene beteiligt, die Zellzyklus-Arrest und Apoptose induzieren. Bei einem der durch *DDIT3* regulierten Proteine handelt es sich auch um das *Heat shock protein 72*, welches auf Ebene der Genexpression auch nach CF-Behandlung leicht induziert wurde (*HSPA1A*) (Jauhiainen *et al.*, 2012). Auch der JNK-Signalweg wirkt induzierend auf *DDIT3*, was eine verstärkte Expression des *Death receptor 5* (*DR5*) zur Folge hat und die Rezeptor-vermittelte extrinsische Apoptose einleitet (Guo *et al.*, 2017). Dieser Effekt ist auch in den hier dargestellten Ergebnissen durch die Hochregulation von *TNFRSF10B* zu erkennen, dem Gen, das für den *DR5* kodiert.

Die Induktion von *DDIT3* und *GADD45A* suggeriert deutlich die Beteiligung von DNA-Schäden an der toxikologischen Antwort nach CF-Exposition. Die gleichzeitige Aktivierung von *PLK3* untermauert diese Vermutung, da es sich bei dem korrespondierenden Protein um eine funktionelle Verbindung zwischen DNA-Schäden und der nachfolgenden Einleitung der Apoptose durch p53 handelt (Xie *et al.*, 2001). Diese Vermutung wird durch eine Studie gestützt, in der nach Exposition von Mäusen gegenüber nativen und thermisch behandelten Carbonfasern eine Hochregulation diverser Marker für die DNA-Reparatur und DNA-Remodellierung beobachtet wurde (Moriyama *et al.*, 2019). Es muss jedoch beachtet werden, dass gerade die Induktion von *DDIT3* und *GADD45A* als universelle Stressmarker auch durch andere Signalwege und Zellschäden getrieben sein kann (Jauhiainen *et al.*, 2012; Zhan, 2005). In der vorliegenden Arbeit wird die Bildung von DNA-Strangbrüchen auf funktioneller Ebene in einem späteren Kapitel betrachtet (s. 5.2.5 Induktion von DNA-Strangbrüchen nach Exposition gegenüber Carbonfasern).

Für die Genexpressionsanalysen kann zusammengefasst werden, dass vermutlich eine große Spanne unterschiedlicher Signalwege durch thermisch-mechanisch behandelte CF ausgelöst wird. Es kann angenommen werden, dass die zellulären Antworten auf mechanisch behandelte CF vergleichbar sind, jedoch in einem geringeren Maße stattfinden. Dies könnte auf Unterschiede in der Oberflächenbeschaffenheit der CF-Stäube zurückgeführt werden, die bereits durch eine veränderte Zytotoxizität aufgefallen sind. Nach Exposition gegenüber thermisch-mechanisch behandelten CF wurden darüber hinaus stärkere Antworten in Hinblick auf eine Induktion der Genexpression in der Monokultur beobachtet, was mit einem zeitlich früheren Verlust der Makrophagen in der Cokultur begründet werden kann. Insgesamt konnten als relevante Signalwege im Bereich der Inflammation die Aktivierung von NF- κ B und NLRP3-Inflammasom und im Bereich der Apoptose diverse Mitglieder der MAPK-Signalkaskade identifiziert werden. Eine Beteiligung von ROS kann zwar aufgrund der hohen Inflammationsantwort und der NF- κ B-Aktivierung ebenfalls vermutet werden, wird jedoch nicht durch eine starke Antwort im Cluster "Oxidative Stressantwort" gestützt. Es konnten ebenfalls keine relevanten Änderungen im Cluster "Fibrose" verzeichnet werden. Eine Bildung von DNA-Schäden muss ebenfalls kritisch betrachtet werden, da lediglich zwei Gene dieses Clusters in besonderem Maße induziert wurden, diese jedoch auch durch andere zelluläre Stressreize aktiviert werden können.

5.2.4 Zytokinfreisetzung nach Exposition gegenüber Carbonfasern

Um die inflammatorische Antwort nach Exposition von Mono- und Cokulturen auf Proteinebene zu untersuchen, wurde die Freisetzung von IL-8 in das umgebende Medium untersucht. Dies sowie die IL-8-Freisetzung von mit Lipopolysaccharid (LPS) behandelten Zellen ist in Abbildung 5.21 dargestellt.

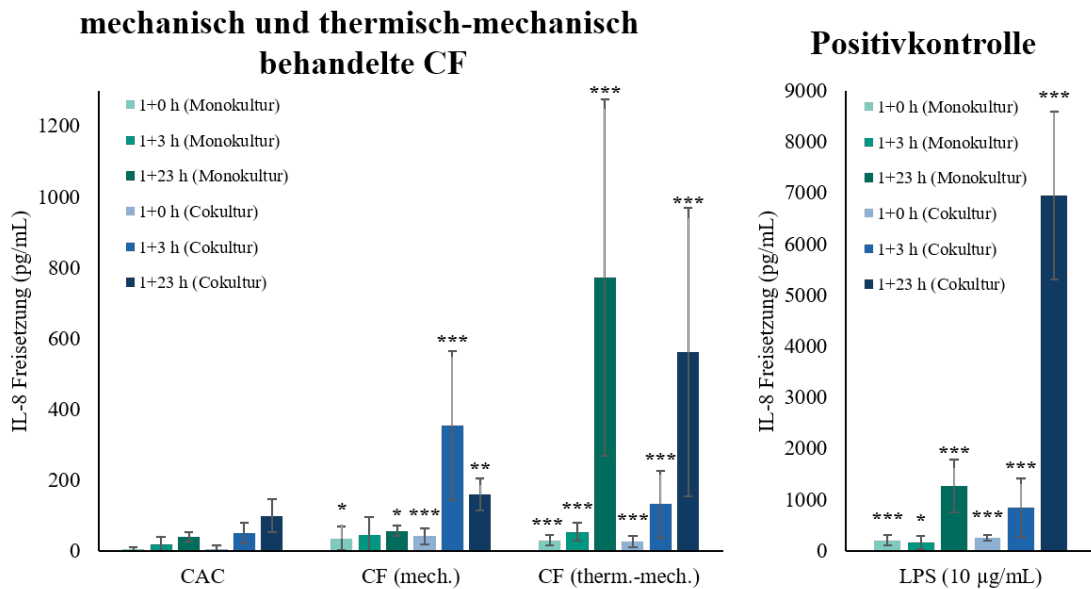


Abbildung 5.21: Zytokinfreisetzung nach ALI-Exposition von Lungenzellmodellen gegenüber mechanisch und thermisch-mechanisch behandelten Carbonfasern (CF) und der zugehörigen Clean Air Controls (CAC) (links) BEAS-2B-Monokulturen und BEAS-2B/dTHP-1-Cokulturen wurden für 1 h gegenüber CF-Stäuben exponiert und für 0, 3 oder 23 h nachinkubiert. Als Positivkontrolle wurde mit 10 µg/mL LPS inkubiert (rechts). Die Mittelwerte dreier Experimente ± SD sind dargestellt. Signifikanz zur CAC (Student's T-Test): */**/** (p < 0,05/0,01/0,005).

Die Positivkontrolle LPS löste durchweg eine hohe IL-8-Freisetzung aus, insbesondere in der Cokultur. Vergleichbare Effekte in Hinblick auf Unterschiede zwischen Mono- und Cokultur wurden bereits in der Literatur beschrieben (J. Li *et al.*, 2020). Die maximale IL-8-Freisetzung durch LPS in der Cokultur lag mit 6,96 ng/mL ca. einen Faktor 10 höher als die maximale Freisetzung nach CF-Exposition.

Die IL-8-Freisetzung nach CF-Exposition spiegelt in direkter Weise die Ergebnisse der Genexpression in Bezug auf das Gen *IL-8* wieder. Bei Exposition gegenüber mechanisch behandelten CF wurden signifikante Mengen von IL-8 lediglich durch die Cokultur freigesetzt. Dabei wurde nach einer Inkubationszeit von 4 h ein Maximum mit einer Freisetzung von 354 pg/mL erreicht. Die stärkere Antwort der Cokultur ist auf die Verstärkung der inflammatorischen Antwort durch die dTHP-1-Zellen zurückzuführen, welche auch auf Genexpressionsebene über einen längeren Zeitraum anhielt als in der Monokultur. Die Freisetzung des Zytokins verhielt sich hierbei zeitversetzt zur Induktion des Gens. Während das korrespondierende Gen ein Maximum nach 1 h aufwies, war ein Maximum der Freisetzung erst nach 4 h erreicht. Nach Exposition mit thermisch-mechanisch behandelten Fasern wurde ein anderes Verhalten beobachtet. Sowohl in der Mono- als auch in der

Cokultur wurden zu allen Zeitpunkten signifikante Konzentrationen an IL-8 freigesetzt, die insgesamt höher waren als nach Inkubation mit mechanisch behandelten CF. Hierbei zeigten sowohl die Mono- als auch die Cokultur einen vergleichbaren zeitlichen Verlauf mit einem stetigen Anstieg der IL-8 Freisetzung bis zu einem Maximum bei 773 pg/mL in der Monokultur und 562 pg/mL in der Cokultur nach 24 h. Es konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Modellen festgestellt werden. Dies suggeriert, dass die dTHP-1-Zellen keine verstärkende Rolle bei der IL-8-Freisetzung spielen, möglicherweise durch das bereits diskutierte Phänomen des Zellverlusts. Eine Freisetzung von IL-8 durch an Faserfragmente adhärierende Zellen wäre dennoch möglich. Lediglich ein zytotoxischer Effekt in den dTHP-1-Zellen würde erklären, aus welchem Grund keine zusätzliche IL-8-Freisetzung in der Cokultur stattfindet. Diese könnte durch eine erhöhte Internalisierung der CF-Stäube durch die dTHP-1-Zellen oder durch Unterschiede in Größe oder Form der Partikel und Fasern zu erklären sein. Womöglich war die korrespondierende LDH-Freisetzung durch die hohe Überzahl an Epithelzellen im Vergleich zu den Makrophagen-ähnlichen Zellen nicht detektierbar.

In einer Studie mit CNTs verschiedener Größen wiesen MWCNTs mit einer größeren Länge eine höhere Toxizität in A549-Zellen auf als kürzere MWCNTs. In derselben Studie wurde für längere MWCNTs auch ein erhöhtes inflammatorisches Potenzial *in-vivo* durch einen verstärkten Influx von Zellen in die Lunge festgestellt (Yamashita *et al.*, 2010). Die Freisetzung von IL-8 als eines der Hauptzytokine wurde bereits für diverse faserförmige Materialien in *in-vitro*-Lungenmodellen am ALI beschrieben, beispielsweise für Asbestfasern in einem Triplekulturmodell aus A549-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen (Endes *et al.*, 2014), für thermisch beanspruchte Mitsui-7-MWCNTs in A549-Zellen (Hufnagel *et al.*, 2021b) und für diverse MWCNTs in A549/dTHP-1-Cokulturmodellen (Di Ianni *et al.*, 2021). Im submersen Modell wurden deutlich mehr Studien mit einer signifikanten IL-8-Freisetzung in Lungenzellen publiziert, sowohl für Asbest (Duncan *et al.*, 2014; Rosenthal *et al.*, 1994; Simeonova & Luster, 1996), als auch für MWCNTs (Ursini *et al.*, 2016; Vales *et al.*, 2016; S. Ye *et al.*, 2009). In vielen dieser Studien wird die Induktion von IL-8 mit der Aktivierung von NF- κ B und anderen ROS-abhängigen Signalwegen sowie mit der Entwicklung fibrotischer oder maligner Effekte verbunden.

Im Vergleich zur IL-8-Freisetzung nach Exposition gegenüber Quarzpartikeln im ersten Teil der vorliegenden Arbeit war die Freisetzung nach Exposition gegenüber CF gering. Während durch die niedrigste Quarzkonzentration ($15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) IL-8-Konzentrationen im Nanogrammbereich freigesetzt wurden, kam es durch Exposition mit CF zu einer maximalen Freisetzung von 773 pg/mL. Dies kann teilweise mit der Verwendung höherer Quarzkonzentrationen und einer anderen Zelllinie begründet werden. Zusätzlich kann vermutet werden, dass für CF-Stäube andere Zytokine eine tragende Rolle spielen. Beispielsweise wurde in der Genexpressionsanalyse eine stärkere Induktion des Gens *IL-6* festgestellt. Die Induktion von MAPK-Signalwegen und seine Rolle als *early response*-Zytokin suggerieren zusätzlich eine Bedeutung von TNF- α , zumindest für die thermisch-mechanisch behandelten CF (Toews, 2001). Die Hypothese einer verstärkten Antwort anderer Zytokine als IL-8 kann für weitere Carbon-basierte Materialien, wie CB und MWCNTs, jedoch nicht bestätigt werden (Han

et al., 2010; Ursini *et al.*, 2014). Aus diesem Grund wäre eine Untersuchung der Sekretion anderer Zytokine auf Proteinebene für CF-Stäube in der Zukunft sinnvoll.

5.2.5 Induktion von DNA-Strangbrüchen nach Exposition gegenüber Carbonfasern

Im Zuge der Genexpressionsanalysen wurde vermutet, dass die Exposition gegenüber CF eine DNA-schädigende Wirkung auslöst. Um eine mögliche genotoxische Wirkung der CF-Stäube zu ermitteln und diese Hypothese zu überprüfen, wurde mithilfe der Alkalischen Entwindung die Induktion von DNA-Strangbrüchen untersucht. Der Anteil doppelsträngiger DNA in den Zellen ist in Abbildung 5.22 dargestellt. Eine Verringerung des doppelsträngigen Anteils korreliert direkt mit der Anzahl induzierter DNA-Schäden.

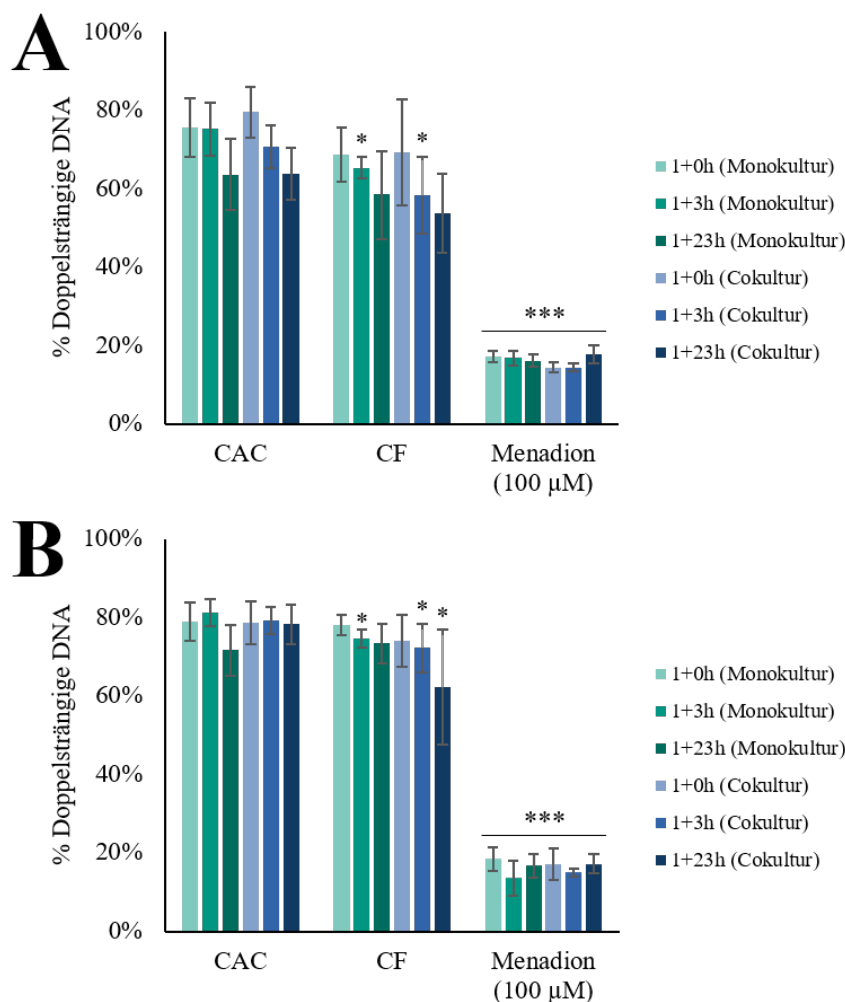


Abbildung 5.22: Anteil doppelsträngiger DNA nach ALI-Exposition von Lungenzellmodellen gegenüber mechanisch (A) und thermisch-mechanisch behandelten CF (B) und nach Exposition gegenüber Reinluft (CAC). Die Bestimmung des Gehaltes an ds-DNA erfolgte nach Exposition von BEAS-2B-Mono- und BEAS-2B/dTHP-1-Cokulturen für 1 h und 0, 3 oder 23 h Nachinkubation mithilfe der Alkalischen Entwindung. Als Positivkontrolle wurde 1 h mit 100 µM Menadion inkubiert. Die Mittelwerte dreier Experimente \pm SD sind dargestellt. Signifikanz zur CAC (Student's T-Test): */**/** (p < 0,05/0,01/0,005).

Bei der Induktion von DNA-Strangbrüchen zeigte sich ein Bild, das den bisher beobachteten Effekten widerspricht: es ist eine stärkere Induktion von Strangbrüchen nach Exposition gegenüber mechanisch behandelten CF zu sehen als nach Exposition gegenüber thermisch-mechanisch behandelten CF. Allerdings waren die beobachteten Effekte zumeist nicht signifikant und spiegelten sich auf ähnliche Weise in der CAC wider. Bei beiden Behandlungsarten konnten keine Unterschiede zwischen Mono- und Cokultur festgestellt werden. Die Induktion von Strangbrüchen nach Exposition gegenüber mechanisch und thermisch-mechanisch behandelten CF war lediglich nach 4 h signifikant, bei thermisch-mechanischer Behandlung in der Cokultur auch nach 24 h. Die CACs und CF-exponierten Proben unterschieden sich bezüglich ihres Gehaltes an doppelsträngiger DNA jedoch selten um mehr als 10 %. Demnach handelt es sich hier nur um einen schwach genotoxischen Effekt. Eine weitere Möglichkeit ist, dass es sich um einen anderen genotoxischen Mechanismus handelt, der nicht mithilfe der AU detektiert werden kann, beispielsweise eine Bildung von Mikrokernen. So wurde für MWCNTs ein solcher genotoxischer Mechanismus beobachtet, beispielsweise in A549-Zellen (Ventura *et al.*, 2020a) oder V79-Zellen (Kisin *et al.*, 2011). Andere Studien beschrieben daneben auch die Bildung von DNA-Strangbrüchen durch MWCNTs, insbesondere für CNTs größerer Länge (Yamashita *et al.*, 2010). Für Asbestfasern wurden ebenfalls diverse genotoxische Effekte beschrieben, etwa die Bildung von DNA-Schäden und chromosomalen Abberationen in exponierten Arbeitskräften (Dusinska *et al.*, 2004) und V79-Zellen (Kisin *et al.*, 2011) sowie die Induktion von Strangbrüchen und Mikrokernen in A549-Zellen (Puhakka *et al.*, 2002; Ventura *et al.*, 2020a). Der Einfluss einer thermischen Behandlung auf die genotoxische Wirkung von Mitsui-7 MWCNTs in BEAS-2B und SAEC-Zellen wurde ebenfalls untersucht: die thermische Behandlung löste hierbei eine geringere Genotoxizität aus, jedoch ebenfalls, wie auch die nativen CNTs, eine Fragmentierung und Translokation von Chromosomen (Siegrist *et al.*, 2019).

In Hinblick auf die Genotoxizität und Mutagenität von CNTs wird davon ausgegangen, dass die Mechanismen mit denen für Asbest zu großen Teilen übereinstimmen, zumindest im Fall der CNTs größerer Länge. Die genotoxischen Mechanismen sind durch ein hohes Maß an frustrierter Phagozytose und eine konsekutive Induktion reaktiver Sauerstoffspezies charakterisiert, welche direkt mit der Größe und Form der Fasern korrelieren (Toyokuni, 2013). Wie aus den REM-Bilder ersichtlich wurde (Abbildung 5.14), entsteht bei der Behandlung der hier untersuchten Fasern zudem ein großer Anteil an eher partikulären Bruchstücken. Diese können ebenfalls genotoxische Wirkungen haben. So wird für CB als partikuläre Substanz ebenfalls eine Genotoxizität postuliert, die jedoch nicht auf frustrierter Phagozytose, sondern rein auf der Entstehung sekundärer DNA-Schäden durch ROS und inflammatorische Mediatoren beruht (Schins & Knaapen, 2007). Grundsätzlich handelt es sich bei der Ermittlung der Genotoxizität von CB um ein umstrittenes Thema, da viele Studien widersprüchliche Ergebnisse liefern, auch im Hinblick auf die Bildung von Micronuclei und DNA-Schäden, wie es von Chaudhuri *et al.* (2018) bereits zusammengefasst wurde. Bei der Einschätzung der toxikologischen Mechanismen, insbesondere der Genotoxizität von CF-Stäuben, ist es aus diesem Grund maßgeblich, den Anteil faserförmiger und partikulärer Bestandteile zu beurteilen und darauf basierend mögliche Vergleiche mit anderen Materialien ableiten zu können.

Es lässt sich schlussfolgern, dass die Genotoxizität von faserförmigen Materialien je nach Form, Größe und Zusammensetzung mechanistisch variieren kann. Demnach muss die hier detektierte schwache Genotoxizität nicht zwingend ein Indiz für eine ausbleibende genotoxische Wirkung der CF-Stäube sein. Die Beobachtungen einer Induktion der DNA-Schadensmarker *DDIT3* und *GADD45A* auf Transkriptionsebene und die daraus resultierende Vermutung einer Genotoxizität kann nur bedingt bestätigt werden. Da gerade für die Kohlenstoff-basierten MWCNTs ein großer Teil der genotoxischen Wirkung in der Bildung chromosomaler Abberationen und Mikronuclei zu liegen scheint, wäre für die CF-Stäube ein ähnlicher Mechanismus plausibel. Aus diesem Grund wäre eine umfassende Untersuchung der Genotoxizität auch durch Verwendung anderer Methoden, insbesondere auf chromosomaler Ebene, sinnvoll.

5.2.6 Exposition einer Triplekultur gegenüber mechanisch vorbehandelten Carbonfasern

Um ein noch realistischeres *in-vitro*-Modell der Lunge zu generieren, wurde die zuvor verwendete BEAS-2B/dTHP-1-Cokultur um die Fibroblastenzellen CCD-33Lu erweitert. Diese wurden an der Unterseite der *Transwell*-Membran kultiviert und waren dadurch von den anderen beiden Zelltypen räumlich getrennt. Aus diesem Grund findet für die Experimente, die auf der direkten Untersuchung von Zellen beruhen (Zellzahlbestimmung, Genexpressionsanalyse und Alkalische Entwindung) eine Unterscheidung des apikalen und basolateralen Kompartiments statt. Für Experimente, die auf Untersuchungen des umgebenden Mediums beruhen (LDH-Assay und IL-8-Freisetzung), wird keine solche Unterscheidung durchgeführt, da bei ALI-Exposition lediglich basolateral Medium vorliegt. Darüber hinaus bestand kein direkter Kontakt zwischen Fibroblasten und CF-Stäuben, da diese nur auf die apikale Seite des *Transwells* appliziert wurden.

Aufgrund der Komplexität des Modells musste die Anzahl der Versuche mit der Triplekultur eingeschränkt werden und es wurden lediglich Expositionen mit mechanisch behandelten CF-Stäuben und einem angeschlossenen Nachinkubationszeitraum von 23 h umgesetzt.

5.2.6.1 Betrachtung der Zytotoxizität

Zunächst wurde die Zytotoxizität nach der Exposition mit CF-Stäuben durch Messung der Zellzahl und der LDH-Freisetzung ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.23 dargestellt.

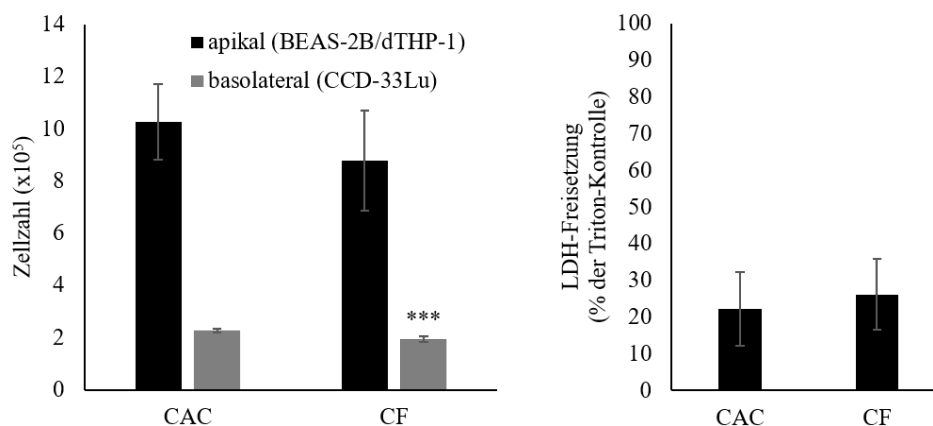


Abbildung 5.23: LDH-Freisetzung (links) und Zellzahlen (rechts) nach ALI-Exposition von Triplekulturmodellen gegenüber mechanisch behandelten Carbonfasern (CF) und der zugehörigen *Clean Air Controls* (CAC). Triplekulturen mit BEAS-2B/dTHP-1-Zellen auf apikaler Seite und CCD-33Lu-Zellen auf basolateraler Seite wurden für 1 h gegenüber CF-Stäuben exponiert und für 23 h nachinkubiert. Die Mittelwerte dreier Experimente \pm SD sind dargestellt. Signifikanz (Student's T-Test): */**/** (p < 0,05/0,01/0,005).

Bei der Zellzahlbestimmung wurde im apikalen Kompartiment kein signifikanter Unterschied zwischen CAC und CF-exponierten Proben festgestellt. Eine signifikante Abnahme der Zellzahl wurde bei den Fibroblasten detektiert, allerdings war der Unterschied mit einer

Zellzahl von $2,27 \times 10^5$ bei der CAC und $1,95 \times 10^5$ bei den CF-exponierten Proben minimal. Die LDH-Freisetzung zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede, war jedoch mit Werten zwischen 20 und 30 % insgesamt höher als in der Mono- und Cokultur.

Da nur eine begrenzte Anzahl von Studien mit vergleichbaren Modellen verfügbar ist, wird im Literaturvergleich auch auf Modelle zurückgegriffen, die anstelle von Fibroblasten Endothelzellen und dendritische Zellen verwenden. In einem 3D-Mikrogewebe, bestehend aus in einem Hydrogel eingebetteten dTHP-1- und BEAS-2B-Zellen sowie IMR-90-Fibroblasten, wurde nach Exposition gegenüber CB, MWCNTs und Asbest erst nach 7-tägiger Nachinkubation eine Zytotoxizität festgestellt, die für MWCNTs deutlicher ausgeprägt war (Viabilität von 50 %) als für Asbest und CB (Viabilität von 75 %). Die Zellen lagen in diesem Gewebe nicht geordnet vor, wodurch alle Zelltypen gegenüber den Testsubstanzen exponiert wurden. Zudem wurden die dTHP-1-Zellen in einem starken Überschuss von 4:1:1 eingesetzt, was die Vergleichbarkeit erschwert (Kabadi *et al.*, 2019). In der vorliegenden Arbeit wurde nur eine Konzentration der Fasern eingesetzt, die eventuell zu gering für das Einsetzen einer Zytotoxizität war, sowie einzeln nicht für die Feststellung einer Konzentrationsabhängigkeit geeignet. In einem Triplekulturmodell, das aus der Bronchialepithelzelllinie 16HBE14o- und Makrophagen im apikalen Kompartiment und dendritischen Zellen im basolateralen Kompartiment bestand, wurde ebenfalls keine Zytotoxizität bei Behandlung mit SWCNTs und MWCNTs beobachtet, genauso wie in den Monokulturen der einzelnen Zellen (Clift *et al.*, 2014). Das gleiche Modell wies darüber hinaus in Experimenten mit Asbestfasern eine konzentrationsabhängige Zytotoxizität auf (Clift *et al.*, 2011). Demnach stimmen die hier generierten Ergebnisse eher mit den Daten aus Studien mit CNTs überein, auch wenn die Modelle nicht optimal miteinander vergleichbar sind.

5.2.6.2 Genexpressionsprofile

Um die Wirkung der mechanisch behandelten Fasern auf die transkriptionelle Ebene der Triplekultur zu untersuchen, wurden nach CF-Exposition Genexpressionsprofile erstellt. Im Folgenden ist eine Auswahl relevanter Gene als Heatmap dargestellt (Abbildung 5.24). Eine umfassende Genexpressionsanalyse findet sich im Anhang (s. Anhang B Ergänzende Daten: Abbildung B.7). Bei Betrachtung der Zellen im basolateralen Kompartiment wurde festgestellt, dass von den vier erfolgreichen Experimenten jeweils zwei vergleichbare Antworten aufwiesen, während sich die anderen beiden gegensätzlich verhielten. Aus diesem Grund findet in der Heatmap eine Trennung zwischen den beiden detektierten Antworten statt. Die Versuche A und C sowie B und D sind dabei zu jeweils einer Gruppe zusammengefasst.

Die Genexpressionsprofile unterschieden sich bei der Triplekultur deutlich von denen der Mono- und Cokulturen. Der auffälligste Effekt war die durchgehende Repression der Inflammationsgene im apikalen Kompartiment. Hierbei waren die Gene *CCL22* 2-fach, *COX2* 2,5-fach und *TNF-A* 3-fach reprimiert. Das Gen *OPN*, das für das Protein Osteopontin kodiert, ebenfalls an diversen inflammatorischen Prozesse beteiligt und charakteristisch für die Ausbildung von Lungenfibrosen ist, wurde ebenfalls ca. 3-fach herunterreguliert

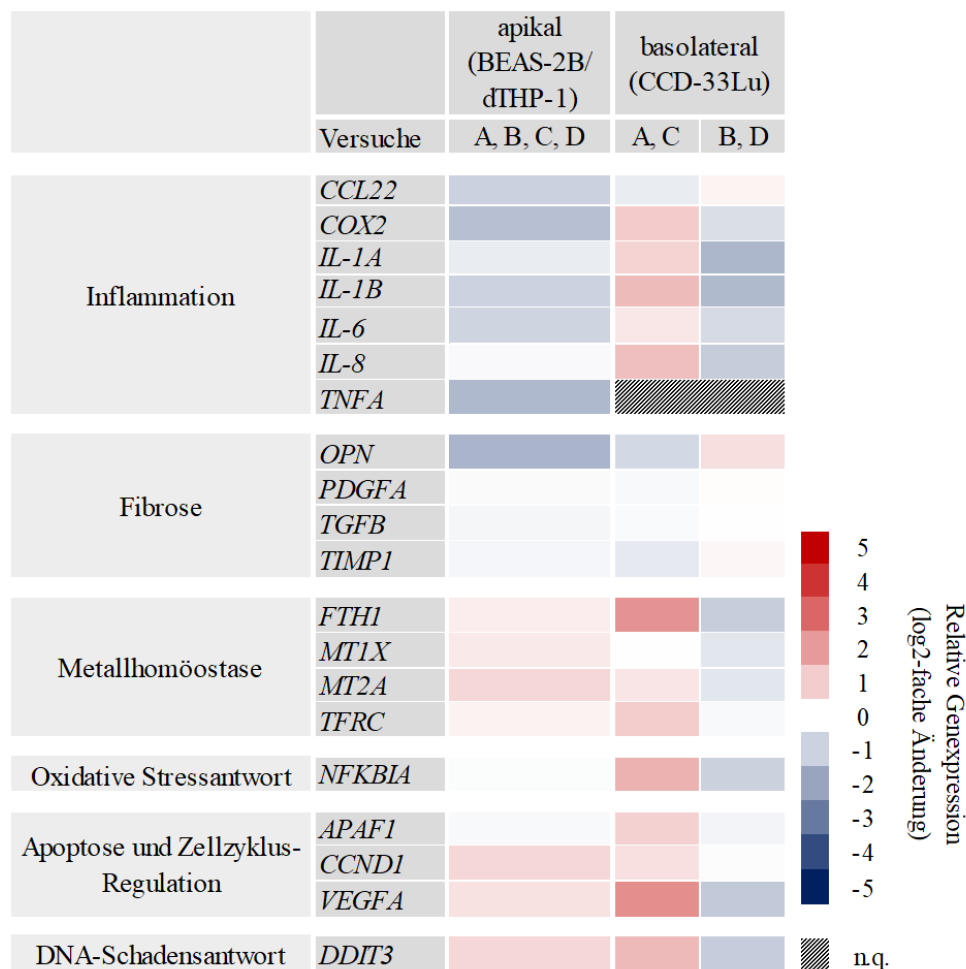


Abbildung 5.24: Schematische Darstellung der Genexpressionsprofile von BEAS-2B/dTHP-1/CCD-33Lu-Triplekulturen nach ALI-Exposition gegenüber mechanisch behandelten CF als Heatmap. Die Zellen wurden 1 h mit CF exponiert und 23 h nachinkubiert. Das apikale und basolaterale Kompartiment sind getrennt dargestellt, zusätzlich werden die Versuche A/C und B/D im basolateralen Kompartiment getrennt dargestellt, da sich die beobachteten Antworten gegensätzlich verhielten. Eine rote Färbung signalisiert eine Induktion, eine blaue Färbung eine Repression. n.q.: nicht quantifizierbar.

(Miyazaki *et al.*, 1995; Pardo *et al.*, 2005). Daneben wurden im apikalen Kompartiment keine Gene in biologisch relevantem Maße beeinflusst.

Im basolateralen Kompartiment wurde ein anderes Muster festgestellt. Hierbei zeigten jeweils die Experimente A und C sowie B und D vergleichbare Effekte, verhielten sich jedoch zueinander spiegelbildlich. Die meisten der dargestellten Gene, mit Ausnahme von *OPN* und *CCL22*, wurden in den Versuchen A und C induziert, in den Versuchen B und D jedoch reprimiert. Dieser Effekt trat besonders deutlich bei den Genen *IL-1B* (bei A/C 2,5-fach induziert, bei B/D 3-fach reprimiert), *FTH1* (bei A/C 4,5-fach induziert, bei B/D 2-fach reprimiert), *NFKBIA* (bei A/C 3-fach induziert, bei B/D 2-fach reprimiert) und *VEGFA* (bei A/C 4,5-fach induziert, bei B/D 2-fach reprimiert) auf.

Eine Interpretation dieser Ergebnisse ist dadurch erschwert, dass in der Triplekultur lediglich ein Nachinkubationszeitpunkt von 24 h gewählt wurde. Wie aus den Mono- und Cokulturen ersichtlich wurde, fand eine starke inflammatorische Antwort bereits unmittel-

bar bzw. wenige Stunden nach Exposition gegenüber behandelten CF statt und klang nach 24 h bereits ab. Es liegt demnach die Vermutung nahe, dass auch in der Triplekultur zu früheren Zeitpunkten eine proinflammatorische Antwort auf Transkriptionsebene erkennbar wäre. Da das Ausmaß dieser frühen Antwort nicht bekannt ist, kann nicht eingeschätzt werden, ob es sich bei den großen Unterschieden zwischen den Einzelversuchen nach 24 h um vergleichsweise geringe Schwankungen der transkriptionellen Antwort handelt. Eine weitere Erklärung kann der Übergang der Zellen in die späte akute Phase der Inflammation sein, die sich durch eine Typ 2-Immunantwort und eine Freisetzung antiinflammatorischer Zytokine wie IL-4 und IL-13 auszeichnet. Dies würde eine Repression proinflammatorischer Gene in Zellen beider Kompartimente erklären und einen ersten Schritt in Richtung einer chronischen Inflammation und Fibroseantwort darstellen. Diese Hypothese kann durch die fehlende Antwort bei den profibrotischen Genen *TGF-B*, *PDGF-A*, *TIMP1* und *OPN* jedoch entkräftet werden, da diese ebenfalls den Beginn einer Typ 2-Immunantwort signalisiert (Dong & Ma, 2019).

Der Einsatz von Fibroblasten als Teil von komplexen Zellkulturmodellen wurde bereits mehrfach beschrieben und hatte in vielen Fällen eine Verstärkung bereits beobachteter Effekte zur Folge. So wurde in einem *conditioned media*-Ansatz mit Makrophagen und Fibroblasten bereits 24 h nach Behandlung der Fibroblasten mit dem vorkonditionierten Medium aus der Inkubation von Makrophagen mit MWCNTs eine Entwicklung zu Myofibroblasten unter Freisetzung fibrotischer Mediatoren festgestellt. Dies ging mit einer Induktion von IL-1 β durch Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms einher (Hindman & Ma, 2018). In einer Monokultur mit MRC-5-Fibroblastenzellen wurden TGF- β und OPN bereits 24 h nach Start der Inkubation mit Mitsui-7 MWCNTs freigesetzt (Chortarea *et al.*, 2019). Auch komplexere Modelle wie das bereits erwähnte 3D-Mikrogewebe aus THP-1-, BEAS-2B-Zellen und IMR-90-Fibroblasten demonstrierten sowohl nach Behandlung mit CNTs als auch mit Asbest eine Induktion fibrotischer Mediatoren wie Matrixmetalloproteinasen, deren Inhibitoren, PDGF-A und die Produktion von Collagen. Eine Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α wurde ebenfalls beobachtet. Allerdings erfolgten diese für fibrotische Effekte charakteristischen Entwicklungen erst 4 bzw. 7 Tage nach Inkubation mit den Testsubstanzen. Darüber hinaus wurde nach Exposition des gleichen Modells mit CB-Partikeln lediglich eine leichte proinflammatorische Antwort generiert, während die verstärkte Expression fibrotischer Mediatoren ausblieb (Kabadi *et al.*, 2019). Barsova *et al.* beschrieben eine Triplekultur aus A549-Zellen, dTHP-1-Zellen und der Fibroblastenzelllinie MRC-5, die über mehrere Tage gegenüber steigenden Dosen Mitsui-7 MWCNTs exponiert wurde. In dieser Studie wurde keine signifikante Freisetzung proinflammatorischer und profibrotischer Mediatoren festgestellt, möglicherweise aufgrund der geringen Dosierung von maximal 2,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Barsova *et al.*, 2020b). Von der gleichen Arbeitsgruppe wurde das EpiAlveolar-Modell vorgestellt, das aus primären Lungenepithel-, Endothel- und Fibroblastenzellen besteht, mit einer optionalen Ergänzung um Makrophagen. Nach wiederholter Exposition mit Mitsui-7 über einen Zeitraum von 21 Tagen konnten signifikante Änderungen in der Freisetzung inflammatorischer Mediatoren (TNF- α , IL-1 β) und fibrotischer Mediatoren (TGF- β und Collagen-1) beobachtet werden. Erneut traten diese jedoch erst nach mehreren Tagen auf (Barsova *et al.*, 2020a).

5.2.6.3 Zytokinfreisetzung

Zur Ermittlung der sekretorischen Inflammationsantwort in der Triplekultur nach Exposition gegenüber mechanisch behandelten CF wurde die Freisetzung von IL-8 gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.25 dargestellt.

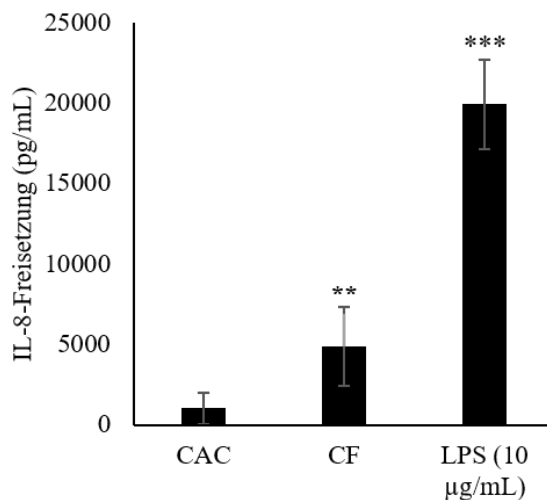


Abbildung 5.25: Freisetzung von Interleukin-8 nach ALI-Exposition von Triplekulturmodellen gegenüber mechanisch behandelten Carbonfasern (CF) und der zugehörigen Clean Air Controls (CAC). BEAS-2B/dTHP-1/CCD-33Lu-Triplekulturen wurden für 1 h gegenüber CF-Stäuben exponiert und für 23 h nachinkubiert. Als Positivkontrolle wurde mit 10 µg/mL LPS inkubiert. Die Mittelwerte dreier Experimente \pm SD sind dargestellt. Signifikanz (Student's T-Test): */**/** (p < 0,05/0,01/0,005).

Nach Exposition gegenüber CF-Stäuben wurde im Vergleich zur CAC mit 4,92 ng/mL eine signifikante Menge IL-8 freigesetzt. Diese war im Vergleich zur Freisetzung in der Cokultur (vgl. Abbildung 5.21), bei der lediglich 354 pg/mL IL-8 sekretiert wurde, ca. um das 14-fache erhöht. Auch in Bezug auf die Positivkontrolle LPS wurden ähnliche Effekte erzielt: in der Cokultur wurden 6,96 ng/mL freigesetzt, während in der Triplekultur eine stärkere inflammatorische Wirkung mit einer Konzentration von 19,9 ng/mL induziert wurde. Demnach zeigte sich in der Triplekultur im Vergleich zu den zuvor betrachteten Zellkultur-Systemen ein höheres inflammatorisches Potenzial. Dies steht im Widerspruch zu den generierten Genexpressionsprofilen, die im apikalen Kompartiment eine Repression nahezu aller Gene der Inflammation und auch im basolateralen Kompartiment keine starken induzierenden Effekte zeigte. Hier spielt vermutlich erneut der Zeitfaktor eine entscheidende Rolle. Bei der Mono- und Cokultur wurde deutlich, dass die meisten Effekte in der Genexpression, vor allem im Bereich der Inflammation, bereits nach 1 oder 4 h auftraten und nach der längeren Inkubationszeit von 24 h bereits abgeklungen waren (vgl. Abbildung 5.16). Die konsequente Freisetzung von IL-8 folgte daraufhin zeitversetzt (vgl. Abbildung 5.21). Eine zusätzliche Betrachtung früherer Zeitpunkte in der Genexpression wäre aus diesem Grund auch bei der Triplekultur von Bedeutung.

In der Literatur wurde in Bezug auf andere faserförmige Materialien ebenfalls von einer Induktion der IL-8-Freisetzung in einigen Triplekulturen berichtet. So zeigte die bereits dargestellte Triplekultur aus Bronchialepithel-, Makrophagen- und dendritischen Zellen

sowohl für Asbest als auch für MWCNTs eine signifikante Sekretion von IL-8 ab einer Konzentration von 5 µg/mL, was vermutlich einer Flächenkonzentration von 5,56 µg/cm² entspricht (Clift *et al.*, 2011). In einer ähnlichen Triplekultur aus A549-, Makrophagen- und dendritischen Zellen wurde eine verstärkte Freisetzung von IL-8 auch durch Asbestfasern ausgelöst (Endes *et al.*, 2014). Gleichzeitig wurde als Reaktion auf SWCNTs in einer identisch aufgebauten Triplekultur keine signifikante IL-8-Freisetzung beobachtet, ebenso wie in den entsprechenden Monokulturen (Müller *et al.*, 2010). In einer Triplekultur aus A549-, dTHP-1-Zellen und WI-38-Fibroblasten, welche der in dieser Arbeit verwendeten Triplekultur am nächsten kommt, wurde die IL-8-Freisetzung nach Exposition mit zwei verschiedenen MWCNTs untersucht. Es kam sowohl nach 6 h als auch 24 h zu einer signifikanten Freisetzung von IL-8, insbesondere bei Exposition gegenüber längeren, dickeren MWCNTs im Vergleich zu kurzen und dünnen MWCNTs (Di Ianni *et al.*, 2021). Demnach ist die inflammatorische Antwort abhängig von der Struktur und Größe der verwendeten Fasern.

Die starke inflammatorische Wirkung in Form einer enormen IL-8-Freisetzung durch Inkubation mit LPS wurde ebenfalls bereits demonstriert, beispielsweise in einem submersen Triplekultur-Modell aus A549-, dTHP-1- und Endothelzellen (Skuland *et al.*, 2020).

Zum Vergleich verschiedener Kulturen wurden Lungenzellen in verschiedenen Konstellationen sowohl am ALI als auch submers gegenüber einem Induktor von oxidativem Stress exponiert und die Freisetzung von IL-8 ermittelt. In Tetrakulturen aus A549- und dTHP-1-Zellen sowie Mast- und Endothelzellen wurde am meisten IL-8 freigesetzt, gefolgt von A549/dTHP-1-Cokulturen und zuletzt A549-Monokulturen. ALI-Modelle setzten in allen Fällen weniger IL-8 frei als die korrespondierenden submersen Modelle (Klein *et al.*, 2013). Folglich reagieren Modelle, in denen eine größere Fülle an verschiedenen Zelltypen verwendet wird, auch auf andere exogene Reize empfindlicher als die entsprechenden Mono- und Cokulturmodelle.

5.2.6.4 Bildung von DNA-Strangbrüchen

Abschließend wurde überprüft, ob die Behandlung mit mechanisch behandelten CF in Triplekulturen zur Entstehung von DNA-Schäden beiträgt. Der Anteil doppelsträngiger DNA ist in Abbildung 5.26 dargestellt.

Im apikalen Kompartiment wurde eine signifikante, jedoch moderate Reduktion der doppelsträngigen DNA auf 44 % beobachtet, was die Induktion von DNA-Strangbrüchen impliziert. Da keine solchen Effekte für die Mono- oder Cokultur beobachtet wurden, kann bei der Triplekultur eine sekundäre Genotoxizität vermutet werden, die durch die Ergänzung des Modells um Fibroblasten zustande kommt. Ebenso war eine leichte Reduktion der doppelsträngigen DNA im basolateralen Kompartiment zu vermerken, die nicht signifikant war. Insgesamt ist eine Interpretation für die Fibroblasten erschwert, da auch die Positivkontrolle Menadion lediglich ein geringes Maß an DNA-Strangbrüchen induziert und zu einem vergleichsweise hohen Anteil doppelsträngiger DNA (39 %) geführt hat. Dies spricht dafür, dass entweder die Positivkontrolle für die Fibroblasten ungeeignet ist oder die Methode der

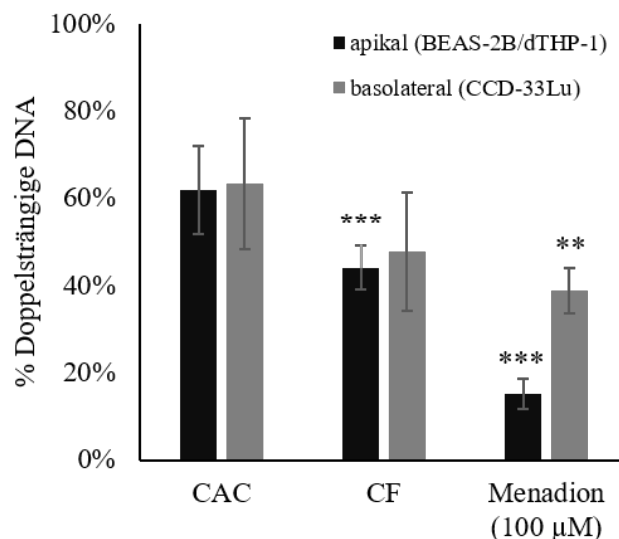


Abbildung 5.26: Anteil doppelsträngiger DNA nach ALL-Exposition von Triplekulturmodellen gegenüber mechanisch behandelten CF und nach Exposition gegenüber Reinluft (CAC). Die Bestimmung des Gehaltes an ds-DNA erfolgte nach Exposition von BEAS-2B/dTHP-1-Zellen (apikal) und CCD-33Lu (basolateral) für 1 h und 23 h Nachinkubation mithilfe der Alkalischen Entwindung. Die Mittelwerte dreier Experimente \pm SD sind dargestellt. Signifikanz zur CAC (Student's T-Test): */**/** (p < 0,05/0,01/0,005).

Alkalischen Entwindung bei diesen Zelltyp die Induktion von DNA-Strangbrüchen nicht verlässlich abbildet.

Basierend auf der Bildung von ROS und der Freisetzung inflammatorischer Mediatoren wurde eine sekundäre Genotoxizität bereits für diverse Partikel und Fasern diskutiert (Magdolenova *et al.*, 2014; Schins, 2002b). In der vorliegenden Arbeit müssen die Fibroblasten in diesen Prozess involviert sein. Demnach induzieren die mechanisch behandelten CF die Bildung von ROS und die Freisetzung von Zytokinen in Epithelzellen und Makrophagen, die durch die Membran eine Kommunikation mit den Fibroblasten bewirken. Diese reagieren daraufhin ebenfalls mit der Ausschüttung von Mediatoren, welche, erneut in Epithel- und Makrophagenzellen angelangt, eine zweite Welle der Genotoxizität induzieren. Durch die fehlenden Untersuchungen bei früheren Zeitpunkten ist es nicht möglich, diesen Vorgang auf Genexpressions- oder Proteinebene vollständig nachzuvollziehen. Darüber hinaus kann eine Kombinationswirkung der direkten Wirkung der CF-Stäube und der indirekten Induktion von DNA-Schäden über den Umweg der Fibroblasten nicht ausgeschlossen werden. Allerdings kann vermutet werden, dass die vermutete sekundäre Genotoxizität erst zu dem beobachteten späteren Zeitpunkt auftritt, da die Antwort über den Weg der Zytokinsekretion aus dem apikalen ins basolaterale und wieder ins apikale Kompartiment doppelt die *Transwell*- und Zellbarriere überwinden muss.

In der zuvor vorgestellten Triplekultur aus A549- und dTHP-1-Zellen sowie WI-38-Fibroblasten wurde keine signifikante Induktion von DNA-Schäden durch zwei Arten von MWCNTs festgestellt (Di Ianni *et al.*, 2021). Eine weitere Verwendung von Triplekultur-Modellen zur Untersuchung der Genotoxizität von MWCNTs oder Asbestfasern ist nicht bekannt. Das genotoxische Potenzial faserförmiger inhalierbarer Materialien wurde jedoch bereits in vielen *in-vitro*-Studien in einzelnen Zelllinien nachgewiesen, sowohl in Epithel-

zellen, als auch in Makrophagen und Fibroblasten (van Berlo *et al.*, 2012). Demnach ist ein genotoxischer Effekt auch in der Triplekultur naheliegend, die empfindlicher auf CF-Stäube reagiert als die entsprechenden Mono- und Cokulturen.

Für die toxikologischen Untersuchungen des Triplekultur-Modells nach Exposition gegenüber mechanisch behandelten CF kann zusammengefasst werden, dass sich die beobachteten Antworten von denen in der Mono- und Cokultur deutlich unterscheiden. Obwohl, vergleichbar zu Mono- und Cokulturen, keine deutliche Zytotoxizität festgestellt werden konnte, wiesen die Genexpressionsanalysen relevante Unterschiede auf. Es konnte beispielsweise eine Repression inflammatorischer Gene im apikalen Kompartiment festgestellt werden, während im basolateralen Kompartiment in unterschiedlichen Experimenten teilweise gegensätzliche Effekte beobachtet wurden. Es kam darüber hinaus zu einer hohen IL-8-Freisetzung, die die IL-8-Sekretion von Mono- und Cokulturen um ein Mehrfaches überschritt. Abschließend konnte auch der Effekt einer sekundären Genotoxizität durch die Bildung von DNA-Strangbrüchen im apikalen Kompartiment festgestellt werden.

5.2.6.5 Eignung des Modells zur Verwendung im Rahmen von ALI-Expositionen

Die widersprüchlichen Ergebnisse der Genexpressionsanalysen und Unterschiede zu bereits in der Literatur beschriebenen Effekten sprechen für eine Instabilität des Triplekultursystems. Dem liegen vermutlich die Fibroblasten zugrunde, bei denen es sich um Primärzellen handelt und die ein sehr unregelmäßiges Wachstumsverhalten aufwiesen. Es kam im experimentellen Verlauf der Arbeit zu Schwierigkeiten bei der Kultivierung und Passage der Zellen sowie bei dem Aufbau der Triplekultur, die neben den dargestellten Resultaten häufig nicht zu verwertbaren Ergebnissen führte (Daten nicht dargestellt). Darüber hinaus war die Nachinkubationszeit der Triplekultur nicht optimal gewählt. Vermutlich waren zum 24 h-Zeitpunkt die initialen Antworten, die auch in Mono- und Cokultur ermittelt wurden, bereits verklungen, während fibrotische Entwicklung erst deutlich später eingesetzt hätten. Zusätzlich zeigte sich bei der Alkalischen Entwindung, dass die Positivkontrolle Menadion entweder bei den Fibroblasten nicht wirksam war, oder Strangbrüche für diese Zelllinie mit der Methode nicht exakt erfasst werden können.

Um die Leistung der Triplekultur zu verbessern, wäre aus diesem Grund eine Anpassung der Zellen und Kultivierungsbedingungen notwendig. Anstelle der schwer zu handhabenden CCD-33Lu-Zellen könnte auf immortalisierte Fibroblasten-Zelllinien zurückgegriffen werden, beispielsweise die zuvor beschriebenen MRC-5-, WI-38- und IMR-90-Zellen. All diese Zellen weisen eine lange Kultivierungsdauer und Stabilität auf (Friedman & Koropchak, 1978). Eine weitere Alternative wäre die Verwendung einer kontaktlosen Kultur, indem die Fibroblasten zwar ebenfalls im basolateralen Kompartiment, jedoch nicht an der Unterseite der Membran, sondern auf dem Boden des Wells kultiviert werden. In einer Anwendung mit Endothelzellen wurde bereits gezeigt, dass dies gerade inflammatorische Effekte nicht verringert. Im Gegenteil wurden bei kontaktlosen Cokulturen zum Teil stärkere Effekte beobachtet als im korrespondierenden Kontakt-Szenario (Herseth *et al.*, 2009).

Für eine Betrachtung längerer Zeiträume müsste vermutlich auf andere Zellen für das gesamte Modell zurückgegriffen werden. BEAS-2B-Zellen bilden über lange Zeiträume keinen stabilen *Monolayer* und auch keine funktionellen *tight junctions* aus, was durch das Fehlen eines mangelnden transepithelialen elektrischen Widerstands deutlich wird. Aus diesem Grund ist deren Verwendung für eine ALI-Kultur über mehrere Tage oder Wochen nicht empfehlenswert. Stattdessen bieten sich aus der bekannten Auswahl von Lungenepithelzellen möglicherweise Calu-3-Zellen an, die über 21 Tage ein stabiles ALI bilden können (Braakhuis *et al.*, 2020). Weitere Möglichkeiten bieten komplexere Modelle aus Primärzellen, wie das zuvor beschriebene EpiAlveolar-Modell, das auch kommerziell erhältlich ist (Barosova *et al.*, 2020a).

KAPITEL 6

ZUSAMMENFASSENDER DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Toxizität zweier Substanzen untersucht, des inhalationstoxisch relevanten α -Quarzes Min-U-Sil5 und einer toxikologisch uncharakterisierten Carbonfaser nach mechanischer und thermisch-mechanischer Behandlung. Hierzu wurden zunächst mehrere *in-vitro*-Modelle der Lunge hinsichtlich ihrer Eignung zur Erfassung der Inhalationstoxizität und der Unterschiede induzierter Antworten verglichen. Zu diesem Zweck wurden A549-Zellen in einem klassischen submersen Modell sowie an einem ALI kultiviert und gegenüber Quarzpartikeln in drei unterschiedlichen Dosierungen exponiert. Ebenso wurde mit einer Cokultur aus A549- und dTHP-1-Zellen verfahren. Die ALI-Exposition fand in der Vitrocell® *Cloud* statt. Nachfolgend wurden die Zellkulturmodelle Untersuchungen im Bereich der Zytotoxizität, Genexpressionsanalyse, Genotoxizität und Inflammation unterzogen. Dabei wurde sowohl eine Konzentrationsabhängigkeit durch die Exposition gegenüber unterschiedlichen Konzentrationen an Quarzpartikeln als auch eine Zeitabhängigkeit durch variable Nachinkubation der Cokultur an einem ALI für 1, 3, 6 und 24 h berücksichtigt. Ziel war es hierbei, das Ausmaß der toxikologischen Antworten in den verschiedenen Kulturen zu vergleichen und mögliche Mechanismen, insbesondere im Bereich der Inflammation, bei dem Zusammenspiel der beiden Zelltypen der Cokultur abzuleiten.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden vergleichbare Kulturen, basierend auf BEAS-2B, dTHP-1 und CCD-33Lu-Zellen, in der Vitrocell® *Automated exposure station* gegenüber vorbehandelten Carbonfaser-Stäuben exponiert. Die Zeitabhängigkeit toxikologischer Antworten wurde bereits in diversen Studien beschrieben wurde, auch mit Partikeln und Fasern (Lindberg *et al.*, 2009; Skuland *et al.*, 2020). Da ein Effekt der Zeitabhängigkeit in Experimenten mit Quarzpartikeln im Rahmen dieser Arbeit augenscheinlich war, wurden für die Carbonfaser-Studien eine Dosis Carbonfasern und variable Nachinkubationszeiten von 0, 3, 23 h gewählt. Es wurden die gleichen Endpunkte untersucht wie nach Quarzexposition: Zytotoxizität, Genexpressionsanalysen, Genotoxizität sowie Inflammation. Hier war es das Ziel, die Antworten der Zellen auf die unterschiedlich vorbehandelten Fasern herauszuarbeiten und die toxikologische Relevanz von Carbonfasern einzuschätzen.

6.1 Vergleich verschiedener Zellkulturmodelle und Expositionsarten am Beispiel α -Quarz

Nach Exposition der beschriebenen Zellkulturmodelle gegenüber dem α -Quarz Min-U-Sil5 wurde zunächst die Zytotoxizität unter Anwendung des LDH-Assay untersucht. Am ALI exponierte A549-Monokulturen und A549/dTHP-1-Cokulturen zeigten keine zytotoxische Antwort, während die äquivalent behandelten submersen Kulturen eine signifikante Zytotoxizität bei der höchsten Konzentration von $60 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ aufwiesen. Als empfindlichstes Modell erwiesen sich die dTHP-1-Monokulturen, die bereits ab einer Konzentration von $6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ eine signifikante Menge LDH freisetzten. Die erst bei hohen Konzentrationen einsetzende Zytotoxizität von Quarzen in A549-Zellen wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben (Clouter *et al.*, 2001; Vuong *et al.*, 2017; R. Wu *et al.*, 2020). Gleichzeitig ist auch die hohe Zytotoxizität von Quarzpartikeln in Makrophagen oder Makrophagen-ähnlichen Zellen bekannt und wird auf eine verstärkte Aufnahme der Partikel durch Phagozytose zurückgeführt (Albrecht *et al.*, 2007; Grytting *et al.*, 2021). Zusätzlich ist als weiterführender Mechanismus der toxikologischen Antwort von Quarz auf Makrophagen der Bruch der anschließend gebildeten Lysosomen durch die reaktive Quarzoberfläche bekannt, die in einer vermehrten Bildung von ROS resultiert (Leinardi *et al.*, 2020). Eine Aufnahme von Quarzpartikeln in Epithelzellen durch Endozytose ist zwar ebenfalls beschrieben, spielt jedoch durch die geringeren aufgenommenen Mengen vermutlich eine untergeordnete Rolle bei der Quarztoxizität (Höhr *et al.*, 2002). Allerdings müssen Unterschiede im Maß der Endozytose zwischen ALI- und submers exponierten Zellen beachtet werden (Medina-Reyes *et al.*, 2020).

Eine umfassende Betrachtung der transkriptionellen Antwort war durch eine Aufstellung von Genexpressionsprofilen mithilfe der HT RT-qPCR-Methode möglich. Die meisten beobachteten Veränderungen fanden hier in den Clustern "Inflammation" und "Oxidative Stressantwort" statt. In der A549-Monokultur konnten biologisch relevante und signifikante Veränderungen nur bei submerser Exposition gegenüber Quarz festgestellt werden, insbesondere bei den Genen *IL-6*, *IL-8* und *SOD2*. Eine Freisetzung der korrespondierenden Proteine nach Quarzexposition wurde für A549-Zellen bereits demonstriert (Hetland *et al.*, 2001; Williams & Zosky, 2019). Die dTHP-1-Monokultur zeigte bei dreifach niedrigeren Dosen eine außerordentliche Aktivierung von *IL-8* um das 24-fache. Zusätzlich kam es zu einer moderaten Induktion weiterer Gene der Inflammation, etwa *COX2*, *IL-1A/B* und *IL-6*, und oxidativen Stressantwort mit *NFKB1*, *NFKB2*, *NFKBIA* und *SOD2*. Die starke Induktion einer Inflammation sowie diverser NF- κ B-assoziiierter Gene suggeriert hierbei eine starke Beteiligung dieses Signalwegs in Quarz-exponierten Makrophagen (Castranova, 2004). Die A549/dTHP-1-Cokultur wies die höchste Effektstärke auf und zeigte insbesondere im Cluster "Inflammation" eine Amplifikation der Effekte, die die Summe der in den Monokulturen beobachteten Antworten überstieg. Bei den meisten Genen setzte sich die Beobachtung einer stärkeren Antwort nach submerser Exposition fort, z.B. für *IL-8* (submers 16-fach, ALI 7-fach), *IL-1B* (submers 6,5-fach, ALI 2-fach) und *SOD2* (submers 10-fach, ALI 5-fach). Lediglich die Gene *TNF-A* und *CCL22* verhielten sich gegensätzlich dazu, was für eine

stärkere Aktivität der Makrophagen bei ALI-Kultivierung spricht (Godiska *et al.*, 1997; J. Sethi & Hotamisligil, 2021).

Zur zusätzlichen Untersuchung der Inflammation wurde die Freisetzung des inflammatorischen Chemokins IL-8 untersucht. Hier zeigten die submersen Modelle beide eine konzentrationsabhängige IL-8-Freisetzung, die Cokultur mit 23 ng/mL einen ca. 7-fach höheren Wert als die Monokultur. Nach ALI-Exposition wurde durch die Cokultur ebenfalls IL-8 in einem konzentrationsabhängigen Verlauf freigesetzt, mit einem Maximum von 10 ng/mL bei der höchsten Quarzdosis. Die Monokultur am ALI sekretierte keine signifikanten Mengen IL-8. Die IL-8-Bildung in der dTHP-1-Monokultur war mit einem Maximum von 2,6 ng/mL vergleichsweise gering, was jedoch durch die geringe Zelldichte und einen starken Verdünnungseffekt durch das umgebende Medium erklärt werden kann. Wird die IL-8-Freisetzung auf die gleiche ausgestreute Zellzahl extrapoliert, die bei den A549-Mono- und A549/dTHP-1-Cokulturen verwendet wurde, ergibt sich mit ca. 54 ng/mL eine deutlich höhere maximale Freisetzung. Allerdings spiegelt diese Berechnung die IL-8-Sekretion vermutlich nicht exakt wider, da bei den verwendeten Quarzkonzentrationen bereits eine Zytotoxizität einsetzte, die sowohl einen Einfluss auf die Zellzahl als auch auf die IL-8-Freisetzung hatte. Bei der IL-8-Freisetzung durch Lungenzellkulturen handelt es sich ebenfalls um ein gut dokumentiertes Phänomen, sowohl für A549-Zellen (Herseith *et al.*, 2008; Øvrevik *et al.*, 2006) als auch für THP-1-Zellen (Grytting *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2003).

Aus diesen drei gut untersuchten Endpunkten lassen sich erste Schlussfolgerungen zur Sensitivität der verschiedenen Modelle ableiten. Zunächst konnte festgestellt werden, dass die submersen Modelle empfindlicher auf Quarzpartikel reagierten als die am ALI kultivierten Zellkulturen. Dies ist besonders auffallend, da Zellen am ALI ein höheres Maß an Stress aufweisen, was auch durch die leicht höhere LDH-Freisetzung der unbehandelten Zellen am ALI (16-20 %) gegenüber den unbehandelten submersen Zellen (12-14 %) ersichtlich wurde. Darüber hinaus wurde in diversen Studien eine höhere Empfindlichkeit von ALI-kultivierten A549-Zellen gegenüber unterschiedlichen Nanomaterialien festgestellt (Bessa *et al.*, 2021; Cappellini *et al.*, 2020; Diabaté *et al.*, 2021; Loret *et al.*, 2016; G. Wang *et al.*, 2020). Lediglich zwei Studien, mit Min-U-Sil5 und Silica-Nanopartikeln, zeichneten ein ähnliches Bild wie in der vorliegenden Arbeit und berichteten von einer höheren Sensibilität der submersen Kulturen (Öhlinger *et al.*, 2019; Panas *et al.*, 2014). Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen für Expositionen mit Silica-basierten Materialien charakteristischen Sachverhalt. Die geringere Toxizität von Quarz-Partikeln am ALI lässt sich womöglich darauf zurückführen, dass die für ALI-Expositionen verwendeten Partikel im Rahmen der Probenvorbereitung in einer BSA-haltigen Lösung suspendiert wurden, was zur Ausbildung einer Proteincorona führen kann. Im submersen System ist dies durch die Anwesenheit von FKS im umgebenden Medium ebenfalls möglich (Hu *et al.*, 2011; Leibe *et al.*, 2019). Die Konzentration und Zusammensetzung der Proteine auf der Quarzoberfläche ist für beide Systeme dennoch verschieden, was die unterschiedliche Effektstärke erklären könnte. Die protektive Funktion von *Surfactant*, das A549-Zellen am ALI sezernieren können, ist ebenfalls bekannt und kann eine Rolle in der Abschwächung der Partikeltoxizität spielen (Blank *et al.*, 2006).

Aus der verstärkten IL-8-Freisetzung wird außerdem ersichtlich, dass die Cokulturen eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Quarz besitzen. Dies wird durch die generierten Genexpressionsprofile zusätzlich gestützt, da die Cokultur in den Clustern "Inflammation" und "Oxidative Stressantwort" eine deutlich stärkere Induktion der verschiedenen Gene verzeichnete. Das höhere inflammatorische Potenzial nach Quarzexposition von Cokulturen im Vergleich zu Monokulturen wurde ebenfalls bereits demonstriert (Herseth *et al.*, 2008; Wottrich *et al.*, 2004). Allgemein wird dies auf die stärkere Aufnahme der Quarzpartikel durch Makrophagen und eine daraus resultierende umfangreiche Freisetzung von Zytokinen zurückgeführt (Suzuki *et al.*, 2008).

Diese beiden Beobachtungen, die einer weniger empfindlichen ALI-Kultur und die einer stärkeren Inflammationsantwort in Cokulturen, betonen, dass eine Verwendung von realistischeren Modellen im Kontext der Partikeltoxikologie eine große Bedeutung besitzt. Die Kultivierung der Zellen am ALI stellt hierbei eine Umgebung her, die besser die Gegebenheiten in der Lunge widerspiegelt, und trägt dazu bei, dass die toxikologischen Auswirkungen von Quarzpartikeln wirklichkeitsgetreuer untersucht werden können. Die Möglichkeit zur Ermittlung der genauen deponierten Dosis sowie die weniger starke Beeinflussung der Partikeleigenschaften sind hierbei ebenfalls von großem Vorteil (Upadhyay & Palmberg, 2018). Gleichzeitig ist die Verwendung unterschiedlicher Zelltypen im Kontext einer Cokultur notwendig, um mögliche Zell-Zell-Interaktionen nachzubilden und die Lunge als aus vielen Zellarten bestehendes Organ besser zu simulieren. Im Kontext dieser Arbeit bedeutet die Verwendung der Makrophagen-ähnlichen dTHP-1-Zellen eine Modulation der inflammatorischen Antwort. In einer Studie wurde ein Vergleich zwischen der klassischen submersen Exposition von A549-Zellen und der Exposition von Mäusen gegenüber Quarzpartikeln gezogen. In den *in-vivo*-Versuchen kam es zur Induktion von vier Mal so vielen mit der Inflammation assoziierten Molekülen als in A549-Zellen, was demonstriert, dass die klassische submerse Kultivierung von Lungenzellen in Monokultur nicht ausreichend für eine toxikologische Charakterisierung ist (Sellamuthu *et al.*, 2011).

Indes konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass sich die beobachtete toxikologische Antwort zwischen ALI und submersem Modell, insbesondere auf Ebene der Genexpression, eher in ihrem Ausmaß unterscheidet als in der Art der zugrunde liegenden Mechanismen. Eine genaue Eingrenzung der beobachteten Antworten in der Cokultur auf jeweils einen Zelltyp ist schwierig, dennoch soll ein Mechanismus auf Basis der beobachteten Effekte in den Monokulturen und den bereits in der Literatur beschriebenen Mechanismen vorgeschlagen werden. Eine schematische Darstellung dieses Vorschlags findet sich in Abbildung 6.1.

In Makrophagen werden große Mengen des Quarzes durch Phagozytose internalisiert. Der saure pH-Wert sorgt in den nachfolgend gebildeten Phagolysosomen für die Entfernung der schützenden Proteincorona und einen Bruch der lysosomalen Membranen durch die reaktivierte Quarzoberfläche. Der freigesetzte Lysosomeninhalt und die Quarzpartikel verursachen daraufhin im Zytoplasma eine verstärkte Bildung von ROS (Leinardi *et al.*, 2020). Ein weiterer für Makrophagen bekannter Mechanismus ist die Bindung von Quarz an Rezeptoren in der Zellmembran. Sogenannte *Scavenger*-Rezeptoren (SR) spielen dabei eine bedeutende Rolle und können neben einer zusätzlichen Induktion endozytotischer

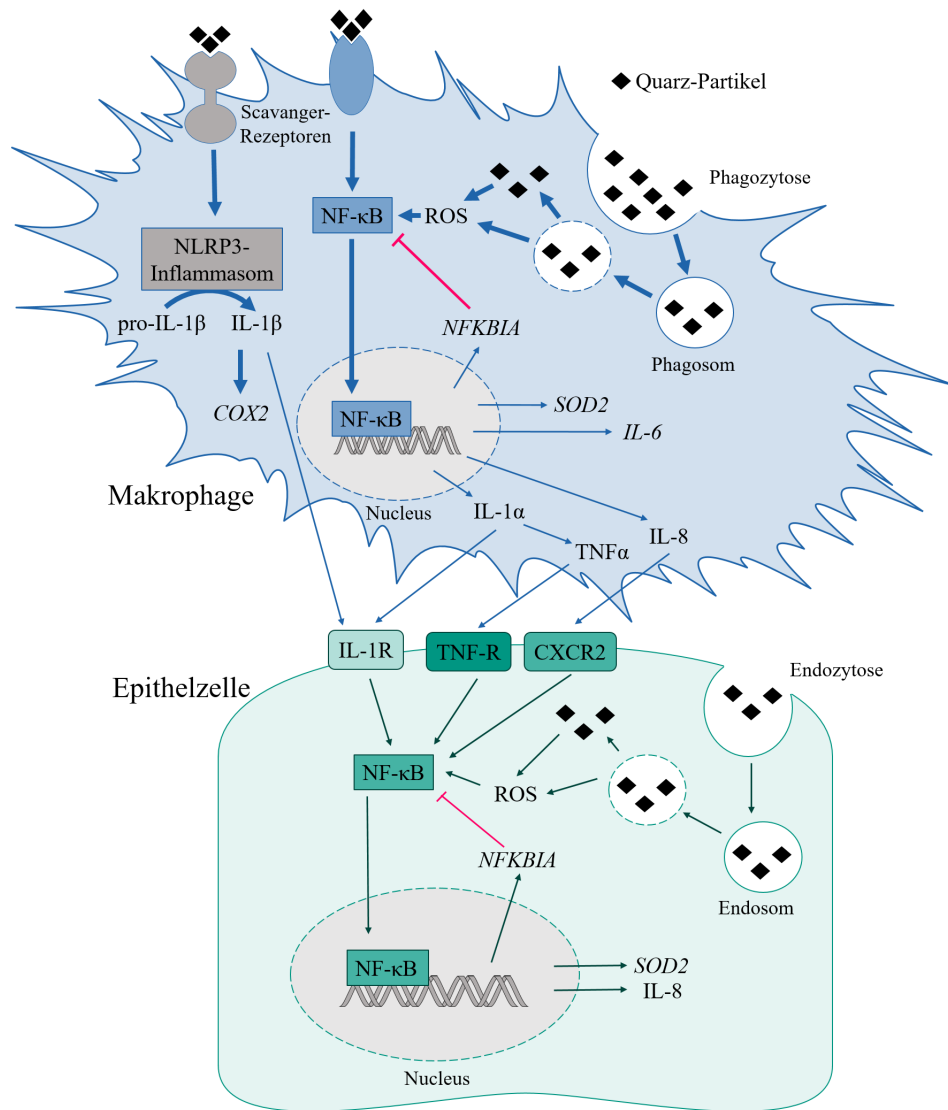


Abbildung 6.1: Schematische Darstellung der inflammatorischen Antwort in Makrophagen und Epithelzellen nach Quarz-Exposition. Quarzpartikel können durch Interaktion mit Scavenger-Rezeptoren der Makrophagen das NLRP3-Inflammasom aktivieren, welches durch die Caspase 1 pro-IL-1 β zu IL-1 β umsetzt, und den Transkriptionsfaktor NF- κ B. Darüber hinaus werden Quarzpartikel durch Phagozytose aufgenommen und induzieren durch Bruch der nachfolgend gebildeten Lysosomen und Freisetzung der enthaltenen Partikel oxidativen Stress. Dieser wirkt ebenfalls induzierend auf NF- κ B. Nach Translokation von NF- κ B in den Zellkern werden diverse inflammatorische Proteine exprimiert und sekretiert, etwa IL-1 α , IL-8 und TNF α . Diese binden an Membranrezeptoren der Epithelzellen und tragen so neben Endozytose und Bildung von ROS zur inflammatorischen Antwort in Epithelzellen bei.

Prozesse auch die direkte Aktivierung inflammatorischer Signalwege bewirken (Hamilton *et al.*, 2008; Iyer *et al.*, 1996). Die vermehrt gebildeten ROS, andere Schäden durch die intrazellulär freigesetzten Quarzpartikel und die Signalweiterleitung durch SR lösen eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B aus. Dieser transloziert in den Zellkern und bindet an Promotorregionen diverser für Zytokine kodierender Gene, beispielsweise IL-6, IL-8, IL-1A und TNF-A (Tripathi & Aggarwal, 2006). Für IL-8 wird auch von einer nachfolgenden Translation ausgegangen, da die Freisetzung von IL-8 auf Proteinebene

demonstriert werden konnte. Darüber hinaus kommt es zur Expression von *NFKBIA*, einem Gen, welches für den NF- κ B-Inhibitor $I\kappa B\alpha$ kodiert. $I\kappa B\alpha$ reguliert durch einen Prozess der negativen Rückkopplung die NF- κ B-Aktivität (Prescott *et al.*, 2021). Die Induktion der Mangan-abhängigen Superoxiddismutase, kodiert durch das Gen *SOD2*, ist ebenfalls auf die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs zurückzuführen (Tripathi & Aggarwal, 2006). Als zusätzlicher inflammatorischer Signalweg kann die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms vermutet werden, bei der das inaktive pro-IL-1 β durch die Caspase-1 in das aktive IL-1 β umgesetzt wird (Sayan & Mossman, 2015). Dieser Vorgang wird auch mit einer verstärkten Expression von *COX2* assoziiert (Simmons *et al.*, 2004). Eine Aktivierung des Inflammasoms kann ebenfalls durch die lysosomale Protease Cathepsin B vonstatten gehen, die bei Bruch der Lysosomen freigesetzt wird (Latz, 2010). Die von den Makrophagen gebildeten Zytokine werden daraufhin freigesetzt und binden an korrespondierende Rezeptoren in den Membranen benachbarter Zellen: IL-1 α und IL-1 β binden an den IL-1-Rezeptor (Kuno & Matsushima, 1994), TNF- α an Rezeptoren der TNF-Superfamilie (Locksley *et al.*, 2001) und IL-8 an den CXCR2-Rezeptor (J. Lee *et al.*, 1992). Zusätzlich kann die Freisetzung von ROS, welche als *Second Messenger* in der Kommunikation zwischen Makrophagen und Epithelzellen fungieren können, angenommen werden. Dies müsste durch eine zusätzliche Methode zur ROS-Detektion nachgewiesen werden (Forman & Torres, 2002). Die Bindung der Zytokine an die Rezeptoren löst daraufhin durch intrazelluläre Signalkaskaden ebenfalls die Induktion des NF- κ B-Signalwegs aus, was eine erneute Freisetzung inflammatorischer Mediatoren zur Folge hat. Dies ist durch die verstärkte Freisetzung von IL-8 in der Cokultur augenscheinlich und bestätigt vermutlich auch die Translation von *IL-1A/B* und *TNF-A* zu deren korrespondierenden Proteinen in den Makrophagen. In den Epithelzellen in Monokultur ist die leichte Induktion des NF- κ B-Signalwegs durch die Aufnahme der Quarzpartikel durch Endozytose vermittelt, die jedoch in einem nicht so starken Ausmaß stattfindet wie in Makrophagen (Höhr *et al.*, 2002). Durch die enge Verbindung der verschiedenen Zytokine und Überschneidungen in deren Aktivierungsmustern kann sich die beobachtete Antwort in der Cokultur permanent selbst verstärken. Die Bildung von sogenannten *Positive Feedback Loops*, in denen sich Zytokine über ihre Induktion von und durch Transkriptionsfaktoren durchgehend steigern, ist beispielsweise für seneszente Zellen bekannt (Bartek *et al.*, 2008). Ein ähnlicher Mechanismus der Kommunikation zwischen Makrophagen und Epithelzellen über konditioniertes Medium wurde bereits für Asbestfasern beschrieben, allerdings wurde dort als grundlegender Signalweg in Makrophagen eher die Inflammasom-Aktivierung postuliert (M. Li *et al.*, 2012).

Zusätzlich zu den zugrunde liegenden Signalwegen wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die Induktion von DNA-Schäden in Quarz-exponierten A549-Mono- und A549/dTHP-1-Cokulturen am ALI untersucht. Es konnte keine Bildung von DNA-Strangbrüchen bei den verwendeten Konzentrationen festgestellt werden. Dies steht teilweise in Widerspruch zu bereits publizierter Literatur, in der in den meisten Studien eine Genotoxizität von Quarz-Partikeln ermittelt wurde, insbesondere die Bildung oxidativer DNA-Schäden steht hierbei im Fokus (Fanizza *et al.*, 2007; H. Li *et al.*, 2008; Schins *et al.*, 2002a; R. Wu *et al.*, 2020). Hier spielt womöglich die Zeitabhängigkeit toxikologischer Antworten eine tragende Rolle. In den zuvor genannten Studien wurde die Bildung von DNA-Schäden bereits nach

kurzen Inkubationszeiten von wenigen Stunden untersucht, während in dieser Arbeit ein Nachinkubationszeitraum von 24 h verwendet wurde. Eine Betrachtung früherer Zeitpunkte hätte möglicherweise andere Ergebnisse geliefert.

Diese Beobachtung sowie die ermittelte zeitliche Dynamik inflammatorischer Prozesse, die durch die Genexpressionsprofile zutage getreten sind, zeigt die Relevanz einer zeitaufgelösten Betrachtung zellulärer Prozesse. Aus diesem Grund wurde für die weiter durchgeführten Expositionsstudien mit Carbonfasern ein Fokus auf die Untersuchung der toxikologischen Antworten nach verschiedenen verstrichenen Zeiträumen gelegt.

6.2 Toxizität von Carbonfasern nach mechanischer und thermisch-mechanischer Behandlung

Drei Zellkulturmodelle wurden gegenüber mechanisch und thermisch-mechanisch behandelten CF exponiert, um die Toxizität der Fasern zu untersuchen, die zwar in der Industrie in großem Maßstab verwendet werden, gleichzeitig toxikologisch kaum untersucht sind. Die REM-Aufnahmen nach Deposition der Stäube machen bereits deutlich, dass sich die Beschaffenheit der gebildeten Fragmente nach den zwei unterschiedlichen Behandlungsarten deutlich unterscheidet. Nach beiden Behandlungsarten lagen unregelmäßig gesplitterte Fragmente vor, manche davon annähernd partikulär, manche auch faserförmig. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass native CF durch ihren hohen Durchmesser keine Gefahr im Kontext der Inhalation darstellen. Allerdings kann mechanischer und thermischer Stress zu einer Bildung respirabler Fragmente führen (J. Wang *et al.*, 2017). Nach thermisch-mechanischer Behandlung war darüber hinaus eine verstärkte Bildung kleinerer Fragmente und Partikel im Submikrometerbereich deutlich. Dazu korrespondierend zeigten die verschiedenen Behandlungsarten auch deutliche Unterschiede in den von ihnen ausgelösten toxikologischen Antworten.

Während die Stäube nach mechanischer Behandlung weder in der Mono- noch in der Cokultur eine Zytotoxizität auslösten, resultierte die Exposition gegenüber thermisch-mechanisch behandelten CF in einer signifikanten Reduktion der Zellzahl um 20-55 % für beide Modelle. Diese kann durch die Entschlichtung der Fasern bei thermischer Behandlung erklärt werden, welche mutmaßlich eine Veränderung der Oberflächenbeschaffenheit zur Folge hatte und zur starken Agglomeration der Fragmente führte. Die veränderte Oberflächenstruktur, bei der es sich um reinen Kohlenstoff handelt, führte zusätzlich zu einer Anhaftung der Zellen und einen nachfolgenden Zellverlust ohne direkte Zerstörung der Zellmembranen und Freisetzung von LDH. Die starke Agglomerationsfähigkeit von *Carbon Black*-Partikeln (CB) als Nanopartikel aus reinem Kohlenstoff und eine dennoch fehlende zytotoxische Reaktion wurde bereits in mehreren Studien beschrieben (Dilger *et al.*, 2016; Kang *et al.*, 2013), ebenso wie die Affinität der Partikeln zu DPPC, einem Bestandteil zellulärer Membranen (Guzmán *et al.*, 2015). Demnach handelt es sich hierbei um einen für Carbon-basierte Materialien charakteristischen Effekt. Dieses Phänomen hatte auch Auswirkungen auf die Genexpressionsanalysen. Insbesondere bei den Cokulturen mit Makrophagen, die zuerst mit den Faser-Stäuben in Kontakt treten, ergab sich durch

den Zellverlust die vermeintliche Repression einiger für Makrophagen-Aktivität charakteristischer Inflammationsgene, z.B. *TNF-A* und *CCL22* (Godiska *et al.*, 1997; J. Sethi & Hotamisligil, 2021).

Die hier ermittelten Ergebnisse zur Zytotoxizität stimmen mit den wenigen publizierten Studien zur Toxizität von Carbonfasern überein. In Kaninchenmakrophagen wiesen nur zwei der fünf untersuchten CF-Komposite eine moderate Zytotoxizität auf, insgesamt war diese jedoch geringer als bei Exposition gegenüber Quarz (Martin *et al.*, 1989). Bei Exposition von murinen Makrophagen gegenüber thermisch behandelten Kompositen aus Graphenoxid und CF wurde ein zytotoxischer Effekt lediglich bei einer Konzentration von 120 µg/mL beobachtet (Chapple *et al.*, 2022). Gleichzeitig wiesen die faserförmigen Carbon-basierten MWCNTs in verschiedenen Zellsystemen eine Zytotoxizität bei geringen Konzentrationen auf (Di Ianni *et al.*, 2021; M. Li *et al.*, 2012; Siegrist *et al.*, 2019; Westphal *et al.*, 2019), die vermutlich in einem erhöhten Maß an frustrierter Phagozytose begründet ist (Toyokuni, 2013). Demnach ist die Größe und Form der resultierenden Fragmente für die Ausbildung einer Zytotoxizität ausschlaggebend. Die fehlende Bildung langer und dünner Fragmente in großer Menge resultierte bei den hier betrachteten Stäuben in einer geringen bzw. ausbleibenden Zytotoxizität. Somit ähneln die generierten Stäube sowohl in ihrer Beschaffenheit als auch in ihrer biologischen Wirkung in Bezug auf die Zytotoxizität CB-Partikeln. Zusätzlich zeigte sich ein bisher in der Literatur unbeschriebener Effekt bei Exposition gegenüber thermisch-mechanisch behandelter Fasern durch das Fehlen der Schlichte, was auch die Relevanz der Oberflächenbeschaffenheit betont.

In Hinblick auf mögliche toxikologische Mechanismen können erneut die Genexpressionsprofile hinzugezogen werden. In Abbildung 6.2 ist die Anzahl der Gene, bei denen eine Veränderung um einen Faktor 2 im Vergleich zur Reinluftkontrolle beobachtet wurde, als Netzdiagramm für die beiden Faserstäube dargestellt.

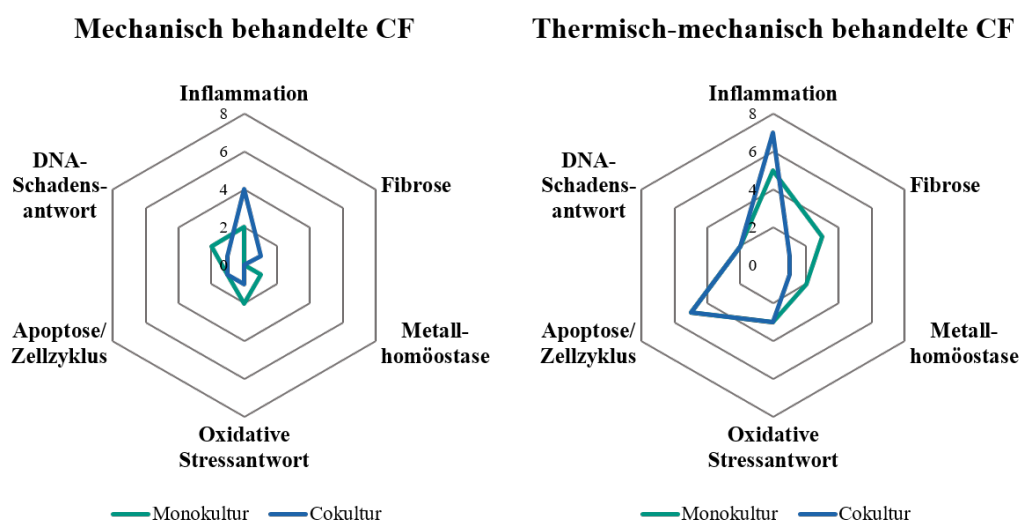


Abbildung 6.2: Beeinflussung der verschiedenen Genexpressions-Cluster durch Exposition gegenüber mechanisch (links) und thermisch mechanisch behandelten (rechts) CF. Die Effekte der Exposition von BEAS-2B-Mono und BEAS-2B/dTHP-1-Coulturen sind als Netzdiagramm dargestellt. Gezeigt ist die Anzahl der Gene, deren Expression um mehr als einen Faktor 2 verändert wurde.

Es wird ersichtlich, dass die mechanisch behandelten CF deutlich weniger relevante Wirkungen auf Ebene der Genexpression auslösten als die thermisch-mechanisch behandelten CF. Im Kontrast zu den vorher durchgeführten Quarzstudien konnten auch keine starken Unterschiede in der Anzahl der aktivierten Gene zwischen Mono- und Cokultur festgestellt werden. Bei Exposition gegenüber mechanisch behandelten CF überwog in der Cokultur leicht die Aktivierung inflammatorischer Effekte, während in der Monokultur keiner der Cluster dominant hervortrat. Bei Exposition gegenüber thermisch-mechanisch behandelten CF zeigten Mono- und Cokultur ein Verhalten, das sich stark überschneidet. Die zelluläre Antwort wies große Schwerpunkte in den Clustern "Apoptose" und "Inflammation" auf. Die fehlenden Unterschiede zwischen Mono- und Cokultur können womöglich durch das bereits diskutierte Phänomen des Zellverlusts erklärt werden, das den Einfluss der Makrophagen auf die transkriptionelle Antwort durch deren erstes Entweichen aus dem System deutlich verringert.

Diese Beobachtungen werden durch die Betrachtung der detaillierten Genexpressionsprofile unterstützt. Bei Exposition gegenüber mechanisch behandelten CF wurden biologisch relevante Effekte lediglich in den Genen *IL-6*, *IL-8*, *DDIT3* und *GADD45A* in Form einer leichten Induktion dieser Gene festgestellt. Die Exposition gegenüber thermisch-mechanisch behandelten CF löste eine umfassendere transkriptionelle Antwort aus. Die deutlichsten Effekte zeigten sich bei dem Inflammationsgen *IL-6*, welches in der Monokultur nach 4 h um das 16-fache, in der Cokultur jedoch nicht signifikant induziert wurde, und dem DNA-Schadensmarker *DDIT3*, welcher in der Monokultur nach 4 h um das 23-fache und in der Cokultur um das 5-fache induziert wurde. Weitere Gene des Clusters "Inflammation", z.B. *IL-8*, *IL-1A/B* und *COX2*, wurden ebenfalls verstärkend beeinflusst. Zudem kam es zu einer Induktion diverser Gene der Apoptose und Zellzyklusregulation, insbesondere *JUN*, *MYC* und *VEGFA* sind hier hervorzuheben.

Trotz der starken Unterschiede im Ausmaß der beobachteten Antworten kann davon ausgegangen werden, dass für die beiden Behandlungsarten ähnliche toxikologische Mechanismen gelten, da zu einem Großteil Effekte in den gleichen Genen zu beobachten waren. Rückschlüsse über Prozesse in einzelnen Zellarten wie im Falle der Quarzstudien sind durch die wenige vorliegende Literatur ebenfalls nicht möglich. Allerdings kann hier von einer stärkeren Rolle der Epithelzellen ausgegangen werden, als sie nach Quarzexposition beobachtet wurde. Vorgeschlagene Signalwege für die CF-Exposition von Lungenzellen sind in Abbildung 6.3 vereinfacht dargestellt.

Die starke Aktivierung diverser Inflammationsgene wie *IL-1A/B*, *IL-8*, *IL-6* und *COX2* spricht, ähnlich wie zuvor für das Quarz dargestellt, für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, dessen Aktivierung von TNF- α vermittelt wird (Tripathi & Aggarwal, 2006). Gleichzeitig moduliert TNF- α auch die Aktivierung des MAPK/ERK-Signalwegs, der eine erhebliche Rolle in der Apoptose, Progression des Zellzyklus und der Differenzierung von Zellen spielt (Kant *et al.*, 2011). Weitere Hinweise hierfür sind die Induktion von *VEGFA* und *MYC*, bei denen es sich jeweils um die kodierenden Gene für Proteine *upstream* und *downstream* der MAPK/ERK-Signalkaskade handelt (L. Wu *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2008). Die Beteiligung dieses Signalwegs signalisiert hierbei eine antiapoptotische Wirkung. Gleichzeitig zeigt sich mit der Induktion des Gens *JUN*, welches für ein Monomer

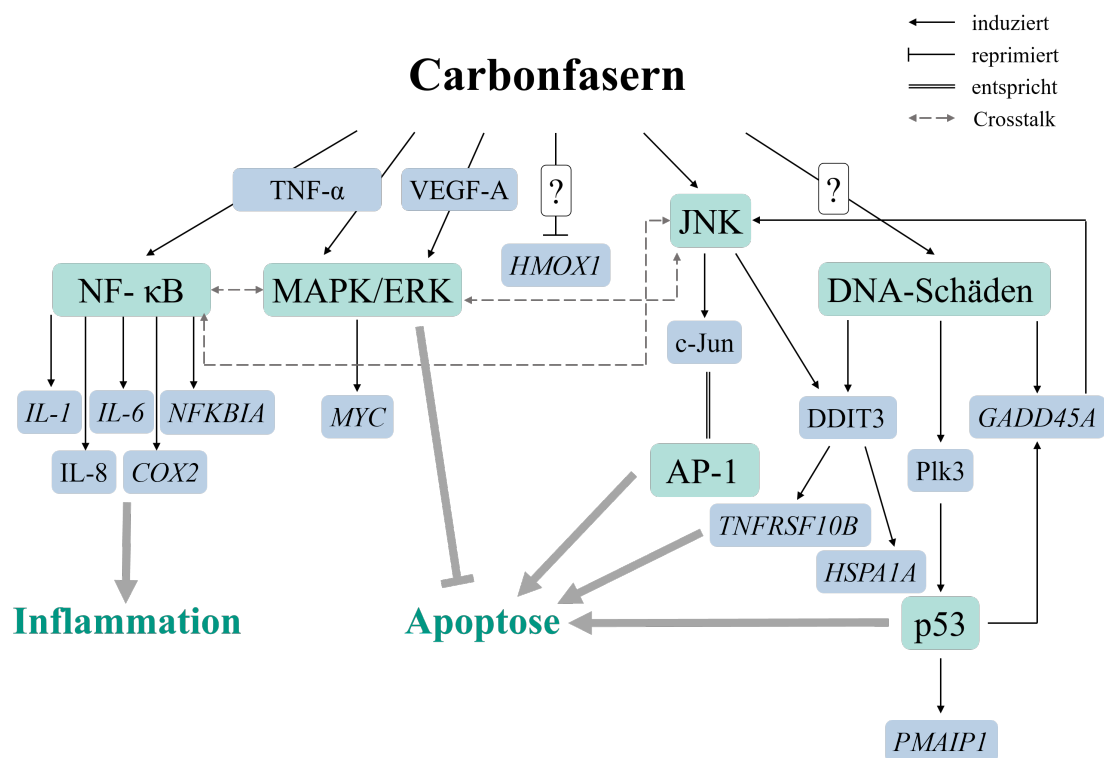


Abbildung 6.3: Schematische Darstellung der zellulären Antwort nach Carbonfaser-Exposition.

Die dargestellten Zusammenhänge wurden auf Basis der Genexpressionsanalysen, IL-8-Freisetzung und AU geschlussfolgert. Schlüsselsignalwege sind grün, in der Genexpression auffällige Gene bzw. deren korrespondierende Proteine blau hinterlegt. Fragezeichen signalisieren eine unklare Signaltransduktion. Als induzierte Signalwege konnten der NF- κ B-Signalweg, der AP-1-Signalweg sowie der MAPK/ERK-Signalweg identifiziert werden. Die meisten in der Genexpression auffälligen Gene kodieren für Effektor- und Aktivatorproteine dieser Signalwege. Das Schema stellt die Signalwege nicht vollständig und stark vereinfacht dar, die Reaktionen können nicht eindeutig auf eine Zelllinie oder ein Material zurückgeführt werden. Für IL-8 wird aufgrund des Nachweises durch einen ELISA von einer Translation ausgegangen. Für *upstream* liegende Proteine wird durch ihre Wirkung auf Schlüsselsignalwege ebenfalls die Translation und ein Vorliegen als Protein angenommen. Alle anderen werden aufgrund des alleinigen Nachweises durch die Genexpression als Gene (kursiv) dargestellt.

des Transkriptionsfaktors AP-1 kodiert, die Beteiligung des JNK-Signalwegs, der in enger Verbindung mit den zuvor genannten NF- κ B- und MAPK/ERK-Signalwegen steht. Sowohl JNK als auch AP-1 sind an der Induktion der Apoptose beteiligt und zeigen proapoptotische Wirkungsweisen, die im Kontrast zum MAPK/ERK-Signalweg stehen (Cargnello & Roux, 2011). Diese Mechanismen stimmen mit einigen Studien überein, in denen die toxikologischen Wirkungen von faserförmigen Materialien untersucht wurden. So wurde in einem *conditioned media*-Szenario mit Asbest-exponierten BEAS-2B und dTHP-1-Zellen eine Induktion von NF- κ B, AP-1 und des NLRP3-Inflammasoms festgestellt sowie eine enge Verbindung dieser drei Signalwege postuliert (M. Li *et al.*, 2012). Johnston *et al.* (2010) beschrieben die Toxizität von CNTs als zweistufigen Prozess: bei geringer Exposition kommt es zu einer verstärkten Schutzantwort aufgrund geringer ROS-Produktion und zu einer Aktivierung der antioxidativen Schutzantwort, beispielsweise durch den Transkriptionsfaktor Nrf2. Bei stärkerer Schädigung zellulärer Bestandteile und hoher ROS-Produktion kommt es vermehrt zur Aktivierung inflammatorisch aktiver Transkriptionsfaktoren (NF- κ B und

AP-1), profibrotischen Antworten und malignen Entwicklungen (Johnston *et al.*, 2010). Da auch eine Repression der Hämoxxygenase 1 durch CF-Stäube festgestellt wurde und damit eine Repression des Nrf2-Transkriptionsfaktors augenscheinlich ist (Loboda *et al.*, 2016), kann für die CF-Stäube bereits ein Mechanismus der stärkeren Schädigung nach dem zuvor beschriebenen Modell angenommen werden.

Eine essenzielle Rolle inflammatorischer Signalwege an der Signalweiterleitung sowie die höhere Empfindlichkeit gegenüber thermisch-mechanisch behandelten CF wurde auch durch die Freisetzung von IL-8 demonstriert. Die Cokultur zeigte nach Exposition gegenüber mechanisch behandelten CF mit 354 pg/mL eine deutlich stärkere Freisetzung des Zytokins als die Monokultur (57,2 pg/mL). Bei Exposition gegenüber thermisch-mechanisch behandelten CF waren die Unterschiede zwischen Mono- und Cokultur nicht so deutlich. Beide Zellkulturmodelle sezernierten zu allen Zeitpunkten nahezu gleiche Mengen an IL-8, darüber hinaus mit 773 pg/mL in der Monokultur und 562 pg/mL in der Cokultur in einem höheren Maße als nach Exposition mit mechanisch behandelten CF. Die Triplekultur wies bei der IL-8-Freisetzung die höchste Sensitivität gegenüber CF auf und setzte eine Konzentration von 4,92 ng/mL IL-8 nach 24 h frei. Eine höhere Empfindlichkeit von Modellen, in denen mehrere unterschiedliche Zelltypen verwendet werden, wurde bereits in der Literatur beschrieben (Klein *et al.*, 2013). Demnach zeigt die hier verwendete Triplekultur ein großes Potenzial, der bestehende Aufbau sollte jedoch in Hinblick auf eine höhere Stabilität und bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse überarbeitet werden.

Auffallend ist das Ausbleiben einer profibrotischen Antwort in allen Zellkulturmodellen einschließlich der Fibroblasten umschließenden Triplekultur. Insbesondere für Asbestfasern und CNTs, weniger für CB, wurde diese bereits vertieft in der Literatur behandelt, unter anderem in Mäusen (Mostovenko *et al.*, 2019; Teegarden *et al.*, 2011) und A549- sowie BEAS-2B-Zellen (Tamminen *et al.*, 2012). Hier kommt erneut ein zeitlicher Aspekt zum Tragen. In der Studie von Tamminen *et al.* wurden fibrotische Entwicklungen erst nach 3 Tagen Exposition festgestellt. Allgemein zeigen fibrotischen Veränderungen eine starke Zeitabhängigkeit und treten für gewöhnlich erst als Folge einer anhaltenden, chronischen Inflammation auf (Dong & Ma, 2019). Demnach waren die Nachinkubationszeiträume von maximal 24 h womöglich zu kurz gewählt.

Eine Beteiligung von DNA-Schäden an der CF-vermittelten Signalweiterleitung muss kritisch betrachtet werden. Im direkten Nachweis durch die Alkalische Entwindung zeigten die CF-Stäube keine starken genotoxischen Effekte in den Mono- und Cokulturen. Es kam zwar bei Exposition gegenüber mechanisch und thermisch-mechanisch behandelten CF zu einer signifikanten Induktion von Strangbrüchen nach 4 h, der hohe Gehalt an doppelsträngiger DNA in CF-exponierten Proben nach 1 und 4 h zeugt jedoch von einer anhaltenden Stabilität der DNA. Demzufolge kann allenfalls von einer leichten Genotoxizität gesprochen werden. In der Triplekultur konnte die moderate Induktion einer sekundären Genotoxizität durch Exposition gegenüber mechanisch behandelten CF, möglicherweise induziert durch oxidativen Stress, beobachtet werden. Zusätzlich ist es auch möglich, dass das genotoxische Potenzial durch die gewählte Methode nicht ausreichend erfasst werden kann. Insbesondere für MWCNTs ist eine Bildung von Mikronuclei als genotoxischer Mechanismus bekannt (Kisin *et al.*, 2011; Ventura *et al.*, 2020a), neben einer Bildung

von DNA-Strangbrüchen (Yamashita *et al.*, 2010). Für CB-Partikel ist die Induktion von DNA-Schäden *in-vitro* ein umstrittener Sachverhalt mit vielen widersprüchlichen Studien (Chaudhuri *et al.*, 2018), allgemein wird jedoch ein Mechanismus sekundärer Genotoxizität angenommen (Schins & Knaapen, 2007). Demnach verhalten sich die CF-Stäube in diesem Aspekt erneut eher vergleichbar zu CB als zu den faserförmigen Vergleichsmaterialien.

Ein Vorhandensein von DNA-Schäden würde die starke Induktion von *DDIT3* erklären, das für das *DNA damage inducible transcript 3* kodiert und neben *IL-6* durchweg die stärkste Aktivierung aufweist, ebenso wie das Gen *GADD45A*. Bei beiden handelt es sich um Gene, die neben der Induktion durch DNA-Schäden auch durch weitere Reize aktiviert werden können, etwa Hypoxie, UV-Strahlung und andere zelluläre Stressreaktionen. Im Falle von *DDIT3* spielt auch der JNK-Signalweg eine tragende Rolle (Jauhiainen *et al.*, 2012; Takekawa & Saito, 1998). Die *DDIT3*-Aktivierung wird auch durch Induktion einiger *downstream*-Gene deutlich, beispielsweise *TNFRSF10B*, welches für den *Death Receptor 5* kodiert und damit einen Mechanismus der Rezeptor-vermittelten extrinsischen Apoptose einleitet (Guo *et al.*, 2017). Das *Heat shock protein 72*, welches durch das Gen *HSPA1A* kodiert wird und insbesondere mit der oxidativen Stressantwort assoziiert wird, kann ebenfalls durch *DDIT3* induziert werden (Jauhiainen *et al.*, 2012), was die Bedeutung von *DDIT3* an diversen zellulären Prozessen auch neben der Rolle als Sensor für DNA-Schäden unterstreicht. Zusätzlich kann auch eine Induktion des Tumorsuppressorproteins p53 angenommen werden. Das Protein Plk3, dessen Induktion auf Genexpressionsebene ebenfalls festgestellt wurde, kann hierbei als Verbindungsglied zwischen der Bildung von DNA-Schäden und der nachfolgenden Aktivierung von p53 angenommen werden (Xie *et al.*, 2001). Bei dem für das Protein Noxa kodierenden Gen *PMAIP1* wurde ebenfalls eine Induktion festgestellt, die auf eine p53-Aktivität schließen lässt (Oda *et al.*, 2000). Gleichzeitig widerspricht die fehlende Induktion des für einen p53-Repressor kodierenden Gens *MDM2* der Hypothese einer Beteiligung von p53 (D. Shi & Gu, 2012). Demnach kann eine Rolle von p53 bei der CF-vermittelten Signalweiterleitung nicht eindeutig bestätigt werden.

In einer *in-vivo*-Studie, in der Mäuse gegenüber nativen und thermisch behandelten CF exponiert wurden, konnte eine Induktion der DNA-Schadensantwort und -Remodellierung festgestellt werden (Moriyama *et al.*, 2019), was eine Beteiligung dieser Prozesse auch in der vorliegenden Arbeit nahe legt. Es liegen darüber hinaus mehrere Studien vor, die eine Beteiligung der MAPK- und p53-Signalwege bei Exposition gegenüber CNTs und Asbestfasern postulieren (Donaldson *et al.*, 2013; Dong & Ma, 2015; Kamp & Weitzman, 1999; Tamminen *et al.*, 2012). Für CB wurde in der Literatur lediglich eine Beteiligung der MAPK-Kaskade festgestellt (Totlandsdal *et al.*, 2010). Da die Beteiligung von p53 und DNA-Strangbrüchen für die in dieser Arbeit betrachteten Faserstäube nicht eindeutig ist, kommt ihnen toxikologisch womöglich eine Rolle zwischen CNTs und CB zu.

Es kann zusammengefasst werden, dass bei Exposition gegenüber CF-Stäuben insbesondere inflammatorische und apoptotische Signalwege in Lungenzellen ausgelöst werden. Eine Überprüfung dieser Mechanismen auf funktioneller Ebene, z.B. durch Messung anderer Zytokine auf Proteinebene, umfassende *Proteomics*-Methoden und weitere Methoden zur

Bestimmung der Genotoxizität, sollte in der Zukunft angestrebt und als Bestandteil neuer Projekte umgesetzt werden.

6.3 Schlussfolgerung

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse betonen die hohe Relevanz einer umfassenden inhalationstoxikologischen Betrachtung verschiedener Materialien *in-vitro*.

Durch den Vergleich verschiedener Zellkulturmodelle mit dem gut untersuchten α -Quarz Min-U-Sil5 wurde deutlich, wie sehr sich toxikologische Antworten in ihrem Ausmaß unterscheiden können, wenn physiologische Gegebenheiten berücksichtigt werden. So zeigten submerse Modelle eine höhere Sensitivität gegenüber Quarz-Partikeln, woraus sich abzeichnet, dass durch die klassische Art der Zellkultivierung beobachtete Effekte leicht überschätzt werden könnten. Dies unterstreicht das *air-liquid interface* als wertvolles Werkzeug zur Konstruktion realistischer Zellkulturmodelle. Simultan demonstrierte die Einbindung Makrophagen-ähnlicher Zellen die Vorteile einer möglichen Kommunikation zwischen verschiedenen Zellarten, wodurch die Lunge als multizelluläres Organ besser widergespiegelt wird. Im Fall der Quarzpartikel äußerte sich dies in einer umfassenden inflammatorischen Antwort, die sowohl auf Ebene der Genexpression als auch auf Ebene der Proteinfreisetzung deutlich wurde. Es war darüber hinaus durch die Verwendung der unterschiedlichen Modelle möglich, einen detaillierten toxikologischen Mechanismus abzuleiten. Die Anwendung der Hochdurchsatz-RT-qPCR ermöglichte hierbei eine systematische Untersuchung zahlreicher intrazellulärer Signalwege und trug zu einem vertieften Verständnis der Quarztoxizität bei. Weiterhin zeigte eine zeitaufgelöste Betrachtung der transkriptionellen Antwort deren Zeitabhängigkeit. Insbesondere im Bereich der Inflammation ist eine Betrachtung früher Zeitpunkte bedeutend, was in den darauf folgenden Experimenten mit CF-Stäuben umfassend umgesetzt wurde.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen der CF-Toxizität stellen die erste umfassende toxikologische Charakterisierung dieses Materials *in-vitro* dar. Bereits die mikroskopischen Aufnahmen machten deutlich, dass bei Behandlung der Carbonfaser Fragmente entstehen können, die eine inhalationstoxikologische Relevanz aufweisen. Dabei wiesen die CF-Stäube nach mechanischer und thermisch-mechanischer Behandlung unterschiedliche Fragmentgrößen, -formen und unterschiedliche Beschaffenheiten der Oberfläche auf, die direkt in den toxikologischen Antworten reflektiert wurden. Dementsprechend lösten thermisch-mechanisch behandelte CF sowohl auf Ebene der Genexpression als auch auf Ebene der Proteinfreisetzung deutlich stärkere Antworten aus als mechanisch behandelte CF. Zudem trat bei Betrachtung der Zellzahl ein bislang unbeschriebener Effekt des Zellverlustes durch eine mutmaßliche starke Adhärenz der Zellen an die durch thermische Behandlung entschlichteten Faserfragmente auf. Die Auswirkungen dieses Effekts *in-vivo* können zwar nicht abgeschätzt werden, lassen jedoch auf einen einzigartigen Mechanismus schließen. Im Literaturvergleich zu anderen Carbon-basierten Materialien lassen sich CF-Stäube vermutlich toxikologisch zwischen CNTs und CB platzieren, da die beobachteten Antworten nicht so stark ausgeprägt waren, wie es häufig für MWCNTs der Fall ist,

allerdings eine größere Bandbreite an Effekten abdecken als bei Exposition mit CB. Hier spielen jedoch ebenfalls die Behandlungsart und die physikochemischen Eigenschaften der generierten Faserfragmente eine tragende Rolle. Die Verwendung einer Triplekultur mit Einbindung von Fibroblasten lieferte insbesondere in den Genexpressionsanalysen widersprüchliche Ergebnisse. Dennoch zeigte sich durch die beachtliche Freisetzung von IL-8 und die Beobachtung einer sekundären Genotoxizität ein hohes Potenzial, welches durch Anpassung von Inkubationszeiten und Verwendung anderer Zelllinien weiter ausgeschöpft werden könnte.

Durch die stetige Entwicklung und Verwendung innovativer Materialien wie Carbonfasern bleibt auch die Inhalationstoxikologie ein Feld, das sich laufend weiterentwickelt. In diesem Kontext existiert ein großer Bedarf an der simultanen Progression toxikologischer *in-vitro*-Methoden, die besser an die physiologischen Gegebenheiten der Lunge angepasst sind und zu einer Reduktion alternativer *in-vivo*-Experimente beitragen können. Insgesamt wurden in dieser Arbeit mehrere Zellkulturmodelle anhand eines bereits gut untersuchten und eines innovativen Materials erfolgreich untersucht und die Abhängigkeit toxikologischer Antworten vom Zellkulturmodell sowie davon abgeleitete toxikologische Mechanismen demonstriert.

KAPITEL 7

LITERATURVERZEICHNIS

- Aghasafari, P., George, U., & Pidaparti, R. (2019). A review of inflammatory mechanism in airway diseases. *Inflammation research*, 68(1), 59–74.
- Albrecht, C., Hohr, D., Haberzettl, P., Becker, A., Borm, P. J., & Schins, R. P. (2007). Surface-dependent quartz uptake by macrophages: potential role in pulmonary inflammation and lung clearance. *Inhalation Toxicology*, 19 Suppl 1, 39–48.
- Alpert, N., van Gerwen, M., & Taioli, E. (2020). Epidemiology of mesothelioma in the 21st century in Europe and the United States, 40 years after restricted/banned asbestos use. *Translational lung cancer research*, 9(Suppl 1), S28.
- Ameyar, M., Wisniewska, M., & Weitzman, J. (2003). A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against. *Biochimie*, 85(8), 747–752.
- Asanov, M., Bonassi, S., Proietti, S., Minina, V., Tomino, C., & El-Zein, R. (2021). Genomic instability in chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer: A systematic review and meta-analysis of studies using the micronucleus assay. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 787, 108344.
- Barbarino, M., & Giordano, A. (2021). Assessment of the carcinogenicity of carbon nanotubes in the respiratory system. *Cancers*, 13(6), 1318.
- Barkauskas, C., Chung, M., Fioret, B., Gao, X., Katsura, H., & Hogan, B. (2017). Lung organoids: current uses and future promise. *Development*, 144(6), 986–997.
- Barsova, H., Karakocak, B., Septiadi, D., Petri-Fink, A., Stone, V., & Rothen-Rutishauser, B. (2020b). An In Vitro Lung System to Assess the Proinflammatory Hazard of Carbon Nanotube Aerosols. *International journal of molecular sciences*, 21(15), 5335.
- Barsova, H., Maione, A., Septiadi, D., Sharma, M., Haeni, L., Balog, S., O’Connell, O., Jackson, G., Brown, D., Clippinger, A., Hayden, P., Petri-Fink, A., Stone, V., & Rothen-Rutishauser, B. (2020a). Use of EpiAlveolar Lung Model to Predict Fibrotic Potential of Multiwalled Carbon Nanotubes. *ACS Nano*, 14(4), 3941–3956.
- Bartek, J., Hodny, Z., & Lukas, J. (2008). Cytokine loops driving senescence. *Nature Cell Biology*, 10(8), 887–889.
- Belade, E., Chrusciel, S., Armand, L., Simon-Deckers, A., Bussy, C., Caramelle, P., Gagliolo, J., Boyer, L., Lanone, S., Pairon, J., et al. (2015). The role of p53 in lung macrophages following exposure to a panel of manufactured nanomaterials. *Archives of toxicology*, 89(9), 1543–1556.
- BéruBé, K., Prytherch, Z., Job, C., & Hughes, T. (2010). Human primary bronchial lung cell constructs: the new respiratory models. *Toxicology*, 278(3), 311–318.
- Bessa, M., Brandão, F., Fokkens, P., Leseman, D., Boere, A., Cassee, F., Salmatonidis, A., Viana, M., Vulpoi, A., Simon, S., et al. (2021). In Vitro Toxicity of Industrially Relevant Engineered Nanoparticles in Human Alveolar Epithelial Cells: Air–Liquid Interface versus Submerged Cultures. *Nanomaterials*, 11(12), 3225.

- Bhowmick, R., & Gappa-Fahlenkamp, H. (2016). Cells and Culture Systems Used to Model the Small Airway Epithelium. *Lung*, 194(3), 419–28.
- Blank, F., Rothen-Rutishauser, B. M., Schurch, S., & Gehr, P. (2006). An optimized in vitro model of the respiratory tract wall to study particle cell interactions. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*, 19(3), 392–405.
- Borm, P., & Driscoll, K. (2019). The hazards and risks of inhaled poorly soluble particles - where do we stand after 30 years of research? *Particle and fibre toxicology*, 16(1), 11.
- Borm, P., Fowler, P., & Kirkland, D. (2018). An updated review of the genotoxicity of respirable crystalline silica. *Particle and fibre toxicology*, 15(1), 1–17.
- Boyles, M., Young, L., Brown, D., MacCalman, L., Cowie, H., Moisala, A., Smail, F., Smith, P., Proudfoot, L., Windle, A., et al. (2015). Multi-walled carbon nanotube induced frustrated phagocytosis, cytotoxicity and pro-inflammatory conditions in macrophages are length dependent and greater than that of asbestos. *Toxicology in vitro*, 29(7), 1513–1528.
- Braakhuis, H., He, R., Vandebriel, R., Gremmer, E., Zwart, E., Vermeulen, J., Fokkens, P., Boere, J., Gosens, I., & Cassee, F. (2020). An air-liquid interface bronchial epithelial model for realistic, repeated inhalation exposure to airborne particles for toxicity testing. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (159), e61210.
- Broz, P., & Dixit, V. M. (2016). Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nature Reviews Immunology*, 16(7), 407–420.
- Buzea, C., Pacheco, I., & Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), MR17–71.
- Cappellini, F., Di Bucchianico, S., Karri, V., Latvala, S., Malmlöf, M., Kippler, M., Elihn, K., Hedberg, J., Odnevall Wallinder, I., Gerde, P., & Karlsson, H. (2020). Dry Generation of CeO₂ Nanoparticles and Deposition onto a Co-Culture of A549 and THP-1 Cells in Air-Liquid Interface—Dosimetry Considerations and Comparison to Submerged Exposure. *Nanomaterials*, 10(4), 618.
- Cargnello, M., & Roux, P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews*, 75(1), 50–83.
- Carter, J., Corson, N., Driscoll, K., Elder, A., Finkelstein, J., Harkema, J., Gelein, R., Wade-Mercer, P., Nguyen, K., & Oberdorster, G. (2006). A comparative dose-related response of several key pro-and antiinflammatory mediators in the lungs of rats, mice, and hamsters after subchronic inhalation of carbon black. *Journal of occupational and environmental medicine*, 1265–1278.
- Castranova, V. (2004). Signaling pathways controlling the production of inflammatory mediators in response to crystalline silica exposure: role of reactive oxygen/nitrogen species. *Free radical biology and medicine*, 37(7), 916–925.
- Chapple, R., Chivas-Joly, C., Kose, O., Erskine, E., Ferry, L., Lopez-Cuesta, J., Kandola, B., & Forest, V. (2022). Graphene oxide incorporating carbon fibre-reinforced composites submitted to simultaneous impact and fire: Physicochemical characterisation and toxicology of the by-products. *Journal of Hazardous Materials*, 424, 127544.
- Chaudhuri, I., Fruijtjer-Pölloth, C., Ngiewih, Y., & Levy, L. (2018). Evaluating the evidence on genotoxicity and reproductive toxicity of carbon black: a critical review. *Critical reviews in toxicology*, 48(2), 143–169.
- Chortarea, S., Zerimariam, F., Barosova, H., Septiadi, D., Clift, M., Petri-Fink, A., & Rothen-Rutishauser, B. (2019). Profibrotic activity of Multiwalled carbon nanotubes upon prolonged exposures in different human lung cell types. *Applied In Vitro Toxicology*, 5(1), 47–61.
- Clift, M., Endes, C., Vanhecke, D., Wick, P., Gehr, P., Schins, R., Petri-Fink, A., & Rothen-Rutishauser, B. (2014). A comparative study of different in vitro lung cell culture

-
- systems to assess the most beneficial tool for screening the potential adverse effects of carbon nanotubes. *Toxicological Sciences*, 137(1), 55–64.
- Clift, M., Foster, E., Vanhecke, D., Studer, D., Wick, P., Gehr, P., Rothen-Rutishauser, B., & Weder, C. (2011). Investigating the interaction of cellulose nanofibers derived from cotton with a sophisticated 3D human lung cell coculture. *Biomacromolecules*, 12(10), 3666–3673.
- Clouter, A., Brown, D., Hohr, D., Borm, P., & Donaldson, K. (2001). Inflammatory effects of respirable quartz collected in workplaces versus standard DQ12 quartz: particle surface correlates. *Toxicological Sciences*, 63(1), 90–98.
- Cooke, W. (1924). Fibrosis of the Lungs Due to the Inhalation of Asbestos Dust. *British Medical Journal*, 2(3317), 147–140 2.
- Crapo, J., Barry, B., Gehr, P., Bachofen, M., & Weibel, E. (1982). Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *American Review of Respiratory Disease*, 126(2), 332–337.
- Cui, X., Xu, R., Zhang, H., Peng, Z., Feng, M., Yu, B., Wang, Y., Shi, T., Zhou, Y., & Liu, Y. (2020). Exogenous Clara cell protein 16 attenuates silica particles-induced inflammation in THP-1 macrophages by down-regulating NF- κ B and caspase-1 activation. *The Journal of Toxicological Sciences*, 45(10), 651–660.
- Dang, C., Resar, L., Emison, E., Kim, S., Li, Q., Prescott, J., Wonsey, D., & Zeller, K. (1999). Function of the c-Myc oncogenic transcription factor. *Experimental cell research*, 253(1), 63–77.
- Daniel, L., Mao, Y., & Umberto, S. (1993). Oxidative DNA damage by crystalline silica. *Free Radical Biology and Medicine*, 14(5), 463–472.
- Danielsen, P., Bendtsen, K. M., Knudsen, K. B., Poulsen, S. S., Stoeger, T., & Vogel, U. (2021). Nanomaterial-and shape-dependency of TLR2 and TLR4 mediated signaling following pulmonary exposure to carbonaceous nanomaterials in mice. *Particle and Fibre Toxicology*, 18(1), 1–18.
- Dhand, R. (2004). New frontiers in aerosol delivery during mechanical ventilation. *Respiratory care*, 49(6), 667.
- Di Ianni, E., Erdem, J., Møller, P., Sahlgren, N., Poulsen, S., Knudsen, K., Zienolddiny, S., Saber, A., Wallin, H., Vogel, U., et al. (2021). In vitro-in vivo correlations of pulmonary inflammogenicity and genotoxicity of MWCNT. *Particle and fibre toxicology*, 18(1), 1–16.
- Diabaté, S., Armand, L., Murugadoss, S., Dilger, M., Fritsch-Decker, S., Schlager, C., Béal, D., Arnal, M., Biola-Clier, M., Ambrose, S., et al. (2021). Air-liquid interface exposure of lung epithelial cells to low doses of nanoparticles to assess pulmonary adverse effects. *Nanomaterials*, 11(1), 65.
- Diabaté, S., Bergfeldt, B., Plaumann, D., Übel, C., & Weiss, C. (2011). Anti-oxidative and inflammatory responses induced by fly ash particles and carbon black in lung epithelial cells. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 401(10), 3197–3212.
- Dilger, M., Orasche, J., Zimmermann, R., Paur, H., Diabaté, S., & Weiss, C. (2016). Toxicity of wood smoke particles in human A549 lung epithelial cells: the role of PAHs, soot and zinc. *Archives of toxicology*, 90(12), 3029–3044.
- Ding, Y., Weindl, P., Lenz, A., Mayer, P., Krebs, T., & Schmid, O. (2020). Quartz crystal microbalances (QCM) are suitable for real-time dosimetry in nanotoxicological studies using VITROCELL® Cloud cell exposure systems. *Particle and fibre toxicology*, 17(1), 1–20.
- Dohle, E., Singh, S., Nishigushi, A., Fischer, T., Wessling, M., Möller, M., Sader, R., Kasper, J., Ghanaati, S., & Kirkpatrick, C. (2018). Human Co-and triple-culture model of the alveolar-capillary barrier on a basement membrane mimic. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 24(9), 495–503.

- Donaldson, K., Poland, C., Murphy, F., MacFarlane, M., Chernova, T., & Schinwald, A. (2013). Pulmonary toxicity of carbon nanotubes and asbestos—similarities and differences. *Advanced drug delivery reviews*, 65(15), 2078–2086.
- Donaldson, K., Stone, V., Duffin, R., Clouter, A., Schins, R., & Borm, P. (2001). The quartz hazard: effects of surface and matrix on inflammogenic activity. *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology*, 20(Suppl. 1).
- Dong, J., & Ma, Q. (2015). Advances in mechanisms and signaling pathways of carbon nanotube toxicity. *Nanotoxicology*, 9(5), 658–676.
- Dong, J., & Ma, Q. (2016). Myofibroblasts and lung fibrosis induced by carbon nanotube exposure. *Particle and Fibre Toxicology*, 13(1), 60.
- Dong, J., & Ma, Q. (2019). Integration of inflammation, fibrosis, and cancer induced by carbon nanotubes. *Nanotoxicology*, 13(9), 1244–1274.
- Duncan, K., Cook, P., Gavett, S., Dailey, L., Mahoney, R., Ghio, A., Roggli, V., & Devlin, R. (2014). In vitro determinants of asbestos fiber toxicity: effect on the relative toxicity of Libby amphibole in primary human airway epithelial cells. *Particle and Fibre Toxicology*, 11, 2.
- Dusinska, M., Collins, A., Kazimirova, A., Barancokova, M., Harrington, V., Volkovova, K., Staruchova, M., Horska, A., Wsolova, L., Kocan, A., Petrik, J., Machata, M., Ratcliffe, B., & Kyrtopoulos, S. (2004). Genotoxic effects of asbestos in humans. *Mutation Research*, 553(1-2), 91–102.
- Endes, C., Schmid, O., Kinnear, C., Mueller, S., Camarero-Espinosa, S., Vanhecke, D., Foster, E., Petri-Fink, A., Rothen-Rutishauser, B., Weder, C., & Clift, M. (2014). An in vitro testing strategy towards mimicking the inhalation of high aspect ratio nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology*, 11, 40.
- Fanizza, C., Ursini, C., Paba, E., Ciervo, A., Di Francesco, A., Maiello, R., De Simone, P., & Cavallo, D. (2007). Cytotoxicity and DNA-damage in human lung epithelial cells exposed to respirable α -quartz. *Toxicology in vitro*, 21(4), 586–594.
- Fatkhutdinova, L., Khaliullin, T., Vasilyeva, O., Zalyalov, R., Mustafin, I., Kisin, E., Birch, M., Yanamala, N., & Shvedova, A. (2016). Fibrosis biomarkers in workers exposed to MWCNTs. *Toxicology and applied pharmacology*, 299, 125–131.
- Fenoglio, I., Tomatis, M., Lison, D., Muller, J., Fonseca, A., Nagy, J., & Fubini, B. (2006). Reactivity of carbon nanotubes: free radical generation or scavenging activity? *Free Radical Biology and Medicine*, 40(7), 1227–1233.
- Figarol, A., Pourchez, J., Boudard, D., Forest, V., Akono, C., Tulliani, J., Lecompte, J., Cottier, M., Bernache-Assollant, D., & Grosseau, P. (2015). In vitro toxicity of carbon nanotubes, nano-graphite and carbon black, similar impacts of acid functionalization. *Toxicology in Vitro*, 30(1), 476–485.
- Fischer, B., Neumann, D., P., A., Risnes, S., 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), 2745–2761.
- Forintos, N., & Czigany, T. (2019). Multifunctional application of carbon fiber reinforced polymer composites: Electrical properties of the reinforcing carbon fibers—A short review. *Composites Part B: Engineering*, 162, 331–343.
- Forman, H., & Torres, M. (2002). Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 166(supplement 1), S4–S8.
- Foster, K., Oster, C., Mayer, M., Avery, M., & Audus, K. (1998). Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Experimental cell research*, 243(2), 359–366.
- Frazier, J. (1992). General perspectives on in vitro toxicity testing. *In Vitro Toxicity Testing*, 1–11.

-
- Freyria, F., Bonelli, B., Tomatis, M., Ghiazza, M., Gazzano, E., Ghigo, D., Garrone, E., & Fubini, B. (2012). Hematite nanoparticles larger than 90 nm show no sign of toxicity in terms of lactate dehydrogenase release, nitric oxide generation, apoptosis, and comet assay in murine alveolar macrophages and human lung epithelial cells. *Chemical research in toxicology*, *25*(4), 850–861.
- Friedman, H., & Koropchak, C. (1978). Comparison of WI-38, MRC-5, and IMR-90 cell strains for isolation of viruses from clinical specimens. *Journal of clinical microbiology*, *7*(4), 368–371.
- Friesen, A., Fritsch-Decker, S., Hufnagel, M., Mühlhopt, S., Stapf, D., Hartwig, A., & Weiss, C. (2022a). Comparing α -Quartz-Induced Cytotoxicity and Interleukin-8 Release in Pulmonary Mono-and Co-Cultures Exposed under Submerged and Air-Liquid Interface Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(12), 6412.
- Friesen, A., Fritsch-Decker, S., Hufnagel, M., Mühlhopt, S., Stapf, D., Weiss, C., & Hartwig, A. (2022b). Gene Expression Profiling of Mono-and Co-Culture Models of the Respiratory Tract Exposed to Crystalline Quartz under Submerged and Air-Liquid Interface Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(14), 7773.
- Fröhlich, E., Bonstingl, G., Höfler, A., Meindl, C., Leitinger, G., Pieber, T., & Roblegg, E. (2013). Comparison of two in vitro systems to assess cellular effects of nanoparticles-containing aerosols. *Toxicology in vitro*, *27*(1), 409–417.
- Fröhlich, E., & Salar-Behzadi, S. (2014). Toxicological assessment of inhaled nanoparticles: role of in vivo, ex vivo, in vitro, and in silico studies. *International journal of molecular sciences*, *15*(3), 4795–4822.
- Fubini, B., & Hubbard, A. (2003). Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free radical Biology and medicine*, *34*(12), 1507–1516.
- Gajewski, S., & Hartwig, A. (2020). PARP1 is Required for ATM-Mediated p53 Activation and p53-Mediated Gene Expression after Ionizing Radiation. *Chemical research in toxicology*, *33*(7), 1933–1940.
- Ghio, A., Dailey, L., Soukup, J., Stonehuerner, J., Richards, J., & Devlin, R. (2013). Growth of human bronchial epithelial cells at an air-liquid interface alters the response to particle exposure. *Particle and fibre toxicology*, *10*(1), 1–8.
- Giard, D., Aaronson, S., Todaro, G., Arnstein, P., Kersey, J., Dosik, H., & Parks, W. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, *51*(5), 1417–1423.
- Gilmore, T. (2006). Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, *25*(51), 6680–6684.
- Godiska, R., Chantry, D., Raport, C., Sozzani, S., Allavena, P., Leviten, D., Mantovani, A., & Gray, P. (1997). Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells. *The Journal of experimental medicine*, *185*(9), 1595–1604.
- Götze, J. (2017). Einführung in die Angewandte Mineralogie (M. Göbbels, Hrsg.).
- Grytting, V., Refsnes, M., Øvrevik, J., Halle, M., Schönenberger, J., van der Lelij, R., Snilsberg, B., Skuland, T., Blom, R., & Låg, M. (2021). Respirable stone particles differ in their ability to induce cytotoxicity and pro-inflammatory responses in cell models of the human airways. *Particle and fibre toxicology*, *18*(1), 1–23.
- Guhad, F. (2005). Introduction to the 3Rs (refinement, reduction and replacement). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, *44*(2), 58–59.
- Guo, X., Meng, Y., Sheng, X., Guan, Y., Zhang, F., Han, Z., Kang, Y., Tai, G., Zhou, Y., & Cheng, H. (2017). Tunicamycin enhances human colon cancer cells to TRAIL-induced apoptosis by JNK-CHOP-mediated DR5 upregulation and the inhibition of the EGFR pathway. *Anti-cancer drugs*, *28*(1), 66–74.

- Guthrie, G. (1997). Mineral properties and their contributions to particle toxicity. *Environmental Health Perspectives*, 105(suppl 5), 1003–1011.
- Guzmán, E., Santini, E., Zabiegaj, D., Ferrari, M., Liggieri, L., & Ravera, F. (2015). Interaction of carbon black particles and dipalmitoylphosphatidylcholine at the water/air interface: thermodynamics and rheology. *The Journal of Physical Chemistry C*, 119(48), 26937–26947.
- Gwinn, M., & Vallyathan, V. (2006). Respiratory burst: role in signal transduction in alveolar macrophages. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 9(1), 27–39.
- Haegens, A., Barrett, T., Gell, J., Shukla, A., MacPherson, M., Vacek, P., Poynter, M., Butnor, K., Janssen-Heininger, Y., Steele, C., et al. (2007). Airway epithelial NF- κ B activation modulates asbestos-induced inflammation and mucin production in vivo. *The Journal of Immunology*, 178(3), 1800–1808.
- Hamilton, R., Thakur, S., & Holian, A. (2008). Silica binding and toxicity in alveolar macrophages. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(7), 1246–1258.
- Han, M., Ye, S., Wen, W., & Zhang, Q. (2010). Oxidative stress-mediated pro-inflammatory responses in lung epithelial cells exposed to multi-walled carbon nanotubes. *2010 4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering*, 1–4.
- Hartwig, A., Dally, H., & Schleppegrell, R. (1996). Sensitive analysis of oxidative DNA damage in mammalian cells: use of the bacterial Fpg protein in combination with alkaline unwinding. *Toxicology letters*, 88(1-3), 85–90.
- He, R., Gerlofs-Nijland, M., Boere, J., Fokkens, P., Leseman, D., Janssen, N., & Cassee, F. (2020). Comparative toxicity of ultrafine particles around a major airport in human bronchial epithelial (Calu-3) cell model at the air-liquid interface. *Toxicology in vitro*, 68, 104950.
- He, R., Houtzager, M., Jongeneel, W., Westerink, R., & Cassee, F. (2021a). In vitro hazard characterization of simulated aircraft cabin bleed-air contamination in lung models using an air-liquid interface (ALI) exposure system. *Environment international*, 156, 106718.
- Herseth, J., Refsnes, M., Låg, M., & Schwarze, P. (2009). Role of IL-1 β and COX2 in silica-induced IL-6 release and loss of pneumocytes in co-cultures. *Toxicology in Vitro*, 23(7), 1342–1353.
- Herseth, J., Volden, V., Schwarze, P., Låg, M., & Refsnes, M. (2008). IL-1beta differently involved in IL-8 and FGF-2 release in crystalline silica-treated lung cell co-cultures. *Particle and Fibre Toxicology*, 5(1), 1–18.
- Hess, P., J. and Angel, & Schorpp-Kistner, M. (2004). AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *Journal of cell science*, 117(25), 5965–5973.
- Hetland, R., Schwarze, P., Johansen, B., Myran, T., Uthus, N., & Refsnes, M. (2001). Silica-induced cytokine release from A549 cells: importance of surface area versus size. *Human & Experimental Toxicology*, 20(1), 46–55.
- Hiemstra, P., Grootaers, G., van der Does, A., Krul, C., & Kooter, I. (2018). Human lung epithelial cell cultures for analysis of inhaled toxicants: Lessons learned and future directions. *Toxicology In Vitro*, 47, 137–146.
- Hilton, G., Barosova, H., Petri-Fink, A., Rothen-Rutishauser, B., & Bereman, M. (2019). Leveraging proteomics to compare submerged versus air-liquid interface carbon nanotube exposure to a 3D lung cell model. *Toxicology in Vitro*, 54, 58–66.
- Hinderliter, P., Minard, K., Orr, G., Chrisler, W., Thrall, B., Pounds, J., & Teeguarden, J. (2010). ISDD: A computational model of particle sedimentation, diffusion and target cell dosimetry for in vitro toxicity studies. *Particle and fibre toxicology*, 7(1), 1–20.
- Hindman, B., & Ma, Q. (2018). Carbon nanotubes and crystalline silica induce matrix remodeling and contraction by stimulating myofibroblast transformation in a three-

-
- dimensional culture of human pulmonary fibroblasts: role of dimension and rigidity. *Archives of Toxicology*, 92(11), 3291–3305.
- Höhr, D., Schins, R., & Borm, P. (2002). Uptake of native and surface-modified quartz in epithelial cells and macrophages. *Annals of Occupational Hygiene*, 46(suppl.1), 39–42.
- Holt, D., Chamberlain, L., & Grainger, D. (2010). Cell-cell signaling in co-cultures of macrophages and fibroblasts. *Biomaterials*, 31(36), 9382–9394.
- Holt, P., & Horne, M. (1978). Dust from carbon fibre. *Environmental Research*, 17(2), 276–83.
- Hoy, R., & Chambers, D. (2020). Silica-related diseases in the modern world. *Allergy*, 75(11), 2805–2817.
- Hu, W., Peng, C., Lv, M., Li, X., Zhang, Y., Chen, N., Fan, C., & Huang, Q. (2011). Protein corona-mediated mitigation of cytotoxicity of graphene oxide. *ACS nano*, 5(5), 3693–3700.
- Huang, S., Boda, B., Vernaz, J., Ferreira, E., Wiszniewski, L., & Constant, S. (2017). Establishment and characterization of an in vitro human small airway model (SmallAir™). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 118, 68–72.
- Hufnagel, M., May, N., Wall, J., Wingert, N., Garcia-Käufer, M., Arif, A., Hübner, C., Berger, M., Mühlhopt, S., Baumann, W., et al. (2021b). Impact of Nanocomposite Combustion Aerosols on A549 Cells and a 3D Airway Model. *Nanomaterials*, 11(7), 1685.
- Hufnagel, M., Neuberger, R., Wall, J., Link, M., Friesen, A., & Hartwig, A. (2021a). Impact of Differentiated Macrophage-Like Cells on the Transcriptional Toxicity Profile of CuO Nanoparticles in Co-Cultured Lung Epithelial Cells. *International journal of molecular sciences*, 22(9), 5044.
- Hufnagel, M., Schoch, S., Wall, J., Strauch, B., & 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), 1237–1249.
- Huh, D., Matthews, B., Mammoto, A., Montoya-Zavala, M., Hsin, H., & Ingber, D. (2010). Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science*, 328(5986), 1662–1668.
- Hussain, S., Thomassen, L., Ferecatu, I., Borot, M., Andreau, K., Martens, J., Fleury, J., Baeza-Squiban, A., Marano, F., & Boland, S. (2010). Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells. *Particle and fibre toxicology*, 7(1), 1–17.
- IARC. (1997). IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans: silica, some silicates, coal dust and para-aramid fibrils. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol68/mono68.pdf>.
- IARC. (2010). IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Carbon black, titanium dioxide, and talc. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, 93, 1.
- Inthavong, K., Mouritz, A., Dong, J., & Tu, J. (2013). Inhalation and deposition of carbon and glass composite fibre in the respiratory airway. *Journal of aerosol science*, 65, 58–68.
- Iyer, R., Hamilton, R., Li, L., & Holian, A. (1996). Silica-induced apoptosis mediated via scavenger receptor in human alveolar macrophages. *Toxicology and applied pharmacology*, 141(1), 84–92.
- Izzotti, A., Cartiglia, C., Balansky, R., D'Agostini, F., Longobardi, M., & De Flora, S. (2002). Selective induction of gene expression in rat lung by hexavalent chromium. *Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center*, 35(2), 75–84.

- Jauhiainen, A., Thomsen, C., Strömbom, L., Grundevik, P., Andersson, C., Danielsson, A., Andersson, M., Nerman, O., Rörvik, L., Ståhlberg, A., et al. (2012). Distinct cytoplasmic and nuclear functions of the stress induced protein DDIT3/CHOP/GADD153. *PLoS one*, 7(4), e33208.
- Jensen, K., Kembouche, Y., Christiansen, E., Jacobsen, N., Wallin, H., Guiot, C., Spalla, O., & Witschger, O. (2017). Final protocol for producing suitable manufactured nanomaterial exposure media-Standard Operation Procedure (SOP) and background documentation.
- Jiang, H., Wang, X., Wang, Z., Ding, J., & Shi, W. (2012). Toxicological mechanisms of Carbon-based nanomaterials. *Advanced Materials Research*, 345, 12–17.
- Johnston, H., Hutchison, G., Christensen, F., Peters, S., Hankin, S., Aschberger, K., & Stone, V. (2010). A critical review of the biological mechanisms underlying the in vivo and in vitro toxicity of carbon nanotubes: The contribution of physico-chemical characteristics. *Nanotoxicology*, 4(2), 207–246.
- Kabadi, P., Rodd, A., Simmons, A., Messier, N., Hurt, R., & Kane, A. (2019). A novel human 3D lung microtissue model for nanoparticle-induced cell-matrix alterations. *Particle and Fibre Toxicology*, 16(1), 15.
- Kafshgari, M., Harding, F., & Voelcker, N. (2015). Insights into cellular uptake of nanoparticles. *Current Drug Delivery*, 12(1), 63–77.
- Kamp, D., & Weitzman, S. (1999). The molecular basis of asbestos induced lung injury. *Thorax*, 54(7), 638–652.
- Kang, M., Lim, C., & Han, J. (2013). Comparison of toxicity and deposition of nano-sized carbon black aerosol prepared with or without dispersing sonication. *Toxicological Research*, 29(2), 121–127.
- Kanj, R., Kang, J., & Castranova, V. (2006). Interaction between primary alveolar macrophages and primary alveolar type II cells under basal conditions and after lipopolysaccharide or quartz exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 69(11), 1097–1116.
- Kant, S., Swat, W., Zhang, S., Zhang, Z., Neel, B., Flavell, R., & Davis, R. (2011). TNF-stimulated MAP kinase activation mediated by a Rho family GTPase signaling pathway. *Genes & development*, 25(19), 2069–2078.
- Kesavardhana, S., Malireddi, R., & Kanneganti, T. (2020). Caspases in cell death, inflammation, and pyroptosis. *Annual review of immunology*, 38, 567–595.
- King, E., & Belt, T. (1938). The physiological and pathological aspects of silica. *Physiological Reviews*, 18(3), 329–365.
- Kisin, E., Murray, A., Sargent, L., Lowry, D., Chirila, M., Siegrist, K., Schwegler-Berry, D., Leonard, S., Castranova, V., Fadeel, B., Kagan, V., & Shvedova, A. (2011). Genotoxicity of carbon nanofibers: are they potentially more or less dangerous than carbon nanotubes or asbestos? *Toxicology and Applied Pharmacology*, 252(1), 1–10.
- Klein, S., Serchi, T., Hoffmann, L., Blomeke, B., & Gutleb, A. (2013). An improved 3D tetra-culture system mimicking the cellular organisation at the alveolar barrier to study the potential toxic effects of particles on the lung. *Particle and Fibre Toxicology*, 10, 31.
- Kletting, S., Barthold, S., Repnik, U., Griffiths, G., Loretz, B., Schneider-Daum, N., de Souza Carvalho-Wodarz, C., & Lehr, C. (2018). Co-culture of human alveolar epithelial (hAELVi) and macrophage (THP-1) cell lines. *ALTEX*, 35(2), 211–222.
- Kobayashi, M., Nishita, M., Mishima, T., Ohashi, K., & Mizuno, K. (2006). MAPKAPK-2-mediated LIM-kinase activation is critical for VEGF-induced actin remodeling and cell migration. *The EMBO journal*, 25(4), 713–726.
- Krug, H., & Wick, P. (2011). Nanotoxicology: an interdisciplinary challenge. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(6), 1260–1278.

-
- Kuh, D., Ben-Shlomo, Y., Lynch, J., Hallqvist, J., & Power, C. (2003). Life course epidemiology. *Journal of epidemiology and community health*, 57(10), 778.
- Kumari, M., Hiramatsu, M., & Ebadi, M. (1998). Free radical scavenging actions of metallothionein isoforms I and II. *Free radical research*, 29(2), 93–101.
- Kuno, K., & Matsushima, K. (1994). The IL-1 receptor signaling pathway. *Journal of leukocyte biology*, 56(5), 542–547.
- Kweon, M., Adhami, V., Lee, J., & Mukhtar, H. (2006). Constitutive overexpression of Nrf2-dependent heme oxygenase-1 in A549 cells contributes to resistance to apoptosis induced by epigallocatechin 3-gallate. *Journal of Biological Chemistry*, 281(44), 33761–33772.
- Lacroix, G., Koch, W., Ritter, D., Gutleb, A., Larsen, S., Loret, T., Zanetti, F., Constant, S., Chortarea, S., Rothen-Rutishauser, B., et al. (2018). Air-liquid Interface in vitro models for respiratory toxicology research: consensus workshop and recommendations. *Applied in vitro toxicology*, 4(2), 91–106.
- Lan, Y., Ng, C., Ong, C., Liya, E., & Bay, B. (2021). Transcriptomic analysis identifies dysregulated genes and functional networks in human small airway epithelial cells exposed to ambient PM2.5. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111702.
- Latz, E. (2010). The inflammasomes: mechanisms of activation and function. *Current opinion in immunology*, 22(1), 28–33.
- Lauvås, A., Skovmand, A., Poulsen, M., Kyjovska, Z., Roursgaard, M., Goericke-Pesch, S., Vogel, U., & Hougaard, K. (2019). Airway exposure to TiO₂ nanoparticles and quartz and effects on sperm counts and testosterone levels in male mice. *Reproductive Toxicology*, 90, 134–140.
- Lee, J., Horuk, R., Rice, G., Bennett, G., Camerato, T., & Wood, W. (1992). Characterization of two high affinity human interleukin-8 receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 267(23), 16283–16287.
- Lee, R., & Van Orden, D. (2008). Airborne asbestos in buildings. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 50(2), 218–225.
- Lehnert, B., Valdez, Y., & Tietjen, G. (1989). Alveolar macrophage-particle relationships during lung clearance. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 1(2), 145–154.
- Leibe, R., Hsiao, I., Fritsch-Decker, S., Kielmeier, U., Wagbo, A., Voss, B., Schmidt, A., Hessman, S., Duschl, A., Oostingh, G., et al. (2019). The protein corona suppresses the cytotoxic and pro-inflammatory response in lung epithelial cells and macrophages upon exposure to nanosilica. *Archives of toxicology*, 93(4), 871–885.
- Leinardi, R., Pavan, C., Yedavally, H., Tomatis, M., Salvati, A., & Turci, F. (2020). Cytotoxicity of fractured quartz on THP-1 human macrophages: Role of the membranolytic activity of quartz and phagolysosome destabilization. *Archives of toxicology*, 94(9), 2981–2995.
- Lengsfeld, H., Mainka, H., & Altstädt, V. (2020). *Carbon Fibers: Production, Applications, Processing*. Carl Hanser Verlag GmbH Co KG.
- Li, H., Van Berlo, D., Shi, T., Speit, G., Knaapen, A., Borm, P., Albrecht, C., & Schins, R. (2008). Curcumin protects against cytotoxic and inflammatory effects of quartz particles but causes oxidative DNA damage in a rat lung epithelial cell line. *Toxicology and applied pharmacology*, 227(1), 115–124.
- Li, J., Qin, Y., Chen, Y., Zhao, P., Liu, X., Dong, H., Zheng, W., Feng, S., Mao, X., & Li, C. (2020). Mechanisms of the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in alveolar epithelial cell/macrophage co-culture. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 20(5), 1–1.
- Li, J., Muralikrishnan, S., Ng, C., Yung, L., & Bay, B. (2010). Nanoparticle-induced pulmonary toxicity. *Experimental biology and medicine*, 235(9), 1025–1033.

- Li, M., Gunter, M., & Fukagawa, N. (2012). Differential activation of the inflammasome in THP-1 cells exposed to chrysotile asbestos and Libby “six-mix” amphiboles and subsequent activation of BEAS-2B cells. *Cytokine*, 60(3), 718–730.
- Li, X. (2016). In vitro toxicity testing of cigarette smoke based on the air-liquid interface exposure: A review. *Toxicology In Vitro*, 36, 105–113.
- Lin, W., Huang, Y., Zhou, X., & Ma, Y. (2006). In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 217(3), 252–259.
- Lindberg, H., Falck, G., Suhonen, S., Vippola, M., Vanhala, E., Catalán, J., Savolainen, K., & Norppa, H. (2009). Genotoxicity of nanomaterials: DNA damage and micronuclei induced by carbon nanotubes and graphite nanofibres in human bronchial epithelial cells in vitro. *Toxicology letters*, 186(3), 166–173.
- Lison, D., & Huaux, F. (2011). Ups and downs of cellular uptake. *Nature nanotechnology*, 6(6), 332–333.
- Loboda, A., Damulewicz, M., Pyza, E., Jozkowicz, A., & Dulak, J. (2016). Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cellular and molecular life sciences*, 73(17), 3221–3247.
- Locksley, R., Killeen, N., & Lenardo, M. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 104(4), 487–501.
- Loomis, D., Dement, J., Richardson, D., & Wolf, S. (2010). Asbestos fibre dimensions and lung cancer mortality among workers exposed to chrysotile. *Occupational and environmental medicine*, 67(9), 580–584.
- Loret, T., Peyret, E., Dubreuil, M., Aguerre-Chariol, O., Bressot, C., le Bihan, O., Amodeo, T., Trouiller, B., Braun, A., Egles, C., & Lacroix, G. (2016). Air-liquid interface exposure to aerosols of poorly soluble nanomaterials induces different biological activation levels compared to exposure to suspensions. *Particle and Fibre Toxicology*, 13(1), 58.
- Luus, K. (2007). Asbestos: mining exposure, health effects and policy implications. *McGill Journal of Medicine*, 10(2), 121.
- Magdolenova, Z., Collins, A., Kumar, A., Dhawan, A., Stone, V., & Dusinska, M. (2014). Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology*, 8(3), 233–278.
- Manning, C., Vallyathan, V., & Mossman, B. (2002). Diseases caused by asbestos: mechanisms of injury and disease development. *International immunopharmacology*, 2(2-3), 191–200.
- Martin, T., Meyer, S., & Luchtel, D. (1989). An evaluation of the toxicity of carbon fiber composites for lung cells in vitro and in vivo. *Environmental Research*, 49(2), 246–61.
- Medina-Reyes, E., Delgado-Buenrostro, N., Leseman, D., Déciga-Alcaraz, A., He, R., Gremmer, E., Fokkens, P., Flores-Flores, J., Cassee, F., & Chirino, Y. (2020). Differences in cytotoxicity of lung epithelial cells exposed to titanium dioxide nanofibers and nanoparticles: Comparison of air-liquid interface and submerged cell cultures. *Toxicology In Vitro*, 65, 104798.
- Meldrum, K., Evans, S., Vogel, U., Tran, L., Doak, S., & Clift, M. (2022). The influence of exposure approaches to in vitro lung epithelial barrier models to assess engineered nanomaterial hazard. *Nanotoxicology*, 0(0), 1–21.
- Miyazaki, Y., Tashiro, T., Higuchi, Y., Setoguchi, M., Yamamoto, S., Nagai, H., Nasu, M., & Vassalli, P. (1995). Expression of osteopontin in a macrophage cell line and in transgenic mice with pulmonary fibrosis resulting from the lung expression of a tumor necrosis factor-alpha transgene. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 760, 334–41.
- Moriyama, A., Hasegawa, T., Nagaya, K., C.and Hamada, Himaki, T., Murakami, M., Horie, M., Takahashi, J., Iwahashi, H., & Moritomi, H. (2019). Assessment of

-
- harmfulness and biological effect of carbon fiber dust generated during new carbon fiber recycling method. *Journal of hazardous materials*, 378, 120777.
- Mostovenko, E., Young, T., Muldoon, P., Bishop, L., Canal, C., Vucetic, A., Zeidler-Erdely, P., Erdely, A., Campen, M.-J., & Ottens, A. (2019). Nanoparticle exposure driven circulating bioactive peptidome causes systemic inflammation and vascular dysfunction. *Particle and Fibre Toxicology*, 16(1), 20.
- Mülhopt, S., Diabaté, S., Krebs, T., Weiss, C., & Paur, H. (2009). Lung toxicity determination by in vitro exposure at the air liquid interface with an integrated online dose measurement. *Journal of Physics: Conference Series*, 170(1), 012008.
- Mülhopt, S., Dilger, M., Diabaté, S., Schlager, C., Krebs, T., Zimmermann, R., Buters, J., Oeder, S., Wäscher, T., Weiss, C., & Paur, H. (2016). Toxicity testing of combustion aerosols at the air-liquid interface with a self-contained and easy-to-use exposure system. *Journal of Aerosol Science*, 96, 38–55.
- Mülhopt, S., Schlager, C., Berger, M., Murugadoss, S., Hoet, P., Krebs, T., Paur, H., & Stapf, D. (2020). A novel TEM grid sampler for airborne particles to measure the cell culture surface dose. *Scientific Reports*, 10(1), 1–6.
- Müller, L., Riediker, M., Wick, P., Mohr, M., Gehr, P., & Rothen-Rutishauser, B. (2010). Oxidative stress and inflammation response after nanoparticle exposure: differences between human lung cell monocultures and an advanced three-dimensional model of the human epithelial airways. *Journal of the Royal Society Interface*, 7(suppl.1), S27–S40.
- Nagai, H., & Toyokuni, S. (2010). Biopersistent fiber-induced inflammation and carcinogenesis: lessons learned from asbestos toward safety of fibrous nanomaterials. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 502(1), 1–7.
- Nagai, H., & Toyokuni, S. (2012). Differences and similarities between carbon nanotubes and asbestos fibers during mesothelial carcinogenesis: shedding light on fiber entry mechanism. *Cancer Science*, 103(8), 1378–90.
- Nemmar, A., Yuvaraju, P., Beegam, S., Yasin, J., Kazzam, E., & Ali, B. (2016). Oxidative stress, inflammation, and DNA damage in multiple organs of mice acutely exposed to amorphous silica nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, 11, 919.
- Niranjan, R., & Thakur, A. (2017). The toxicological mechanisms of environmental soot (black carbon) and carbon black: focus on oxidative stress and inflammatory pathways. *Frontiers in immunology*, 8, 763.
- Nobbmann, U., & Morfesis, A. (2009). Light scattering and nanoparticles. *Materials today*, 12(5), 52–54.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., & Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, 288(5468), 1053–1058.
- Öhlinger, K., Kolesnik, T., Meindl, C., Gallé, B., Absenger-Novak, M., Kolb-Lenz, D., & Fröhlich, E. (2019). Air-liquid interface culture changes surface properties of A549 cells. *Toxicology in Vitro*, 60, 369–382.
- Osmond-McLeod, M., Poland, C., Murphy, F., Waddington, L., Morris, H., Hawkins, S., Clark, S., Aitken, R., McCall, M., & Donaldson, K. (2011). Durability and inflammogenic impact of carbon nanotubes compared with asbestos fibres. *Particle and Fibre Toxicology*, 8, 15.
- Ou, L., Song, B., Liang, H., Liu, J., Feng, X., Deng, B., Sun, T., & Shao, L. (2016). Toxicity of graphene-family nanoparticles: a general review of the origins and mechanisms. *Particle and fibre toxicology*, 13(1), 1–24.
- Øvrevik, J., Refsnes, M., Låg, M., Holme, J., & Schwarze, P. (2015). Activation of proinflammatory responses in cells of the airway mucosa by particulate matter: oxidant and non-oxidant-mediated triggering mechanisms. *Biomolecules*, 5(3), 1399–1440.

- Øvrevik, J., Refsnes, M., Namork, E., Becher, R., Sandnes, D., Schwarze, P., & Låg, M. (2006). Mechanisms of silica-induced IL-8 release from A549 cells: initial kinase-activation does not require EGFR activation or particle uptake. *Toxicology*, 227(1-2), 105–116.
- Owen, P., Glaister, J., Ballantyne, B., & Clary, J. (1986). Subchronic inhalation toxicology of carbon fibers. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 28(5), 373–6.
- Panas, A., Comouth, A., Saathoff, H., Leisner, T., Al-Rawi, M., Simon, M., Seemann, G., Dössel, O., Mülhopt, S., Paur, H., et al. (2014). Silica nanoparticles are less toxic to human lung cells when deposited at the air–liquid interface compared to conventional submerged exposure. *Beilstein journal of nanotechnology*, 5(1), 1590–1602.
- Pardo, A., Gibson, K., Cisneros, J., Richards, T., Yang, Y., Becerril, C., Yousem, S., Herrera, I., Ruiz, V., Selman, M., & Kaminski, N. (2005). Up-regulation and profibrotic role of osteopontin in human idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS Med*, 2(9), e251.
- Park, S.-J. (2015). *Carbon fibers*. Springer.
- Pavan, C., Delle Piane, M., Gullo, M., Filippi, F., Fubini, B., Hoet, P., Horwell, C., Huaux, F., Lison, D., Lo Giudice, C., Martra, G., Montfort, E., Schins, R., Sulpizi, M., Wegner, K., Wyart-Remy, M., Ziemann, C., & Turci, F. (2019). The puzzling issue of silica toxicity: are silanols bridging the gaps between surface states and pathogenicity? *Particle and Fibre Toxicology*, 16(1), 32.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B., Karandikar, M., Berman, K., & Cobb, M. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine reviews*, 22(2), 153–183.
- Peeters, P., Eurlings, I., Perkins, T., Wouters, E., Schins, R., Borm, P., Drommer, W., Reynaert, N., & Albrecht, C. (2014). Silica-induced NLRP3 inflammasome activation in vitro and in rat lungs. *Particle and fibre toxicology*, 11(1), 58.
- Peeters, P., Perkins, T., Wouters, E., Mossman, B., & Reynaert, N. (2013). Silica induces NLRP3 inflammasome activation in human lung epithelial cells. *Particle and fibre toxicology*, 10(1), 1–11.
- Popov, V. (2004). Carbon nanotubes: properties and application. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 43(3), 61–102.
- Prescott, J., Mitchell, J., & Cook, S. (2021). Inhibitory feedback control of NF- κ B signalling in health and disease. *Biochemical Journal*, 478(13), 2619–2664.
- Puhakka, A., Ollikainen, T., Soini, Y., Kahlos, K., Saily, M., Koistinen, P., Paakko, P., Linnainmaa, K., & Kinnula, V. (2002). Modulation of DNA single-strand breaks by intracellular glutathione in human lung cells exposed to asbestos fibers. *Mutation Research*, 514(1-2), 7–17.
- Raman, D., Sobolik-Delmaire, T., & Richmond, A. (2011). Chemokines in health and disease. *Experimental cell research*, 317(5), 575–589.
- Reddel, R., Ke, Y., Gerwin, B., McMenamin, M., Lechner, J., Su, R., Brash, D., Park, J., Rhim, J., & Harris, C. (1988). Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer research*, 48(7), 1904–1909.
- Reisetter, A., Stebounova, L., Baltrusaitis, J., Powers, L., Gupta, A., Grassian, V., & Monick, M. (2011). Induction of inflammasome-dependent pyroptosis by carbon black nanoparticles. *Journal of Biological Chemistry*, 286(24), 21844–21852.
- Rosenthal, G., Germolec, D., Blazka, M., Corsini, E., Simeonova, P., Pollock, P., Kong, L., Kwon, J., & Luster, M. (1994). Asbestos stimulates IL-8 production from human lung epithelial cells. *The Journal of Immunology*, 153(7), 3237–3244.
- Roursgaard, M., Jensen, K., Poulsen, S., Jensen, N., Poulsen, L., Hammer, M., Nielsen, G., & Larsen, S. (2011). Acute and subchronic airway inflammation after intratracheal

-
- instillation of quartz and titanium dioxide agglomerates in mice. *TheScientificWorld-JOURNAL*, 11, 801–825.
- Ruttkey-Nedecky, B., Nejdil, L., Gumulec, J., Zitka, O., Masarik, M., Eckschlager, T., Stiborova, M., Adam, V., & Kizek, R. (2013). The role of metallothionein in oxidative stress. *International journal of molecular sciences*, 14(3), 6044–6066.
- Sahu, D., Kannan, G., & Vijayaraghavan, R. (2014). Carbon black particle exhibits size dependent toxicity in human monocytes. *International journal of inflammation*, 2014, 827019.
- Salvesen, G. (2002). Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows. *Cell death and differentiation*, 9(1), 3–5.
- Sayan, M., & Mossman, B. (2015). The NLRP3 inflammasome in pathogenic particle and fibre-associated lung inflammation and diseases. *Particle and fibre toxicology*, 13(1), 1–15.
- Sayes, C., Reed, K., & Warheit, D. (2007). Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. *Toxicological sciences*, 97(1), 163–180.
- Schins, R. (2002b). Mechanisms of genotoxicity of particles and fibers. *Inhalation toxicology*, 14(1), 57–78.
- Schins, R., Duffin, R., Höhr, D., Knaapen, A., Shi, T., Weishaupt, C., Stone, V., Donaldson, K., & Borm, P. (2002a). Surface modification of quartz inhibits toxicity, particle uptake, and oxidative DNA damage in human lung epithelial cells. *Chemical research in toxicology*, 15(9), 1166–1173.
- Schins, R., & Knaapen, A. (2007). Genotoxicity of poorly soluble particles. *Inhalation toxicology*, 19(sup1), 189–198.
- Schreck, R., Albermann, K., & Baeuerle, P. (1992). Nuclear factor κ B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free radical research communications*, 17(4), 221–237.
- Schumacher, P., Fischer, F., Sann, J., Walter, D., & Hartwig, A. (2022). Impact of Nano- and Micro-Sized Chromium (III) Particles on Cytotoxicity and Gene Expression Profiles Related to Genomic Stability in Human Keratinocytes and Alveolar Epithelial Cells. *Nanomaterials*, 12(8), 1294.
- Secondo, L., Liu, N., & Lewinski, N. (2017). Methodological considerations when conducting in vitro, air–liquid interface exposures to engineered nanoparticle aerosols. *Critical Reviews in Toxicology*, 47(3), 225–262.
- Sellamuthu, R., Umbright, C., Li, S., Kashon, M., & Joseph, P. (2011). Mechanisms of crystalline silica-induced pulmonary toxicity revealed by global gene expression profiling. *Inhalation toxicology*, 23(14), 927–937.
- Sethi, G., Sung, B., Aggarwal, B., et al. (2008). TNF: a master switch for inflammation to cancer. *Frontiers in Bioscience*, 13(2), 5094–107.
- Sethi, J., & Hotamisligil, G. (2021). Metabolic Messengers: tumour necrosis factor. *Nature metabolism*, 3(10), 1302–1312.
- Shi, D., & Gu, W. (2012). Dual roles of MDM2 in the regulation of p53: ubiquitination dependent and ubiquitination independent mechanisms of MDM2 repression of p53 activity. *Genes & cancer*, 3(3-4), 240–248.
- Shi, J., & Sun, S. (2018). Tumor necrosis factor receptor-associated factor regulation of nuclear factor κ B and mitogen-activated protein kinase pathways. *Frontiers in immunology*, 1849.
- Shrestha, J., Razavi Bazaz, S., Aboulkheyr Es, H., Yaghobian Azari, D., Thierry, B., Ebrahimi Warkiani, M., & Ghadiri, M. (2020). Lung-on-a-chip: the future of respiratory disease models and pharmacological studies. *Critical reviews in biotechnology*, 40(2), 213–230.

- Shvedova, A., Yanamala, N., Kisin, E., Khailullin, T., Birch, M., & Fatkhutdinova, L. (2016). Integrated analysis of dysregulated ncRNA and mRNA expression profiles in humans exposed to carbon nanotubes. *PLoS one*, *11*(3).
- Siegrist, K., Reynolds, S., Porter, D., Mercer, R., Bauer, A., Lowry, D., Cena, L., Stueckle, T., Kashon, M., Wiley, J., et al. (2019). Mitsui-7, heat-treated, and nitrogen-doped multi-walled carbon nanotubes elicit genotoxicity in human lung epithelial cells. *Particle and Fibre Toxicology*, *16*(1), 1–19.
- Simeonova, P., & Luster, M. (1996). Asbestos induction of nuclear transcription factors and interleukin 8 gene regulation. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, *15*(6), 787–795.
- Simmons, D., Botting, R., & Hla, T. (2004). Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacological reviews*, *56*(3), 387–437.
- Singh, V., Yadav, P., & Mishra, V. (2020). Recent advances on classification, properties, synthesis, and characterization of nanomaterials. *Green synthesis of nanomaterials for bioenergy applications*, 83–97.
- Skuland, T., Lag, M., Gutleb, A., Brinchmann, B., Serchi, T., Ovrevik, J., & Refsnes, M. (2020). Pro-inflammatory effects of crystalline- and nano-sized non-crystalline silica particles in a 3D alveolar model. *Particle and Fibre Toxicology*, *17*(1), 13.
- Standiford, T., Kunkel, S., Basha, M., Chensue, S., Lynch, J., Toews, G., Westwick, J., Strieter, R., et al. (1990). Interleukin-8 gene expression by a pulmonary epithelial cell line. A model for cytokine networks in the lung. *The Journal of clinical investigation*, *86*(6), 1945–1953.
- Sun, H., Clancy, H. A., Kluz, T., Zavadil, J., & Costa, M. (2011). Comparison of gene expression profiles in chromate transformed BEAS-2B cells. *PLoS one*, *6*(3), e17982.
- Sung, J., Wang, Y., Narasimhan Sriram, N., Jackson, M., Long, C., Hickman, J., & Shuler, M. (2018). Recent advances in body-on-a-chip systems. *Analytical chemistry*, *91*(1), 330–351.
- Suzuki, T., Chow, C., & Downey, G. (2008). Role of innate immune cells and their products in lung immunopathology. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *40*(6-7), 1348–1361.
- Takekawa, M., & Saito, H. (1998). A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. *Cell*, *95*(4), 521–530.
- Tamminen, J., Myllärniemi, M., Hyytiäinen, M., Keski-Oja, J., & Koli, K. (2012). Asbestos exposure induces alveolar epithelial cell plasticity through MAPK/Erk signaling. *Journal of Cellular Biochemistry*, *113*(7), 2234–2247.
- Teeguarden, J., Webb-Robertson, B., Waters, K., Murray, A., Kisin, E., Varnum, S., Jacobs, J., Pounds, J., Zanger, R., & Shvedova, A. (2011). Comparative proteomics and pulmonary toxicity of instilled single-walled carbon nanotubes, crocidolite asbestos, and ultrafine carbon black in mice. *Toxicological Sciences*, *120*(1), 123–135.
- te Velde, A., Huijbens, R., Heije, K., de Vries, J., & Figdor, C. (1990). Interleukin-4 (IL-4) inhibits secretion of IL-1 beta, tumor necrosis factor alpha, and IL-6 by human monocytes. *Blood*, *76*(7), 1392–1397.
- Thakur, S., Hamilton, R., & Holian, A. (2008). Role of scavenger receptor a family in lung inflammation from exposure to environmental particles. *Journal of immunotoxicology*, *5*(2), 151–157.
- Toews, G. (2001). Cytokines and the lung. *European Respiratory Journal*, *18*(34 suppl), 3s–17s.
- Totlandsdal, A., Refsnes, M., & Låg, M. (2010). Mechanisms involved in ultrafine carbon black-induced release of IL-6 from primary rat epithelial lung cells. *Toxicology in Vitro*, *24*(1), 10–20.

-
- Toyokuni, S. (2009). Mechanisms of asbestos-induced carcinogenesis. *Nagoya Journal of Medical Science*, 71(1-2), 1–10.
- Toyokuni, S. (2013). Genotoxicity and carcinogenicity risk of carbon nanotubes. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(15), 2098–2110.
- Tripathi, P., & Aggarwal, A. (2006). NF- κ B transcription factor: a key player in the generation of immune response. *Current science*, 519–531.
- Tsoutsouloupoulos, A., Gohlsch, K., Möhle, N., Breit, A., Hoffmann, S., Krischenowski, O., Mückter, H., Gudermann, T., Thiermann, H., Aufderheide, M., et al. (2019). Validation of the CULTEX® Radial Flow System for the assessment of the acute inhalation toxicity of airborne particles. *Toxicology in Vitro*, 58, 245–255.
- Tsuchiya, S., Kobayashi, Y., Goto, Y., Okumura, H., Nakae, S., Konno, T., & Tada, K. (1982). Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer research*, 42(4), 1530–1536.
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., & Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International journal of cancer*, 26(2), 171–176.
- Uotila, M., Ruoslahti, E., & Engvall, E. (1981). Two-site sandwich enzyme immunoassay with monoclonal antibodies to human alpha-fetoprotein. *Journal of immunological methods*, 42(1), 11–15.
- Upadhyay, S., & Palmberg, L. (2018). Air-liquid interface: relevant in vitro models for investigating air pollutant-induced pulmonary toxicity. *Toxicological Sciences*, 164(1), 21–30.
- Ursini, C., Cavallo, D., Fresegna, A., Ciervo, A., Maiello, R., Buresti, G., Casciardi, S., Bellucci, S., & Iavicoli, S. (2014). Differences in cytotoxic, genotoxic, and inflammatory response of bronchial and alveolar human lung epithelial cells to pristine and COOH-functionalized multiwalled carbon nanotubes. *BioMed research international*, 2014, 359506.
- Ursini, C., Maiello, R., Ciervo, A., Fresegna, A., Buresti, G., Superti, F., Marchetti, M., Iavicoli, S., & Cavallo, D. (2016). Evaluation of uptake, cytotoxicity and inflammatory effects in respiratory cells exposed to pristine and-OH and-COOH functionalized multi-wall carbon nanotubes. *Journal of applied toxicology*, 36(3), 394–403.
- Valberg, P., Long, C., & Sax, S. (2006). Integrating studies on carcinogenic risk of carbon black: epidemiology, animal exposures, and mechanism of action. *Journal of occupational and environmental medicine*, 1291–1307.
- Vales, G., Rubio, L., & Marcos, R. (2016). Genotoxic and cell-transformation effects of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) following in vitro sub-chronic exposures. *Journal of hazardous materials*, 306, 193–202.
- van Berlo, D., Clift, M., Albrecht, C., & Schins, R. (2012). Carbon nanotubes: an insight into the mechanisms of their potential genotoxicity. *Swiss medical weekly*, 142, w13698.
- van Berlo, D., Knaapen, A., van Schooten, F., Schins, R., & Albrecht, C. (2010). NF- κ B dependent and independent mechanisms of quartz-induced proinflammatory activation of lung epithelial cells. *Particle and fibre toxicology*, 7(1), 13.
- Ventura, C., Pereira, J., Matos, P., Marques, B., Jordan, P., Sousa-Uva, A., & Silva, M. (2020a). Cytotoxicity and genotoxicity of MWCNT-7 and crocidolite: assessment in alveolar epithelial cells versus their coculture with monocyte-derived macrophages. *Nanotoxicology*, 1–25.
- Ventura, C., Vieira, L., Silva, C., Sousa-Uva, A., & Silva, M. J. (2020b). Functional effects of differentially expressed microRNAs in A549 cells exposed to MWCNT-7 or crocidolite. *Toxicology Letters*, 328, 7–18.
- Verma, D., & Shaw, D. (2001). A comparison of international silica (α -quartz) calibration standards by Fourier transform-infrared spectrophotometry. *Annals of occupational hygiene*, 45(6), 429–435.

- Vietti, G., Lison, D., & van den Brule, S. (2016). Mechanisms of lung fibrosis induced by carbon nanotubes: towards an Adverse Outcome Pathway (AOP). *Particle and Fibre Toxicology*, 13, 11.
- Vuong, N., Goegan, F., P. and De Rose, Breznan, D., Thomson, E., O'Brien, J., Karthikeyan, S., Williams, A., Vincent, R., & Kumarathasan, P. (2017). Responses of A549 human lung epithelial cells to cristobalite and α -quartz exposures assessed by toxicoproteomics and gene expression analysis. *Journal of Applied Toxicology*, 37(6), 721–731.
- Wang, G., Zhang, X., Liu, X., & Zheng, J. (2020). Co-culture of human alveolar epithelial (A549) and macrophage (THP-1) cells to study the potential toxicity of ambient PM_{2.5}: a comparison of growth under ALI and submerged conditions. *Toxicology Research*, 9(5), 636–651.
- Wang, J., Schlagenhauf, L., & Setyan, A. (2017). Transformation of the released asbestos, carbon fibers and carbon nanotubes from composite materials and the changes of their potential health impacts. *Journal of Nanobiotechnology*, 15(1), 15.
- Wang, M., Gray, C., Reznick, S., Mahmud, K., & Kutsovsky, Y. (2000). Carbon black. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 4, 761–803.
- Wang, X., Sun, Z., Villeneuve, N., Zhang, S., Zhao, F., Li, Y., Chen, W., Yi, X., Zheng, W., Wondrak, G., et al. (2008). Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis*, 29(6), 1235–1243.
- Warheit, D., Hansen, J., Hartsky, M., & Carakostas, M. (1994). Acute Inhalation Toxicity Studies in Rats with a Respirable-Sized Experimental Carbon Fibre: Pulmonary Biochemical and Cellular Effects. *The Annals of Occupational Hygiene*, 38(7), 769–776.
- Warheit, D., Webb, T., Colvin, V., Reed, K., & Sayes, C. (2007). Pulmonary bioassay studies with nanoscale and fine-quartz particles in rats: toxicity is not dependent upon particle size but on surface characteristics. *Toxicological sciences*, 95(1), 270–280.
- Westphal, G., Rosenkranz, N., Brik, A., Weber, D., Föhring, I., Monsé, C., Kaiser, N., Hellack, B., Mattenklott, M., Brüning, T., Johnen, G., & Bünger, J. (2019). Multi-walled carbon nanotubes induce stronger migration of inflammatory cells in vitro than asbestos or granular particles but a similar pattern of inflammatory mediators. *Toxicology in Vitro*.
- WHO et al. (1997). The world health report 1997: conquering suffering; enriching humanity. In *The world health report 1997: conquering suffering; enriching humanity* (S. 162–162).
- Williams, L., & Zosky, G. (2019). The inflammatory effect of iron oxide and silica particles on lung epithelial cells. *Lung*, 197(2), 199–207.
- Winkler, A., Cherubini, A., Rusconi, F., Santo, N., Madaschi, L., Pistoni, C., Moschetti, G., Sarnicola, M., Crosti, M., Rosso, L., et al. (2022). Human airway organoids and microplastic fibers: A new exposure model for emerging contaminants. *Environment International*, 163, 107200.
- Witkamp, R., & Monshouwer, M. (2000). Signal transduction in inflammatory processes, current and future therapeutic targets: a mini review. *Veterinary Quarterly*, 22(1), 11–16.
- Wottrich, R., Diabaté, S., & Krug, H. (2004). Biological effects of ultrafine model particles in human macrophages and epithelial cells in mono- and co-culture. *International journal of hygiene and environmental health*, 207(4), 353–361.
- Wu, L., Mayo, L., Dunbar, J., Kessler, K., Ozes, O., Warren, R., & Donner, D. (2000). VRAP is an adaptor protein that binds KDR, a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Journal of Biological Chemistry*, 275(9), 6059–6062.
- Wu, R., Högberg, J., Adner, M., Ramos-Ramirez, P., Stenius, U., & Zheng, H. (2020). Crystalline silica particles cause rapid NLRP3-dependent mitochondrial depolarization

-
- and DNA damage in airway epithelial cells. *Particle and Fibre Toxicology*, 17(1), 1–20.
- Xie, S., Wu, H., Wang, Q., Cogswell, J., Husain, I., Conn, C., Stambrook, P., Jhanwar-Uniyal, M., & Dai, W. (2001). Plk3 functionally links DNA damage to cell cycle arrest and apoptosis at least in part via the p53 pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 276(46), 43305–43312.
- Xu, H., Dinsdale, D., Nemery, B., & Hoet, P. (2003). Role of residual additives in the cytotoxicity and cytokine release caused by polyvinyl chloride particles in pulmonary cell cultures. *Toxicological sciences*, 72(1), 92–102.
- Yamano, Y., Kagawa, J., Hanaoka, T., Takahashi, T., Kasai, H., Tsugane, S., & Watanabe, S. (1995). Oxidative DNA damage induced by silica in vivo. *Environmental research*, 69(2), 102–107.
- Yamashita, K., Yoshioka, Y., Higashisaka, K., Morishita, Y., Yoshida, T., Fujimura, M., Kayamuro, H., Nabeshi, H., Yamashita, T., Nagano, K., Abe, Y., Kamada, H., Kawai, Y., Mayumi, T., Yoshikawa, T., Itoh, N., Tsunoda, S., & Tsutsumi, Y. (2010). Carbon nanotubes elicit DNA damage and inflammatory response relative to their size and shape. *Inflammation*, 33(4), 276–80.
- Yanamala, N., Kisin, E., Gutkin, D., Shurin, M., Harper, M., & Shvedova, A. (2018). Characterization of pulmonary responses in mice to asbestos/asbestiform fibers using gene expression profiles. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 81(4), 60–79.
- Yang, M., & Zhang, M. (2019). Biodegradation of Carbon Nanotubes by Macrophages. *Frontiers in Materials*, 6(225), 2797–2807.
- Ye, J., & Shi, X. (2001). Gene expression profile in response to chromium-induced cell stress in A549 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 222(1), 189–197.
- Ye, S., Wu, Y., Hou, Z., & Zhang, Q. (2009). ROS and NF- κ B are involved in upregulation of IL-8 in A549 cells exposed to multi-walled carbon nanotubes. *Biochemical and biophysical research communications*, 379(2), 643–648.
- Yuan, X., Zhang, X., Sun, L., Wei, Y., & Wei, X. (2019). Cellular Toxicity and Immunological Effects of Carbon-based Nanomaterials. *Particle and Fibre Toxicology*, 16(1), 18.
- Zhan, Q. (2005). Gadd45a, a p53-and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 569(1-2), 133–143.
- Zhang, J., Chevali, V., Wang, H., & Wang, C. (2020). Current status of carbon fibre and carbon fibre composites recycling. *Composites Part B: Engineering*, 193, 108053.
- Zhou, Y., Su, W., & Cheng, Y. (2007). Fiber deposition in the tracheobronchial region: experimental measurements. *Inhalation Toxicology*, 19(13), 1071–8.
- Zhu, J., Blenis, J., & Yuan, J. (2008). Activation of PI3K/Akt and MAPK pathways regulates Myc-mediated transcription by phosphorylating and promoting the degradation of Mad1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(18), 6584–6589.

ANHANG A

CHEMIKALIEN UND INSTRUMENTE

A.1 Chemikalien

Tabelle A.1: Liste der verwendeten Chemikalien und der zugehörigen Hersteller.

Chemikalie	Hersteller
20x DNA Binding Dye Sample Loading Reagent	Fluidigm (San Francisco)
2x Assay Loading Reagent	Fluidigm (San Francisco)
2x TaqMan® PreAmp Master Mix	Applied Biosystems (Darmstadt)
Accutase®	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Accutase® (IBCS)	Gibco, Thermo Fisher (Dreieich)
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth (Karlsruhe)
CasyTon®	Roche (Mannheim)
Collagen (rat-tail)	Roche (Rotkreuz)
di-Kaliumhydrogenphosphat, $\geq 99\%$, p.A.	Roth (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO), $\geq 99,9\%$, p.A.	Sigma-Aldrich (Steinheim)
di-Natriumhydrogenphosphat, $\geq 99\%$, p.A.	Roth (Karlsruhe)
DMEM-HG	Sigma-Aldrich (Steinheim)
DMEM (IBCS)	Gibco, Thermo Fisher (Dreieich)
DNA Away	Roth (Karlsruhe)
DNA Suspension Buffer	TEKnova (Kristiansand)
DPBS (IBCS)	Gibco, Thermo Fisher (Dreieich)
Ethanol (80 % und 96 %)	Roth (Karlsruhe)
Exonuklease I (20 U/ μ L)	BioLabs (Frankfurt)
Exonuklease Reaktionspuffer	BioLabs (Frankfurt)
Fetales Kälberserum	Thermo Fisher (Dreieich)
Fetales Kälberserum (IBCS)	Gibco, Thermo Fisher (Dreieich)
Fibronectin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
HEPES, $\geq 99,5\%$, p.A.	Roth (Karlsruhe)
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Hydroxylapatit, high resolution	Calbiochem (Läufelfingen)
IFC Control Line Fluid	Fluidigm (San Francisco)
Kaliumchlorid, $\geq 99,5\%$, p.A.	Roth (Karlsruhe)
Kaliumhydrogenphosphat, $\geq 99,5\%$, p.A.	Roth (Karlsruhe)

Tabelle A.1: Liste der verwendeten Chemikalien und der zugehörigen Hersteller.

Chemikalie	Hersteller
KGM	Lonza (Basel)
L-Glutamin (IBCS)	Roth (Karlsruhe)
Lipopolysaccharid (IBCS)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Menadion	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Min-U-Sil 5	ITC, KIT
Natriumchlorid, $\geq 99,5\%$, p.A.	Roth (Karlsruhe)
Natriumdihydrogenphosphat, $\geq 99\%$, p.A.	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid, $\geq 99\%$, p.A.	Roth (Karlsruhe)
Natronlauge 1 N	Roth (Karlsruhe)
PCR Certified Water	TEKnova (Kristiansand)
Penicillin-Streptomycin (P: 5 U/L, S: 5 mg/mL)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Penicillin-Streptomycin (IBCS)	Gibco, Thermo Fisher (Dreieich)
Phorbol-12-myristat-13-acetat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Primer Fluidigm	Fluidigm (San Francisco)
RPMI-1640	Sigma-Aldrich (Steinheim)
RPMI-1640 (IBCS)	Gibco, Thermo Fisher (Dreieich)
RPMI-1640 mit HEPES (IBCS)	Gibco, Thermo Fisher (Dreieich)
RPMI + 25 mM HEPES	Thermo Fisher (Dreieich)
Salzsäure 0,1 N	Roth (Karlsruhe)
SDS 10 %	Roth (Karlsruhe)
SsoFast™ EvaGreen® Supermix mit Low ROX	BioRad (München)
TE-Puffer	TEKnova (Kristiansand)
Triton X-100 (10 %)	Thermo Fisher (Dreieich)
Triton X-100 (100 %, IBCS)	Roth (Karlsruher)
Trypsin, 0,25 % Trypsin in EDTA	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Trypsin, 0,25 % Trypsin in EDTA (IBCS)	Gibco, Thermo Fisher (Dreieich)

A.2 Puffer und Lösungen

Tabelle A.2: Liste und Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
PBS (pH 7,4)	0,1 M NaCl
	0,0045 M KCl
	0,007 M Na ₂ HPO ₄
	0,003 M KH ₂ PO ₄
PBS-EDTA (pH 7,4)	0,5 mM EDTA in PBS
Trypsin	0,25 % Trypsin in PBS-EDTA
Coating-Mischung	500 μ L Fibronektin (1 mg/mL in H ₂ O bidest.)
	500 μ L Collagen (3 mg/mL in 0,2 % Essigsäure)

Tabelle A.2: Liste und Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
	500 μ L BSA (1mg/ml in H ₂ O bidest.)
Alkalische Lösung	2,6252 g NaCl
	1 mL NaOH, 1 M (A549-/BEAS-2B-Zellen)
	800 μ L NaOH, 1 M (CCD-33Lu-Zellen)
	1 ml Na ₂ HPO ₄ , 0,5 M auffüllen auf 50 mL mit H ₂ O (bidest.)
Hydroxylapatit-Lösung	0,05 g Apatit in 0,5 mL 0,01 M NaP (pro Säule)
0,15 M KP-Puffer	15,3 mL KH ₂ PO ₄ , 0,5 M
	14,7 mL K ₂ HPO ₄ , 0,5 M auffüllen auf 100 mL mit H ₂ O (bidest.)
0,35 M KP-Puffer	37,5 mL KH ₂ PO ₄ , 0,5 M
	34,3 mL K ₂ HPO ₄ , 0,5 M auffüllen auf 100 mL mit H ₂ O (bidest.)
0,5 M KP-Puffer	51 mL KH ₂ PO ₄ , 0,5 M
	49 mL K ₂ HPO ₄ , 0,5 M auffüllen auf 100 mL mit H ₂ O (bidest.)
0,1 M NaP-Puffer	1,96 mL Na ₂ HPO ₄ , 0,5 M
	2,04 mL NaH ₂ PO ₄ , 0,5 M auffüllen auf 200 mL mit H ₂ O (bidest.)

A.3 Kits

Tabelle A.3: Liste der verwendeten Kits und zugehörigen Hersteller.

Kit	Hersteller
CytoTox-ONE™	Promega (Madison)
IL-8 Human Uncoated ELISA Kit (IBCS)	Invitrogen (Waltham)
Keratinocyte Growth Medium BulletKit™ (KGM)	Lonza (Basel)
LDH Test Kit (IBCS)	Roche (Mannheim)
NucleoSpin® RNA Plus Kit	Macherey-Nagel (Düren)
qScript™ cDNA Synthesis Kit	QuantaBio (Beverly)

A.4 Instrumente und Software

Tabelle A.4: Liste der verwendeten Instrumente und Software, sowie der entsprechenden Hersteller.

Instrument/Software	Hersteller
AeroneLab Nebulizer System	Aerogen (Galway)

Tabelle A.4: Liste der verwendeten Instrumente und Software, sowie der entsprechenden Hersteller.

Instrument/Software	Hersteller
Autoklav D-150	Perkin Elmer (Waltham)
Biofreezer Herafreeze Top	Thermo Scientific (Langenselbold)
Biomark	Fluidigm (San Francisco)
Brutschrank Heracell 150i	Thermo Scientific (Langenselbold)
Brutschrank Thermo Scientific BB15 (IBCS)	Thermo Scientific (Langenselbold)
Casy® TTC Cell Counter & Analyzer System	Roche (Mannheim)
Centrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Centrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg)
Centrifuge 5417R (IBCS)	Eppendorf (Hamburg)
Centrifuge (IBCS)	Heraeus Christ (Hanau)
Eismaschine	Ziegra (Isernhagen)
Eppendorf-Pipette Research® Plus	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf-Pipette Reference® 2	Eppendorf (Hamburg)
Feinwaage BP61S	Sartorius (Göttingen)
Feinwaage LE26P	Sartorius (Göttingen)
Galaxy Mini Centrifuge	VWR International (Darmstadt)
Glaspipetten (1, 2, 5, 10, 20 mL)	Roth (Karlsruhe)
Heißluftsterilisator	Memmert (Büchenbach)
IFC Controller HX	Fluidigm (San Francisco)
Kühl- und Gefrierschränke	Bosch (Gerlingen)
Laborspülmaschine Professional G7883	Miele (Gütersloh)
Megafuge 1.0	Heraeus (Hanau)
MicroCentrifuge	Roth (Karlsruhe)
Mikroskop Axiovert 40C	Carl Zeiss AG (Feldbach)
Mikroskop Leica DMIL (IBCS)	Leica (Wetzlar)
Multipipette Distriman	Gilson (Limburg an der Lahn)
Multipipette Pipete Lite XLS®	Mettler Toledo (Gießen)
NanoQuant Platte	Tecan Group (Crailsheim)
Nebulizer Unit (4,0 - 6,0 VMD)	Aerogen (Galway)
Nebulizer Unit (10,0 VMD)	Aerogen (Galway)
Neubauer Zählkammer	Brand (Wertheim)
PCR Workstation Pro	Peqlab (Erlangen)
PCR Workstation	VWR International (Darmstadt)
pH-Meter 3210	WTW (Weilheim)
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Plattenlesegerät VERSAMax (IBCS)	Molecular Devices (San José)
Reinstwasseranlage Milli-Q	Merck Millipore (Darmstadt)
Software "Fluidigm Real Time PCR Analysis"	Fluidigm (San Francisco)
Software "GenEx"	MultiD Analyses (Göteborg)
Software "Tecan iconcontrol 1.10"	Tecan Group (Crailsheim)

Tabelle A.4: Liste der verwendeten Instrumente und Software, sowie der entsprechenden Hersteller.

Instrument/Software	Hersteller
Software "Vitrocell Monitor"	Vitrocell (Waldkirch)
Sonifier W-250 D	Branson Ultrasonics (Danbury)
Sonifier S-450 D	Branson Ultrasonics (Danbury)
Sterilwerkbank HERAsafeKS	Thermo Scientific (Langenselbold)
Sterilwerkbank HERAsafe 18/2 (IBCS)	Thermo Scientific (Langenselbold)
T100 Thermal Cycler	BioRad (München)
Tecan Infinite M200 PRO	Tecan Group (Crailsheim)
Tischzentrifuge für EppendorfgeläÙe	VWR International (Darmstadt)
Ultraschallbad Sonorex Super RK 255H	Bandelin (Berlin)
Vitrocell Automated Exposure Station	Vitrocell (Waldkirch)
Vitrocell Cloud 12/12	Vitrocell (Waldkirch)
Vortex-Genie 2T	Scientific Industries (New York)
Waage VWR 1502	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad	Memmert (Schwabach)
Wasserbad (IBCS)	P-D Industriegesellschaft (Dresden)
Zetasizer NanoZS	Malvern Panalytical (Herrenberg)

A.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle A.5: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien und der zugehörigen Hersteller.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
12-Well-Platten	Corning (Amsterdam)
2,5 mL Sample Cups	Perkin Elmer (Waltham)
5 mL round bottom tube	Corning (Amsterdam)
6-Well-Platten	Corning (Amsterdam)
8er Deckelkette (flach)	Sarstedt (Nümbrecht)
96-Well-Platte	TPP (Trasadingen)
Balzers™ AT Quarzkristalle	Colnatec (Gilbert)
Casy-Cups	Roche (Mannheim)
Dynamic Array IFC	Fluidigm (San Francisco)
Einmalspritzen (5 und 10 mL)	Terumo (Eschborn)
Eppendorf Reaktionsgefäße (1,5 und 2 mL)	Sarstedt (Nümbrecht)
Glasfilterfritte 0,7 cm	Whatman (Maidstone)
Glasfilterfritte 1 cm	Whatman (Maidstone)
Handschuhe (Latex)	VWR International (Darmstadt)
Handschuhe (Nitril)	Ansell (Richmond)
Handschuhe (Nitril, IBCS)	MedCare (Prag)
Kryoröhrchen mit Gewinde (1,8 mL)	Sarstedt (Nümbrecht)
Küvetten (Makro, PS)	LLG (Meckenheim)
Multiply® Pro-Gefäße (0,5 mL)	Sarstedt (Nümbrecht)
Multiply®-µ-Strip (0,2 ml-Kette)	Sarstedt (Nümbrecht)
Parafilm	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Pipettenspitzen (10 µL)	Mettler-Toledo (Gießen)
Pipettenspitzen (10 µL)	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettenspitzen (1-200 µL)	Ratiolab (Dreieich)
Pipettenspitzen (100-1000 µL)	Brandt (Wertheim)
Pipettenspitzen (5 mL)	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen Deckworks (10 µL, IBCS)	Corning (Amsterdam)
Pipettenspitzen Deckworks (1-200 µL, IBCS)	Corning (Amsterdam)
Pipettenspitzen Deckworks (100-1000 µL, IBCS)	Corning (Amsterdam)
Pipettenspitzen Deckworks (5 mL, IBCS)	Corning (Amsterdam)
Plastik-Zentrifugenröhrchen (15, 50 mL)	Sarstedt (Nümbrecht)
Plastik-Zentrifugenröhrchen (15, 50 mL, IBCS)	Greiner (Kremsmünster)
Reagenzgläser 75x12mm	Hecht Assistent (Sondheim v.d.R.)
Schraubdeckelgläser (10 mL)	HERAUSFINDEN
Sterilfilter	VWR International (Darmstadt)
Sterilindikatorband (Autoklav)	Roth (Karlsruhe)
Sterilindikatorband (Heißluftsterilisator)	Roth (Karlsruhe)
TEM-Gitternetze (400 mesh, Cu)	Ted Pella (Redding)

Tabelle A.5: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien und der zugehörigen Hersteller.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Transwell Einsätze (6- und 12-Well)	Corning (Amsterdam)
Wägeschiffchen	Roth (Karlsruhe)
Zellkulturflaschen (25 und 75 cm ²)	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturflaschen (25 und 75 cm ² , IBCS)	Greiner (Kremsmünster)
Zellkulturschalen (∅ 3, 6, 10 und 15 cm)	Sarstedt (Nümbrecht)

ANHANG B

ERGÄNZENDE DATEN

B.1 Differenzierung von THP-1-Zellen

Die Differenzierung der THP-1-Zellen zu dTHP-1 wurde unter den in Tabelle B.1 dargestellten Bedingungen durchgeführt. Es erfolgte zunächst eine viertägige Inkubation PMA, gefolgt von einer dreitägigen Nachinkubation mit PMA-freiem Medium.

Tabelle B.1: Differenzierungsschema für THP-1-Zellen in unterschiedlichen Ansatzgrößen.

Schale [cm]	6	10	15
Volumen Medium [mL]	5	12	20
Ausgestreute Zellzahl [10^6]	2	5,5	14,5
Erhaltene Zellzahl [10^6]	ca. 0,4	ca. 1,3	ca. 3,3
Volumen PMA (10 μ M) [μ L]	24,3	58,3	97,2
Zelldichte [$10^5/\text{cm}^2$]	0,94	0,93	0,93

B.2 Genliste der HT RT-qPCR

Die in der HT RT-qPCR verwendeten Gene sind in Tabelle B.2 nach den jeweiligen Clustern geordnet dargestellt.

Tabelle B.2: Liste der in der HT-RT-qPCR verwendeten Gene, sortiert nach Genclustern.

Referenz-gene	Fremdstoff-metabolismus	Inflammation	Fibrose	Metall-homöostase	Oxidative Stressant-wort	Apoptotische Faktoren und Zellzyklusregulatoren	DNA-Schadensantwort und -Reparatur
<i>ACTB</i>	<i>AHR</i>	<i>CCL22</i>	<i>ACTA2</i>	<i>FTTH1</i>	<i>CAT</i>	<i>APAF1</i>	<i>APEX1</i>
<i>B2M</i>	<i>CYP1A1</i>	<i>COX2</i>	<i>COL1A1</i>	<i>MT1X</i>	<i>G6PD</i>	<i>BAX</i>	<i>ATM</i>
<i>GAPDH</i>	<i>NQO1</i>	<i>IL-1A</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>MT2A</i>	<i>GCLC</i>	<i>BBC3</i>	<i>ATR</i>
<i>GUSB</i>		<i>IL-1B</i>	<i>FNI</i>	<i>SLC30A1</i>	<i>GPX1</i>	<i>BCL2</i>	<i>BRCA1</i>
<i>HPRT1</i>		<i>IL-6</i>	<i>OPN</i>	<i>TFR3</i>	<i>GPX2</i>	<i>BTRC</i>	<i>BRCA2</i>
		<i>IL-8</i>	<i>PDGFA</i>		<i>GSR</i>	<i>CCND1</i>	<i>DDB1</i>
		<i>TNF-A</i>	<i>TGF-B</i>		<i>HMOX1</i>	<i>CDKN1A</i>	<i>DDB2</i>
			<i>TMPI</i>		<i>HSPA1A</i>	<i>CDKN1B</i>	<i>DDIT3</i>
			<i>VIM</i>		<i>KEAP1</i>	<i>CDKN2B</i>	<i>ERCC1</i>
					<i>MAP3K5</i>	<i>E2F1</i>	<i>ERCC4/XPF</i>
					<i>NEF2L2</i>	<i>EGFR</i>	<i>ERCC5/XPG</i>
					<i>NEKB1</i>	<i>JUN</i>	<i>GADD45A</i>
					<i>NEKB2</i>	<i>MDM2</i>	<i>LIG1</i>
					<i>NEKBIA</i>	<i>MYC</i>	<i>LIG3</i>
					<i>PRDX1</i>	<i>PLK3</i>	<i>MGMT</i>
					<i>SOD1</i>	<i>PMAIP1</i>	<i>MLH1</i>
					<i>SOD2</i>	<i>PPM1D</i>	<i>MSH2</i>
					<i>TXN</i>	<i>SIRT2</i>	<i>PARP1</i>
					<i>TXNRD1</i>	<i>TNFRSF10B</i>	<i>PCNA</i>
						<i>VEGFA</i>	<i>POLQ</i>
						<i>XIAP</i>	<i>POLD1</i>
							<i>RAD50</i>
							<i>RAD51</i>
							<i>RRM2B</i>
							<i>XPA</i>
							<i>XPC</i>

B.3 Detaillierte Ergebnisse der Genexpressionsanalysen

B.3.1 Genexpressionsanalysen nach Quarz-Exposition



Abbildung B.1: Schematische Darstellung der Genexpressionsprofile von A549-Monokulturen nach ALI- und submerser Exposition gegenüber Min-U-Sil5 als Heatmap. Eine rote Färbung signalisiert eine Induktion, eine blaue Färbung eine Repression. Bei ALI-Deposition ist der Mittelwert ± SD aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt. n.q.: nicht quantifizierbar.

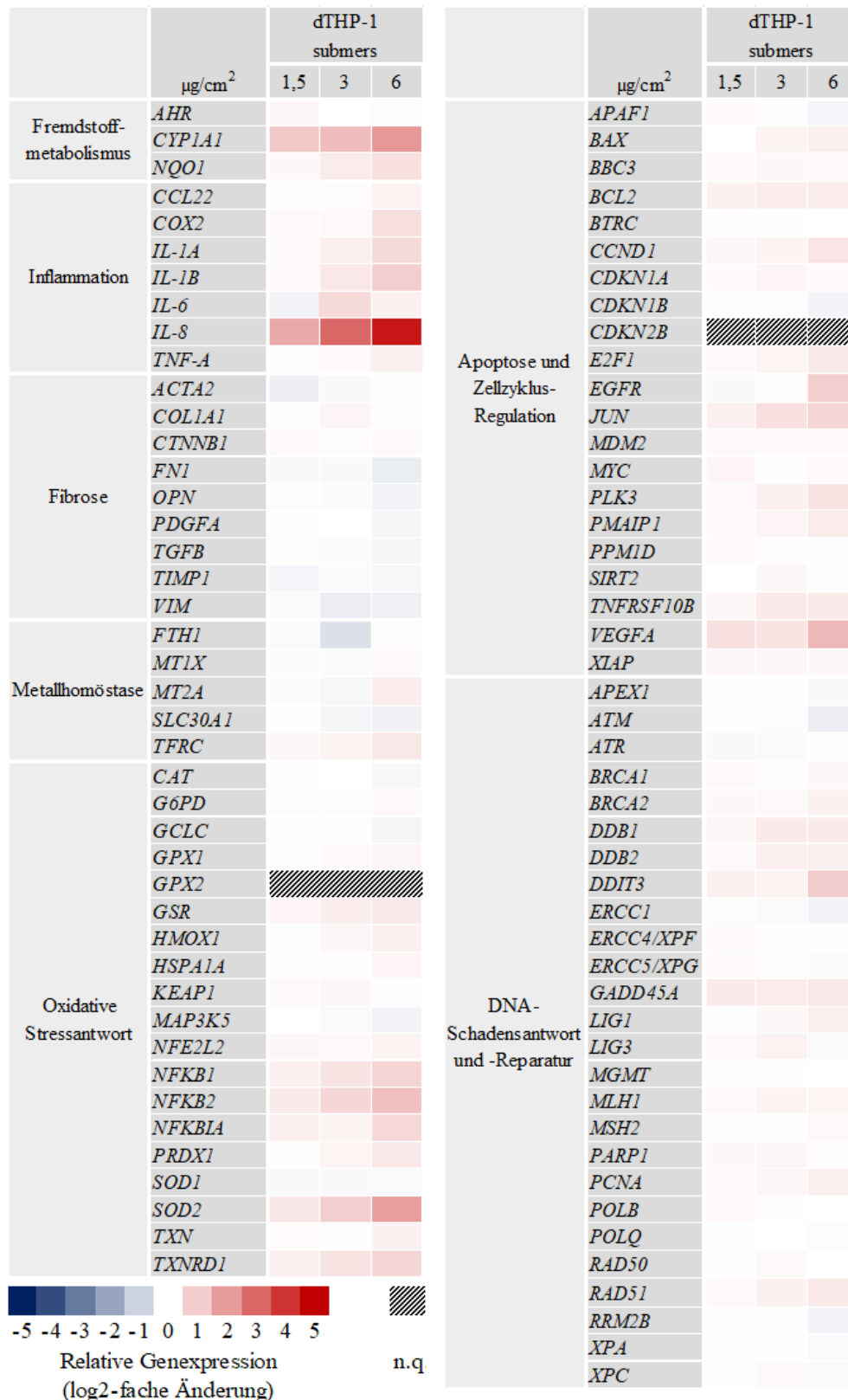


Abbildung B.2: Schematische Darstellung der Genexpressionsprofile von dTHP-1-Monokulturen nach submerser Exposition gegenüber Min-U-Sil5 als Heatmap. Eine rote Färbung signalisiert eine Induktion, eine blaue Färbung eine Repression. Bei ALI-Deposition ist der Mittelwert ± SD aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt. n.q.: nicht quantifizierbar.

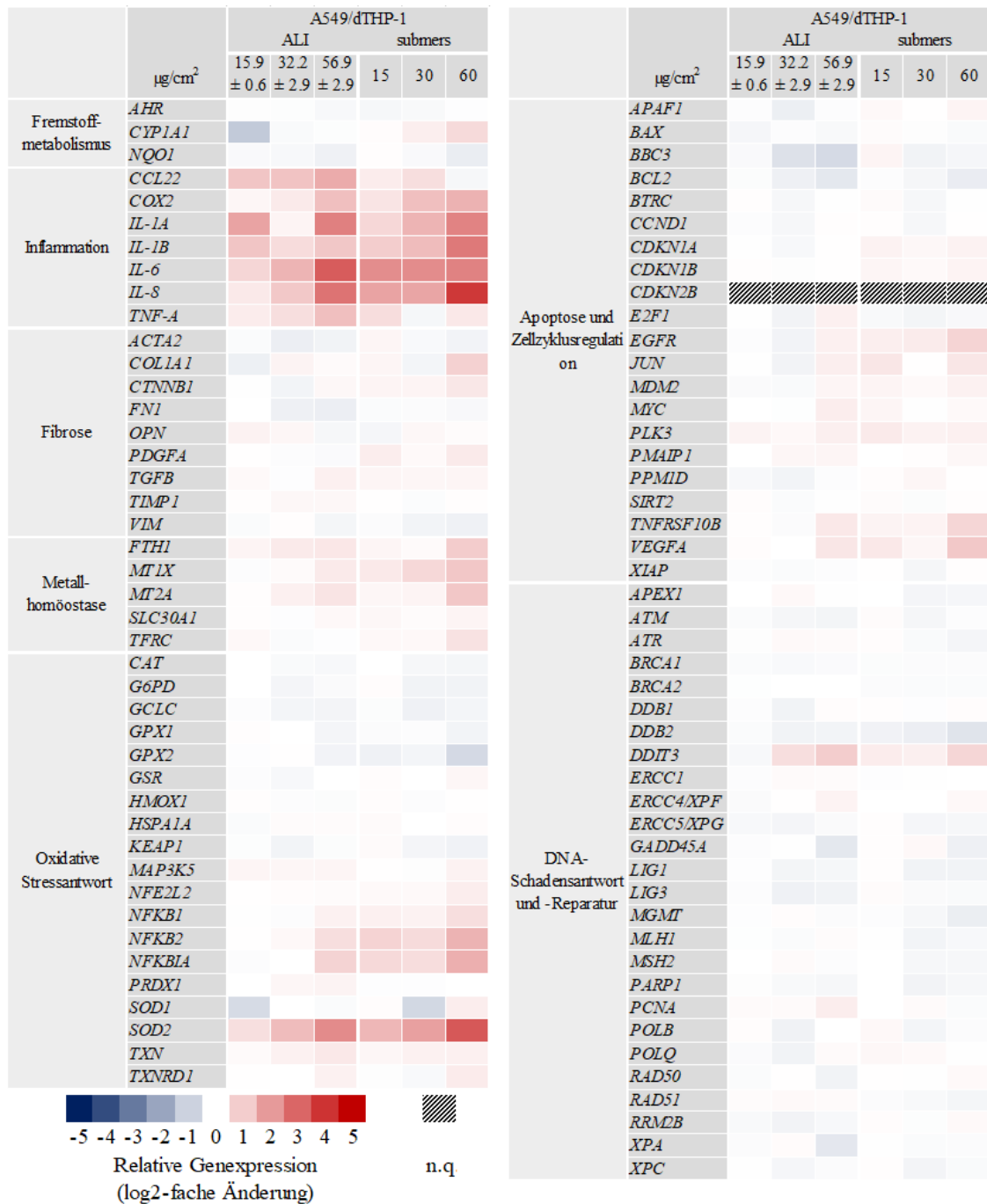


Abbildung B.3: Schematische Darstellung der Genexpressionsprofile von A549/dTHP-1-Cokulturen nach ALI- und submerser Exposition gegenüber Min-U-Sil5 als Heatmap. Eine rote Färbung signalisiert eine Induktion, eine blaue Färbung eine Repression. Bei ALI-Deposition ist der Mittelwert ± SD aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt. n.q.: nicht quantifizierbar.

B.3.2 Genexpressionsanalysen nach Carbonfaser-Exposition



Abbildung B.4: Schematische Darstellung der zeitabhängigen Genexpressionsprofile von A549/dTHP-1-Cokulturen nach ALI-Exposition gegenüber $56,9 \pm 2,94 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Min-U-Sil5 als Heatmap. Eine rote Färbung signalisiert eine Induktion, eine blaue Färbung eine Repression. Bei ALI-Deposition ist der Mittelwert \pm SD aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt. n.q.: nicht quantifizierbar.



Abbildung B.5: Schematische Darstellung der Genexpressionsprofile von BEAS-2B-Mono- und BEAS-2B/dTHP-1-Cokulturen nach ALI-Exposition gegenüber mechanisch behandelten CF als Heatmap. Eine rote Färbung signalisiert eine Induktion, eine blaue Färbung eine Repression. n.q.: nicht quantifizierbar.



Abbildung B.6: Schematische Darstellung der Genexpressionsprofile von BEAS-2B-Mono- und BEAS-2B/dTHP-1-Cokulturen nach ALI-Exposition gegenüber thermisch-mechanisch behandelten CF als Heatmap. Eine rote Färbung signalisiert eine Induktion, eine blaue Färbung eine Repression. n.q.: nicht quantifizierbar.

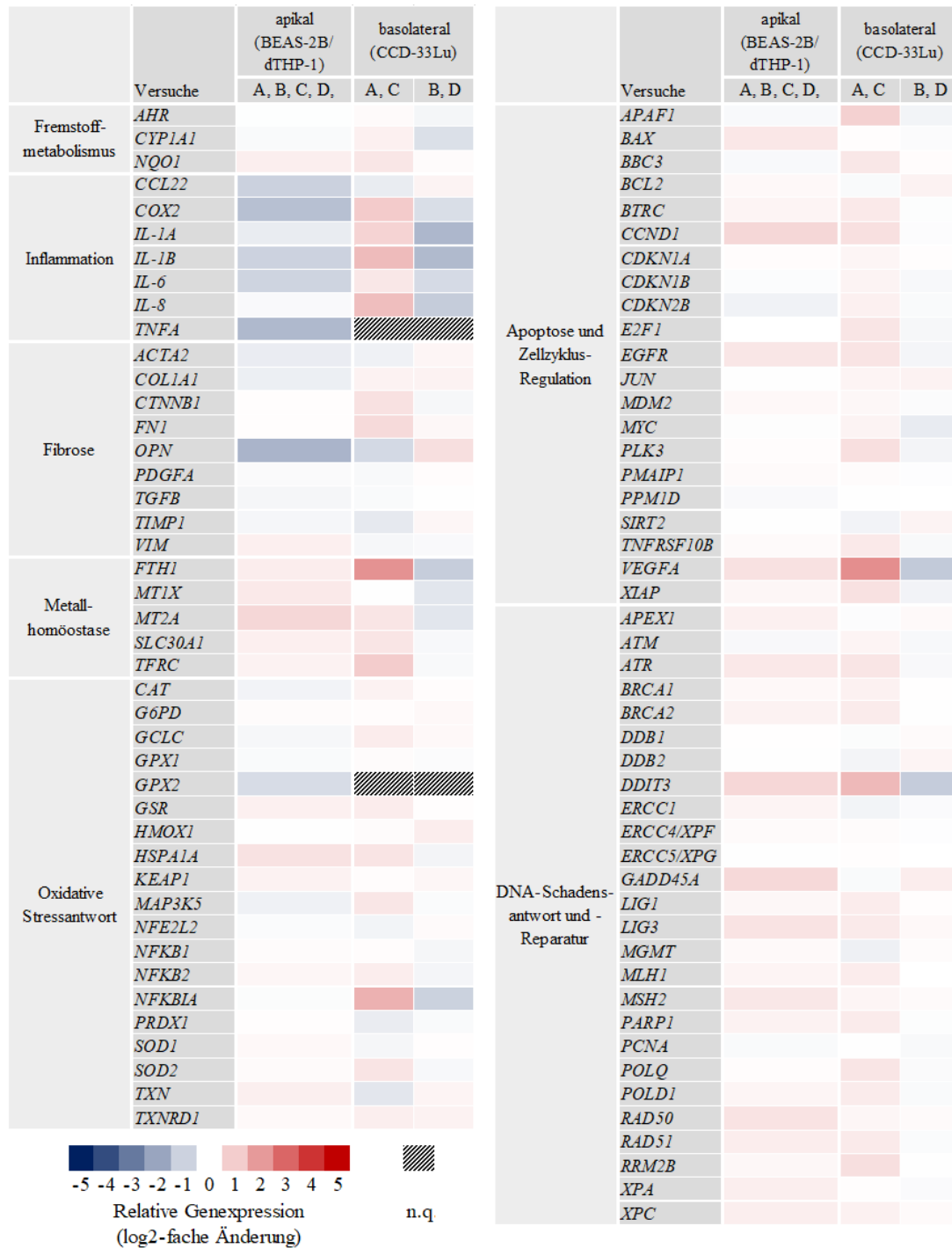


Abbildung B.7: Schematische Darstellung der Genexpressionsprofile von BEAS-2B/dTHP-1/CCD-33Lu-Triplekulturen nach ALI-Exposition gegenüber thermisch-mechanisch behandelten CF als Heatmap. Die Zellen wurden 1 h mit CF exponiert und 23 h nachinkubiert. Das apikale und basolaterale Kompartiment sind getrennt dargestellt, zusätzlich die Versuche A/C und B/D im basolateralen Kompartiment. Eine rote Färbung signalisiert eine Induktion, eine blaue Färbung eine Repression. n.q.: nicht quantifizierbar.

ANHANG C

PUBLIKATIONSLISTE

Publikationen in Fachzeitschriften

Hufnagel, M., Neuberger, R., Wall, J., Link, M., **Friesen, A.**, Hartwig, A. (2021). Impact of Differentiated Macrophage-Like Cells on the Transcriptional Toxicity Profile of CuO Nanoparticles in Co-Cultured Lung Epithelial Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 5044.

Friesen, A., Fritsch-Decker, S., Hufnagel, M., Mühlhopt, S., Stapf, D., Hartwig, A., Weiss, C. (2022). Comparing α -Quartz-Induced Cytotoxicity and Interleukin-8 release in Pulmonary Mono- and Co-Cultures Exposed under Submerged and Air-Liquid Interface Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), 6412.

Friesen, A., Fritsch-Decker, S., Hufnagel, M., Mühlhopt, S., Stapf, D., Hartwig, A., Weiss, C. (2022). Gene Expression Profiling of Mono- and Co-Culture Models of the Respiratory Tract Exposed to Crystalline Quartz under Submerged and Air-Liquid Interface Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14), 7773.

Publikationen in Vorbereitung

Friesen, A., Fritsch-Decker, S., Mühlhopt, S., Quarz, C., Stapf, D., Hartwig, A., Weiss, C. (voraussichtl. 2022). Comparing the Toxicological Responses of Pulmonary Air-Liquid Interface Models upon Exposure to Differentially Treated Carbon Fibers.

Vorträge auf Fachtagungen

Friesen, A., Hufnagel, M., Fritsch-Decker, S., Weiss, C., Hartwig, A.: Transcriptional toxicity profiling of lung cell cultures exposed to crystalline quartz at an air-liquid interface. Meeting of the German Society for Environmental Mutation Research, Young Scientist Workshop, 15.-25.03.2021, online.

Friesen, A., Fritsch-Decker, S., Mülhopt, S., Weiss, C., Stapf, D., Hartwig, A.: Toxicological evaluation of carbon fibre dusts after air-liquid interface exposure of lung cell cultures. 7th German Pharm-Tox Summit, 7.-10.03.2022, Bonn/online.

Posterbeiträge auf Fachtagungen

Friesen, A., Fritsch-Decker, S., Weiss, C., Hartwig, A.: CarbonFibreCycle – AP-5: Toxikologische Untersuchungen an Lungenzellmodellen nach Carbonfaser-Exposition. Clustertreffen der NanoCare4-Förderung des BMBF, 21.09.2021, online.

Friesen, A., Poselenova, K., Hufnagel, M., Fritsch-Decker, S., Diabate, S., Weiss, C., Hartwig, A.: Pulmonary toxicity of crystalline quartz after air-liquid interface exposure of alveolar and bronchial mono- and cocultures. Nanotox 2021, 19.-22.04.2021, Edinburgh (UK)/online.

Preise und Auszeichnungen

GT Vortragspreis, 7th German Pharm-Tox Summit, 7.-10.03.2022, Bonn/online.

DANKSAGUNG

Auf dieser Reise, die sich Promotion nennt, wurde ich von vielen Leuten begleitet.

Mein erster und größter Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. Andrea Hartwig. Andrea, ich bedanke mich bei dir für die Aufnahme in den Arbeitskreis, für die Möglichkeit, meine Promotion bei dir durchzuführen, das spannende Thema, das ich mit dem CFC-Projekt hatte und die gute Betreuung. Danke auch für deine Ratschläge in fachlichen und organisatorischen Dingen und für das Beantworten vieler, vieler Fragen, für die Hilfe bei der Verfassung von Dissertation, Publikationen, Berichten und Postern.

Als nächstes möchte ich mich bei meinem Arbeitskreis bedanken. Ich bin nicht in den Lebensmittelchemie-Adel hineingeboren worden, ich wurde nach meinem Master-Abschluss in der Chemischen Biologie quasi adoptiert. Trotzdem habe ich mich seit meinem ersten Arbeitstag nicht ein einziges Mal fehl am Platz gefühlt. So ein warmes Willkommen durch alle am IAB konnte ich mir in meinen wildesten Träumen nicht vorstellen. Dafür kann ich nur das größte Dankeschön sagen, das mir einfällt! Beginnen möchte ich hier mit meinem Dank bei Matze, der mich von Anfang an unter seine Fittiche genommen hat, mir während meiner gesamten Zeit immer mit Rat und Tat und einem offenen Ohr zur Seite gestanden und meine Dissertation korrigiert hat. Weiterhin bedanke ich mich besonders bei meinen BMBF-Buddies Johanna und Ronja und dem Rest des Mittags- und Kaffeepausen-Teams, Franzi, Martin und Tatjana, für die lustigsten Kaffeepausen, die leckersten Cupcakes, die wildesten Among-Us- und Skribbl-Schlachten, die gemütlichste Couch und die moralische Unterstützung, wenn es mal doch schwieriger wurde. Natürlich möchte ich mich auch bei allen anderen aus dem AK Hartwig bedanken, Ehemaligen und Neuzugängen, also ein dickes Dankeschön auch an Sandra, Paul, Frau Köberle, Sonya, Tizia, Sabine, Vivi, Wera und Doro. Ohne euch alle hätte ich mit Sicherheit irgendwann das Handtuch geworfen!

Natürlich besteht das IAB nicht nur aus dem AK Hartwig. Viele lustige Stunden habe ich auch zusammen mit Leuten aus dem AK Bunzel und AK Scherf verbracht (Ich werde jetzt nicht alle Namen aufzählen, da es nur peinlich wird, wenn ich jemanden vergesse). Aber danke für die schöne Zeit bei Feierabendbier, Tour de Chambre, Singstar-Abend, Badminton-Turnier, Institutsausflügen und auch einfach für die kurzen Gespräche auf dem Gang oder in der Bürotür. Das Institut wäre unvorstellbar ohne euch.

Im CFC-Projekt war ich ebenfalls nicht allein. Ein großer Dank gilt den Kolleginnen und Kollegen aus der AG Weiss, allen voran Dr. PD Carsten Weiss, meinem Koreferrenten, für seine Ratschläge in Projekt- und Publikationsdingen, Susanne für die tolle Zusammenarbeit im Rahmen des Projektes, und außerdem Dorit, Silvia und Christina für einige sehr unterhaltsame Mittagspausen und die stetige Unterstützung im Labor. Weiterhin möchte ich mich beim ITC-Team bedanken, bei Sonja für die Projektkoordination von CFC und ihr

stetiges offenes Ohr für meine Fragen, und außerdem bei Theresa und Marco für die gute Zusammenarbeit bei den ALI-Expositionen.

Ich möchte mich auch besonders bei meinen vier großartigen Masterandinnen bedanken, Kristina, Ilona, Jessi und Caro. Ich hoffe, ihr konntet viel aus eurer Zeit mit mir mitnehmen. Ich persönlich habe von euch auf jeden Fall viel gelernt und die Zusammenarbeit mit euch sehr genossen.

Abschließen möchte ich meine Danksagung mit den Menschen, die mich hinter den Kulissen unterstützt haben:

Dazu zählt Bettina, die mich, von Düsseldorf aus, mit einem offenen Ohr und ihrer verrückten Art unterstützt hat. Dazu zählt meine ChemBio-Kollegin Maris, die gleichzeitig am Campus Nord promoviert hat, für viele schöne Momente bei Spieleabenden, im Gospelchor und bei Mittagspausen in der Kantine. Dazu zählen aber auch vor allem meine Eltern und meine Schwester Anja, die für mich, ebenfalls aus dem fernen Düsseldorf, eine große Stütze waren. Euer "Na, wie geht's deinen Zellen?" hat mich häufig aufgemuntert und eure Unterstützung selbst in schwierigen Zeiten nicht den Mut verlieren lassen. Ich habe euch sehr lieb.

Zum Schluss bedanke ich mich bei Philipp. Danke, dass du mich durchweg unterstützt hast. Danke, dass du mich aufgefangen hast, wenn ich schwierige Momente hatte. Danke für deine Geduld und Liebe. Und danke für die kontinuierliche Versorgung mit Tee, Pudding, Bananenbrot und Waffelröllchen. Ich hätte diese Reise nicht ohne dich geschafft.