

Untersuchungen des Einflusses metallbasierter Nanopartikel und *Nanowire*
auf die Genexpression sowie die DNA-Integrität in pulmonalen
Zellkulturmodellen des Menschen und der Ratte

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

M.Sc. Ronja Neuberger

1. Referentin: Prof. Dr. Andrea Hartwig

2. Referentin: Prof. Dr. Katharina Scherf

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2022

Eidesstattliche Erklärung

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 06.12.2022

Ronja Neuberger

*No woman burdens her mind with small matters
unless she has some very good reason for doing so.*

Frei nach Sir Arthur Conan Doyle

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	7
2.1	Nanomaterialien	7
2.1.1	Aufnahme von Nanomaterialien	8
2.1.2	Partikel und <i>Wire</i>	9
2.2	Genotoxizität von Nanomaterialien	11
2.3	Kupfermaterialien	13
2.4	Nickelmaterialien	14
2.5	Silbermaterialien	15
2.6	Ceroxid, Titandioxid	16
2.7	Kohlenstoffnanoröhren	18
2.8	Zellkulturmodelle	18
2.9	Vergleichbarkeit von Mensch und Ratte in der toxikologischen Untersuchung von Nanomaterialien	19
3	Fragestellung	22
4	Material und Methoden	24
4.1	Nanomaterialien	24
4.1.1	Dispergieren der Nanomaterialien	25
4.1.2	Physikochemische Eigenschaften	25
4.1.2.1	Elektronenmikroskopie	25
4.1.2.2	Dynamische Lichtstreuung	26
4.1.2.3	Zeta-Potential	26
4.1.2.4	Löslichkeit	26
4.1.2.5	Reinheit	27
4.1.2.6	Endotoxintest	27
4.2	Zellkulturexperimente	27
4.2.1	Zelllinien und Kultivierung	27

4.2.2	Inkubation mit Nanomaterialien	29
4.2.3	Bestimmung der Zytotoxizität mittels ATP-Assay	30
4.2.4	Ermittlung der intrazellulären Ionenfreisetzung der Nanomaterialien in den verwendeten Zelllinien	30
4.2.5	Untersuchung der intrazellulären Ionenverteilung	30
4.2.6	Genexpressionsanalysen mittels <i>High-Throughput</i> RT-qPCR	31
4.2.6.1	RNA-Isolierung und -Quantifizierung	32
4.2.6.2	cDNA-Synthese	32
4.2.6.3	Präamplifikation	33
4.2.6.4	Primer- und Probenvorbereitung	34
4.2.6.5	Dynamic Array	34
4.2.6.6	Datenanalyse	35
4.2.7	Etablierung eines Gen-Sets zur Untersuchung der Genexpression der Spezies <i>rattus norvegicus</i> sowie Ergänzung des bestehenden Gen-Sets um inflammatorische und fibrotische Marker	35
4.2.7.1	Bewertung der Primer-Spezifität	36
4.2.7.2	Bewertung der Primer-Effizienz	36
4.2.8	Quantifizierung von DNA-Strangbrüchen	37
4.2.9	Durchflusszytometrische Bestimmung der Induktion von Mikrokernen	38
4.2.10	Statistik	40

5 Ergebnisse und Diskussion 41

5.1	Etablierung eines Gen-Sets zur Untersuchung der Genexpression der Spezies <i>rattus norvegicus</i> sowie Ergänzung des bestehenden humanen Gen-Sets um inflammatorische und fibrotische Marker	41
5.1.1	Auswahl der Gene und Design der Primerpaare	41
5.1.2	Untersuchung der Primer-Spezifität und der Primer-Effizienz	42
5.2	Kupferverbindungen	44
5.2.1	Materialcharakterisierung	44
5.2.2	Zellkulturexperimente – Auswahl der Zellkulturmodelle	47
5.2.3	Zytotoxizität	48
5.2.4	Bioverfügbarkeit und intrazelluläre Verteilung	50
5.2.5	Genexpressionsanalysen	51
5.2.6	Untersuchungen zur Genotoxizität	58
5.2.7	Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse aus den Untersuchungen der Kupferverbindungen	62
5.3	Nickelverbindungen	66
5.3.1	Materialcharakterisierung	66
5.3.2	Zytotoxizität	68

5.3.3	Bioverfügbarkeit und intrazelluläre Verteilung	69
5.3.4	Genexpressionsanalysen	70
5.3.5	Untersuchungen zur Genotoxizität	74
5.3.6	Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse aus den Untersuchungen der Nickelverbindungen	76
5.4	Silberverbindungen	79
5.4.1	Materialcharakterisierung	79
5.4.2	Zytotoxizität	80
5.4.3	Bioverfügbarkeit und intrazelluläre Verteilung	82
5.4.4	Genexpressionsanalysen	83
5.4.5	Untersuchungen zur Genotoxizität	86
5.4.6	Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse aus den Untersuchungen der Silberverbindungen	89
5.5	CeO ₂ NP, TiO ₂ NP und CNT	93
5.5.1	Materialcharakterisierung	94
5.5.2	Zytotoxizität	95
5.5.3	Bioverfügbarkeit und intrazelluläre Verteilung	96
5.5.4	Genexpressionsanalysen	97
5.5.5	Untersuchungen zur Genotoxizität	101
5.5.6	Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse aus den Untersuchungen der CeO ₂ NP, TiO ₂ NP und CNT	103
6	Zusammenfassende Diskussion	107
7	Literaturverzeichnis	122
8	Anhang	135
8.1	Verwendete Materialien	135
8.1.1	Verwendete Chemikalien	135
8.1.2	Verwendete Lösungen und Puffer	139
8.1.3	Verwendete Verbrauchsmaterialien	141
8.1.4	Verwendete Kits	142
8.1.5	Verwendete Geräte, Software und Geräteeinstellungen	143
8.2	Ergänzende Daten	147
8.3	Etablierung zusätzlicher Primer für die HT RT-qPCR	150
8.3.1	Inflammatorische und fibrotische Marker zur Ergänzung des humanen Gen-Sets	150
8.3.1.1	Ausgewählte Gene und codierte Proteine	150

8.3.1.2	Primer-Sequenzen	151
8.3.1.3	Bestimmung der Spezifität und Effizienz der Primer-Paare	152
8.3.2	Etablierung eines Gensets zur Untersuchung der Genexpression in Rattenzellen	153
8.3.2.1	Ausgewählte Gene und codierte Proteine	153
8.3.2.2	Primer-Sequenzen des Gen-Sets zur Untersuchung von Rattenzellen	156
8.4	Genexpressionsanalysen	165
8.4.1	Untersuchte Gene – Humane Proben	165
8.4.1.1	Vollständige Ergebnisse der Humanproben	166
8.4.2	Untersuchte Gene – Rattenproben	172
8.4.2.1	Vollständige Ergebnisse der Rattenproben	173
8.5	Abkürzungsverzeichnis	175
8.6	Abbildungsverzeichnis	178
8.7	Tabellenverzeichnis	181
8.8	Publikationsliste	183

1 Zusammenfassung

Das stetig wachsende Feld der Nanotechnologie und die daraus hervorgehende Fülle an neuen innovativen Materialien bergen ein potentiell toxikologisches Risiko für die menschliche Gesundheit. Dementsprechend muss sich auch die Toxikologie fortlaufend weiterentwickeln, um eine zeitgemäße Risikobewertung gewährleisten zu können. Besonders metallbasierte Nanomaterialien weisen neben der größenspezifischen Toxizität auch eine inhärente metallspezifische Toxizität auf, die, je nach Metallspezies, auch eine kanzerogene Wirkung auslösen kann.

Neben den seit einiger Zeit bekannten und bereits gut untersuchten metallbasierten Nanopartikeln werden gerade in den letzten Jahren immer häufiger *Nanowire* in innovativen Produkten eingesetzt, die eine zusätzliche Faser-spezifische Toxizität aufweisen können. Um potentielle adverse Effekte dieser Nanomaterialien zu beurteilen, wurden im Rahmen dieser Arbeit umfangreiche *in vitro*-Untersuchungen durchgeführt, wobei der Fokus besonders auf dem Einfluss solcher Materialien auf die genomische Stabilität lag. Hierfür kamen verschiedene pulmonale *in vitro*-Zellsysteme des Menschen in Mono- und Kokultur sowie ein Monokultur-System der Ratte zum Einsatz. Der Vergleich zwischen den beiden Spezies soll dabei die Basis für Untersuchungen auf *ex vivo*- und *in vivo*-Ebene bilden und durch die Extrapolation zwischen den Spezies zu einer Reduktion von *in vivo*-Untersuchungen beitragen. Gegenstand der Analysen waren Kupfer-, Nickel- und Silber-basierte Nanopartikel und *Nanowire* sowie die Referenzmaterialien CeO₂- und TiO₂-Nanopartikel als biobeständige Partikelreferenz und Kohlenstoffnanoröhren als biobeständige Faserreferenz.

Um eine Bewertungsgrundlage zu schaffen, wurden die Nanomaterialien zunächst einer umfangreichen Materialcharakterisierung unterzogen. Diese umfasste neben elektronenmikroskopischen Untersuchungen auch die Messung der dynamischen Lichtstreuung in Suspension sowie die Bestimmung der Löslichkeit in den verwendeten Zellkulturmedien und weiteren biologisch relevanten Flüssigkeiten. Hierbei zeigten die Kupfer-basierten Nanomaterialien die stärkste Löslichkeit, während für die Silbrenanomaterialien sowie die Referenzmaterialien nahezu keine Löslichkeit messbar war. Bei den Löslichkeitsstudien wurde unter anderem eine lysosomale Modellflüssigkeit genutzt, die der Abschätzung einer potentiellen Ionenfreisetzung innerhalb der Lysosomen nach einer endozytotischen Aufnahme dienen sollte. Dieser Prozess, der zur intrazellulären Ionenfreisetzung führen kann, wird als *trojan horse mechanism* bezeichnet und gilt als einer der Hauptursachen der Toxizität von metallbasierten Nanomaterialien. Die intrazelluläre

Ionenfreisetzung und -verteilung in den verwendeten Zelllinien wurde ebenfalls untersucht. Hierbei spiegeln die Ergebnisse zum Großteil die Resultate der Löslichkeitsstudien wider. Eine Ausnahme bildeten die Silbernanomaterialien, für die trotz einer scheinbaren Unlöslichkeit intrazellulär verfügbare Ionen detektiert werden konnten. Dies kann über die Bildung von unlöslichen Sekundärpartikeln aufgrund einer hohen Thiol-Affinität begründet werden.

Freie Metallionen stehen im Verdacht, reaktive Sauerstoffspezies zu induzieren und in Folge dessen die Zellen auf verschiedene Arten zu schädigen. Hierzu zählt unter anderem die Induktion inflammatorischer sowie DNA-schädigender Prozesse. Diese Mechanismen wurden mithilfe der Genexpressionsanalyse untersucht. Die in der Arbeitsgruppe etablierte Hochdurchsatz RT-qPCR wurde im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich der Untersuchung von Wirkmechanismen metallbasierter Nanomaterialien um inflammatorische und fibrotische Marker erweitert und zudem um ein Gen-Set zur Untersuchung von Rattenzellen ergänzt. Dabei lösten die Kupfer-basierten Nanomaterialien in den humanen Zellsystemen die stärksten Veränderungen der Expressionsprofile aus, während in den Rattenzellen die Nickel-basierten Nanomaterialien den größten Einfluss besaßen. Insgesamt induzierten die löslichen Nanomaterialien vor allem Gene, die auf freie Metallionen, oxidativen Stress sowie Inflammation hindeuten und bestätigten damit den prognostizierten *trojan horse mechanism*. Zudem konnten Faser-spezifische Effekte durch eine stärkere Induktion inflammationsbezogener Gene in der Kokultur nach der Inkubation mit Nickel- und Silber-*Nanowire* beobachtet werden, die vermutlich mit einer Aktivierung der Makrophagen und dem Prozess der sog. „frustrierten Phagozytose“ zusammenhängen.

Über die alkalische Entwindung sowie den durchflusszytometrischen Mikrokerntest wurden zusätzlich DNA-schädigende Effekte untersucht. Das größte genotoxische Potential zeigten die Kupfernanomaterialien, wobei sich die Anzahl an DNA-Strangbrüchen in der Kokultur auf das Doppelte bis Dreifache im Vergleich zur Monokultur belief. Dies könnte mit dem Auftreten einer sekundären Genotoxizität, ausgelöst durch die Makrophagen, begründet werden. Unterschiede zwischen den beiden Testsystemen ergaben sich vor allem für die Nickel- und Silber-basierten *Nanowire* sowie die Kohlenstoffnanoröhren, die ausschließlich im Mikrokerntest eine Genotoxizität aufwiesen. Dies spricht für einen Faser-spezifischen klastogenen Effekt. Demgegenüber konnten für die unlöslichen CeO₂- und TiO₂-Nanopartikel keine adversen Effekte detektiert werden.

Zusammenfassend konnten bestehende Theorien zum Wirkmechanismus metallbasierter Nanomaterialien nachvollzogen und um neue Erkenntnisse, insbesondere bezüglich der *Nanowire*, erweitert werden. So konnte der für die Toxizität dieser Materialien postulierte *trojan horse mechanism* in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, ebenso wie die Induktion von oxidativem Stress, der in der Ausbildung inflammatorischer Prozesse und einer DNA-schädigenden Wirkung resultierte. Unter den Kupfernanomaterialien konnte kein Unterschied zwischen Partikel und *Wire* ausgemacht werden, weshalb diese Spezies vermutlich vorrangig über die intrazelluläre Ionenfreisetzung toxisch wirken. Im Gegensatz hierzu konnte die Toxizität von Nickel- und Silber-basierten Nanomaterialien nicht ausschließlich auf die Ionen zurückgeführt werden, da die *Nanowire*, genau wie auch die Kohlenstoffnanoröhren, Faser-spezifische Effekte auslösten. Hierbei zeigte sich besonders in der Genexpressionsanalyse auch der Einfluss der Makrophagen, was die Relevanz der Zell-Zell-Kommunikation und deren Berücksichtigung in *in vitro*-Anwendungen unterstreicht. Der Vergleich der beiden Spezies Mensch und Ratte zeigte eine größere Empfindlichkeit der Rattenzellen in nahezu allen durchgeführten Experimenten, trotz einer zumeist ähnlichen intrazellulären Bioverfügbarkeit des jeweiligen Metalls. Dies könnte in einer potenteren anti-oxidativen Abwehr der humanen Zelllinie begründet sein.

Im Zusammenhang mit dem BMBF-geförderten Projekt *MetalSafety*, in dessen Rahmen die vorliegende Arbeit entstand, bieten diese Ergebnisse die Grundlage für eine Risikobewertung der untersuchten Nanomaterialien. Durch die Verwendung von humanen Zellkulturen und einer Zelllinie aus der Ratte konnte zudem eine Datenbasis geschaffen werden, um mittels weiterer *in vitro*-, *ex vivo*- und *in vivo*-Experimente im Rahmen des Projekts das Verständnis der Vergleichbarkeit von *in vitro*-, *ex vivo*- und *in vivo*-Untersuchungen zu vertiefen und so in Zukunft potentiell die Anzahl an Versuchstieren reduzieren zu können.

Abstract

The steadily growing field of nanotechnology and the resulting abundance of new innovative materials pose a potential toxicological risk to human health. Accordingly, toxicology also needs to evolve continuously in order to be able to guarantee state-of-the-art risk assessment. Metal-based nanomaterials in particular exhibit not only size-specific toxicity, but also inherent metal-specific toxicity, which, depending on the metal species, can also cause a carcinogenic effect.

In addition to metal-based nanoparticles, which have already been well studied, nanowires are being used increasingly in innovative products and can exhibit an additional, fibre-specific toxicity. In order to assess potential adverse effects of these nanomaterials, extensive *in vitro* studies with a special focus on the impact on genomic stability were performed in the context of this work. For this purpose, different human pulmonary *in vitro* cell systems in mono- and coculture as well as a rat monoculture system were used. The comparison between the two species is intended to form the basis for investigations on an *ex vivo* and *in vivo* level and the extrapolation between the species could contribute to a reduction of *in vivo* investigations. The subject of the analyses were copper-, nickel- and silver-based nanoparticles and nanowires as well as the reference materials CeO₂ and TiO₂ nanoparticles as a biopersistent particle reference and carbon nanotubes as a biopersistent fibre reference.

In order to create a basis for comprehensive evaluation, the nanomaterials were first extensively characterized. In addition to electron microscopic examinations, the measurement of dynamic light scattering in suspension and the determination of solubility in the cell culture media and biologically relevant liquids was included as well. The copper-based nanomaterials showed the most pronounced solubility, while almost no solubility was measurable for the silver nanomaterials as well as the reference materials. Among other liquids, a lysosomal model fluid was used in the solubility studies to estimate the potential ion release within the lysosome after endocytotic uptake. This process, which can lead to intracellular ion release, is called the trojan horse mechanism and is considered to be one of the main causes of toxicity of metal-based nanomaterials. Furthermore, the intracellular ion release and distribution in the cell lines used was investigated. Here, the results mirrored the results of the solubility studies. An exception were the silver nanomaterials, for which intracellularly available ions could be detected despite an apparent insolubility. This can be explained by the formation of insoluble secondary particles due to a high thiol affinity.

Free metal ions are suspected of inducing reactive oxygen species and causing damage to cells in various ways, which include the induction of inflammatory and DNA damaging processes. These mechanisms were investigated with the help of gene expression analysis. The high-throughput RT-qPCR established previously in the working group was extended in the context of this work. To investigate the mode of action of metal-based nanomaterials, inflammatory and fibrotic markers were added to the human gene set, and a complete new set of rat genes was established. In human cell cultures, the copper-based nanomaterials led to the most pronounced changes in expression profiles, while in rat cells the nickel nanomaterials had the most significant influence. In general, the soluble nanomaterials induced mainly genes indicative of free metal ions, oxidative stress and inflammation, confirming the predicted trojan horse mechanism. In addition, fibre-specific effects were observed, revealing a stronger induction of inflammation-related genes in the coculture after incubation with nickel and silver nanowires, presumably related to macrophage activation and so-called "frustrated phagocytosis".

DNA damaging effects were additionally investigated via alkaline unwinding and the flow cytometric micronucleus test. The copper-based nanomaterials showed the greatest genotoxic potential, with the number of DNA strand breaks in the coculture being increased two to three times compared to the monoculture. This could be explained by the appearance of secondary genotoxicity triggered by the macrophages. Differences between the two genotoxic assays were mainly found for the nickel- and silver-based nanowires as well as the carbon nanotubes, which showed genotoxicity exclusively in the micronucleus test. This suggests a fibre-specific clastogenic effect. In contrast, no adverse effects could be detected for the insoluble CeO₂ and TiO₂ nanoparticles.

In summary, it was possible to confirm current assumptions about the mode of action of metal-based nanomaterials and to extend these by new findings, especially with regard to nanowires. Thus, the trojan horse mechanism postulated for the toxicity of these materials was confirmed in the present study, as was the induction of oxidative stress, which resulted in inflammatory processes and a DNA-damaging effect. Among the copper nanomaterials, no difference was identified between particles and wires, presumably via intracellular ion release. In contrast, the toxicity of nickel- and silver-based nanomaterials could not be attributed exclusively to the ions, since the nanowires, similar to the carbon nanotubes, triggered fibre-specific effects. In this context, the influence of macrophages was also shown, especially in the gene expression analysis, which underlines the relevance of cell-cell communication and its consideration in *in vitro* applications. The comparison of the two species, human and rat, showed a more pronounced sensitivity of the rat cells in almost all experiments

conducted, despite a mostly similar intracellular bioavailability of the respective metal. This could be due to a more potent anti-oxidative defense of the human cell line.

In the context of the BMBF-funded *MetalSafety* project, in which the present work was performed, these results provide the basis for the evaluation of the nanomaterials investigated and can contribute to a more refined risk assessment. By using human cell cultures and a cell line derived from the rat, it was also possible to create a data basis to deepen the understanding of the comparability of *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* studies by means of experiments within the framework of the project and thus potentially reduce the number of test animals in the future.

2 Einleitung

2.1 Nanomaterialien

Die Nanotechnologie stellt ein schnell wachsendes und hochaktuelles Forschungsgebiet dar, das zur Synthese und dem Einsatz zahlreicher verschiedener Nanomaterialien (NM) geführt hat. NM sind Teilchen, die in mindestens einer Dimension weniger als 100 nm messen (EU Kommission, 2011) und können daher jede Geometrie annehmen. Aufgrund ihrer besonderen und neuen Eigenschaften, die sie von ihren größer skalierten Pendanten unterscheiden, finden sie in innovativen Produkten immer häufiger Anwendung (Karlsson *et al.*, 2022). Als Konsequenz hieraus stellt sich zunehmend die Frage nach den potentiellen adversen Effekten dieser Materialien.

In der Umwelt kommt der Kontakt mit NM vor allem über Stäube und Aerosole zustande, die eingeatmet werden können. Neben den natürlichen Ursprüngen von NM wie Waldbränden und Vulkanausbrüchen, spielen anthropogene Quellen eine immer wichtigere Rolle (Oberdörster *et al.*, 2005). So entwickeln viele Industriezweige, aber auch der medizinische Bereich, zunehmend neue Produkte und Anwendungen, die nanoskalige Materialien enthalten. Dies stellt häufig die Schnittstelle zum Verbraucher her, denn NM werden auch in Produkten des täglichen Bedarfs eingesetzt. Neben den Konsumenten solcher Produkte sind allerdings in erster Linie die Menschen in den Produktionsstätten exponiert. Zudem können während der Nutzung durch Abrieb oder bei der Entsorgung NM freigesetzt werden (Karlsson *et al.*, 2022). Laut der *Nanodatabase* (www.nanodb.dk) befinden sich aktuell (Stand 09/2022) über 5200 Produkte auf dem europäischen Markt, die NM enthalten. Zehn Jahre zuvor waren es noch ca. 1000 Produkte (Hansen *et al.*, 2020), was nochmals die bereits angesprochene steigende Bedeutung und Verbreitung dieser Materialien unterstreicht.

In Folge dieser zunehmenden Verwendung von NM und der damit einhergehenden verstärkten Exposition kam es zur Etablierung eines neuen Forschungszweiges, der sich mit den Gefahren dieser Materialien beschäftigt, der Nanotoxikologie. Die geringe Größe mit der korrelierenden großen spezifischen Oberfläche macht NM zu einer potentiellen Noxe, da sie klein genug sind, um in den Körper und dessen Zellen einzudringen und gleichzeitig eine hohe, aus ihrer großen Oberfläche resultierende Reaktivität aufweisen. Darüber hinaus besitzen sie ein so geringes Gewicht, dass sie in trockenem Zustand leicht aufgewirbelt, durch die Luft getragen und unbeabsichtigt eingeatmet

werden können. Aufgrund ihrer geringen Größe können sie hierbei tief in die Lunge, bis hin zu deren empfindlichsten Strukturen, den Alveolen, gelangen (Oberdörster *et al.*, 2005).

Die Risikobewertung von NM ist daher ein wichtiger Bestandteil der Nanotoxikologie. Bisherige Studien konnten hierbei aufzeigen, dass sich NM mit verschiedenen Eigenschaften (Größe, Form, Material, Oberflächenbeschaffenheit, etc.) hinsichtlich ihrer Toxikologie deutlich voneinander unterscheiden können. Folglich können NM nicht als einheitliche Substanzgruppe bewertet werden. Stattdessen ist eine Fall-zu-Fall Betrachtung verschiedener NM notwendig (Karlsson *et al.*, 2022).

2.1.1 Aufnahme von Nanomaterialien

Die Aufnahme von NM in Zellen läuft über die Endozytose ab, wobei zwischen Phagozytose (Aufnahme großer extrazellulärer Partikel) und Pinozytose (Aufnahme von Flüssigkeiten und darin gelösten Substanzen) unterschieden wird (Abbildung 1). Bei beiden Prozessen wird zunächst infolge eines Erkennungsvorgangs an der Außenseite der Zellmembran diese eingestülpt. Das Vesikel samt dem aufzunehmenden Material wird zum Zellinneren hin abgeschnürt und ein Endosom entsteht, welches zum Lysosom transportiert wird. Wie bereits erwähnt, nehmen Makrophagen NM über die Phagozytose auf. Die Phagozytose ist ein rezeptorvermittelter Prozess zur Aufnahme von Partikeln, der nur wenigen Zelltypen des Immunsystems vorbehalten ist. Die Aufnahme in Epithelzellen läuft dagegen vorrangig über die Pinozytose ab, die über verschiedene zelluläre Mechanismen vermittelt werden kann. So kann die Pinozytose in drei verschiedene Mechanismen unterteilt werden: in die Makropinozytose, die Caveolae-vermittelte Endozytose und die Clathrin-vermittelte Endozytose (Sahay *et al.*, 2010). Die Clathrin-vermittelte Endozytose gilt als der klassische Aufnahmeweg und ist in allen Säugerzellen zu finden. Sie ist an spezialisierten Stellen der Membran möglich, bei denen an der Zellinnenseite das Protein Clathrin sitzt. Transferrin und *low density lipoprotein* werden beispielsweise über diesen Weg endozytiert. Typisch für die Caveolae-vermittelte Endozytose ist die Anwesenheit des Proteins Caveolin-1, das notwendig für die Ausbildung der Caveolae ist. Aufgrund der speziellen Form des Proteins haben die resultierenden Endosomen eine flaschenartige Form und sind 60-80 nm groß. Die Makropinozytose ist Clathrin- und Caveolae-unabhängig. Nach einer Rezeptor-Aktivierung bilden sich Einstülpungen, die die extrazelluläre Flüssigkeit umschließen und sich als Makropinosom abschnüren (Sahay *et al.*, 2010).

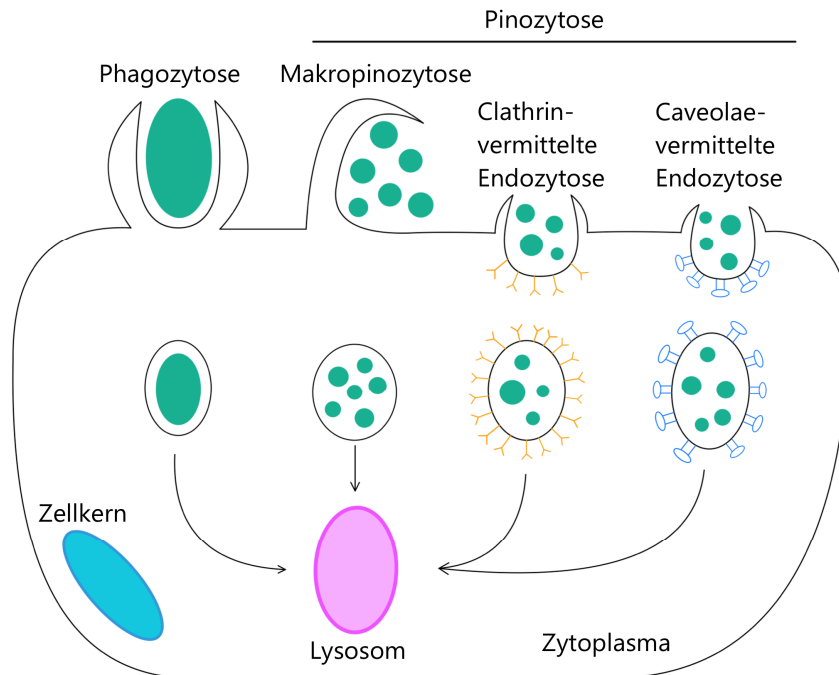


Abbildung 1 Schematische Darstellung verschiedener Aufnahmemechanismen von Nanomaterialien und deren weitere Prozessierung (modifiziert nach Sahay *et al.*, 2010).

Die Nanomaterialien werden je nach Größe und Beschaffenheit entweder über die Phagozytose oder die Pinozytose aufgenommen. Letztere kann wiederum in die Makropinozytose sowie die Clathrin- und Caveolae-vermittelte Endozytose unterteilt werden. Nach der Aufnahme werden die gebildeten Vesikel zu Lysosomen transportiert.

2.1.2 Partikel und Wire

Misst ein NM in allen drei Raumdimensionen weniger als 100 nm und seine kürzeste und längste Achse unterscheiden sich nicht wesentlich voneinander, so wird von einem Nanopartikel (NP) gesprochen.

Einer der wichtigsten Parameter in Bezug auf die Toxikologie ist in den meisten Studien die Größe der NP, da sie relevant für die Aufnahme in die Zellen ist. Dennoch ist die zelluläre Aufnahme nicht zwingend notwendig, um Toxizität hervorzurufen (Karlsson *et al.*, 2022). So können auch die Löslichkeit sowie die Beschaffenheit und die Oberflächenstruktur eine entscheidende Rolle spielen (Oberdörster *et al.*, 2005; Nel *et al.*, 2006).

Neben den partikulären NM, die bereits Gegenstand vieler Studien waren, sind faserförmige Nanostrukturen, insbesondere metallbasierte, bisher nur in sehr geringem Umfang untersucht worden (Allegri *et al.*, 2016). Faserförmige NM, die sog. *Nanowire* (NW), überschreiten in einer Dimension 100 nm und weisen per Definition ein Seitenverhältnis von $>1:3$ auf (Oberdörster *et al.*,

2005). Weitere Materialien und Materialkategorien mit diesen Eigenschaften sind Kohlenstoffnanoröhren (CNT), *Nanorods*, *Nanofiber* und Asbest.

Metallbasierte NW sind, neben NP, ebenfalls ein wichtiger Rohstoff für die Industrie geworden und werden zunehmend in elektronischen und optoelektronischen Produkten wie Touchscreens und Solarzellen verwendet. Diese Anwendungen beruhen auf der hohen Leitfähigkeit bei gleichzeitiger hoher Transparenz. Bisher wurde hierfür zumeist Indiumzinnoxid verwendet, was aufgrund der geringen Verfügbarkeit des Indiums immer teurer wird. (Sannicolo *et al.*, 2016). Auch wenn das Material der NW selbst kein toxikologisches Risiko aufweisen sollte, birgt deren Form unabhängig vom Metall gesundheitliche Gefahren, wie sie beispielsweise von Asbest bekannt sind. Asbest ist ein Silikat-Material und ein bekanntes Kanzerogen, das im Zusammenhang mit der Entstehung von Lungenfibrosen und Lungentumoren steht (Oberdörster *et al.*, 2005; Karlsson *et al.*, 2022). Die Beziehung zwischen der Struktur der NW und der biologischen Aktivität wird auch als „Faser Paradigma“ bezeichnet. Demnach sind drei Parameter der Fasern entscheidend: die Dosis, die Dimension (Form) und die Langlebigkeit (Allegri *et al.*, 2016). Bezogen auf die Dimension wurden von der *World Health Organisation* (WHO) solche Fasern als besonders kritisch eingeordnet, die eine Länge von mindestens 5 µm und einen Durchmesser von maximal 3 µm aufweisen. Das Verhältnis von Länge zu Durchmesser muss dabei mindestens 3:1 betragen (World Health Organisation, 2017). Fasern, die den WHO-Kriterien entsprechen, werden daher auch als WHO-Fasern bezeichnet (Allegri *et al.*, 2016). Einige Studien kamen hierbei zu dem Schluss, dass ein größeres Verhältnis von Länge zu Breite zu einer ausgeprägteren Toxizität führt (Donaldson *et al.*, 2011).

Sowohl NW als auch NP können als luftgetragene NM eingeatmet werden, weshalb die Lunge als Hauptexpositionsweg für den Menschen gilt. Aufgrund ihrer geringen Größe sind sie zudem in der Lage, tief in den Atemtrakt vorzudringen, bis hin zu den zilienfreien Bereichen in der Alveolarregion. In diesen Bereichen kann dementsprechend keine mukoziliäre Clearance mehr stattfinden. Stattdessen müssen Makrophagen die Fremdkörper aufnehmen und entweder verdauen, was bei metallbasierten NM nur selten gelingt, oder zu zilienbesetzten Abschnitten transportieren (Schinwald *et al.*, 2012a). Dieser Prozess ist allerdings sehr zeitintensiv und führt unter Umständen zu einer langen Verweildauer der NM in der Lunge (Lippmann *et al.*, 1980). Dies ist vor allem bei biopersistenten NM der Fall, die auf diese Weise Entzündungen hervorrufen können, aber auch lösliche Materialien können durch die Freisetzung toxisch wirkender Ionen entsprechende Reaktionen verursachen (Utembe *et al.*, 2015). Nanofasern entfalten im Alveolarbereich zudem dadurch eine schädliche Wirkung, dass Makrophagen diese aufgrund ihrer Länge nicht vollständig

phagozytieren können („frustrierte Phagozytose“) und in der Folge Stressmarker wie Zytokine (bspw. Interleukine) ausschütten sowie reaktive Sauerstoffspezies (ROS – *reactive oxygen species*) generieren. Das Hervorrufen von Entzündungsreaktionen führt des Weiteren dazu, dass immer mehr Immunzellen und Makrophagen einwandern und sich eine chronische Entzündung entwickelt. Diese geht mit verschiedenen Krankheitsverläufen einher, wie Lungenfibrose und Krebs (Schinwald *et al.*, 2012b). Darüber hinaus wurde auch von Fällen berichtet, in denen NW Schäden verursachten, indem sie Löcher in Zellmembranen bohrten (Stoehr *et al.*, 2011).

Einer der Hauptmechanismen, der für die Toxizität von NM verantwortlich ist, ist die Entstehung von oxidativem Stress durch ROS. Durch die gesteigerte Generierung von ROS können die bereits erwähnten inflammatorischen Reaktionen sowie Schädigungen der DNA entstehen, die wiederum zu einem Zellzyklusarrest führen können. Sind die Schäden zu gravierend und die Zelle ist der Reparatur nicht gewachsen, leitet sie die Apoptose ein. Neben der DNA können auch die Mitochondrien als Target der ROS dienen, wodurch deren Membran beschädigt werden kann. Ist dies der Fall, treten weitere ROS sowie Cytochrom C aus den Mitochondrien aus und aktivieren eine zelluläre Signalkaskade, die ebenfalls in der Einleitung der Apoptose resultiert (Ma *et al.*, 2014). Die angesprochene genotoxische Wirkung wird im folgenden Kapitel genauer beleuchtet.

2.2 Genotoxizität von Nanomaterialien

Der DNA-schädigenden Wirkung von NM können direkte und indirekte Mechanismen zugrunde liegen. Der direkte Weg besteht aus der Aufnahme der NM in die Zelle (Kapitel 2.1.1) und dem anschließenden Eindringen in den Zellkern. Aufgrund ihrer geringen Größe sind NM in der Lage, durch die Kernporen zu diffundieren, aber auch der aktive Transport in den Zellkern oder der zufällige Einschluss innerhalb der Kernmembran während der Mitose können mögliche Wege sein. Dort können sie anschließend direkt mit dem Erbgut oder mit DNA-bezogenen Proteinen, wie beispielsweise die Histone, interagieren, was zur physischen Schädigung der DNA oder einer beeinträchtigten Genexpression oder Zellteilung führen kann.

Ein direkter Mechanismus der DNA-Schädigung resultiert aus der verstärkten Induktion von ROS. ROS sind unter physiologischen Bedingungen in den Zellen in niedriger Konzentration vorhanden und übernehmen wichtige Aufgaben in der Signaltransduktion. Dabei ist ihre Konzentration über die Anwesenheit von anti-oxidativen Enzymen und Molekülen streng kontrolliert. Ihren Ursprung haben sie in der Regel in der Atmungskette, die in den Mitochondrien abläuft. Kommt es zu einer übermäßigen ROS-Generierung, versucht die Zelle zunächst über die Antioxidantien die

überschüssigen ROS zu reduzieren und diese unschädlich zu machen. Verschiebt sich das Gleichgewicht jedoch hin zu den ROS, wird von oxidativem Stress gesprochen und die Zellbestandteile können während dieses Stadiums von den freien Radikalen geschädigt werden. Hierzu zählt auch die DNA, die dadurch typischerweise Einzel- und Doppelstrangbrüche, DNA-Basenmodifikationen und DNA-Quervernetzungen erleidet. Gerade die Ionen der Übergangsmetalle sind durch ihre Redox-Aktivität zum Eingehen von Fenton-ähnlichen Reaktionen prädestiniert, die zur Induktion von ROS führen. Ein zusätzlicher indirekter Mechanismus, der zur DNA-Schädigung führen kann, ist die Inflammation. Dieser für den Körper essentielle Prozess dient der Abwehr von unter anderem Viren und Bakterien, kann aber auch Punktmutationen und DNA-Addukte sowie ebenfalls die Generierung von ROS verursachen (Singh *et al.*, 2009; Petersen und Nelson, 2010).

Die DNA stellt das empfindlichste Target der Zelle dar, da unerkannte oder nicht behobene Schäden schwerwiegende Folgen wie die Tumorentstehung haben können. Aufgrund des DNA-schädigenden Potentials stehen NM im Zusammenhang mit der Karzinogenese. Die inhärenten DNA-Reparaturmechanismen der Zellen sind somit essentiell bei der Verhinderung der Manifestation von DNA-Schäden. Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass NM auch die DNA-Reparaturprozesse beeinträchtigen können (Singh *et al.*, 2009; Carriere *et al.*, 2017). Dies geschieht beispielsweise durch freigesetzte Metallionen, die mit DNA-Reparaturproteinen interagieren können und auf diese Weise deren Funktion beeinträchtigen. Besonders anfällig sind dabei häufig bei Proteinen vorkommende Zink-bindende Strukturen, die DNA- oder RNA-Bindungsstellen besitzen. Abgesehen von solchen freigesetzten Metallionen können allerdings auch unlösliche NM Redox-Reaktionen an deren Oberfläche katalysieren und somit den Redox-Status der umgebenden Proteine verändern. Zuletzt kann auch durch die Veränderung der Transkription ein negativer Einfluss auf die DNA-Reparaturprozesse ausgeübt werden (Carriere *et al.*, 2017). In Abbildung 2 ist schematisch dargestellt, an welchen Stellen im DNA-Reparaturmechanismus NP nachteilige Effekte ausüben können.

Wie bereits erwähnt, spielen bei metallbasierten NM viele Charakteristiken eine entscheidende Rolle. Besonders entscheidend ist dabei auch die Zusammensetzung des Materials, da hiervon die Löslichkeit sowie die Robustheit abhängt. Somit sollen die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Materialien in den nun folgenden Kapiteln näher betrachtet werden.

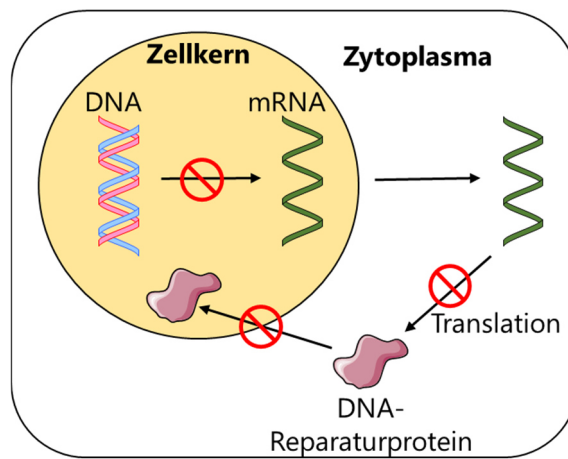


Abbildung 2 Schematische Darstellung der Beeinträchtigung von DNA-Reparaturprozessen durch Nanopartikel (modifiziert nach Carriere *et al.*, 2017).

Nanopartikel können auf direktem oder indirektem Weg die DNA-Reparatur beeinträchtigen, indem sie beispielsweise die Genexpression oder die Translation beeinflussen, oder mit DNA-Reparaturproteinen interagieren, sodass deren Funktion gestört werden kann.

2.3 Kupfermaterialien

Kupfernanomaterialien (Cu NM) weisen eine biozide Wirkung (antibakteriell, antiviral und antimykotisch) auf und werden aufgrund ihrer guten elektrischen Leitfähigkeit in elektronischen Geräten eingesetzt. So wird Kupferoxid zum Beispiel als Halbleiter in vielen verschiedenen Anwendungen wie Batterien und Gassensoren verwendet. In der Form von Nanofasern wird Kupfer gerade in den letzten Jahren vermehrt als Alternative zu Silbrenanowiren in transparenten, leitenden Filmen untersucht (Nam und Lee, 2016). Obwohl Kupfer ein essentielles Spurenelement darstellt, dessen Aufnahme und Verteilung im Körper streng reguliert wird, weist es in Untersuchungen viele toxische Eigenschaften auf (Linder, 2020; Karlsson *et al.*, 2022).

Die Toxizität von Cu NP und CuO NP wurde bereits in vielen Studien sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht, wobei ausgeprägte Effekte beobachtet werden konnten. Cu NW dagegen wurden bisher nicht in den Fokus toxikologischer Studien gestellt, weshalb sich die Darstellung des aktuellen Forschungsstandes ausschließlich auf Studien mit Cu NP und CuO NP bezieht. Der aktuellen Literatur zufolge wirken nanoskalige Kupferverbindungen toxisch über den Weg der intrazellulären Ionenfreisetzung, gefolgt von der Induktion von oxidativem Stress. Kupferionen sind redox-aktiv und können Fenton-ähnliche Reaktionen eingehen, die zur Generierung von ROS führen. Cu NP und CuO NP umgehen dabei die sehr gut regulierte homöostatische Kontrolle der Zellen, indem sie endozytotisch eingeschleust und zum Lysosom transportiert werden, wo sie sich aufgrund des niedrigen pHs lösen und Kupferionen freisetzen. Dieser Prozess wird auch als *trojan horse mechanism*

bezeichnet (Limbach *et al.*, 2007; Strauch *et al.*, 2020). Gerade bei Kupfer kommt dieser Effekt besonders stark zu tragen, da es bei neutralem pH schwerlöslich, bei saurem pH dagegen sehr leicht löslich ist (Semisch *et al.*, 2014). Die resultierende Überladung der Zelle mit Kupfer kann zum Zelltod führen. Für Kupfer-basierte NP konnte zudem bereits gezeigt werden, dass ihre Größe von Bedeutung ist. So weisen nanoskalige Partikel eine stärkere Toxizität auf als Partikel im mikroskaligen Bereich (Midander *et al.*, 2009; Semisch *et al.*, 2014). Darüber hinaus konnten Unterschiede im Wirkmechanismus von Cu NP und CuO NP festgestellt werden, die sich auf die Reaktivität gegenüber Zellmembranen beziehen. Hierbei zeigten Cu NP einen stärkeren Effekt als CuO NP (Karlsson *et al.*, 2013). Verschiedene Studien, die die Auswirkungen unterschiedlicher metallbasierter NP miteinander verglichen, schlussfolgerten, dass Kupfer-basierte Partikel die größte Zytotoxizität besitzen (Karlsson *et al.*, 2008; Lanone *et al.*, 2009). Durch Cu NM konnte zudem eine veränderte Expression von Genen der oxidativen Stressantwort beobachtet werden, die mit einer Glutathion (GSH)-Depletion einherging (Strauch *et al.*, 2017). Auch genotoxische Effekte durch Kupfer-basierte NM konnten in A549- und BEAS-2B-Zellen beobachtet werden. Diese lassen sich auf den oxidativen Stress zurückführen (Ahamed *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012; Semisch *et al.*, 2014). Darüber hinaus sind Kupferionen aufgrund ihrer Thiol-Affinität in der Lage, Proteine zu binden und somit möglicherweise deren Funktion zu beeinträchtigen. Auch GSH wäre hierfür ein potentieller Bindungspartner (Karlsson *et al.*, 2022). Obwohl bisher keine toxikologischen Studien zu Cu NW vorliegen, sind Effekte ähnlich zu den partikulären Verbindungen denkbar, sofern die Cu NW von den Zellen internalisiert werden können. Dass diese Möglichkeit realistisch ist, zeigen viele Studien mit NW anderer Art (Visalli *et al.*, 2015; Perez *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2019).

2.4 Nickelmaterialien

Ein Alleinstellungsmerkmal der Nickelnanomaterialien (Ni NM) stellt im Rahmen dieser Arbeit deren Magnetismus dar, der auch die Grundlage für eine Reihe von Anwendungen bildet. Ni NP werden, neben elektronischen Produkten wie Sensoren, auch in der Katalyse und in Brennstoffzellen sowie in der Biomedizin eingesetzt (Wu und Kong, 2020). Auch Ni NW konnten in den letzten Jahren die Aufmerksamkeit der Industrie und des biomedizinischen Sektors erregen, da ihr magnetisches Moment pro Volumeneinheit größer ist als das der korrespondierenden Partikel (Felix *et al.*, 2016). Besonders interessant erscheinen zudem geplante Anwendungen in der Biomedizin, die Ni NW einen Einsatz zur Zellseparierung erlauben würden. Erste Experimente mit funktionalisierten NW scheinen dabei vielversprechend zu sein (Gao *et al.*, 2010) und könnten möglicherweise auch in der Krebstherapie genutzt werden (Contreras *et al.*, 2015).

Da durch die breiten Einsatzmöglichkeiten von Ni NM die Gefahr besteht, dass eine unbeabsichtigte Freisetzung aus Konsumgütern stattfinden könnte, ist die toxikologische Untersuchung dieser Materialien von hoher Relevanz. Darüber hinaus wurden Nickelverbindungen von der *International Agency for Research on Cancer* (IARC) in die Kategorie I (kanzerogen für den Menschen) eingestuft (Karlsson *et al.*, 2022). Vor allem in den letzten Jahren sind einige Studien zur Toxizität von Ni NM durchgeführt worden, die sowohl *in vitro*- als auch *in vivo*-Experimente umfassten (Poland *et al.*, 2012; Felix *et al.*, 2016; Kong *et al.*, 2016; Latvala *et al.*, 2016; Perez *et al.*, 2016; Åkerlund *et al.*, 2018; Gliga *et al.*, 2020). Zusammengefasst konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Ni NP zytotoxisch und genotoxisch wirken, wobei besonders zelluläre Ereignisse wie oxidativer Stress und Apoptose eine wichtige Rolle spielen könnten. Im Vergleich mit mikroskaligen Partikeln oder Nickelionen riefen Ni NP die stärksten toxischen Effekte hervor (Wu und Kong, 2020). Dabei laufen die apoptotischen Prozesse vor allem über den Todesrezeptor ab und scheinen darüber hinaus auch mit der genotoxischen Wirkung in Verbindung zu stehen (Magaye und Zhao, 2012). Aus Tierversuchen wurde abgeleitet, dass vor allem die intrazelluläre Bioverfügbarkeit für die Toxizität der Ni NP von Bedeutung ist. Während Nickelionen oder leicht lösliche NP keine Toxizität in den Lungen der Tiere auslösten, waren kleine, schwer lösliche NP, die aber eine hohe Bioverfügbarkeit aufwiesen, kanzerogen. Auch für Ni NW konnten zytotoxische Effekte nachgewiesen werden. Die Viabilität von HeLa S3-Zellen nahm nach der Inkubation dosisabhängig ab und die ROS-induzierte Apoptose wurde als Hauptmechanismus der Ni NW-Toxizität vermutet. Zudem wirkten längere NW toxischer als kurze (Ma *et al.*, 2014). In der humanen Fibroblasten-Zelllinie WI-38 konnte nach 24 h zwar keine Zytotoxizität nachgewiesen, dennoch konnte die Aufnahme der *Wire* in die Zellen gezeigt werden. Toxische Auswirkungen konnten erst nach 48 und 72 h beobachtet werden (Felix *et al.*, 2016). In dTHP-1-Zellen dagegen wurde nach 24 h eine Abnahme der Viabilität um 50 % beobachtet (Byrne *et al.*, 2009). Als Wirkmechanismus wurde von mehreren Autoren die intrazelluläre Freisetzung von Ni²⁺-Ionen vermutet, die zu oxidativem Stress und in der Folge zur Apoptose führt (Ma *et al.*, 2014; Felix *et al.*, 2016; Perez *et al.*, 2016).

2.5 Silbermaterialien

Der Einsatz von Silbernanomaterialien (Ag NM) findet zumeist aufgrund deren antimikrobiellen Eigenschaften statt, weshalb sie in einer Vielzahl von Produkten Anwendung finden. Hierzu zählen beispielsweise Textilien, aber auch Wundauflagen und Sprays im medizinischen Bereich (Karlsson *et al.*, 2022). Darüber hinaus hat Silber die höchste elektrische und thermische Leitfähigkeit unter allen Metallen, was zusätzlich ihren Einsatz in elektronischen Geräten rechtfertigt (Stoehr *et al.*, 2011).

Insgesamt führten diese beiden Eigenschaften dazu, dass Ag NP die am meisten in Konsumgütern verwendeten NM sind (Vance *et al.*, 2015). Einer möglichen Exposition ausgesetzt sind dabei nicht nur die Endverbraucher, sondern insbesondere auch die Mitarbeiter der produzierenden Firmen sowie von Entsorgungs- und Recyclingbetrieben. So konnte bei der Herstellung von Ag NP beispielsweise eine Arbeitsplatzkonzentration von 5-288 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ gemessen werden (Karlsson *et al.*, 2022). Aufgrund der daraus resultierenden Relevanz von Nanosilber wurden bereits viele Studien zur Toxikologie durchgeführt. *In vitro*-Studien konnten zeigen, dass Ag NP in der Lage sind, oxidativen Stress, DNA-Schäden und Apoptose zu induzieren. Allerdings gehen die Studien häufig weit auseinander, was an den verschiedenen NP-Größen, der Oberflächenbeschichtung, aber auch an der verwendeten Zelllinie liegen könnte. Darüber hinaus steht auch die Freisetzung von Silberionen unter Verdacht, einen großen Beitrag zur Zytotoxizität zu leisten, was durch kleinere Partikel mit einem hohen Oberflächen-Volumen-Verhältnis verstärkt werden würde (Karlsson *et al.*, 2022). Zudem ist bekannt, dass freie Silberionen sehr schnell an SH-Gruppen binden, was wiederum Proteine mit Thiolgruppen zu einem der Haupttargets macht (Liu *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2015). Allerdings gibt es auch Studien, die eine Zytotoxizität ohne eine Ionenfreisetzung beobachten, weshalb Ionen nicht immer die alleinige Ursache für diese sein können (Stoehr *et al.*, 2011; Gliga *et al.*, 2014). Wie bereits erwähnt, wurde auch ein DNA-schädigendes Potential der Ag NM, sowohl durch Ag NP (Bobyk *et al.*, 2021; Cervena *et al.*, 2021) als auch durch Ag NW (Wang *et al.*, 2019) festgestellt. Bobyk *et al.* (2021) stellten in A549-Zellen nach einer 24-stündigen Inkubation mit Ag NP einen signifikanten Anstieg an DNA-Strangbrüchen fest. Dabei machten sie vor allem die Löslichkeit der Partikel verantwortlich für die Toxizität (Bobyk *et al.*, 2021). Das genotoxische Potential von Ag NW wurde von Wang *et al.* (2019) untersucht, wobei die Entstehung von mehrkernigen Zellen festgestellt wurde. Hierfür konnte allerdings weder die Ionenfreisetzung noch die Induktion von ROS verantwortlich gemacht werden, da beides nicht nachgewiesen werden konnte. Stattdessen wurde eine Störung der Zellteilung durch die Ag NW vermutet (Wang *et al.*, 2019). Trotz erster Erkenntnisse aus den soeben beschriebenen Studien, sind die tatsächlichen Mechanismen der Ag NM-basierten Genotoxizität bisher weitestgehend nicht aufgeklärt (Karlsson *et al.*, 2022).

2.6 Ceroxid, Titandioxid

Ceroxidnanopartikel (CeO_2 NP) und Titandioxidnanopartikel (TiO_2 NP) werden im Rahmen dieser Arbeit unter den unlöslichen NP zusammengefasst. Aufgrund ihres bereits jahrelangen Einsatzes in Produkten des täglichen Bedarfs wie Sonnencreme oder Zahnpasta (TiO_2 NP) und in der Katalyse sowie der Automobilindustrie (CeO_2 NP) wurden diese beiden Materialien bereits umfangreich

untersucht (Karlsson *et al.*, 2022). Daher dienen sie in der vorliegenden Arbeit zum einen als in der Literatur gut charakterisierte Referenzmaterialien und zum anderen als geeignete unlösliche Vergleichspartikel zu den übrigen löslichen NM.

Unter anderem durch den Einsatz in Automobil-Kraftstoffen gelangen CeO₂ NP in die Atmosphäre, wodurch sowohl der Mensch aber auch die Umwelt einer täglichen Exposition ausgesetzt sind. Die Toxikologie betreffend konnten in der Literatur durch *in vitro*-Experimente zum Teil gegenteilige Effekte nachgewiesen werden: einerseits zeigten Studien die Fähigkeit der NP, oxidativen Stress zu induzieren (Park *et al.*, 2008a), andererseits konnte auch ein protektiver Effekt beobachtet werden, wobei CeO₂ NP die Reaktion von H₂O₂ zu Wasser und Sauerstoff katalysierten und auf diese Weise anti-oxidativ wirkten (Hirst *et al.*, 2009; Karakoti *et al.*, 2010). In weiteren *in vitro*-Studien konnten leichte adverse Effekte beobachtet werden, die jedoch unabhängig von der Induktion von ROS stattfanden (Urner *et al.*, 2014), während andere Publikationen das Ausbleiben von toxischen Effekten beschrieben (Hirst *et al.*, 2009). *In vivo* konnten nach der intratrachealen Instillation von CeO₂ NP eine akute pulmonale Inflammation sowie Zytotoxizität nachgewiesen werden (Cho *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2011). Zudem zeigten Langzeitstudien die Deposition von CeO₂ NP aus der Lunge in die Leber (Schwotzer *et al.*, 2018). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten CeO₂ NP sind vom JRC als Referenzmaterial NM-212 gelistet.

TiO₂ NP können sowohl in den Kristallstrukturen Anatas oder Rutil vorliegen, als auch in einer Mischung aus beiden. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten TiO₂ NP werden vom JRC als Referenzmaterial (NM-105) geführt und bestehen aus einer Mischung aus beiden genannten Strukturen (Anatas:Rutil 85:15) (Rasmussen *et al.*, 2014a). Zur Toxizität von TiO₂ NP gibt es bereits sowohl einige toxikologische Studien *in vitro* als auch *in vivo*, die diesem Material keine ausgeprägte Toxizität bescheinigen, da erst ab einem Einsatz von unrealistisch hohen Konzentrationen Effekte beobachtet werden konnten (Karlsson *et al.*, 2022). Dabei nehmen die Größe sowie die Kristallstruktur Einfluss auf die Toxizität und die Fähigkeit zur Induktion des Zelltods nahm für kleine Partikel mit einem höheren Anatas-Anteil zu (Simon-Deckers *et al.*, 2008). Einzelne Studien konnten eine inflammatorische Reaktion *in vitro* nachweisen, allerdings in geringem Ausmaß und bei hohen Inkubationsdosen (Sayes und Warheit, 2008; Kolling *et al.*, 2020). *In vivo* hingegen konnten stärkere Effekte wie Inflammation und Genotoxizität nachgewiesen werden, weshalb die Empfehlung lautet, das Einatmen von TiO₂ NP zu vermeiden. Aufgrund hinreichender Nachweise aus Tierversuchen und unzureichenden Beweisen aus epidemiologischen Studien, stufte die IARC (*Agency for Research on*

Cancer) TiO₂ NP als „möglicherweise krebserregend in Menschen“ (Gruppe 2B) ein (Karlsson *et al.*, 2022).

2.7 Kohlenstoffnanoröhren

Kohlenstoffnanoröhren (*carbon nanotubes* – CNT) sind zylindrische Nanoröhren, die in einwandige (*single walled*, SWCNT) und mehrwandige (*multi walled*, MWCNT) Fasern unterschieden werden können. Die Anwendungsmöglichkeiten dieser Materialien sind vielseitig und reichen von Sensoren und Batterien über den Einsatz als Füllmaterial in Nanokompositen bis hin zum medizinischen Bereich (Ibrahim, 2013; Khalid *et al.*, 2016). Aufgrund ihrer Faserstruktur, Biopersistenz und Rigidität besteht die Möglichkeit, dass sie ein ähnliches Verhalten wie Asbest zeigen (Johnston *et al.*, 2010). Im Rahmen dieser Arbeit dienen die mitgeführten CNT vor allem als Referenzmaterial mit einer ausgewiesenen Faserwirkung, welches zudem keine potentiell toxischen Ionen freisetzt. Die ausgewählten CNT werden von dem JRC unter der Nummer NM-401 geführt und sind auch unter den Namen Mitsui-7 MWCNT oder NRCWE-006 bekannt. Dieses Material, das in der vorliegenden Arbeit als CNT bezeichnet wird, erfüllt aufgrund der physischen Eigenschaften das Faser-Paradigma und wurde aufgrund einiger Tierstudien von der IARC in die Gruppe 2B, kanzerogen für den Menschen, eingestuft. Neben der genannten Kanzerogenität verursachten die Fasern zudem eine chronische Inflammation, Fibrose und Krebs (Di Ianni *et al.*, 2021).

2.8 Zellkulturmodelle

In toxikologischen *in vitro*-Untersuchungen werden die Experimente zumeist unter submersen Bedingungen und in Monokultur durchgeführt. Hierbei wachsen die Zellen einer spezifischen Zelllinie am Boden der Zellkulturgefäße und sind mit Nährmedium überschichtet. Für lungenbezogene Untersuchungen, unter anderem mit NM, kommen hierbei häufig Epithelzellen zum Einsatz, was die realistische Situation allerdings nur begrenzt widerspiegelt, da das Lungengewebe aus einer Zusammenstellung verschiedener Zelltypen aufgebaut ist, die miteinander im Austausch stehen. In dem für die Untersuchung von NM relevanten Alveolarbereich, sind die beiden wichtigsten Zelltypen die Epithelzellen, die eine Barrierefunktion erfüllen, sowie die alveolären Makrophagen, die als Zellen des Immunsystems die Art und Stärke einer potentiellen Immunantwort bestimmen. Gemeinsam sorgen sie für die Aufrechterhaltung der Lungenhomöostase (Bissonnette *et al.*, 2020). Die Konstruktion einer *in vitro*-Kokultivierung von Epithelzellen mit Makrophagen ist daher gerade im Zusammenhang mit der Untersuchung von NM bedeutend, da die Makrophagen dazu befähigt sind, die NM zu phagozytieren und auf diese Weise entweder die Epithelzellen zu schützen oder unter

Umständen inflammatorische Reaktionen hervorzurufen und zu verstärken. Die erfolgreiche Anwendung einer entsprechenden Kokultur aus Epithelzellen und Makrophagen zur Untersuchung von NM konnte bereits mehrfach gezeigt werden, unter anderem im Zusammenhang mit CeO₂ NP (Loret *et al.*, 2016; Cappellini *et al.*, 2020), CuO NP (Hufnagel *et al.*, 2021) oder MWCNT (Di Ianni *et al.*, 2021). In Abbildung 3 sind sowohl eine Monokultur als auch eine Kokultur schematisch dargestellt.

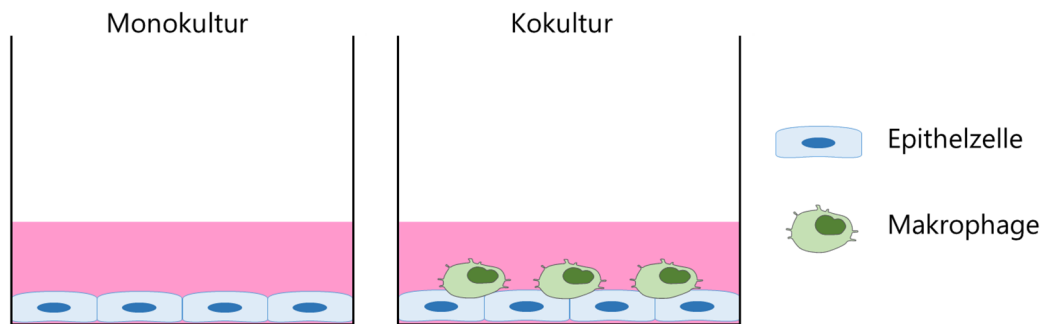


Abbildung 3 Schematische Darstellung einer Mono- sowie einer Kokultur unter submersen Bedingungen.

Neben einer humanen Mono- und Kokultur kommen im Rahmen dieser Arbeit auch Lungenepithelzellen der Ratte zum Einsatz. Dies dient dem Speziesvergleich, der auch bei der Ableitung eines Risikos für den Menschen aus Tierversuchen erfolgen muss. Die Wahl fiel dabei auf die Ratte als Ursprung, da sie in Tierversuchen eine große Relevanz besitzt und zudem innerhalb des BMBF-geförderten Projekts *MetalSafety* (in dessen Rahmen auch die vorliegende Arbeit entstanden ist) *ex vivo*- und *in vivo*-Versuche ebenfalls mit dieser Spezies durchgeführt werden. Auf die Vergleichbarkeit von Mensch und Ratte in toxikologischen Experimenten wird im folgenden Kapitel eingegangen.

2.9 Vergleichbarkeit von Mensch und Ratte in der toxikologischen Untersuchung von Nanomaterialien

Nagetiere, insbesondere Ratten, sind gängige Versuchstiere in toxikologischen Experimenten und werden auch häufig im Bereich der Nanotoxikologie bei Inhalationsstudien eingesetzt. (Rao *et al.*, 2003; Fröhlich und Salar-Behzadi, 2014). Besonders bei der Ermittlung der Toxizität von NM ergeben sich speziesbedingt einige relevante Unterschiede zwischen Mensch und Ratte, die sich auf deren Vergleichbarkeit auswirken (Tabelle 1).

Tabelle 1 Unterschiede des Respirationstrakts von Mensch und Ratte (modifiziert nach Olin, 2000; Fröhlich und Salar-Behzadi, 2014).

CYP: Cytochrom P450.

	Mensch	Ratte
Lungenlappen	Rechts 3, links 2	Rechts 4, Links 1
Größe terminale Bronchien	0,6 mm Weite, 1,68 mm Länge	0,2 mm Weite, 0,35 mm Länge
Clearance-Dauer (Bronchien)	24 h	6-8 h
Größe Alveolen	210 µm	100 µm
CYP Expression		<<
Auftreten von Tumoren		<<
Atemvolumen	500 mL	1 mL
Hauptsächlich deponierte Partikelgröße	2-3 µm	1 µm
Tumore nach Partikelüberladung	nein	ja

Die in Tabelle 1 aufgeführten Unterschiede führen hauptsächlich zu Abweichungen in der Partikeldeposition sowie im Akkumulationsmuster unter den eingeatmeten NM, was zumeist den Hauptgrund für verschiedene Ergebnisse bei den Untersuchungen der beiden Spezies darstellt. Zudem liegen weitere Unterschiede beispielsweise in der Toxikodynamik und der Toxikokinetik vor. Darüber hinaus wird die höhere Sensitivität der Ratte häufig durch die in der Tabelle (Tabelle 1) genannte höhere Expression von Enzymen der CYP (Cytochrom P450)-Familie erklärt (Fröhlich und Salar-Behzadi, 2014). Die ebenfalls erwähnte Partikelüberladung beschreibt ein Phänomen, das zur Unbeweglichkeit der Makrophagen in Ratten führt, und dessen Auftreten im Menschen nicht gesichert ist. Beispielsweise kann sich Kohlestaub in menschlichen Lungen zwar akkumulieren, aber eine Überladung konnte bisher nicht beobachtet werden. Tritt eine Überladung bei Ratten auf, zeigen sie zudem eine stärkere Inflammation und Proliferation von Epithelzellen als Menschen, aber auch als Hamster und Mäuse, was die Ratte zum empfindlichsten Versuchstier macht (Olin, 2000).

Trotz all der genannten Differenzen bildet die Ratte dennoch die pathologischen Merkmale des Menschen nach einer Staubbelastrung ähnlich ab, weshalb sie sich unter Berücksichtigung der soeben beschriebenen Einschränkungen als Tiermodell für die Abschätzung der humanen Risiken eignet. Anatomisch betrachtet wären der Hund sowie Primaten besser geeignete Tiermodelle zur Beurteilung der toxikologischen Auswirkungen, jedoch sind diese Untersuchungen sehr

kostenintensiv (Fröhlich und Salar-Behzadi, 2014). Daher werden Grenzwerte zumeist aus Rattenbasierten *in vivo*-Daten abgeleitet.

Tierversuche stehen bereits seit vielen Jahren aus ethischen Gründen in der Kritik und sind nur schwer mit dem Tierschutz vereinbar. Aus toxikologischer Sicht besteht ebenfalls ein Interesse daran, Versuchstiere einzusparen und es wird daher stetig an der Etablierung adäquater Alternativen zu *in vivo*-Experimenten geforscht. Dies folgt dem 3 R-Prinzip (*refine, reduce, replace*), das die Einsparung von Versuchstieren anstrebt. Eine permanente Herausforderung bei der Anwendung alternativer Methoden ist die Extrapolation der *in vitro* generierten Daten auf die *in vivo*-Situation. Besonders entscheidend für einen geeigneten Vergleich der beiden Modelle ist die Anwendung ähnlicher Dosierungen, aber auch die Vergleichbarkeit der Testmaterialien sowie der gewählte Endpunkt sind relevant (Ma-Hock *et al.*, 2021). In Bezug auf die NM-Testung werden Effekte *in vitro* erst bei höheren Dosen als *in vivo* beobachtet, was die Unterschiede der beiden Modelle verdeutlicht. *In vitro*-Modelle sind weniger komplex und besitzen Schwächen in der Toxikodynamik, Toxikokinetik und der realitätsnahen Exposition von konkreten Zelltypen.

Dementsprechend ist es ein aktuelles Forschungsbestreben diese Schwächen durch neuartige und komplexere Versuchskonzeptionen zu kompensieren. Beispiele hierfür sind unter anderem Zellkulturmodelle aus mehr als zwei Zelllinien, 3D-Zellkulturen, die *air liquid interface*-Kultivierung sowie *organ-on-a-chip*-Modelle (Fröhlich, 2018; Ma *et al.*, 2021).

Darüber hinaus ist es zudem relevant eine gute Datengrundlage aus vergleichbaren *in vivo*- sowie *in vitro*-Studien zu etablieren, die ein besseres Verständnis der Extrapolation der *in vitro* generierten Daten auf die *in vivo*-Situation erlauben, um so in Zukunft in Kombination mit den zuvor beschriebenen neuartigen Untersuchungsmethoden und Experimenten die Anzahl nötiger Tierversuche reduzieren zu können.

3 Fragestellung

Metallbasierte Nanomaterialien finden zunehmend Anwendung in zahlreichen innovativen Prozessen und Produkten. Hierzu zählt beispielsweise der Einsatz als Halbleiter in elektronischen Geräten, als antimikrobieller Zusatz in Kleidung sowie zum Schutz vor UV-Strahlung in Sonnencreme. Neben den seit einigen Jahren bekannten und bereits gut toxikologisch charakterisierten Nanopartikeln nimmt auch der Anteil metallbasierter *Nanowire* in neuen Produkten zu. Diese werden aufgrund der hohen Leitfähigkeit bei gleichzeitiger Transparenz vorwiegend in Touchscreens und Solarzellen verarbeitet. Neben der potentiellen Toxizität der jeweiligen Metallverbindung selbst können die Nanomaterialien zusätzliche adverse Effekte aufgrund ihrer geringen Größe besitzen. Diese bedingt, inwieweit sie nach dem Einatmen in die Lunge eindringen können und ob eine Aufnahme in Zellen stattfinden kann. *Nanowire* bergen darüber hinaus aufgrund ihrer Form zusätzlich die Gefahr eines Faser-spezifischen Wirkmechanismus, wie er von Asbest bekannt ist.

Die toxikologische Untersuchung ausgewählter metallbasierter Nanopartikel sowie *Nanowire* ist Bestandteil des BMBF-geförderten Projekts *MetalSafety*, in dessen Rahmen die vorliegende Dissertation angefertigt wurde. Ziel des Projekts ist es erstmalig einen systematischen Vergleich des Einflusses von Nanomaterialien verschiedener Form und Zusammensetzung auf unterschiedliche pulmonale Zellen in Folge diverser *in vitro*-, *ex vivo*- und *in vivo*-Expositionswege zu untersuchen.

Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt hierbei auf der Identifizierung toxikologischer Wirkprofile *in vitro* in verschiedenen pulmonalen Zellkulturmodellen von Mensch und Ratte, wobei insbesondere mögliche adverse Einflüsse auf die genomische Stabilität untersucht werden sollen. Um eine große Bandbreite verschiedener Materialien zu gewährleisten, sollen Kupfer-, Nickel, und Silber-basierte Nanopartikel und *Nanowire* sowie die Referenzmaterialien CeO₂-, TiO₂-Nanopartikel und *multi walled carbon nano tubes* untersucht werden. Alle Materialien sollen in einem ersten Schritt umfangreich charakterisiert werden, um eine ausreichende Bewertungsgrundlage zu schaffen. Die Materialcharakterisierung soll unter anderem die Bestimmung von physikochemischen Eigenschaften wie den primären und hydrodynamischen Durchmesser, das ζ -Potential, den Polydispersitätsindex sowie die Löslichkeit in relevanten Flüssigkeiten beinhalten. Anschließend soll in systematischen Untersuchungen an pulmonalen *in vitro*-Zellsystemen des Menschen (in Mono- und Kokultur) und der Ratte (in Monokultur) die Zytotoxizität in den Zellmodellen bestimmt werden, was der Auswahl von geeigneten Dosierungen für die weiteren Versuche dienen soll. Die Analyse der

intrazellulären Bioverfügbarkeit der Metallionen sowie deren intrazelluläre Verteilung sollen zusätzliche Hinweise zum *mode of action* liefern. Zur detaillierteren Bestimmung der Wirkmechanismen soll eine etablierte Methode der quantitativen Hochdurchsatz-*Real Time* PCR Anwendung finden, die speziell zur Untersuchung der metallbasierten Nanomaterialien um inflammatorische und fibrotische Marker erweitert werden soll. Darüber hinaus soll zudem ein neues Ratten-Gen-Set, angelehnt an das humane Gen-Set, etabliert werden, um die Untersuchung von Ratten-basierten Proben zu ermöglichen. Hierfür sollen 95 Primerpaare, angepasst auf das Genom der Ratte, designet und auf ihre Spezifität und Effizienz hin geprüft und validiert werden. Zur näheren Betrachtung von genotoxischen Effekten soll zudem die Induktion von DNA-Strangbrüchen mittels alkalischer Entwindung sowie von Mikrokernen über eine durchflusszytometrische Anwendung bestimmt werden.

Die ermittelten Ergebnisse sollen im Anschluss dem Vergleich sowohl der verschiedenen Metallspezies untereinander als insbesondere auch dem Vergleich von Nanopartikel und *Nanowire* dienen, um fundierter Aussagen über die Toxizität von Fasern gegenüber Partikeln treffen zu können. Dies beinhaltet neben dem umfangreichen Vergleich der breiten Auswahl an relevanten Nanomaterialien auch den Einfluss verschiedener Kultivierungsmodelle (Mono- und Kokultur). Darüber hinaus soll der für die Extrapolation von Tierversuchen essentielle Speziesvergleich zwischen Mensch und Ratte durchgeführt werden, der durch die Verwendung entsprechender Zelllinien realisiert werden soll. Dies kann den ersten Schritt in der Untersuchung Spezies-bezogener Unterschiede nach der Inkubation mit Nanomaterialien bilden. Im Rahmen des *MetalSafety*-Projekts sollen diese Untersuchungen die Grundlage für weitere *ex vivo*- und *in vivo*-Studien bilden und zukünftig zur toxikologischen Neubewertung der Materialien beitragen. Ergänzend zur submersen Exposition soll M. Sc. Johanna Wall innerhalb des *MetalSafety*-Projekts durch die *Air Liquid Interface*-Applikation der Nanomaterialien auf pulmonale *in vitro*-Zellsysteme des Menschen potentielle Unterschiede zwischen den genannten Expositionsmodellen identifizieren.

Insgesamt sollen diese umfangreichen Untersuchungen und Vergleiche von Materialien, Formen, Zellkultursystemen und Spezies somit einen neuartigen und umfassenden Ansatz für die Untersuchung von Nanomaterialien darstellen.

4 Material und Methoden

Im folgenden Kapitel werden die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Materialien und Methoden aufgeführt und beschrieben. Eine genaue Auflistung der verwendeten Geräte, Lösungen, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien ist im Anhang unter Kapitel 8.1 zu finden.

4.1 Nanomaterialien

Die physikochemischen Eigenschaften von Nanomaterialien (NM) können sich bezüglich vieler Parameter voneinander unterscheiden. Neben der Größe, der Oberflächenbeschaffenheit, der chemischen Zusammensetzung und der Morphologie spielen auch die Löslichkeit, die Oberflächenladung und Oberflächenmodifikationen eine wichtige Rolle, da sie deren Verhalten und damit die Toxikologie bestimmen. Daher wurden die verwendeten NM einer umfangreichen Charakterisierung der physikochemischen Eigenschaften unterzogen. Hierbei fanden verschiedene Analysemethoden wie die Elektronenmikroskopie oder die dynamische Lichtstreuung (DLS) Anwendung. Eine detaillierte Zusammenstellung dieser Materialien ist in Tabelle 2 zu finden.

Tabelle 2 Zusammenstellung der verwendeten Nanomaterialien.

NP: Nanopartikel. NW: *Nanowire*.

Material	Quelle	Form	Artikel	Lotnummer
CuO NP	PlasmaChem	Pulver	PL-CuO	YF131107
Cu NP	iolitec	Pulver	NM-0016-HP-0025	RNM016006
Cu NW	PlasmaChem	Pulver	PL-CuW50	YF1805291
Ni NP	Sigma-Aldrich	Pulver	577995	MKCG8391
Ni NW	PlasmaChem	Pulver	PL-NiW200	YF161
Ag NP	RAS AG/JRC	Suspension (in Wasser; 10 %wt)	Agpure 10/NM-300K	A10_180926
Ag NW	RAS AG	Suspension (in Ethylenglycol; Stabilisator: Polyvinylpyrrolidon; 4 %wt Ag)	ECOS HC	1375
CeO ₂ NP	JRC	Pulver	NM-212	---
TiO ₂ NP	JRC	Pulver	NM-105	---
MWCNT	JRC	Pulver	NM-401	---

4.1.1 Dispergieren der Nanomaterialien

Zunächst wurde frisch eine 2,56 mg/ml-konzentrierte Stammlösung (S_0) in 0,05 %iger BSA-Lösung hergestellt. Die Herstellung erfolgte nach dem NANOGENOTOX-Protokoll. Hierfür wurde von den pulverförmigen Materialien je 15,36 mg in ein Glasvial eingewogen und anschließend mit 30 μ l Ethanol (96 %) angefeuchtet. Hinzu kamen 5,970 ml der 0,05 %igen BSA-Lösung, um die finale Konzentration zu erreichen. Die beiden Silbermaterialien lagen in Suspension vor, weshalb bei der Herstellung der Stammlösung deren Volumen berücksichtigt und das Volumen der BSA-Lösung entsprechend angepasst wurde. Um eine homogene Suspension zu erhalten, wurde die S_0 -Stammsuspension unterschiedlich behandelt, zumeist mithilfe einer Ultraschallspitze. Dies betraf alle Partikel sowie Ni NW und CNT, die für 13:25 min bei 10 % Amplitude (7179 J) behandelt wurden und Cu NW, die unter denselben Bedingungen für 20 s sonifiziert wurden. Ag NW wurden ausschließlich mittels eines Magnetrührers suspendiert. Um Material und Zeit einzusparen, wurden Aliquote der frischen Stammsuspension in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Auf diese wurde später zurückgegriffen. Hierfür wurden die befüllten Vials direkt in den flüssigen Stickstoff überführt und dort bis zur Verwendung gelagert. Das Auftauen erfolgte durch die Behandlung im Ultraschallbad bei 60 °C für 1 min (Keller *et al.*, 2021).

4.1.2 Physikochemische Eigenschaften

Die physikochemischen Eigenschaften von NM können sich in Bezug auf ihre Größe, Kristallstruktur, spezifische Oberfläche, chemische Zusammensetzung und Ladung und Löslichkeit unterscheiden. Daher wurden die verwendeten Materialien umfassend charakterisiert.

4.1.2.1 Elektronenmikroskopie

Für die Aufnahmen am Elektronenmikroskop wurde 1 μ L der nach 4.1.1 hergestellten Stammsuspension auf ein Kupfer-Gitternetz (TEM-*grid*) aufgebracht. Im Anschluss konnten die NP mithilfe eines Transmissionselektronenmikroskops (TEM) und die NW mithilfe eines Rasterelektronenmikroskops (REM) abgebildet werden. Die TEM-Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Heike Störmer mithilfe des TEM CM 200 FEG (*PHILIPS*) und die REM-Aufnahmen von Dipl.-Ing. Volker Zibat mittels des REM 1530 Gemini LEO (*Zeiss*) angefertigt. Die Auswertung der Größen der NM erfolgte mithilfe der Software *ImageJ*. Pro Material wurden drei TEM-*grids* angefertigt und repräsentative Ausschnitte daraus abgebildet. Hieraus wurden je 300 NM pro Material analysiert und die Mittelwerte bestimmt.

4.1.2.2 Dynamische Lichtstreuung

Mithilfe der DLS (*dynamic light scattering* – Dynamische Lichtstreuung) wurde der hydrodynamische Durchmesser (d_h) und der Polydispersitätsindex (PDI) unter Verwendung des *Zetasizers Nano ZS* (*Malvern*) bestimmt. Gemessen wurden die beiden Parameter in einer 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konzentrierten Suspension in RPMI-1640 Medium (10 % FKS), die frisch aus der Stammsuspension (4.1.1) hergestellt wurde. Die Messungen wurden in Polystyrolküvetten bei 20 °C durchgeführt und die Proben entsprechend vor der Messung äquilibriert. Pro Probe wurden 3 *runs* mit je 20 *subruns* durchgeführt.

4.1.2.3 Zeta-Potential

Mithilfe des Zeta-Potentials ist es möglich eine Aussage über die Stabilität einer Partikelsuspension zu treffen. Hierfür wurde die NM-Suspension in eine gefaltete Kapillarzelle (*Malvern Instruments Ltd*) gefüllt, die zuvor gut mit Wasser und Ethanol gespült wurde. Anschließend konnte die automatisierte Messung erfolgen.

4.1.2.4 Löslichkeit

Die Löslichkeit der NM wurde ermittelt, um den Beitrag der löslichen Fraktion an potentiellen toxischen Effekten abschätzen zu können. Dies wurde über die Auflösungsrate in den physiologisch relevanten Flüssigkeiten RPMI-1640, Ham's F-12, künstliche alveoläre Flüssigkeit (AAF) und künstlicher lysosomaler Flüssigkeit (ALF) analysiert. Die genauen Zusammensetzungen sind im Anhang unter 8.1.2 zusammengefasst. Die Materialien wurden nach der Aufarbeitung (Kapitel 4.1.1) in den jeweiligen Medien auf eine Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ verdünnt. 10 mL Aliquote wurden anschließend in 15 mL Zentrifugenröhrchen abgefüllt und bei 37 °C auf einer Schüttelplatte (150 rpm) für 24 h, 48 h oder 168 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Suspension bei Raumtemperatur und 3000 rcf für 1 h zentrifugiert. Dies führte zu einer ersten Abtrennung ungelöster Bestandteile. Im Anschluss wurden insgesamt 8 mL des Überstandes in 2 mL Aliquoten abgenommen und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, um sie erneut bei Raumtemperatur und 16.000 rcf für 1 h zu zentrifugieren. Von den Überständen wurde je 1 mL entnommen, vereinigt, gemischt und davon 2 mL wiederum zentrifugiert (16.000 rcf, 1 h, Raumtemperatur). Aus dem resultierenden Überstand wurde erneut 1 mL entnommen und auf einem Heizschüttler bei 95 °C eingedampft. Die Probe wurde in 500 μl einer Mischung aus HNO_3 (69 %) und H_2O_2 (31 %) (1:1, v/v) aufgenommen und durch das stufenweise Heizen von 60 auf 95 °C verascht. Der Rückstand wurde in 0,2 %iger HNO_3 gelöst und anschließend der Metallgehalt mithilfe der ICP-MS (Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma) oder der Graphitrohr-AAS

(Atomabsorptionsspektrometrie) bestimmt. Die zusätzliche Messung am DLS (Kapitel 4.1.2.2) bestätigte die erfolgreiche Abscheidung von Partikel- oder Faserrückständen.

Die absolute Quantifizierung der Metallgehalte an der AAS wurden durch eine externe Kalibrierung ermöglicht. Die Bereiche erstreckten sich für Nickel von 0-12 µg/L und für Silber und Kupfer von 0-25 µg/L. Darüber hinaus wurde für die Bestimmung von Silber und Kupfer zusätzlich ein Pd/Mg-Modifizier verwendet, der zusammen mit der Probe (1:5, v/v) in das Graphitrohr gegeben wurde. Die verwendeten Temperaturprogramme sind im Anhang unter 8.1.5 zu finden.

4.1.2.5 Reinheit

Um die Reinheit der NM bestimmen zu können, wurde die Stammsuspension mithilfe eines Heizschüttlers eingedampft, woraufhin der Aufschluss mit 500 µL einer HNO₃ (69 %)/H₂O₂ (31 %)-Mischung (1:1, v/v) erfolgen konnte, indem die Probe kontinuierlich von 60 auf 95 °C erhitzt wurde. Der Rückstand wurde in 0,2 %-iger HNO₃ aufgenommen und an das Institut für Angewandte Geowissenschaften (KIT) übergeben. Dort wurde die Analyse in Kooperation mit Dr. Elisabeth Eiche durchgeführt. Die Messung erfolgte mittels eines Massenspektrometers mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS), wodurch es möglich war, 21 Elemente parallel zu bestimmen.

4.1.2.6 Endotoxintest

Die Prüfung der Materialien auf eine mögliche Verunreinigung mit Endotoxinen ist notwendig, um eine Beeinflussung der Experimente ausschließen zu können. Hierfür wurde das Endotoxintest-Kit *LAL chromogenic endotoxin quantification kit* (Thermo Scientific™) verwendet.

4.2 Zellkulturexperimente

Alle praktischen Arbeiten mit lebenden Zellen wurden zum Schutz vor Kontaminationen in einer Sterilwerkbank mit vertikaler Strömung (*laminar flow*) durchgeführt. Die unter der Sicherheitswerkbank verwendeten Lösungen und Verbrauchsmaterialien waren ebenfalls steril.

4.2.1 Zelllinien und Kultivierung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Zelllinien verwendet. Dabei handelte es sich um zwei Zelllinien humanen Ursprungs und eine weitere Zelllinie, die von der Wanderratte (*rattus norvegicus*) stammt. Hierbei verbinden die Rattenzelllinie RLE-6TN (ATCC CRL-2300) sowie die Humanzelllinie A549 (ATCC CCL-185) ähnliche Charakteristika, da es sich bei beiden um Typ II-Alveolarepithelzellen handelt. Diese Zelllinien wachsen adhärent als Monolayer (Giard *et al.*, 1973; Driscoll *et al.*, 1995). Zusätzlich wurde die humane Monozyten-Zelllinie THP-1 (ATCC TIB-202)

verwendet, die mittels einer Inkubation mit PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) für fünf Tage in Makrophagen-ähnliche Zellen differenziert wurde. Mit der Differenzierung geht auch der Übergang der Suspensionszellen zu adhären Zellen einher. Die differenzierten THP-1-Zellen (dTHP-1) wurden ausschließlich zusammen mit A549-Zellen in einer Kokultivierung eingesetzt. Alle Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultiviert. Als Nährmedium diente für die beiden Humanzelllinien RPMI-1640 unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FKS), 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin. Die RLE-6TN-Zellen wurden in Ham's F-12-Medium unter Zusatz von 10 % FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 µg/mL *bovine pituitary extract*, 5 µg/mL bovines Insulin, 1,25 µg/mL Transferrin, 2,5 ng/mL *insulin-like growth factor 1* sowie 2,5 ng/mL *epidermal growth factor* kultiviert.

Die adhären Zellen wurden alle drei bis vier Tage passagiert. Zu diesem Zeitpunkt wiesen sie eine Konfluenz von etwa 80-90 % auf. Hierfür wurde das Nährmedium entfernt, der Zellrasen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und anschließend mit 0,25 %igem Trypsin (A549) bzw. mit Accutase® (RLE-6TN) von der Zellkulturschale abgelöst. Die Zellen konnten nach ca. 3-5 min Inkubation im Brutschrank in frischem Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt werden. Hierfür wurde das Zellzählgerät CASY® TT zu Hilfe genommen. Eine definierte Anzahl Zellen wurde anschließend in eine frische Zellkulturschale überführt. Für die Untersuchungen wurden A549-Zellen der Passage 20-35 und RLE-6TN-Zellen der Passage 3-13 verwendet. Die Suspensionszelllinie THP-1 wurde einmal pro Woche subkultiviert. Zum Zeitpunkt der Passage betrug die Zelldichte etwa $6-8 \cdot 10^5$ Zellen/ml. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurde eine definierte Zellzahl in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Medium überführt, sodass eine Anfangszelldichte von $2,5 \cdot 10^4$ Zellen/mL erreicht wurde. Die THP-1-Zellen wurden in der Passage 4-18 verwendet.

Kryokonservierung und Inkulturnahme der Zellen

Um im Verlauf der Zellkulturexperimente auf Zellen niedriger Passagenzahl zurückgreifen zu können, wurden Aliquote der verwendeten Zelllinien in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und gelagert. Hierfür wurden je 10^6 Zellen in 1 ml FKS/10 % DMSO (v/v) schonend eingefroren und in Kryotanks überführt. Zur Inkulturnahme wurden die Vials im Wasserbad auf 37 °C erwärmt und zügig in ein Zentrifugenröhrchen mit frischem Zellkulturmedium überführt. Nach der Zentrifugation (1300 rpm, 4 min) wurde der Überstand abgenommen, das Zellpellet in frischem Nährmedium resuspendiert und in ein Zellkulturgefäß überführt.

Mykoplasmentest

Um eine potentielle Kontamination der Zellen mit Mykoplasmen auszuschließen, wurde in regelmäßigen Abständen ein Mykoplasmentest mit allen Zelllinien durchgeführt. Hierfür wurde das *PCR Mycoplasma Test Kit I/C (PromoKine)* verwendet.

4.2.2 Inkubation mit Nanomaterialien

Vorbereitung der Zellkulturen

Die für die Experimente gewählten Zelldichten orientierten sich an der Kultivierung in einem Transwell-System, das für die Exposition an einem *Air Liquid Interface (ALI)* genutzt wird. Hierfür wird ein sehr dichter Zelllayer benötigt, weshalb die ausgestreute Zellkonzentration deutlich höher gewählt wurde als in regulären submersen Versuchen. Dies diente der besseren Vergleichbarkeit mit ALI-Experimenten, die ebenfalls innerhalb des *MetalSafety*-Projekts Anwendung fanden. Die verwendeten Zelldichten sind in Tabelle 3 dargestellt. Für die Konstruktion der Kokultur aus A549- und dTHP-1-Zellen wurden zunächst die A549-Zellen wie beschrieben in die Zellkulturgefäße ausgebracht. Nach 4 h waren die Zellen adhärent und die differenzierten THP-1-Zellen konnten auf die A549-Zellen gegeben werden. Zum Zeitpunkt der Inkubation lag ein Verhältnis von 10:1 (Epithelzellen/Makrophagen) vor (Cappellini *et al.*, 2020).

Tabelle 3 Zelldichten der verschiedenen Zelllinien in den Zellkulturexperimenten.

Die Zelllinie A549 wurde sowohl in Mono- als auch in Kokultur mit derselben Zelldichte verwendet. Für dTHP-1-Zellen wurden unterschiedliche Zelldichten für die Kultivierung als Mono- und Kokultur (Ko) benötigt.

	A549	dTHP-1 (Ko)	dTHP-1 (Mono)	RLE-6TN
Zelldichte [10^5 Zellen/cm ²]	2	0,3	2	4,1

Vorbereitung der Nanomaterialien

Die Herstellung der Inkubationskonzentrationen erfolgte im entsprechenden Nährmedium aus der frischen oder aufgetauten Stammsuspension S_0 . Unabhängig vom Experiment wurden für die Inkubation 312,5 μ l Inkubationsmedium pro cm² Wachstumsfläche verwendet. Als Anhaltspunkt diente dabei eine 96-Well Platte mit 0,32 cm² Wachstumsfläche pro Well, die standardmäßig mit 100 μ l inkubiert wurde. Für die Inkubation wurde das Zellkulturmedium abgenommen und durch das Inkubationsmedium ersetzt.

4.2.3 Bestimmung der Zytotoxizität mittels ATP-Assay

Die akute zytotoxische Wirkung der NM wurde mithilfe des sehr sensitiven ATP (Adenosintriphosphat)-Assays analysiert. Dieser beruht auf der Reaktion von ATP und Luciferin mit Luciferase, wobei Oxyluciferin gebildet und Licht freigesetzt wird. Die Intensität des Lichts ist dabei proportional zum ATP-Gehalt und damit zur Menge an lebenden Zellen (Crouch *et al.*, 1993). Die Viabilität wurde semiquantitativ bestimmt, indem die Probenwerte auf die Negativkontrolle bezogen wurden.

Die Zytotoxizität der Materialien wurde zunächst unter Einsatz von fünf Konzentrationen (1, 5, 10, 50, 100 µg/mL) ermittelt. Hieraus wurden im Anschluss drei Konzentrationen pro Material und Zelllinie ausgewählt, die je einer hohen (ca. 50 %) einer mittleren (20-30 %) und einer niedrigen bzw. keiner Zytotoxizität entsprachen. Eine Zusammenstellung dieser Konzentrationen ist im Anhang in Tabelle 30 unter Kapitel 8.2 oder in den materialspezifischen Kapiteln im Abschnitt 5 (Ergebnisse und Diskussion) zu finden.

4.2.4 Ermittlung der intrazellulären Ionenfreisetzung der Nanomaterialien in den verwendeten Zelllinien

Zur Ermittlung der intrazellulären Ionenfreisetzung wurden die Zellen in einer 12-Well-Platte kultiviert und inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen abgelöst, die Gesamt- und die Lebendzellzahl sowie das Zellvolumen bestimmt und anschließend nach Semisch *et al.* (2014) aufgearbeitet. Hierfür wurden die Zellen zunächst zentrifugiert (3.000 rcf, 3 min, 4 °C), der Überstand abgenommen und das Zellpellet zur Lyse zusammen mit 1 mL RIPA-Puffer für 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 16.000 rcf für 1 h, um Zellfragmente und Rückstände der NM abzutrennen. In 380 µL des Überstandes wurden im Anschluss die gelöste Ionenkonzentration mittels GF-AAS oder ICP-MS bestimmt, wie bereits in Kapitel 4.1.2.4 beschrieben. Um einen NM-Rückstand auszuschließen, wurde eine Messung mittels DLS durchgeführt.

4.2.5 Untersuchung der intrazellulären Ionenverteilung

Zur Bestimmung der intrazellulären Ionenverteilung in Zytoplasma und Zellkern wurde eine Zellfraktionierung mittels *Nuclear Extract Kit* (Active Motif®) angelehnt an Semisch *et al.* (2014) durchgeführt. Die Zellen wurden in 35 mm-Zellkulturschalen kultiviert und nach 24 h inkubiert. Nach weiteren 24 h wurde das Inkubationsmedium abgenommen, der Zellrasen mit 2 mL kaltem PBS/Phosphatase-Inhibitor (PBS/PI) gewaschen und erneut 3 mL PBS/PI zugegeben. Die Zellen wurden anschließend mithilfe eines Zellschabers abgelöst und in ein Zentrifugenröhrchen überführt.

Vor der Zentrifugation (4 °C für 5 min und 200 rcf) wurde mithilfe des CASY®-Zellzählgeräts die Gesamt-, die Lebendzellzahl sowie das mittlere Zellvolumen bestimmt. Der Überstand wurde verworfen.

Für die Extraktion der Zytoplasma-Fraktion wurde das Zellpellet in 250 µL hypotonischer Pufferlösung aufgenommen und in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden anschließend für 20 min auf Eis gelagert, wodurch die Zellmembran anschwellen konnte. Um die Zellmembran anschließend zum Platzen zu bringen, wurden die Proben für 2 min auf einem Vortex-Schüttler gerüttelt und die Vollständigkeit der Zellyse mikroskopisch bestätigt. Im Anschluss wurden die Proben zentrifugiert (30 s, 4 °C, 14.000 rcf), um die Zytoplasmafraktion (Überstand) von der Kernfraktion zu trennen. Die Zytoplasmafraktion wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Das Volumen der Zellkerne wurden vor der Lyse mithilfe des CASY®-Zellzählgeräts ermittelt. Das abzentrifugierte Kernpellet wurde im Anschluss in 25 µL *Complete lysis buffer* (CLB) aufgenommen, 1,25 µL Detergenz zugefügt und für 10 s auf einem Vortex-Schüttler durchmischt. Anschließend wurde die Suspension bei 150 U/min für 30 min auf Eis inkubiert und erneut mithilfe eines Vortex-Schüttlers gemischt. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (10 min, 14.000 rcf, 4 °C) wurde die lösliche Kernfraktion abgeschieden. Diese konnte bei -20 °C bis zur Messung gelagert werden.

Um zu überprüfen, ob die Zellfraktionierung erfolgreich verlaufen ist, wurden im Vorfeld Proteinuntersuchungen in den beiden Fraktionen mittels Western Blot durchgeführt. Die für die Fraktionen spezifischen Proteine α -Tubulin (Zytoplasma) und Lamin b (Zellkern) wurden hierfür mittels Elektrophorese aufgetrennt und über einen Immunoblot nachgewiesen.

4.2.6 Genexpressionsanalysen mittels *High-Throughput* RT-qPCR

Um den Einfluss der verschiedenen NM auf transkriptioneller Ebene untersuchen zu können, wurde eine in der Arbeitsgruppe etablierte *High Throughput* (HT) RT-qPCR-Methode angewandt (Fischer *et al.*, 2016). Hierfür wurden die Zellen in 24-Well-Platten kultiviert und nach 24 h mit den NM oder den korrespondierenden Metallsalzen für weitere 24 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Inkubationsmedium abgenommen, die Zellen abgelöst und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Zur Herstellung eines Zellpellets wurden die Proben zentrifugiert (4 min, 1.400 rpm, 4 °C), der Überstand abgenommen und die Zellen in kaltem PBS resuspendiert. Nach der erneuten Zentrifugation unter denselben Bedingungen wurde der Überstand erneut verworfen und das Zellpellet bei -80 °C gelagert.

4.2.6.1 RNA-Isolierung und -Quantifizierung

Die RNA-Isolierung und auch alle folgenden Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen und auf Eis durchgeführt. Hierfür wurde das *NucleoSpin® RNA Plus Kit* (Macherey Nagel) verwendet. Es wurde nach den Handlungsempfehlungen des Herstellers vorgegangen.

Die Probenpellets wurden aufgetaut, in 350 µL Lysepuffer resuspendiert, gevortext und das Lysat anschließend auf eine *gDNA Removal* Säule überführt. Nach 30 s bei 11000 rcf in der Zentrifuge verblieb die für den weiteren Verlauf unerwünschte gDNA auf der Säule und wurde verworfen. Dem Filtrat wurden 100 µL *Binding Solution* zugefügt und das Gemisch anschließend resuspendiert. Nach der Übertragung auf eine weitere Säule wurde erneut zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Die auf der Säule verbliebene RNA wurde zur weiteren Aufreinigung dreimal gewaschen (200 µL Waschpuffer 1, 600 µL Waschpuffer 2, 250 µL Waschpuffer 2), wobei nach jedem Durchgang zentrifugiert (20 s, 11000 rcf, 4 °C) und das Filtrat verworfen wurde. Im Anschluss wurde die Säule, um Verunreinigungen zu vermeiden, auf ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5 mL) umgesetzt und die RNA mit 30 µL DNase-freiem Wasser von der Säule eluiert (Zentrifugation bei 11000 rcf für 1 min). Um die Ausbeute an RNA zu steigern, wurde das Eluat erneut auf die Säule gegeben und zentrifugiert (11000 rcf für 1 min). Die extrahierte RNA konnte anschließend bis zur weiteren Verwendung für bis zu zwei Wochen bei -80 °C gelagert werden. Vor der cDNA-Synthese erfolgte die Bestimmung der Reinheit und die Quantifizierung der RNA mittels NanoQuant-Platte am *Infinite M200 Pro* (Tecan) bei 260 nm in Doppelbestimmung. Nach dem die Platte geblankt wurde, erfolgte die Messung von je 2 µL Probe. Zur Gewährleistung der Probenreinheit, wurde der Quotient von RNA zu Proteinen (260 nm/280 nm) herangezogen, der für eine ausreichende Reinheit >2,0 betragen musste.

4.2.6.2 cDNA-Synthese

Das Umschreiben der RNA in cDNA wurde mithilfe des *qScript cDNA Synthesis Kit* (Quantabio) durchgeführt. Von jeder Probe wurden dabei zwei technische Replikate mitgeführt, die unabhängig voneinander umgeschrieben und auch im weiteren Verlauf der Analyse separat behandelt wurden. Pro Replikat wurden je 1 µL *iScript Reverse Transkriptase*, 4 µL *Reaction Mix (5x)* und 1 µg RNA eingesetzt und der Ansatz auf 20 µL mit Nuklease-freiem Wasser ergänzt. Das Reaktionsgemisch wurde zentrifugiert, kurz gevortext, erneut zentrifugiert und anschließend in den Thermocycler überführt. Die cDNA konnte im Anschluss für mehrere Wochen bei -20 °C gelagert werden.

Tabelle 4 Temperaturprogramm der cDNA-Synthese.

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

4.2.6.3 Präamplifikation

In diesem Schritt werden die Genabschnitte, die später Target in der HT RT-qPCR sein werden, bereits vorab amplifiziert, um eine ausreichende Templatemenge zu gewährleisten. Hierfür wurde ein *Pooled Primer Mix* aus allen Primerpaaren des Gen-Sets der Hochdurchsatz-PCR hergestellt und auf eine Konzentration von 500 nM eingestellt. Zu 0,5 µL des *Pooled Primer Mix* wurden 2,5 µL *TaqMan PreAmp Master Mix (2x)*, 1,25 µL cDNA und 0,75 µL PCR-zertifizierte Wasser gegeben. Neben den Proben wurden auch Kontrollen mit RNA bzw. mit Wasser statt cDNA mitgeführt. Die Präamplifikation lief nach dem folgenden Temperaturprogramm ab:

Tabelle 5 Temperaturprogramm der Präamplifikation.

Initiale Denaturierung	10 min	95 °C	12 Zyklen
Denaturierung	15 s	92 °C	
Annealing und Elongation	4 min	60 °C	
∞		4 °C	

Im Anschluss an die Präamplifikation wurde ein Exonuklease-I-Verdau durchgeführt, um einzelsträngige DNA wie ungebundene Primer und Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) zu entfernen. Pro Ansatz wurden 0,2 µL Exonuklease Reaktionspuffer (10x), 0,4 µL Exonuclease I (20 Einheiten/µL) und 1,4 µL PCR-zertifiziertes Wasser direkt zur Probe gegeben. Der Verdau verlief im Thermocycler nach dem folgenden Temperaturprogramm:

Tabelle 6 Temperaturprogramm des Exonukleaseverdaus.

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

Im nächsten Schritt wurden die Proben 1:5 mit TE-Puffer verdünnt, indem zu jeder Probe 18 µL des Puffers pipettiert wurden. Anschließend wurden die Proben sehr gut durchmischt und bei -20 °C eingefroren.

4.2.6.4 Primer- und Probenvorbereitung

Die Primer wurden auf eine Konzentration von 5 μM verdünnt, indem zu 2,5 μL des Primerpaars (100 μM) 25 μL *2x Assay Loading Reagent* und 22,5 μL *DNA-Suspensionspuffer* gegeben wurden. Zusätzlich zu den 95 Primerpaaren wurde im Gen-Set eine *No reaction control* mitgeführt, der PCR-zertifiziertes Wasser statt Primer zugesetzt wurden. Der Reaktionsmix wurde bei -20 °C gelagert.

Zur Probenvorbereitung wurden je 2,25 μL der verdünnten Probelösung mit 2,5 μL *2x SsoFast EvaGreen Supermix with Low ROX* und 0,25 μL *20x DNA Binding Dye Sample Loading Reagent* vereint, gut gemischt und zentrifugiert. Darüber hinaus wurde eine *No template control* mitgeführt, die statt der Probelösung PCR-zertifiziertes Wasser enthält.

4.2.6.5 Dynamic Array

Im ersten Schritt der Vorbereitung des *Dynamic Array IFC (integrated fluidic circuits)* von Fluidigm wurden beide Akkumulatoren mit 150 μL *Control Line Fluid* beladen und das *Dynamic Array* anschließend in den *IFC Controller HX* (Fluidigm) überführt. Dort fand das Primern statt, währenddessen die Kontrollflüssigkeit in die Kanäle gedrückt wurde. Nach Ablauf des Programms wurde das *Dynamic Array* manuell mit den Primer- und Probengemischen beladen, indem je 5 μL in die hierfür vorgesehenen Kavitäten pipettiert wurden. Dabei wurde darauf geachtet, die Luftblasenbildung so gering wie möglich zu halten. Während des anschließenden Programms *Loas Mix* im *IFC Controller HX* erfolgte die Zusammenführung der Proben und Primer in den Reaktionskammern des *Dynamic Arrays*. Im Anschluss an das Programm wurden anhaftende Staubpartikel von der Oberfläche des *Dynamic Arrays* entfernt und letzteres in das BioMark™-System von Fluidigm überführt. Dort fand die qPCR mit anschließender Schmelzkurvenanalyse nach folgendem Temperaturprogramm statt:

Tabelle 7 Temperaturprogramm der HT RT-qPCR und anschließender Schmelzkurvenanalyse.

Thermale Durchmischung	2400 s	70 °C	30 Zyklen
	30 s	60 °C	
Initiale Durchmischung	60 s	95 °C	
	20 s	60 °C	
PCR	30 s	96 °C	
	3 s	60 °C	
Schmelzkurve	1 °C / 3 s	Bis 95 °C	

4.2.6.6 Datenanalyse

Die Auswertung der Rohdaten der HT RT-qPCR wurde mithilfe der Software *Fluidigm Real-Time PCR Analysis* absolviert. Zu Beginn wurde über den passiven Referenzfarbstoff *ROX* die gleichmäßige Beladung der Reaktionskammern überprüft. Im Anschluss wurde für die Feststellung der C_q -Werte der Proben das Fluoreszenzsignal des DNA-interkalierenden Farbstoffs *EvaGreen* ausgewertet. Dessen Signalintensität ist proportional zur Amplifikatmenge. Die Daten wurden in einer *Heatmap* übersichtlich dargestellt, was auch die Möglichkeit einer optischen Qualitätskontrolle bot, wobei insbesondere Wert auf die Negativkontrollen gelegt wurde. Ein weiterer Anhaltspunkt für mögliche Ungereimtheiten stellten auch die Graphen der Schmelzkurvenanalyse dar.

Nachfolgend wurden die C_q -Werte in der Software *GenEx* weiter verarbeitet. In mehreren Prozessierungsschritten wurde unter anderen ein *Cut-off* der C_q -Werte bei 27 gesetzt sowie die optimale Auswahl an Referenzgenen durchgeführt. Die relative Genexpression wurde im Anschluss mit der $\Delta\Delta C_q$ -Methode ermittelt (Livak und Schmittgen, 2001), wobei zu Beginn eine Normierung mit den ausgewählten Referenzgenen stattfand. In nächsten Schritt wurde die unbehandelte Kontrolle subtrahiert, die auf einen Wert von 1 festgelegt wurde.

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

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

$$\text{Veränderung} = 2^{-\Delta\Delta C_q} \quad (3)$$

Abschließend wurden die \log_2 -Werte der Proben berechnet, wobei die unbehandelte Kontrolle auf den Wert 0 festgelegt wurde. In Anlehnung an die einschlägige Literatur wurden als relevante Änderung der Genexpression \log_2 -Werte von $< -1,5$ sowie $> +1,5$ angesehen (Andrew *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2012).

4.2.7 Etablierung eines Gen-Sets zur Untersuchung der Genexpression der Spezies *rattus norvegicus* sowie Ergänzung des bestehenden Gen-Sets um inflammatorische und fibrotische Marker

Um die Fragestellung nach dem Wirkmechanismus der Toxizität der NM besser beantworten zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst das bestehende Gen-Set zur Untersuchung humaner Zellproben um inflammatorische und fibrotische Marker ergänzt. Konkret handelte es sich um die Gene *CCL22*, *PTGS2* (*COX2*), *IL-1a*, *IL-1b* und *TNF-a* als inflammatorische Marker und *ACTA2*,

COL1A1, *CTNNB1*, *FN1*, *OPN*, *PDGFA*, *TGF- β* , *TIMP1* und *VIM* als fibrotische Marker. Das neu zusammengestellte Gen-Set ist in Anhang unter 8.4.2 zu finden.

Das Gen-Set zur Untersuchung der Genexpression von Rattenzellen wurde in Anlehnung an das Gen-Set für Humanzellen zusammengestellt. Allerdings war es bei einigen Genen nicht möglich korrespondierende Primer für das Ratten-Genom zu finden und in seltenen Fällen existierte kein Ortholog. Gene, die nicht übernommen werden konnten waren *ACTB*, *GAPDH*, *MT2A*, *BAX*, *PMAIP1*, *DDIT3* und *RRM2B*. Das vollständige Gen-Set ist unter 8.3.2 zusammengefasst.

4.2.7.1 Bewertung der Primer-Spezifität

Zur Analyse der Primer-Spezifität wurde eine konventionelle qPCR mit einem 1 μ L Primer-Paar, 1 μ L einer randomisierten cDNA und 10 μ L *SsoFast EvaGreen Supermix with low ROX* durchgeführt. Der Ansatz wurde auf 20 μ L mit PCR-zertifiziertem Wasser ergänzt. Zudem wurde eine NTC mitgeführt, der Wasser statt cDNA zugefügt wurde. Die qPCR lief nach folgendem Temperaturprogramm ab:

Tabelle 8 Temperaturprogramm der qPCR mit anschließender Schmelzkurvenanalyse zur Untersuchung der Primer-Spezifität.

Initiale Durchmischung	60 s	95 °C	40 Zyklen
Denaturierung	5 s	96 °C	
Annealing und Elongation	20 s	60 °C	
Schmelzkurve	3 s	65 °C	
	1 °C / 5 s	Bis 95 °C	

Im Anschluss wurde zur Untersuchung der Amplifikate eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierfür wurden je 7,5 μ L des PCR-Produkts mit 1,5 μ L Ladepuffer versetzt und in einem 2 %igen Agarosegel (2 g Agarose, 100 mL TAE-Puffer, 10 μ L Gel-Red) aufgetrennt (110 V, 75 min). Anschließend konnte die Detektion mittels Fluoreszenzmessung am LAS 3000 erfolgen.

4.2.7.2 Bewertung der Primer-Effizienz

Zur Bewertung der Primer-Effizienz wurde zunächst eine Präamplifikation und ein anschließender Exonukleaseverdau (Kapitel 4.2.6.3) durchgeführt. Aus dem daraus erhaltenen PCR-Produkt wurde anschließend eine Verdünnungsreihe angesetzt und diese einer konventionellen qPCR (Kapitel 4.2.7.1) unterzogen. Neben der unverdünnten DNA wurden die Verdünnungsschritte 1:5, 1:10, 1:50, 1:100 und 1:200 verwendet. Die Auswertung erfolgte nach Raymaekers *et al.* (2009).

4.2.8 Quantifizierung von DNA-Strangbrüchen

Zur Quantifizierung von DNA-Strangbrüchen wurde die Alkalische Entwindung (AU) angewandt (Hartwig *et al.*, 1993). Hintergrund dieser Methode ist die Entwindung der DNA in alkalischem Milieu, die immer von DNA-Enden ausgeht. Die Inkubation mit der alkalischen Lösung für exakt 30 min ist dabei entscheidend, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Nach verschiedenen Aufarbeitungsschritten können schlussendlich DNA-Einzelstränge (ssDNA) von DNA-Doppelsträngen (dsDNA) durch eine Hydroxylapatit-Chromatographie getrennt, angefärbt und quantifiziert werden. Die Anzahl an DNA-Strangbrüchen wird im Anschluss aus dem Verhältnis dsDNA zu ssDNA berechnet werden.

Für diese Versuche wurden die Zellen in 24-Well-Platten ausgestreut und wie in 4.2.2 angegeben inkubiert. Dabei wurden je Dosis drei Replikate mitgeführt. Eine Stunde vor Ende der Inkubationszeit wurde die Positivkontrolle mit 100 μ M Menadion behandelt. Nach 24 h wurde das Inkubationsmedium abgenommen, kaltes PBS zugegeben und die Platte auf Eis gelagert. Zur Entwindung der DNA wurde das PBS wieder abgenommen und jedes Well mit 750 μ L alkalischer Lösung (pH 12,3) versetzt. Nach genau 30 min wurde die Lösung mit 0,1 M HCl auf einen pH-Wert von 6,8 neutralisiert und mittels einer Ultraschallspitze für 15 s sonifiziert (konstante Sonifizierung bei 10 % Amplitude). Im Anschluss wurde die Probelösung mit 15 μ L einer 10 %igen SDS-Lösung stabilisiert. Bis zur Hydroxylapatit-Chromatographie konnte die DNA-Lösung bei -20 °C gelagert werden.

Alle Lösungen, Puffer und Proben sowie die Säulen während der Chromatographie wurden auf 60 °C erwärmt. Die Zusammensetzung der jeweiligen Lösungen sind im Anhang unter 8.1.2 zu finden. Zur Vorbereitung der Chromatographie-Säulen wurde eine Hydroxylapatit-Suspension (0,1 g/mL) in 0,01 M Natriumpuffer (NaP) für 30 min bei 60 °C äquilibriert. Anschließend wurde pro Säulen 1 mL der Suspension zwischen zwei Glasfaserfiltern eingefüllt und mit 0,5 M Kaliumpuffer (KP) gewaschen. Es folgte eine Konditionierung der Säulen mit 0,01 M NaP, woraufhin die Proben aufgegeben wurden. Die Probe wurde ebenfalls mit 0,01 M NaP gespült und anschließend eluiert. Hierfür wurde zunächst die ssDNA mit 0,15 M KP und anschließend die dsDNA mit 0,35 m KP in unterschiedliche Wells einer 24-Well-Platte von der Säule gespült. Die DNA-Lösungen wurden im Anschluss bei Raumtemperatur mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 angefärbt (Absorption bei 360 nm, Emission bei 455 nm). Die Fluoreszenz wurde nach genau 20 min mithilfe eines Mikrotiterplattenlesegeräts gemessen. Zusätzlich zu den Proben wurden Blindproben der Elutionspuffer mitgeführt.

Zur Berechnung der Strangbrüche wurde zunächst die Fluoreszenz des Elutionspuffers von den Probenwerten abgezogen. Da der Fluoreszenzfarbstoff stärker in dsDNA interkaliert, musste außerdem der Korrekturfaktor 2,1 eingerechnet werden (Hartwig *et al.*, 1993). Aus diesen Werten konnten im Anschluss die Anzahl der Strangbrüche pro 10^6 Basenpaare (bp) berechnet werden, indem die Probenwerte auf die unbehandelte Kontrolle bezogen wurden und zudem ein Umrechnungsfaktor miteinbezogen wurde. Dieser Faktor wurde in vorangegangenen Arbeiten anhand einer Kalibriergeraden ermittelt (Hartwig, 1996) und im Zuge einer wissenschaftlichen Abschlussarbeit für A549-Zellen angepasst. Dieser Wert konnte auch für die weiteren Zellmodelle verwendet werden.

$$F = F_{\text{Probe}} - F_{\text{Blindwert Elutionspuffer}} \quad (4)$$

$$\text{Anteil dsDNA} = F_{\text{dsDNA}} / (F_{\text{dsDNA}} + 2,1 * F_{\text{ssDNA}}) \quad (5)$$

$$\text{Strangbrüche pro } 10^6 \text{ bp} = -\ln(\text{Anteil dsDNA}_{\text{Probe}} / \text{Anteil dsDNA}_{\text{Kontrolle}}) * 17587 \quad (6)$$

F = Fluoreszenz. dsDNA = doppelsträngige DNA. ssDNA = einzelsträngige DNA. bp = Basenpaare.

4.2.9 Durchflusszytometrische Bestimmung der Induktion von Mikrokernen

Die Bestimmung von Mikrokernen (MN) erfolgte mithilfe der Fluoreszenzfarbstoffe EMA (Ethidium-Monoazidbromid) und SYTOX Green. So war es möglich, apoptotische und nekrotische Zellen von viablen Zellen mit einer intakten Zellmembran zu unterscheiden. EMA dringt durch beschädigte Zellmembranen in das Zellinnere ein und bindet an die DNA dieser Zellen. Später in der Analyse werden EMA-gefärbte Zellen von der Auswertung ausgeschlossen. Nach der Lyse der Zellen wurden diese zusätzlich mit SYTOX Green angefärbt. In der durchflusszytometrischen Analyse wurden nur Zellen betrachtet, die ausschließlich ein SYTOX Green-Signal und kein EMA-Signal aufwiesen, da sie zum Zeitpunkt des Versuchsabbruchs eine intakte Zellmembran aufwiesen und somit als viabel galten.

Der Versuchsansatz erfolgte im Hochdurchsatzformat in einer 96-Well-Platte. Hierfür wurden pro Well 5.000 A549-Zellen ausgestreut. Die abweichende Zelldichte im Vergleich zu anderen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Zellkulturexperimenten hatte methodische Gründe. Nach 24 h erfolgte die Inkubation mit den NM sowie mit der Positivkontrolle Mitomycin C (MMC) für weitere 24 h. Am Tag 3 schließlich wurde der Versuch abgebrochen, indem die Inkubationsmedien abgenommen wurden und frisches Nährmedium in die Wells gegeben wurde. Es folgte ein Nachinkubationszeitraum für weitere 24 h, während dessen die Zellen einen weiteren Zellzyklus durchlaufen und sich potentiell MN ausbilden.

Nach Ablauf der Nachinkubationsdauer wurde die Zellkulturplatte für 20 min auf Eis gekühlt und anschließend das Medium abgenommen. Es folgte die EMA-Färbung (8,5 µg/mL in Puffer (2 % FKS in PBS)) für 15 min auf Eis unter einer Kaltlichtlampe (1000 W), um den Farbstoff zu aktivieren und kovalent an die DNA zu binden. Im Anschluss wurde die Farbelösung abgenommen und die Wells mit kaltem Puffer gewaschen. Nach der Zugabe der Lyselösung 1 (enthielt 0,05 µM SYTOX Green und 0,5 mg/mL RNase) wurde die Platte für 1 h im Zellkulturinkubator inkubiert. Im nächsten Schritt wurde zur Lyselösung 1 die Lyselösung 2 gegeben, die ebenfalls mit SYTOX Green versetzt war. Durch leichtes Resuspendieren wurden die beiden Lösungen miteinander gemischt. Die Platte wurde danach erneut für 30 min bei Raumtemperatur und in Dunkelheit inkubiert.

Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer *LRSII Fortessa™* (BD Biosciences) in Kombination mit einem HTS (*High Throughput Sampler*)-Modul. Pro Well wurden 1000 Events analysiert (Exzitation des Lasers: 488 nm, SYTOX-Signal: Bandpassfilter Emission 530/30 nm, EMA-Signal: Bandpassfilter Emission 575/26 nm). Die Gates wurden in enger Anlehnung an Avlasevich *et al.* (2006) gesetzt. Sie dienen dazu, intakte Zellen mit MN von Zellen ohne MN oder apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen zu unterscheiden. Hierfür mussten sechs verschiedene Gates gesetzt werden. Nur wenn ein Event alle sechs Kriterien erfüllte, wurde es als Zellkern oder MN erfasst. Beispielhaft ist das finale Gate in Abbildung 4 dargestellt. Die MN können aufgrund ihrer geringen Größe und einem daraus resultierenden 100-fach kleinerem SYTOX-Fluoreszenzsignal von den Zellkernen unterschieden werden.

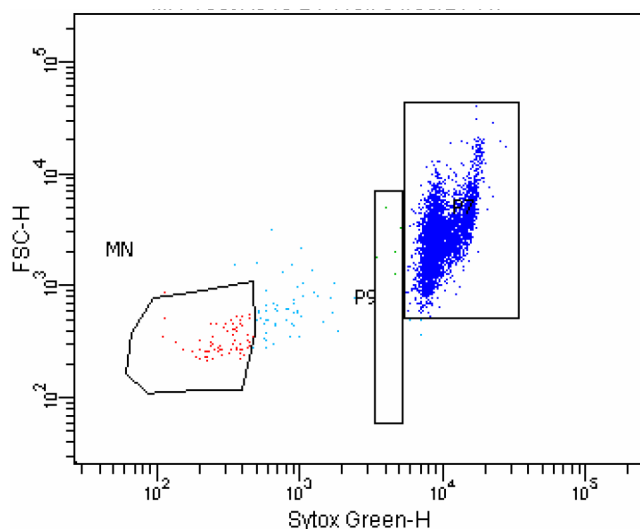


Abbildung 4 Beispielhafte Darstellung der finalen Gate-Setzung.

Durch die Auftragung des Vorwärtsstrellichts (FSC) gegen das SYTOX Green-Signal können im letzten Schritt Mikrokerne (MN, rot) von Zellkernen (P7, blau) und hypodiploiden Kernen (P9, grün) unterschieden werden.

Statt der Standardträgerflüssigkeit wurden für die Versuche am HTS-Modul eine 0,9 %ige NaCl-Lösung verwendet, um Schwankungen im SYTOX Green-Signal zu vermeiden (Bryce *et al.*, 2013). Die Geräteeinstellungen während der Messung am HTS-Modul sind im Anhang 8.1.5 zu finden.

4.2.10 Statistik

Die Darstellung der Ergebnisse innerhalb der vorliegenden Dissertation erfolgte als Mittelwerte der unabhängigen Versuche \pm Standardabweichung. Zur Ermittlung von Abweichungen zwischen den Mittelwerten wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) verwendet, gefolgt von dem Dunnett T Post-hoc-Test.

5 Ergebnisse und Diskussion

Im nun folgenden Kapitel werden die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse dargestellt und diskutiert. Zunächst wird ein Überblick über die Primer-Etablierung für die Genexpressionsanalyse gegeben, anschließend folgen die Ergebnisse aus den Untersuchungen von Nanomaterialien (NM), die nach Metallen aufgeteilt sind. Hierbei werden zuerst die Ergebnisse der verschiedenen Versuche dargestellt und in die bereits bestehende Literatur eingeordnet. Anschließend erfolgt jeweils eine versuchsübergreifende Diskussion der Ergebnisse des jeweiligen Materials. Insgesamt soll somit der Einfluss der metallbasierten Nanopartikel (NP) sowie der neuartigen *Nanowire* (NW) auf verschiedene Lungen-basierte Zellsysteme mit Fokus auf eine veränderte Genexpression sowie eine genotoxische Wirkung hin analysiert und eingeordnet werden, um literaturbekannte Wirkmechanismen zu bestätigen und neue aufzudecken.

Teile der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit entstanden in enger Zusammenarbeit mit M. Sc. Johanna Wall im Rahmen des BMBF-geförderten Forschungsprojekts *MetalSafety*.

5.1 Etablierung eines Gen-Sets zur Untersuchung der Genexpression der Spezies *rattus norvegicus* sowie Ergänzung des bestehenden humanen Gen-Sets um inflammatorische und fibrotische Marker

Eine zentrale Analysemethode im Rahmen dieser Arbeit stellte die HT RT-qPCR (Hochdurchsatz Reverse Transkriptase quantitative Echtzeit-PCR) dar. Mithilfe dieser Methode ist es möglich, zeitgleich die Expression von 95 Genen in 96 Proben zu analysieren, um Genexpressionsprofile von potentiell toxischen Substanzen zu erstellen (Fischer *et al.*, 2016). Da das bestehende und etablierte Gen-Set inflammatorische sowie fibrotische Marker nur in geringem Ausmaß einschloss, lag ein Fokus auf der Erweiterung des Gen-Sets hinsichtlich entsprechender Markergene und damit einhergehend auf dem Design und der Etablierung neuer Primer. Zudem war es notwendig, das gesamte Gen-Set abgestimmt auf das Transkriptom der Ratte zu reproduzieren, um auch Rattenzellproben untersuchen zu können.

5.1.1 Auswahl der Gene und Design der Primerpaare

Zur Ergänzung des humanen Gen-Sets wurden die wichtigsten Inflammations- und Fibrosemarker basierend auf einer ausführlichen Literaturrecherche ausgewählt. Dies erfolgte in Zusammenarbeit mit M.Sc. Alexandra Friesen im Rahmen des BMBF-geförderten Schwesternprojekts *Carbon Fibre*

Cycle. Für das Ratten-spezifische Gen-Set war der Anspruch, das humane Gen-Set bestmöglich abzubilden, um eine Vergleichbarkeit zwischen transkriptionellen Daten aus humanen und Ratten-basierten Proben zu gewährleisten. Hierfür wurde ebenfalls eine umfangreiche Literaturrecherche durchgeführt, um die Orthologie, Funktionalität und Induzierbarkeit der Gene sicherzustellen. Es stellte sich heraus, dass die meisten Gene des humanen Gen-Sets Orthologe im Genom der Ratte aufweisen. Ein Umweg musste beispielsweise beim humanen *IL-8* genommen werden, da die Ratte hierfür kein orthologes Gen besitzt. Dies wurde mit Primern für das *CXCL1*-Gen ersetzt (Mukaida, 2003). Die finale Zusammenstellung der beiden Gen-Sets sind im Anhang unter 8.4 zu finden.

Das Primer-Design erfolgte mithilfe der Software *Beacon Designer 8* (Version 8.20, *PREMIER Biosoft*). Zuvor wurde für jedes Gen in verschiedenen Datenbanken (*NCBI*, *ensembl* und *Rat Genome Database*) die Anzahl und Beschaffenheit vorhandener Transkriptvarianten, Lage von Exon-Exon-Schnittstellen sowie die Größe der beim Spleißen entfernten Introns ermittelt. Beim Designen selbst wurden verschiedene Kriterien vorausgesetzt: Die Primer sollten eine Länge von mindestens 17 Basenpaare (bp) umfassen, einen GC-Gehalt von 40-60 % sowie eine Schmelztemperatur zwischen 55 und 80 °C besitzen, wobei die beiden Primer des Paares möglichst ähnliche Schmelztemperaturen aufweisen sollten. Außerdem müssen Homologien zu anderen Genen und das Ausbilden von Sekundärstrukturen innerhalb des Primers oder des Amplikons ausgeschlossen werden. Um das unerwünschte Anlagern an genomische DNA zu verhindern, sollten die Primer eine Exon-Exon-Schnittstelle umfassen. Dabei ist eine Intron-Größe von > 700 bp optimal (Raymaekers *et al.*, 2009). Einige RNA-Sequenzen konnten die geforderten Kriterien nicht uneingeschränkt erfüllen, weshalb manche Primerpaare kein Intron und andere ein kürzeres Intron umspannen. Dennoch konnte die Spezifität der betroffenen Primerpaare mithilfe der Validierungsarbeiten nachgewiesen werden. Andere RNA-Sequenzen konnten allerdings essentielle Kriterien wie die Abwesenheit von Homologien zu anderen Bereichen des Genoms nicht erfüllen. Die entsprechenden Gene konnten daher nicht in das Gen-Set aufgenommen werden. Dies betraf u.a. die Referenzgene *ACTB* und *GAPDH*, die deshalb mit Primern für die Gene *MARCHF5* und *MAPK14* ersetzt wurden (Cai *et al.*, 2007).

5.1.2 Untersuchung der Primer-Spezifität und der Primer-Effizienz

Die neu designten Primerpaare mussten einer Spezifität- und Effizienzprüfung unterworfen werden, um sicherzustellen, dass sie zum einen nur an das ausgewählte Gen binden und zum anderen in jedem PCR-Zyklus das Amplikon verdoppeln. Die Spezifität zum jeweiligen Zielgen wurde mithilfe einer Agarose-Gelelektrophorese und anschließender Fluoreszenzdetektion überprüft, der eine

konventionelle PCR vorangestellt war. Hierfür wurde kommerziell erworbene randomisierte cDNA, entweder vom Mensch oder von der Ratte, verwendet. In Abbildung 5 ist eines der Agarosegele exemplarisch dargestellt.

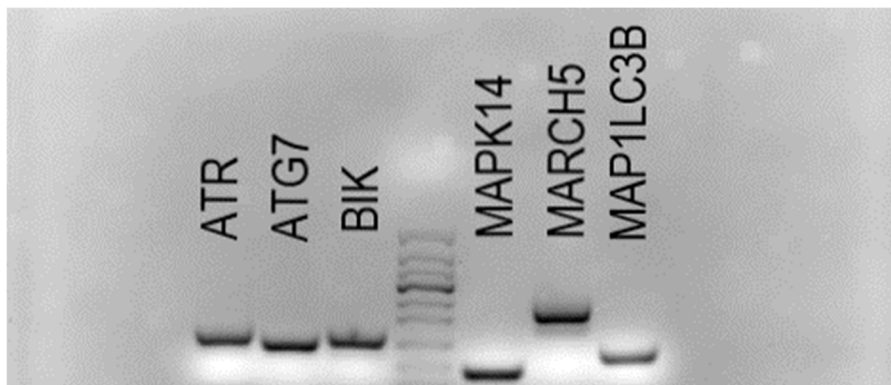


Abbildung 5 Exemplarische Darstellung eines Agarosegels zur Ermittlung der Spezifität von Primerpaaren im Rahmen der Etablierung eines Gen-Sets zur Untersuchung von Rattenproben.

Beispielhaft sind die Resultate der Primerpaare für die Gene *ATR*, *ATG7*, *BIK*, *MAPK14*, *MARCH5* und *MAP1LC3B* dargestellt. Auf der mittleren Position wurde eine DNA-Leiter aufgetragen, um die Ampikonglängen abschätzen zu können.

Die Übereinstimmung der detektierten und der theoretischen Ampikonglänge sowie die Abwesenheit von zusätzlichen Banden bestätigte die Spezifität der Primerpaare. In einem weiteren Schritt wurde die Effizienz mittels einer cDNA-Verdünnungsreihe, die sechs Kalibrierpunkte umfasste, und mithilfe einer konventionellen qPCR untersucht. Die im Anschluss erhaltenen C_q -Werte konnten mittels linearer Regression sowie der Formel $E = 10^{(-1/m)-1}$ in die Effizienz (E) umgerechnet werden, wobei m die Steigung der Regressionsgeraden darstellt (Raymaekers *et al.*, 2009). Neben der Effizienz wurde auch der Korrelationskoeffizient R^2 der Regressionsgeraden bewertet. Hierbei wurden Werte zwischen $0,99 \leq R^2 \leq 0,999$ und im Falle der Effizienz Werte von $0,9 \leq E \leq 1,1$ akzeptiert (Raymaekers *et al.*, 2009). Es wurden ausschließlich Primer in die Gen-Sets aufgenommen, die diese Kriterien erfüllen konnten. Insgesamt konnten hierbei 15 Primerpaare für das humane Gen-Set sowie ein vollständiges Gen-Set von 95 Genen zur Untersuchung von Ratten-Proben etabliert werden. Diese bilden zusammen mit den bereits vorhandenen Primerpaaren (veröffentlicht in Fischer *et al.*, 2016) die Basis für die Genexpressionsanalysen der vorliegenden Arbeit. Hierbei werden folgende Gencluster abgedeckt: Referenzgene, Fremdstoffmetabolismus, Inflammation, Fibrose, Metallhomöostase, oxidative Stressantwort, DNA-Schadensantwort und Reparatur sowie apoptotische Faktoren und Zellzyklusregulation. Die Etablierungsdaten sowie die finalen Gen-Sets sind im Anhang unter 8.3 und 8.4 zusammengestellt.

5.2 Kupferverbindungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Kupfer-basierte NM verwendet und umfangreich auf ihre physikochemischen Eigenschaften, ihre Zytotoxizität in ausgewählten Zellsystemen, ihre Bioverfügbarkeit und intrazelluläre Verteilung sowie ihren Einfluss auf die genomische Stabilität hin untersucht. Bei den Materialien handelte es sich um Kupfernanowire (Cu NW, *PlasmaChem*, PL-CuW50), metallische Kupfernanopartikel (Cu NP, *iolitec*, NM-0016-HP-0025) sowie Kupferoxidnanopartikel (CuO NP, *PlasmaChem*, PL-CuO). Zudem wurde eine lösliche Kupferverbindung, CuCl_2 , im Folgenden zumeist als Cu_{aq} bezeichnet, mitgeführt, um den Einfluss von Ioneneffekten besser beurteilen zu können.

Auf die einzelnen Analysemethoden wird ausschließlich im nun folgenden Kapitel (5.2) genauer eingegangen, um Wiederholungen zu vermeiden.

5.2.1 Materialcharakterisierung

Die Ergebnisse zur Materialcharakterisierung entstanden in Zusammenarbeit mit M. Sc. Johanna Wall, Dr. Matthias Hufnagel sowie der BASF SE im Rahmen des BMBF-geförderten Projekts *MetalSafety* und wurden bereits veröffentlicht unter Wall *et al.* (2021).

Die Materialcharakterisierung umfasste zunächst den hydrodynamischen Durchmesser (d_h), den Polydispersitätsindex (PDI) und das Zeta (ζ)-Potential, die mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) bestimmt wurden. Für die DLS-Messungen wurden die Materialien aufgearbeitet (Kapitel 4.1.1) und auf 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in RPMI-1640 mit 10 % FKS verdünnt.

Zur Ermittlung des d_h wird kohärentes und monochromatisches Licht eines Lasers in die Probe geleitet. Dort wird es von den NM gestreut und von einem Detektor analysiert. Aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung befindet sich die Suspension ständig in Bewegung und führt zu zeitabhängigen Fluktuationen des Streulichts, deren Ausmaß in Relation zur Partikelgröße steht. Hieraus kann der Diffusionskoeffizient errechnet werden und im Anschluss über die Stokes-Einstein-Beziehung der d_h . Dieser beschreibt somit den hypothetischen Durchmesser eines Partikels, der mit derselben Geschwindigkeit durch das untersuchte Lösemittel diffundiert wie das betrachtete Teilchen (Stetefeld *et al.*, 2016). Aus der DLS-Messung kann darüber hinaus der PDI berechnet werden, der eine Aussage zur Größenverteilung der Partikel zulässt. Es handelt sich hierbei um eine dimensionslose Zahl zwischen 0 und 1, wobei 0 eine monodisperse und 1 eine polydisperse Suspension beschreibt. Somit gilt der PDI als Maß für die Homogenität einer Suspension. Im Gegensatz hierzu trifft das ζ -Potential eine Aussage über die Stabilität der Suspension. Es ist definiert

als elektrisches Potential an der Abschergrenze eines Partikels in Suspension, der sich im elektrischen Feld bewegt und ist somit die Potentialdifferenz zwischen dem elektrisch bewegten Partikel und dem umgebenden Medium (Bhattacharjee, 2016). Das ζ -Potential kann durch Anlegen eines externen elektrischen Feldes und unter Einbeziehung der Dielektrizitätskonstante und der Viskosität des Mediums bestimmt werden. Eine Suspension gilt als stabil, wenn das ζ -Potential bei ≤ -30 mV oder $\geq +30$ mV liegt (Larsson *et al.*, 2012).

Der primäre Partikeldurchmesser sowie die Längen und Breiten der *Wire* wurden elektronenmikroskopisch bestimmt. Die Elektronenmikroskopie basiert auf der unterschiedlich starken Ablenkung von Elektronen, die die Abbildung einer Probe ermöglicht. Dabei wird bei der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) durch die Probe gestrahlt, wofür die Probe ausreichend durchlässig sein muss. Im Gegensatz dazu wird bei der Rasterelektronenmikroskopie (REM) die Oberfläche der Probe mit einem Elektronenstrahl in Rastern abgetastet.

Die Analyse der Reinheit der Materialien wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Elisabeth Eiche vom Institut für Angewandte Geowissenschaften des KIT durchgeführt. Hierfür wurde die IPC-MS (Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma) genutzt, wobei es sich um eine Methode zur Elementanalyse handelt. Es wurden jeweils die Gehalte von 21 Elementen bestimmt und daraus auf die Reinheit der NM geschlossen.

Die physikochemischen Eigenschaften der Cu NM sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9 Physikochemische Eigenschaften der Kupfernanomaterialien.

d_p : Primärer Partikeldurchmesser. d_h : Hydrodynamischer Durchmesser. PDI: Polydispersitätsindex. [≈]Herstellerangaben.

	CuO NP	Cu NP	Cu NW
d_p [nm]	17,1 \pm 0,4	55,2 \pm 1,5	
d_h [nm]	160,3 \pm 42,1	308,2 \pm 40,3	
PDI	0,48 \pm 0,05	0,23 \pm 0,07	
ζ-Potential [mV]	-14,8 \pm 0,2	-15,3 \pm 0,02	-14,1
Reinheit [%wt]	98,7 \pm 0,81	98,6 \pm 0,4	> 99,5 [≈]
Länge [μm]			6,3 \pm 0,4
Breite [nm]			300 \pm 6

Die durchschnittliche primäre Partikelgröße der beiden kupferbasierten NP lag bei 17,1 und 55,2 nm, der hydrodynamische Durchmesser bei 160,3 und 308,2 nm. Die Cu NP (d_p 55,2 nm) entsprachen

damit nicht den Herstellerangaben (d_p 25 nm) und besaßen zudem den größten primären Partikeldurchmesser aller im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Partikel. Die hydrodynamischen Durchmesser korrelierten dabei mit den primären Durchmessern. Die Homogenität der Suspension findet Ausdruck im PDI, der bei den kupferbasierten NP mit 0,23-0,48 im hohen mittleren Bereich liegt. Das ζ -Potential der NP und der NW liegt zwischen -14,1 und -15,3 mV und gilt somit als nicht stabil. Allerdings könnte eine Proteinkorona bestehend aus Proteinen des Zellkulturmediums die NM umgeben, die das gemessene ζ -Potential auf Werte zwischen -10 bis -20 mV normiert (Walkey und Chan, 2012). Aufgrund dessen kann wahrscheinlich keine klare Aussage aus den Messdaten des ζ -Potentials gezogen werden. Ähnliche Werte erhielten ebenfalls Semisch *et al.* für die Messungen in Zellkulturmedium. In Wasser dagegen lag das ζ -Potential von CuO NP bei -4,5 mV (Semisch *et al.*, 2014). Um eine inhomogene Suspension durch ein potentiell Absedimentieren zu vermeiden, wurden die Materialien in der Versuchsvorbereitung zügig verarbeitet und Standzeiten vermieden. Allerdings trägt eine instabile Suspension dazu bei, dass die NM während der Inkubation auf die Zellen absedimentieren und auf diese Weise eine direkte Interaktion möglich ist. Die Cu NW liegen mit einer mittleren Länge von $6,3 \pm 0,4 \mu\text{m}$ oberhalb der nach WHO-Kriterien (Kapitel 2.1.2) als kritisch eingestuften Länge von $5 \mu\text{m}$ (World Health Organisation, 2017). Im Vergleich zu den Ni NW und Ag NW weisen sie mit $300 \pm 6 \text{ nm}$ zudem die größte Breite auf.

Um den Beitrag der löslichen Fraktion zu potentiellen toxischen Effekten abschätzen zu können, wurde zudem die Löslichkeit der NM bestimmt. In Tabelle 10 sind die Ergebnisse der Löslichkeitsstudien zu sehen. Die Kupfermaterialien lösten sich zu einem relativ hohen Anteil bereits nach 24 h. Dabei setzten die Cu NP mit 31,7 % (RPMI-1640) den größten Anteil an Ionen frei, gefolgt von den CuO NP (22,6 %). In Ham's F-12-Medium setzte sich dieser Trend mit leicht verringerter Löslichkeit für die beiden Partikel fort. Cu NW zeigten mit 8,4 und 13,1 % die geringste Löslichkeit in beiden Zellkulturmedien. Besonders gut lösten sich alle drei NM in lysosomaler (51,1-70,7 %) Modellflüssigkeit.

Für die Berechnung der Konzentration der Ionenkontrolle für die weiteren Versuche wurden die 22,6 % gelöstes Kupfer aus CuO NP in RPMI-1640 bei einer Konzentration von $50 \mu\text{g/mL}$ herangezogen. Hieraus ergab sich eine Konzentration von $189 \mu\text{M}$. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde für RLE-6TN-Zellen dieselbe Ionenkonzentration gewählt, auch da sich die Löslichkeit in Ham's F-12 ohnehin nur geringfügig unterschied.

Tabelle 10 Löslichkeit der Kupfermaterialien nach 24 h in den verwendeten Zellkulturmedien sowie in relevanten biologischen Flüssigkeiten.

RPMI-1640/Ham's F-12: Zellkulturmedien mit 10 % FKS. AAF: Artificielle alveoläre Flüssigkeit (pH 7,4). ALF: Artificielle lysosomale Flüssigkeit (pH 4,5).

	Löslichkeit [% gelöst]			
	RPMI-1640	Ham's F-12	AAF	ALF
CuO NP	22,6 ± 12,1	20,4 ± 6,0	2,8 ± 2,5	62,6 ± 2,3
Cu NP	31,7 ± 3,0	23,7 ± 5,1	14,6 ± 1,0	70,7 ± 7,6
Cu NW	8,4 ± 0,5	13,1 ± 2,0	6,0 ± 2,7	51,1 ± 2,1

Die Löslichkeit von Cu NM wurde bereits in verschiedenen Studien untersucht. Für CuO NP wurde im Zellkulturmedium DMEM/FKS eine Löslichkeit von 44 % nach 24 h beobachtet. In ALF konnte dieselbe Studie nach 24 h ca. 95 % gelöstes Kupfer detektieren (Semisch *et al.*, 2014). Eine weitere Studie stellte die Löslichkeit von 89 % in ALF nach 24 h fest (Cho *et al.*, 2012b). Karlsson *et al.* (2013) detektierten 79 % gelöstes Kupfer aus Cu NP bereits nach 4 h. Die Unterschiede zu den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen können sich auf die Wahl des Mediums sowie der Partikel zurückführen lassen. In einer zeitabhängigen Löslichkeitsstudie konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die stärkste Kupferfreisetzung in den ersten vier Stunden nach der Exposition auftritt. Im Falle von metallischen Cu NP nahm die Löslichkeit danach ab, was zu der Annahme führte, dass sich eine Oxidschicht an der Partikeloberfläche gebildet hat, die die Löslichkeit herabsetzt. Im Gegensatz dazu haben sich CuO NP über den gesamten Inkubationszeitraum kontinuierlich gelöst (Midander *et al.*, 2009). Die Löslichkeit der Cu NW ist wahrscheinlich deshalb geringer, da sie aufgrund ihrer Form im Vergleich zu Cu NP und CuO NP eine kleinere spezifische Oberfläche besitzen.

5.2.2 Zellkulturexperimente – Auswahl der Zellkulturmodelle

Zur *in vitro*-Untersuchung des toxischen Potentials der NM wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Zellkulturmodelle unter submersen Bedingungen verwendet. Um relevante Expositionsszenarien abbilden zu können, wurden insbesondere Zelllinien des Alveolarraums der Lungen von Mensch und Ratte gewählt, da NM, bedingt durch die geringe Größe, bis in diesen empfindlichen Bereich vordringen können. Dort stellen Alveolarepithelzellen sowie alveoläre Makrophagen die häufigsten Zelltypen dar. Somit fanden zum einen die humane Tumorzelllinie A549 sowie die Zelllinie RLE-6TN aus der Ratte Anwendung. Beide Zelllinien entsprechen Alveolarepithelzellen vom Typ II. Zum anderen wurden differenzierte THP-1-Zellen (dTHP-1)

eingesetzt, die Makrophagen-ähnliche Eigenschaften aufweisen. Die A549-Zellen kamen jeweils in Mono- und in Kokultur mit den dTHP-1-Zellen zum Einsatz während die RLE-6TN-Zellen ausschließlich in Monokultur verwendet wurden (Kapitel 2.8). Die Verwendung von sowohl Zellen des Menschen als auch der Ratte dient dem Speziesvergleich auf *in vitro*-Ebene, der als Basis für weitere Experimente auf *ex vivo*- und *in vivo*-Ebene dienen kann. Da die Ratte eine hohe Relevanz bei *in vivo*-Versuchen besitzt, fiel die Wahl auf Zellen dieser Spezies.

5.2.3 Zytotoxizität

Die Bestimmung der akuten Zytotoxizität der getesteten NM erfolgte mithilfe des ATP (Adenosintriphosphat)-Assays (4.2.3). ATP gilt als Biomarker für die Viabilität, da es nur von metabolisch aktiven Zellen produziert und im Falle von Nährstoff- und Sauerstoffmangel sowie nach dem Zelltod schnell abgebaut wird. Somit ist die Menge an ATP proportional zur Anzahl an vitalen Zellen. Im Assay wird mithilfe einer Chemilumineszenz-Reaktion der ATP-Gehalt einer Probe semiquantitativ bestimmt, wobei die ATP-abhängige Reaktion von Luciferin mit Luciferase die Grundlage bildet.

In Abbildung 6 sind die Ergebnisse des Zytotoxizitätsassays der ausgewählten Zellsysteme nach 24-stündiger Inkubation mit den Cu NM dargestellt. Die ATP-Gehalte wurden auf die unbehandelte Kontrolle bezogen.

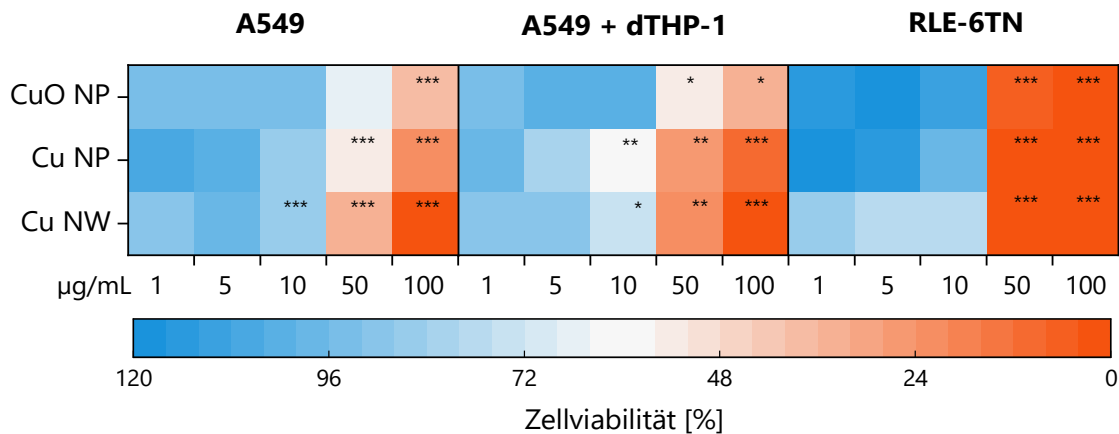


Abbildung 6 Zellviabilität von A549-, A549 + dTHP-1- sowie RLE-6TN-Zellen nach Inkubation mit Kupferbasierten Nanopartikeln (NP) und Nanowire (NW).

Die Zellen wurden für 24 h mit den Testsubstanzen inkubiert und im Anschluss der ATP-Gehalt bestimmt. Als *Heatmap* dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen. Die Einfärbungen entsprechen den ATP-Gehalten in Prozent der Kontrolle. Statistisch signifikante Abweichungen gegenüber der unbehandelten Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett-T-Test (*p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001).

Die stärksten Effekte wurden in den Rattenepithelzellen (RLE-6TN) hervorgerufen, wobei bereits bei 50 µg/mL keine metabolische Aktivität mehr messbar war. In den humanen Kulturen (A549 und A549 + dTHP-1) war dies erst bei der Maximaldosis (100 µg/mL) zu beobachten. Insgesamt reagierte die Rattenzelllinie somit empfindlicher auf die Kupfermaterialien als die humane Zelllinie.

Der direkte Vergleich der humanen Mono- und Kokultur zeigt, dass die Kokultur etwas empfindlicher auf die Cu NM reagiert, was vor allem für die Cu NP deutlich wird. Dies könnte an einer größeren Sensitivität der dTHP-1-Makrophagen liegen, was zu einer stärkeren Abnahme des ATP-Gehalts führt. Zudem verursachten die Cu NP, möglicherweise aufgrund der stärkeren Löslichkeit im Zellkulturmedium, insgesamt eine größere zytotoxische Wirkung in A549-Zellen als CuO NP. Für die RLE-6TN-Zellen lässt sich hierzu keine Aussage treffen.

Die Zytotoxizität von Cu NM wurde bereits in einigen Studien untersucht. So zeigte eine Studie, die A549-Zellen für 18 h und bei einer Konzentration von 80 µg/mL mit Cu NP und CuO NP inkubierten, eine Abnahme der Viabilität um 90 % für beide Materialien (Midander *et al.*, 2009). Bei Untersuchungen mittels Kolonieformationsassay, der eine Langzeit-Zytotoxizität anzeigt, nahm die Fähigkeit zur Bildung von Kolonien nach der Inkubation mit CuO NP in A549-Zellen dosisabhängig ab. Dabei war bereits bei der niedrigsten Dosis (5 mg/mL) eine signifikante Reduktion an Kolonien detektierbar und bei 50 µg/mL konnten nur noch 10 % der Kolonien im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ausgebildet werden (Semisch *et al.*, 2014). Dies könnte bedeuten, dass die langfristige Zytotoxizität von CuO NP ein empfindlicherer Parameter als die akute Zytotoxizität ist. Die Rattenzelllinie reagierte deutlich empfindlicher auf die beiden höchsten eingesetzten Konzentrationen als die A549-Zellsysteme. Eine unterschiedliche Empfindlichkeit der beiden Zelllinien konnte auch in einer Studie beobachtet werden, wobei sowohl RLE-6TN- als auch A549-Zellen mit löslichen Metallsalzen inkubiert wurden. Nach der 24-stündigen Inkubation mit CuCl₂ wurde für die RLE-6TN-Zellen ein niedrigerer EC₅₀ bestimmt als für die A549-Zellen, was auf eine höhere Sensitivität der Rattenepithelzelllinie hindeutet (Riley *et al.*, 2005).

Für die weiteren Experimente wurden, basierend auf diesen Ergebnissen, die folgenden Konzentrationen ausgewählt:

Tabelle 11 Dosisauswahl für die weiterführenden Experimente aufgrund der Daten des ATP-Assays.

Angaben ein µg/mL.

	Niedrig	Mittel	Hoch
CuO NP	10	25	50
Cu NP	1	5	10
Cu NW	1	10	50

5.2.4 Bioverfügbarkeit und intrazelluläre Verteilung

Zur Analyse der Bioverfügbarkeit wurden die drei verwendeten Zelllinien jeweils als Monokultur untersucht. Hierfür wurden die Zellen für 24 h mit den NM inkubiert und anschließend lysiert. Nicht-gelöste NM-Reste sowie feste Zellbestandteile wurden in mehreren Zentrifugationsschritten entfernt und der Metallgehalt im Überstand mittels GF-AAS (Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie) bestimmt. Im folgenden (Kapitel 5) werden dabei die Resultate jeweils als intrazelluläre Ionenkonzentration angegeben. Eine Darstellung der Absolutgehalte pro Zelle ist im Anhang unter 8.2 (Abbildung 31) zu finden. Aufgrund unterschiedlicher Zellvolumina der verwendeten Zelllinien können die beiden Darstellungen optisch voneinander abweichen. Zur Analyse der intrazellulären Verteilung wurden Zytoplasma und Zellkern voneinander getrennt, separat lysiert und vermessen.

Die intrazelluläre Bioverfügbarkeit von Kupferionen nach der Inkubation mit Cu NP und CuO NP (Abbildung 7) zeigte keine Dosisabhängigkeit in den verwendeten Zelllinien. Dennoch war eine deutliche Erhöhung des Kupfergehalts im Vergleich zum basalen Kupfergehalt zu beobachten. Eine Ausnahme bilden die RLE-6TN-Zellen, in denen eine leichte konzentrationsabhängige Zunahme nach der Inkubation mit CuO NP zu sehen war. Dagegen stieg die Konzentration an Kupferionen nach der Inkubation mit Cu NW in dTHP-1-Zellen dosisabhängig stark an (bis zu 80-fach höher als der Basalgehalt). In RLE-6TN-Zellen ist im Zusammenhang mit Cu NW ebenfalls eine Dosisabhängigkeit zu erkennen, während sich der Kupfergehalt in den humanen Epithelzellen mit steigender Dosis nicht entsprechend änderte. Die intrazelluläre Ionenverteilung zeigt in allen Zelllinien und mit allen Cu NM eine Akkumulation von Kupfer im Zellkern im Vergleich zum Zytoplasma. In den meisten Fällen verläuft dies dosisabhängig.

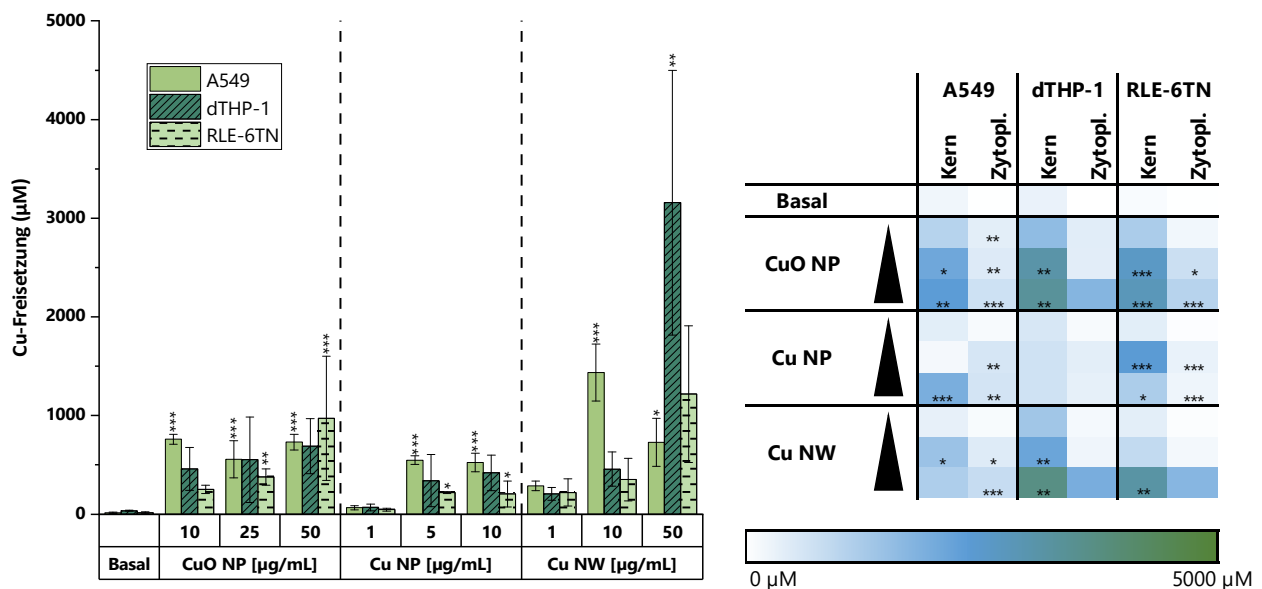


Abbildung 7 Bioverfügbarkeit der Kupfernanomaterialien in den Zelllinien A549, dTHP-1 und RLE-6TN.

Die Zellen wurden für 24 h mit den Nanomaterialien inkubiert. Die Daten sind als Ionenkonzentrationen dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen \pm SD. Statistisch signifikante Abweichungen gegenüber der unbehandelten Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett-T-Test (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Eine ähnliche intrazelluläre Verteilung von Kupferionen konnte auch in einer Studie von Semisch *et al.* (2014) beobachtet werden. Sie inkubierten ebenfalls A549-Zellen für 24 h mit CuO NP. Dabei konnte im Zellkern bei jeder Inkubationskonzentration ein höherer Gehalt als im Zytoplasma festgestellt werden und der Gesamtanstieg erfolgte dosisabhängig. Die Gesamtaufnahme an Kupferionen in BEAS-2B-Zellen sowie deren intrazelluläre Verteilung nach der Inkubation von CuO NP wurde in einer weiteren Studie untersucht. Dabei wurde eine dosisabhängige Zunahme an freiem Kupfer sowohl in der gesamten Zelle als auch in den beiden Kompartimenten detektiert, wobei auch hier der Gehalt im Zellkern höher war. Gleichzeitig wurden CuO NP mit den korrespondierenden mikroskaligen Partikeln verglichen sowie mit CuCl_2 , die durchweg zu einer geringeren intrazellulären Kupferfreisetzung führten (Strauch *et al.*, 2017).

5.2.5 Genexpressionsanalysen

Teilaspekte der in diesem Kapitel diskutierten Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht (Hufnagel *et al.*, 2021).

Durch die Analyse der Genexpression können Veränderungen auf transkriptioneller Ebene aufgezeigt werden, die in Folge einer Behandlung mit potentiell toxischen Substanzen auftreten. Die HT RT-qPCR ist eine innovative und empfindliche Methode, die zur Aufklärung von Wirkmechanismen beitragen kann. Dabei wird die Modulation der Transkription von 95 Genen

verschiedener Cluster zeitgleich in 96 Proben analysiert. Hierfür wird die RNA aus den Zellproben isoliert, in cDNA umgeschrieben und anschließend die qPCR im Nanoliter-Maßstab durchgeführt. Die Auswertung erfolgt über den C_q -Wert (*cycle of quantification*), der angibt, wie häufig das entsprechende Transkript eines Gens in der Probe vorhanden war. Je niedriger dieser Wert, desto häufiger wurde das gesuchte Gen exprimiert. Die C_q -Werte werden sowohl auf Referenzgene (Humane Proben: *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *GUSB*, *HPRT1*. Rattenproben: *B2M*, *GUSB*, *HPRT1*, *MAPK14*, *MARCHF5*) als auch auf die unbehandelte Kontrolle des jeweiligen Versuchs bezogen und in den \log_2 -fachen Faktor (bezogen auf die unbehandelte Kontrolle) umgerechnet.

Diese Methode wurde innerhalb des Arbeitskreises in vorangegangenen Arbeiten etabliert (Fischer *et al.*, 2016). Zudem wurde sie im Zusammenhang mit verschiedenen NM bereits erfolgreich angewandt (Strauch *et al.*, 2017; Hufnagel *et al.*, 2020). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das bestehende Gen-Set um inflammatorische und fibrotische Marker ergänzt und neu zusammengestellt. Darüber hinaus wurde ein weiteres Gen-Set zur Untersuchung von Rattenzellen etabliert (Kapitel 5.1).

Ein Überblick über die veränderte Expression ausgewählter Gene in der A549-Monokultur und -Kokultur nach der Inkubation mit den Kupfermaterialien ist in Abbildung 8 als *Heatmap* dargestellt. Die vollständige *Heatmap* mit allen untersuchten Genen befindet sich im Anhang unter 8.4. Grundsätzlich wurden im Rahmen dieser Arbeit nur Ergebnisse ausgewertet, die einen \log_2 -fachen Faktor von $\pm 1,5$ überschreiten konnten. Dieser Wert wurde in Anlehnung an vergleichbare Studien gewählt (Andrew *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2012).

Die Exposition gegenüber Cu NM sowie löslichem Kupfer verursachte zum Teil starke Veränderungen auf transkriptioneller Ebene. Dabei unterschieden sich die Expressionsprofile von Mono- und Kokultur sowie der verschiedenen Materialien untereinander nur geringfügig. Auch eine klare Dosis-Wirkungsbeziehung war nicht in allen beeinflussten Genen zu erkennen. Auffällig ist die weitläufige Repression vieler Gene über alle Gencluster hinweg. Einige wenige Gene wurden dennoch vermehrt induziert, wobei die stärkste Induktion Gene der oxidativen Stressantwort sowie der Metallhomöostase betraf, aber auch Gene der inflammatorischen Antwort wurden vermehrt exprimiert.

Ergebnisse und Diskussion

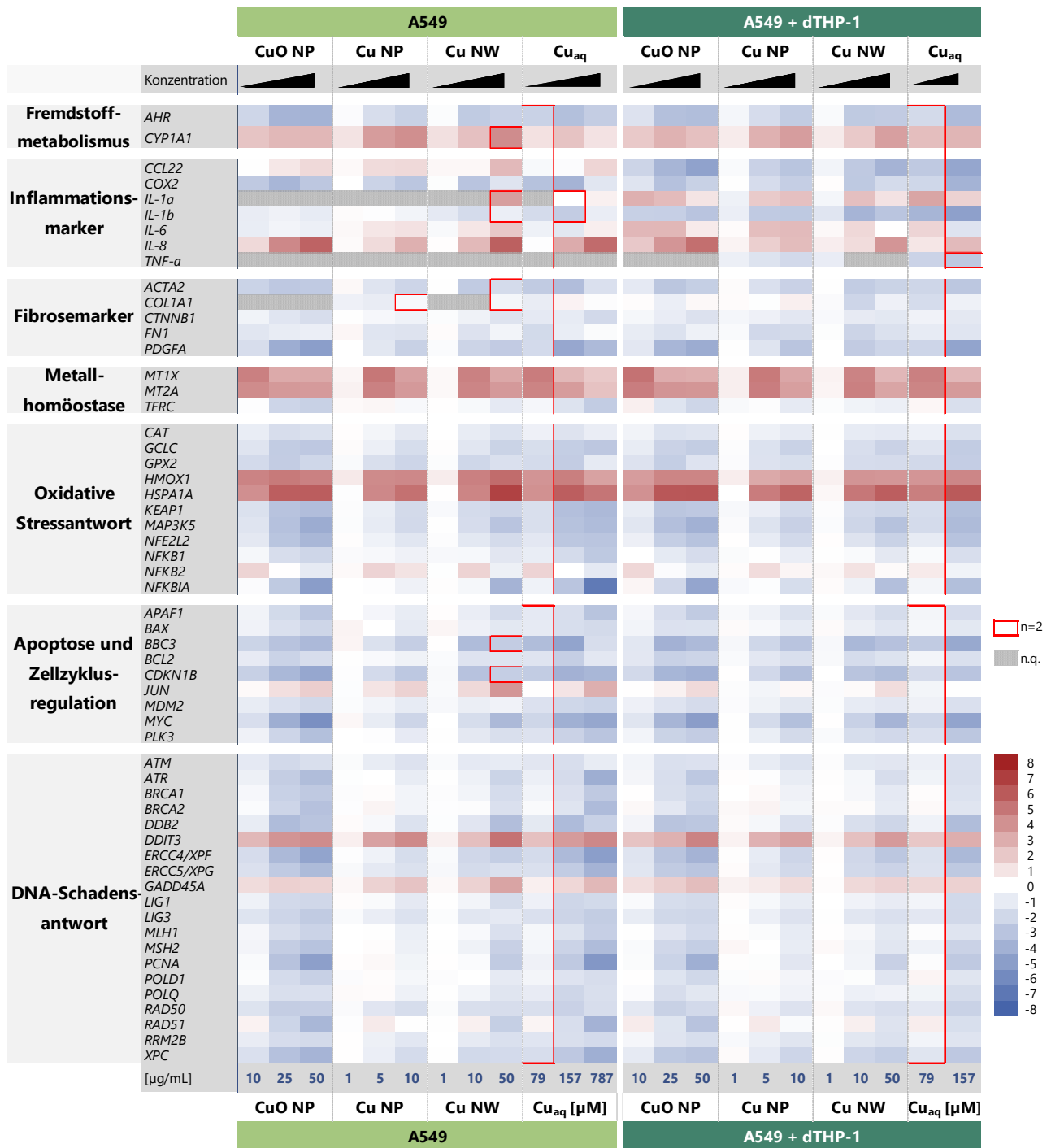


Abbildung 8 Beeinflussung der Genexpression durch Kupfer-basierte Nanomaterialien in A549-Monokultur sowie -Kokultur mit dTHP-1-Zellen nach einer Inkubationsdauer von 24 h. Gezeigt sind Gene des Fremdstoffmetabolismus, der Inflammations- und Fibrosemarker, der Metallhomöostase, der oxidativen Stressantwort, der Apoptose und der Zellzyklusregulation sowie der DNA-Schadensantwort.

Eine rote Färbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine verminderte Genexpression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen, sofern nicht anders angegeben.

Cu NM sowie lösliche Kupferverbindungen sind dafür bekannt, oxidativen Stress hervorzurufen und in der Folge entsprechende Schutzmechanismen der Zelle zu aktivieren. Dies beruht auf der Redox-Aktivität von Kupfer, wodurch es in der Lage ist, Fenton-ähnliche Reaktionen einzugehen, die zur

Generierung von Hydroxylradikalen führen (Jomova *et al.*, 2012; Ameh und Sayes, 2019). Die Induktion von zellulärem Stress kann in der verstärkten Expression der beiden Stressmarkergene *HSPA1A* und *HMOX1* gesehen werden. Diese zählen zur oxidativen Stressantwort, werden aber auch bei zellulärem Stress aktiviert. *HMOX1* codiert für die Hämoxigenase 1 und ist als Marker für das Stresslevel einer Zelle bekannt, da das Enzym auch durch pro-inflammatorische Prozesse induziert wird. *HMOX1* wird unter anderem durch den redox-sensitiven Transkriptionsfaktor Nrf-2, der in seiner inaktiven Form an Keap1 gebunden ist und durch Oxidation freigesetzt wird, reguliert (Ryter *et al.*, 2006; Piantadosi *et al.*, 2011). Die Aktivierung von Nrf-2 durch CuO NP konnte bereits in HeLa S3-Zellen gezeigt werden (Strauch *et al.*, 2017). Es ist allerdings bekannt, dass Nrf-2 in A549-Zellen aufgrund einer Fehlregulation dauerhaft exprimiert wird (Singh *et al.*, 2006). In Bezug auf die Induktion von *HMOX1* ist nicht allein Nrf-2 verantwortlich, sondern auch andere Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise AP-1 und NF- κ B, können zur Aktivierung führen (Alam und Cook, 2007). *HSPA1A* codiert für das Protein *Heat Shock 70 kDa Protein 1A* und gehört zu den Chaperonen der HSP70-Familie. Unter Normalbedingungen unterstützen diese Proteine andere Proteine bei der Faltung und tragen so zum Schutz der Zelle bei. Darüber hinaus haben sie anti-inflammatorische Eigenschaften, da sie die Freisetzung von Cytokinen modulieren. Auslöser für die verstärkte Expression von *HSPA1A* sind verschiedene Arten von zellulärem Stress, der intrinsisch, aber auch extrinsisch bedingt sein kann (Radons, 2016). Sowohl *HSPA1A* als auch *HMOX1* wurden durch die Inkubation mit Cu NM verstärkt exprimiert, wobei nennenswerte Effekte ab einer Dosis von $\geq 5 \mu\text{g/mL}$ beobachtet werden konnten. Die stärkste Induktion von *HSPA1A* in A549-Zellen war durch eine Behandlung mit Cu NW (50 $\mu\text{g/ml}$) zu beobachten, wobei eine 116-fache Erhöhung (\log_2 -facher Faktor 6,9) erreicht wurde. Im Gegensatz zu *HSPA1A* und *HMOX1* wurden die weiteren Gene dieses Genclusters mehrheitlich reprimiert. Dabei handelte es sich um Gene, die für Enzyme der antioxidativen Schutzmechanismen codieren.

Zudem kann die Freisetzung von Kupferionen, die bereits in den Bioverfügbarkeitsstudien (5.2.4) beobachtet wurde, durch die Induktion von beiden Metallothionein (MT)-codierenden Genen bestätigt werden. *MT1X* und *MT2A* codieren für Mitglieder der Metallothionein-Familie und spielen eine wichtige Rolle in der Zink- und Kupferhomöostase, der Bindung überschüssiger Schwermetallionen und der zellulären Redox-Chemie. Die Transkription der Metallothioneine wird durch unterschiedliche Stimuli induziert, wie die Überladung mit Metallionen oder oxidativen Stress (Günther *et al.*, 2012; Scheller *et al.*, 2017). Die Gene *MT1X* und *MT2A* wurden durch alle eingesetzten Kupferverbindungen in beiden Zellkultursystemen in ähnlichem Ausmaß verstärkt exprimiert (bis hin

zu einem Faktor von 34 (\log_2 -fachen Faktor 5,1)). Auffällig ist zudem, dass für die MT-codierenden Gene jeweils nicht die höchste verwendete Konzentration den größten Ausschlag zeigte, sondern die Dosen 5 oder 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dies steht möglicherweise mit einer Sättigung der MT im Zusammenhang, wodurch auch höhere Kupferkonzentrationen nicht zu einer weiteren Steigerung der MT-Transkription führen würden. Dies ist im Einklang mit der deutlichen Expressionssteigerung anderer Gene (*IL-8*, *HSPA1A*, *NFKBIA*) in der höchsten Inkubationskonzentration im Vergleich zur mittleren. Die MT können die freien Kupferionen nicht mehr bewältigen, was zur Steigerung des zellulären Stresses führt.

Unter den Inflammationsmarkern wurden einige Gene reprimiert (*IL-1b*, *COX2/PTGS2*) und andere vermehrt exprimiert (*IL-8*, *IL-6* und *IL-1a*). Zudem ergaben sich in dieser Gruppe Unterschiede zwischen Mono- und Kokultur für die Gene *CCL22* und *IL-1a*, wobei ersteres in der Monokultur verstärkt und in der Kokultur vermindert exprimiert wurde. Letzteres dagegen war in der Monokultur mehrheitlich nicht nachweisbar, wurde in der Kokultur aber auf ein relevantes Level induziert. *CCL22* ist ein Chemokin und gilt als Marker für adulte Makrophagen, was eine Erklärung dafür darstellt, dass *CCL22* in der unbehandelten A549-Kokultur um den Faktor 120 stärker exprimiert wurde als in der unbehandelten A549-Monokultur (Daten nicht gezeigt) (Bourdonnay *et al.*, 2009; Hufnagel *et al.*, 2021). Einen Grund für die Unterschiede zwischen Mono- und Kokultur in der Expression von *CCL22* könnten eine gesteigerte Zytotoxizität der Kupferverbindungen in dTHP-1-Zellen darstellen, die zu einer Abnahme des mRNA-Gehalts führt und somit im Rahmen der Genexpressionsanalyse in einer Repression sichtbar wird.

Die beiden Gencluster Apoptose und Zellzyklus sowie DNA-Schadensantwort wurden mehrheitlich vermindert exprimiert und ausschließlich einzelne Gene wie *JUN*, *DDIT3* und *GADD45A* wurden induziert. *JUN* codiert für c-Jun, die Untereinheit eines Transkriptionsfaktors, der zusammen mit AP-1 gebildet wird. Dessen Aktivität wird durch die Jun N-terminalen Kinasen (JNKs) reguliert, die wiederum sowohl durch oxidativen Stress als auch durch Inflammation aktiviert werden können (Behrens *et al.*, 1999; Vlahopoulos und Zoumpourlis, 2004). *GADD45A* codiert für das gleichnamige Protein und gehört der GADD (*growth arrest and DNA damage*)-Familie an, deren Mitglieder, im Zellkern lokalisiert, im Falle einer DNA-Schädigung den Zellzyklusarrest und die DNA-Reparatur auslösen (Rosemary Sifakas und Des Richardson, 2009). *DDIT3* steht für *DNA damage inducible transcript 3* und wird, genau wie *GADD45A*, nach der Schädigung der DNA induziert (Jauhiainen *et al.*, 2012). Somit weist die Induktion beider Gene auf ein DNA-schädigendes Potential der Cu NM hin, das im folgenden Kapitel (5.2.6) näher betrachtet wird. Widersprüchlich zur Induktion von Genen,

die auf DNA-Schäden hindeuten, ist die Repression einiger DNA-Reparaturgene. Dies könnte möglicherweise im Eintreten einer zellulären Seneszenz begründet sein (Collin *et al.*, 2018).

Zusammenfassend deuten die meisten der verstärkt exprimierten Gene auf die Entstehung von oxidativem Stress durch die Inkubation mit Cu NM hin, da sie über redox-sensitive Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel Nrf-2, AP-1 oder NF- κ B induziert werden können. Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse in den humanen Zellmodellen zeigten zudem, dass alle getesteten Materialien ähnliche Expressionsprofile, sowohl in der Mono- als auch in der Kokultur, hervorrufen und somit das Kultivierungsmodell sowie die Morphologie keinen Einfluss ausüben. Da hierzu auch das lösliche Kupfersalz (CuCl_2) zählt (die eingesetzte Cu_{aq} -Konzentration $157 \mu\text{M}$ entspricht dabei in etwa der löslichen Fraktion aus den Cu NM bei $50 \mu\text{g/mL}$), kann durch diese Analyse nicht ausgeschlossen werden, dass die Effekte nach der NM-Inkubation durch die gelösten Kupferionen im Zellkulturmedium hervorgerufen werden. Auch wenn die ebenfalls durchgeführten Analysen der Genotoxizität (5.2.6) keine Effekte durch die Ionen ergaben und somit eher für Effekte durch endozytierte NM sprechen, lässt sich aufgrund der Genexpressionsdaten für das lösliche Kupfersalz hier keine abschließende Beurteilung vornehmen und auch eine Kombination aus beiden Szenarien wäre denkbar.

Die Veränderungen durch Kupferverbindungen auf transkriptioneller Ebene in Rattenepithelzellen sind in Abbildung 9 dargestellt. Für die Inkubation dieser Zelllinie mussten die Inkubationskonzentrationen aufgrund der Zytotoxizität der Cu NM leicht angepasst werden. Zwischen den beiden NM-Morphologien sind, ähnlich wie in den humanen Zellsystemen, nur wenige Unterschiede zu erkennen. Darüber hinaus fällt im Vergleich zu A549-Zellen auf, dass ein Großteil der Gene induziert statt reprimiert wurde. Hierauf wird im Folgenden näher eingegangen.

In RLE-6NT-Zellen wurden die Gencluster der Metallhomöostase sowie der oxidativen Stressantwort am stärksten induziert, wobei jeweils die Gene *MT1X*, *TFRC* (13,6-19,9-fach (\log_2 -fach 3,7-4,3)) und *HMOX1* (Cu NP 15,4 (\log_2 -fach 3,9)); CuO NP 110,3 (\log_2 -fach 6,8); Cu NW 52,7 (\log_2 -fach 5,7); Cu_{aq} 847,6 (\log_2 -fach 9,7)) am stärksten beeinflusst wurden. Wie bereits erwähnt deutet die Induktion von *MT1X* auf intrazellulär freigesetzte Metallionen hin und *HMOX1* auf zellulären Stress, der sich unter anderem als oxidativer Stress äußert. Weitere Gene der oxidativen Stressantwort, die in relevantem Ausmaß induziert wurden, sind *GPX2*, *CAT*, *TXNRD1* und *SOD2*. *GPX2* codiert dabei für die Glutathion-Peroxidase 2, die Glutathion-Dimere reduziert und sie auf diese Weise wieder der antioxidativen Abwehr zur Verfügung stellt. Die Katalase wiederum (codierendes Gen: *CAT*) unterstützt ebenfalls die oxidative Stressantwort indem sie das Oxidans H_2O_2 zu Wasser und Sauerstoff umsetzt.

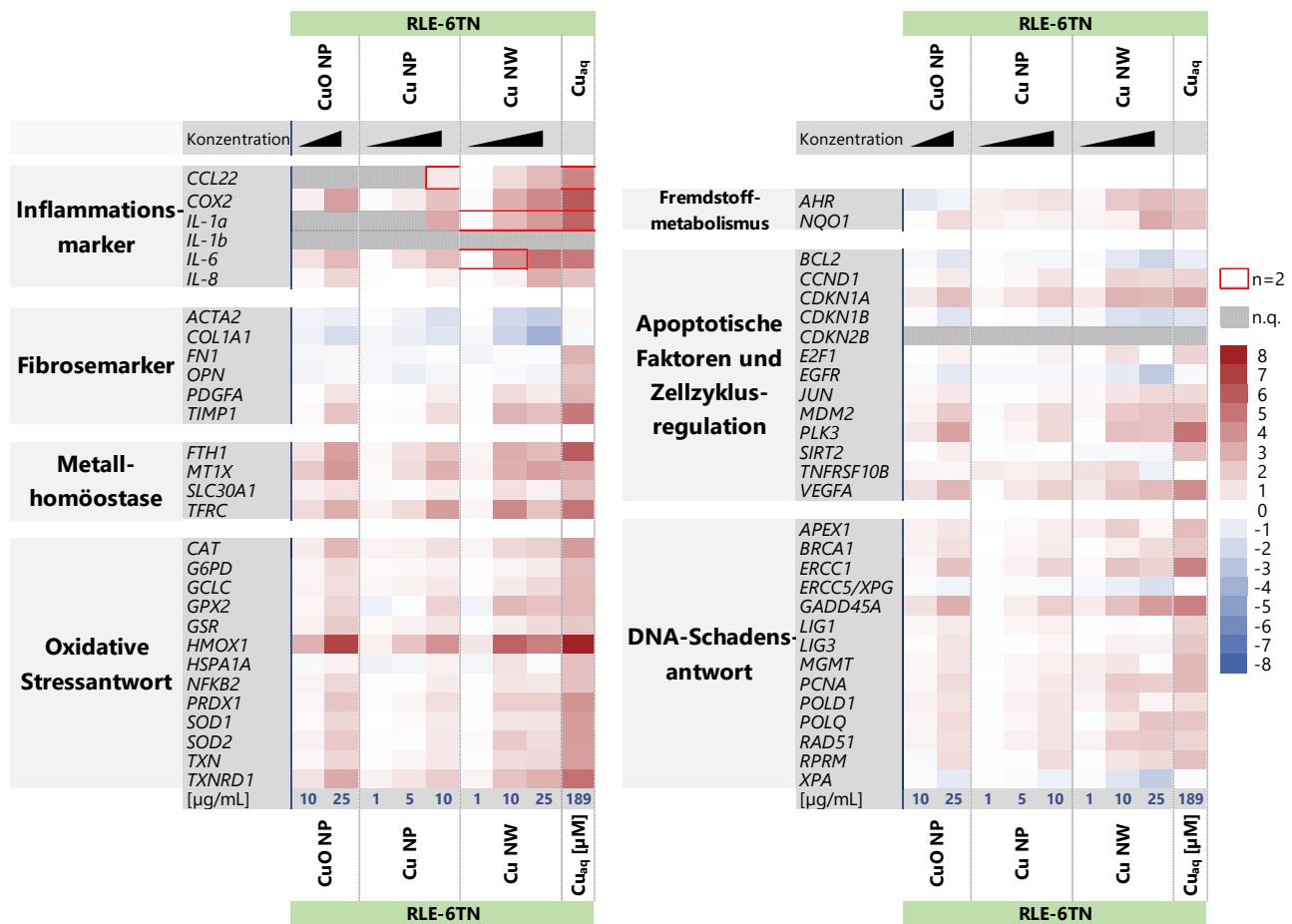


Abbildung 9 Beeinflussung der Genexpression durch Kupfer-basierte Nanomaterialien in RLE-6TN-Zellen. Gezeigt sind Gene des Fremdstoffmetabolismus, der Inflammations- und Fibrosemarker, der Metallhomöostase, der oxidativen Stressantwort, der Apoptose und der Zellzyklusregulation sowie der DNA-Schadensantwort.

Eine rote Färbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine verminderte Genexpression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen, sofern nicht anders angegeben.

Ein Großteil der Inflammationsmarker wurde ebenfalls in relevantem Ausmaß induziert, wobei Cu NW stärkere Effekte hervorriefen als die beiden NP. Im Besonderen wurden die Gene *IL-6*, *IL-8*, *IL-1a*, *CCL22* und *COX2* verstärkt exprimiert, die für pro-inflammatorische Zytokine, Chemokine und weitere assoziierte Proteine codieren. Das lösliche Kupfersalz führte ebenfalls zu relevanten Änderungen der Expression von Genen, die auch durch die NM verändert exprimiert wurden. In den meisten Fällen übertraf das Ausmaß der Modulation sogar die Auswirkungen der NM. Wie auch bei den A549-Zellen kann anhand dieser Analyse nicht genau differenziert werden, ob die beobachteten Effekte durch extrazellulär gelöste Ionen oder durch endozytierte NM oder durch eine Kombination aus beiden Szenarien hervorgerufen wurden. In Analogie mit den A549-Zellen konnten auch hier in der Analyse der Genotoxizität (5.2.6) keine Effekte durch die Ionen beobachtet werden.

Tacu *et al.* führten ebenfalls Untersuchungen mit NP an RLE-6TN-Zellen durch, allerdings verwendeten sie kohlenstoffhaltige Partikel, die mit Cu beschichtet wurden. Ihre Ergebnisse zeigten, dass die Beschichtung die Fähigkeit zur Induktion von oxidativem Stress im Vergleich zum unbeschichteten NP oder auch zu einer Eisen-Beschichtung erhöhte. Das Auslösen von oxidativem Stress wurde dabei mikroskopisch über die Translokation von Nrf-2 in den Zellkern beurteilt. Darüber hinaus untersuchten sie die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen in das umgebende Medium und stellten nach der 24 h-Inkubation eine erhöhte Konzentration von MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) fest. Bei diesem Protein handelt es sich um einen potenten chemotaktischen Faktor, der einen großen Einfluss auf Monozyten hat (Tacu *et al.*, 2021).

Insgesamt deutet das Cu NM-bezogene Genexpressionsprofil in den RLE-6TN-Zellen darauf hin, dass im speziellen die intrazellulär verfügbaren Ionen dafür verantwortlich sein könnten, oxidativen Stress aufzulösen, dessen Folge Entzündungsreaktionen und DNA-Schäden sind. Dieser Wirkmechanismus wurde in der Literatur bereits häufig im Zusammenhang mit Cu NM beschrieben (Karlsson *et al.*, 2022). Darüber hinaus ergaben sich Unterschiede zwischen Cu NP und Cu NW, die im intrazellulären Löslichkeitsverhalten begründet sein können. Im Vergleich zu den humanen Zellmodellen zeigten die RLE-6TN-Zellen ein sehr unterschiedliches Expressionsprofil, da die meisten Gencluster induziert statt reprimiert wurden. Ein Grund hierfür könnte einerseits der Speziesunterschied sein, wodurch möglicherweise verschiedene zelluläre Mechanismen zugrunde liegen. Andererseits könnten hierfür auch unterschiedliche Metabolismen der Tumorzelllinie und der primären Zelllinie verantwortlich sein. Ähnliche Differenzen zwischen A549- und BEAS-2B-Zellen erhielten auch Strauch *et al.* nach der Inkubation mit CuO NP. Bei den BEAS-2B-Zellen handelt es sich ebenfalls um eine primäre Zelllinie, die vergleichbare Reaktionen wie die RLE-6TN-Zellen zeigten (Strauch *et al.*, 2017).

5.2.6 Untersuchungen zur Genotoxizität

Die Bestimmung der Genotoxizität wurde mithilfe von zwei verschiedenen Analysemethoden durchgeführt, die unterschiedliche Endpunkte betrachten. Zum einen wurde die Induktion von DNA-Strangbrüchen (SB) über die alkalische Entwindung (AU – *alkaline unwinding*) und zum anderen die Induktion von Mikrokernen (MN – *micronucleus*) über einen durchflusszytometrischen Hochdurchsatz-Ansatz analysiert. Die AU beruht auf dem Prinzip der zeitabhängigen Entwindung der DNA-Doppelhelix im alkalischen Milieu, die in diesem pH-Bereich immer weiter fortschreitet. Als Startpunkte dienen dabei jeweils die Enden der DNA und damit auch die entstandenen SB. DNA-Bereiche, die sich während einer spezifischen Zeitspanne entwinden, werden im weiteren Analyseverlauf als einzelsträngige DNA vorliegen (ssDNA) und Stellen, die nicht entwunden werden,

da keine SB vorlagen, verbleiben doppelsträngig (dsDNA). Die ssDNA und dsDNA werden im Anschluss chromatographisch voneinander getrennt, angefärbt sowie gemessen. Aus dem Verhältnis von ssDNA zu dsDNA kann auf die Menge an SB geschlossen werden (Hartwig *et al.*, 1993).

Mit dem MN-Test kann ein weiterer genotoxischer Endpunkt untersucht werden, der sowohl klastogene als auch aneugene Effekte erfasst. MN sind Chromatin-haltige Strukturen, die während der Zellteilung entstehen, wenn Chromosomen oder Chromosomen-Fragmente unvollständig an den Spindelapparat gebunden werden und in der Folge nicht an die Pole gezogen werden können. Um diese Fragmente bildet sich ebenfalls eine eigene Kernmembran und der entstandene MN wird nach der Zellteilung in einer der beiden Tochterzellen verbleiben. Der durchflusszytometrische Versuchsansatz ist eine etablierte Methode, die im Gegensatz zur mikroskopischen Methode die Auszählung einer höheren Zellzahl zulässt. Die Detektion erfolgt mithilfe zweier verschiedener DNA-Farbstoffe, die die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen zulassen (Avlasevich *et al.*, 2011; Bryce *et al.*, 2013).

Die Ergebnisse zur Untersuchung der Genotoxizität in Verbindung mit Cu NM sind in Abbildung 10 dargestellt. Diese umfassen auch Ergebnisse der Abschlussarbeit von Marius Dargel.

Die verwendeten Materialien führten in der A549-Monokultur zu einer moderaten, dosisabhängigen Induktion von DNA-Strangbrüchen, wobei kein deutlicher Unterschied zwischen den Materialien zu erkennen war. Im Gegensatz dazu reagierte die A549-Kokultur deutlich empfindlicher und es konnte in manchen Fällen über die doppelte Anzahl an DNA-SB im Vergleich zur Monokultur detektiert werden. Die deutlich erhöhte Induktion von SB in der A549-Kokultur im Vergleich zur Monokultur könnte an dem Auftreten einer sekundären Genotoxizität liegen, die durch die dTHP-1-Zellen ausgelöst wird. Hierbei werden die Makrophagen durch die NM aktiviert und schütten in der Folge Zytokine und Chemokine aus, die wiederum in den benachbarten Zellen zu genotoxischen Effekten führen (Vallabani und Karlsson, 2022). Möglich wäre zudem, dass aufgrund einer höheren Empfindlichkeit gegenüber den Cu NM in den dTHP-1-Zellen (Daten nicht gezeigt) bereits die Apoptose ausgelöst wurde, die typischerweise in der Fragmentierung der DNA resultiert. Mithilfe der AU wird dies als DNA-SB detektiert (Nagata, 2000). Ähnlich starke Effekte konnten in RLE-6TN-Zellen für CuO NP und Cu NW in der höchsten Dosis beobachtet werden, da diese Konzentration ebenfalls eine hohe Zytotoxizität aufwies (Kapitel 5.2.3). Cu NP führten in RLE-6TN-Zellen dagegen zu keinem genotoxischen Effekt, vermutlich da deutlich niedrigere Inkubationskonzentrationen eingesetzt wurden. Werden die Effekte durch die eingesetzten Dosen direkt miteinander verglichen, waren die Cu NP das potenteste Material in den humanen Zellsystemen, während in RLE-6TN-Zellen die drei

Ergebnisse und Diskussion

Materialien etwa ähnliche Effekte verursachten. Im Vergleich der beiden Epithelzelllinien miteinander zeigten sich die Rattenzellen sensitiver gegenüber genotoxischen Agenzien, im Besonderen da in der Positivkontrolle dieselbe Behandlung zur doppelten Anzahl an SB führte. Im MN-Test, der ausschließlich mit der A549-Monokultur durchgeführt wurde, konnte aufgrund der Beschaffenheit des Assays nur deutlich geringere Dosen als in den weiteren Analysen eingesetzt werden. Dennoch wurde ebenfalls eine moderate, dosisabhängige Genotoxizität durch alle Cu NM beobachtet. Von Effekten durch die im Medium freigesetzten Ionen ist in beiden Analysen nicht auszugehen, da CuCl_2 (Cu_{aq}) keine Genotoxizität zeigte.

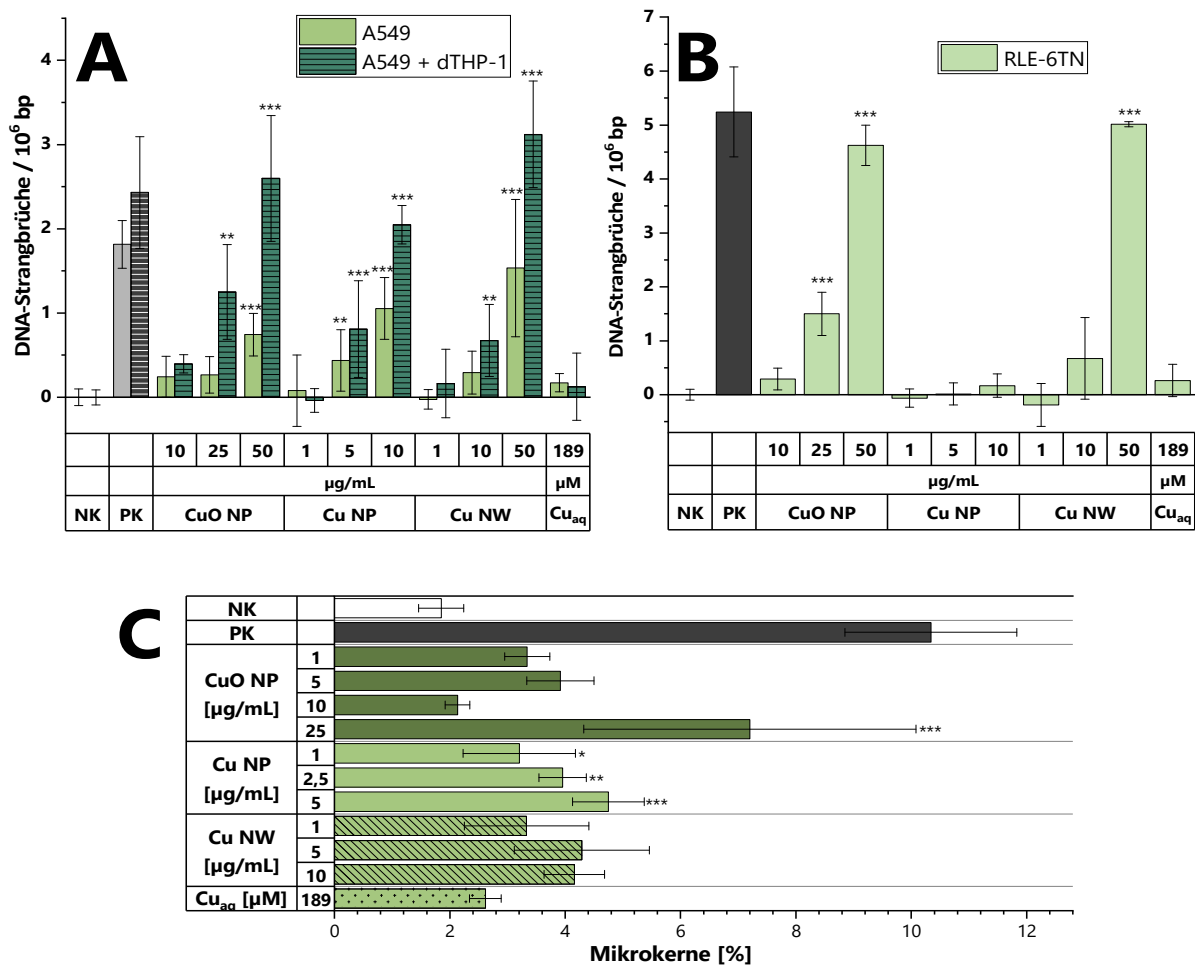


Abbildung 10 Induktion von DNA-Strangbrüchen sowie von Mikrokerneln nach der Inkubation mit Kupfermaterialien.

A: Induktion von DNA-Strangbrüchen in A549-Zellen in Mono- als auch in Kokultur mit dTHP-1-Zellen. B: Induktion von DNA-Strangbrüchen in RLE 6TN-Zellen. C: Induktion von Mikrokerneln in A549-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit den Testsubstanzen inkubiert. Für den Mikrokerntest wurde für weitere 24 h nachinkubiert. Als Positivkontrollen dienten für die AU (A+B) 100 μM Menadion und für den Mikrokerntest (C) 0,3 μM Mitomycin C. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen \pm SD. Statistisch signifikante Abweichungen gegenüber der unbehandelten Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett-T-Test (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Midander *et al.* analysierten ebenfalls das DNA-schädigende Potential von Cu NP und CuO NP, wobei sie nach 4 h Inkubation zwar eine signifikante Induktion an DNA-SB detektierten, jedoch keinen Unterschied zwischen den beiden NP feststellen konnten (Midander *et al.*, 2009). Die Fähigkeit von verschiedenen NM-Spezies oxidative DNA-Schäden in A549-Zellen zu induzieren wurde in einer Studie von Karlsson *et al.* untersucht. Dabei wurden CuO NP als einziges Kupfer-basiertes NM verwendet, die sich dabei als das potenteste Material in Bezug auf die Genotoxizität herausstellten (Karlsson *et al.*, 2008). Die Ergebnisse dieser beiden Studien weichen etwas von den im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten ab, da die metallischen Cu NP und Cu NW einen stärkeren Einfluss als CuO NP bei der gleichen Inkubationsdosis hatten. Möglicherweise spielen dabei unterschiedliche Inkubationszeiträume oder verschiedene Partikelgrößen eine Rolle. Darüber hinaus war die eingesetzte Dosis von Midander *et al.* im Falle der Cu NP sehr zytotoxisch, weshalb die Ergebnisse zur Genotoxizität unter Vorbehalt betrachtet werden sollten (Midander *et al.*, 2009). Eine weitere Studie untersuchte ebenfalls den Einfluss von CuO NP auf die Induktion von DNA-Strangbrüchen sowie auf die Entstehung von MN. Die Strangbrüche wurden in HeLa S3-Zellen analysiert, wobei ein signifikanter Anstieg an DNA-Läsionen detektiert wurde (0,8 DNA-Strangbrüche / 10^6 bp bei 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Im Vergleich dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit bei einer ähnlichen Konzentration weniger Strangbrüche nachgewiesen (0,3 DNA-Strangbrüche / 10^6 bp), was an den unterschiedlichen Zelllinien oder den abweichenden Partikelgrößen (Semisch *et al.* 55 nm, vorliegende Arbeit 17 nm) liegen könnte. Im MN-Test innerhalb derselben Studie, der mit A549-Zellen durchgeführt wurde, konnte eine ähnlich starke Induktion von MN, vergleichbar zu dieser Arbeit, beobachtet werden (Semisch *et al.*, 2014). Ein DNA-schädigendes Potential von metallischen Cu NP konnte zudem in einer weiteren Studie an isolierten DNA-Molekülen gezeigt werden. Mechanistisch betrachtet verlief der oxidative Angriff auf die DNA laut Jose *et al.* über die Generierung von reaktivem Singulett-Sauerstoff (Jose *et al.*, 2011). Tacu *et al.* analysierten die Induktion von DNA-Schäden mithilfe des Comet-Assays in RLE-6TN-Zellen, wofür die Zellen für 4 h mit kupferbeschichteten Carbon-NP inkubiert wurden. Sie verwendeten eine nicht-zytotoxische Konzentration ($40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), die in der Folge eine signifikante Induktion von DNA-Strangbrüchen verursachte (Tacu *et al.*, 2021). Aufgrund des abweichenden Partikel-Aufbaus und den daraus resultierenden unterschiedlichen Cu-Gehalten lassen sich die Ergebnisse nur schwer mit den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten vergleichen.

Insgesamt zeigen die verwendeten Cu NM ein DNA-schädigendes Potential, wobei zwischen den Materialien keine deutlichen Unterschiede zu beobachten waren.

5.2.7 Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse aus den Untersuchungen der Kupferverbindungen

Kupfer findet aufgrund seiner antimikrobiellen Eigenschaften sowie seiner hohen elektrischen Leitfähigkeit auch in Nanoform ein breites Anwendungsspektrum. Die Toxizität von Kupfer wurde in den vergangenen Jahren bereits vielschichtig analysiert, in Bezug auf nanoskaliges Kupfer beschränkten sich die meisten Studien jedoch auf CuO NP, während metallische Cu NP weniger häufig und Cu NW nach aktuellem Kenntnisstand bisher nicht toxikologisch untersucht wurden. Hierzu soll die vorliegende Arbeit einen wichtigen Beitrag leisten. Die Relevanz der toxikologischen Untersuchungen von Cu NM konnte durch bereits veröffentlichte Studien gezeigt werden, da sie sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu ausgeprägten adversen Effekten führten (Petersen und Nelson, 2010; Karlsson *et al.*, 2022). Einige Studien, die verschiedene NP-Spezies miteinander verglichen, kamen unabhängig vom betrachteten Endpunkt zum Ergebnis, dass die Kupfer-basierten Materialien die größte Toxizität besitzen (Karlsson *et al.*, 2008; Lanone *et al.*, 2009). Dabei leistet vor allem die Größe des Materials einen wichtigen Beitrag zur Toxizität, was Vergleiche von CuO NP mit korrespondierenden mikroskaligen Partikeln bereits mehrfach zeigen konnte, indem sich die NP wiederholt als potenter herausstellten (Yokohira *et al.*, 2008; Midander *et al.*, 2009; Semisch *et al.*, 2014; Strauch *et al.*, 2017; Strauch *et al.*, 2020). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten NP wiesen einen mittleren Durchmesser von 17,1 nm (CuO NP) und 55,2 nm (Cu NP) auf, weshalb für die CuO NP grundsätzlich eine höhere Toxizität zu erwarten war. Die Cu NW maßen eine mittlere Länge von 6,3 μm und eine Breite von 300 nm. Da metallisches Kupfer leicht oxidiert, ist es wahrscheinlich, dass sich an der Oberfläche eine Oxidschicht gebildet hat. Dies konnten Midander *et al.* (2009) für deren eingesetzte Cu NP mithilfe einer multianalytischen Charakterisierung zeigen (Abbildung 11).

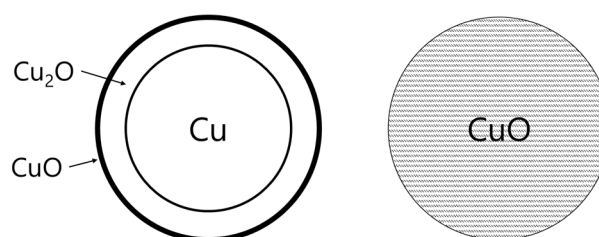


Abbildung 11 Schematische Darstellung der Zusammensetzung der metallischen Kupfernanopartikel (links) sowie der Kupferoxidnanopartikel (rechts).

Modifiziert nach Midander *et al.*, 2009.

Der Mechanismus hinter der Toxikologie von Cu NM wurde schon häufiger mit dem sog. *trojan horse mechanism* beschrieben, bei dem die NM endozytotisch aufgenommen und anschließend zu den Lysosomen transportiert werden, in deren Inneren ein pH-Wert von 4,5 herrscht. Dort lösen sich die

Cu NM aufgrund des niedrigen pHs, wodurch Ionen freigesetzt werden und anschließend ins Zytoplasma gelangen. Auf diese Weise wird die gut regulierte Kupferhomöostase umgangen, was auch zur Namensgebung des Mechanismus führte, und es kommt in der Folge zu einer Kupferüberladung der Zelle (Limbach *et al.*, 2005; Limbach *et al.*, 2007; Studer *et al.*, 2010). Dieser Effekt kommt für NM deutlich stärker zu tragen, die sich in neutralen Medien schlecht, jedoch im sauren Milieu leicht lösen, was auch auf Cu NM zutrifft. In Wasser liegt die Löslichkeit bei etwa 2 % (Semisch *et al.*, 2014), in den verwendeten Zellkulturmedien konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Löslichkeit der NP von 20-32 % und der NW von 8-13 % gemessen werden. Im Gegensatz dazu lösten sie sich in einer lysosomalen Modellflüssigkeit zu 51-71 % (5.2.1). Dass die endozytotische Aufnahme über den Clathrin-vermittelten Weg fast ausschließlich für die Toxizität von CuO NP verantwortlich ist, konnte bereits gezeigt werden (Wang *et al.*, 2012; Strauch *et al.*, 2020). Die intrazelluläre Ionenfreisetzung konnte im Rahmen dieser Arbeit durch die Analyse der Bioverfügbarkeit festgestellt werden (5.2.4), wobei nach der Inkubation mit NP keine eindeutige Dosisabhängigkeit beobachtet werden konnte. Dass kein weiteres Kupfer aufgenommen wurde, könnte möglicherweise daran liegen, dass die intrazelluläre Kupferkonzentration zunächst schnell ansteigt und zu einer Kupferüberladung der Zelle führt, woraufhin die Zelle die Aufnahme von weiteren extrazellulären Ionen unterbindet und wahrscheinlich das Ausschleusen der Ionen vorantreiben. Durch den damit einhergehenden hohen Stress könnte zudem die Endozytoseaktivität ausgesetzt werden. Nach der Inkubation mit Cu NW dagegen zeigten die dTHP-1-Zellen in Monokultur und die RLE-6TN-Zellen eine dosisabhängige intrazelluläre Zunahme der Kupferkonzentration. Bezüglich der dTHP-1-Zellen zeigt dies zum einen zudem, dass die Makrophagen-ähnlichen Zellen in der Lage sind, die *Wire* in einem größeren Ausmaß aufzunehmen und zum anderen könnte dies bedeuten, dass die NW durch ihre Form möglicherweise langsamer aufgenommen werden, was zu einer verzögerten Ionenfreisetzung führt. Andererseits könnte die Kupferüberladung der dTHP-1-Zellen zu keiner Beeinträchtigung der Endozytoseaktivität führen, was für die anderen Zelllinien vermutet wurde. Insgesamt konnte in RLE-6TN-Zellen am wenigsten freies Kupfer pro Zelle nachgewiesen werden. Aufgrund der Größe der Zellen ist die daraus resultierende Ionenkonzentration jedoch vergleichbar mit den A549-Zellen. Dass die RLE-6TN-Zellen dennoch sensitiver auf diesen Kupferionengehalt reagieren, konnte in der stärkeren Abnahme der Viabilität in der Analyse der Zytotoxizität beobachtet werden (5.2.3).

Nach der intrazellulären Freisetzung der Ionen hat deren Redox-Aktivität einen entscheidenden Einfluss auf die Toxizität, da diese in Fenton-ähnlichen Reaktionen reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

erzeugen können. ROS sind hochreaktiv und können zum Zelltod führen, indem sie Zellbestandteile schädigen (Jomova *et al.*, 2012). In einigen Studien konnte bereits die Generierung von ROS durch Cu NM belegt werden (Fahmy und Cormier, 2009; Tacu *et al.*, 2021). In einer anderen Studie wiederum konnte gezeigt werden, dass die Kupferionen weniger über ROS zum Zelltod führen als viel mehr über die Bindung an Thiol-haltige Proteine, deren Funktion dadurch beeinträchtigt wird. Dazu zählt auch Glutathion (GSH), das während einer Kupferüberladung verbraucht wird (Saporito-Magriñá *et al.*, 2018). Einige der angesprochenen Mechanismen konnten auch in den Genexpressionsstudien beobachtet werden. Die Induktion von MT-codierenden Genen ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Bioverfügbarkeitsanalyse, da diese eine intrazelluläre Ionenfreisetzung anzeigt und damit zusätzlich die *trojan horse*-Theorie bestätigt. Die verstärkte Expression von *HMOX1* unterstützt zudem die Annahme, dass die Kupferionen oxidativen Stress verursachen, während die sehr stark erhöhte Transkription eines Genes (v.a. in A549-Zellen), das für ein *Heat shock* Protein codiert (*HSPA1A*), mit der Theorie von Saporito-Magriñá *et al.* übereinstimmt, wonach Cu an Thiolgruppen bindet und die Proteine auf diese Weise unbrauchbar macht (Saporito-Magriñá *et al.*, 2018). Dieser Publikation zufolge versuchen die Zellen eher die Protein-Homöostase wiederherzustellen als gegen die oxidative Umgebung vorzugehen und verlieren so erst kurz vor dem Zelltod die Kontrolle über die Thiol-Homöostase. GSH, das ebenfalls eine Thiol-Gruppe enthält, agiert laut den Autoren während der Kupferüberladung protektiv, indem es mit den Kupferionen interagiert und diese bindet und nicht, wie erwartet, die ROS reduziert. Darüber hinaus konnte in den Genexpressionsstudien die Induktion wichtiger pro-inflammatorischer Zytokine (*IL-6*, *IL-8*) beobachtet werden, was auch in der Literatur bereits für CuO NP sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden konnte (Yokohira *et al.*, 2008; Cho *et al.*, 2012a; Tacu *et al.*, 2021). Einzelne Studien konnten die Induktion von inflammatorischen Prozessen auch für Cu NP mit Chitosan-Beschichtung zeigen, wobei auf deren Anwendung im medizinischen Bereich abgezielt wurde (Worthington *et al.*, 2013). Die Induktion von oxidativem Stress und Inflammation ist im Zusammenhang mit NM über die Transkription von inflammatorischen Genen eng verknüpft. Zusätzlich können die ROS auch Lipide oxidieren, was zur Produktion von pro-inflammatorischen Eikosanoiden führt. Signalwege, die über oxidative Bedingungen induziert werden, sind unter anderem der pro-inflammatorische MAP (*mitogen activated protein*)-Kinase-Weg, aber auch die Induktion von redox-sensitiven TF wie AP-1 und NF- κ B spielen eine Rolle (Donaldson und Poland, 2012). Die humanen Zellmodelle zeigten in der Genexpression eine flächendeckende Repression vieler Gene, während in den Rattenzellen ein Großteil der Gene induziert wurde. Dies steht möglicherweise im Zusammenhang mit den unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Epithelzelllinien, da es sich bei den A549-Zellen um eine

Tumorzelllinie handelt, während RLE-6TN Primärzellen sind. Ähnliche Unterschiede zwischen A549- und BEAS-2B-Zellen konnten bereits beobachtet werden (Strauch *et al.*, 2017). Eine bekannte biochemische Dysfunktion der A549-Zellen ist die Daueraktivierung des TF Nrf-2 aufgrund eines Defekts seines negativen Inhibitors Keap1 (Singh *et al.*, 2006). Die Repression vieler Gene der DNA-Schadensantwort in beiden A549-basierten Zellsystemen entsprach nicht den Erwartungen, da durch die Untersuchung der Genotoxizität DNA-Schädigungen detektiert werden konnten (5.2.6). Zudem war eine deutliche Tendenz der freien Kupferionen zur Akkumulation im Zellkern zu erkennen (5.2.4), wodurch die Gefahr besteht, dass diese entweder direkt mit der DNA interagieren oder weitere ROS generieren, die das Potential besitzen, ebenfalls die DNA anzugreifen. Beide Szenarien würden zur Schädigung der DNA führen. Darüber hinaus könnten die Ionen auch mit Kern-Proteinen interagieren und deren Funktionsweise stören. Hierzu würde auch PARP1 zählen, das eine wichtige Rolle in der Schadenserkennung spielt, und zudem Zink-bindende Strukturen trägt, die anfällig für Kupfer sind. Jedoch könnten nicht allein die Ionen zur schädigenden Wirkung der Cu NM beitragen, sondern auch die NM selbst könnten direkt mit Bestandteilen der Zellen interagieren. Falls die NM die mitochondriale Membran depolarisieren und auf diese Weise den Elektronentransport stören, können auch aus den Mitochondrien ROS freigesetzt werden (Petersen und Nelson, 2010). Bei der Betrachtung der Induktion von DNA-SB hatten Cu NP in A549-Zellen den größten Effekt, wobei für alle Konzentrationen und Materialien in der Kokultur mehr SB induziert wurden. Dies könnte an der stärker ausgeprägten Sensitivität der dTHP-1-Zellen liegen. Die RLE-6TN-Zellen reagierten empfindlicher auf die Cu NM als die humanen Zellen, wobei die höchste eingesetzte Dosis wahrscheinlich zu zytotoxisch war und zur Apoptose geführt haben könnte. MN in A549-Zellen wurden von allen Materialien in ähnlichem Ausmaß induziert, während das Kupfersalz keinen Effekt in beiden Assays zeigte. In anderen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass extrazellulär gelöstes Kupfer keine Genotoxizität hervorruft (Karlsson *et al.*, 2008; Karlsson *et al.*, 2009), weshalb folglich allein die aufgenommenen NM zur DNA-schädigenden Wirkung beitragen. Dass nach der Inkubation mit den Cu NM eine Dosisabhängigkeit beobachtet wurde, in der Analyse der Bioverfügbarkeit hingegen nicht, spricht zudem dafür, dass nicht alleine die intrazellulär gelösten Ionen für die genotoxische Wirkung verantwortlich sind.

Insgesamt konnten in den Analysen im Rahmen dieser Arbeit zwischen den verschiedenen Cu NM nur geringfügige Unterschiede festgestellt werden. Die neuartigen Cu NW wiesen eine leicht erhöhte Zytotoxizität in den humanen Zellsystemen auf, während sich die drei NM in den Rattenzellen ähnlich zytotoxisch zeigten. Auf unterschiedliche Wirkmechanismen durch die verschiedenen Morphologien

und Größen konnte in den Genexpressionsanalysen nicht rückgeschlossen werden, da sich die Expressionsprofile sehr glichen. Allein in RLE-6TN-Zellen zeigten die Cu NW eine stärkere Induktion der Inflammationsmarker. Insgesamt konnte zudem die Induktion von einschlägigen Stressmarkern, inflammatorische Gene sowie einzelne Gene der DNA-Schadensantwort beobachtet werden. Auch eine DNA-schädigende Wirkung, die bei allen drei NM dosisabhängig verlief, konnte nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse stimmen mit dem in der Literatur beschriebenen Wirkmechanismus für Cu NM überein, wonach es über den *trojan horse mechanism* zur Kupferüberladung der Zellen kommt. Darüber hinaus konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass dieser pathogene Verlauf wahrscheinlich auch auf faserförmige Cu NM zutrifft und kein spezieller Mechanismus nachzuweisen war, der auf die Faserform zurückzuführen ist. Zudem konnte die Hypothese, dass die etwas größeren Cu NP weniger toxisch sein müssten, nicht bestätigt werden. Daher kann geschlussfolgert werden, dass NP bestehend aus metallischen Kupfer eine größere Toxizität aufweisen als CuO NP. Womöglich wäre dieser Effekt noch besser zu vergleichen gewesen, wenn die beiden NP eine ähnliche Größe aufgewiesen hätten.

5.3 Nickelverbindungen

Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten nickelbasierten NM handelte es sich um Nickelnanowire (Ni NW, *PlasmaChem*, PL-NiW200) und Nickelnanopartikel (Ni NP, *Sigma-Aldrich*, 577995). Zudem wurde eine lösliche Nickelverbindung, NiCl_2 , im Folgenden zumeist als Ni_{aq} bezeichnet, mitgeführt, um den Einfluss von Ioneneffekten besser beurteilen zu können.

5.3.1 Materialcharakterisierung

Die physikochemischen Eigenschaften der Ni NM sind in Tabelle 12 zu sehen. Der hydrodynamische Durchmesser der Ni NP ($388,0 \pm 33,2$ nm) scheint vom primären Partikeldurchmesser ($21,4 \pm 0,1$ nm) deutlich abzuweichen. Zusammen mit dem relativ hohen PDI von $0,67 \pm 0,02$ deutet dies auf eine inhomogene Suspension mit schnell agglomerierenden Partikeln hin. Auch das ζ -Potential, das bei beiden Materialien zwischen -30 und +30 mV liegt, signalisiert eine instabile Suspension. Wie bereits erwähnt (5.2.1), wird dieser Wert wahrscheinlich von einer Proteinkorona beeinflusst (Walkey und Chan, 2012). Beide nickelbasierte Materialien weisen eine hohe Reinheit von 98,7-99,1 %wt auf.

Tabelle 12 Physikochemische Eigenschaften der Nickelnanomaterialien.

d_p : Primärer Partikeldurchmesser. d_h : Hydrodynamischer Durchmesser. PDI: Polydispersitätsindex.

	Ni NP	Ni NW
d_p [nm]	21,4 ± 0,1	
d_h [nm]	388,0 ± 33,2	
PDI	0,67 ± 0,02	
ζ-Potential [mV]	-15,7 ± 0,2	-14,5
Reinheit [%wt]	98,7 ± 0,86	99,1
Länge [µm]		9,97 ± 0,29
Breite [nm]		280 ± 6

In Tabelle 13 ist die Löslichkeit der Nickelmaterialien in den Zellkulturmedien sowie in biologisch relevanten Flüssigkeiten zusammengefasst. Nach 24 h lösten sich im Zellkulturmedium maximal 3,9 % der eingesetzten Ni NP und maximal 1,0 % der eingesetzten Ni NW. Aufgrund dieser Analyse wurde in den folgenden Experimenten eine Ionenkontrolle der Konzentration 34 µM mitgeführt, was der Konzentration an gelösten Ionen nach 24 h und 50 µg/mL Ni NP im RPMI-1640 entspricht. In der lysosomalen Modellflüssigkeit lösten sich die Ni NP zu 43,7 %, während sich nur 5,6 % aus den Ni NW lösten.

Die Ergebnisse zur Löslichkeit stimmen auch mit vergleichbaren Studien überein. So konnten Perez *et al.* für Ni NW ebenfalls eine Löslichkeit von <1 % in Zellkulturmedien und artifiziellen Körperflüssigkeiten (pH 7,8) messen, während in einer saureren Lösung (pH 4,8) eine Löslichkeit von 4 % festgestellt werden konnte (Perez *et al.*, 2016). Auch Ni NP zeigten ein ähnliches Löslichkeitsverhalten (Latvala *et al.*, 2016).

Tabelle 13 Löslichkeit der Nickelmaterialien nach 24 h in den verwendeten Zellkulturmedien sowie in relevanten biologischen Flüssigkeiten.

RPMI-1640/Ham's F-12: Zellkulturmedien mit 10 % FKS. AAF: Artificielle alveoläre Flüssigkeit (pH 7,4). ALF: Artificielle lysosomale Flüssigkeit (pH 4,5).

	Löslichkeit [% gelöst]			
	RPMI-1640	Ham's F-12	AAF	ALF
Ni NP	3,9 ± 1,4	3,0 ± 2,2	4,0 ± 0,7	43,7 ± 9,5
Ni NW	0,6 ± 0,3	1,0 ± 0,8	0,9 ± 0,6	5,6 ± 6,9

5.3.2 Zytotoxizität

Die Zytotoxizität der Ni NM ist in Abbildung 12 dargestellt. Für alle drei Zellkulturen ist eine dosisabhängige Abnahme der Viabilität erkennbar. Hierbei zeigten sich die Ni NP deutlich potenter als die korrespondierenden NW. In der höchsten inkubierten Konzentration führten die Ni NP in A549-Zellen zu einer Abnahme der Viabilität um 70 %, die NW um 35 %. Die Rattenepithelzellen reagierten empfindlicher auf Ni NM als das humane Pendant. In dieser Zelllinie sank die Viabilität durch Ni NW auf 50 % und durch Ni NP auf 7 %.

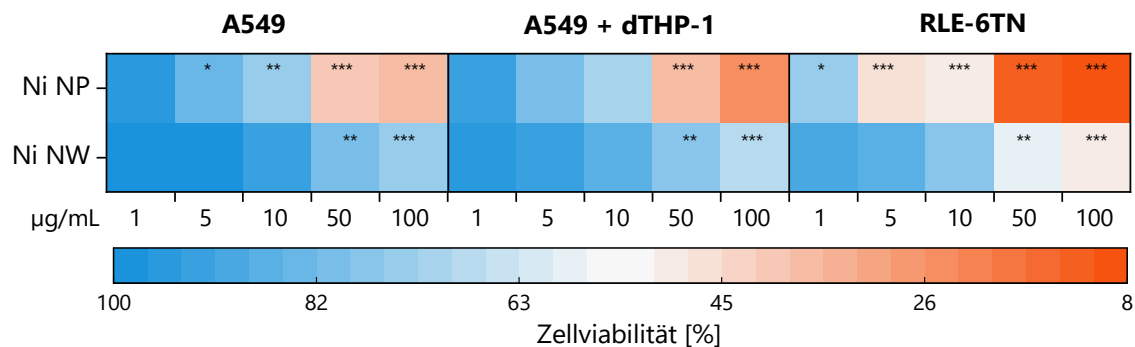


Abbildung 12 Zellviabilität von A549-, A549 + dTHP-1- sowie RLE-6TN-Zellen nach Inkubation mit Nickel-basierten Nanopartikeln (NP) und Nanowire (NW).

Die Zellen wurden für 24 h mit den Testsubstanzen inkubiert und im Anschluss der ATP-Gehalt bestimmt. Als *Heatmap* dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen. Die Einfärbungen entsprechen den ATP-Gehalten in Prozent der Kontrolle. Statistisch signifikante Abweichungen gegenüber der unbehandelten Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett-T-Test (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Magaye *et al.* haben ebenfalls Studien zur Zytotoxizität über die Ermittlung des ATP-Gehalts mit Ni NP in A549-Zellen durchgeführt. Sie beobachteten eine Abnahme der Viabilität auf ca. 40 % in der höchsten inkubierten Dosis (75 µg/mL), was sich mit den im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Ergebnissen deckt. Unterschiede können über die abweichende Expositionszeit (< 24 h) oder den in etwa doppelten Partikeldurchmesser (40,5 nm) erklärt werden. Zudem zeigten sich die NP zytotoxischer als die sog. feine Partikel, die einen Durchmesser von 350 nm aufwiesen (Magaye *et al.*, 2016). In einer weiteren Studie wurden im Zusammenhang mit Ni NW WI-38-Zellen verwendet, eine humane Fibroblastenzelllinie. Die dabei erhobenen Zytotoxizitätsdaten (keine Abnahme der Zellviabilität nach 24 h in den Konzentrationen 0-22,5 µg/mL) stimmen mit den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Werten überein (Felix *et al.*, 2016). In einer dritten Studie wurden dTHP-1-Zellen mit Ni NW inkubiert, deren Viabilität nach 24 h bei der höchsten Dosis (ca. 50 µg/mL) um 50 % herabgesetzt war (Byrne *et al.*, 2009).

Anhand der erhobenen Daten wurde für die Materialien und Zelllinien je eine Konzentration mit keiner/niedriger, mittlerer und hoher Zytotoxizität für die weiteren Versuche ausgewählt. Diese sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14 Dosisauswahl für die weiterführenden Experimente aufgrund der Daten des ATP-Assays.
Angaben in µg/mL.

	Niedrig	Mittel	Hoch
Ni NP	1	10	50
Ni NW	10	50	100

5.3.3 Bioverfügbarkeit und intrazelluläre Verteilung

Die Bioverfügbarkeit der Ni NP fiel in den beiden humanen Zelllinien ähnlich aus (Abbildung 13), während in der Rattenzelllinie eine höhere Nickelkonzentration nachgewiesen werden konnte. In allen drei Zelllinien ist dabei ein dosisabhängiger Anstieg an intrazellulär verfügbarem Nickel zu beobachten. Nach der Inkubation mit Ni NW dagegen waren die Konzentrationen an frei verfügbarem Nickel in allen untersuchten Zelllinien ähnlich ausgeprägt, wobei deutlich weniger Nickel gemessen werden konnte als nach der Inkubation mit Ni NP. Innerhalb der Zellen war das Nickel nach der Inkubation mit Ni NW in etwa ähnlich stark im Zytoplasma und im Zellkern konzentriert. Hingegen ließ sich nach der Inkubation mit Ni NP eine Tendenz hin zum Zytoplasma beobachten.

Latvala *et al.* untersuchten ebenfalls die Aufnahme von Ni NP in A549-Zellen und konnten bereits nach einer Inkubationszeit von 4 h deren Internalisierung nachweisen. Nach einer Nachinkubationszeit von weiteren 24 h wurde der Ni-Gehalt mittels AAS bestimmt, wobei eine Aufnahme von 25 % des eingesetzten Nickels detektiert werden konnte. Eine intrazelluläre Freisetzung von Ionen konnte allerdings nicht bestätigt werden und die Partikel in den Endosomen hatten sich nach 24 h kaum gelöst (Latvala *et al.*, 2016).

Die intrazelluläre Verteilung nach der Inkubation mit NiO MP in A549-Zellen wurde von Schwerdtle *et al.* untersucht. Auch sie stellten eine konzentrationsabhängige Zunahme des intrazellulären Ni-Gehaltes fest, wobei sich ebenfalls der größere Anteil an Nickel im Zytoplasma feststellen ließ. Das Verhältnis der Konzentration im Zytoplasma und im Zellkern belief sich in der höchsten Inkubationskonzentration auf 2:1 (Schwerdtle und Hartwig, 2006).

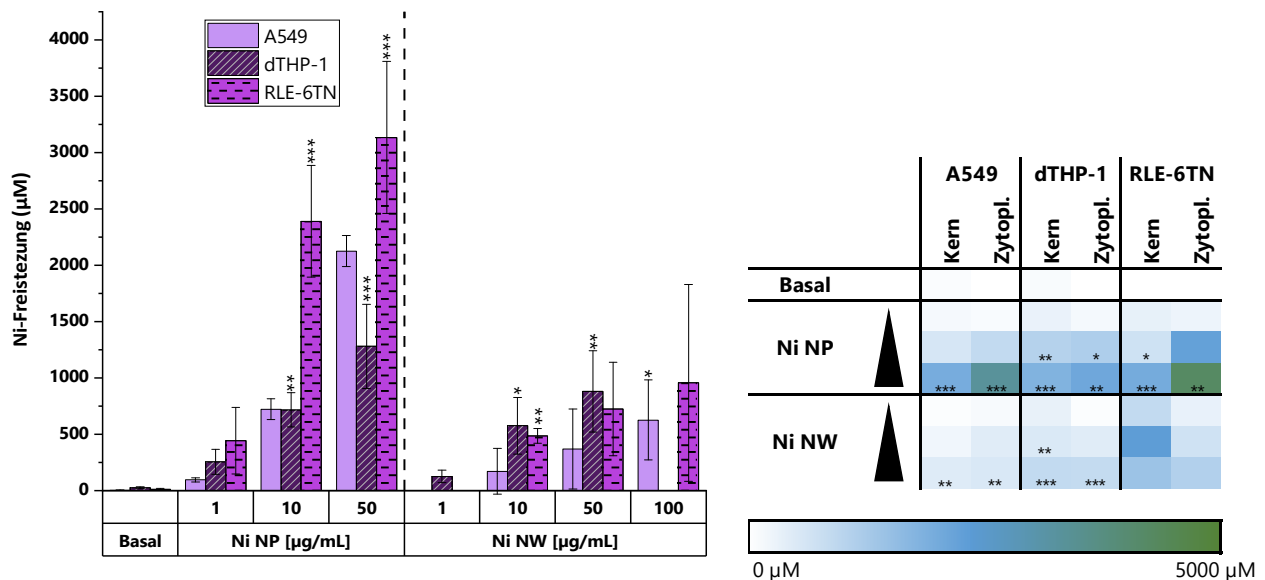


Abbildung 13 Bioverfügbarkeit (links) und intrazelluläre Verteilung (rechts) der Nickelnanomaterialien in den Zelllinien A549, dTHP-1 und RLE-6TN.

Die Zellen wurden für 24 h mit den Nanomaterialien inkubiert. Die Daten sind als Ionenkonzentrationen dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen \pm SD. Statistisch signifikante Abweichungen gegenüber der unbehandelten Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett-T-Test (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Verschiedene Studien konnten zudem die zelluläre Aufnahme von faserförmigen Ni NW zeigen (Fung *et al.*, 2008; Margineanu *et al.*, 2016). Eine weitere Studie verwendete hierfür dTHP-1-Zellen, wobei der Nachweis allerdings nur qualitativ verlief (Byrne *et al.*, 2009). Perez *et al.* (2016) analysierten die intrazelluläre Ionenfreisetzung in HCT 116-Zellen nach der Inkubation mit Ni NW, die sich auf $< 1\%$ belief. Die im Rahmen dieser Arbeit detektierten Nickelionen belaufen sich ebenfalls auf $< 1\%$ des eingesetzten Materials.

Bezogen auf die Gesamtaufnahme pro Zelle (Abbildung 31 im Anhang unter 8.2) konnte in dTHP-1-Zellen nach der Inkubation mit Ni NW die dreifache Menge und nach der Inkubation mit Ni NP ein ähnlicher Gehalt an freiem Nickel im Vergleich zu den beiden Epithelzelllinien nachgewiesen werden. Makrophagen sind ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems und dafür verantwortlich, Fremdkörper oder schädliche Viren und Bakterien über Endozytose aufzunehmen, zu verdauen und auf diese Weise unschädlich zu machen. Daher besitzen sie eine größere Endozytosekapazität als Epithelzellen und sind in der Lage, mehr NM aufzunehmen. Dies würde die höheren intrazellulären Gehalte in den dTHP-1-Zellen erklären.

5.3.4 Genexpressionsanalysen

Die Veränderungen der Genexpression in A549-Zellen sowie der Kokultur mit dTHP-1-Zellen durch die Inkubation mit Ni NM sind in Abbildung 14 dargestellt.

Durch die Inkubation der A549-basierten Zellsysteme mit Nickelverbindungen konnte eine veränderte Genexpression in den Genclustern der Inflammationsmarker und der Metallhomöostase sowie bei einigen Genen der oxidativen Stressantwort und der DNA-Schadensantwort beobachtet werden. Die Gengruppe der Apoptose und der Zellzyklusregulation ist aufgrund einer nur geringfügigen Änderung im Anhang (Abbildung 34, Kapitel 8.4.1.1) dargestellt.

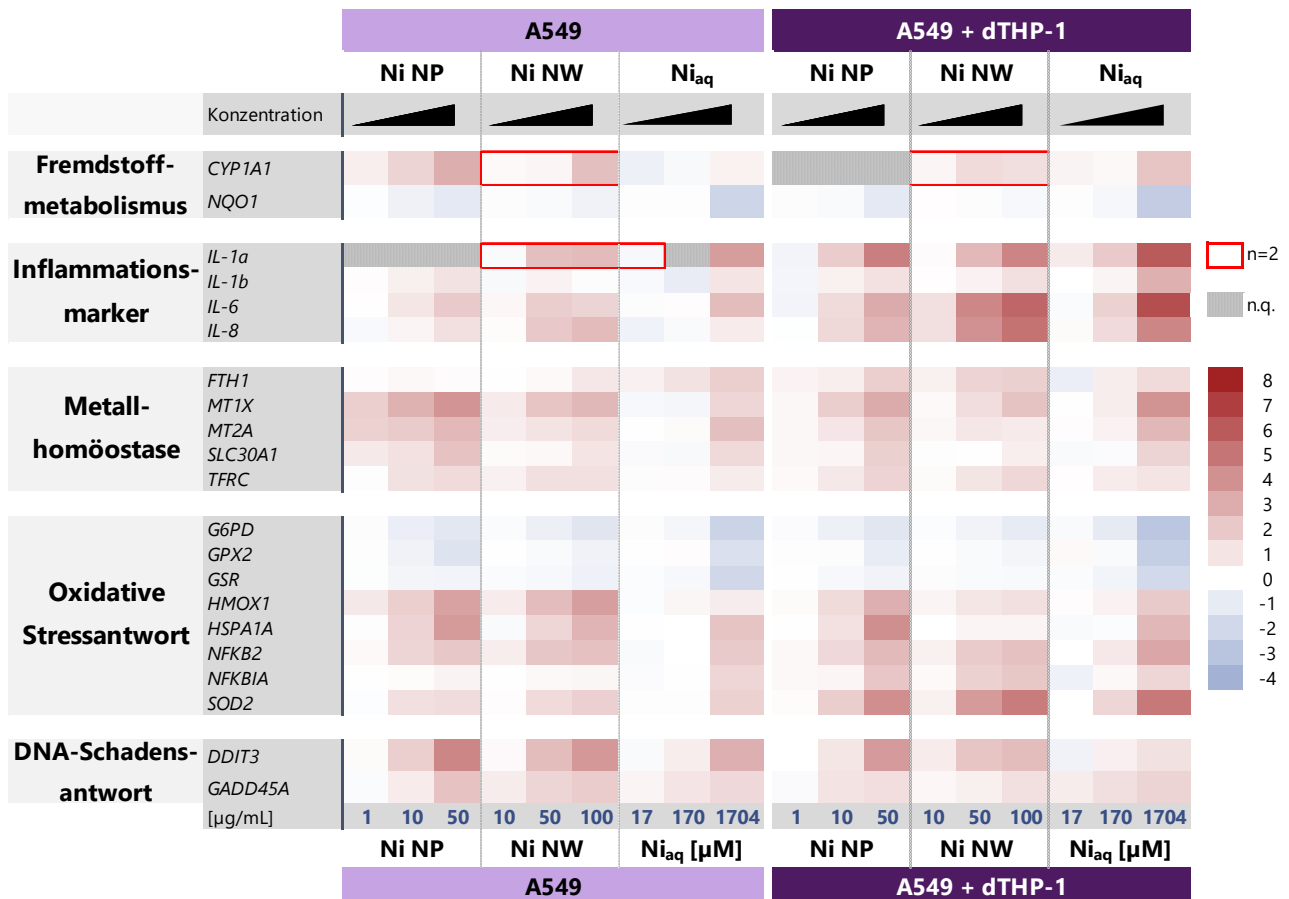


Abbildung 14 Beeinflussung der Genexpression durch Nickel-basierte Nanomaterialien in A549-Monokultur sowie -Kokultur mit dTHP-1-Zellen. Gezeigt sind Gene des Fremdstoffmetabolismus, der Metallhomöostase, der oxidativen Stressantwort, der DNA-Schadensantwort sowie inflammatorische Marker.

Eine rote Färbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine verminderte Genexpression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen, sofern nicht anders angegeben.

Die Nickelverbindungen liegen nach der Aufnahme wahrscheinlich sowohl als Ionen als auch in ihrer Nanoform vor. Dass eine Ionenfreisetzung stattfindet, konnte bereits in den Studien zur Bioverfügbarkeit gezeigt werden (Kapitel 5.3.3) und wird mithilfe der Genexpression durch die Induktion der MT-codierenden Gene (*MT1X*, *MT2A*) im Gencluster der Metallhomöostase bestätigt. Nickelionen können zudem intrazellulären oxidativen Stress auslösen, der auch Inflammation und DNA-Schädigungen hervorrufen kann (Cameron *et al.*, 2011; Goodman *et al.*, 2011). Die beobachteten Effekte könnten aber auch durch die NM selbst und weniger durch die freigesetzten

Ionen hervorgerufen werden (Capasso *et al.*, 2014). Die Resultate auf transkriptioneller Ebene spiegeln dabei jedoch nicht zwingend die Situation auf Proteinebene wider und sollten deshalb dahingehend überprüft werden.

Beim Vergleich der Mono- und Kokultur sind Unterschiede vor allem im Bereich der Inflammationsmarker zu erkennen. Hierbei wurden die Gene *IL-1 α* , *IL-6* und *IL-8* in der Kokultur um ein Vielfaches stärker exprimiert als in der Monokultur. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf die dTHP-1-Makrophagen zurückzuführen, die die Rolle von Immunzellen einnehmen, dadurch selbst vermehrt Inflammationsmarker ausschütten und wechselseitig die inflammatorische Antwort in A549-Zellen verstärken. Die prägnanten Gene der Gruppe der Metallhomöostase (*MT1X*, *MT2A*) wurden dagegen in der Monokultur etwas stärker exprimiert als in der Kokultur, was in dieser Hinsicht für einen protektiven Effekt der dTHP-1-Zellen spricht. Ein ähnliches Bild ist auch für die beiden wichtigsten Marker von oxidativem Stress *HMOX1* und *HSPA1A* zu sehen. Gegenteilige Ergebnisse liefert auf den ersten Blick jedoch das Gen *SOD2*, das für die Superoxiddismutase 2 codiert, und in der Kokultur bei Ni NW (100 $\mu\text{g/ml}$) um das 26,6-fache (\log_2 -fach 4,7) erhöht wurde, während in der Monokultur eine Erhöhung um das 3,25-fache (\log_2 -fach 1,7) gemessen werden konnte. Diese Induktion von *SOD2* infolge einer Inflammation konnte verstärkt in THP-1-Zellen, aber auch in A549-Zellen bereits beobachtet werden. In THP-1-Zellen spielt dabei vor allem TNF- α und in A549-Zellen der NF- κ B-Signalweg eine wichtige Rolle, wobei IL-6 verstärkend einwirkt (Yi *et al.*, 2017). In seiner Funktion bindet das Enzym SOD2 an ROS wie das Hydroperoxid-Anion und wandelt diese in die weniger reaktiven Verbindungen H_2O_2 und Sauerstoff um.

Beim Vergleich der beiden Morphologien der Ni NM scheinen die Ni NW einen stärkeren Einfluss auf die Genexpression der Kokultur zu haben, was vor allem die Gene der inflammatorischen Antwort betrifft. Hierbei kann allerdings ein reiner Ioneneffekt ausgeschlossen werden, da die Ni NW eine geringere intrazelluläre Ionenfreisetzung aufwies. Vermutlich führen die *Wire* in den Makrophagen vermehrt zur sog. „frustrierten Phagozytose“, was eine verstärkte Ausschüttung inflammatorischer Marker zur Folge hat. Ähnliche Beobachtungen konnten auch Poland *et al.* (2012) beim Vergleich von langen Ni NW (24 μm) und kurzen Ni NW (4 μm) mit Ni NP machen. Die Autoren konnten die „frustrierte Phagozytose“ im Falle der langen *Wire* detektieren, während die kurzen Fasern und die Ni NP vollständig internalisiert wurden.

Die Genexpressionsänderungen in Rattenepithelzellen sind in Abbildung 15 dargestellt.

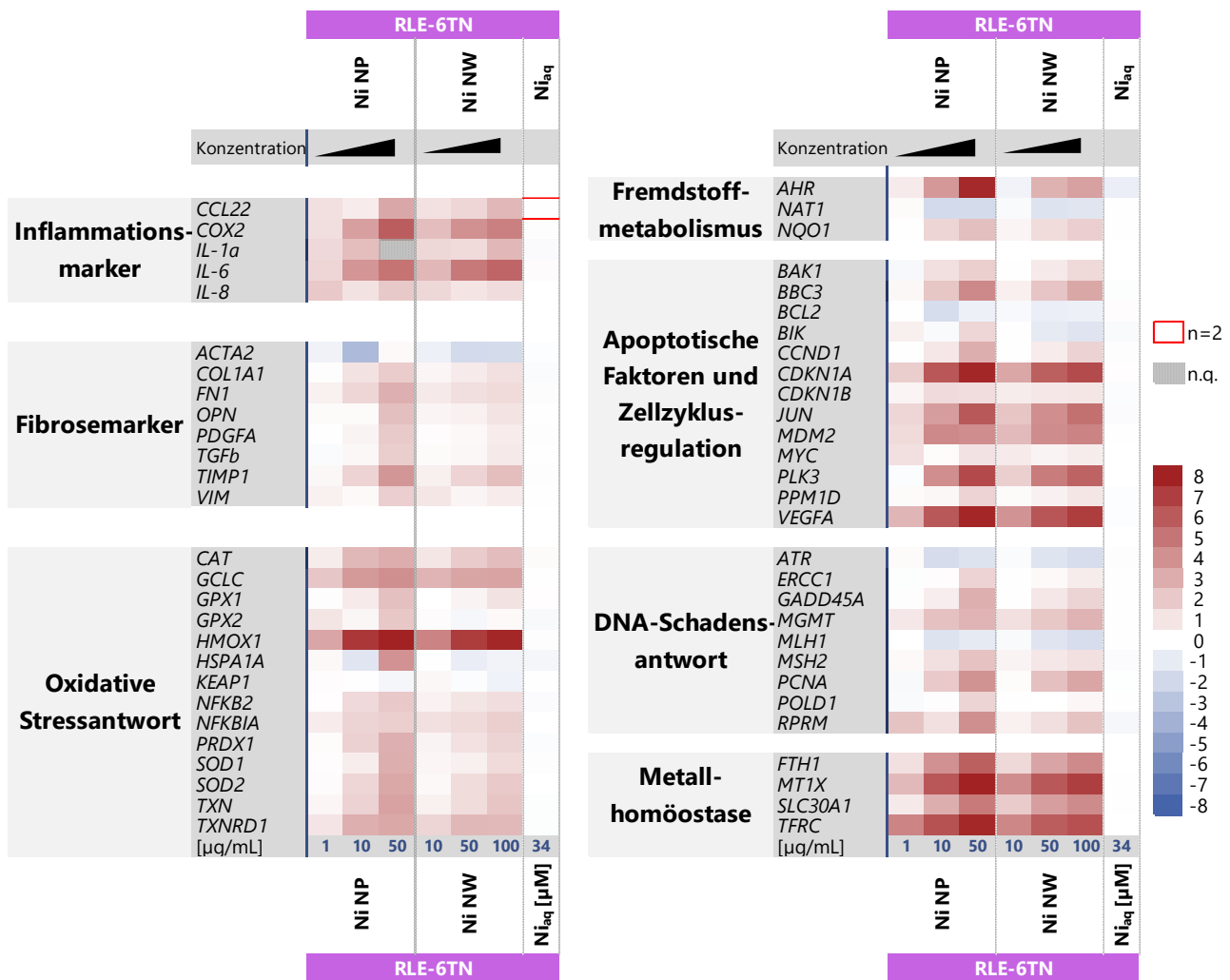


Abbildung 15 Beeinflussung der Genexpression durch Nickel-basierte Nanomaterialien in RLE-6TN-Zellen. Gezeigt sind Gene des Fremdstoffmetabolismus, der Metallhomöostase, der DNA-Schadensantwort, der Apoptose sowie der Zellzyklusregulation, der oxidativen Stressantwort und inflammatorische und fibrotische Marker.

Eine rote Färbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine verminderte Genexpression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen, sofern nicht anders angegeben.

Beim Vergleich der beiden Ni NM sind keine Unterschiede in den Expressionsprofilen zu erkennen, wobei die Ni NP die Expression etwas stärker beeinflussten als die Ni NW, obwohl die halbe Inkubationskonzentration verwendet wurde. Dies ist in Übereinstimmung mit den vorangegangenen Untersuchungen der Bioverfügbarkeit sowie der Zytotoxizität, in denen die Ni NP bei gleicher Dosierung stärkere Effekte zeigten. Deutliche Änderungen ergaben sich für die Gene der Metallhomöostase, die in erheblichem Ausmaß induziert wurden. Am stärksten betroffen waren die Gene *MT1X* und *TFRC* (225,2-281,7-fach (log₂-fach 7,8-8,1)), aber auch *FTH1* und *SLC30A1* wurden bedeutend induziert (28,1-56,6-fach (log₂-fach 4,8-5,8)). Ebenfalls sehr stark induziert wurde das Gen

HMOX1 (NP 592,6 (\log_2 9,2); NW 229,6 (\log_2 7,8)). Weitere Gene aus der Gruppe der oxidativen Stressantwort, deren Expression in relevantem Ausmaß gesteigert wurde, waren *GCLC*, *CAT*, *TNX*, *TXNRD1* und *SOD2*. Ein Großteil der Inflammationsmarker wurde ebenfalls in relevantem Ausmaß induziert. Hierzu zählen vor allem die Gene *IL-6*, *IL-1a*, *CCL22* und *COX2*.

Die zum Teil massive Induktion von Genen aus der Gruppe der Zellzyklusregulation lässt auf einen Zellzyklusarrest schließen. Auffällig ist zudem, dass das lösliche Nickelsalz zu keiner relevanten Änderung der Genexpression führte. Da die NiCl_2 -Inkubationskonzentration an die Löslichkeit der NM im Zellkulturmedium angelehnt ist, können die durch die Ni NM beobachteten Effekte nicht durch extrazelluläre gelöste Ionen induziert worden sein.

Einige dieser Gene sprechen für die Induktion des ERK/MAPK-Signalwegs: *VEGFA* codiert für den *vascular endothelial growth factor* α und wirkt unter Normalbedingungen proliferativ. Allerdings vermittelt es auch inflammatorische Reaktionen und aktiviert den genannten Signalweg (Wu *et al.*, 2000; Shaik-Dasthagirisahab *et al.*, 2013). Die Induktion von VEGF durch Nickel konnte bereits in anderen Studien beobachtet werden (Gliga *et al.*, 2020). *CDKN1A*, das für das Protein p21 codiert, wirkt anti-proliferativ indem es Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) hemmt, die den Übergang zwischen verschiedenen Zellzyklusphasen vermitteln (Karimian *et al.*, 2016). *PLK3* hemmt bei einer übermäßigen Expression ebenfalls die Proliferation (Conn *et al.*, 2000). Auch *NFKB2*, das vermehrt induziert wurde, steht im Zusammenhang mit dem ERK/MAPK-Signalweg, dessen Aktivierung in Verbindung mit Nickel bereits gezeigt werden konnte (Capasso *et al.*, 2014). Die Autoren vermuten dabei die Induktion über ROS und oxidativen Stress.

5.3.5 Untersuchungen zur Genotoxizität

Die Ergebnisse der Genotoxizitätsanalysen sind in Abbildung 16 dargestellt. Diese umfassen auch Resultate der Abschlussarbeit von Marius Dargel.

Die Ni NP führten unter den humanen Zellkulturen ausschließlich in der A549-Monokultur zu einem dosisabhängigen, signifikanten Anstieg an DNA-Strangbrüchen. Auch im Mikrokerntest konnte eine signifikante Induktion durch Ni NP und Ni NW detektiert werden, während die Ni NW jedoch keine DNA-Strangbrüche induzierten. In der Kokultur konnte keine Induktion von DNA-Strangbrüchen gemessen werden. In RLE-6TN-Zellen führten lediglich die beiden höchsten Dosen jeweils zu einem Anstieg an DNA-Strangbrüchen.

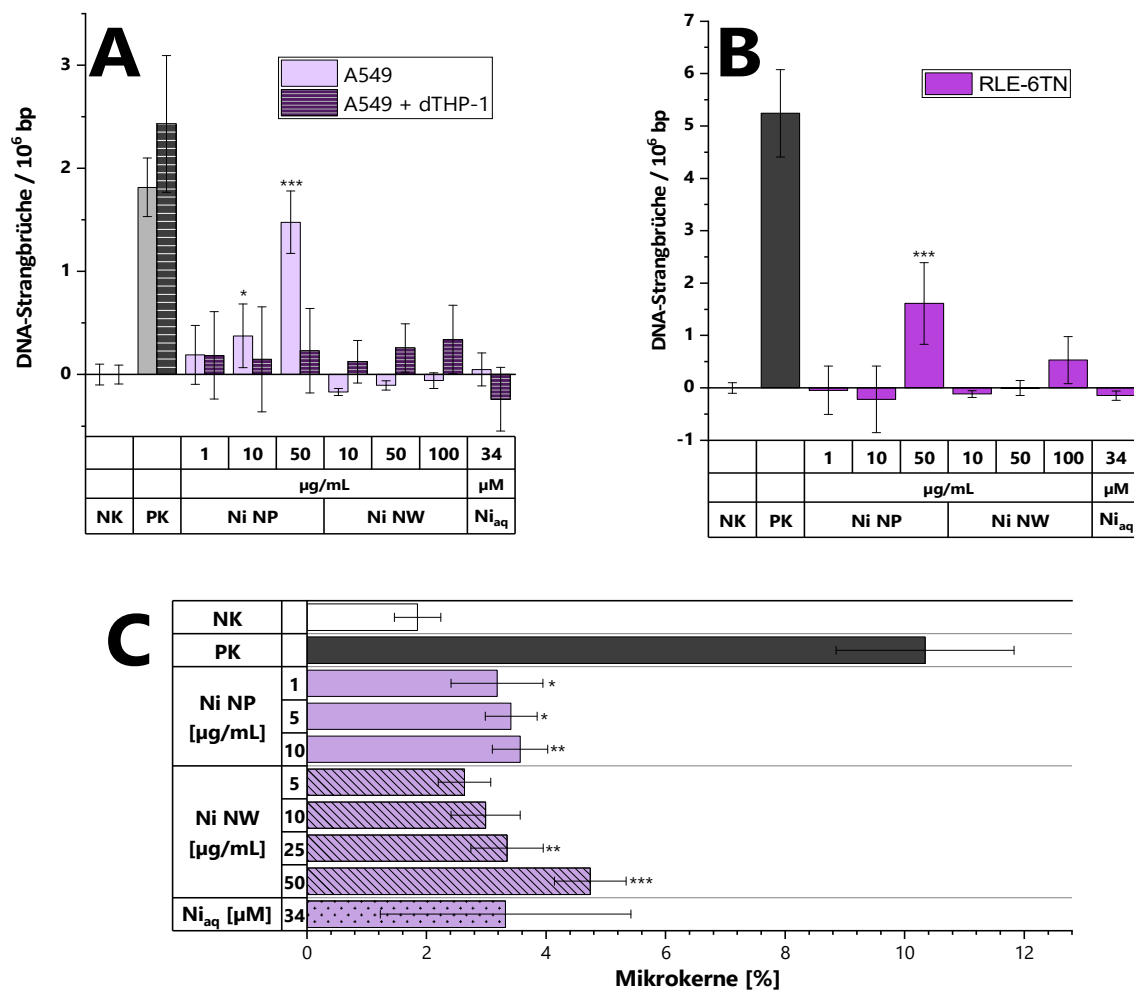


Abbildung 16 Gegenüberstellung der Induktion von DNA-Strangbrüchen sowie der Induktion von Mikrokerneln nach der Inkubation mit Nickelmaterialien.

A: Induktion von DNA-Strangbrüchen in A549-Zellen in Mono- als auch in Kokultur mit dTHP-1-Zellen. B: Induktion von DNA-Strangbrüchen in RLE 6TN-Zellen. C: Induktion von Mikrokerneln in A549-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit den Testsubstanzen inkubiert. Für den Mikrokerntest wurde für weitere 24 h nachinkubiert. Als Positivkontrollen dienten für die AU (A+B) 100 µM Menadion und für den Mikrokerntest (C) 0,3 µM Mitomycin C. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen ± SD. Statistisch signifikante Abweichungen gegenüber der unbehandelten Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett-T-Test (*p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001).

Auch Åkerlund *et al.* (2018) beobachteten genotoxische Effekte nach der Inkubation von humanen Lungenzellen (HBEC) mit Ni NP, die sich vor allem in Einzelstrangbrüchen äußerten. Zudem war eine leichte Mutagenität im *Hprt*-Test nachweisbar. Als primären Wirkmechanismus hinter der Genotoxizität vermuteten sie die Induktion von oxidativem Stress, der indirekt zu DNA-Schäden führt. Eine weitere Studie vermutet die Auslösung des mitochondrialen Apoptosewegs durch Ni NP, der in der Freisetzung von verschiedenen Kapsasen und der Fragmentierung der DNA resultiert (Ahmad *et al.*, 2015).

5.3.6 Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse aus den Untersuchungen der Nickelverbindungen

Die Toxizität von Nickel, sowohl in seiner löslichen Form als auch als NM, wurde bereits umfangreich untersucht. Der Vergleich zeigte dabei immer wieder, dass Ni NM toxischer als die korrespondierenden MP und Nickelsalze sind, was nicht nur in Zellkulturversuchen sondern auch im Tierversuch bestätigt werden konnte (Magaye und Zhao, 2012; Magaye *et al.*, 2016; Karlsson *et al.*, 2022). Die Toxizität äußert sich neben der Zytotoxizität auch in der Generierung von ROS und in einer karzinogenen Wirkung, weshalb Nickelverbindungen von der IARC als kanzerogen für den Menschen eingestuft wurden (Karlsson *et al.*, 2022). Dabei scheint die toxische Wirkung stark von der Löslichkeit sowie der Bioverfügbarkeit der jeweiligen Verbindung abzuhängen. Es konnte gezeigt werden, dass lösliche Ni-Verbindungen und sehr leicht (extrazellulär) lösliche Ni NP in der Lunge von Versuchstieren keine bis eine sehr geringe Toxizität auslösten. Wenn dagegen ein Partikel schnell internalisiert werden kann und eine hohe intrazelluläre Löslichkeit aufweist, wird diesem Material eine hohe Kanzerogenität vorausgesagt (Magaye *et al.*, 2016; Karlsson *et al.*, 2022). Dieses Verhalten trifft auf die Ni NP zu, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden. Sie zeigten eine geringe Löslichkeit im Zellkulturmedium sowie in künstlicher Alveolarflüssigkeit, lösten sich aber zu einem hohen Anteil in lysosomaler Modellflüssigkeit, während sich die Ni NW auch im sauren Milieu nur geringfügig lösten (Tabelle 13). Für die geringe Löslichkeit im Zellkulturmedium könnte die Ausbildung einer Oxidschicht um das metallische Nickel ursächlich sein. Diese würde nach der Internalisierung zunächst abgebaut, bevor Nickelionen gelöst werden (Felix *et al.*, 2016). Die intrazelluläre Ionenfreisetzung konnte auch durch die Analyse der Bioverfügbarkeit bestätigt werden (Abbildung 13). Die intrazelluläre Verfügbarkeit von Nickelionen war dabei nach der Inkubation mit Ni NP ausgeprägter als mit Ni NW, was dem Trend der Löslichkeit in der lysosomalen Modellflüssigkeit entspricht. Zudem spielt die Form und Größe der NM eine wichtige Rolle, die sich auch auf die Aufnahme in die Zellen auswirkt. Es konnte gezeigt werden, dass kleinere Partikel besser aufgenommen werden und in der Folge toxischer wirken (Magaye und Zhao, 2012). Ni NW können trotz ihrer länglichen Form von Zellen aufgenommen werden (Byrne *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2014; Perez *et al.*, 2016), wobei die Zellen in der Lage sind, große NW-Aggregate zu brechen (Margineanu *et al.*, 2016). Die Aufnahme der *Wire* verläuft wohl hauptsächlich über die Phagozytose (Perez *et al.*, 2016), während Partikel über die Endozytose aufgenommen werden (Goodman *et al.*, 2011). Dies könnte die deutlich gesteigerte Gesamtaufnahme an Nickel nach der Inkubation mit Ni NW in einer dTHP-1-Monokultur im Vergleich zu beiden Epithelzelllinien erklären (Abbildung 31 im Anhang unter

8.2). Einer der Hauptmechanismen hinter der Toxikologie von Ni NM scheint auch die Induktion von oxidativem Stress zu sein, der in der Folge zur Schädigung der DNA führen kann und häufig in der Apoptose resultiert. Hierfür werden meist intrazellulär freigesetzte Ionen verantwortlich gemacht, wobei auch andere Mechanismen denkbar wären. Durch die Genexpressionsanalysen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, konnten ebenfalls Hinweise auf diesen Wirkmechanismus beobachtet werden. So wurden die Gene, die für Metallothioneine codieren, sehr viel stärker exprimiert als in der unbehandelten Kontrolle, was die Anwesenheit von Ionen und damit auch das Resultat der Bioverfügbarkeitsstudie bestätigt. Nickelionen, die sehr wahrscheinlich als Ni^{2+} vorliegen (Felix *et al.*, 2016), können oxidativen Stress auslösen, der in der Folge auch zu inflammatorischen Reaktionen führen kann (Peters *et al.*, 2007). Beide genannten Reaktionen können auch in den Ergebnissen der Genexpression gesehen werden, da sowohl Gene der oxidativen Stressantwort als auch der Inflammationsmarker verstärkt induziert wurden. Das Auslösen einer Entzündungsreaktion ist typischerweise kein Mechanismus von Nickel (Peters *et al.*, 2007) und war *in vitro* in Lungenzellen bisher weitestgehend unbekannt. Dagegen tritt dieser pathologische Verlauf im Tierversuch häufiger auf (Ogami *et al.*, 2009). In den humanen Zellkulturen haben die beiden Ni NM ein sehr ähnliches Genexpressionsprofil hervorgerufen, wobei in der Kokultur die Transkription der betroffenen Gene stärker induziert wurde. Dies könnte an der Anwesenheit der dTHP-1-Zellen liegen, die in der Ausschüttung von immunologischen Signalstoffen potenter sind, wodurch die inflammatorische Reaktion in den A549-Zellen zusätzlich aktiviert wird. Die Höhe der Induktion ist dabei ähnlich zur dTHP-1-Monokultur (Abbildung 36 und Abbildung 37 im Anhang unter 8.4.1.1). Im Vergleich zu den A549-Zellen weisen die RLE-6TN-Zellen deutlich gesteigerte Veränderungen auf transkriptioneller Ebene auf, die in der erhöhten intrazellulären Nickelkonzentration begründet sein könnten. Wie bereits erwähnt, ist die Induktion der Inflammation kein typischer Mechanismus von Nickel, weshalb die Induktion der entsprechenden Gene möglicherweise über die redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 erfolgt sein könnte (Peters *et al.*, 2007). Widersprüchlich hierzu wirkt jedoch die Induktion der anti-apoptotischen Gene *JUN* und *VEGFA*. Dies könnte allerdings damit erklärt werden, dass sie zum einen ebenfalls von NF- κ B induziert werden können und zum anderen als Signalmolekül während der Inflammation dienen.

Die Analyse der Genotoxizität betreffend, konnte in A549-Zellen ausschließlich in der Monokultur durch Ni NP eine signifikante Induktion von DNA-Strangbrüchen beobachtet werden, während in der Kokultur, auch nach der Inkubation mit Ni NW, nur ein leichter Anstieg zu sehen war. Die Effekte in der A549-Monokultur spiegeln die Beobachtungen aus der Bioverfügbarkeitsanalyse wider, die

eine deutlich gesteigerte Ionenfreisetzung der Ni NP zeigte. Dies steht zudem im Einklang mit den Resultaten von Åkerlund *et al.* (2018), wonach sich die Genotoxizität von Ni NP als DNA-Einzelstrangbrüche äußert. Da Ni-induzierte DNA-Schäden häufig über die Basenexzisionsreparatur repariert werden, ist hierbei von einer oxidativen Schädigungen auszugehen (Latvala *et al.*, 2017).

Der leichten Induktion von DNA-Strangbrüchen in der Kokultur durch beide Nanoformen könnte eine Art Schutzmechanismus der dTHP-1-Zellen zugrunde liegen, wonach diese die NM aufgrund ihrer erhöhten Phagozytose-Aktivität schneller aufnehmen. Hierfür würde sprechen, dass selbst bei niedrigen Dosen die dTHP-1-Zellen einen hohen intrazellulären Absolutgehalt (Abbildung 31 im Anhang unter 8.2) aufweisen. Anschließend könnte es durch die intrazelluläre Ionenfreisetzung zur Apoptose kommen, die die Fragmentierung der DNA zur Folge hätte, sodass ein großer Teil der beobachteten Strangbrüche auf die Makrophagen-DNA entfallen könnte (Nagata, 2000). Außerdem wäre der zelluläre Mechanismus der sekundären Genotoxizität denkbar (Vallabani und Karlsson, 2022). Die Induktion von MN in A549-Zellen durch die Ni NW könnte über einen aneugenischen Mechanismus verlaufen, der bereits für andere Nanofaser-Spezies nachgewiesen werden konnte, wonach die *Wire* physisch mit der DNA, den Mikrotubuli oder mit DNA-assoziierten Proteinen interagieren (Tavares *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2019). DNA-Strangbrüche in RLE-6TN-Zellen konnten ausschließlich nach der Inkubation mit Ni NP bei 50 µg/mL detektiert werden. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass es sich hierbei um keinen tatsächlichen genotoxischen Effekt handelt, sondern auf der hohen Zytotoxizität in dieser Konzentration beruht (Abbildung 12). Daher ist es plausibel, dass die Strangbrüche ein Merkmal der bereits eingetretenen Apoptose sind, da hierbei typischerweise eine Fragmentierung der DNA stattfindet.

Insgesamt zeigten sich die Ni NP, verglichen mit den Ni NW, toxischer, was besonders bei der Bestimmung der Zytotoxizität und der Genotoxizität deutlich wurde. Grund hierfür könnte die stärkere intrazelluläre Ionenfreisetzung durch die NP sein. Dieser Mechanismus wurde schon häufig für Nickelmaterialien beschrieben. In der Folge kann oxidativer Stress auftreten, der ebenfalls mittels Genexpressionsanalysen nachgewiesen werden konnte. Zudem ist die Induktion der Inflammation ein bekannter pathologischer Verlauf im Tierversuch, der in der vorliegenden Arbeit ebenfalls durch eine gesteigerte Transkription entsprechender Gene beobachtet wurde, wobei die Ni NW einen größeren Effekt hatten. Möglicherweise ist hierfür der Mechanismus der sog. „frustrierten Phagozytose“ verantwortlich. Darüber hinaus deuteten einige Veränderungen in der Genexpression auf die Einleitung der Apoptose hin. Laut Perez *et al.* wird zwar zunächst die Apoptose eingeleitet, jedoch wird aufgrund des oxidativen Stresses im weiteren Verlauf die Zellmembran so stark

destabilisiert, dass die Zelle schlussendlich an einer sekundären Nekrose zugrunde geht (Perez *et al.*, 2016). Die vermehrte Expression des Gens *DDIT3* könnte ein Hinweis auf die Schwellung des Endoplasmatischen Retikulums (ER) darstellen, die von Felix *et al.* (2016) beobachtet wurde. Da Nickelverbindungen von der IARC als kanzerogen eingestuft wurden, lag auch ein besonderer Fokus auf der Untersuchung DNA-schädigender Effekte. Die Ni NP führten dabei sowohl zu DNA-Strangbrüchen als auch zur Induktion von Mikrokernen, während ausschließlich Ni NW MN in A549-Zellen induzierten. Hier könnte eine Faser-Toxizität zugrunde liegen, die auch schon für andere Nanofasern beobachtet wurde.

5.4 Silberverbindungen

Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Silber-basierten NM handelte es sich um Silbernanowire (Ag NW, RAS AG/JRC, Agpure 10/NM-300K) und Silbernanopartikel (Ag NP, RAS AG, ECOS HC). Zudem wurde eine lösliche Silberverbindung, AgNO_3 , im Folgenden zumeist als Ag_{aq} bezeichnet, mitgeführt, um den Einfluss von Ioneneffekten beurteilen zu können.

5.4.1 Materialcharakterisierung

Die Ergebnisse der Charakterisierung der Silbernanomaterialien (Ag NM) ist in Tabelle 15 zusammengefasst.

Tabelle 15 Physikochemische Eigenschaften der Silbernanomaterialien.

d_p : Primärer Partikeldurchmesser. d_h : Hydrodynamischer Durchmesser. PDI: Polydispersitätsindex.

	Ag NP	Ag NW
d_p [nm]	15,5 ± 0,04	
d_h [nm]	72,4 ± 10,0	
PDI	0,31 ± 0,06	
ζ-Potential [mV]	-11,2 ± 2,1	-4,1 ± 0,1
Reinheit [%wt]	99,3 ± 0,08	99,1 ± 0,65
Länge [μm]		10,6 ± 0,28
Breite [nm]		110 ± 1,6

Mit $15,5 \pm 0,04$ nm primärem Partikeldurchmesser sind Silberpartikel die kleinsten Partikel, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden. Die gefundene Größe stimmt dabei mit dem JRC-Bericht überein (Comero *et al.*, 2011) und der hydrodynamische Durchmesser fiel zudem entsprechend gering aus. Im Gegensatz dazu sind die Ag NW mit einer Länge von $10,6 \pm 0,28$ μm die längsten NW im Rahmen der vorliegenden Arbeit. Das ζ -Potential spricht auch bei diesen NM-Spezies für eine

instabile Suspension der Ag NP sowie der Ag NW. Wie aber bereits erwähnt, könnte dies mit der Ausbildung einer Proteinkorona erklärt werden (Walkey und Chan, 2012). Beide Materialien weisen eine hohe Reinheit ($\geq 99,1$ %wt) auf.

Die Silbermaterialien zeigten keine Löslichkeit in den Zellkulturmedien und in biologisch relevanten Medien (Tabelle 16). Allein im dynamischen System, das auf einem kontinuierlichen Durchfluss beruht, lösten sich die Ag NW nach 168 h zu 11 % (Tabelle 31 im Anhang unter 8.2).

Tabelle 16 Löslichkeit der Silbermaterialien nach 24 h in den verwendeten Zellkulturmedien sowie in relevanten biologischen Flüssigkeiten.

RPMI-1640/Ham's F-12: Zellkulturmedien mit 10 % FKS. AAF: Artificielle alveoläre Flüssigkeit (pH 7,4). ALF: Artificielle lysosomale Flüssigkeit (pH 4,5).

	Löslichkeit [% gelöst]			
	RPMI-1640	Ham's F-12	AAF	ALF
Ag NP	0,8 ± 0,8	0,7 ± 0,8	1,0 ± 0,2	0,3 ± 0,1
Ag NW	0,7 ± 0,5	0,3 ± 0,01	0,4	0,2 ± 0,01

Die Löslichkeit und die Toxizität von Ag NM hängt grundsätzlich sehr stark von der Größe und der Art der Oberflächenbeschichtung ab. Am weitesten verbreitet sind NP mit einer atoxischen PVP (Polyvinylpyrrolidon)- oder Citrat-Stabilisierung (Wang *et al.*, 2014b), wobei vor allem PVP-beschichtete Partikel als schwerlöslich gelten. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Ag NP (JRC NM-300K) weisen keine PVP- oder Citrat-Beschichtung auf und werden in der Literatur als leichtlöslich beschrieben (Bobyk *et al.*, 2021). Dennoch konnte sowohl im Rahmen dieser Arbeit als auch in weiteren Studien keine oder nur eine geringe Löslichkeit in unterschiedlichen Medien und bei verschiedenen pH-Werten gemessen werden (Cho *et al.*, 2012b; Jiang *et al.*, 2015).

5.4.2 Zytotoxizität

Die ATP-Gehalte in den verwendeten Zellsystemen nach der Inkubation mit Ag NM ist in Abbildung 17 zu sehen.

Die A549-Zellen reagierten moderat auf die Inkubation, wobei die Ag NP zytotoxischer wirkten und die Viabilität auf 60 % sank. Wie auch nach der Inkubation mit Cu NM und Ni NM zeigten sich die RLE-6TN-Zellen sensibler als die A549-Zellen und der ATP-Gehalt nahm durch die Maximaldosis um 98 % (im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle) ab.

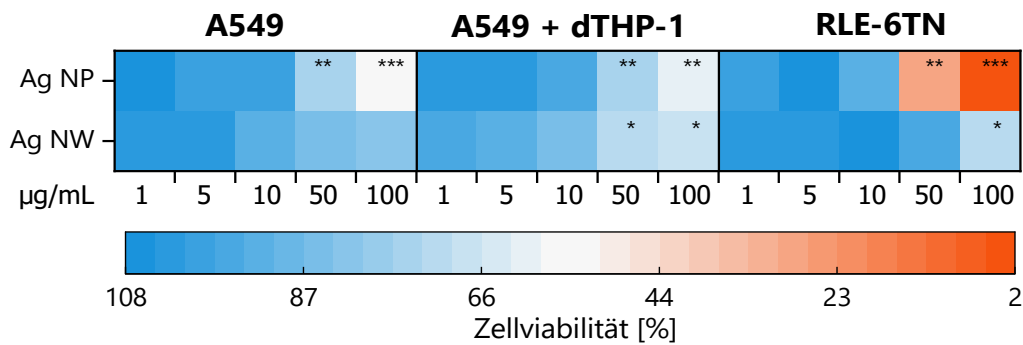


Abbildung 17 Zellviabilität von A549-, A549 + dTHP-1- sowie RLE-6TN-Zellen nach Inkubation mit Silberbasierten Nanopartikeln (NP) und Nanowire (NW).

Die Zellen wurden für 24 h mit den Testsubstanzen inkubiert und im Anschluss der ATP-Gehalt bestimmt. Als *Heatmap* dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen. Die Einfärbungen entsprechen den ATP-Gehalten in Prozent der Kontrolle. Statistisch signifikante Abweichungen gegenüber der unbehandelten Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett-T-Test (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Auch Bobyk *et al.* (2020) untersuchten die Zytotoxizität desselben partikulären Materials (NM-300K) in A549-Zellen. Sie stellten eine ähnlich leichte Zytotoxizität in den niedrigen Inkubationsdosen fest. Bei 50 µg/mL lag die metabolische Aktivität bei ca. 80 %, bei 100 µg/mL dagegen bei etwa 15 %. Die abweichenden Ergebnisse könnten an der Wahl des Assays liegen. In der genannten Studie wurde der WST-1-Assay durchgeführt. Verschiedene Studien, wie u.a. Chen *et al.* (2013), untersuchten zudem die Zytotoxizität von Ag NW, wobei keine Abnahme der Zellviabilität nach 24 h bei einer Konzentration von 25 µg/mL festgestellt werden konnte. Wang *et al.* (2019) ermittelten die Viabilität von A549-Zellen nach der Inkubation mit Ag NW unterschiedlicher Länge nach 24 h. Sie konnten einen dosisabhängigen Effekt feststellen, wobei die kürzeren NW in jeder eingesetzten Dosis am toxischsten wirkten. Insgesamt konnte aber nur eine leichte Zytotoxizität von 20 % bei 50 µg/mL festgestellt werden, was den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit entspricht.

Für die weiteren Experimente wurden, basierend auf diesen Ergebnissen, die folgenden Konzentrationen ausgewählt:

Tabelle 17 Dosisauswahl für die weiterführenden Experimente aufgrund der Daten des ATP-Assays.

Angaben in µg/mL. *Angepasste Dosis für RLE-6TN-Zellen.

	Niedrig	Mittel	Hoch
Ag NP	10	50	100/75*
Ag NW	5	50	100

5.4.3 Bioverfügbarkeit und intrazelluläre Verteilung

Die beiden Silbermaterialien zeigten nur eine geringe Bioverfügbarkeit in den verwendeten Zelllinien (Abbildung 18). In Abhängigkeit der Inkubationskonzentration konnte die stärkste intrazelluläre Ionenfreisetzung in dTHP-1-Zellen gemessen werden. In beiden Epithelzelllinien fiel die intrazelluläre Ionenkonzentration unter Einbeziehung der Standardabweichung in etwa ähnlich aus. Die intrazelluläre Verteilung betreffend konnte ein deutlicher Trend hin zur Akkumulation im Zellkern beobachtet werden.

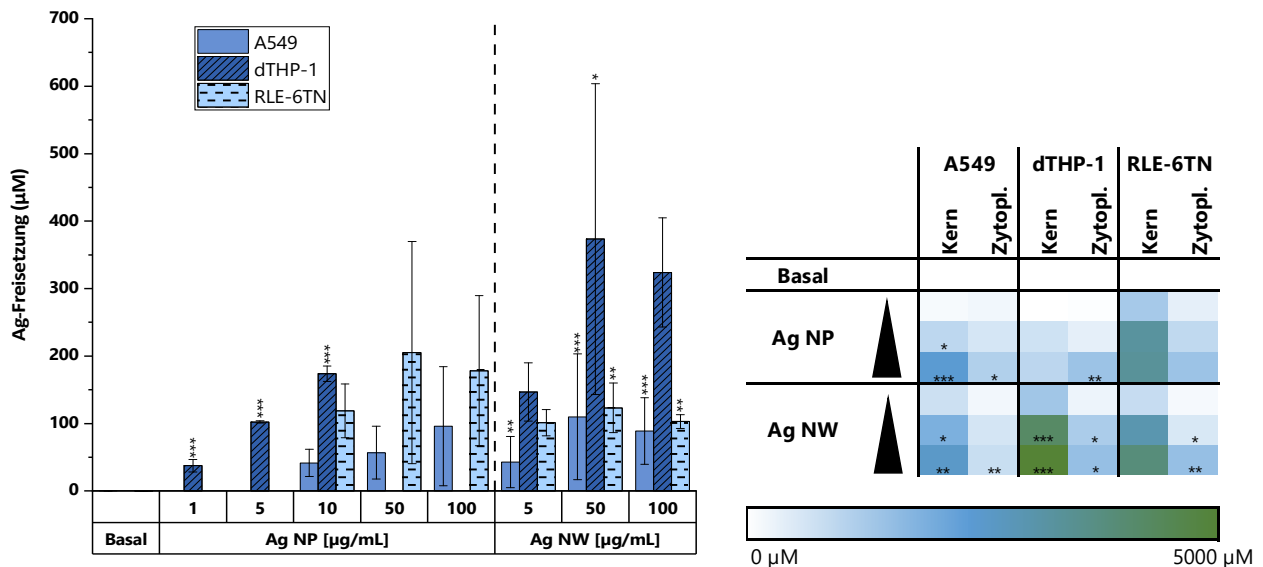


Abbildung 18 Bioverfügbarkeit (links) und intrazelluläre Verteilung (rechts) der Silbernanomaterialien in den Zelllinien A549, dTHP-1 und RLE-6TN.

Die Zellen wurden für 24 h mit den Nanomaterialien inkubiert. Die Daten sind als Ionenkonzentrationen dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen \pm SD. Statistisch signifikante Abweichungen gegenüber der unbehandelten Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett-T-Test (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Jiang *et al.* (2015) führten eine zeitabhängige Studie zur Aufnahme von Ag NP ($d_p = 16$ nm) in CHO-K1-Zellen durch, die eine kontinuierliche Zunahme an intrazellulärem Silber zeigte. Nach 24 h Inkubation mit 10 $\mu\text{g/mL}$ konnte eine Aufnahme von 152 ng Ag/ 10^5 Zellen gemessen werden. Da in der Studie partikuläres und gelöstes Silber addiert wurden, ist ein direkter Vergleich der Daten mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht möglich. Die Studie konnte zudem zeigen, dass internalisierte Ag NM sehr schnell gelöst werden (55 % nach 1 h, 80 % nach 24 h) (Jiang *et al.*, 2015). Dies bedeutet, dass den Ionen ein relativ langer Zeitraum für Reaktionen mit Zellbestandteilen zur Verfügung steht, bis der Versuch nach 24 h beendet wird. Durch deren große Affinität zu Thiol-Gruppen kann eine entsprechende toxikologische Wirkung erwartet werden. In einer *in vivo*-Studie mit Ag NW an Ratten konnte die Aufnahme in Makrophagen sowie in Alveolarepithelzellen beobachtet werden, wobei sekundäre Partikel bestehend aus Ag_2S auf der Zelloberfläche

zurückblieben. Innerhalb der Zellen wiesen die NW eine kürzere Länge auf, was auf ein Herunterbrechen der NW durch die Zellen schließen lässt (Chung *et al.*, 2017). Die Internalisierung von Ag NW durch Makrophagen sowie durch Epithelzellen konnte im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls gezeigt werden.

5.4.4 Genexpressionsanalysen

Die Veränderungen der Genexpression nach 24 h Inkubation mit den eingesetzten Silbermaterialien ist in Teilen in Abbildung 19 dargestellt. Die gesamte *Heatmap* ist im Anhang unter 8.4.1.1. (Abbildung 35 und Abbildung 36) abgebildet.

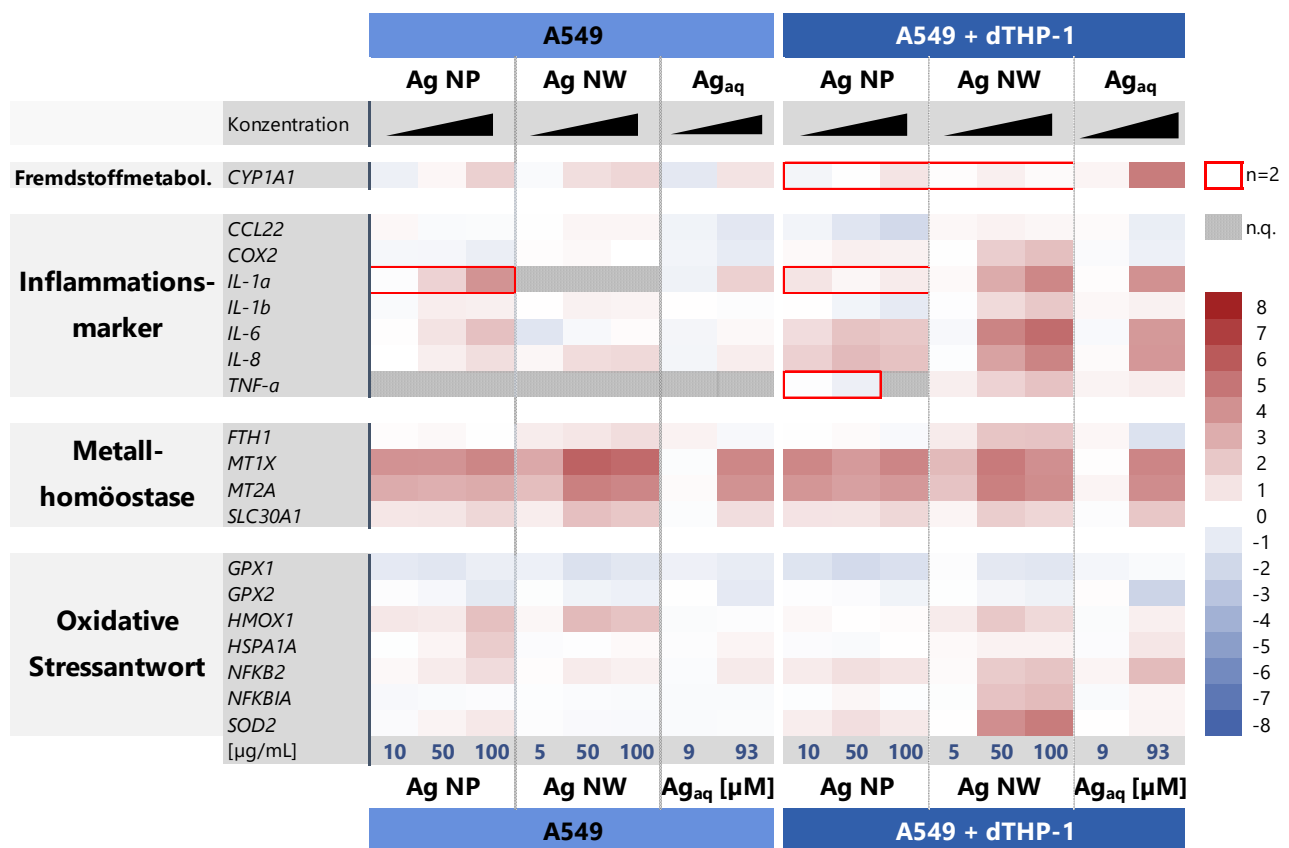


Abbildung 19 Beeinflussung der Genexpression durch Silber-basierte Nanomaterialien in A549-Monokultur sowie -Kokultur mit dTHP-1-Zellen. Gezeigt sind Gene des Fremdstoffmetabolismus, der Metallhomöostase, der oxidativen Stressantwort sowie inflammatorische Marker.

Eine rote Färbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine verminderte Genexpression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen, sofern nicht anders angegeben.

Durch die Inkubation der beiden A549-basierten Zellsysteme wurden sowohl in Mono- als auch in Kokultur hauptsächlich Gene der Metallhomöostase induziert, wobei in der Kokultur auch inflammationsbezogene Gene induziert wurden. Insgesamt zeigten sich jedoch nur wenige transkriptionelle Veränderungen. Ein interessanter Befund ist die Induktion der MT-codierenden Gene *MT1X* und *MT2A*, die eine intrazelluläre Freisetzung von Ionen anzeigen.

Die Makrophagen-ähnlichen Zellen zeigten ihren Einfluss in Bezug auf die Expression der Inflammationsmarker, indem in der A549-Kokultur eine deutlich gesteigerte Induktion nahezu aller Gene dieser Gruppe beobachtet werden konnte. Dies wurde vor allem nach der Inkubation mit Ag NW deutlich, wobei besonders die Gene *IL-1a*, *IL-8* (20,7-22,4 (\log_2 4,4-4,5)) sowie *IL-6* (40,5 (\log_2 5,3)) betroffen waren. Im Gegensatz hierzu unterschied sich die relative Änderung der Genexpression in Verbindung mit Ag NP in der Mono- und Kokultur kaum. Auch AshaRani *et al.* (2012) beobachteten die Induktion verschiedener inflammatorischer Marker nach der Inkubation mit Ag NP in humanen Fibroblasten. Vor allem *IL-6* gilt als Biomarker einer beginnenden inflammatorischen Reaktion, da es sehr schnell induziert werden kann und deshalb in der zeitlichen Abfolge einer Inflammation sehr früh auftritt. Im weiteren Verlauf wird es durch seine pro-inflammatorische Eigenschaft diese Entzündungsreaktion noch weiter verstärken.

Auch die Gene *HMOX1* und *SOD2* der oxidativen Stressantwort wurden verstärkt exprimiert, wobei in der Monokultur beide NM-Spezies zu einer relevanten Erhöhung der Genexpression führten und in der Kokultur vor allem die Wire die Transkription induzierten. Besonders auffällig sind die Unterschiede zwischen Mono- und Kokultur in der Expression des Gens *SOD2*, die in Abbildung 20 im Detail dargestellt sind. *SOD2* codiert für das Enzym Superoxiddismutase 2.

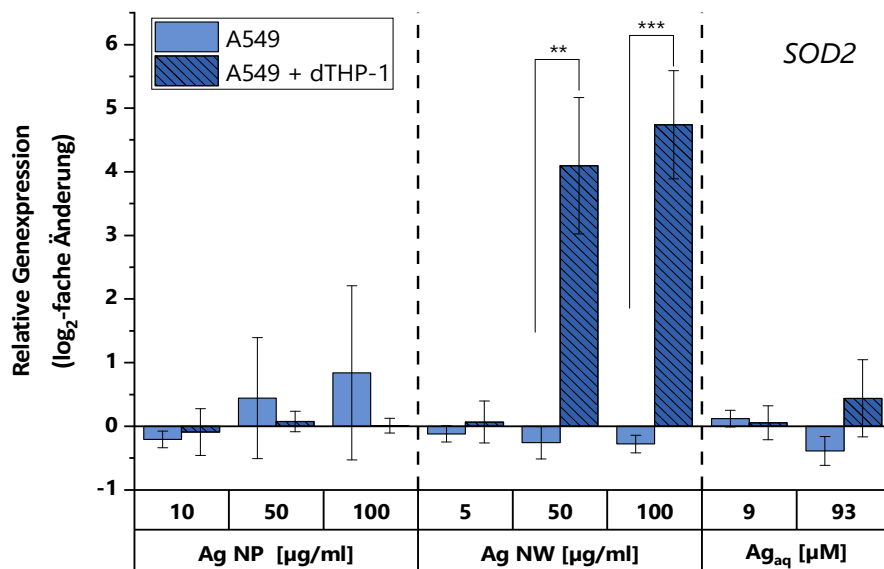


Abbildung 20 Veränderung der Genexpression den Gens *SOD2* nach der Inkubation mit Silbernanopartikeln (Ag NP) und Silbernanowire (Ag NW) für 24 h in A549-Zellen sowie in der entsprechenden Kokultur mit dTHP-1-Zellen.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen \pm SD. Statistisch signifikante Abweichungen zwischen Mono- und Kokultur nach ANOVA mit anschließendem Dunnett-T-Test (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Die Unterschiede zwischen Mono- und Kokultur könnten in der gesteigerten Endozytoseaktivität der dTHP-1-Zellen begründet sein, die in einer schnelleren Aufnahme der NM resultieren würde. Nach der Inkubation mit NP könnten sie auf diese Weise eine schützende Funktion gegenüber den A549-Zellen haben. Die Inkubation mit Ag NW dagegen löst durch die Länge der Fasern wahrscheinlich die „frustrierte Phagozytose“ in den dTHP-1-Zellen aus (Wang *et al.*, 2019), wodurch in der Folge eine Stressreaktion verursacht wird. Dabei schütten die Makrophagen vermehrt ROS aus und der Zellinhalt kann austreten (Ye *et al.*, 1999; Schinwald und Donaldson, 2012). Dies wiederum kann zu einer verstärkten oxidativen Stressantwort in den A549-Zellen führen und weitere inflammatorische Reaktionen hervorrufen.

Im Bereich der DNA-Schadensantwort wurden zwei Gene in einem relevanten Ausmaß induziert (Abbildung 36 unter 8.4). Dies betraf zum einen *GADD45A* in der Monokultur und *DDIT3* in beiden humanen Kultivierungssystemen. Die Induktion dieser Gene spricht für einen genotoxischen Stress in den Zellen, der durch Inflammation und oxidativen Stress ausgelöst werden kann (AshaRani *et al.*, 2012).

Die Veränderung der Genexpression nach der Inkubation mit Ag NM in Rattenepithelzellen ist in Abbildung 21 dargestellt.

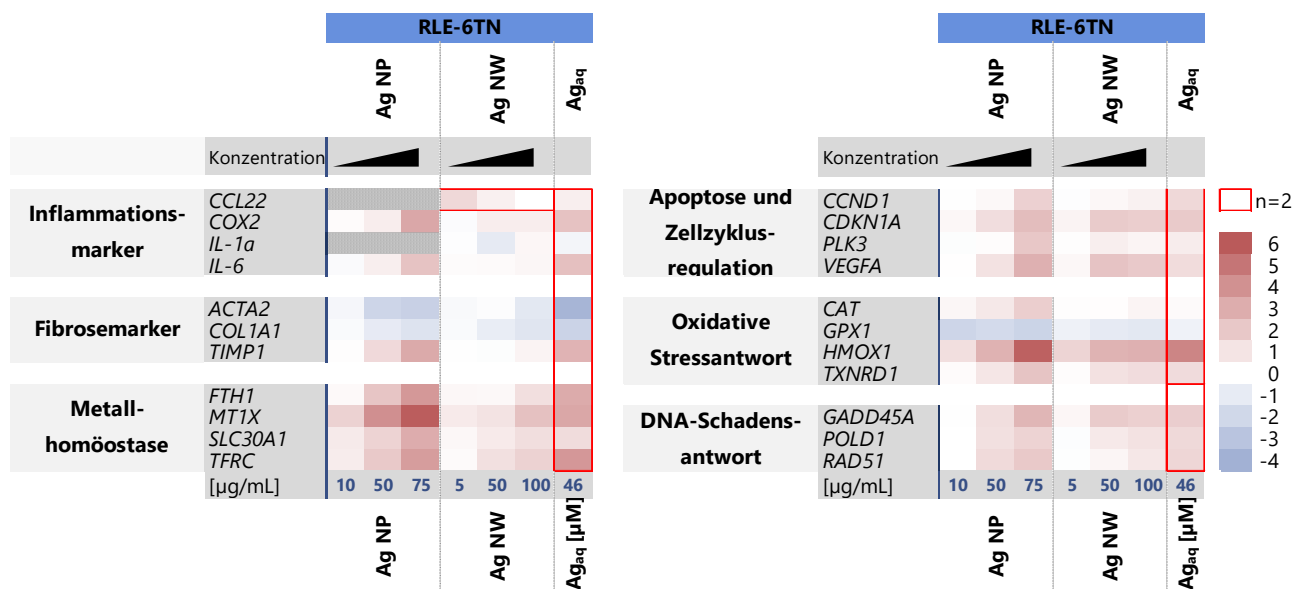


Abbildung 21 Beeinflussung der Genexpression durch Silber-basierte Nanomaterialien in RLE-6TN-Zellen. Gezeigt sind Gene der Metallhomöostase, der DNA-Schadensantwort, der Apoptose sowie der Zellzyklusregulation, der oxidativen Stressantwort und inflammatorische und fibrotische Marker.

Eine rote Färbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine verminderte Genexpression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen, sofern nicht anders angegeben.

Durch die Silbermaterialien wurde die Transkription vergleichsweise weniger Gene des verwendeten Gen-Sets modifiziert, wobei Ag NP stärkere Auswirkungen zeigten als Ag NW. Gene, die besonders stark exprimiert wurden, sind *COX2/PTGS2*, *IL-6* (Inflammation), *MT1X*, *TFRC*, *FTH1*, *SLC30A1* (Metallhomöostase), *CAT*, *HMOX1* und *TXNRD1* (Oxidative Stressantwort). Reprimiert wurden die Gene *ACTA2*, *COL1A1* und *GPX1*. Die Induktion der Gene der Metallhomöostase bestätigen auch in der Rattenzelllinie die intrazelluläre Freisetzung von Silberionen, die zu oxidativem Stress führt (Juling *et al.*, 2018). Dieser kann in der Induktion der oxidativen Stressantwort gesehen werden. Wahrscheinlich wurde zudem auch der redox-sensitive Transkriptionsfaktors NF- κ B aktiviert, was sich in der gesteigerten Expression von *COX2/PTGS2* und *IL-6* äußert. Da GPX1 in seiner Funktion als anti-oxidatives Enzym dazu beiträgt ROS zu verringern, entspricht dessen verminderte Expression nicht den Erwartungen. Die Abwesenheit dieses Enzyms kann das oxidative Ungleichgewicht in den Zellen sogar noch verschlimmern. Die Herabregulation von GPX1 auf Proteinebene konnte auch von Khan *et al. in vitro* nach der Inkubation mit Ag NP beobachtet werden. Sie vermuteten, dass die Ag NP-Toxizität im Anfangsstadium zu einem Rückgang der oxidativen Stressantwort führen kann (Khan *et al.*, 2019). Auch könnte die Affinität von Silber zu SH-Gruppen zu einer Komplexierung von GSH führen, die in der Folge die Regulation von GSH-assoziierten Enzymen stört (Juling *et al.*, 2018).

5.4.5 Untersuchungen zur Genotoxizität

Die Untersuchungen zur Genotoxizität umfassen auch Ergebnisse der Abschlussarbeit von Marius Dargel. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 dargestellt.

Insgesamt verursachte die Inkubation mit Silbermaterialien deutliche genotoxische Effekte in den verwendeten Zellkulturmodellen. Unter den humanen Zellsystemen konnte allein in der A549-Monokultur eine dosisabhängige Induktion an DNA-Strangbrüchen durch Ag NP beobachtet werden, während der Mikrokerntest eine deutliche genotoxische Wirkung beider Silbermaterialien aufzeigte. Hierbei führten die jeweils höchsten eingesetzten Konzentrationen zu einer stärker ausgeprägten Induktion von MN als die verwendete Positivkontrolle. Auffällig ist hierbei zudem, dass die lösliche Silberverbindung zu keiner relevanten MN-Induktion führte, womit ein Ioneneffekt ausgeschlossen werden kann. In den Rattenepithelzellen riefen die Ag NM ebenfalls eine deutliche dosisabhängige Induktion von DNA-Strangbrüchen hervor.

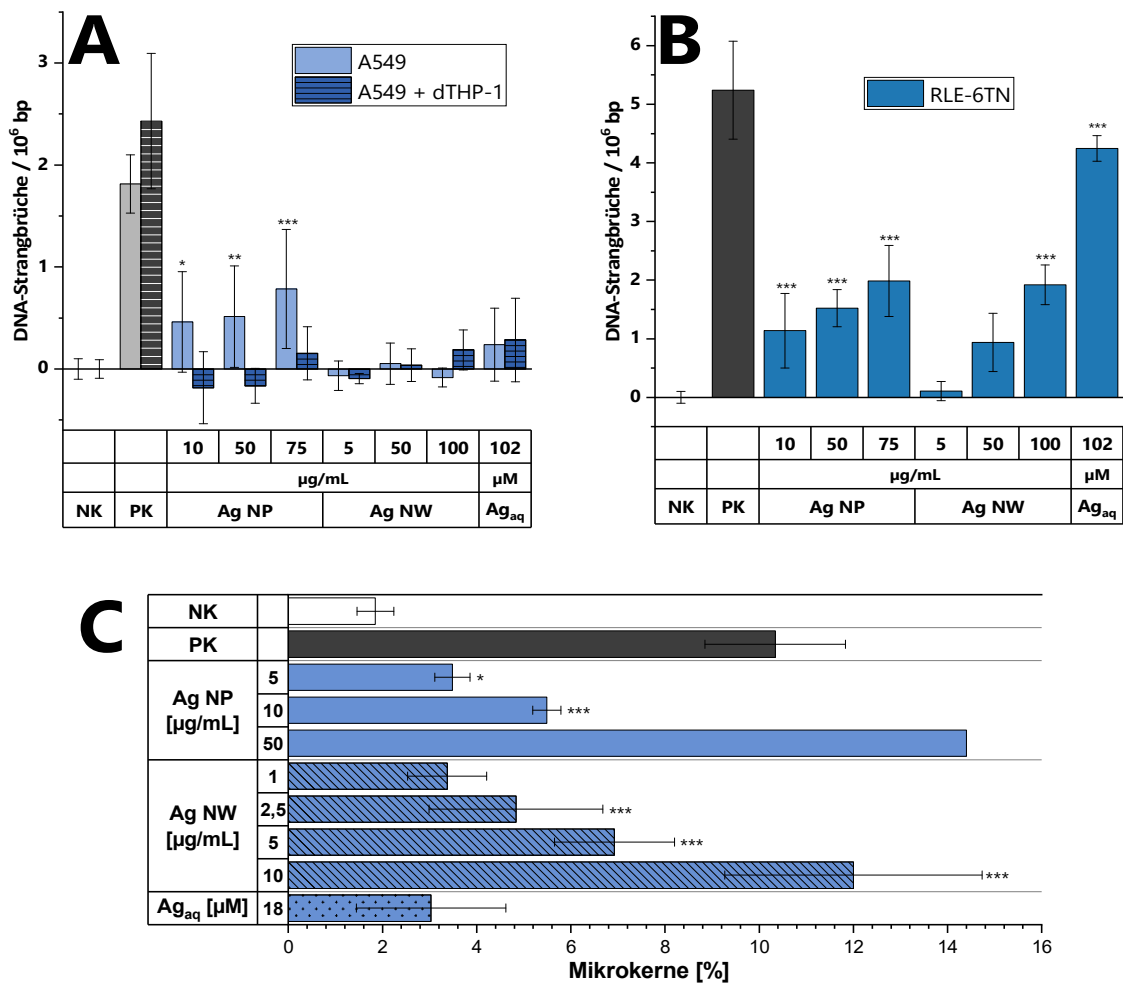


Abbildung 22 Gegenüberstellung der Induktion von DNA-Strangbrüchen sowie der Induktion von Mikrokerneln nach der Inkubation mit Silbermaterialien.

A: Induktion von DNA-Strangbrüchen in A549-Zellen in Mono- als auch in Kokultur mit dTHP-1-Zellen. B: Induktion von DNA-Strangbrüchen in RLE 6TN-Zellen. C: Induktion von Mikrokerneln in A549-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit den Testsubstanzen inkubiert. Für den Mikrokerntest wurde für weitere 24 h nachinkubiert. Als Positivkontrollen dienten für die AU (A+B) 100 µM Menadion und für den Mikrokerntest (C) 0,3 µM Mitomycin C. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen ± SD. Statistisch signifikante Abweichungen gegenüber der unbehandelten Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett-T-Test (*p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001).

Eine genotoxische Wirkung von Ag NP konnte bereits von mehreren Studien gezeigt werden. So konnte ein signifikanter Anstieg an DNA-Strangbrüchen in A549-Zellen nach der Inkubation mit NM-300K über den Comet-Assay nachgewiesen werden, was den im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen entspricht. Dagegen wurde keine Induktion von MN beobachtet. Die Autoren vermuteten, dass ausschließlich Einzelstrangbrüche entstehen und keine Doppelstrangbrüche, die zu MN führen würden (Bobyk *et al.*, 2021). Dies stellt einen Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit dar, da hier eine statistisch signifikante MN-Induktion in A549-Zellen beobachtet werden konnte. Dies wird ebenfalls durch die Studie von Cervena *et al.* (2021) unterstützt, die MN nach der Inkubation mit NM-300K in BEAS-2B-Zellen detektieren konnten. Mithilfe des

Comet-Assays konnte in einer weiteren Studie in humanen Fibroblasten sowie in einer Hirntumorzelllinie das Auftreten von Strangbrüchen sowie die signifikante Induktion von MN gezeigt werden (AshaRani *et al.*, 2009), was im Einklang mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit steht. Die Autoren der genannten Studien vermuten als Ursache der genotoxischen Wirkung die Induktion von oxidativem Stress in der Folge einer intrazellulären Ionenfreisetzung. Im Gegensatz dazu könnte die Induktion von DNA-Strangbrüchen in RLE-6TN-Zellen aus einer zu starken Zytotoxizität resultieren. Dies würde insbesondere die Inkubation mit Ag NP in der hohen Konzentration betreffen.

Studien zur Genotoxizität von Ag NW sind zum jetzigen Zeitpunkt rar. Eine Studie untersuchte die genotoxische Wirkung mithilfe des Ames-Mutagenitätstests in Bakterien sowie *in vivo* durch den Chromosomenaberrationstest in Mäusen. Beide Untersuchungen zeigten keine Genotoxizität der verwendeten *Wire*. Die Autoren vermuteten, dass die PVP-Beschichtung der Fasern der Grund hierfür sein könnte. Die mittlere Länge der NW betrug 8,5 μm und ist damit kürzer als die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Fasern (Charehsaz *et al.*, 2017). Im Gegensatz dazu stellten Wang *et al.* (2019) durchaus eine Veränderung der DNA durch sehr lange Ag NW (30, 50 und 100 μm Länge) fest. In A549-Zellen konnten innerhalb der genannten Studie Fehler bei der Zytokinese, die Störung der Mitose sowie die Entstehung von mehrkernigen Zellen gezeigt werden. Dabei verursachten die NW mit 30 μm Länge die stärksten Auswirkungen. Die Autoren machten dabei weder die Freisetzung von Silberionen noch die Induktion von ROS verantwortlich, sondern gehen von der physischen Störung der Zytokinese durch die *Wire* aus. Es wird vermutet, dass sich die Ag NW während der Telophase an der Brücke zwischen den beiden neuen Zellkernen anlagern und so die Aufteilung auf die Tochterzellen verhindern. Möglicherweise steht dieses Verhalten im Zusammenhang mit der Affinität zu Schlüsselenzymen dieses Prozesses. Dies führt zur Aneuploidie der Zellen, was ein Kennzeichen für Krebs darstellt (Wang *et al.*, 2019). Die deutlichen Unterschiede zwischen den Ergebnissen der alkalischen Entwindung und des MN-Tests im Rahmen dieser Arbeit legen nahe, dass Ag NW und Ag NP einen unterschiedlichen Wirkmechanismus in Bezug auf deren Genotoxizität aufweisen. Durch die alkalische Entwindung können ausschließlich DNA-Strangbrüche nachgewiesen werden, die zu den klastogenen DNA-Schäden zählen, im MN-Test dagegen können sowohl aneugene als auch klastogene Schäden detektiert werden, sofern diese zur Entstehung eines MN geführt haben. Daher könnte hinter der Genotoxizität der Ag NW ein aneugener Wirkmechanismus stehen, während Ag NP klastogen wirken könnten. Aufgrund dessen könnte ein Wirkmechanismus, wie bereits von Wang *et al.* (2019) beschrieben und hier erläutert, auch den Experimenten der vorliegenden Arbeit zugrunde

liegen, da die Ag NW keine Effekte in der AU, dafür aber eine statistisch signifikante Induktion von MN verursachten.

5.4.6 Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse aus den Untersuchungen der Silberverbindungen

Aufgrund des stark gestiegenen Einsatzes von nanoskaligem Silber, sowohl in medizinischen Produkten wie Gesichtsmasken, als auch in elektronischen Geräten des täglichen Bedarfs, ist die Beurteilung der Toxizität und die Risikoabschätzung von großer Bedeutung und daher auch Gegenstand der aktuellen Forschung. Dass Ag NM toxisch wirken können, konnte durch viele bereits veröffentlichte Studien gezeigt werden, wobei Ag NP deutlich häufiger untersucht wurden als Ag NW. Die Ergebnisse zeigen, dass Silber vor allem über die intrazelluläre Freisetzung von Ionen toxisch wirkt (Karlsson *et al.*, 2022). Im Gegensatz hierzu belegen einige Studien, dass die beobachtete Toxizität auch ohne jeglichen Nachweis von Silberionen auftreten kann (Stoehr *et al.*, 2011; Lehmann *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019). Der weitere pathogene Verlauf wird in einem Großteil der Studien als Induktion von ROS und oxidativem Stress beschrieben, der zusammen mit inflammatorischen Prozessen auftritt und in der Schädigung der DNA resultiert. In der Folge kommt es zu einem Zellzyklusarrest, der teilweise auch in die Apoptose übergeht. Dies konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden (Karlsson *et al.*, 2022). Die Toxizität der Ag NM hängt vor allem von deren Größe und Oberflächenbeschichtung ab. Kleinere Partikel (20 nm) verursachen eine stärkere Zytotoxizität und Lungen-Infektion sowie eine veränderte Lungenfunktion im Tierversuch (Sung *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2014b). Dagegen ist die Infektion nach der Inkubation mit langen Fasern (> 10 µm) persistenter (Chung *et al.*, 2017; Toybou *et al.*, 2019). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Silbermaterialien waren zum einen das JRC-Referenzmaterial NM-300K (Ag NP) mit einem mittleren Durchmesser von 15,5 nm und zum anderen Ag NW mit einer mittleren Länge von 10,6 µm. Die Materialien hatten keine Beschichtung und wiesen auch keine Oxidschicht auf (Comero *et al.*, 2011). Beschichtungen mit Citrat oder PVP werden häufig eingesetzt, um die Stabilität und Haltbarkeit der Materialien zu verbessern. Eine Beschichtung, beispielsweise mit PVP, kann die Toxizität der Ag NM herabsetzen, da PVP freigesetzte Ionen komplexieren kann (Wang *et al.*, 2014b). Obwohl Ag NM grundsätzlich als leicht lösliche Materialien gelten (Bobyk *et al.*, 2021), konnte im Rahmen dieser Arbeit keine Löslichkeit im Zellkulturmedium und in physiologisch relevanten Flüssigkeiten festgestellt werden (Tabelle 16). Im Gegensatz dazu wurden bei der Untersuchung der intrazellulären Ionenfreisetzung und -verteilung freie Ionen detektiert. Diese gegensätzlichen Ergebnisse könnten auf die Bildung von unlöslichen Sekundärstrukturen des Silbers

aufgrund seiner Affinität zu S- und Cl-Gruppen zurückzuführen sein (Jiang *et al.*, 2015). Diese wurden während der Versuchsdurchführung der Löslichkeitsstudien (4.1.2.4) wahrscheinlich mit abzentrifugiert und konnten in der Folge im Experiment nicht oder möglicherweise nur unvollständig erfasst werden. In der Zelle wiederum könnte ein Teil des Silbers gebunden an Zellbestandteile und ein anderer Teil frei als Ionen vorliegen. Als Hauptaufnahmewege wurden die Caveolae-vermittelte Endozytose sowie die energieabhängige Diffusion identifiziert. Daneben scheint ebenfalls die energieunabhängige Diffusion eine Rolle zu spielen, da auch bei 4 °C noch NP aufgenommen wurden. Zudem ist die Größe und die Oberflächenchemie bei der Aufnahme von Bedeutung, was wahrscheinlich in direkter Korrelation mit der Toxizität steht (Jiang *et al.*, 2015). Für *Nanorods* (Nanostäbe) wurden die Clathrin- und Caveolae-vermittelte Endozytose als Aufnahmeweg in A549-Zellen ermittelt. Allerdings handelte es sich in dieser Studie um goldbasierte NM, die sich möglicherweise unterschiedlich zu Ag NW verhalten könnten (Wang *et al.*, 2011). Die Aufnahme von Ag NM könnte durch das Ausbilden einer Proteinkorona erleichtert werden, die die NM „maskiert“ (AshaRani *et al.*, 2012). Nach der Aufnahme in die Endosomen werden diese zu den Lysosomen transportiert, die einen niedrigeren pH aufweisen. Dort findet die Oxidation von Ag^0 in Ag^+ statt, die durch die Bindung an organische Moleküle in Ag-O- übergehen. Die Akkumulation von Ionen führt zur Schädigung der lysosomalen Membran und in der Folge zur Freisetzung des Inhalts in das Zytoplasma. Dadurch können nicht nur Ionen sondern auch nicht gelöste NM in das Zytoplasma gelangen (AshaRani *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2015). Dies wiederum kann das Membranpotential der Mitochondrien stören und so zur Generierung von ROS führen. Zudem bindet Silber im Zytoplasma an Cystein-haltige Proteine und Moleküle, die dadurch ebenfalls in ihrer Funktion beeinträchtigt werden können (Wang *et al.*, 2015). Welche Thiol-haltige Struktur dabei am stärksten betroffen ist, hängt von deren Häufigkeit in der jeweiligen Zelllinie ab; in A549-Zellen wären dies beispielsweise die Metallothioneine während in HepG2-Zellen (Leberzelllinie) GSH am häufigsten zu finden ist (Bobyk *et al.*, 2021). Die Analyse der intrazellulären Verteilung ergab, dass sich der größere Anteil des gelösten Silbers im Zellkern aller betrachteten Zelllinien befindet. Als freies Ag^+ können die Ionen durch die Kernporen diffundieren oder werden gebunden an Proteine in den Zellkern eingeschleust. Verschiedene Studien konnten aber auch die NP selbst im Kern nachweisen. Sie könnten über einen Ko-Transport zusammen mit zytosolischen Proteinen, die im Zellkern gebraucht werden, aufgenommen werden (AshaRani *et al.*, 2012). Andererseits besitzen die Kernporen einen Durchmesser von 9-10 nm, durch die die NP diffundieren könnten (AshaRani *et al.*, 2009). Sowohl der Ko-Transport als auch die Diffusion sind dabei sehr von der Größe der NM abhängig. Bei der Untersuchung der Zytotoxizität zeigten die Partikel ein höheres Potential gegenüber den *Wire*, wobei

die Rattenzelllinie empfindlicher reagierte als die humanen Zellkulturen (Abbildung 17). Dies kann in Teilen mit der Bioverfügbarkeit begründet werden, da in RLE-6TN-Zellen mehr Silberionen durch Ag NP als durch NW freigesetzt wurden (Abbildung 18). Wie bereits erwähnt, führt eine höhere Ionenkonzentration in den Zellen sehr wahrscheinlich zu einer stärker ausgeprägten Toxizität, da sie zumeist mit der Entwicklung von oxidativem Stress einhergeht (Wang *et al.*, 2014b). Die Induktion von oxidativem Stress konnte auch im Rahmen dieser Arbeit in den Genexpressionsanalysen beobachtet werden (Abbildung 19 und Abbildung 20). Daneben wurden auch Gene der Metallhomöostase aktiviert, die für freie Ionen sprechen, sowie Gene der inflammatorischen Marker. Diese Erkenntnisse decken sich also mit dem in der Literatur beschriebenen Wirkmechanismus von Silber. Die Unterschiede zwischen der humanen Mono- und Kokultur könnten mit der unterschiedlichen Bioverfügbarkeit der Ag NW in dTHP-1- und A549-Zellen zusammenhängen (Abbildung 18), da die dTHP-1-Zellen eine um ein Vielfaches höhere intrazelluläre Ionenfreisetzung und daher wahrscheinlich auch eine höhere Aufnahme aufweisen. Zum anderen kann die „frustrierte Phagozytose“ der Makrophagen eine Rolle spielen, die ebenfalls die Induktion von oxidativem Stress zur Folge hat (Li *et al.*, 2017). In einer Publikation konnte beobachtet werden, dass Fasern bereits ab einer Länge von 10 µm nicht mehr vollständig durch THP-1-Zellen umschlossen werden können (Schinwald und Donaldson, 2012). Dies entspricht einer Länge, die von einem Großteil der hier eingesetzten Fasern überschritten wird. In der Folge kann die Membran nicht geschlossen werden und Zellinhalt tritt aus. Die Zelle und als Reaktion darauf auch die umliegenden Zellen, schüttet dabei Inflammationsmarker aus (Schinwald und Donaldson, 2012). In den RLE-6TN-Zellen veränderten die Ag NP die Transkription stärker als die Ag NW. Dies könnte an der höheren intrazellulären Ionenfreisetzung nach der Inkubation mit Ag NP liegen. Vermutlich spielt bei der Toxikologie von Silber auch die Aktivierung verschiedener redox-sensitiver Moleküle und Transkriptionsfaktoren wie NF-κB oder AP-1 eine Rolle. Zusätzlich kann das zelluläre Redox-System der Zellen gestört werden (Juling *et al.*, 2018). Durch die Affinität zu Thiol-Gruppen kann Silber möglicherweise auch Zink aus Zinkfinger-Proteinen verdrängen. Ein prominentes Beispiel hierfür wären die Metallothioneine. In der Folge wird das Zink in die Zelle freigesetzt. Die Induktion der MT-Gene könnte daher entweder auf die freien Silberionen oder freies Zn²⁺ zurückzuführen sein (Bobyk *et al.*, 2021). Auf Proteinebene konnten ebenfalls einige Interleukine und Zytokine nach einer Ag NP-Inkubation nachgewiesen werden (AshaRani *et al.*, 2012). Trotz der in der Literatur beschriebenen Hemmung der DNA-Reparatursysteme (Bobyk *et al.*, 2021) konnte im Rahmen dieser Arbeit nahezu keine Veränderung der Transkription der entsprechenden Gen-Cluster festgestellt werden. Lediglich das Gen *DDIT3* wurde in relevantem Ausmaß in der A549-Monokultur induziert, was verschiedene Auslöser, wie

DNA-Schäden und ER-Stress, aber auch mitochondriellen Stress, haben kann (Ishikawa *et al.*, 2009; Jauhainen *et al.*, 2012). Dies ist im Einklang zu der Theorie, dass Ag^+ auch die Mitochondrien angreift und die Membran schwächt. Ebenfalls decken sich diese Beobachtungen mit den Resultaten der Genotoxizitätsanalysen, wo vermehrt DNA-Schäden in der Monokultur detektiert wurden. Das DNA-schädigende Potential der Ag NM resultiert wahrscheinlich aus der Induktion von oxidativem Stress und ROS, die in der Folge die DNA angreifen. Diese Theorie kann aber nicht von allen Studien gestützt werden, da zum Teil zwar Strangbrüche detektiert wurden, allerdings weder Fgp-sensitive Stellen noch 8-oxo-Guanin nachgewiesen werden konnten. Bobyk *et al.* stellten die Hypothese auf, dass die Art der DNA-Schäden von der Proteinausstattung des jeweiligen Zelltyps abhängt. Die Autoren schlagen als Mechanismus vor, dass das Vorliegen einer hohen Konzentration an GSH, welches durch Ag^+ gebunden wird, eher zur Entstehung von oxidativen DNA-Schäden führt, da es die ROS nicht mehr reduzieren kann. Wenn aber eher Thiol-haltige Proteine vorliegen, wie bei den A549-Zellen, entstehen eher DNA-Strangbrüche (Bobyk *et al.*, 2021). Ein weiterer denkbarer Mechanismus ist die direkte Interaktion von Ag^+ oder Ag NM mit der DNA, nachdem diese in den Zellkern gelangt sind (AshaRani *et al.*, 2009). Durch den Nachweis von DNA-Schädigungen wäre die Aktivierung der DNA-Schadensantwort logisch gewesen. Die in der Literatur beschriebene Hemmung konnte allerdings ebenfalls nicht beobachtet werden. Möglicherweise halten sich zum gemessenen 24 h-Zeitpunkt diese beiden Effekte die Waage, sodass kein Ausschlag in eine bestimmte Richtung verifiziert werden konnte. Das Verhalten von Ag NW in Bezug auf eine genotoxische Wirkung wurde bisher nur wenig untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch Ag NW in den humanen Zellsystemen ausschließlich eine Induktion von Mikrokernen und nicht von DNA-Strangbrüchen beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass möglicherweise eine aneugene Schädigung aufgetreten ist, die mithilfe der alkalischen Entwindung nicht erfasst werden kann. Charehsaz *et al.* (2017) stellten ebenfalls fest, dass Ag NW weder mutagen noch klastogen wirken und Wang *et al.* (2019) fanden eine Beeinträchtigung der Mitose und Zytokinese. Möglicherweise kann dies auf die Faserstruktur zurückgeführt werden, denn CNT konnten bereits in einigen Studien als aneugen identifiziert werden (Muller *et al.*, 2008; Ventura *et al.*, 2020) und auch für Asbest konnte die Entstehung von Aneuploidie beobachtet werden. Lange NW könnten daher ähnlich wirken (Wang *et al.*, 2019).

Zusammengefasst zeigten beide Silbermaterialien toxische Effekte in unterschiedlichem Ausmaß. Während die Ag NP zytotoxischer in allen drei Zellkulturen wirkten, führten die Ag NW zu stärkeren Effekten in der Genexpressionsanalyse und bei der Untersuchung der Genotoxizität. Obwohl die

intrazelluläre Ionenfreisetzung laut aktueller Literatur eine wichtige Rolle in der Toxizität spielt, kann sie nicht der alleinige Auslöser sein (Wang *et al.*, 2014b; Karlsson *et al.*, 2022). Die Ergebnisse dieser Arbeit können nur in Teilen mit der detektierten Bioverfügbarkeit erklärt werden, da die beiden Materialien zu einem ähnlichen Maß Ionen in den Epithelzellen freisetzen. In der Genexpression konnte die Anwesenheit von intrazellulären Silberionen bestätigt werden sowie die Induktion von oxidativem Stress. Auf transkriptioneller Ebene konnte die Inhibierung der DNA-Reparatur dagegen nicht beobachtet werden, was möglicherweise an einer zu kurzen Inkubationsdauer oder an einem unpassenden Versuchsdesign lag. Die Genexpressionsanalyse offenbarte zusätzlich einen starken Einfluss der dTHP-1-Makrophagen, da in der Kokultur die Expression von Genen der Inflammationsmarker im Vergleich zur Monokultur erhöht waren. Dies betraf vor allem die Inkubation mit Ag NW, die durch die Länge der NW zur „frustrierten Phagozytose“ und in der Folge zu einer verstärkten Inflammation führen könnte. Die Analyse der Induktion von DNA-Strangbrüchen und von Mikrokernen zeigte Strangbrüche in der A549-Monokultur durch Ag NP und in RLE-6TN-Zellen durch beide Ag NM. Mikrokerne konnten in A549-Zellen nach der Inkubation mit ebenfalls beiden Materialien beobachtet werden. Unter Berücksichtigung der Resultate beider Genotoxizitätstests, könnte die beobachtete Genotoxizität der Ag NW auf einen aneugenen Mechanismus beruhen, während für die Ag NP ein klastogener Mechanismus wahrscheinlich ist.

5.5 CeO₂ NP, TiO₂ NP und CNT

CeO₂ NP und TiO₂ NP werden zu den unlöslichen NM gezählt und finden sowohl in der Industrie (Sensoren, Katalyse) als auch in Gegenständen des täglichen Bedarfs (Sonnenschutzmittel) Anwendung. Genauso werden die Kohlenstoffnanoröhren (*carbon nanotubes* - CNT) aufgrund ihrer thermischen und elektrischen Leitfähigkeit in verschiedenen Produkten eingesetzt. Die daraus resultierende hohe Relevanz sowie ihre potentiell toxischen Eigenschaften rechtfertigen deren Bedeutung in der gegenwärtigen Forschung. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Materialien unter anderem als unlösliche Opponenten für die in lysosomaler Flüssigkeit löslichen Kupfer-, Nickel- und Silber-basierten Materialien eingesetzt, da diese physikochemisch und toxikologisch bereits sehr gut charakterisiert wurden. Die CNT dienen zudem als Referenz für eine lungentoxische Nanofaser. Konkret handelte es sich bei den im folgenden Kapitel untersuchten NM um Cer(IV)oxid-NP (JRC NM-212), Titandioxid-NP (JRC NM-105) sowie *multi walled* CNT (MWCNT, kurz CNT; JRC NM-401). Letztere sind auch unter der Bezeichnung Mitsui-7 oder MWCNT-7 bekannt. Alle diese Materialien sind vom JRC als Referenzmaterialien gelistet.

5.5.1 Materialcharakterisierung

In Tabelle 18 sind die physikochemischen Eigenschaften der CeO₂ NP, TiO₂ NP sowie der CNT zusammengefasst. Die beiden NP besitzen einen ähnlichen primären Durchmesser (d_p 21,5-23,7 nm) und einen vergleichsweise kleinen PDI, was für die Homogenität der Proben spricht. Das ζ -Potential liegt mit -14,8 bis -15 mV im ähnlichen Bereich wie bei den weiteren im Rahmen dieser Arbeit verwendeten NM und deutet auf eine instabile Suspension hin. Der Wert könnte allerdings, wie auch bei den anderen NM, durch eine Proteinkorona, bestehend aus Proteinen des Zellkulturmediums, verfälscht sein (Walkey und Chan, 2012).

Tabelle 18 Physikochemische Eigenschaften der CeO₂ NP und TiO₂ NP sowie der Kohlenstoffnanoröhren (CNT).

d_p : Primärer Partikeldurchmesser. d_h : Hydrodynamischer Durchmesser. PDI: Polydispersitätsindex.

	CeO₂ NP	TiO₂ NP	CNT
d_p [nm]	21,5 ± 0,3	23,7 ± 0,5	
d_h [nm]	187,0 ± 7,3	165,8 ± 14,2	
PDI	0,20 ± 0,02	0,14 ± 0,01	
ζ-Potential [mV]	-15 ± 0,6	-14,8 ± 0,2	
Reinheit [%wt]	98,5	91,5 ± 0,61	99,2 ^a
Länge [μm]			3,36 ± 0,002 ^b
Breite [nm]			62,8 ± 1,4 ^b

^aRasmussen *et al.*, 2014b; ^bTavares *et al.*, 2014.

Da die CNT bereits in der Literatur sehr gut charakterisiert sind, wurden die Charakterisierungsarbeiten nicht zusätzlich durchgeführt. Die CNT besitzen, genau wie die CeO₂ NP und TiO₂ NP, eine hohe Reinheit und gehören mit 3,36 μ m Länge, verglichen mit den anderen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten NW, zu den kürzeren Fasern. Darüber hinaus sind die verwendeten CNT sehr rigide (Tavares *et al.*, 2014).

Die Löslichkeiten der beiden NP, die mithilfe der ICP-MS bestimmt wurden, können Tabelle 19 entnommen werden. Sowohl CeO₂ NP als auch TiO₂ NP erwiesen sich als unlöslich in allen getesteten Medien. Dies stimmt auch mit den Angaben des JRC überein (Rasmussen *et al.*, 2014a; Singh *et al.*, 2014). Ebenso konnten Koltermann-Jüly *et al.* (2018) für beide Materialien keine Löslichkeit nachweisen. Darüber hinaus bestätigt der JRC-Bericht auch die Unlöslichkeit der CNT (Rasmussen *et al.*, 2014b).

Tabelle 19 Löslichkeit von CeO₂ NP und TiO₂ NP nach 24 h in den verwendeten Zellkulturmedien sowie in relevanten biologischen Flüssigkeiten.

RPMI-1640/Ham's F-12: Zellkulturmedien mit 10 % FKS. AAF: Artifizielle alveoläre Flüssigkeit (pH 7,4). ALF: Artifizielle lysosomale Flüssigkeit (pH 4,5). n. n.: nicht nachweisbar.

	Löslichkeit [% gelöst]			
	RPMI-1640	Ham's F-12	AAF	ALF
CeO₂ NP	0,005 ± 0,0	0,005	0,001	0,021
TiO₂ NP	0,008 ± 0,0	n. n.	0,003 ± 0,0	0,014

5.5.2 Zytotoxizität

Die Viabilität der verwendeten Zellsysteme nach der Inkubation mit CeO₂ NP, TiO₂ NP und CNT ist in Abbildung 23 dargestellt. Die beiden Metalloxide nahmen nur einen geringen Einfluss auf die metabolische Aktivität, während der ATP-Gehalt nach der Inkubation mit CNT in allen Zellsystemen um etwa 50 % abnahm.

In der Literatur konnten im Falle von CeO₂ NP gegenläufige Ergebnisse bezüglich der Zytotoxizität beobachtet werden. So stellten Hirst *et al.* einen protektiven Effekt fest, indem CeO₂ NP direkt mit H₂O₂ interagiert und die Reaktion zu Wasser und Sauerstoff katalysiert (Hirst *et al.*, 2009). Andere Studien mit A549- oder BEAS-2B-Zellen beobachteten dagegen eine Abnahme der Zellviabilität um 25 % nach 24 h (Park *et al.*, 2008a). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit würde eher für die protektive Funktion der CeO₂ NP sprechen, da auch durch die hohen Dosen keine Zytotoxizität gemessen werden konnte und die Viabilität im Falle der A549-Monokultur sogar noch zunahm.

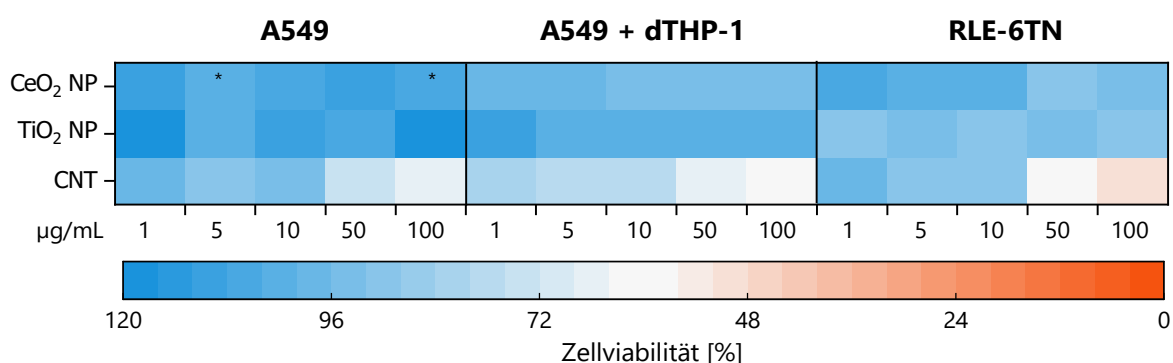


Abbildung 23 Zellviabilität von A549-, A549 + dTHP-1- sowie RLE-6TN-Zellen nach Inkubation mit CeO₂ NP, TiO₂ NP sowie Kohlenstoffnanoröhren.

Die Zellen wurden für 24 h mit den Testsubstanzen inkubiert und im Anschluss der ATP-Gehalt bestimmt. Als *Heatmap* dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen. Die Einfärbungen entsprechen den ATP-Gehalten in Prozent der Kontrolle. Statistisch signifikante Abweichungen gegenüber der unbehandelten Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett-T-Test (*p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001).

Für TiO₂ NP konnte in einer Studie mit A549-Zellen nach 18 h Inkubation ebenfalls keine Zytotoxizität festgestellt werden, während die maximale Inkubationsdosis umgerechnet 125 µg/mL betrug (Karlsson *et al.*, 2008). Dieselbe Gruppe detektierte zudem keinen Unterschied in der Zytotoxizität zwischen TiO₂ NP und korrespondierenden mikroskaligen Partikeln (Karlsson *et al.*, 2009). In einer weiteren Studie konnte darüber hinaus der TC50 in THP-1-Zellen auf 432 µg/mL festgelegt werden, während für A549-Zellen kein Wert ermittelt werden konnte, da die Toxizität zu gering war (Lanone *et al.*, 2009).

In Bezug auf die Zytotoxizität von MWCNT wurden ebenfalls Publikationen mit A549-Zellen veröffentlicht, die eine ähnliche Abnahme der Viabilität (35-40 %) beobachteten. Dies wurde unter anderem mithilfe des LDH-Assays festgestellt, der eine Aussage über die Membranintegrität zulässt. Daraus schlossen die Autoren, dass die MWCNT, unabhängig von den verschiedenen getesteten Längen, die Membranen der Zellen schädigen (Simon-Deckers *et al.*, 2008).

Aufgrund der geringen Zytotoxizität von CeO₂ NP und TiO₂ NP wurde in den weiteren Experimenten ausschließlich mit der maximalen Dosis von 100 µg/mL gearbeitet, da eine zusätzliche Abstufung nicht nötig war. Die CNT erreichten mit 50 % Zytotoxizität im ATP-Assays den maximal geduldeten Wert für die weiteren Experimente. Da die Viabilität im RCC dagegen nur auf 82 % abnahm (Daten nicht gezeigt) und zudem eine *Worst Case*-Betrachtung durchgeführt werden sollte, fiel die Entscheidung hier ebenfalls 100 µg/mL.

Für die weiteren Experimente wurden, basierend auf diesen Ergebnissen, die folgenden Konzentrationen ausgewählt:

Tabelle 20 Dosisauswahl für die weiterführenden Experimente aufgrund der Daten des ATP-Assays.
Angaben in µg/mL.

	CeO ₂ NP	TiO ₂ NP	CNT
Dosis	100	100	100

5.5.3 Bioverfügbarkeit und intrazelluläre Verteilung

Die Bioverfügbarkeit von Metallionen nach der Inkubation mit CeO₂ NP und TiO₂ NP ist in Abbildung 24 dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass nach der Inkubation mit CeO₂ NP ein vernachlässigbarer Anteil an gelöstem Cer in A549- und dTHP-1-Zellen nachweisbar war, während sich die Gehalte an Titan auch nach der Inkubation auf dem Basallevel bewegten. Aufgrund dessen wurde auf die Bestimmung der intrazellulären Verteilung verzichtet. Da die CNT keine Löslichkeit aufweisen, wurde

für dieses Material keine intrazelluläre Bioverfügbarkeit bestimmt. Die zelluläre Aufnahme in A549-Zellen konnte bereits in der Literatur gezeigt werden (Visalli *et al.*, 2015).

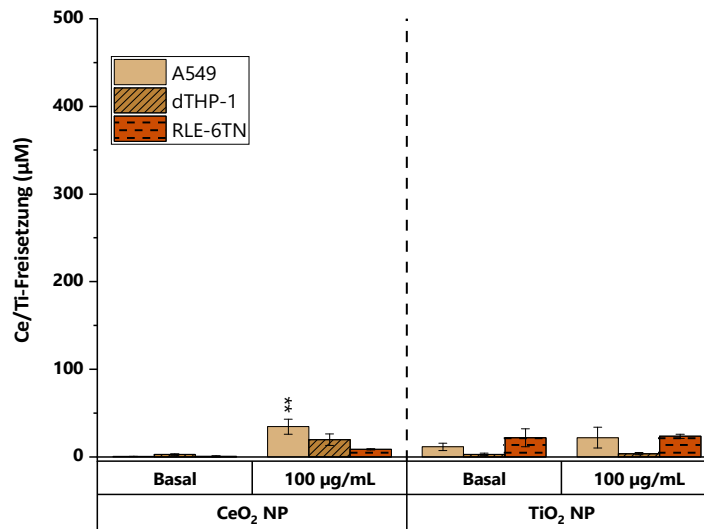


Abbildung 24 Bioverfügbarkeit der CeO₂ NP und TiO₂ NP in den Zelllinien A549, dTHP-1 und RLE-6TN.

Die Zellen wurden für 24 h mit den Nanomaterialien inkubiert. Die Daten sind als Ionenkonzentrationen dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen \pm SD. Statistisch signifikante Abweichungen gegenüber der unbehandelten Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett-T-Test (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

In einer umfangreichen Studie mit diversen NP wurde die Löslichkeit in verschiedenen Medien und mithilfe von unterschiedlichen Methoden untersucht. Das Ziel der Studie war unter anderem zu eruieren, ob die Löslichkeit in einer lysosomalen Modellflüssigkeit repräsentativ für die Löslichkeit in kultivierten Makrophagen sowie *in vivo* ist. Dabei konnten für NM-212 (CeO₂ NP) und NM-105 (TiO₂ NP) keine Ionen in den Makrophagen festgestellt werden, was den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit entspricht (Koltermann-Jülly *et al.*, 2018).

5.5.4 Genexpressionsanalysen

Da die Ergebnisse der HT RT-qPCR keine relevanten Änderungen der Genexpression (\log_2 -facher Faktor $>1,5$ bzw. $<-1,5$; Kapitel 4.2.6.6) nach der Inkubation mit TiO₂ NP und CeO₂ NP ergaben, sind die *Heatmaps* ausschließlich im Anhang unter 8.4.1.1 und 8.4.2.1 (Abbildung 35, Abbildung 36, Abbildung 39 und Abbildung 40) zu finden. Dagegen wurden nach der Inkubation mit CNT einige wenige Gene in relevantem Ausmaß induziert, diese sind in Abbildung 25 und Abbildung 26 dargestellt.

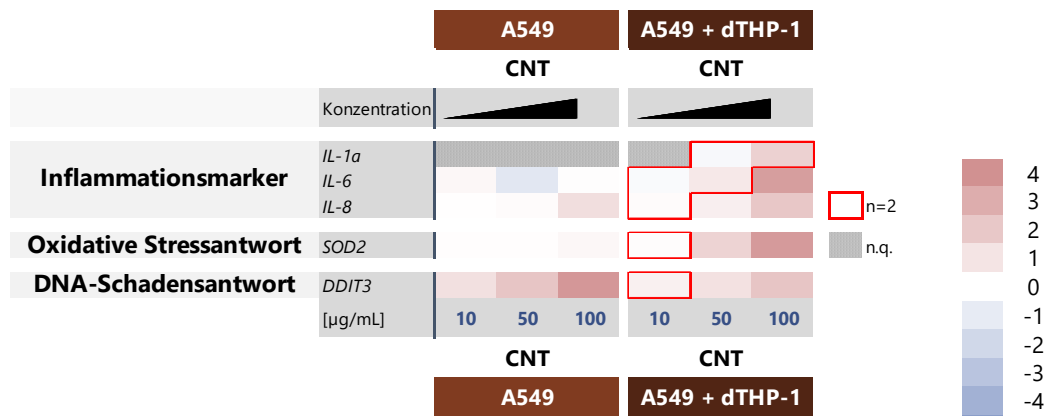


Abbildung 25 Beeinflussung der Genexpression durch Kohlenstoffnanoröhren (CNT) in A549-Monokultur sowie -Kokultur mit dTHP-1-Zellen. Gezeigt sind ausgewählte Gene der DNA-Schadensantwort, der oxidativen Stressantwort sowie inflammatorische Marker.

Eine rote Färbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine verminderte Genexpression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen, sofern nicht anders angegeben.

In der A549-Kokultur (Abbildung 25) wurden nach der Inkubation mit CNT Gene dosisabhängig vermehrt exprimiert, die für Interleukine codieren (*IL-6*: 11,6 (\log_2 3,5), 100 µg/mL), aber auch das Gen *SOD2*, das für die Superoxiddismutase 2 codiert (12,7 (\log_2 3,6), 100 µg/mL). Diese Gene wurden dagegen in der Monokultur in einem nicht-relevanten Ausmaß verändert exprimiert, weshalb sich hier der Einfluss der Makrophagen-ähnlichen dTHP-1-Zellen geltend macht. Zudem wurde das Gen *DDIT3* sowohl in der Mono- als auch in der Kokultur verstärkt exprimiert (Mono.: 13,6 (\log_2 3,8); Ko.: 4,1 (\log_2 2,1), je 100 µg/mL). *DDIT3* codiert für den pro-apoptotischen Transkriptionsfaktor CHOP und spielt eine wichtige Rolle in der DNA-Schadensantwort sowie bei ER-Stress. Die stärkere Induktion der Gene in der Kokultur lässt sich wahrscheinlich auf einen Endozytose-Stress der dTHP-1-Zellen zurückführen. Die eingesetzten CNT weisen zwar eine kürzere Länge als beispielsweise die Ag NW auf, könnten aufgrund ihrer Rigidität möglicherweise dennoch die „frustrierte Phagozytose“ auslösen (Murphy *et al.*, 2012). Zudem könnten die sehr starren CNT die Zellmembran der Zellen durchstechen (Keshavan *et al.*, 2021), was den eher flexiblen Ag NW wahrscheinlich nicht möglich wäre. Weiterhin haben die dTHP-1 Makrophagen wahrscheinlich eine intensivere Wechselwirkungen mit den NM, was auf ihrer gesteigerten phagozytotischen Kapazität beruht (Chortarea *et al.*, 2019). Die „frustrierte Phagozytose“ führt in der Folge zu zellulärem Stress, der sich durch oxidative und inflammatorische Prozesse äußert. Durch die Ausschüttung von Signalmolekülen kann dieser Stress auch auf die Epithelzellen übertragen werden.

Ergebnisse und Diskussion

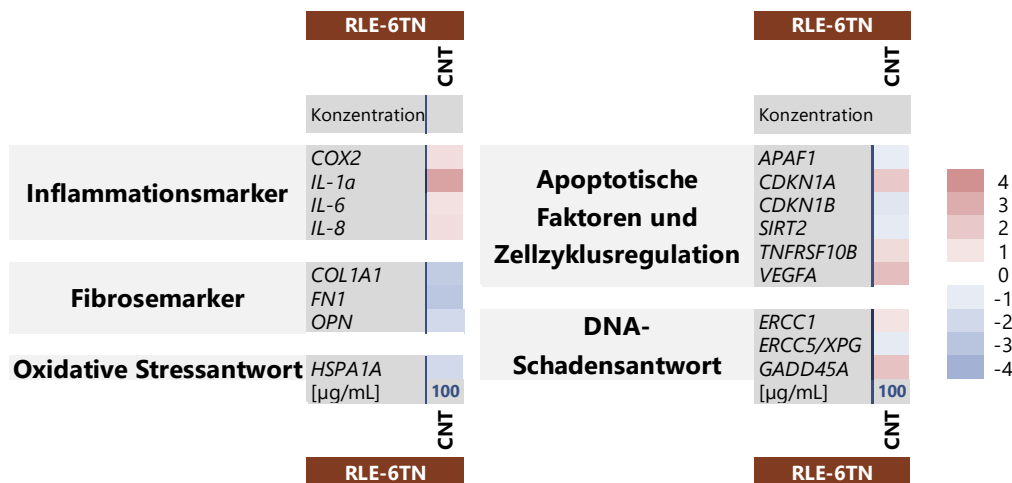


Abbildung 26 Beeinflussung der Genexpression durch Kohlenstoffnanoröhren (CNT) in RLE-6TN-Zellen. Gezeigt sind ausgewählte Gene der DNA-Schadensantwort, der Apoptose sowie der Zellzyklusregulation, der oxidativen Stressantwort sowie inflammatorische und fibrotische Marker.

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

Die Ergebnisse der Rattenepithelzelllinie sind in Abbildung 26 dargestellt, wobei auch Gene aufgenommen wurden, die nicht den geforderten \log_2 -fachen Faktor 1,5 über- oder unterschritten. Induziert wurden nach der Inkubation mit CNT im Besonderen die Gene *IL-1a*, *GADD45A*, *CDKN1A* und *VEGFA*, während einige Gene, die für Fibrose- und Apoptosemarker codieren, reprimiert wurden. Die Induktion der genannten Gene spricht dabei für zellulären Stress und die Einleitung eines Zellzyklusarrests.

Die Induktion von inflammatorischen Genen durch CNT wurde bereits eingehend untersucht und in der Literatur beschrieben. Di Ianni *et al.* verwendete ebenso das JRC-Material NM-401 im Zusammenhang mit einer submersen Inkubation von A549- und dTHP-1-Zellen, jeweils in Monokultur für 6 und 24 h. Die mRNA-Level des Gens *IL-8* in A549-Zellen waren nach 6 h, ausschließlich durch die höchste Konzentration (160 µg/mL), um das circa 15-fache erhöht. Nach 24 h dagegen konnte auch in der Konzentration 40 µg/mL eine statistisch signifikante Induktion beobachtet werden. Die dTHP-1-Monokultur verhielt sich nach der Inkubation mit 40 µg/mL ähnlich wie die A549-Zellen, während 80 µg/mL die Expression nach 6 h 19-fach und nach 24 h 41-fach erhöhte. Dieses Material löste in dTHP-1-Zellen unter allen acht innerhalb dieser Studie getesteten CNT den stärksten Effekt auf die Expression von *IL-8* aus. Die Autoren schlussfolgerten, dass vor allem lange und dicke CNT eine inflammatorische Reaktion hervorrufen (Di Ianni *et al.*, 2021). In einer weiteren Studie wurden primäre Alveolarepithelzellen beider Typen sowie alveoläre Makrophagen mit CNT verschiedener Länge inkubiert und inflammatorische Marker analysiert. Hierbei stellte sich

heraus, dass die kurzen Fasern (0,6 μm Länge) einen stärkeren Effekt in den Epithelzellen hervorriefen als die langen MWCNT (20 μm Länge). Im Gegensatz dazu waren die Makrophagen anfälliger für die langen Fasern (Sweeney *et al.*, 2014). Die CNT, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, sind im Vergleich hierzu bei einer mittleren Länge einzuordnen (3,4 μm). CNT in einem ähnlichen Längenbereich wurden ebenfalls in der Publikation verwendet. Dabei konnte eine signifikante Induktion von IL-8 und IL-6 in Alveolar-Epithelzellen Typ II sowie in Makrophagen detektiert werden (Sweeney *et al.*, 2014). Im Rahmen dieser Arbeit konnte ausschließlich in der Kokultur eine relevante Änderung der Genexpression von *IL-8* und *IL-6* beobachtet werden. Womöglich reagieren Primärzellen somit sensitiver als kultivierte Zellen.

Ähnlich zu den im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten stellten auch Cappellini *et al.* (2020) keine Freisetzung von Zytokinen in einer A549-Kokultur mit dTHP-1-Zellen nach der Inkubation mit CeO_2 NP sowohl unter submersen als auch unter ALI (*Air Liquid Interface*)-Bedingungen fest. Im Gegensatz dazu konnte in einer *in vivo*-Studie durchaus eine veränderte Genexpression bereits einen Tag nach der Inhalation von CeO_2 NP in Lungenzellen von Ratten festgestellt werden. In Summe wurden 11 der 34 untersuchten Gene verändert exprimiert, die sich zum Großteil nicht in dem Gen-Set der vorliegenden Arbeit befanden. Dennoch sind Parallelen unter anderem beim Gencluster des oxidativen Stress zu erkennen, in dem Gene reprimiert wurden. Zudem konnte eine Induktion von beispielsweise *IL-1a* zwar nicht nach 24 h, jedoch nach 28 Tagen Inkubation festgestellt werden. Bei den Genclustern der Inflammationsmarker sowie der DNA-Reparatur wurden einzelne Gene hochreguliert, andere vermindert exprimiert. Allerdings sind inflammatorische Effekte nur in den hohen Dosen aufgetreten, die zu einer Überladung der Lunge geführt hatten, sodass die Makrophagen übersättigt und die Clearance eingeschränkt war. Für niedrigere Konzentrationen, die nicht zu einer Lungenüberladung geführt hatten, wurden keine Anzeichen einer Inflammation beobachtet. Neben der Inflammation, die die Genexpression in den hohen Dosen dominierte, konnten auch Anzeichen für oxidativen Stress ausgemacht werden (Schwotzer *et al.*, 2018). Die unterschiedlichen Ergebnisse aus der *in vivo*-Studie, verglichen mit der vorliegenden Arbeit, stammen wahrscheinlich daher, dass im Tier eine sehr hohe Dosis eingesetzt wurde, die sich nur schwer mit den submersen Konzentrationen vergleichen lässt und die zudem zur Lungenüberladung führte. Zusätzlich reagiert das komplexe System eines lebenden Organismus mit vielen verschiedenen Zelltypen und Strukturen sehr wahrscheinlich anders als submers kultivierte Zellen.

Bezüglich der TiO_2 NP konnten in vorangegangenen Studien innerhalb der Arbeitsgruppe nach der Exposition über ein ALI ebenfalls keine Änderungen in der Genexpression in A549-Zellen beobachtet

werden. Dabei war die applizierte Dosis mit maximal $26 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ in einem ähnlichen Bereich wie die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Konzentration (Hufnagel *et al.*, 2020). Im Gegensatz dazu konnte in einer weiteren Studie die Induktion von pro-inflammatorischen Genen sowie Genen, die mit oxidativem Stress in Zusammenhang stehen, nach der Inkubation von BEAS-2B-Zellen beobachtet werden. Allerdings betraf dies insbesondere den 4 h-Zeitpunkt nach der Inkubation, während nach 24 h die meisten Effekte auf transkriptioneller Ebene bereits wieder nachgelassen hatten. Dies konnte in der Publikation in einer zeitaufgelösten Versuchsdurchführung deutlich gemacht werden (Park *et al.*, 2008b). Möglicherweise war dies auch bei den Daten der Fall, die im Zuge der vorliegenden Arbeit erhoben wurden, und die potentiellen Effekte waren nach 24 h bereits nicht mehr detektierbar, da der Peak womöglich einige Stunden zuvor erreicht war.

5.5.5 Untersuchungen zur Genotoxizität

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Genotoxizität sind in Abbildung 27 zu sehen und umfassen auch Resultate der Abschlussarbeit von Marius Dargel.

Mithilfe der Untersuchung der Induktion von DNA-Strangbrüchen konnte keine genotoxische Wirkung nachgewiesen werden. Im MN-Test dagegen induzierten die CNT in A549-Zellen die Entstehung von MN signifikant. Die Informationen zur Genotoxizität der CNT in den beiden Assays lässt einen rein aneugenem Wirkmechanismus vermuten, da mittels AU ausschließlich klastogene Effekte und mittels MN-Test sowohl klastogene als auch aneugene Effekte nachgewiesen werden können.

Publikationen bezüglich der Genotoxizität von verschiedenen SWCNT und MWCNT liefern gegenläufige Ergebnisse. Einige Publikationen konnten mittels alkalischem Comet-Assay die Induktion von DNA-SB bereits in niedrigen Konzentrationen messen (Karlsson *et al.*, 2008), während andere Studien keine Effekte aufzeigen konnten (Jacobsen *et al.*, 2008). Mithilfe einer γ -H2AX-Färbung kann zudem die Induktion von DSB untersucht werden. Auch hierfür lieferten verschiedene Studien gegensätzliche Ergebnisse (Petersen und Nelson, 2010). In einer *in vivo*-Studie mit Ratten wurde nach einer einmaligen Gabe von MWCNT die Induktion von MN festgestellt, was ebenfalls in *in vitro*-Experimenten beobachtet werden konnte. Die Autoren schlossen aus ihren Daten, dass sowohl klastogene Effekte wie DSB als auch aneugene Effekte, wie der Verlust eines Chromosoms, eine Rolle in der Genotoxizität von MWCNT spielen (Muller *et al.*, 2008). In einer aktuellen Studie mit CNT verschiedener Länge wurden ebenfalls die NM-401-CNT im Kombination mit A549-Zellen

verwendet. Auch hier konnte keine Induktion von DNA-SB mittels Comet-Assay beobachtet werden (Di Ianni *et al.*, 2021).

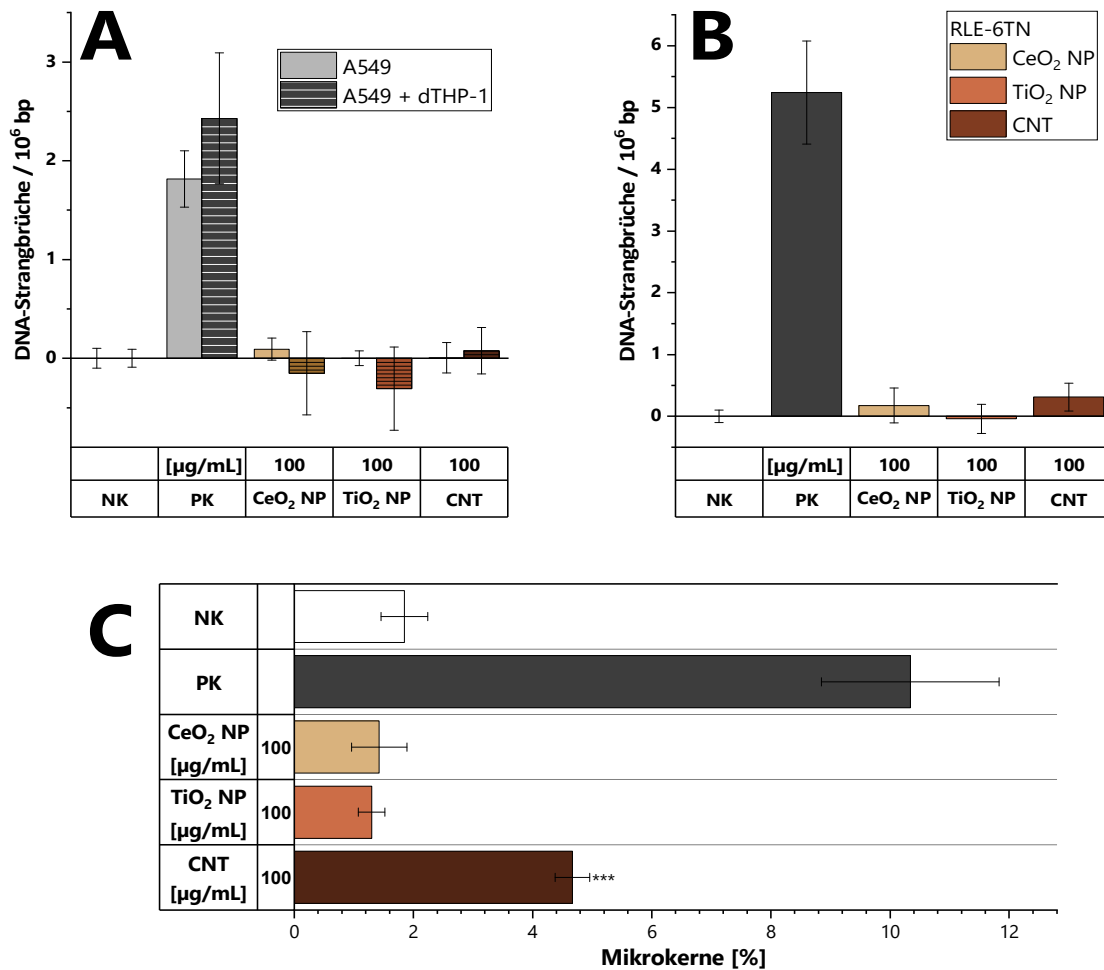


Abbildung 27 Gegenüberstellung der Induktion von DNA-Strangbrüchen sowie der Induktion von Mikrokernen nach der Inkubation mit CeO₂ NP, TiO₂ NP und Kohlenstoffnanoröhren (CNT).

A: Induktion von DNA-Strangbrüchen in A549-Zellen in Mono- als auch in Kokultur mit dTHP-1-Zellen. B: Induktion von DNA-Strangbrüchen in RLE 6TN-Zellen. C: Induktion von Mikrokernen in A549-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit den Testsubstanzen inkubiert. Für den Mikrokernertest wurde für weitere 24 h nachinkubiert. Als Positivkontrollen dienten für die AU (A+B) 100 μM Menadion und für den Mikrokernertest (C) 0,3 μM Mitomycin C. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen \pm SD. Statistisch signifikante Abweichungen gegenüber der unbehandelten Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett-T-Test (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

El Yamani *et al.* (2017) beurteilten die Genotoxizität von CeO₂ NP (NM-212) und TiO₂ NP (NM-100) und stellten die Induktion von DNA-SB in A549-Zellen fest. Diese war jedoch nur schwach ausgeprägt und wurde im Falle von TiO₂ NP nach 24 h, im Vergleich zum 3 h-Zeitpunkt, bereits nahezu vollständig repariert. Ursini *et al.* (2014) konnten ebenfalls nach 24 h keine Genotoxizität von TiO₂ NP in A549-Zellen mittels Comet-Assay nachweisen. Ebenso verhielt es sich nach der ALI-Exposition von

A549-Zellen mit TiO₂ NP, wobei die Untersuchung mittels AU durchgeführt wurde (Hufnagel *et al.*, 2020).

Insgesamt nehmen viele Faktoren, wie die Wahl der Zelllinie, der Inkubationszeit und im Besonderen die Wahl des Assays Einfluss auf den Ausgang von Studien zur Genotoxizität.

5.5.6 Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse aus den Untersuchungen der CeO₂ NP, TiO₂ NP und CNT

Die in diesem Kapitel behandelten NM dienten vorwiegend als Referenzen für unlösliche, teils kaum toxische Substanzen gegenüber den im sauren Milieu löslichen Kupfer-, Nickel- und Silber-basierten Materialien innerhalb der vorliegenden Arbeit. Diese wurden ausgewählt, da CeO₂ NP und TiO₂ NP sehr gut charakterisiert und bereits häufig für toxikologische Studien eingesetzt wurden. Zudem werden sie zu den unlöslichen NM gezählt und bilden somit einen geeigneten Gegenpart zu den löslichen Metallen. Als Referenz für eine Nanofaser wurden die Mitsui-7 MWCNT ausgewählt, da sie viele Eigenschaften einer hochgradig lungentoxischen Faser vereinen und zudem unlöslich sind.

Entsprechend den Erwartungen zeigten die beiden NP keine Löslichkeit in relevanten Flüssigkeiten sowie keine Zytotoxizität im ausgewählten Konzentrationsbereich, während die CNT in der höchsten Dosis die Zellviabilität um etwa 50 % herabsetzten. Dennoch wurde für die weiteren Experimente ausschließlich die Maximaldosis (100 µg/mL) weitergeführt. Bei der Untersuchung der Bioverfügbarkeit zeigten die NP keine intrazelluläre Ionenfreisetzung, weshalb die Bestimmung der intrazellulären Verteilung nicht durchgeführt wurde. Inwieweit sich Metallionen aus den verwendeten CNT lösen, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Allerdings wurde dies im Bericht der JRC festgehalten, wonach sich aus dem Material NM-401 vernachlässigbar geringe Mengen an Aluminium (59 µg/g), Eisen (379 µg/g) und Nickel (2 mg/g) lösen (Rasmussen *et al.*, 2014b). Demnach ist bei toxischen Effekten, die potentiell durch diese drei Materialien hervorgerufen werden, nicht von einem Ioneneffekt auszugehen. In der Analyse der Genexpression mittels HT RT-qPCR riefen ausschließlich die CNT relevante Effekte in den verwendeten Zellmodellen hervor, die sich auf einzelne wenige Gene beschränkten. In der A549-Kokultur wurden einige Inflammationsmarker sowie die Gene *SOD2* und *DDIT3* verstärkt exprimiert, in der Monokultur ausschließlich letzteres. In den Rattenepithelzellen waren *IL-1α*, *CDKN1A*, *VEGFA* und *GADD45A* hochreguliert und Gene, die für Fibrosemarker codieren, vermindert exprimiert. In der A549-Kokultur sind damit die Einflüsse der Makrophagen-ähnlichen dTHP-1-Zellen deutlich zu sehen. Obwohl die Länge der CNT im mittleren Bereich liegt (3,4 µm), können diese Fasern dennoch zur „frustrierten Phagozytose“ führen (Murphy

et al., 2012). Neben dem Auslösen der „frustrierten Phagozytose“ können vollständig aufgenommene Fasern auch physische Schäden in der Zelle verursachen, weshalb für CNT die Generierung von ROS über die physische Beeinträchtigung der Mitochondrien als ein wichtiger toxischer Wirkmechanismus beschrieben wird (Manke *et al.*, 2013). Die Induktion von adversen Effekten über ROS ist ebenso der in der Literatur beschriebene Wirkmechanismus von CeO₂ NP und TiO₂ NP, die entweder eine Redox- oder Photoaktivität besitzen (Petersen und Nelson, 2010; Schwotzer *et al.*, 2018). Obwohl die Induktion von ROS durch CeO₂ NP und TiO₂ NP schon häufig in der Literatur beschrieben wurde, konnte dies dennoch nicht im Rahmen dieser Arbeit beobachtet werden (Petersen und Nelson, 2010). Womöglich war hierbei der 24 h-Zeitpunkt allein nicht aussagekräftig genug, da in zeitaufgelösten Studien die Effekte nach 3-6 h ihren Peak erreichten und nach 24 h weitestgehend wieder abgebaut waren (El Yamani *et al.*, 2017). Für CNT ist des Weiteren die Induktion von inflammatorischen Reaktionen ein bekannter Prozess, der wahrscheinlich über den MAP-Kinase Signalweg verläuft (Sweeney *et al.*, 2014). Die Induktion von DNA-Strangbrüchen, die potentiell aus oxidativem Stress resultieren kann, konnte im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls nicht für die drei unlöslichen Materialien beobachtet werden und ausschließlich die CNT hatten einen signifikanten Anstieg an MN zur Folge. Falls die Materialien im Verlauf der Inkubation zur Generierung von ROS geführt haben, die potentiell die DNA angriffen, konnte dies nach 24 h nicht mehr detektiert werden. Da auch in der Genexpression nahezu keine Hinweise auf ROS zu sehen waren, muss dieser Mechanismus, sofern er aufgetreten ist, nur in sehr geringem Ausmaß stattgefunden haben. Die Induktion von MN durch CNT lässt auf einen aneugenischen Effekt schließen, da im Gegensatz dazu keine DNA-Strangbrüche detektiert werden konnten. Die Aufnahme von CNT in die Zellen sowie auch deren gerichtete Anordnung an der DNA konnte in verschiedenen Publikationen bereits gezeigt werden. Dabei sind direkte Interaktionen mit der DNA nicht ausgeschlossen, aber auch eine physische Wechselwirkung mit dem Spindelapparat oder mit an der Zellteilung beteiligten Proteinen könnten mögliche Mechanismen darstellen (Li *et al.*, 2005; Muller *et al.*, 2008). Für CNT wird aufgrund ihrer Faserstruktur, die abhängig von der Form und Größe das Faser-Paradigma erfüllt, sowie ihrer Rigidität von einem Asbest-ähnlichen Wirkmechanismus ausgegangen. Dieser beruht auf einer chronischen Entzündung der Lunge, wobei die biopersistenten Stäube nicht abgebaut und aufgrund ihrer Größe nur schwer abtransportiert werden können. In der Folge können sich Lungenfibrosen und Tumore entwickeln. Da sich ein solcher Prozess über Jahrzehnte entwickelt und ein Zusammenspiel vieler Zelltypen und Mechanismen erfordert, ist ein Effekt bereits nach 24 h *in vitro* nicht unbedingt zu erwarten, dennoch konnte in der Kokultur eine gesteigerte Genexpression der inflammatorischen Marker sowie des oxidativen Stress-Markers *SOD2* beobachtet werden. Darüber hinaus konnten Tierstudien solche

Mechanismen noch deutlicher hervorheben (Søs Poulsen *et al.*, 2013; Numano *et al.*, 2019; Di Ianni *et al.*, 2021).

Wie bereits erwähnt wurden TiO₂ NP von der IARC als „möglicherweise krebserzeugend für den Menschen“ eingestuft und auch die EFSA gab 2021 eine neue Bewertung zum Zusatzstoff E171 ab, welche die Verwendung von E171 in der EU verbietet. E171 besteht zum Großteil aus mikroskaligem TiO₂ und enthält etwa 3,2 % TiO₂ NP (Younes *et al.*, 2021). Die Einschätzung der IARC beruht dabei hauptsächlich auf Tierstudien mit Ratten, wobei eine sehr hohe Dosis verabreicht wurde, die zur Lungenüberladung führte. Studien mit anderen Tieren zeigten dagegen keinen kanzerogenen Effekt. Darüber hinaus wurden auch epidemiologische Studien mit Menschen in Betracht gezogen, wobei eine von drei Studien eine leicht erhöhte Inzidenz für Tumore aufzeigte (IARC, 2010). Da es sich hierbei ebenfalls um Langzeitstudien handelt, die entweder eine Überladung der Lunge oder eine chronische Exposition über viele Jahre beinhalten, ist dies mit dem in der vorliegenden Arbeit gewählten Expositionsmodell nicht vergleichbar. In die Neubewertung der EFSA flossen Studien ein, die DNA-SB und Chromosomenschäden nachweisen konnten, wobei jedoch keine Korrelation zwischen den physikochemischen Eigenschaften der Partikel und den Ergebnissen nachgewiesen werden konnte. Allerdings zeigten auch hier die meisten betrachteten Studien keinen Effekt. Dies ist auch in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Nichts destotrotz wurde aufgrund dieser Unsicherheiten, die eine genotoxische Wirkung nicht ausschließen konnten, E171 als nicht sicher eingestuft (Younes *et al.*, 2021).

Insgesamt konnten im Rahmen dieser Arbeit für die beiden unlöslichen Partikel CeO₂ NP und TiO₂ NP keine adversen Effekte beobachtet werden. Dies widerspricht zum Teil der Fachliteratur, die beiden Materialien entweder durch eine Redox- oder Photoaktivität jeweils die Generierung von ROS zuschreibt, die zu oxidativem Stress führen kann. Möglicherweise konnten diese Effekte aufgrund des gewählten Inkubationszeitraums von 24 h nicht beobachtet werden. Hierfür spricht unter anderem eine 90-Tage-Studie, die die Langzeit-Auswirkungen von CeO₂ NP auf die Lungen von Ratten untersuchte. Dabei zeigte sich eine eingeschränkte Clearance nach der Exposition mit hohen Dosen sowie Entzündungen des Gewebes. Darüber hinaus legte die Persistenz der NP auch nach abgeschlossener Exposition adverse Langzeit-Effekte nahe (Schwotzer *et al.*, 2017).

Die verwendeten CNT zeigten eine mittlere Zytotoxizität in der höchsten eingesetzten Dosis und induzierten inflammatorische Markergene in der A549-Kokultur. Letzteres steht mit der „frustrierten Phagozytose“ der dTHP-1-Zellen im Zusammenhang, die in der Folge vermehrt Entzündungsmarker ausschütten. Darüber hinaus induzierten die CNT zwar keine DNA-Strangbrüche, dagegen aber MN

in einem statistisch signifikanten Ausmaß, was auf einen aneugenen Wirkmechanismus der Fasern schließen lässt. Dieser könnte auf einer physischen Störung des Spindelapparates oder der direkten Interaktion der CNT mit der DNA beruhen.

6 Zusammenfassende Diskussion

Um potentielle adverse Effekte der in immer mehr Produkten eingesetzten Nanomaterialien (NM) beurteilen zu können, muss sich auch das Feld der Toxikologie stetig weiterentwickeln, um eine *state of the art* Risikobewertung zu ermöglichen. Neben seit einigen Jahren bekannten Nanopartikeln (NP) werden auch immer häufiger neuartige Nanofasern (NW) eingesetzt. NW bergen durch ihre Form die Gefahr eines Faser-spezifischen Wirkmechanismus, welcher der lungentoxischen Silikat-Faser Asbest ähneln könnte. Asbest wirkt allein durch ein spezifisches Längen-zu-Durchmesser-Verhältnis gesundheitsschädlich und nicht etwa durch die chemische Zusammensetzung. Im Falle von metallbasierten NM besteht zusätzlich das Risiko eines metallspezifischen Wirkmechanismus, der auf der Freisetzung von Ionen und der Wechselwirkung von Zellbestandteilen mit NM selbst basiert. Obwohl einige Metalle, wie beispielsweise Kupfer, essentiell für den menschlichen Körper sind, führt eine Überladung der Zellen zu teils schwerwiegenden Konsequenzen. Übergangsmetalle sind in der Lage das Redox-Gleichgewicht von Zellen zu stören, was in der Folge zu oxidativem Stress führt, wodurch wiederum Makromoleküle wie Lipide, Proteine oder auch die DNA geschädigt werden (Shi *et al.*, 2004). In den letzten Jahren konnten zwar umfangreiche toxikologische Daten zu metallbasierten NP gesammelt werden, jedoch ist die Datenlage noch nicht ausreichend. Die metallbasierten NW traten erst in den letzten Jahren in verschiedenen Studien in Erscheinung, weshalb für diese Materialien bisher nur wenige Daten existieren. Dabei waren unter den NW Silbernanofasern (Ag NW) häufiger in Publikationen vertreten (Schinwald *et al.*, 2012a; Schinwald und Donaldson, 2012; Chen *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014; Charehsaz *et al.*, 2017; Chung *et al.*, 2017; Lehmann *et al.*, 2018; Toybou *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019), während beispielsweise für Kupfernanofasern (Cu NW) bisher keine toxikologischen Daten vorliegen.

Die vorliegende Arbeit soll einen wichtigen Beitrag zur Identifizierung toxikologischer Wirkprofile von metallbasierten NM leisten und einen Vergleich über die *in vitro*-Toxikologie von ausgewählten metallbasierten NW zu den korrespondierenden NP geben. Hierbei werden systematische Untersuchungen genutzt, um Faser- und Partikelwirkungen zu erfassen und zu vergleichen. Da die Lunge als Hauptexpositionsorgan für NM gilt, werden pulmonale Zellkulturmodelle des Menschen und der Ratte verwendet. Der Vergleich der beiden Spezies auf *in vitro*-Ebene bildet dabei den ersten Schritt hin zur Untersuchung möglicher Spezies-bezogener Unterschiede in der Reaktion auf NM. Innerhalb des BMBF-geförderten Projekts *MetalSafety* werden auf den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnissen aufbauend weiterhin die toxikologischen Auswirkungen auf *ex vivo*-

Ebene mittels Lungenschnitten von Mensch und Ratte untersucht sowie *in vivo*-Untersuchungen an der Ratte durchgeführt und abschließend verglichen. Dies dient der Beantwortung der Frage nach der Übertragbarkeit von *in vitro*-Modellen auf *in vivo*-Begebenheiten sowie der Beurteilung der Extrapolation von Tierversuchen auf den Menschen. Das Forschungsprojekt und damit auch die vorliegende Arbeit folgt somit dem Konzept der 3 Rs der Toxikologie (*refine, reduce, replace*), das die Reduzierung von Versuchstieren zum Ziel hat (Burden *et al.*, 2017).

Um die Grundlage hierfür zu schaffen, lag der Fokus der Arbeit somit auf der Aufklärung von toxikologischen Wirkmechanismen sowie dem Vergleich der partikulären und faserförmigen Nanospezies in submersen *in vitro* Untersuchungen. Als Materialien für die entsprechenden Experimente wurden im Sauren lösliche Kupfer-, Nickel- und Silber-basierte NM sowie eine Reihe an (unlöslichen) Referenzmaterialien gewählt, wobei die drei ersteren je eine metallische NP-Spezies und eine metallische NW-Spezies sowie zusätzlich das partikuläre Kupfer-Metalloxid umfassten. Für die Referenzmaterialien fiel die Wahl auf CeO₂ NP und TiO₂ NP als unlösliche Partikelreferenzen, sowie auf Kohlenstoffnanoröhren (CNT) als unlösliche Faserreferenz. Bei der Untersuchung der Materialien lag der Schwerpunkt neben einer umfassenden Materialcharakterisierung auf der Untersuchung der Beeinflussung der genomischen Stabilität. Letztere wurde mittels zweier Methoden bewertet, die die alkalische Entwindung sowie einen durchflusszytometrischen Mikrokerntest umfassen und verschiedene genotoxische Endpunkte einschließen. Um weitere Anhaltspunkte auf die zelluläre Reaktion zu erhalten, wurde außerdem eine Hochdurchsatz RT-qPCR durchgeführt, die die parallele Analyse von 95 Genen in 96 Proben zulässt. Zu diesem Zweck wurde das Gen-Set speziell auf NM-spezifische Wirkmechanismen angepasst, indem inflammatorische und fibrotische Marker zu einem bestehenden Gen-Set ergänzt wurden. Darüber hinaus wurde ein neues Gen-Set desselben Umfangs, angelehnt an das humane Gen-Set, zur Untersuchung von Rattenproben etabliert. Für die toxikologischen Untersuchungen kamen immortalisierte Lungen-Zelllinien von Mensch und Ratte zum Einsatz, die Typ II-Alveolarepithelzellen zugeordnet werden können. Zudem wurde die humane Monozytenzelllinie THP-1 verwendet, die, differenziert zu Makrophagen, ausschließlich in einer Kokultur mit Epithelzellen kultiviert wurde. Dies diente der Konstruktion einer natürlichen Zell-Zell-Interaktion zwischen den Zelltypen. Die Wahl des Zellkulturmodells beruht zudem auf der Relevanz der Lunge als Haupteintrittsort von NM in den Körper, wo sie, aufgrund der geringen Größe, weit vordringen und sich in den Alveolen absetzen können. Das Fehlen einer Zilien-basierten Clearance in den Alveolen macht die Anwesenheit von alveolären Makrophagen essentiell, da sie die Fremdkörper aufnehmen und abtransportieren

können. Im Folgenden sollen nun die beschriebenen und im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse zusammenfassend dargelegt sowie miteinander verglichen und diskutiert werden. Einen ersten Überblick über die wichtigsten Resultate bieten hierbei Tabelle 21 und Tabelle 22.

Tabelle 21 Ergebnisübersicht über die Untersuchungen der Löslichkeit, Bioverfügbarkeit, intrazellulären Verteilung, Zytotoxizität, alkalischen Entwindung (AU) und des Mikrokerntests (MN-Test).

0: kein Effekt. +, ++, +++: Effektstärke. *Externe Daten. / nicht bestimmt. ALF: Artifizielle lysosomale Flüssigkeit (pH 4,5). Zytopl.: Zytoplasma. dTHP-1: differenzierte THP-1-Zellen. A549Co: Kokultivierung aus A549- und dTHP-1-Zellen.

		CuO	Cu	Cu	Ni	Ni	Ag	Ag	CeO₂	TiO₂	CNT
		NP	NP	NW	NP	NW	NP	NW	NP	NP	
Löslichkeit											
Medium		++	++	+	+	0	0	0	0	0	0*
ALF		+++	+++	+++	++	+	0	0	0	0	0*
Bioverfügbarkeit											
A549		++	++	++	+++	++	+	++	0	0	/
dTHP-1		++	++	+++	++	++	++	+++	0	0	/
RLE-6NT		++	+	++	+++	++	++	++	0	0	/
Intrazelluläre Verteilung											
A549	Zellkern	++	++	+	++	+	++	++	/	/	/
	Zytopl.	+	+	+	+++	+	+	+	/	/	/
dTHP-1	Zellkern	+++	+	+++	++	+	+	+++	/	/	/
	Zytopl.	++	+	++	++	+	+	+	/	/	/
RLE-6NT	Zellkern	+++	++	+++	++	+	+++	+++	/	/	/
	Zytopl.	+	+	++	+++	+	+	+	/	/	/
Zytotoxizität											
A549		++	++	++	++	+	+	0	0	0	+
A549Co		++	++	++	++	+	+	+	0	0	+
RLE-6NT		+++	+++	+++	+++	++	++	+	0	0	+
AU											
A549		++	++	++	+++	0	++	0	0	0	0
A549Co		+++	+++	+++	+	+	0	0	0	0	0
RLE-6NT		++	0	+	++	+	++	++	0	0	0
MN-Test											
A549		+	+	+	+	++	++	+++	0	0	++

Als erster Schritt wurden die physikochemischen Eigenschaften der NM bestimmt, da diese einen wichtigen Einfluss auf die Toxikologie besitzen. Die Größe entscheidet unter anderem darüber, wie weit ein Partikel oder eine Faser in der Lunge vordringt und ob ein NM in eine Zelle aufgenommen werden kann. Zudem spielt die Löslichkeit eine entscheidende Rolle bei der Freisetzung potentiell toxischer Ionen oder der Ausbildung einer chronischen Entzündung aufgrund einer inhärenten Biopersistenz (Oberdörster *et al.*, 2005; Karlsson *et al.*, 2022).

Die Untersuchungen zeigten, dass sich die primären Durchmesser der NP, mit Ausnahme der Cu NP (55,2 nm), in einem sehr engen Bereich von 15,5-23,7 nm bewegen. Die metallbasierten NW besaßen Längen zwischen 6,3 und 10,6 µm und Breiten von 110 bis 300 nm, während die CNT mit 3,4 µm Länge und 62,8 nm Breite die kleinsten Fasern innerhalb der Arbeit darstellen. Dennoch kann es auch in diesem Längenbereich zur „frustrierten Phagozytose“ kommen (Murphy *et al.*, 2012). Darüber hinaus wurde die Löslichkeit in verschiedenen relevanten Flüssigkeiten, wie dem Zellkulturmedium und verschiedenen artifiziellen Körperflüssigkeiten bestimmt, wobei sich die Cu NM am leichtesten lösten (8-31 % im Zellkulturmedium, 51-71 % in lysosomaler Modellflüssigkeit), während die Ni NM eine geringe Löslichkeit aufwiesen und die Ag NM, CeO₂ NP und TiO₂ NP nahezu unlöslich waren. Entsprechend der Löslichkeit im Zellkulturmedium wurden auch die Konzentrationen für die Ionenkontrollen der Zellkulturexperimente gewählt. Die Bestimmung der Löslichkeit in lysosomaler Modellflüssigkeit (pH 4,5) diente der Abschätzung einer potentiellen Ionenfreisetzung innerhalb eines Lysosoms nach einer endozytotischen Aufnahme. Die Endozytose stellt den primären Aufnahmeweg dar, wobei die Aufnahme, je nach zugrundeliegendem Mechanismus, spezifisch oder unspezifisch abläuft. Möglicherweise verhilft den NM eine Art Mimikry-Effekt durch den Aufbau einer Proteinkorona zur erleichterten Aufnahme (AshaRani *et al.*, 2012). Durch die endozytotische Aufnahme umgehen die NM die zelluläre Regulation der Metallhomöostase, weshalb dieser Prozess auch als *trojan horse mechanism* bezeichnet wird. Die anschließende Ionenfreisetzung aus den Lysosomen kann zur Überladung der Zellen führen und gilt als eine der Hauptursache der Toxizität von metallbasierten NM (Limbach *et al.*, 2005; Limbach *et al.*, 2007).

Darüber hinaus stehen freie Metallionen im Verdacht, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu erzeugen und auf diese Weise oxidativen Stress hervorzurufen (Nel *et al.*, 2006). Dies trifft in erster Linie auf redox-aktive Metalle zu, aber auch andere Metallionen sind über indirekte Wirkmechanismen dazu in der Lage. Für eine detaillierte Untersuchung der NM sowie die Abgrenzung möglicher Partikel- bzw. Fasereffekte von Effekten, welche durch freie Metallionen ausgelöst werden, ist die Bestimmung der intrazellulären Ionenfreisetzung und -verteilung somit von großer Bedeutung. Die stärkste

Ionenfreisetzung konnte für die Nickel- und Kupfer-basierten NM beobachtet werden, wobei unter den Zelllinien die dTHP-1-Zellen häufig den höchsten Absolutgehalt an freien Ionen aufwiesen (Abbildung 31 in Anhang unter 8.2). Dies liegt an der erhöhten Phagozytoseaktivität, die zu einer höheren NM-Aufnahme führt. In der Bioverfügbarkeit spiegelte sich die bereits analysierte Löslichkeit der NM wider. Lediglich Ag NM führten trotz einer scheinbaren Unlöslichkeit in Modellflüssigkeiten zu intrazellulär verfügbaren Ionen. Der Grund hierfür ist die Bildung von nicht messbaren Sekundärpartikeln (Jiang *et al.*, 2015; Chung *et al.*, 2017).

Tabelle 22 Ergebnisübersicht über die Genexpressionsanalysen.

Die Daten wurden mittels Hochdurchsatz RT-qPCR erhoben und umfassen verschiedenen Gencluster. 0: kein Effekt. +, ++, +++: Effektstärke (Induktion). -, --, ---: Effektstärke (Repression). + / -: innerhalb des Clusters wurden Gene induziert und reprimiert. A549Co: Kokultivierung aus A549- und dTHP-1-Zellen.

	CuO NP	Cu NP	Cu NW	Ni NP	Ni NW	Ag NP	Ag NW	CeO ₂ NP	TiO ₂ NP	CNT
Oxidative Stressantwort										
A549	+++ / --	+++ / --	+++ / --	+	+	+	+	0	0	0
A549Co	+++ / --	+++ / --	+++ / --	0	0	0	++	0	0	+
RLE-6NT	++	+	++	+++	+++	++	+	0	0	0
Metallhomöostase										
A549	+++ / -	+++ / -	+++ / -	++	+	++	+++	0	0	0
A549Co	+++ / -	+++ / -	+++ / -	++	+	++	++	0	0	0
RLE-6NT	++	+	++	+++	+++	++	+	0	0	0
Inflammation										
A549	+++ / -	+++ / -	+++ / -	0	+	++	0	0	0	0
A549Co	+++ / -	+++ / -	+++ / -	++	+++	++	+++	0	0	++
RLE-6NT	++	++	++	+++	+++	++	0	0	0	++
Apoptose / Zellzyklus										
A549	--	--	--	0	0	0	0	0	0	0
A549Co	--	--	--	0	0	0	0	0	0	0
RLE-6NT	++ / -	+ / -	++ / -	+++	+++	+	+	0	0	+
DNA-Schadensantwort										
A549	++ / --	++ / --	++ / --	+	+	+	+	0	0	+
A549Co	++ / --	++ / --	++ / --	+	+	0	0	0	0	+
RLE-6NT	+	+	+	++	++	+	+	0	0	+

Die intrazelluläre Verteilung betreffend akkumulierten die Ionen innerhalb der Zellen im Falle der Kupfer- und Silbermaterialien im Zellkern, während die Nickelionen vermehrt im Zytoplasma zu finden waren. Da Kupfer genau wie Silber eine Thiol-Affinität besitzt, liegen womöglich im Zellkern vermehrt schwefelhaltige Komponenten vor, was die Einwanderung aus dem Zytoplasma erklären würde. Metallionen im Zellkern können mit der DNA oder mit Kernproteinen interagieren und auf diese Weise beeinträchtigen oder aber neue ROS bilden, die die DNA und andere Kernkomponenten schädigen.

Um auch einen Einblick in durch ROS ausgelösten oxidativen Stress und damit Wirkmechanismen wie Inflammation und DNA-Schäden (bis hin zur Apoptose) zu erhalten (AshaRani *et al.*, 2009; Ahamed, 2013), wurden die NM ebenfalls mittels der speziell angepassten Hochdurchsatz RT-qPCR sowie zweier Genotoxizitätstests untersucht. Verglichen mit den anderen Materialien führten die Cu NM in den humanen Zellsystemen zu den größten Veränderungen im Expressionsprofil, gefolgt von Ni NM und Ag NM. CeO₂ NP und TiO₂ NP verursachten keine relevanten Änderungen und die CNT übten nur geringfügigen Einfluss auf einzelne Gene aus. Cu NM, Ni NM und Ag NM induzierten besonders Gene, die auf freie Metallionen, oxidativen Stress und Inflammation hindeuteten und bestätigen somit den prognostizierten Mechanismus. Auffällig war, dass die genannten Materialien häufig die Expression derselben Gene veränderten, was auf eine ähnliche Wirkungsweise schließen lässt. Im Kontrast hierzu steht die Repression eines großen Gen-Bereichs durch die Cu NM, die aufgrund der erhobenen Daten nur schwer erklärt werden kann. Möglicherweise spielen hierbei zelluläre Prozesse wie die Seneszenz oder epigenetische Mechanismen eine Rolle (Chibber und Shanker, 2017; Collin *et al.*, 2018). Darüber hinaus kann eine solch hohe Anzahl an reprimierten Genen auch auf eine übergreifende Einschränkung der A549-Zellen im Zusammenhang mit Kupfer hindeuten. Tumorzelllinien weisen häufig einen veränderten Metabolismus auf, der sich bei den A549-Zellen unter anderem in einer dauerhaften Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf-2 äußert (Singh *et al.*, 2006). Für diese Theorie spricht zudem, dass die RLE-6TN-Zellen, die nicht aus malignem Gewebe stammen, diese Repression nicht aufweisen. Ein Vergleich mit den ebenfalls aus gesundem Gewebe hervorgegangenen BEAS-2B-Zellen wurde bereits an anderer Stelle durchgeführt und ergab ähnliche Resultate (Strauch *et al.*, 2017). Die RLE-6TN-Zellen zeigten eine Hochregulation unterschiedlichen Ausmaßes für nahezu aller Gencluster und entsprechen somit dem erwarteten Bild nach der Cu NM-Inkubation. Während in der Rattenzelllinie nur leichte Unterschiede zwischen den verschiedenen Kupfer-basierten NM, die ausschließlich die Inflammationsmarker betrafen, detektiert werden konnten, wurde in den humanen Zellkultursystemen kein Unterschied zwischen NP und NW

festgestellt. Dies betraf neben der Genexpression auch die beiden Genotoxizitätstests, weshalb für diese Gruppe kein spezieller Partikel- oder Faser-Effekt bestätigt werden kann. Vielmehr muss die Aufnahme und die folgende intrazelluläre Auflösung für diese Materialien ähnlich ablaufen. Auffällig ist hier zudem, dass die korrespondierende Ionenkontrolle (CuCl_2) in der Genexpression vergleichbare Effekte wie die NM hervorrief. In der Untersuchung der Genotoxizität konnte jedoch kein Effekt durch CuCl_2 beobachtet werden, weshalb die DNA-schädigenden Effekte allein durch die aufgenommenen NM hervorgerufen werden müssen und nicht etwa durch extrazelluläre gelöste Ionen. Dies bedeutet, dass die Aufnahme der NM und die anschließende intrazelluläre Auflösung notwendig sind, um genotoxische Effekte beobachten zu können.

Im Falle der Ni NM war bezüglich der Genexpressionsanalysen in der A549-Monokultur kein Unterschied zwischen den Materialien auszumachen. In der Kokultur hingegen konnte eine Induktion der inflammationsbezogenen Gene beobachtet werden, die für die NW deutlich stärker ausfiel als für die Ni NP. Dies zeigt den Einfluss der Makrophagen und verdeutlicht den Bedarf nach komplexeren *in vitro*-Modellen, die die Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Zelltypen zulassen und auf diese Weise die Realität besser abbilden. Die RLE-6TN-Zellen reagierten am stärksten auf die Inkubation mit Ni NM, wobei die Ni NP einen deutlicheren Einfluss besaßen. Dieser stärkere Effekt könnte mit der höheren Bioverfügbarkeit zusammenhängen. Insgesamt glichen sich die exprimierten Gene in großen Teilen jedoch, was für einen ähnlichen Wirkmechanismus von Ni NW und Ni NP spricht.

Für die Ag NM wurden ebenfalls die Gene in der A549-Kokultur stärker induziert, wobei hier zudem ein Fasereffekt durch die Ag NW zu erkennen war, da vor allem inflammatorische Gene vermehrt exprimiert wurden. Dies könnte auf die „frustrierte Phagozytose“ zurückzuführen sein, die durch Fasern dieser Länge durchaus ausgelöst werden kann (Murphy *et al.*, 2012). Neben den inflammationsbezogenen Genen wurde auch das Gen *SOD2* (Superoxiddismutase 2) induziert, dessen Signalweg mit den inflammatorischen Markern verknüpft ist (Yi *et al.*, 2017). Dagegen wurden andere oxidative Stressmarker wie *HMOX1* in der Kokultur im Vergleich zur Monokultur nicht verstärkt induziert. Dies spricht dafür, dass die Inflammation nicht durch oxidativen Stress ausgelöst wurde, sondern bestärkt den Verdacht, dass die „frustrierte Phagozytose“ ursächlich für die Inflammation ist. In den RLE-6TN-Zellen wurden vergleichsweise wenige Gene durch die Ag NM modifiziert, wobei die Ag NP einen deutlicheren Einfluss hatten. Diese können von den Rattenepithelzellen wahrscheinlich leichter aufgenommen werden, was sich auch in den Bioverfügbarkeitsanalysen zeigte, und führen dementsprechend zu einem stärkeren Effekt.

Unter den unlöslichen Materialien zeigten ausschließlich die CNT eine relevante Änderung der Genexpression in einer sehr geringen Anzahl von Genen. Diese betrafen in den humanen Zellsystemen vor allem Inflammationsmarker, die ausschließlich in der Kokultur vermehrt exprimiert wurden, was ebenfalls auf zellulären Stress der Makrophagen hinweist, der möglicherweise mit der „frustrierten Phagozytose“ im Zusammenhang steht. In den Rattenepithelzellen wurden einzelne Gene induziert, die mit Inflammation, Zellzyklusarrest und der Apoptose assoziiert werden.

Die Genexpressionsanalyse bestätigte somit insgesamt den prognostizierten Wirkmechanismus der ausgewählten NM mit gewissen Material- und Speziesunterschieden. Im Wesentlichen wurden Gene der Metallhomöostase, der oxidativen Stressantwort und der inflammatorischen Antwort induziert. Durch die Kokultur-Experimente konnte zudem der direkte Einfluss der Makrophagen beobachtet werden, was die Relevanz eines solchen *in vitro*-Kultivierungsmodells hervorhebt. Ein Speziesunterschied zwischen Human- und Rattenzellen zeigte sich darin, dass die menschlichen Zellen am stärksten auf Cu NM reagierten, während die Rattenzellen die deutlichste Reaktion im Zusammenhang mit Ni NM zeigten.

Zusätzliche Hinweise auf die toxikologische Relevanz der NM bietet die Untersuchung des genotoxischen Potentials. Hierfür wurde die alkalische Entwindung (AU) genutzt, mit deren Hilfe die Induktion von DNA-Strangbrüchen (DNA-SB) detektiert werden kann. Das größte genotoxische Potential zeigten dabei die Cu NM, die SB in den verwendeten Kulturen dosisabhängig induzierten, während sich die Anzahl an SB in der A549-Kokultur im Vergleich zur Monokultur auf das Doppelte bis Dreifache beliefen. Dies liegt möglicherweise an einer höheren Empfindlichkeit der dTHP-1-Makrophagen, oder aber an der Induktion einer sekundären Genotoxizität in den A549-Zellen, die von Makrophagen über die Freisetzung von Zytokinen ausgelöst wurde (Vallabani und Karlsson, 2022). Im Gegensatz dazu wurden durch Ni NP insbesondere in der A549-Monokultur dosisabhängig DNA-SB in statistisch signifikantem Ausmaß induziert, was die Ergebnisse der Bioverfügbarkeitsanalyse widerspiegelt. Für Ag NM konnten Ergebnisse ähnlich zu den Ni NM detektiert werden, deren Ursache wahrscheinlich ebenfalls in einer intrazellulären Ionenfreisetzung und dem daraus resultierenden oxidativen Stress liegt. Die unlöslichen Materialien führten zu keiner Induktion von DNA-SB.

Um neben klastogenen Wirkmechanismen auch aneugene nachzuweisen, wurde der Mikrokerneltest (MN-Test) genutzt. Die Detektion von MN nach der Exposition mit Cu NM lieferte ähnliche Ergebnisse wie die AU während sich die Resultate der beiden Assays für einige andere Materialien unterschieden. Besonders die faserförmigen NM induzierten häufiger MN, während sie in der AU

zum Teil kaum Effekte zeigten. Dies könnte an einem aneugenem Mechanismus liegen, der für verschiedene Nanofasern bereits mehrfach beobachtet werden konnte (Muller *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2019).

Zusammenfassend beruht die Toxizität der Cu NM ausschließlich auf den intrazellulär freigesetzten Ionen über den sog. *trojan horse mechanism*, der auf deren Löslichkeit im sauren Milieu beruht. Für alle verwendeten Cu NM konnte eine schnelle Auflösung detektiert werden, weshalb in den durchgeführten Testsystemen nahezu keine Unterschiede zwischen den Materialien beobachtet werden konnten. Die Ni NM wirken ebenfalls vor allem über die freigesetzten Ionen toxisch, jedoch ist auch die direkte Interaktion der NM mit Zellbestandteilen denkbar. Dies zeigte sich in der signifikanten Induktion von MN bei gleichzeitiger Abwesenheit von DNA-SB und lässt somit auf einen Fasereffekt schließen. Die Ag NM bieten in Bezug auf die Genotoxizität ein ganz ähnliches Bild wie die Ni NM, weisen jedoch möglicherweise durch die ausgeprägte Thiol-Affinität einen anderen Wirkmechanismus auf. Für die Ag NW sowie die CNT konnte in den Analysen ein wahrscheinlich aneugener Wirkmechanismus beobachtet werden, der für Nanofasern schon mehrmals gezeigt werden konnte (Muller *et al.*, 2008; Ventura *et al.*, 2020). Demgegenüber konnten für CeO₂ NP und TiO₂ NP in den durchgeführten Studien keine adversen Effekte detektiert werden.

Hinsichtlich eines direkten oder indirekten genotoxischen Wirkmechanismus sind generell vier Wege möglich. Der erste zu nennende Mechanismus tritt bei redox-aktiven MN in Erscheinung, die in einer Fenton-ähnlichen Reaktion ROS induzieren und so die DNA indirekt schädigen können. Der zweite Weg ist für biopersistente Materialien relevant, die durch ihre andauernde Anwesenheit Entzündungen und in der Folge oxidativen Stress hervorrufen. Die NM der dritten Kategorie schädigen über die direkte Interaktion mit der DNA oder anderen Zellbestandteilen wie den Mitochondrien und verursachen hierdurch DNA-Läsionen oder führen zur ROS-Freisetzung. ROS und oxidativer Stress gelten als Hauptquelle für spontane DNA-Schäden, die mutagene Strukturen wie 8-oxo-Guanin oder Einzelstrangbrüche hervorrufen. Tritt dies gehäuft auf, kann es auch zu einem Doppelstrangbruch kommen, der als sehr schwerwiegende DNA-Schädigung gilt. Eine vierte Möglichkeit ergibt sich über die Inhibierung von DNA-Reparaturmechanismen sowohl durch freigesetzte Metallionen als auch durch unlösliche NM (AshaRani *et al.*, 2009; Petersen und Nelson, 2010; Carriere *et al.*, 2017).

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Materialien lassen sich vorwiegend in die erste Gruppe der redox-aktiven Materialien einordnen. Hierzu zählen in erster Linie die Cu NM, Ni NM, aber auch die Ag NM würden vorwiegend in diese erste Kategorie fallen, da sie nicht biopersistent sind und die

Ionen über die Beeinträchtigung von Proteinen ROS induzieren. Jedoch bergen insbesondere die Ag NW und Ni NW auch Eigenschaften der dritten Kategorie, da sie eine Faser-spezifische Toxizität aufwiesen und dadurch in der Lage sind, aneugene Effekte hervorzurufen. Obwohl CeO₂ NP und TiO₂ NP eine Redox- oder Photoaktivität aufweisen, konnten in der vorliegenden Arbeit keine Hinweise auf adverse Effekte gefunden werden. Daher würden sie, basierend auf den vorliegenden Ergebnissen, den zweiten Mechanismus der biopersistenten Materialien vertreten. Die CNT dagegen wären sowohl in der zweiten als auch in der dritten Kategorie einzuordnen, da sie biopersistent sind sowie direkt über die Interaktion mit Zellbestandteilen toxisch wirken.

Basierend auf diesen Einordnungen konnten zwei Hauptmechanismen für die toxische Wirkung der betrachteten NM ausgemacht werden, die in den folgenden Abbildungen (Abbildung 28 und Abbildung 29) veranschaulicht wurden. In beiden Fällen werden die NM zunächst über die Endozytose in die Zellen aufgenommen und zu den Lysosomen transportiert. Dort beginnen sich die beiden Wirkmechanismen zu unterscheiden. Ersterer (Abbildung 28) basiert auf der Löslichkeit der NM im sauren Milieu, die zu einer massiven Ionenfreisetzung führt. Die Ionen sowie noch vorhandene NM gelangen ins Zytoplasma wo sie, je nach Ionenspezies, verschiedene Targets angreifen.

Über eine inhärente Redox-Aktivität oder über andere Mechanismen werden in der Folge ROS erzeugt, die wiederum die DNA und andere Zellbestandteile angreifen können. Nehmen die Beeinträchtigungen ein gewisses Ausmaß an, wird die Zellen den Zellzyklus stoppen und versuchen, die Schäden zu beheben. Sollte dies nicht gelingen, wird die Apoptose eingeleitet.

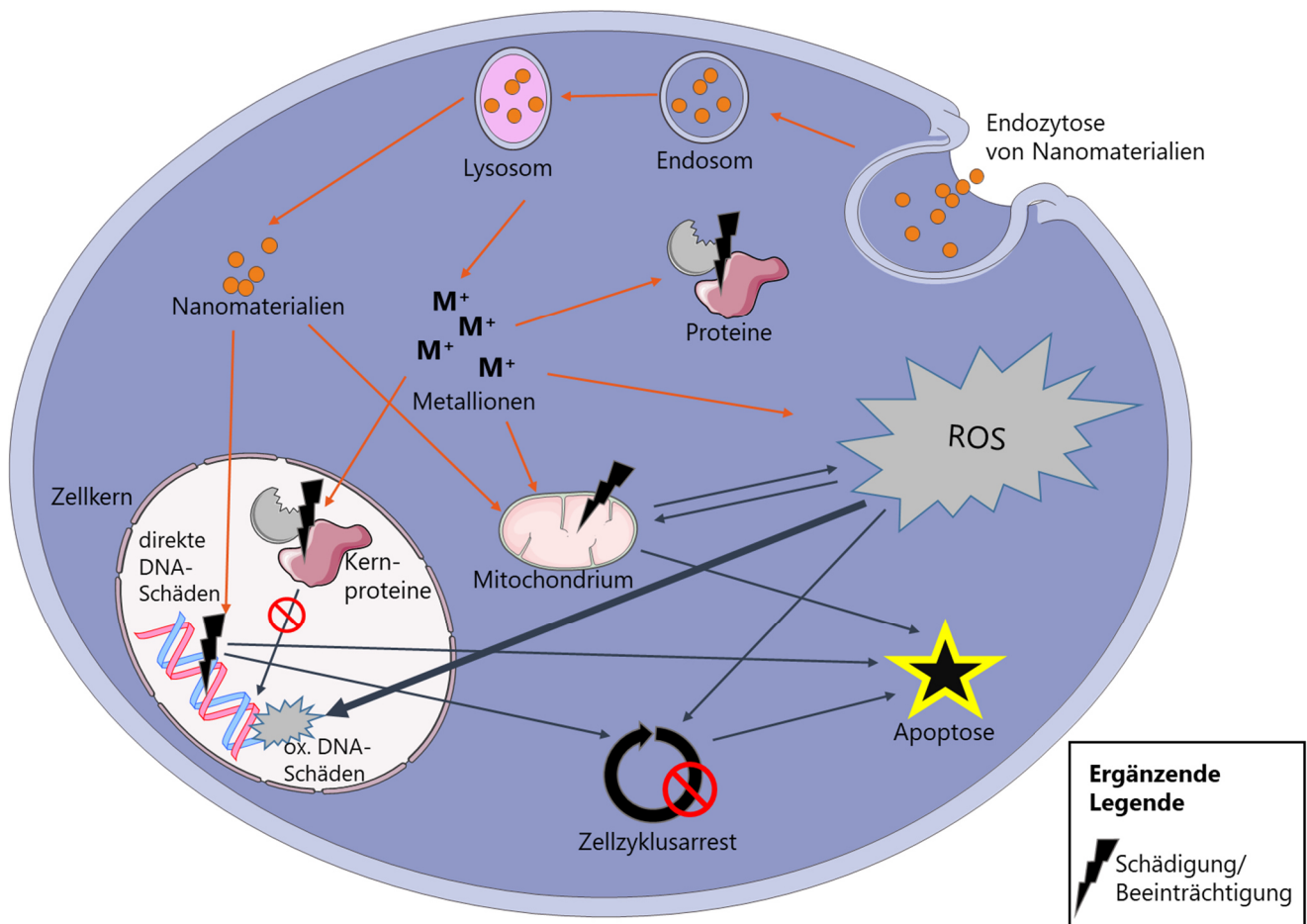


Abbildung 28 Schematische Darstellung des toxischen Wirkmechanismus von lysosomal löslichen und redox-aktiven Nanomaterialien.

Die Nanomaterialien werden über die Endozytose aufgenommen, lösen sich im Lysosom durch den niedrigen pH teilweise auf und gelangen in das Zytoplasma. Je nach Metallspezies sind die respektiven Metallionen (M^+) in der Lage, direkt oder indirekt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu generieren, mit Proteinen zu interagieren oder Zellbestandteile anzugreifen. Wird die mitochondriale Membran geschädigt können ebenfalls ROS austreten. Bei einer schwerwiegenden Schädigung der Mitochondrien tritt Cytochrom C aus und die Apoptose wird eingeleitet. Wird die DNA geschädigt, kommt es zu einem Zellzyklusarrest, der der Reparatur dient. Die Beeinträchtigung von Kernproteinen sowie DNA-Reparaturproteinen kann sich dabei negativ auswirken. Sind die Schäden zu gravierend, wird ebenfalls die Apoptose eingeleitet. Der Weg der NM und derer Ionen ist mit orangen Pfeilen dargestellt. Die aus den Interaktionen resultierenden Konsequenzen mit blauen Pfeilen.

Der zweite Mechanismus (Abbildung 29) verläuft nicht über eine Freisetzung von Ionen, sondern über die physische Schädigung von verschiedenen Zellbestandteilen durch die NM. Empfindliche Targets sind hierbei die Mitochondrien sowie die DNA und DNA-assoziierte Proteine. Vor allem Fasern stehen im Verdacht, sich an die DNA anzulagern und dadurch die Mitose zu stören (Zimmerman *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2019). Die direkte oder indirekte Schädigung der DNA kann, wie auch im zuvor beschriebenen Mechanismus, zum Zellzyklusarrest und unter Umständen zur Apoptose führen. Ein Angriff auf die Mitochondrien kann außerdem die Durchlässigkeit der

mitochondrialen Membran zur Folge haben, was in der Freisetzung von Cytochrom C resultiert, woraufhin unmittelbar die Apoptose eingeleitet wird.

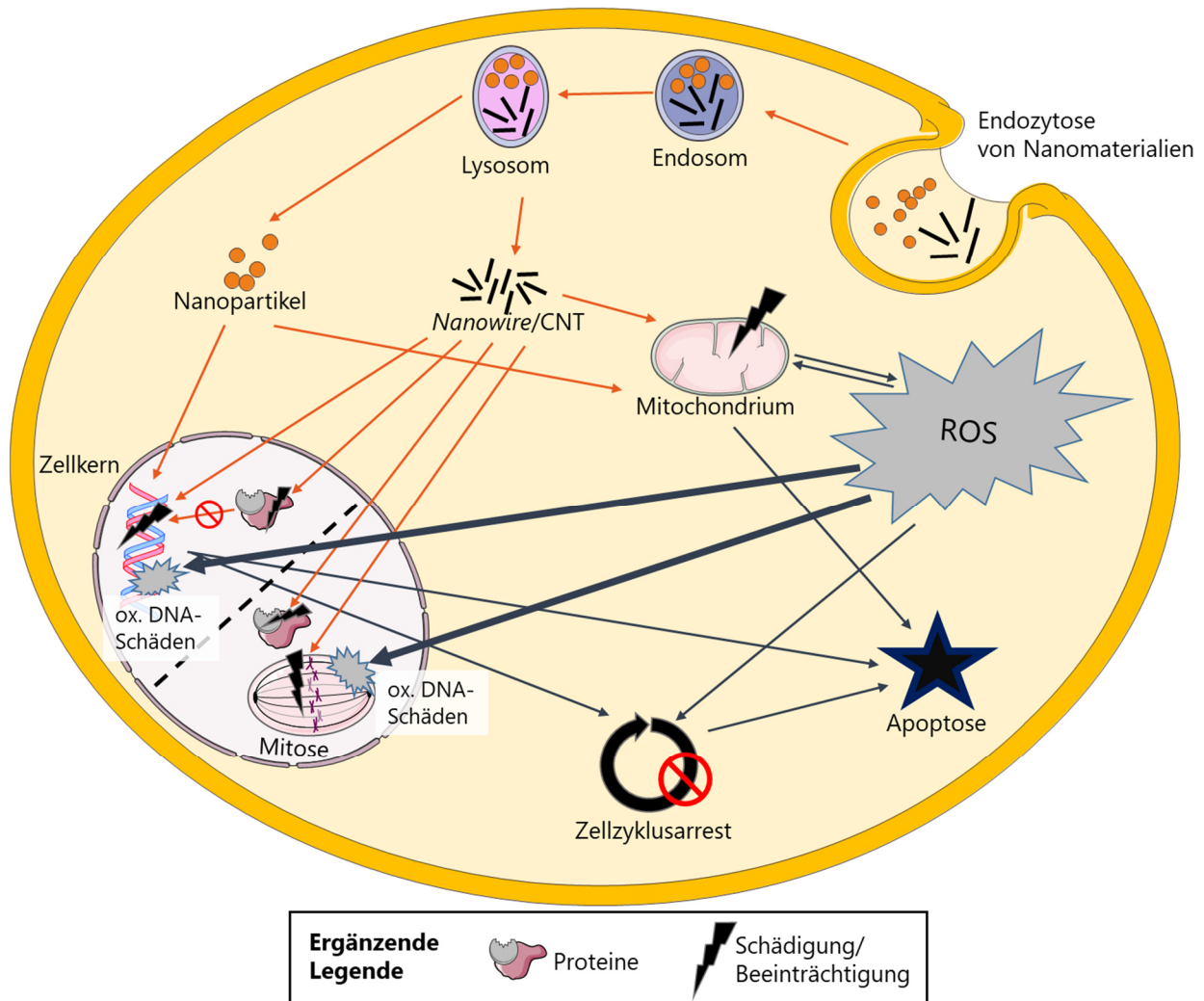


Abbildung 29 Schematische Darstellung des toxischen Wirkmechanismus von unlöslichen sowie faserförmigen Nanomaterialien.

Die Aufnahme der Nanomaterialien (NM) erfolgt über die Endozytose. Nach der Freisetzung in das Zytoplasma sind die Haupttargets die Mitochondrien sowie die DNA. Die NM sind in der Lage direkt mit der DNA zu interagieren und sie auf diese Weise zu beeinträchtigen und sind zudem in der Lage die Mitose zu stören. Schädigungen der DNA können zum Zellzyklusarrest führen, der bei irreparablen Schäden in die Apoptose übergeht. Wird die mitochondriale Membran geschädigt, können reaktive Sauerstoffspezies (ROS) austreten, die ebenfalls die DNA und weitere Zellbestandteile angreifen können. Darüber hinaus kann aus den Mitochondrien auch Cytochrom C freigesetzt werden, wodurch unmittelbar die Apoptose eingeleitet wird. Der Weg der NM ist mit orangenen Pfeilen dargestellt. Die aus den Interaktionen resultierenden Konsequenzen mit blauen Pfeilen.

In den Abbildungen nicht thematisiert ist die an anderer Stelle bereits erwähnte zusätzliche Induktion einer inflammatorischen Antwort, die über redox-aktive Transkriptionsfaktoren eng mit oxidativem Stress verknüpft ist. Diese wurde in den durchgeführten Experimenten durch die Anwesenheit von Makrophagen in der Kokultur noch weiter verstärkt. Makrophagen sind im Aufbau einer

Immunantwort deutlich potenter als Epithelzellen und reagieren zudem auf einige Metalle empfindlicher. Sind faserförmige NM außerdem zu lang für eine vollständige Aufnahme, wird von der sog. „frustrierten Phagozytose“ gesprochen. Dabei kann die Membran um das Phagosom nicht geschlossen werden, wodurch Zellinhalt austreten kann. Dieser Vorgang ist schematisch in Abbildung 30 dargestellt. Benachbarte Zellen erkennen über Rezeptoren auf der Außenseite diese Zellbestandteile und reagieren ihrerseits mit Stressreaktionen und Inflammation. Darüber hinaus ist der Makrophage selbst durch den Zustand der unvollständigen Phagozytose gestresst und schüttet ebenfalls Stress- und Inflammationsmarker aus.

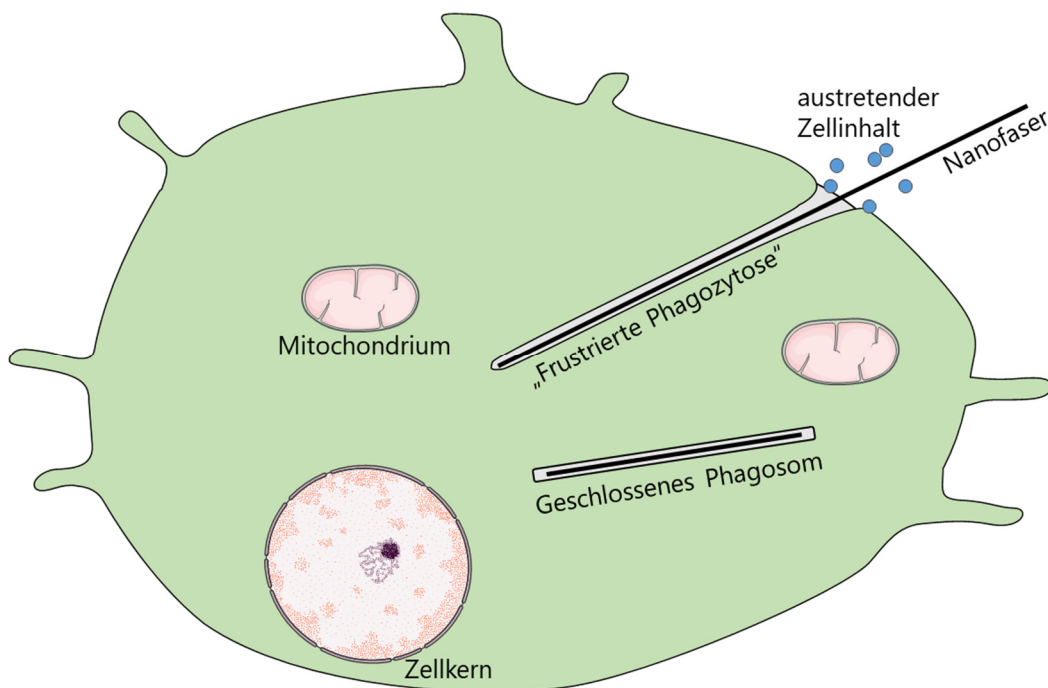


Abbildung 30 Schematische Darstellung der Phagozytose einer kurzen Faser, die vollständig aufgenommen werden konnte, sowie einer langen Faser, die eine sog. „frustrierte Phagozytose“ auslöst (Modifiziert nach Schinwald und Donaldson, 2012).

Kurze Fasern können durch Makrophagen vollständig phagozytiert werden während lange Fasern nicht komplett umschlossen werden können. Durch die geöffnete Membran kann Zellinhalt (blaue Kugeln) austreten.

Das Verständnis der Toxikologie von NM ist ein wichtiges Anliegen, um eine potentielle Gefährdung für den Menschen ableiten zu können. Hierfür werden neben *in vitro*- und Computer-basierten Methoden auch ganze Organismen, vorzugsweise Nagetiere, eingesetzt (Burden *et al.*, 2017). Somit sollte im weiteren Verlauf der Arbeit anhand der aus den *in vitro* Experimenten erhaltenen Ergebnisse die Vergleichbarkeit von humanen Zellkulturen und Zellen der Ratte untersucht werden, um zusammen mit weiteren Ergebnissen aus dem Projekt *MetalSafety*, die den direkten Vergleich mit *in vivo* und *ex vivo* Experimenten im Fokus haben, potentiell einen Beitrag zur Reduzierung von Tierversuchen zu leisten. Dieses Vorgehen entspricht dem 3R-Konzept, das wiederum einen Rahmen

für den Schutz von Versuchstieren vorgibt, der als kurzfristige Maßnahme die Weiterentwicklung von Experimenten vorsieht, sodass die Zahl an Tieren reduziert werden kann, während langfristig die Forschung auf einen vollständigen und adäquaten Ersatz hinarbeiten soll (Burden *et al.*, 2017). In diesem Kontext wurde für die vorliegende Arbeit neben den humanen Zelllinien A549 und dTHP-1 die Lungenepithelzelllinie RLE-6TN ausgewählt, die aus dem Alveolarbereich einer männlichen Ratte stammt. Diese weist, genau wie die A549-Zellen, Charakteristiken von Alveolarepithelzellen vom Typ II auf, jedoch mit dem Unterschied, dass die RLE-6TN-Zellen keinem tumorösem Gewebe entstammen, sondern spontan immortalisiertem (Driscoll *et al.*, 1995).

Der Vergleich der beiden Zelllinien ergab insgesamt in nahezu allen durchgeführten Experimenten eine größere Empfindlichkeit der Rattenzellen. Auffällig ist dabei, dass stärkere Effekte zumeist trotz einer ähnlichen Bioverfügbarkeit auftraten. Da die NM größtenteils über die Induktion von ROS und oxidativem Stress toxisch wirken, könnte eine schwächere anti-oxidative Abwehr der Rattenzellen einer der Gründe hierfür sein. Die oxidative Stressantwort umfasst eine Reihe von verschiedenen Enzymen und Molekülen, die unter anderem durch redox-aktive Transkriptionsfaktoren induziert werden. Eine Studie von Karkossa *et al.* demonstrierte mithilfe einer Proteomics-Analyse, dass in RLE-6TN-Zellen bei oxidativem Stress vorwiegend Proteine induziert werden, die mit dem Transkriptionsfaktor Nrf-2 in Zusammenhang stehen, während Proteine, die über NF- κ B, AP-1 und zytotoxische Mechanismen induziert werden, nicht detektiert wurden (Karkossa *et al.*, 2021). Dies könnte bedeuten, dass RLE-6TN-Zellen die oxidative Abwehr erst aufbauen müssen, während in A549-Zellen durch die Daueraktivierung von Nrf-2 eine permanente oxidative Stressantwort aufweisen. Jedoch kann auch eine Reihe von anderen Faktoren für die beobachteten Unterschiede verantwortlich sein (Wang *et al.*, 2014a). Um neue Erkenntnisse zur Übertragbarkeit der Ergebnisse verschiedener Untersuchungsmethoden (*in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*) zu erhalten (und so potentiell zur Verminderung möglicher Tierversuche beizutragen), sollen in zukünftigen Schritten die gefundenen Effekte, wie oben bereits erwähnt, auch *ex vivo* mittels Lungenschnitten von Mensch und Ratte sowie *in vivo* in Ratten überprüft werden.

Zusammenfassend stellt die vorliegende Dissertation die Relevanz der Nanotoxikologie in pulmonalen Systemen mit dem Fokus auf metallbasierte NM in den Vordergrund. Die Gegenüberstellung von verschiedenen partikulären und faserförmigen Materialien, die sowohl in der Industrie als auch in Produkten des täglichen Bedarfs eine breite Anwendung finden, zeigte eindrucksvoll deren Gefahrenpotential für die menschliche Gesundheit auf. Die im Sauren löslichen NM aus Kupfer, Nickel und Silber zeigten eine intrazelluläre Bioverfügbarkeit, die sehr wahrscheinlich auf den *trojan horse mechanism* zurückgeführt werden kann, und führten in der Folge zu zytotoxischen Effekten. In den Genexpressionsanalysen konnte zudem eine umfassende oxidative Stressantwort sowie inflammatorische Reaktionen beobachtet werden. Diese waren vor allem auf die freigesetzten Ionen zurückzuführen. Im Falle der eingesetzten NW und CNT waren im Besonderen die Einflüsse der Makrophagen-ähnlichen Zellen in einer Kokultivierung eindeutig zu beobachten, was die Wichtigkeit des Miteinbeziehens von Zell-Zell-Kommunikationen im Zuge von *in vitro*-Experimenten unterstreicht. Diese ist essentiell, um Wirkmechanismen in der Zellkultur umfassend erfassen, untersuchen und verstehen zu können. Darüber hinaus konnte über die Anwendung verschiedener Genotoxizitätstests die DNA-schädigende Wirkung sowohl durch die Induktion von DNA-Strangbrüchen als auch von Mikrokernen detektiert werden. Hierbei zeigten faserförmige NM einen Effekt im MN-Test, was auf einen aneugenen Wirkmechanismus schließen lässt. Im Gegensatz zu den löslichen NM konnten für die beiden unlöslichen Materialien CeO₂ NP und TiO₂ NP keine adversen Effekte beobachtet werden. Somit konnte sowohl ein Einfluss der Löslichkeit der NM als auch ihrer Form auf die Toxizität aufgezeigt werden. Die submersen *in vitro*-Versuche im Rahmen dieser Arbeit bilden damit zusammen mit den ALI (*air liquid interface*)-Experimenten, die von M.Sc. Johanna Wall durchgeführt wurden, eine solide Basis für die Evaluierung und Gruppierung der untersuchten NM und können so im Zusammenhang mit *MetalSafety* zur Neubewertung gültiger Grenzwerte und zur Ableitung von Sicherheitsfaktoren beitragen. Durch die Verwendung von humanen Zellkulturen und einer Zelllinie aus der Ratte konnte schlussendlich zudem in Anlehnung an das 3R-Prinzip eine wichtige Basis für den Vergleich mit *ex vivo* und *in vivo*-Experimenten geschaffen werden.

7 Literaturverzeichnis

- Ahamed, M. (2013). Silica nanoparticles-induced cytotoxicity, oxidative stress and apoptosis in cultured A431 and A549 cells. *Hum Exp Toxicol* 32: 186–195.
- Ahamed, M., Siddiqui, M.A., Akhtar, M.J., Ahmad, I., Pant, A.B. und Alhadlaq, H.A. (2010). Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in human lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 396: 578–583.
- Ahmad, J., Alhadlaq, H.A., Siddiqui, M.A., Saquib, Q., Al-Khedhairi, A.A., Musarrat, J. und Ahamed, M. (2015). Concentration-dependent induction of reactive oxygen species, cell cycle arrest and apoptosis in human liver cells after nickel nanoparticles exposure. *Environ Toxicol* 30: 137–148.
- Åkerlund, E., Cappellini, F., Di Bucchianico, S., Islam, S., Skoglund, S., Derr, R., Odnevall Wallinder, I., Hendriks, G. und Karlsson, H.L. (2018). Genotoxic and mutagenic properties of Ni and NiO nanoparticles investigated by comet assay, γ -H2AX staining, Hprt mutation assay and ToxTracker reporter cell lines. *Environ Mol Mutagen* 59: 211–222.
- Alam, J. und Cook, J.L. (2007). How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene? *Am J Respir Cell Mol Biol* 36: 166–174.
- Allegri, M., Bianchi, M.G., Chiu, M., Varet, J., Costa, A.L., Ortelli, S., Blosi, M., Bussolati, O., Poland, C.A. und Bergamaschi, E. (2016). Shape-related toxicity of titanium dioxide nanofibres. *PLoS One* 11: e0151365.
- Ameh, T. und Sayes, C.M. (2019). The potential exposure and hazards of copper nanoparticles: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 71: 103220.
- Andrew, A.S., Warren, A.J., Barchowsky, A., Temple, K.A., Klei, L., Soucy, N.V., O'Hara, K.A. und Hamilton, J.W. (2003). Genomic and proteomic profiling of responses to toxic metals in human lung cells. *Environ Health Perspect* 111: 825–835.
- AshaRani, P.V., Low Kah Mun, G., Hande, M.P. und Valiyaveetil, S. (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* 3: 279–290.
- AshaRani, P.V., Sethu, S., Lim, H.K., Balaji, G., Valiyaveetil, S. und Hande, M.P. (2012). Differential regulation of intracellular factors mediating cell cycle, DNA repair and inflammation following exposure to silver nanoparticles in human cells. *Genome Integr* 3: 2.
- Avlasevich, S., Bryce, S., Boeck, M. de, Elhajouji, A., van Goethem, F., Lynch, A., Nicolette, J., Shi, J. und Dertinger, S. (2011). Flow cytometric analysis of micronuclei in mammalian cell cultures: past, present and future. *Mutagenesis* 26: 147–152.
- Avlasevich, S.L., Bryce, S.M., Cairns, S.E. und Dertinger, S.D. (2006). *In vitro* micronucleus scoring by flow cytometry: differential staining of micronuclei versus apoptotic and necrotic chromatin enhances assay reliability. *Environ Mol Mutagen* 47: 56–66.
- Behrens, A., Sibilina, M. und Wagner, E.F. (1999). Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat Genet* 21: 326–329.
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *J Control Release* 235: 337–351.
- Bissonnette, E.Y., Lauzon-Joset, J.-F., Debley, J.S. und Ziegler, S.F. (2020). Cross-talk between alveolar macrophages and lung epithelial cells is essential to maintain lung homeostasis. *Front Immunol* 11: 583042.
- Bobyk, L., Tarantini, A., Beal, D., Veronesi, G., Kieffer, I., Motellier, S., Valsami-Jones, E., Lynch, I., Jouneau, P.-H., Pernet-Gallay, K., Aude-Garcia, C., Sauvaigo, S., Douki, T., Rabilloud, T. und

- Carriere, M. (2021). Toxicity and chemical transformation of silver nanoparticles in A549 lung cells: dose-rate-dependent genotoxic impact. *Environ. Sci.: Nano* 8: 806–821.
- Bourdonnay, E., Morzadec, C., Fardel, O. und Vernhet, L. (2009). Redox-sensitive regulation of gene expression in human primary macrophages exposed to inorganic arsenic. *J Cell Biochem* 107: 537–547.
- Bryce, S.M., Avlasevich, S.L., Bemis, J.C., Tate, M., Walmsley, R.M., Saad, F., van Dijck, K., Boeck, M. de, van Goethem, F., Lukamowicz-Rajska, M., Elhajouji, A. und Dertinger, S.D. (2013). Flow cytometric 96-well microplate-based *in vitro* micronucleus assay with human TK6 cells: protocol optimization and transferability assessment. *Environ Mol Mutagen* 54: 180–194.
- Burden, N., Aschberger, K., Chaudhry, Q., Clift, M.J., Doak, S.H., Fowler, P., Johnston, H., Landsiedel, R., Rowland, J. und Stone, V. (2017). The 3Rs as a framework to support a 21st century approach for nanosafety assessment. *Nano Today* 12: 10–13.
- Byrne, F., Prina-Mello, A., Whelan, A., Mohamed, B.M., Davies, A., Gun'ko, Y.K., Coey, J. und Volkov, Y. (2009). High content analysis of the biocompatibility of nickel nanowires. *J Magn Mater* 321: 1341–1345.
- Cai, J.H., Deng, S., Kumpf, S.W., Lee, P.A., Zagouras, P., Ryan, A. und Gallagher, D.S. (2007). Validation of rat reference genes for improved quantitative gene expression analysis using low density arrays. *BioTechniques* 42: 503–512.
- Cameron, K.S., Buchner, V. und Tchounwou, P.B. (2011). Exploring the molecular mechanisms of nickel-induced genotoxicity and carcinogenicity: a literature review. *Rev Environ Health* 26: 81–92.
- Capasso, L., Camatini, M. und Gualtieri, M. (2014). Nickel oxide nanoparticles induce inflammation and genotoxic effect in lung epithelial cells. *Toxicol Lett* 226: 28–34.
- Cappellini, F., Di Bucchianico, S., Karri, V., Latvala, S., Malmlöf, M., Kippler, M., Elihn, K., Hedberg, J., Odnevall Wallinder, I., Gerde, P. und Karlsson, H.L. (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.
- Carriere, M., Sauvaigo, S., Douki, T. und Ravanat, J.-L. (2017). Impact of nanoparticles on DNA repair processes: current knowledge and working hypotheses. *Mutagenesis* 32: 203–213.
- Cervena, T., Rossnerova, A., Zavodna, T., Sikorova, J., Vrbova, K., Milcova, A., Topinka, J. und Rossner, P. (2021). Testing strategies of the *in vitro* micronucleus assay for the genotoxicity assessment of nanomaterials in BEAS-2B cells. *Nanomaterials* 11.
- Charehsaz, M., Coskun, S., Unalan, H.E., Reis, R., Helvacioğlu, S., Giri, A.K. und Aydin, A. (2017). Genotoxicity study of high aspect ratio silver nanowires. *Toxicol Environ Chem* 99: 837–847.
- Chen, S., Goode, A.E., Sweeney, S., Theodorou, I.G., Thorley, A.J., Ruenraroengsak, P., Chang, Y., Gow, A., Schwander, S., Skepper, J., Zhang, J.J., Shaffer, M.S., Chung, K.F., Tetley, T.D., Ryan, M.P. und Porter, A.E. (2013). Sulfidation of silver nanowires inside human alveolar epithelial cells: a potential detoxification mechanism. *Nanoscale* 5: 9839–9847.
- Chibber, S. und Shanker, R. (2017). Can CuO nanoparticles lead to epigenetic regulation of antioxidant enzyme system? *J Appl Toxicol* 37: 84–91.
- Cho, W.-S., Duffin, R., Poland, C.A., Duschl, A., Oostingh, G.J., Macnee, W., Bradley, M., Megson, I.L. und Donaldson, K. (2012a). Differential pro-inflammatory effects of metal oxide nanoparticles and their soluble ions *in vitro* and *in vivo*; zinc and copper nanoparticles, but not their ions, recruit eosinophils to the lungs. *Nanotoxicology* 6: 22–35.

- Cho, W.-S., Duffin, R., Poland, C.A., Howie, S.E.M., Macnee, W., Bradley, M., Megson, I.L. und Donaldson, K. (2010). Metal oxide nanoparticles induce unique inflammatory footprints in the lung: important implications for nanoparticle testing. *Environ Health Perspect* 118: 1699–1706.
- Cho, W.-S., Duffin, R., Thielbeer, F., Bradley, M., Megson, I.L., Macnee, W., Poland, C.A., Tran, C.L. und Donaldson, K. (2012b). Zeta potential and solubility to toxic ions as mechanisms of lung inflammation caused by metal/metal oxide nanoparticles. *Toxicol Sci* 126: 469–477.
- Chortarea, S., Zerimariam, F., Barosova, H., Septiadi, D., Clift, M.J., Petri-Fink, A. und Rothen-Rutishauser, B. (2019). Profibrotic activity of multiwalled carbon nanotubes upon prolonged exposures in different human lung cell types. *Appl In Vitro Toxicol* 5: 47–61.
- Chung, K.F., Seiffert, J., Chen, S., Theodorou, I.G., Goode, A.E., Leo, B.F., McGilvery, C.M., Hussain, F., Wiegman, C., Rossios, C., Zhu, J., Gong, J., Tariq, F., Yufit, V., Monteith, A.J., Hashimoto, T., Skepper, J.N., Ryan, M.P., Zhang, J., Tetley, T.D. und Porter, A.E. (2017). Inactivation, clearance, and functional effects of lung-instilled short and long silver nanowires in rats. *ACS Nano* 11: 2652–2664.
- Collin, G., Huna, A., Warnier, M., Flaman, J.-M. und Bernard, D. (2018). Transcriptional repression of DNA repair genes is a hallmark and a cause of cellular senescence. *Cell Death Dis* 9: 259.
- Comero, S., Klein, C., Stahlmecke, B., Romazanov, J., Kuhlbusch, T., van Doren, E., Wick, P., Locoro, G., Koerdel, W., Gawlik, B., Mast, J., Krug, H., Hund-Rinke, K., Friedrichs, S., Maier, G., Werner, J. und Linsinger, T. (2011). NM-300 silver characterisation, stability, homogeneity.
- Conn, C.W., Hennigan, R.F., Dai, W., Sanchez, Y. und Stambrook, P.J. (2000). Incomplete cytokinesis and induction of apoptosis by overexpression of the mammalian polo-like kinase, Plk3. *Cancer Res* 60: 6826–6831.
- Contreras, M.F., Sougrat, R., Zaher, A., Ravasi, T. und Kosel, J. (2015). Non-chemotoxic induction of cancer cell death using magnetic nanowires. *Int J Nanomedicine* 10: 2141–2153.
- Crouch, S., Kozlowski, R., Slater, K.J. und Fletcher, J. (1993). The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods* 160: 81–88.
- Di Ianni, E., Erdem, J.S., Møller, P., Sahlgren, N.M., Poulsen, S.S., Knudsen, K.B., Zienolddiny, S., Saber, A.T., Wallin, H., Vogel, U. und Jacobsen, N.R. (2021). *In vitro-in vivo* correlations of pulmonary inflammogenicity and genotoxicity of MWCNT. *Part Fibre Toxicol* 18: 25.
- Donaldson, K., Murphy, F., Schinwald, A., Duffin, R. und Poland, C.A. (2011). Identifying the pulmonary hazard of high aspect ratio nanoparticles to enable their safety-by-design. *Nanomedicine (Lond)* 6: 143–156.
- Donaldson, K. und Poland, C.A. (2012). Inhaled nanoparticles and lung cancer - what we can learn from conventional particle toxicology. *Swiss Med Wkly* 142: w13547.
- Driscoll, K.E., Carter, J.M., Iype, P.T., Kumari, H.L., Crosby, L.L., Aardema, M.J., Isfort, R.J., Cody, D., Chestnut, M.H. und Burns, J.L. (1995). Establishment of immortalized alveolar type II epithelial cell lines from adult rats. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 31: 516–527.
- El Yamani, N., Collins, A.R., Rundén-Pran, E., Fjellsbø, L.M., Shaposhnikov, S., Zienolddiny, S. und Dusinska, M. (2017). *In vitro* genotoxicity testing of four reference metal nanomaterials, titanium dioxide, zinc oxide, cerium oxide and silver: towards reliable hazard assessment. *Mutagenesis* 32: 117–126.
- EU Kommission (2011). *Empfehlung der Kommission vom 18. Oktober 2011 zur Definition von Nanomaterialien – 2011/696/EU*.
- Fahmy, B. und Cormier, S.A. (2009). Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells. *Toxicol In Vitro* 23: 1365–1371.

- Felix, L.P., Perez, J.E., Contreras, M.F., Ravasi, T. und Kosel, J. (2016). Cytotoxic effects of nickel nanowires in human fibroblasts. *Toxicol Rep* 3: 373–380.
- Fischer, B.M., Neumann, D., Piberger, A.L., Risnes, S.F., Köberle, B. und Hartwig, A. (2016). Use of high-throughput RT-qPCR to assess modulations of gene expression profiles related to genomic stability and interactions by cadmium. *Arch Toxicol* 90: 2745–2761.
- Fröhlich, E. (2018). Comparison of conventional and advanced *in vitro* models in the toxicity testing of nanoparticles. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 46: 1091–1107.
- Fröhlich, E. und Salar-Behzadi, S. (2014). Toxicological assessment of inhaled nanoparticles: role of *in vivo*, *ex vivo*, *in vitro*, and *in silico* studies. *Int J Mol Sci* 15: 4795–4822.
- Fung, A.O., Kapadia, V., Pierstorff, E., Ho, D. und Chen, Y. (2008). Induction of cell death by magnetic actuation of nickel nanowires internalized by fibroblasts. *J. Phys. Chem. C* 112: 15085–15088.
- Gao, N., Wang, H. und Yang, E.-H. (2010). An experimental study on ferromagnetic nickel nanowires functionalized with antibodies for cell separation. *Nanotechnology* 21: 105107.
- Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H. und Parks, W.P. (1973). *In vitro* cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51: 1417–1423.
- Gliga, A.R., Di Bucchianico, S., Åkerlund, E. und Karlsson, H.L. (2020). Transcriptome profiling and toxicity following long-term, low dose exposure of human lung cells to Ni and NiO nanoparticles-comparison with NiCl₂. *Nanomaterials* 10.
- Gliga, A.R., Skoglund, S., Wallinder, I.O., Fadeel, B. und Karlsson, H.L. (2014). Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Part Fibre Toxicol* 11: 11.
- Goodman, J.E., Prueitt, R.L., Thakali, S. und Oller, A.R. (2011). The nickel ion bioavailability model of the carcinogenic potential of nickel-containing substances in the lung. *Crit Rev Toxicol* 41: 142–174.
- Günther, V., Lindert, U. und Schaffner, W. (2012). The taste of heavy metals: gene regulation by MTF-1. *Biochim Biophys Acta* 1823: 1416–1425.
- Hansen, S.F., Hansen, O.F.H. und Nielsen, M.B. (2020). Advances and challenges towards consumerization of nanomaterials. *Nat. Nanotechnol.* 15: 964–965.
- Hartwig, A. (1996). Sensitive analysis of oxidative DNA damage in mammalian cells: use of the bacterial Fpg protein in combination with alkaline unwinding. *Toxicol Lett* 88: 85–90.
- Hartwig, A., Klyszcz-Nasko, H., Schlepegrell, R. und Beyersmann, D. (1993). Cellular damage by ferric nitrilotriacetate and ferric citrate in V79 cells: interrelationship between lipid peroxidation, DNA strand breaks and sister chromatid exchanges. *Carcinogenesis* 14: 107–112.
- Hirst, S.M., Karakoti, A.S., Tyler, R.D., Sriranganathan, N., Seal, S. und Reilly, C.M. (2009). Anti-inflammatory properties of cerium oxide nanoparticles. *Small* 5: 2848–2856.
- Hufnagel, M., Neuberger, R., Wall, J., Link, M., Friesen, A. und Hartwig, A. (2021). Impact of differentiated macrophage-like cells on the transcriptional toxicity profile of CuO nanoparticles in co-cultured lung epithelial cells. *Int J Mol Sci* 22: 5044.
- Hufnagel, M., Schoch, S., Wall, J., Strauch, B.M. und Hartwig, A. (2020). Toxicity and gene expression profiling of copper- and titanium-based nanoparticles using air-liquid interface exposure. *Chem Res Toxicol* 33: 1237–1249.
- IARC (2010). *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans – Carbon black, titanium dioxide, and talc.*

- Ibrahim, K.S. (2013). Carbon nanotubes-properties and applications: a review. *Carbon letters* 14: 131–144.
- Ishikawa, F., Akimoto, T., Yamamoto, H., Araki, Y., Yoshie, T., Mori, K., Hayashi, H., Nose, K. und Shibamura, M. (2009). Gene expression profiling identifies a role for CHOP during inhibition of the mitochondrial respiratory chain. *J Biochem* 146: 123–132.
- Jacobsen, N.R., Pojana, G., White, P., Møller, P., Cohn, C.A., Korsholm, K.S., Vogel, U., Marcomini, A., Loft, S. und Wallin, H. (2008). Genotoxicity, cytotoxicity, and reactive oxygen species induced by single-walled carbon nanotubes and C₆₀ fullerenes in the FE1-Muta™ Mouse lung epithelial cells. *Environ Mol Mutagen* 49: 476–487.
- Jauhainen, A., Thomsen, C., Strömbom, L., Grundevik, P., Andersson, C., Danielsson, A., Andersson, M.K., Nerman, O., Rökvist, L., Ståhlberg, A. und Åman, P. (2012). Distinct cytoplasmic and nuclear functions of the stress induced protein DDIT3/CHOP/GADD153. *PLoS one* 7: e33208.
- Jiang, X., Miclăuș, T., Wang, L., Foldbjerg, R., Sutherland, D.S., Autrup, H., Chen, C. und Beer, C. (2015). Fast intracellular dissolution and persistent cellular uptake of silver nanoparticles in CHO-K1 cells: implication for cytotoxicity. *Nanotoxicology* 9: 181–189.
- Johnston, H.J., Hutchison, G.R., Christensen, F.M., Peters, S., Hankin, S., Aschberger, K. und 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: 207–246.
- Jomova, K., Baros, S. und Valko, M. (2012). Redox active metal-induced oxidative stress in biological systems. *Transition Met Chem* 37: 127–134.
- Jose, G.P., Santra, S., Mandal, S.K. und Sengupta, T.K. (2011). Singlet oxygen mediated DNA degradation by copper nanoparticles: potential towards cytotoxic effect on cancer cells. *J Nanobiotechnol* 9: 9.
- Juling, S., Böhmert, L., Lichtenstein, D., Oberemm, A., Creutzenberg, O., Thünemann, A.F., Braeuning, A. und Lampen, A. (2018). Comparative proteomic analysis of hepatic effects induced by nanosilver, silver ions and nanoparticle coating in rats. *Food Chem Toxicol* 113: 255–266.
- Karakoti, A., Singh, S., Dowding, J.M., Seal, S. und Self, W.T. (2010). Redox-active radical scavenging nanomaterials. *Chem Soc Rev* 39: 4422–4432.
- Karimian, A., Ahmadi, Y. und Yousefi, B. (2016). Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 42: 63–71.
- Karkossa, I., Bannuscher, A., Hellack, B., Wohlleben, W., Laloy, J., Stan, M.S., Dinischiotu, A., Wiemann, M., Luch, A., Haase, A., Bergen, M. von und Schubert, K. (2021). Nanomaterials induce different levels of oxidative stress, depending on the used model system: comparison of *in vitro* and *in vivo* effects. *Sci Total Environ* 801: 149538.
- Karlsson, H.L., Cronholm, P., Gustafsson, J. und Möller, L. (2008). Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem Res Toxicol* 21: 1726–1732.
- Karlsson, H.L., Cronholm, P., Hedberg, Y., Tornberg, M., Battice, L. de, Svedhem, S. und Wallinder, I.O. (2013). Cell membrane damage and protein interaction induced by copper containing nanoparticles-importance of the metal release process. *Toxicology* 313: 59–69.
- Karlsson, H.L., Gustafsson, J., Cronholm, P. und Möller, L. (2009). Size-dependent toxicity of metal oxide particles—a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol Lett* 188: 112–118.
- Karlsson, H.L., Toprak, M.S. und Fadeel, B. (2022). Toxicity of metal and metal oxide nanoparticles. In *Handbook on the toxicology of metals – General considerations*, Nordberg, G. and Costa, M. (Eds.), Academic Press, London, pp. 87–126.

- Keller, J.G., Quevedo, D.F., Faccani, L., Costa, A.L., Landsiedel, R., Werle, K. und Wohlleben, W. (2021). Dosimetry *in vitro* - exploring the sensitivity of deposited dose predictions vs. affinity, polydispersity, freeze-thawing, and analytical methods. *Nanotoxicology* 15: 21–34.
- Keshavan, S., Gupta, G., Martin, S. und Fadeel, B. (2021). Multi-walled carbon nanotubes trigger lysosome-dependent cell death (pyroptosis) in macrophages but not in neutrophils. *Nanotoxicology* 15: 1125–1150.
- Khalid, P., Suman, V.B., Hussain, M.A. und Arun, A.B. (2016). Toxicology of carbon nanotubes - a review. *Int J Appl Eng Res* 11: 148–157.
- Khan, A.M., Korzeniowska, B., Gorshkov, V., Tahir, M., Schröder, H., Skytte, L., Rasmussen, K.L., Khandige, S., Møller-Jensen, J. und Kjeldsen, F. (2019). Silver nanoparticle-induced expression of proteins related to oxidative stress and neurodegeneration in an *in vitro* human blood-brain barrier model. *Nanotoxicology* 13: 221–239.
- Kolling, J., Tigges, J., Hellack, B., Albrecht, C. und Schins, R.P.F. (2020). Evaluation of the NLRP3 inflammasome activating effects of a large panel of TiO₂ nanomaterials in macrophages. *Nanomaterials* 10.
- Koltermann-Jüly, J., Keller, J.G., Vennemann, A., Werle, K., Müller, P., Ma-Hock, L., Landsiedel, R., Wiemann, M. und Wohlleben, W. (2018). Abiotic dissolution rates of 24 (nano)forms of 6 substances compared to macrophage-assisted dissolution and *in vivo* pulmonary clearance: grouping by biodissolution and transformation. *NanoImpact* 12: 29–41.
- Kong, L., Gao, X., Zhu, J., Cheng, K. und Tang, M. (2016). Mechanisms involved in reproductive toxicity caused by nickel nanoparticle in female rats. *Environ Toxicol* 31: 1674–1683.
- Lanone, S., Rogerieux, F., Geys, J., Dupont, A., Maillot-Marechal, E., Boczkowski, J., Lacroix, G. und Hoet, P. (2009). Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. *Part Fibre Toxicol* 6: 14.
- Larsson, M., Hill, A. und Duffy, J. (2012). Suspension Stability; Why Particle Size, Zeta Potential and Rheology are Important. *Ann Trans Nordic Rheol Soc*.
- Latvala, S., Hedberg, J., Di Bucchianico, S., Möller, L., Odnevall Wallinder, I., Elihn, K. und Karlsson, H.L. (2016). Nickel release, ROS generation and toxicity of Ni and NiO micro- and nanoparticles. *PLoS one* 11: e0159684.
- Latvala, S., Vare, D., Karlsson, H.L. und Elihn, K. (2017). *In vitro* genotoxicity of airborne Ni NP in air-liquid interface. *J Appl Toxicol* 37: 1420–1427.
- Lehmann, S.G., Gilbert, B., Maffei, T.G., Grichine, A., Pignot-Paintrand, I., Clavaguera, S., Rachidi, W., Seve, M. und Charlet, L. (2018). *In vitro* dermal safety assessment of silver nanowires after acute exposure: tissue vs. cell models. *Nanomaterials* 8.
- Li, S., He, P., Dong, J., Guo, Z. und Dai, L. (2005). DNA-directed self-assembling of carbon nanotubes. *J Am Chem Soc* 127: 14–15.
- Li, Y., Qin, T., Ingle, T., Yan, J., He, W., Yin, J.-J. und Chen, T. (2017). Differential genotoxicity mechanisms of silver nanoparticles and silver ions. *Arch Toxicol* 91: 509–519.
- Limbach, L.K., Li, Y., Grass, R.N., Brunner, T.J., Hintermann, M.A., Müller, M., Gunther, D. und Stark, W.J. (2005). Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. *Environ Sci Technol* 39: 9370–9376.
- Limbach, L.K., Wick, P., Manser, P., Grass, R.N., Bruinink, A. und Stark, W.J. (2007). Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. *Environ Sci Technol* 41: 4158–4163.

- Linder, M.C. (2020). Copper homeostasis in mammals, with emphasis on secretion and excretion. A review. *Int J Mol Sci* 21.
- Lippmann, M., Yeates, D.B. und Albert, R.E. (1980). Deposition, retention, and clearance of inhaled particles. *Br J Ind Med* 37: 337–362.
- Liu, J., Wang, Z., Liu, F.D., Kane, A.B. und Hurt, R.H. (2012). Chemical transformations of nanosilver in biological environments. *ACS Nano* 6: 9887–9899.
- Livak, K.J. und Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods* 25: 402–408.
- Loret, T., Peyret, E., Dubreuil, M., Aguerre-Chariol, O., Bressot, C., Le Bihan, O., Amodeo, T., Trouiller, B., Braun, A., Egles, C. und Lacroix, G. (2016). Air-liquid interface exposure to aerosols of poorly soluble nanomaterials induces different biological activation levels compared to exposure to suspensions. *Part Fibre Toxicol* 13: 1–21.
- Ma, C., Peng, Y., Li, H. und Chen, W. (2021). Organ-on-a-chip: a new paradigm for drug development. *Trends in pharmacological sciences* 42: 119–133.
- Ma, C., Song, M., Zhang, Y., Yan, M., Zhang, M. und Bi, H. (2014). Nickel nanowires induce cell cycle arrest and apoptosis by generation of reactive oxygen species in HeLa cells. *Toxicol Rep* 1: 114–121.
- Ma, J.Y., Zhao, H., Mercer, R.R., Barger, M., Rao, M., Meighan, T., Schwegler-Berry, D., Castranova, V. und Ma, J.K. (2011). Cerium oxide nanoparticle-induced pulmonary inflammation and alveolar macrophage functional change in rats. *Nanotoxicology* 5: 312–325.
- Magaye, R., Gu, Y., Wang, Y., Su, H., Zhou, Q., Mao, G., Shi, H., Yue, X., Zou, B., Xu, J. und Zhao, J. (2016). *In vitro* and *in vivo* evaluation of the toxicities induced by metallic nickel nano and fine particles. *J Mol Hist* 47: 273–286.
- Magaye, R. und Zhao, J. (2012). Recent progress in studies of metallic nickel and nickel-based nanoparticles' genotoxicity and carcinogenicity. *Environ Toxicol Pharmacol* 34: 644–650.
- Ma-Hock, L., Sauer, U.G., Ruggiero, E., Keller, J.-G., Wohlleben, W. und Landsiedel, R. (2021). The use of nanomaterial *in vivo* organ burden data for *in vitro* dose setting. *Small* 17: e2005725.
- Manke, A., Wang, L. und Rojanasakul, Y. (2013). Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *Biomed Res Int* 2013: 942916.
- Margineanu, M.B., Julfakyan, K., Sommer, C., Perez, J.E., Contreras, M.F., Khashab, N., Kosel, J. und Ravasi, T. (2016). Semi-automated quantification of living cells with internalized nanostructures. *J Nanobiotechnol* 14: 4.
- Midander, K., Cronholm, P., Karlsson, H.L., Elihn, K., Möller, L., Leygraf, C. und Wallinder, I.O. (2009). Surface characteristics, copper release, and toxicity of nano- and micrometer-sized copper and copper(II) oxide particles: a cross-disciplinary study. *Small* 5: 389–399.
- Mukaida, N. (2003). Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: L566–77.
- Muller, J., Decordier, I., Hoet, P.H., Lombaert, N., Thomassen, L., Huaux, F., Lison, D. und Kirsch-Volders, M. (2008). Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells. *Carcinogenesis* 29: 427–433.
- Murphy, F.A., Schinwald, A., Poland, C.A. und Donaldson, K. (2012). The mechanism of pleural inflammation by long carbon nanotubes: interaction of long fibres with macrophages stimulates them to amplify pro-inflammatory responses in mesothelial cells. *Part Fibre Toxicol* 9: 8.
- Nagata, S. (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* 256: 12–18.

- Nam, V.B. und Lee, D. (2016). Copper nanowires and their applications for flexible, transparent conducting films: a review. *Nanomaterials* 6.
- Nel, A., Xia, T., Mädler, L. und Li, N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311: 622–627.
- Numano, T., Higuchi, H., Alexander, D.B., Alexander, W.T., Abdelgied, M., El-Gazzar, A.M., Saleh, D., Takase, H., Hirose, A., Naiki-Ito, A., Suzuki, S., Takahashi, S. und Tsuda, H. (2019). MWCNT-7 administered to the lung by intratracheal instillation induces development of pleural mesothelioma in F344 rats. *Cancer Sci* 110: 2485–2492.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E. und Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113: 823–839.
- Ogami, A., Morimoto, Y., Myojo, T., Oyabu, T., Murakami, M., Todoroki, M., Nishi, K., Kadoya, C., Yamamoto, M. und Tanaka, I. (2009). Pathological features of different sizes of nickel oxide following intratracheal instillation in rats. *Inhal Toxicol* 21: 812–818.
- Olin, S.S. (2000). The relevance of the rat lung response to particle overload for human risk assessment: a workshop consensus report. *Inhal Toxicol* 12: 1–17.
- Park, E.-J., Choi, J., Park, Y.-K. und Park, K. (2008a). Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology* 245: 90–100.
- Park, E.-J., Yi, J., Chung, K.-H., Ryu, D.-Y., Choi, J. und Park, K. (2008b). Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicol Lett* 180: 222–229.
- Perez, J.E., Contreras, M.F., Vilanova, E., Felix, L.P., Margineanu, M.B., Luongo, G., Porter, A.E., Dunlop, I.E., Ravasi, T. und Kosel, J. (2016). Cytotoxicity and intracellular dissolution of nickel nanowires. *Nanotoxicology* 10: 871–880.
- Peters, K., Unger, R.E., Gatti, A.M., Sabbioni, E., Tsaryk, R. und Kirkpatrick, C.J. (2007). Metallic nanoparticles exhibit paradoxical effects on oxidative stress and pro-inflammatory response in endothelial cells *in vitro*. *Int J Immunopathol Pharmacol* 20: 685–695.
- Petersen, E.J. und Nelson, B.C. (2010). Mechanisms and measurements of nanomaterial-induced oxidative damage to DNA. *Anal Bioanal Chem* 398: 613–650.
- Piantadosi, C.A., Withers, C.M., Bartz, R.R., MacGarvey, N.C., Fu, P., Sweeney, T.E., Welty-Wolf, K.E. und Suliman, H.B. (2011). Heme oxygenase-1 couples activation of mitochondrial biogenesis to anti-inflammatory cytokine expression. *J Biol Chem* 286: 16374–16385.
- Poland, C.A., Byrne, F., Cho, W.-S., Prina-Mello, A., Murphy, F.A., Davies, G.L., Coey, J.M.D., Gounko, Y., Duffin, R., Volkov, Y. und Donaldson, K. (2012). Length-dependent pathogenic effects of nickel nanowires in the lungs and the peritoneal cavity. *Nanotoxicology* 6: 899–911.
- Radons, J. (2016). The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? *Cell Stress Chaperones* 21: 379–404.
- Rao, G.V.S., Tinkle, S., Weissman, D.N., Antonini, J.M., Kashon, M.L., Salmen, R., Battelli, L.A., Willard, P.A., Hoover, M.D. und Hubbs, A.F. (2003). Efficacy of a technique for exposing the mouse lung to particles aspirated from the pharynx. *J Toxicol Environ Health A* 66: 1441–1452.
- Rasmussen, K., Mast, J., De Temmermann, P., Verleysen, E., Waegeneers, N., van Steen, F., Pizzolon, J.C., Temmermann, L. de, van Doren, E., Alstrup Jensen, K., Birkedal, R., Levin, M., Hjortkjaer Nielson, S., Kalevi Koponen, I., Clausen, P., Kofoed-Sorsensen, V., Kembouche, Y., Thieriet, N., Spalla, O., Guiot, C., Rousset, D., Witschger, O., Bau, S., Bianchi, B., Mothkus, C., Shivachev, B., Dimowa, L., Nikolova, R., Nihtianova, D., Tarassov, M., Petrov, O., Bakardjieva, S., Gilliland, D., Pianella, F., Ceccone, G., Spampinato, V., Cotogno, G., Gibson, N., Gaillard, C. und Mech, A. (2014a). Titanium dioxide, NM-100, NM-101, NM-102, NM-103, NM-104, NM-105: characterisation and physico chemical properties.

- Rasmussen, K., Mast, J., Temmerman, P. de, Verleysen, E., Waegeneers, N., van Steen, F., Pizzolon, J., Temmerman, L. de, van Doren, E., Jensen, K., Birkedal, R., Clausen, P., Kembouche, Y., Thieriet, N., Spalla, O., Giuot, C., Rousset, D., Witschger, O., Bau, S., Bianchi, B., Shivachev, B., Dimowa, L., Nikolova, R., Nihtianova, D., Tarassov, M., Petrov, O., Bakardjieva, S., Motzkus, C., Labarraque, G., Oster, C., Cotogno, G. und Gaillard, C. (2014b). Multi-walled carbon nanotubes, NM-400, NM-401, NM-402, NM-403, characterisation and physico-chemical properties.
- Raymaekers, M., Smets, R., Maes, B. und Cartuyvels, R. (2009). Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. *J Clin Lab Anal* 23: 145–151.
- Riley, M.R., Boesewetter, D.E., Turner, R.A., Kim, A.M., Collier, J.M. und Hamilton, A. (2005). Comparison of the sensitivity of three lung derived cell lines to metals from combustion derived particulate matter. *Toxicol in Vitro* 19: 411–419.
- Rosemary Sifakas, A. und Des Richardson, R. (2009). Growth arrest and DNA damage-45 alpha (GADD45alpha). *Int J Biochem Cell Biol* 41: 986–989.
- Ryter, S.W., Alam, J. und Choi, A.M.K. (2006). Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* 86: 583–650.
- Sahay, G., Alakhova, D.Y. und Kabanov, A.V. (2010). Endocytosis of nanomedicines. *J Control Release* 145: 182–195.
- Sannicola, T., Lagrange, M., Cabos, A., Celle, C., Simonato, J.-P. und Bellet, D. (2016). Metallic nanowire-based transparent electrodes for next generation flexible devices: a review. *Small* 12: 6052–6075.
- Saporito-Magriñá, C.M., Musacco-Sebio, R.N., Andrieux, G., Kook, L., Orrego, M.T., Tuttolomondo, M.V., Desimone, M.F., Boerries, M., Borner, C. und Repetto, M.G. (2018). Copper-induced cell death and the protective role of glutathione: the implication of impaired protein folding rather than oxidative stress. *Metallomics* 10: 1743–1754.
- Sayes, C.M. und Warheit, D.B. (2008). An *in vitro* investigation of the differential cytotoxic responses of human and rat lung epithelial cell lines using TiO₂ nanoparticles. *IJNT* 5: 15.
- Scheller, J.S., Irvine, G.W., Wong, D.L., Hartwig, A. und Stillman, M.J. (2017). Stepwise copper(I) binding to metallothionein: a mixed cooperative and non-cooperative mechanism for all 20 copper ions. *Metallomics* 9: 447–462.
- Schinwald, A., Chernova, T. und Donaldson, K. (2012a). Use of silver nanowires to determine thresholds for fibre length-dependent pulmonary inflammation and inhibition of macrophage migration *in vitro*. *Part Fibre Toxicol* 9: 47.
- Schinwald, A. und Donaldson, K. (2012). Use of back-scatter electron signals to visualise cell/nanowires interactions *in vitro* and *in vivo*; frustrated phagocytosis of long fibres in macrophages and compartmentalisation in mesothelial cells *in vivo*. *Part Fibre Toxicol* 9: 34.
- Schinwald, A., Murphy, F.A., Prina-Mello, A., Poland, C.A., Byrne, F., Movia, D., Glass, J.R., Dickerson, J.C., Schultz, D.A., Jeffree, C.E., Macnee, W. und Donaldson, K. (2012b). The threshold length for fiber-induced acute pleural inflammation: shedding light on the early events in asbestos-induced mesothelioma. *Toxicol Sci* 128: 461–470.
- Schwerdtle, T. und Hartwig, A. (2006). Bioavailability and genotoxicity of soluble and particulate nickel compounds in cultured human lung cells. *Materwiss Werksttech* 37: 521–525.
- Schwozter, D., Ernst, H., Schaudien, D., Kock, H., Pohlmann, G., Dasenbrock, C. und Creutzenberg, O. (2017). Effects from a 90-day inhalation toxicity study with cerium oxide and barium sulfate nanoparticles in rats. *Part Fibre Toxicol* 14: 23.

- Schwotzer, D., Niehof, M., Schaudien, D., Kock, H., Hansen, T., Dasenbrock, C. und Creutzenberg, O. (2018). Cerium oxide and barium sulfate nanoparticle inhalation affects gene expression in alveolar epithelial cells type II. *J Nanobiotechnol* 16: 16.
- Semisch, A., Ohle, J., Witt, B. und Hartwig, A. (2014). Cytotoxicity and genotoxicity of nano - and microparticulate copper oxide: role of solubility and intracellular bioavailability. *Part Fibre Toxicol* 11: 10.
- Shaik-Dasthagirisahab, Y.B., Varvara, G., Murmura, G., Saggini, A., Potalivo, G., Caraffa, A., Antinolfi, P., Tete', S., Tripodi, D., Conti, F., Cianchetti, E., Toniato, E., Rosati, M., Conti, P., Speranza, L., Pantalone, A., Saggini, R., Theoharides, T.C. und Pandolfi, F. (2013). Vascular endothelial growth factor (VEGF), mast cells and inflammation. *Int J Immunopathol Pharmacol* 26: 327–335.
- Shi, H., Hudson, L.G. und Liu, K.J. (2004). Oxidative stress and apoptosis in metal ion-induced carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 37: 582–593.
- Silva, R.M., Xu, J., Saiki, C., Anderson, D.S., Franzi, L.M., Vulpe, C.D., Gilbert, B., van Winkle, L.S. und Pinkerton, K.E. (2014). Short versus long silver nanowires: a comparison of *in vivo* pulmonary effects post instillation. *Part Fibre Toxicol* 11: 52.
- Simon-Deckers, A., Gouget, B., Mayne-L'hermite, M., Herlin-Boime, N., Reynaud, C. und Carrière, M. (2008). *In vitro* investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. *Toxicology* 253: 137–146.
- Singh, A., Misra, V., Thimmulappa, R.K., Lee, H., Ames, S., Hoque, M.O., Herman, J.G., Baylin, S.B., Sidransky, D., Gabrielson, E., Brock, M.V. und Biswal, S. (2006). Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. *PLoS medicine* 3: e420.
- Singh, C., Friedrichs, S., Ceccone, G., Gibson, P., Jensen, K.A., Levin, M., Goenaga Infante, H., Carlander, D. und Rasmussen, K. (2014). Cerium dioxide, NM-211, NM-212, NM-213. Characterisation and test item preparation.
- Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G.J.S., Griffiths, S.M., Williams, P.M., Maffei, T.G.G., Wright, C.J. und Doak, S.H. (2009). NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials* 30: 3891–3914.
- Søs Poulsen, S., Jacobsen, N.R., Labib, S., Wu, D., Husain, M., Williams, A., Bøgelund, J.P., Andersen, O., Købler, C., Mølhav, K., Kyjovska, Z.O., Saber, A.T., Wallin, H., Yauk, C.L., Vogel, U. und Halappanavar, S. (2013). Transcriptomic analysis reveals novel mechanistic insight into murine biological responses to multi-walled carbon nanotubes in lungs and cultured lung epithelial cells. *PLoS One* 8: e80452.
- Stetefeld, J., McKenna, S.A. und Patel, T.R. (2016). Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev* 8: 409–427.
- Stoehr, L.C., Gonzalez, E., Stampfl, A., Casals, E., Duschl, A., Puentes, V. und Oostingh, G.J. (2011). Shape matters: effects of silver nanospheres and wires on human alveolar epithelial cells. *Part Fibre Toxicol* 8: 36.
- Strauch, B.M., Hubele, W. und Hartwig, A. (2020). Impact of endocytosis and lysosomal acidification on the toxicity of copper oxide nano- and microsized particles: uptake and gene expression related to oxidative stress and the DNA damage response. *Nanomaterials* 10: 679.
- Strauch, B.M., Niemand, R.K., Winkelbeiner, N.L. und Hartwig, A. (2017). Comparison between micro- and nanosized copper oxide and water soluble copper chloride: interrelationship between intracellular copper concentrations, oxidative stress and DNA damage response in human lung cells. *Part Fibre Toxicol* 14: 28.

- Studer, A.M., Limbach, L.K., van Duc, L., Krumeich, F., Athanassiou, E.K., Gerber, L.C., Moch, H. und Stark, W.J. (2010). Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles. *Toxicol Lett* 197: 169–174.
- Sung, J.H., Ji, J.H., Yoon, J.U., Kim, D.S., Song, M.Y., Jeong, J., Han, B.S., Han, J.H., Chung, Y.H., Kim, J., Kim, T.S., Chang, H.K., Lee, E.J., Lee, J.H. und Yu, I.J. (2008). Lung function changes in Sprague-Dawley rats after prolonged inhalation exposure to silver nanoparticles. *Inhal Toxicol* 20: 567–574.
- Sweeney, S., Berhanu, D., Misra, S.K., Thorley, A.J., Valsami-Jones, E. und Tetley, T.D. (2014). Multi-walled carbon nanotube length as a critical determinant of bioreactivity with primary human pulmonary alveolar cells. *Carbon* 78: 26–37.
- Tacu, I., Kokalari, I., Abollino, O., Albrecht, C., Malandrino, M., Ferretti, A.M., Schins, R.P.F. und Fenoglio, I. (2021). Mechanistic insights into the role of iron, copper, and carbonaceous component on the oxidative potential of ultrafine particulate matter. *Chem Res Toxicol* 34: 767–779.
- Tavares, A.M., Louro, H., Antunes, S., Quarré, S., Simar, S., Temmerman, P.-J. de, Verleysen, E., Mast, J., Jensen, K.A., Norppa, H., Nessler, F. und Silva, M.J. (2014). Genotoxicity evaluation of nanosized titanium dioxide, synthetic amorphous silica and multi-walled carbon nanotubes in human lymphocytes. *Toxicol in Vitro* 28: 60–69.
- Toybou, D., Celle, C., Aude-Garcia, C., Rabilloud, T. und Simonato, J.-P. (2019). A toxicology-informed, safer by design approach for the fabrication of transparent electrodes based on silver nanowires. *Environ Sci Nano* 6: 684–694.
- Urner, M., Schlicker, A., Z'graggen, B.R., Stepuk, A., Booy, C., Buehler, K.P., Limbach, L., Chmiel, C., Stark, W.J. und Beck-Schimmer, B. (2014). Inflammatory response of lung macrophages and epithelial cells after exposure to redox active nanoparticles: effect of solubility and antioxidant treatment. *Environ Sci Technol* 48: 13960–13968.
- Ursini, C.L., Cavallo, D., Fresegna, A.M., Ciervo, A., Maiello, R., Tassone, P., Buresti, G., Casciardi, S. und Iavicoli, S. (2014). Evaluation of cytotoxic, genotoxic and inflammatory response in human alveolar and bronchial epithelial cells exposed to titanium dioxide nanoparticles. *J Appl Toxicol* 34: 1209–1219.
- Utembe, W., Potgieter, K., Stefaniak, A.B. und Gulumian, M. (2015). Dissolution and biodurability: important parameters needed for risk assessment of nanomaterials. *Part Fibre Toxicol* 12: 11.
- Vallabani, N.V.S. und Karlsson, H.L. (2022). Primary and secondary genotoxicity of nanoparticles: establishing a co-culture protocol for assessing micronucleus using flow cytometry. *Front Toxicol* 4.
- Vance, M.E., Kuiken, T., Vejerano, E.P., McGinnis, S.P., Hochella, M.F., Rejeski, D. und Hull, M.S. (2015). Nanotechnology in the real world: redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J. Nanotechnol.* 6: 1769–1780.
- Ventura, C., Pereira, J.F.S., Matos, P., Marques, B., Jordan, P., Sousa-Uva, A. und Silva, M.J. (2020). Cytotoxicity and genotoxicity of MWCNT-7 and crocidolite: assessment in alveolar epithelial cells versus their coculture with monocyte-derived macrophages. *Nanotoxicology* 14: 479–503.
- Visalli, G., Bertuccio, M.P., Iannazzo, D., Piperno, A., Pistone, A. und Di Pietro, A. (2015). Toxicological assessment of multi-walled carbon nanotubes on A549 human lung epithelial cells. *Toxicol In Vitro* 29: 352–362.
- Vlahopoulos, S. und Zoumpourlis, V.C. (2004). JNK: a key modulator of intracellular signaling. *Biochemistry (Mosc)* 69: 844–854.
- Walkey, C.D. und Chan, W.C.W. (2012). Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chem Soc Rev* 41: 2780–2799.

- Wall, J., Selecki, D.A., Schworm, F., Neuberger, R., Link, M., Hufnagel, M., Schumacher, P., Schulz, F., Heinrich, U., Wohlleben, W. und Hartwig, A. (2021). Comparison of metal-based nanoparticles and nanowires: solubility, reactivity, bioavailability and cellular toxicity. *Nanomaterials* 12.
- Wang, F., Chen, Y., Wang, Y., Yin, Y., Qu, G., Song, M. und Wang, H. (2019). Ultra-long silver nanowires induced mitotic abnormalities and cytokinetic failure in A549 cells. *Nanotoxicology* 1–15.
- Wang, L., Liu, Y., Li, W., Jiang, X., Ji, Y., Wu, X., Xu, L., Qiu, Y., Zhao, K., Wei, T., Li, Y., Zhao, Y. und Chen, C. (2011). Selective targeting of gold nanorods at the mitochondria of cancer cells: implications for cancer therapy. *Nano letters* 11: 772–780.
- Wang, L., Pal, A.K., Isaacs, J.A., Bello, D. und Carrier, R.L. (2014a). Nanomaterial induction of oxidative stress in lung epithelial cells and macrophages. *J Nanopart Res* 16.
- Wang, L., Zhang, T., Li, P., Huang, W., Tang, J., Wang, P., Liu, J., Yuan, Q., Bai, R., Li, B., Zhang, K., Zhao, Y. und Chen, C. (2015). Use of synchrotron radiation-analytical techniques to reveal chemical origin of silver-nanoparticle cytotoxicity. *ACS Nano* 9: 6532–6547.
- Wang, X., Ji, Z., Chang, C.H., Zhang, H., Wang, M., Liao, Y.-P., Lin, S., Meng, H., Li, R., Sun, B., van Winkle, L., Pinkerton, K.E., Zink, J.I., Xia, T. und Nel, A.E. (2014b). Use of coated silver nanoparticles to understand the relationship of particle dissolution and bioavailability to cell and lung toxicological potential. *Small* 10: 385–398.
- Wang, Z., Li, N., Zhao, J., White, J.C., Qu, P. und Xing, B. (2012). CuO nanoparticle interaction with human epithelial cells: cellular uptake, location, export, and genotoxicity. *Chem Res Toxicol* 25: 1512–1521.
- World Health Organisation (2017). WHO guidelines on protecting workers from potential risks of manufactured nanomaterials.
- Worthington, K.L.S., Adamcakova-Dodd, A., Wongrakpanich, A., Mudunkotuwa, I.A., Mapuskar, K.A., Joshi, V.B., Allan Guymon, C., Spitz, D.R., Grassian, V.H., Thorne, P.S. und Salem, A.K. (2013). Chitosan coating of copper nanoparticles reduces *in vitro* toxicity and increases inflammation in the lung. *Nanotechnology* 24: 395101.
- Wu, F., Sun, H., Kluz, T., Clancy, H.A., Kiok, K. und Costa, M. (2012). Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) protects against chromate-induced toxicity *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol* 258: 166–175.
- Wu, L.W., Mayo, L.D., Dunbar, J.D., Kessler, K.M., Ozes, O.N., Warren, R.S. und Donner, D.B. (2000). VRAP is an adaptor protein that binds KDR, a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *J Biol Chem* 275: 6059–6062.
- Wu, Y. und Kong, L. (2020). Advance on toxicity of metal nickel nanoparticles. *Environ Geochem Health* 42: 2277–2286.
- Ye, J., Shi, X., Jones, W., Rojanasakul, Y., Cheng, N., Schwegler-Berry, D., Baron, P., Deye, G.J., Li, C. und Castranova, V. (1999). Critical role of glass fiber length in TNF-alpha production and transcription factor activation in macrophages. *Am J Physiol* 276: L426–34.
- Yi, L., Shen, H., Zhao, M., Shao, P., Liu, C., Cui, J., Wang, J., Wang, C., Guo, N., Kang, L., Lv, P., Xing, L. und Zhang, X. (2017). Inflammation-mediated SOD-2 upregulation contributes to epithelial-mesenchymal transition and migration of tumor cells in aflatoxin G1-induced lung adenocarcinoma. *Sci Rep* 7: 7953.
- Yokohira, M., Kuno, T., Yamakawa, K., Hosokawa, K., Matsuda, Y., Hashimoto, N., Suzuki, S., Saoo, K. und Imaida, K. (2008). Lung toxicity of 16 fine particles on intratracheal instillation in a bioassay model using f344 male rats. *Toxicologic pathology* 36: 620–631.
- Younes, M., Aquilina, G., Castle, L., Engel, K.-H., Fowler, P., Frutos Fernandez, M.J., Fürst, P., Gundert-Remy, U., Gürtler, R., Husøy, T., Manco, M., Mennes, W., Moldeus, P., Passamonti, S., Shah, R., Waalkens-Berendsen, I., Wölfle, D., Corsini, E., Cubadda, F., Groot, D. de, FitzGerald, R., Gunnare,

S., Gutleb, A.C., Mast, J., Mortensen, A., Oomen, A., Piersma, A., Plichta, V., Ulbrich, B., van Loveren, H., Benford, D., Bignami, M., Bolognesi, C., Crebelli, R., Dusinska, M., Marcon, F., Nielsen, E., Schlatter, J., Vleminckx, C., Barmaz, S., Carfí, M., Civitella, C., Giarola, A., Rincon, A.M., Serafimova, R., Smeraldi, C., Tarazona, J., Tard, A. und Wright, M. (2021). Safety assessment of titanium dioxide (E171) as a food additive. *EFSA journal. European Food Safety Authority* 19: e06585.

Zimmerman, J.F., Parameswaran, R., Murray, G., Wang, Y., Burke, M. und Tian, B. (2016). Cellular uptake and dynamics of unlabeled freestanding silicon nanowires. *Sci Adv* 2: e1601039.

8 Anhang

8.1 Verwendete Materialien

8.1.1 Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
20x DNA Binding Dye Sample Loading Reagent	Fluidigm (San Francisco, USA)
2x Assay Loading Reagent	Fluidigm (San Francisco, USA)
2x TaqMan© PreAmp Master Mix	Applied Biosystems (Foster City, USA)
AAS-Kupferstandard (1 g/L)	Roth (Karlsruhe, DE)
AAS-Magnesium-Matrixmodifier	Perkin Elmer (Waltham, USA)
AAS-Nickelstandard	Roth (Karlsruhe, DE)
AAS-Palladium-Matrixmodifier	Perkin Elmer (Waltham, USA)
AAS-Silberstandard	Perkin Elmer (Waltham, USA)
Accutase®	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Agarose NEED Ultra-Qualität	Roth (Karlsruhe, DE)
Bovines Serumalbumin, niedriger Endotoxingehalt	Fisher Scientific (Waltham, USA)
Calciumchlorid	Roth (Karlsruhe, DE)
CASYton®	OMNI Life Science (Bremen, DE)
cDNA-Standard, human normal tissues	BioChain Institute (Newark,USA)
cDNA-Standard, rat normal tissues	BioChain Institute (Newark,USA)
di-Kaliumhydrogenphosphat, ≥99 %	Roth (Karlsruhe, DE)
di-Natriumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe, DE)
Dimethylsulfoxid, ≥99,9 %	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
di-Natriumhydrogenphosphat, ≥99 %	Roth (Karlsruhe, DE)

Anhang

DNA-Suspensionspuffer	TEKnova (Hollister, USA)
DOC	Roth (Karlsruhe, DE)
EDTA ≥ 99 %	Roth (Karlsruhe, DE)
Ethidium-Monoazidbromid	Invitrogen (Waltham, USA)
Ethanol (reinst), 99,9 %	Roth (Karlsruhe, DE)
Ethanol (vergällt), 96 %	BrüggemannAlcohol (Heilbronn, DE)
Exonuklease I, 20 U/ μ L	New England BioLabs (Ipswich, USA)
Exonuklease Reaktionspuffer	New England BioLabs (Ipswich, USA)
FACS Flow	BD (Franklin Lakes, USA)
Fetales Kälberserum	Gibco (Carlsbad, USA)
GelPilot 50 bp DNA Ladder (Nr. 239025)	Qiagen (Hilden, DE)
GelRed Nucleic Acid Stain	Biotium (Fremont, USA)
Glycin	Roth (Karlsruhe, DE)
Hoechst 33258	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Hydroxylapatit, high resolution	MP Biomedicals (Santa Ana, USA)
IFC Control Line Fluid	Fluidigm (San Francisco, USA)
Igepal	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Kaliumchlorid	Roth (Karlsruhe, DE)
Kaliumdihydrogenphosphat, ≥ 99 %	Roth (Karlsruhe, DE)
Kupferchlorid	Roth (Karlsruhe, DE)
Magnesiumchlorid	Roth (Karlsruhe, DE)
Menadion	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Mitomycin C	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Natriumacetat	Roth (Karlsruhe, DE)

Anhang

Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumcitrat	Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumdihydrogenphosphat, $\geq 99\%$	Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumhydrogencarbonat	Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumhydroxid	Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumlactat	Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumpyruvat	Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumsulfat	Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumtartrat	Roth (Karlsruhe, DE)
Natronlauge 1 N	Roth (Karlsruhe, DE)
Nickelchlorid	Roth (Karlsruhe, DE)
PCR-Primer	Fluidigm (San Francisco, USA) Eurofins Genomics (Luxemburg)
PCR-zertifiziertes Wasser	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Phorbol-12-myristat-13-acetat	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Phosphatidylcholin	Roth (Karlsruhe, DE)
Protease-Inhibitor	Roche (Basel, CH)
RNase A	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
RPMI-1640	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Saccharose	Roth (Karlsruhe, DE)
Salpetersäure	Roth (Karlsruhe, DE)
Salzsäure 0,1 N	Roth (Karlsruhe, DE)
Silbernitrat	Roth (Karlsruhe, DE)

SDS 10 %	Roth (Karlsruhe, DE)
SSoFast EvaGreen Supermix with low ROX	Bio-Rad (Hercules, USA)
SYTOX Green®	Invitrogen (Waltham, USA)
TE-Puffer	TEKnova (Hollister, USA)
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Roth (Karlsruhe, DE)
Tris	Roth (Karlsruhe, DE)
Triton-X 100	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Trypsin	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Wasserstoffperoxid	Roth (Karlsruhe, DE)
Zitronensäure	Roth (Karlsruhe, DE)

Tabelle 23 **Verwendete Nanomaterialien.**

Material	Quelle	Form	Artikel	Lotnummer
CuO NP	PlasmaChem (Berlin, DE)	Pulver	PL-CuO	YF131107
Cu NP	iolitec (Heilbronn, DE)	Pulver	NM-0016-HP- 0025	RNM016006
Cu NW	PlasmaChem (Berlin, DE)	Pulver	PL-CuW50	YF1805291
Ni NP	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	Pulver	577995	MKCG8391
Ni NW	PlasmaChem (Berlin, DE)	Pulver	PL-NiW200	YF161
Ag NP	RAS AG (Regensburg, DE)	Suspension (in Wasser; 10 %wt)	Agpure 10 (JRC: NM-300K)	A10_180926
Ag NW	RAS AG (Regensburg, DE)	Suspension (in Ethylenglycol; Stabilisator: Polyvinylpyrrolidon; 4 %wt Ag)	ECOS HC	1375
CeO ₂ NP	JRC (Brüssel, BEL)	Pulver	NM-212	---

Anhang

TiO ₂ NP	JRC (Brüssel, BEL)	Pulver	NM-105	---
MWCNT	JRC (Brüssel, BEL)	Pulver	NM-401	---

8.1.2 Verwendete Lösungen und Puffer

Tabelle 24 Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen sowie deren Zusammensetzung.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Löslichkeitsuntersuchungen	
Künstliche alveoläre Flüssigkeit (pH 7,4)	0,0095 g MgCl ₂ 0,6019 g NaCl 0,0298 g KCl 0,0142 g Na ₂ SO ₄ 0,0071 g Na ₂ SO ₄ 0,0368 g CaCl ₂ *2 H ₂ O 0,0953 g NaAcetat*2 H ₂ O 0,2604 g NaHCO ₃ 0,0097 g NaCitrat*H ₂ O 0,0100 g Phosphatidylcholin aufgefüllt auf 100 mL bidest. Wasser
Künstliche lysosomale Flüssigkeit (pH 4,5)	0,3210 g NaCl 0,6000 g NaOH 2,0800 g Zitronensäure 0,01285 g CaCl ₂ *2 H ₂ O 0,0071 g Na ₂ HPO ₄ 0,0039 g Na ₂ SO ₄ 0,0048 g MgCl ₂ 0,0059 g Glycin 0,0077 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat 0,0090 g NaTartrat*2 H ₂ O 0,0085 g Natriumlactat 0,0086 g Natriumpyruvat aufgefüllt auf 100 mL bidest. Wasser
Zellkultur	
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

Anhang

PBS-EDTA (pH 7,4)	0,5 mM EDTA in PBS
Trypsin-Lösung	0,25 % Trypsin in PBS-EDTA
Intrazelluläre Bioverfügbarkeit	
RIPA-Puffer	10 mM Tris (pH 7,06) 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % (v/v) Triton-X 100 1 % DOC 0,01 % SDS 1x Protease-Inhibitor
Alkalische Entwindung	
Alkalische Lösung	2,6252 g NaCl 1 mL NaOH, 1 M 1 mL Na ₂ HPO ₄ , 0,5 M aufgefüllt auf 50 mL bidest. Wasser
Hydroxylapatit-Lösung	0,1 g Apatit in 0,1 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 bidest. Wasser
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 bidest. Wasser
0,5 M KP-Puffer	51 mL KH ₂ HPO ₄ , 0,5 M 49 mL NaH ₂ PO ₄ , 0,5 M
0,01 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 bidest. Wasser
Mikrokerntest	
Puffer	2 % FKS in PBS
Färbelösung A	8,5 µg/mL EMA in Puffer
Lyselösung 1	58,4 mg NaCl 114 mg Tri-Natriumcitrat-Dihydrat 30 µL Igepal in 100 mL bidest. Wasser kurz vor der Verwendung in Aliquot zugeben: 0,05 µM SYTOX Green 0,5 mg/mL RNase

Anhang

Lyselösung 2	8,56 g Saccharose 1,5 g Zitronensäure In 100 mL bidest. Wasser kurz vor der Verwendung in Aliquot zugeben: 0,05 µM SYTOX Green
NaCl-Lösung	0,9 % NaCl in bidest. Wasser

8.1.3 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
12-Well Platten	TPP (Trasadingen, CH)
6-Well Platten	TPP (Trasadingen, CH)
24-Well Platten	Greiner Bio-One (Kremsmünster, AUT)
96-Well Platten	TPP (Trasadingen, CH)
96-Well Platten, weiß, transparenter Boden (ATP-Assay)	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Casy-Cups	Roche (Mannheim, DE)
Dynamic Array IFC	Fluidigm (San Francisco, USA)
Einmalspritze Omnifix® 3 mL	B. Braun (Melsungen, DE)
Eppendorf Reaktionsgefäße (1,5 und 2 mL)	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Folded Capillary Zeta Cell	Malvern Panalytical (Malvern, UK)
Glasfilterfritte 1 cm	Whatman (Maidstone, UK)
Glasfläschchen	Fisher Scientific (Waltham, USA)
Graphitrohr	Perkin Elmer (Waltham, USA)
Handschuhe (Latex)	VWR International (Radnor, USA)
Handschuhe (Nitril)	Ansell (Yarra City, AU)
Kanülen	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Kryoröhrchen	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Küvetten	Sarstedt (Nümbrecht, DE)

Parafilm	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Pasteurpipetten	Roth (Karlsruhe, DE)
PCR-8er-Streifen 0,2 mL mit Deckel	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Pipettenspitzen 20 µL	Brand (Wertheim, DE)
Pipettenspitzen 20 µL (qPCR)	Mettler-Toledo (Columbus, USA)
Pipettenspitzen 200 µL	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Pipettenspitzen 1000 µL	Brand (Wertheim, DE)
Pipettenspitzen 5000 µL	Eppendorf (Hamburg, DE)
Sample Cups 1,2 und 2,5 mL	Perkin Elmer (Waltham, USA)
Sterilfilter	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Sterilindikatorband	Roth (Karlsruhe, DE)
TEM-Gitternetz (Kupfer)	Plano (Wetzlar, DE)
Wägeschiffchen	Roth (Karlsruhe, DE)
Zellkulturflaschen (25, 75 und 175 cm ²)	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Zellkulturschalen (3,5 cm, 6 cm, 10 cm, 15 cm)	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Zentrifugenröhrchen (15 und 50 mL)	Sarstedt (Nümbrecht, DE)

8.1.4 Verwendete Kits

Kit	Hersteller
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega (Madison, USA)
LAL chromogenic endotoxin quantification kit	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Nuclear Extract Kit	Active Motif (Carlsbad, USA)
NucleoSpin® RNA Plus Kit	Macherey-Nagel (Düren, DE)
PCR Mykoplasma Test Kit I/C	PromoKine (Heidelberg, DE)

Glovebox Basic vinyl glove bag	Coy Laboratory Products (Grass Lake, USA)
IFC Controller HX	Fluidigm (San Francisco, USA)
Kühlschrank	Bosch (Gerlingen, DE)
LAS 3000 Luminescent Image Analyzer	Fujifilm (Minato, JPN)
Lichtmikroskop Axiovert 40 C	Zeiss (Oberkochen, DE)
Mehrkanalpipette 1-10 µL (8-Kanal)	Mettler-Toledo (Columbus, USA)
Messkolben 50 mL	Brand (Wertheim, DE)
Mikrotiterplattenlesegerät Infinite® M200 Pro	Tecan Group (Männedorf, CH)
Multipette DISTRIMAN®	Gilson (Middleton, USA)
NanoQuant Plate™	Tecan Group (Männedorf, CH)
PCR Workstation	Peqlab (Erlangen, DE)
pH-Meter pH 3210 mit pH-Elektrode SenTix® 41	WTW (Weilheim, DE)
Pipetus™ Pipettierhilfe	Hirschmann (Eberstadt, DE)
Rasterelektronenmikroskop	Zeiss (Oberkochen, DE)
Reinstwasseranlage Milli-Q	Merck Millipore (Darmstadt, DE)
Rotator	Labinco B.V. (Breda, NLD)
Schüttelinkubator	Heraeus (Hanau, DE)
Software „Aida Image Analyzer“	Raytest (Angleur, BEL)
Software „Beacon Designer 8.20“	Premier Biosoft (Palo Alto, USA)
Software „GenEx“	MultiD (Götevorg, SWE)
Software „ImageJ“	National Institutes of Health (Maryland, USA)
Software-Paket „MS-Office“	Microsoft (Redmond, USA)
Software „Real-Time PCR Analysis“	Fluidigm (San Francisco, USA)

Software „SPSS Statistics, Version 27“	IBM (New York, USA)
Software „Tecan iControl 1.10“	Tecan Group (Männedorf, CH)
Software „Zeta Sizer Software 7.12“	Bruker (Massachusetts, USA)
Sonifier W-250D	Branson Ultrasonics (Brookfield, USA)
Sterilwerkbank HERAsafeKS	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Thermocycler T100™	Bio-Rad (Hercules, USA)
Thermo Mixer C	Eppendorf (Hamburg, DE)
Tischzentrifuge 5417 R	Eppendorf (Hamburg, DE)
Tischzentrifuge Mini Star	VWR (Radnor, USA)
Transmissionselektronenmikroskop CM200 FEG	Philips (Amsterdam, NLD)
Ultraschallbad Sonorex RK 103 H	Bandelin (Berlin, DE)
Umwälzthermostat MA-26	Julabo (Seelbach, DE)
Ultratiefkühlschrank HERAFreeze Top	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Vortex-Genie 2T	Scientific Industries (New York, USA)
Waage Entris	Sartorius (Göttingen, DE)
Waage Cubis® II	Sartorius (Göttingen, DE)
Waage VWR 1502	Sartorius (Göttingen, DE)
Wasserbad	Memmert (Schwabach, DE)
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus (Hanau, DE)
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf (Hamburg, DE)
Zetasizer Nano ZS	Malvern Panalytical (Malvern, UK)

Anhang

Tabelle 25 Temperaturprogramm der Graphitrohr-AAS-Analyse von Kupfer.

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

Tabelle 26 Temperaturprogramm der Graphitrohr-AAS-Analyse von Nickel.

	Temperatur [°C]	Ramp Time [s]	Hold Time [s]	Gasstrom Argon [mL/min]
Trocknen 1	110	1	30	250
Trocknen 2	150	15	40	250
Pyrolyse	1100	10	20	250
Atomisierung	2300	0	5	0
Ausheizen	2500	1	3	250

Tabelle 27 Temperaturprogramm der Graphitrohr-AAS-Analyse von Silber.

	Temperatur [°C]	Ramp Time [s]	Hold Time [s]	Gasstrom Argon [mL/min]
Trocknen 1	110	1	30	250
Trocknen 2	130	15	30	250
Pyrolyse	800	10	20	250
Atomisierung	1700	0	5	0
Ausheizen	2450	1	3	250

Tabelle 28 Geräteeinstellungen am HTS (*High Throughput Sampler*)-Modul während der durchflusssyztometrischen Bestimmung von Mikrokernen.

Parameter	
Anzahl der Events (<i>Stopping Gate</i>)	1000
Flussrate Probe	0,5 µL/s
Probenvolumen	200 µL
Mischvolumen	100 µL
Mischgeschwindigkeit	180 µL
Anzahl der Mischungen	2
Waschvolumen	400 µL

8.2 Ergänzende Daten

Tabelle 29 Herstellung der Nanomaterial-Suspensionen.

EtOH: Ethanol (96 %); BSA: Bovines Serumalbumin, niedriger Endotoxingehalt; USS: Ultraschallspitze.

Material	Form	Einwiegen/ Abmessen	Herstellung Suspension	Aufarbei- tung
CuO NP	Pulver	15,36 mg	30 µl EtOH + 970 µl BSA (0,05 %) + 5 ml BSA (0,05 %)	13:25 min USS
Cu NP	Pulver	15,36 mg	30 µl EtOH + 970 µl BSA (0,05 %) + 5 ml BSA (0,05 %)	13:25 min USS
Cu NW	Pulver	15,36 mg	30 µl EtOH + 970 µl BSA (0,05 %) + 5 ml BSA (0,05 %)	20 s USS
Ni NP	Pulver	15,36 mg	30 µl EtOH + 970 µl BSA (0,05 %) + 5 ml BSA (0,05 %)	13:25 min USS
Ni NW	Pulver	15,36 mg	30 µl EtOH + 970 µl BSA (0,05 %) + 5 ml BSA (0,05 %)	13:25 min USS
Ag NP	Suspension (10 % in Wasser)	139,6 µl	30 µl EtOH + 860 µl BSA (0,05 %) + 5 ml BSA (0,05 %)	13:25 min USS
Ag NW	Suspension (4 %wt, Ethylenglycol)	384 mg (345,6 µl)	30 µl EtOH + 624 µl BSA (0,05 %) + 5 ml BSA (0,05 %)	Magnetrührer
CeO ₂ NP	Pulver	15,36 mg	30 µl EtOH + 970 µl BSA (0,05 %) + 5 ml BSA (0,05 %)	13:25 min USS
TiO ₂ NP	Pulver	15,36 mg	30 µl EtOH + 970 µl BSA (0,05 %) + 5 ml BSA (0,05 %)	13:25 min USS
CNT	Pulver	15,36 mg	30 µl EtOH + 970 µl BSA (0,05 %) + 5 ml BSA (0,05 %)	13:25 min USS

Tabelle 30 Dosisauswahl für Zellkulturexperimente basierend auf Daten des ATP-Assays.

Die angeführten Konzentrationen wurden für alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellkulturmodelle verwendet. # Angepasste Dosis für RLE-6TN-Zellen.

Material	Dosis [$\mu\text{g}/\text{mL}$]		
	Niedrig	Mittel	Hoch
CuO NP	10	25	50
Cu NP	1	5	10
Cu NW	1	10	50
Ni NP	1	10	50
Ni NW	10	50	100
Ag NP	10	50	100/75 [#]
Ag NW	5	50	100
CeO ₂ NP	1	50	100
TiO ₂ NP	1	50	100
CNT			100

Tabelle 31 Löslichkeit der verwendeten Nanomaterialien im dynamischen System nach 168 h in phagolysosomaler Modellflüssigkeit (PSF).

Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit der BASF SE erhoben.

Material	Dynamische Löslichkeit in PSF [% gelöst]
CuO NP	97,3
Cu NP	45,5
Cu NW	35
Ni NP	63,2
Ni NW	94,4
Ag NP	1,6
Ag NW	11
CeO ₂ NP	0,3
TiO ₂ NP	0,3

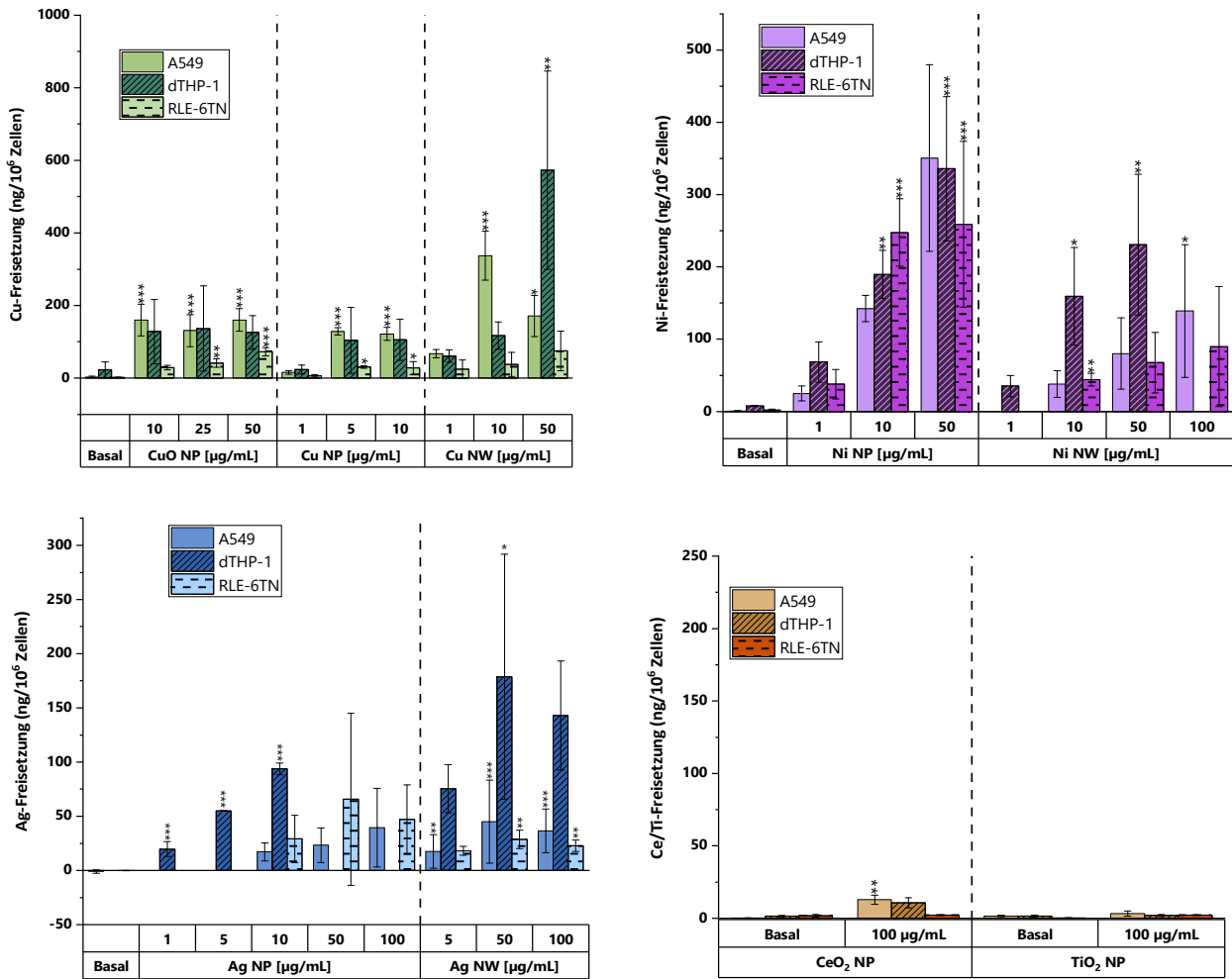


Abbildung 31 Bioverfügbarkeit der Kupfer-, Nickel- und Silbernanomaterialien sowie der CeO₂ NP und TiO₂ NP in den Zelllinien A549, dTHP-1 und RLE-6TN.

Die Zellen wurden für 24 h mit den Nanomaterialien inkubiert. Die Bioverfügbarkeit ist als Ionenfreisetzung pro 10⁶ Zellen dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen ± SD. Statistisch signifikante Abweichungen gegenüber der unbehandelten Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett-T-Test (*p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001).

8.3 Etablierung zusätzlicher Primer für die HT RT-qPCR

8.3.1 Inflammatorische und fibrotische Marker zur Ergänzung des humanen Gen-Sets

8.3.1.1 Ausgewählte Gene und codierte Proteine

Tabelle 32 Korrespondierende Proteine zu den Inflammations- und Fibrose-bezogenen Genen zur Ergänzung des humanen Gen-Sets.

Gen	Codiertes Protein
<i>ACTA2</i>	actin alpha 2, smooth muscle
<i>CCL22</i>	C-C motif chemokine ligand 22
<i>COL1A1</i>	collagen type I alpha 1 chain
<i>CTNNB1</i>	catenin beta 1
<i>FN1</i>	fibronectin 1
<i>IL1A</i>	interleukin 1 alpha
<i>IL1B</i>	interleukin 1 beta
<i>IL6</i>	interleukin 6
<i>PDGFA</i>	platelet derived growth factor subunit A
<i>PTGS2 (COX2)</i>	prostaglandin-endoperoxide synthase 2
<i>SPP1 (OPN)</i>	secreted phosphoprotein 1
<i>TGFB1</i>	transformin growth factor beta 1
<i>TIMP1</i>	TIMP metalloproteinase inhibitor 1
<i>TNF</i>	tumor necrosis factor
<i>VIM</i>	vimentin

8.3.1.2 Primer-Sequenzen

Tabelle 33 Gen-Namen, Gen-IDs, Reference Sequence Accession Nummern (RefSeq) sowie forward (fwd) und reverse (rev) Primer-Sequenzen.

*Primer-Sequenzen wurden im Rahmen der zuvor durchgeführten Masterarbeit designet und in Teilen etabliert. Die abschließende Etablierung erfolgte im Rahmen der vorliegenden Dissertation.

Gen	Gen-ID	RefSeq	Primer-Sequenz 5'→3'	
<i>ACTA2</i>	59	NM_001141945.2	fwd:	GACCTTTGGCTTGGCTTGT
			rev:	GGTGCGGACAGGAATTGAAG
<i>CCL22</i>	6367	NM_002990.5	fwd:	CGTCTGCTGCCGTGATTAC
			rev:	AGTAGGCTCTTCATTGGCTCAG
<i>COL1A1</i>	1277	NM_000088.3	fwd:	GCCAAGACGAAGACATCCC
			rev:	GTGGTTTCTTGGTCGGTGG
<i>CTNNB1</i>	1499	NM_001098209	fwd:	CTGAGGAAGAGGATGTGGATACC
			rev:	TGAGCAGCATCAAACGTGTAGA
<i>FN1</i>	2335	NM_001306129.1	fwd:	CGGTGGCTGTCAGTCAAAG
			rev:	ACCTCGGCTTCCTCCATAAC
<i>IL1A</i>	3552	NM_000575.5	fwd:	GAATGACGCCCTCAATCAAAGT
			rev:	GCAGCACTGGTTGGTCTTC
<i>IL1B*</i>	3553	NM_000576.2	fwd:	GAGGCACAAGGCACAACA
			rev:	CCTGGAAGGAGCACTTCATCT
<i>IL6*</i>	3569	NM_000600.4	fwd:	CCAATCTGGATTCAATGAGGAGAC
			rev:	GCAGGAAGTGGATCAGGACTT
<i>PDGFA</i>	5154	NM_002607.5	fwd:	CGATGAGGACCTTGGCTTG
			rev:	CTTCTCGGGCACATGCTTAG
<i>PTGS2 (COX2)</i>	5743	NM_000963.4	fwd:	CCGAGGTGTATGTATGAGTGTGG
			rev:	TGTGTTTGGAGTGGGTTTCAGA
<i>SPP1 (OPN)</i>	6696	NM_000582.2	fwd:	TGAATCTGATGAACTGGTCACTGA
			rev:	TGATGTCCTCGTCTGTAGCA
<i>TGFB1*</i>	7040	NM_000660.5	fwd:	GGAAACCCACAACGAAATCTATGA
			rev:	GCTGAGGTATCGCCAGGAAT
<i>TIMP1</i>	7076	NM_003254.3	fwd:	GATACTTCCACAGGTCCCACAAC
			rev:	GGTCCGTCCACAAGCAATGA
<i>TNF</i>	7124	NM_000594.4	fwd:	ACACCATGAGCACTGAAAGC
			rev:	CCAGAGGGCTGATTAGAGAGA
<i>VIM</i>	7431	NM_003380.5	fwd:	AAGACGGTTGAACTAGAGATGGA
			rev:	TGTAGGAGTGTGGTTGTTAAGAA

8.3.1.3 Bestimmung der Spezifität und Effizienz der Primer-Paare

Die Primer-Spezifität wurde über eine Agarose-Gelelektrophorese bestimmt. Beispielhaft wurde eines der Gele bereits in Abbildung 5 in Kapitel 5.1.2 dargestellt. Die Effizienz-Prüfung ist beispielhaft im Folgenden dargestellt.

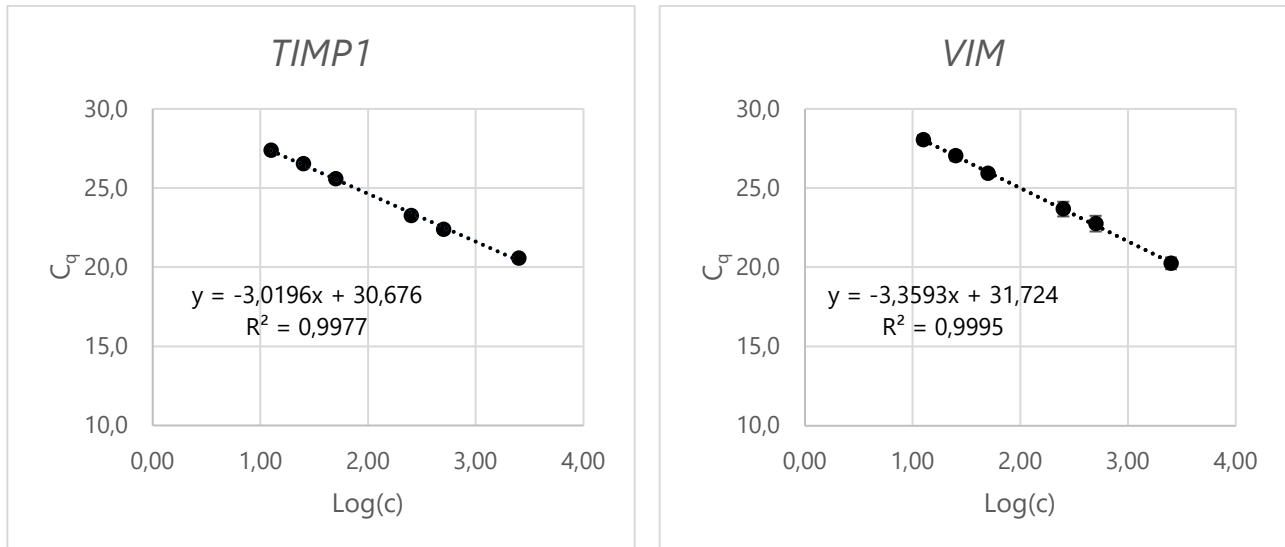


Abbildung 32 Beispielhafte Darstellung der Evaluation der Primer-Effizienz.

Gezeigt sind die Kalibriergeraden für die Genen *TIMP1* (links) und *VIM* (rechts) mit entsprechender linearer Regressionstrendlinie und dem Korrelationskoeffizient R^2 . Es wurden sechs Verdünnungen einer Standard-cDNA (0-200-fach) mit den Primer-Paaren in einer konventionellen qPCR umgesetzt. In der Graphik ist der \log_{10} der relativen cDNA-Konzentration gegen den C_q -Wert aufgetragen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen \pm Standardabweichung.

Tabelle 34 Zusammenstellung der Parameter zur Beurteilung der Primer-Effizienz.

Dargestellt sind die Steigung, der Korrelationskoeffizient (R^2) sowie die Effizienz. *Daten wurden im Rahmen der vorangegangenen Masterarbeit ermittelt.

Gen	Steigung	R^2	Effizienz
<i>ACTA2</i>	-3,1441	0,9974	1,08
<i>CCL22</i>	-3,5608	0,9974	0,91
<i>COL1A1</i>	-3,1221	0,9979	1,09
<i>CTNNB1</i>	-3,2042	0,9823	1,05
<i>FN1</i>	-3,1366	0,997	1,08
<i>IL1A</i>	-3,5588	0,9986	0,91
<i>IL1B</i>	-3,2612	0,9954	1,03
<i>IL6*</i>	-2,8826	0,9168	1,22
<i>PDGFA</i>	-3,2844	0,9906	1,02
<i>PTGS2 (COX2)</i>	-3,3981	0,9992	0,97

Anhang

<i>SPP1 (OPN)</i>	-3,0959	0,9956	1,10
<i>TGFB1</i>	-3,1704	0,9941	1,07
<i>TIMP1</i>	-3,0196	0,9977	1,14
<i>TNF</i>	-3,5388	0,9992	0,92
<i>VIM</i>	-3,3593	0,9995	0,98

8.3.2 Etablierung eines Gensets zur Untersuchung der Genexpression in Rattenzellen

8.3.2.1 Ausgewählte Gene und codierte Proteine

Tabelle 35 Korrespondierende Proteine der ausgewählten Gene zur Untersuchung der Genexpression in Rattenzellen.

Gen	Codiertes Protein
<i>ACTA2</i>	actin alpha 2, smooth muscle
<i>APAF1</i>	apoptotic peptidase activating factor 1
<i>APEX1</i>	apurinic/apyrimidinic endodeoxyribonuclease 1
<i>ATG7</i>	autophagy related 7
<i>ATM</i>	ATM serine/threonine kinase
<i>ATR</i>	ATR serine/threonine kinase
<i>B2M</i>	beta-2 microglobulin
<i>BAK1</i>	BCL2-antagonist/killer 1
<i>BBC3</i>	Bcl-2 binding component 3
<i>BCL2</i>	BCL2, apoptosis regulator
<i>BIK</i>	BCL2-interacting killer
<i>BRCA1</i>	BRCA1, DNA repair associated
<i>BRCA2</i>	BRCA2, DNA repair associated
<i>BTRC</i>	beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase
<i>CAT</i>	catalase
<i>CCL22</i>	C-C motif chemokine ligand 22
<i>CCND1</i>	cyclin D1
<i>CDKN1A</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
<i>CDKN1B</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
<i>CDKN2B</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B
<i>COL1A1</i>	collagen type I alpha 1 chain
<i>CTNNB1</i>	catenin beta 1
<i>CXCL1 (IL8)</i>	C-X-C motif chemokine ligand 1

<i>CYP1A1</i>	cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1
<i>DDB1</i>	damage-specific DNA binding protein 1
<i>DDB2</i>	damage-specific DNA binding protein 2
<i>E2F1</i>	E2F transcription factor 1
<i>EGFR</i>	epidermal growth factor receptor
<i>ERCC1</i>	ERCC excision repair 1
<i>ERCC4/XPF</i>	ERCC excision repair 4, endonuclease catalytic subunit
<i>ERCC5/XPG</i>	ERCC excision repair 5, endonuclease
<i>FN1</i>	fibronectin 1
<i>FTH1</i>	ferritin heavy chain 1
<i>G6PD</i>	glucose-6-phosphate dehydrogenase
<i>GADD45A</i>	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
<i>GCLC</i>	glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit
<i>GPX1</i>	glutathione peroxidase 1
<i>GPX2</i>	glutathione peroxidase 2
<i>GSR</i>	glutathione-disulfide reductase
<i>GUSB</i>	glucuronidase, beta
<i>HMOX1</i>	heme oxygenase 1
<i>HPRT1</i>	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
<i>HSPA1A</i>	heat shock protein family A (Hsp70) member 1A
<i>IL1A</i>	interleukin 1 alpha
<i>IL1B</i>	interleukin 1 beta
<i>IL6</i>	interleukin 6
<i>JUN</i>	Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit
<i>KEAP1</i>	Kelch-like ECH-associated protein 1
<i>LIG1</i>	DNA ligase 1
<i>LIG3</i>	DNA ligase 3
<i>MAP1LC3B</i>	microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta
<i>MAP3K5</i>	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5
<i>MAPK14</i>	mitogen activated protein kinase 14
<i>MARCHF5</i>	membrane associated ring-CH-type finger 5
<i>MDM2</i>	MDM2 proto-oncogene
<i>MGMT</i>	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
<i>MLH1</i>	mutL homolog 1

<i>MSH2</i>	mutS homolog 2
<i>MT1</i>	metallothionein 1
<i>MYC</i>	MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor
<i>NAT1</i>	N-acetyltransferase 1
<i>NFE2L2</i>	nuclear factor erythroid 2-related factor 2
<i>NFKB1</i>	nuclear factor kappa B subunit 1
<i>NFKB2</i>	nuclear factor kappa B subunit 2
<i>NFKBIA</i>	NFKB inhibitor alpha
<i>NQO1</i>	NAD(P)H quinone dehydrogenase 1
<i>PARP1</i>	poly (ADP-ribose) polymerase 1
<i>PCNA</i>	proliferating cell nuclear antigen
<i>PDGFA</i>	Platelet derived growth factor subunit A
<i>PLK3</i>	polo-like kinase 3
<i>POLD1</i>	DNA polymerase delta 1, catalytic subunit
<i>POLQ</i>	DNA polymerase theta
<i>PPM1D</i>	protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1D
<i>PRDX1</i>	peroxiredoxin 1
<i>PTGS2 (COX2)</i>	prostaglandin-endoperoxide synthase 2
<i>RAD50</i>	RAD50 double strand break repair protein
<i>RAD51</i>	RAD51 recombinase
<i>RPRM</i>	reprimin, TP53 dependent G2 arrest mediator homolog
<i>SIRT2</i>	sirtuin 2
<i>SLC30A1</i>	solute carrier family 30 member 1
<i>SOD1</i>	superoxide dismutase 1
<i>SOD2</i>	superoxide dismutase 2
<i>SPP1 (OPN)</i>	secreted phosphoprotein 1
<i>TFRC</i>	transferrin receptor
<i>TGFB1</i>	transformin growth factor beta 1
<i>TIMP1</i>	TIMP metalloproteinase inhibitor 1
<i>TNF</i>	tumor necrosis factor
<i>TNFRSF10B</i>	TNF receptor superfamily member 10b
<i>TXN1</i>	thioredoxin 1
<i>TXNRD1</i>	thioredoxin reductase 1
<i>VEGFA</i>	vascular endothelial growth factor A

<i>VIM</i>	vimentin
<i>XIAP</i>	X-linked inhibitor of apoptosis
<i>XPA</i>	XPA, DNA damage recognition and repair factor
<i>XPC</i>	XPC complex subunit, DNA damage recognition and repair factor

8.3.2.2 Primer-Sequenzen des Gen-Sets zur Untersuchung von Rattenzellen

Tabelle 36 Gen-Namen, Gen-IDs, Reference Sequence Accession Nummern (RefSeq) sowie forward (fwd) und reverse (rev) Primer-Sequenzen.

Gen	Gen-ID	RefSeq	Primer-Sequenz 5'→3'	
<i>ACTA2</i>	81633	NM_031004.2	fwd:	CCGCTCTGTCTCTAGCACAC
			rev:	AACTGAAGGCGCTGATCCA
<i>APAF1</i>	78963	NM_023979.2	fwd:	GCGTTCCTCAGATGACAGTTA
			rev:	AGGTGGTTGCTCTTATTGGTGAA
<i>APEX1</i>	79116	NM_024148.1	fwd:	ACTCAAGATATGCTCCTGGAATGT
			rev:	GCCCACACCACTATATCCTTCT
<i>ATG7</i>	312647	NM_001012097.1	fwd:	TGCTGGTCTCCTTGCTCAA
			rev:	AACTGCCGCTCCATCTGT
<i>ATM</i>	300711	NM_001106821.1	fwd:	AACCTCCAGACAGAAGAAGATGC
			rev:	CCACTGCTGCTGAGACACT
<i>ATR</i>	685055	XM_003750561.4	fwd:	CCGACCTCTGTGATGTTACTTG
			rev:	ATGTGGCAGGATGGAGTTG
<i>B2M</i>	24223	NM_012512.2	fwd:	CGTCGTGCTTGCCATTCA
			rev:	TTGAGGTGGGTGGAAGTGA
<i>BAK1</i>	116502	NM_053812.1	fwd:	CTACGACACGGAGTTCCAGAA
			rev:	TAGCCAAAGCCCAGGAGAG
<i>BBC3</i>	317673	NM_173837.2	fwd:	AGCCCAACTAGGTGCCTAC
			rev:	CCAAGTCCGTATCTCCATCAGT
<i>BCL2</i>	24224	NM_016993.2	fwd:	GCAGAGATGTCCAGTCAGC
			rev:	AAATCAAACAGAGGTCGCATG
<i>BIK</i>	114496	NM_053704.1	fwd:	TCACTATACCTCAGGAGCGTTACT
			rev:	CCAGTAGATTCCGTGCCTCAA
<i>BRCA1</i>	497672	NM_012514.1	fwd:	CTTCTGAATGAGGACGCTTCTATC
			rev:	AGACAACTGGACACTGAGACT
<i>BRCA2</i>	360254	NM_031542.2	fwd:	GCAGCACAGCAGATTTAGGA
			rev:	AAGGTGACTGGTCTAGTGGTAG
<i>BTRC</i>	361765	NM_001007148.2	fwd:	AGAAGACTGTAATAATGGCGAACC
			rev:	GAGAGTTTCCGCTGCTTGG

Anhang

<i>CAT</i>	24248	NM_012520.2	fwd:	AGATGGCACACTTTGACAGAGA
			rev:	GAGAATCGGACGGCAATAGGA
<i>CCL22</i>	117551	NM_057203.1	fwd:	ATCTGCTGCCAGGACTACATC
			rev:	TGCTGAGCCTTGTGGAGAC
<i>CCND1</i>	58919	NM_171992.4	fwd:	CTACCGCACAAACGCACTT
			rev:	GCAGGCTTGACTCCAGAAG
<i>CDKN1A</i>	114851	NM_080782.4	fwd:	TGTCGCTGTCTTGCACTCT
			rev:	GCACTTCAGGGCTTTCTCTTG
<i>CDKN1B</i>	83571	NM_031762.3	fwd:	CTTCGACGCCAGACGTAAAC
			rev:	TCAGTGCTTATACAGGATGTCCAT
<i>CDKN2B</i>	25164	NM_130812.3	fwd:	GTTCTGGGACCCTCTATCTTTCA
			rev:	CCTCTAGCCTGTGGATCTTCTG
<i>COL1A1</i>	29393	NM_053304.1	fwd:	TGTGCGATGGCGTGCTAT
			rev:	ATGACTTCTGCGTCTGGTGAT
<i>CTNNB1</i>	84353	NM_053357.2	fwd:	AGACTGCTGATCTCGGACTG
			rev:	GCCGTATCCACCAGAGTGA
<i>CXCL1 (IL8)</i>	81503	NM_030845.1	fwd:	AAGGTGTTGAGCGGGAAGA
			rev:	GAGACGAGAAGGAGCATTGGTTA
<i>CYP1A1</i>	24296	NM_012540.3	fwd:	CATTGTGCCTGCCTCCTAC
			rev:	GGTCTCCTAGTTGATGCTGAAC
<i>DDB1</i>	64470	NM_171995.2	fwd:	TATGTGGTCACCGCAGAAGG
			rev:	TGCCAATGATGCCAGTCTCT
<i>DDB2</i>	100362121	NM_001271346.1	fwd:	CTCCAAGAAATGCCCAGAAAC
			rev:	GACAATGCTGCTGCTCCTC
<i>E2F1</i>	399489	NM_001100778.1	fwd:	AGGACTCAGACATCCAGCG
			rev:	GCAGAATCCACAGCTTGTAGTTG
<i>EGFR</i>	24329	NM_031507.1	fwd:	AGGGACTGCGAGAACCAA
			rev:	GAGCCTGTTACTTGTGCCTTG
<i>ERCC1</i>	292673	NM_001106228.1	fwd:	ACCCACCAGGAAGAAGTTTGTTA
			rev:	ATGGCGTACTCTGCGTATGT
<i>ERCC4/XPF</i>	304719	XM_017597787.1	fwd:	CGACAAGACAATCCGCCATTAC
			rev:	GCACGAGCATTACGAACAT
<i>ERCC5/XPG</i>	301382	XM_017596802.1	fwd:	AGGAGAGTGGTTGCTGAAGA
			rev:	TTGCTGGAAGAAGGAAGAGATTC
<i>FN1</i>	25661	NM_019143.2	fwd:	AGCAAGCCTGAACCTGAAGA
			rev:	CTCCAACATATAGCCACCAGTCT
<i>FTH1</i>	25319	NM_012848.2	fwd:	ACAGTGCTTGAACGGAACC

Anhang

			rev:	AGACGCGGTGGTCATGAT
<i>G6PD</i>	24377	NM_017006.2	fwd:	TGAGTCAGACAGGCTGGAAC
			rev:	AGGTAGTGGTCAATGCGGTAG
<i>GADD45A</i>	25112	NM_024127.2	fwd:	TGTAGTTACTCAAGCAGTCACTCC
			rev:	AGTCTCACCTCTCTCTCCTTCT
<i>GCLC</i>	25283	NM_012815.2	fwd:	CATCTACCACGCAGTCAAGGA
			rev:	CATCGCCGCCATTTCAGTAAC
<i>GPX1</i>	24404	NM_030826	fwd:	ATCTCAGCCCCATCCAGTTAAAAG
			rev:	GAGCCGAGCAGCAGACATA
<i>GPX2</i>	29326	NM_183403	fwd:	CCTGCCACCCATTTCTTTAG
			rev:	GAAGATGCCATCATTCTGTGAAGA
<i>GSR</i>	116686	NM_053906	fwd:	ATCCACGGCTACGCAACA
			rev:	CGCAATCTCCACGGCAATG
<i>GUSB</i>	24434	NM_017015	fwd:	TCCTTGGAGGTGACGATGAC
			rev:	TGTTGACGCCTTGAAGTAGA
<i>HMOX1</i>	24451	NM_012580.2	fwd:	CGCCTTCCTGCTCAACAT
			rev:	AGCGGTGTCTGGGATGAA
<i>HPRT1</i>	24465	NM_012583	fwd:	AGCGTCGTGATTAGTGATGATGA
			rev:	GCAAGTCTTTCAGTCTGTCCATA
<i>HSPA1A</i>	24472	NM_212504	fwd:	GCTATCAGAGGACAGGACACA
			rev:	GATGGCTGCTTGGCTTCTC
<i>IL1A</i>	24493	NM_0170019.1	fwd:	CCTGTGTTGCTGAAGGAGATT
			rev:	GCTGCGGATGTGAAGTAGTT
<i>IL1B</i>	24494	NM_031512.2	fwd:	ATGCCTCGTGCTGTCTGA
			rev:	GGGTGTGCCGTCTTTCATC
<i>IL6</i>	24498	NM_012589.2	fwd:	CCACCCACAACAGACCAGTATA
			rev:	TCCAGAAGACCAGAGCAGATT
<i>JUN</i>	24516	NM_021835.3	fwd:	GTGAAGTGACCGACTGTTCTATGA
			rev:	CTTAGGGTTACTGTAGCCGTAGG
<i>KEAP1</i>	117519	NM_057152.2	fwd:	GCGTGCTCGGGAGTATATCTAC
			rev:	GCATGGAACACCTCGGACT
<i>LIG1</i>	81513	NM_001024268.2	fwd:	GTTGGTGATGGTGCCTCCT
			rev:	TGAGTGCTTCGGCTGTTCT
<i>LIG3</i>	303369	NM_001012011	fwd:	GGAACAGATAAGCCAGCACATTG
			rev:	TCACATTTACTTGC GGACAGACT
<i>MAP1LC3B</i>	64862	NM_022867.2	fwd:	GGACCTGCTGCCTTCTCTAA
			rev:	TCCTATACACCTGACCTGTTTCG

Anhang

<i>MAP3K5</i>	365057	NM_001277694.1	fwd: AGAAGAAGACACAGCCCAA rev: CGGAGAAACGGAGCCATACT
<i>MAPK14</i>	81649	NM_031020.2	fwd: CCAAATACCATTCAAGTGCCTCTT rev: AACGGACAGACAGACAGACA
<i>MARCHF5</i>	294079	NM_001106372.2	fwd: CTTATGGAGCAGTGACAGTGATG rev: CGAGGAACAGGACAACCAATC
<i>MDM2</i>	314856	NM_001108099.1	fwd: CGTAAGTGACCATTCTGCTGATT rev: CTCCTGCCTGATAGACTGTGA
<i>MGMT</i>	25332	NM_012861.1	fwd: GAGCCTGTGTACCGTTCCA rev: TCTCCCACTGAGAAATCGTATCC
<i>MLH1</i>	81685	NM_031053.1	fwd: GACGGTAGTGAATCGCATAGC rev: GTGCCATTGTCTTGGATCTGAAT
<i>MSH2</i>	81709	NM_031058.1	fwd: AAGGCTTCTCCTGGCAATCT rev: CCAACTCCAACCTGTCTCTGA
<i>MT1</i>	24567	NM_138826.4	fwd: CACCGTTGCTCCAGATTCAC rev: TTACACCTGAGGGCAGCA
<i>MYC</i>	24577	NM_012603.2	fwd: AGTGTTCTCTGCCTCTGCC rev: CGTGACTGTCGGGTTTTCC
<i>NAT1</i>	116631	NM_001037315.1	fwd: TCAGAGAACAGCAGGAAGTAAAGT rev: TGTCATTGTCTTGGCACCTAATC
<i>NFE2L2</i>	83619	NM_031789.2	fwd: CCAGCACATCCAGACAGACA rev: TATCCAGGGCAAGCGACTC
<i>NFKB1</i>	81736	NM_001276711.1	fwd: CGGATGACAGAGGCGTGATAAG rev: CTGGCGGATGATCTCCTTCTC
<i>NFKB2</i>	309452	NM_001008349.1	fwd: GTGTCCTGCATGTAACCAAGAAG rev: GAGAAGCGTAGCCGTACAATG
<i>NFKBIA</i>	25493	NM_001105720.2	fwd: GTAACCTACCAGGGCTACTCC rev: GGCAACTCATCTTCCGTGAATT
<i>NQO1</i>	24314	NM_017000.3	fwd: GGTGAGAAGAGCCCTGATTGTA rev: TTCCTTATACGCCAGAGATGACT
<i>PARP1</i>	25591	NM_013063.3	fwd: GACGAGGTGGATGGAATAGATGAA rev: CTTGCTGCTGGTTGAAGATGAG
<i>PCNA</i>	25737	NM_022381.3	fwd: CATATTGGAGATGCTGTGGTGA rev: ACTGAGTGTTACTGTAGGAGACA
<i>PDGFA</i>	25266	NM_012801.1	fwd: AGCCATCCCCGCAGTTTG rev: GCTTCTTCCTGACATACTCCACTT
<i>PLK3</i>	58936	NM_022187.1	fwd: CACCAGCACGAAGCACTT

Anhang

			rev:	GTCACTGAACAGCATGAGAAGG
<i>POLD1</i>	59294	NM_021662.2	fwd:	GCTATGAACGGGAAGAAGACCT
			rev:	GAAGGAGGAGTCACGGATGTT
<i>POLQ</i>	288079	NM_001105878.1	fwd:	TGTCACTCGGAAGTCAGCAT
			rev:	G TTCAGCATT CAGCCAGGAAG
<i>PPM1D</i>	287585	NM_001105825.2	fwd:	CAGGATGACCCAAAGGATGATTT
			rev:	ACTACACGATTCACTCCAGACTT
<i>PRDX1</i>	117254	NM_057114	fwd:	GCTCACGGTTGGTTCTGTT
			rev:	GTGGCTTTGAAGCTGGGA
<i>PTGS2 (COX2)</i>	29527	NM_017232.3	fwd:	AATCAAATTACTGCTGAAGCCCAC
			rev:	CCGAAGGAAGGGAATGTTGTTCC
<i>RAD50</i>	64012	NM_02246.1	fwd:	CAGGTACGACAGACACAAGGT
			rev:	GGCGATTCTTCAATGGCTCAA
<i>RAD51</i>	499870	NM_001109204.1	fwd:	AGGTGGAGGTGAAGGGAAAG
			rev:	GGTCTGGTGGTCTGTGTTGA
<i>RPRM</i>	680110	NM_001044276.1	fwd:	AGACTTCGGGACTCAGCAG
			rev:	GCAGCGTGGCGTATAAACA
<i>SIRT2</i>	361532	NM_001008368	fwd:	CACGGCACCTTCTACACATC
			rev:	ACATTCTGACACTTCTCACACTTG
<i>SLC30A1</i>	58976	NM_022853.2	fwd:	CCAACACGCTAGTGGCTAAC
			rev:	GACTGTCTGACTCCTGGATGA
<i>SOD1</i>	24786	NM_017050.1	fwd:	GGAAGCATGGCGATGAAGG
			rev:	TCTGTCCTGACACCACA ACTG
<i>SOD2</i>	24787	NM_017051.2	fwd:	TGGACAAACCTGAGCCCTA
			rev:	CAGCCTGAACCTTGGACTC
<i>SPP1 (OPN)</i>	25353	NM_012881.2	fwd:	CGCATTACAGCAAACACTCAGA
			rev:	TCGTCATCGTCGTCGTCAT
<i>TFRC</i>	64678	NM_022712.1	fwd:	TCAAGCCAGATCAGCATTCTCT
			rev:	GCCTTCATGTTACTGTCAGCATT
<i>TGFB1</i>	59086	NM_021578.2	fwd:	CCGCAACAACGCAATCTATGA
			rev:	ACCAAGGTAACGCCAGGAA
<i>TIMP1</i>	116510	NM_053819.1	fwd:	AGAGACACGCTAGAGCAGATAC
			rev:	ACGCTGGTATAAGGTGGTCT
<i>TNF</i>	24835	NM_012675.3	fwd:	GGCTCCCTCTCATCAGTTCC
			rev:	TCCTCCGCTTGGTGGTTT
<i>TNFRSF10B</i>	364420	NM_001108873.1	fwd:	TCACCACAACACGGAACCT
			rev:	GAGCCACTTCAGCAGCATT

Anhang

<i>TXN1</i>	116484	NM_053800.3	fwd: AATGTGGTGTTCTTGAAGTAGAC rev: GCATGATTAGGCAAACCTCCGTAA
<i>TXNRD1</i>	58819	NM_031614.3	fwd: GTTCAACCTTCCCTGTAGACTGT rev: CGACCGTGCTGTGGATAGT
<i>VEGFA</i>	83785	NM_001287110.1	fwd: ACCCTGGCTTTACTGCTGTA rev: CGTCCATGAACTTCACCACT
<i>VIM</i>	81818	NM_031140.1	fwd: CCTCGCTCTCTTCTTGCAGATC rev: TGTAGGTGCGGGTGGATGT
<i>XIAP</i>	63879	NM_022231.2	fwd: GAATCTGTGGTAAGAAGCTGCTGAA rev: GACTTGACTCATCCTGCGAAT
<i>XPA</i>	298074	NM_001106656.1	fwd: GGAGGCGTGACCAGCATAA rev: GCTATCGCATGTTGGCAAATCG
<i>XPC</i>	312560	NM_001107874.1	fwd: GTCCAAGAATCTCAAGGCTGTG rev: AGTCATCCTCGCTGTCATCT

Tabelle 37 Zusammenstellung der Parameter zur Beurteilung der Primer-Effizienz.

Dargestellt sind die Steigung, der Korrelationskoeffizient (R^2) sowie die Effizienz.

Gen	Steigung	R^2	Effizienz
<i>ACTA2</i>	-3,3020	0,9994	1,01
<i>APAF1</i>	-3,0832	0,9992	1,11
<i>APEX1</i>	-3,4074	0,9999	0,97
<i>ATG7</i>	-3,2926	0,9977	1,01
<i>ATM</i>	-3,4997	1,0000	0,93
<i>ATR</i>	-3,2639	0,9984	1,02
<i>B2M</i>	-3,5555	0,9977	0,91
<i>BAK1</i>	-3,3051	0,9970	1,01
<i>BBC3</i>	-3,3350	1,0000	0,99
<i>BCL2</i>	-3,4152	0,9994	0,96
<i>BIK</i>	-3,2526	0,9978	1,03
<i>BRCA1</i>	-3,3603	0,9997	0,98
<i>BRCA2</i>	-3,4824	0,9994	0,94
<i>BTRC</i>	-3,4808	0,9999	0,94
<i>CAT</i>	-3,3522	0,9978	0,99
<i>CCL22</i>	-3,3240	0,9997	1,00
<i>CCND1</i>	-3,2914	0,9997	1,01

Anhang

<i>CDKN1A</i>	-3,3560	0,9969	0,99
<i>CDKN1B</i>	-3,2281	0,9998	1,04
<i>CDKN2B</i>	-3,2941	0,9998	1,01
<i>COL1A1</i>	-3,2781	0,9996	1,02
<i>CTNNB1</i>	-3,2571	0,9991	1,03
<i>CXCL1 (IL8)</i>	-3,4456	0,9994	0,95
<i>CYP1A1</i>	-3,2968	0,9993	1,01
<i>DDB1</i>	-3,3961	0,9997	0,97
<i>DDB2</i>	-3,3645	0,9997	0,98
<i>E2F1</i>	-3,2937	0,9988	1,01
<i>EGFR</i>	-3,3568	0,9996	0,99
<i>ERCC1</i>	-3,3821	0,9989	0,98
<i>ERCC4/XPF</i>	-3,3685	0,9996	0,98
<i>ERCC5/XPG</i>	-3,2804	0,9992	1,02
<i>FN1</i>	-3,3364	0,9997	0,99
<i>FTH1</i>	-3,4265	0,9988	0,96
<i>G6PD</i>	-3,3793	0,9991	0,98
<i>GADD45A</i>	-3,2519	0,9964	1,03
<i>GCLC</i>	-3,3139	0,9994	1,00
<i>GPX1</i>	-3,3795	0,9997	0,98
<i>GPX2</i>	-3,3425	0,9981	0,99
<i>GSR</i>	-3,4467	0,9994	0,95
<i>GUSB</i>	-3,3595	0,9997	0,98
<i>HMOX1</i>	-3,3798	0,9998	0,98
<i>HPRT1</i>	-3,3955	0,9994	0,97
<i>HSPA1A</i>	-3,4532	1,0000	0,95
<i>IL1A</i>	-3,2979	0,9998	1,01
<i>IL1B</i>	-3,2510	0,9997	1,03
<i>IL6</i>	-3,2047	0,9993	1,05
<i>JUN</i>	-3,2313	0,9971	1,04
<i>KEAP1</i>	-3,3836	0,9975	0,97
<i>LIG1</i>	-3,2987	0,9997	1,01
<i>LIG3</i>	-3,3594	0,9991	0,98
<i>MAP1LC3B</i>	-3,1729	0,9982	1,07

Anhang

<i>MAP3K5</i>	-3,2591	0,9991	1,03
<i>MAPK14</i>	-3,2518	0,9977	1,03
<i>MARCHF5</i>	-3,2556	0,9985	1,03
<i>MDM2</i>	-3,4160	0,9995	0,96
<i>MGMT</i>	-3,3878	0,9999	0,97
<i>MLH1</i>	-3,2305	0,9984	1,04
<i>MSH2</i>	-3,4088	0,9987	0,96
<i>MT1</i>	-3,4006	0,9986	0,97
<i>MYC</i>	-3,2552	0,9997	1,03
<i>NAT1</i>	-3,3226	0,9996	1,00
<i>NFE2L2</i>	-3,2740	0,9985	1,02
<i>NFKB1</i>	-3,2951	0,9994	1,01
<i>NFKB2</i>	-3,2444	0,9993	1,03
<i>NFKBIA</i>	-3,4144	0,9999	0,96
<i>NQO1</i>	-3,2999	0,9991	1,01
<i>PARP1</i>	-3,5267	0,9999	0,92
<i>PCNA</i>	-3,3966	0,9973	0,97
<i>PDGFA</i>	-3,2616	0,9993	1,03
<i>PLK3</i>	-3,2842	0,9997	1,02
<i>POLD1</i>	-3,2892	0,9996	1,01
<i>POLQ</i>	-3,2366	0,9991	1,04
<i>PPM1D</i>	-3,3038	0,9994	1,01
<i>PRDX1</i>	-3,3941	0,9994	0,97
<i>PTGS2 (COX2)</i>	-3,2995	0,9991	1,01
<i>RAD50</i>	-3,3262	0,9997	1,00
<i>RAD51</i>	-3,3257	0,9999	1,00
<i>RPRM</i>	-3,2408	0,9983	1,04
<i>SIRT2</i>	-3,3317	0,9998	1,00
<i>SLC30A1</i>	-3,2543	0,9975	1,03
<i>SOD1</i>	-3,3911	0,9994	0,97
<i>SOD2</i>	-3,3277	0,9992	1,00
<i>SPP1 (OPN)</i>	-3,2583	0,9991	1,03
<i>TFRC</i>	-3,2894	0,9998	1,01
<i>TGFB1</i>	-3,2854	0,9910	1,02

Anhang

<i>TIMP1</i>	-3,3450	0,9993	0,99
<i>TNF</i>	-3,2130	0,9985	1,05
<i>TNFRSF10B</i>	-3,3122	0,9988	1,00
<i>TXN1</i>	-3,3480	0,9998	0,99
<i>TXNRD1</i>	-3,3652	0,9997	0,98
<i>VEGFA</i>	-3,2939	0,9998	1,01
<i>VIM</i>	-3,3142	0,9982	1,00
<i>XIAP</i>	-3,3316	0,9973	1,00
<i>XPA</i>	-3,3215	0,9989	1,00
<i>XPC</i>	-3,2870	0,9995	1,01

8.4 Genexpressionsanalysen

8.4.1 Untersuchte Gene – Humane Proben

Tabelle 38 Untersuchte Gene innerhalb des humanen Gen-Sets und Einteilung in Signalwege.

Referenz-Gene	Fremdstoff-metabolismus	Inflam-mation	Fibrose	Metall-homöo-stase	Oxidative Stress-antwort	Apoptose u. Zellzyklus-regulation	DNA-Schadens-antwort
<i>ACTB</i>	<i>CYP1A1</i>	<i>CCL22</i>	<i>ACTA2</i>	<i>FTH1</i>	<i>CAT</i>	<i>APAF1</i>	<i>APEX1</i>
<i>B2M</i>	<i>AHR</i>	<i>PTGS2(COX2)</i>	<i>COL1A1</i>	<i>MT1X</i>	<i>G6PC</i>	<i>BAX</i>	<i>ATM</i>
<i>GAPDH</i>	<i>NQO1</i>	<i>IL1A</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>MT2A</i>	<i>GCLC</i>	<i>BBC3</i>	<i>ATR</i>
<i>GUSB</i>		<i>IL1B</i>	<i>FN1</i>	<i>SLC30A1</i>	<i>GPX1</i>	<i>BCL2</i>	<i>BRCA1</i>
<i>HPRT1</i>		<i>IL6</i>	<i>SPP1(OPN)</i>	<i>TFRC</i>	<i>GPX2</i>	<i>BTRC</i>	<i>BRCA2</i>
		<i>IL8</i>	<i>PDGFA</i>		<i>GSR</i>	<i>CCND1</i>	<i>DDB1</i>
		<i>TNF</i>	<i>TGFB1</i>		<i>HMOX1</i>	<i>CDKN1A</i>	<i>DDB2</i>
			<i>TIMP1</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>NFE2L2</i>	<i>EGFR</i>	<i>ERCC5(XPG)</i>
					<i>NFKB1</i>	<i>JUN</i>	<i>GADD45A</i>
					<i>NFKB2</i>	<i>MDM2</i>	<i>LIG1</i>
					<i>NFKBIA</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>POLD1</i>
						<i>XIAP</i>	<i>POLQ</i>
							<i>RAD50</i>
							<i>RAD51</i>
							<i>RRM2B</i>
							<i>XPA</i>
							<i>XPC</i>

8.4.1.1 Vollständige Ergebnisse der Humanproben

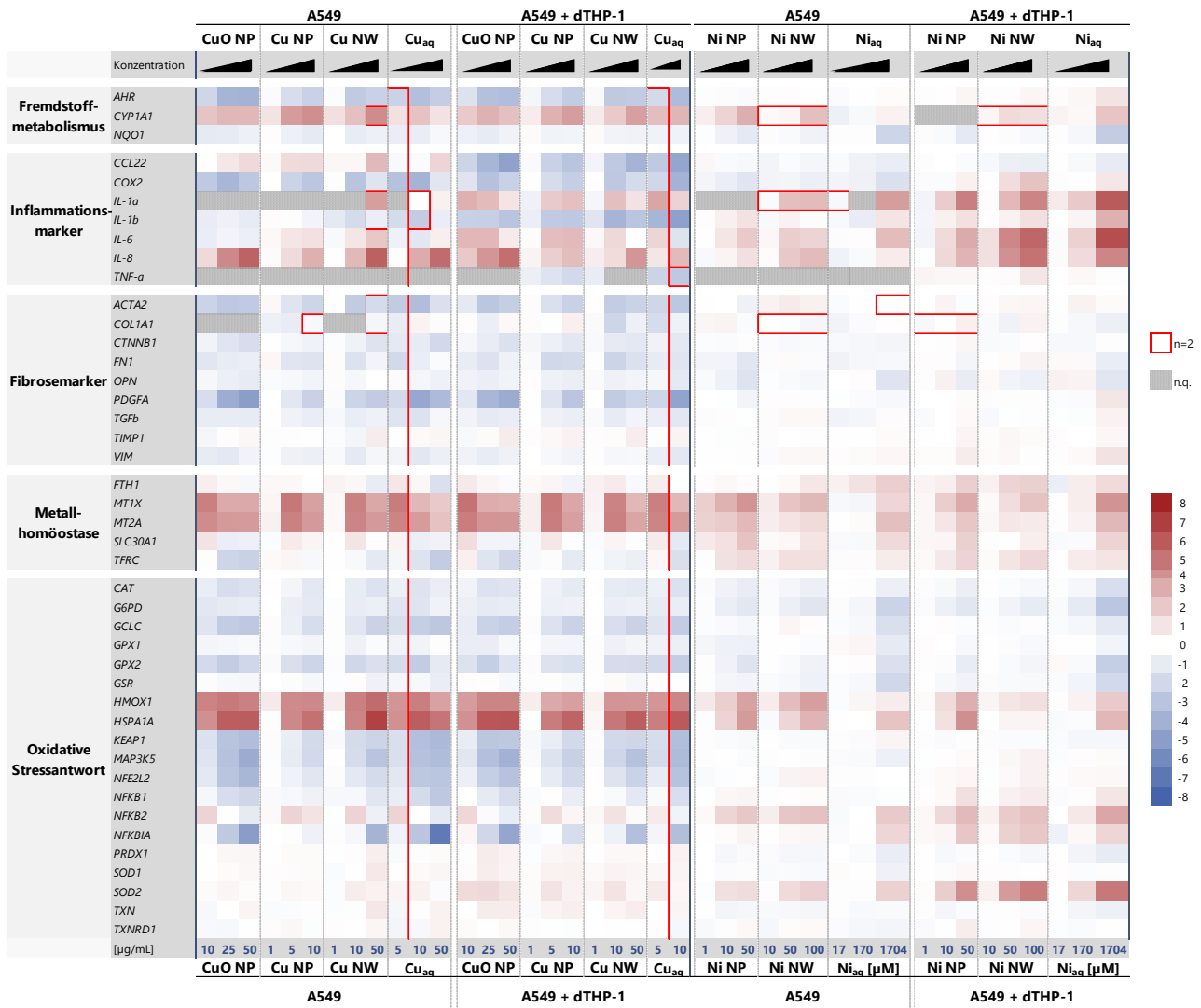


Abbildung 33 Beeinflussung der Genexpression durch Kupfer- und Nickel-basierte Nanomaterialien sowie lösliche Kupfer- und Nickelverbindungen in A549-Monokultur und -Kokultur mit dTHP-1-Zellen. Gezeigt sind Gene des Fremdstoffmetabolismus, der inflammatorischen und fibrotischen Marker, der Metallhomöostase sowie der oxidativen Stressantwort.

Eine rote Färbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine verminderte Genexpression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen, sofern nicht anders angegeben.

Anhang

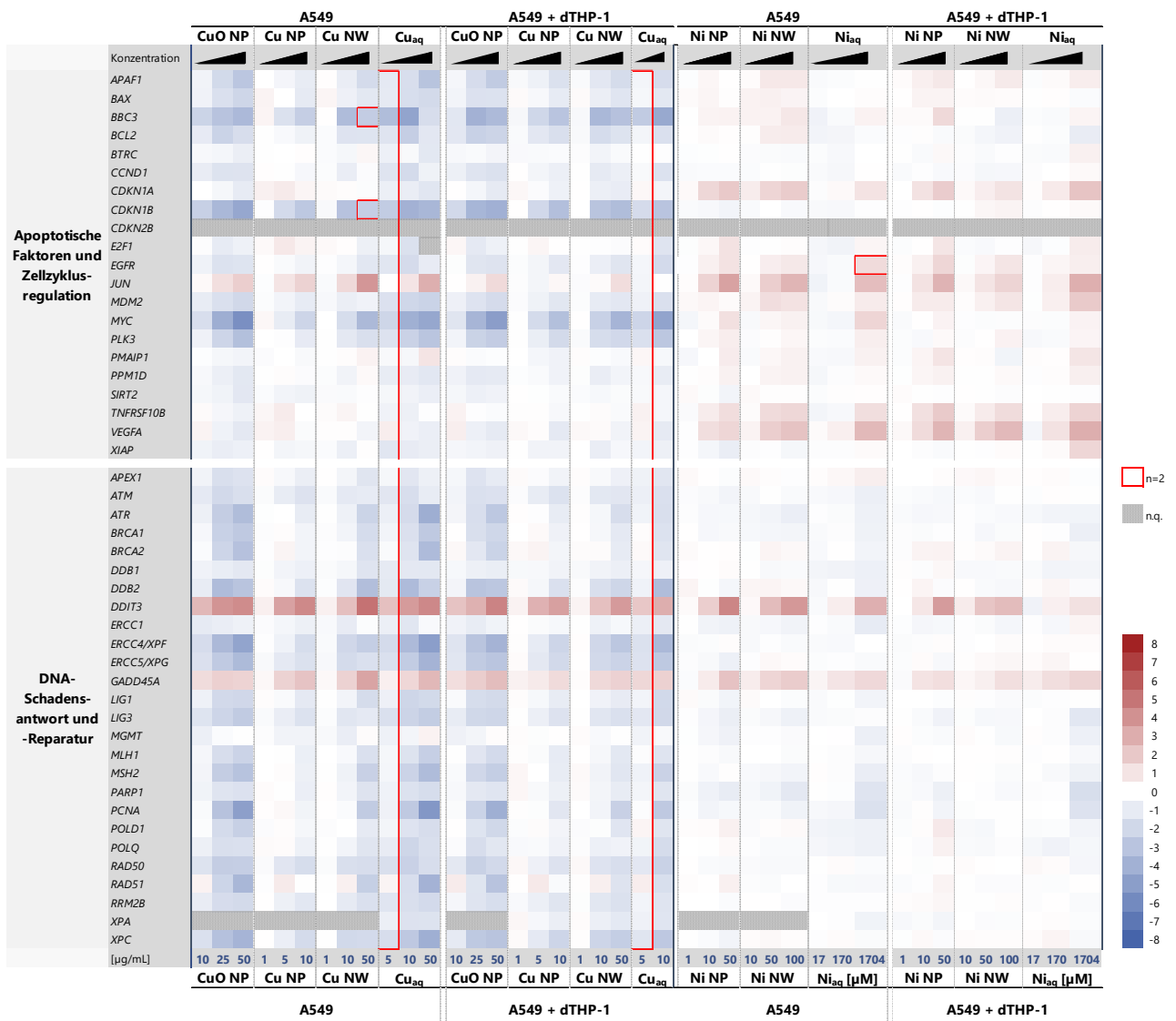


Abbildung 34 Beeinflussung der Genexpression durch Kupfer- und Nickel-basierte Nanomaterialien sowie lösliche Kupfer- und Nickelverbindungen in A549-Monokultur und -Kokultur mit dTHP-1-Zellen. Gezeigt sind Gene der Apoptose und der Zellzyklusregulation sowie der DNA-Schadensantwort und -Reparatur.

Eine rote Färbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine verminderte Genexpression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen, sofern nicht anders angegeben.

Anhang

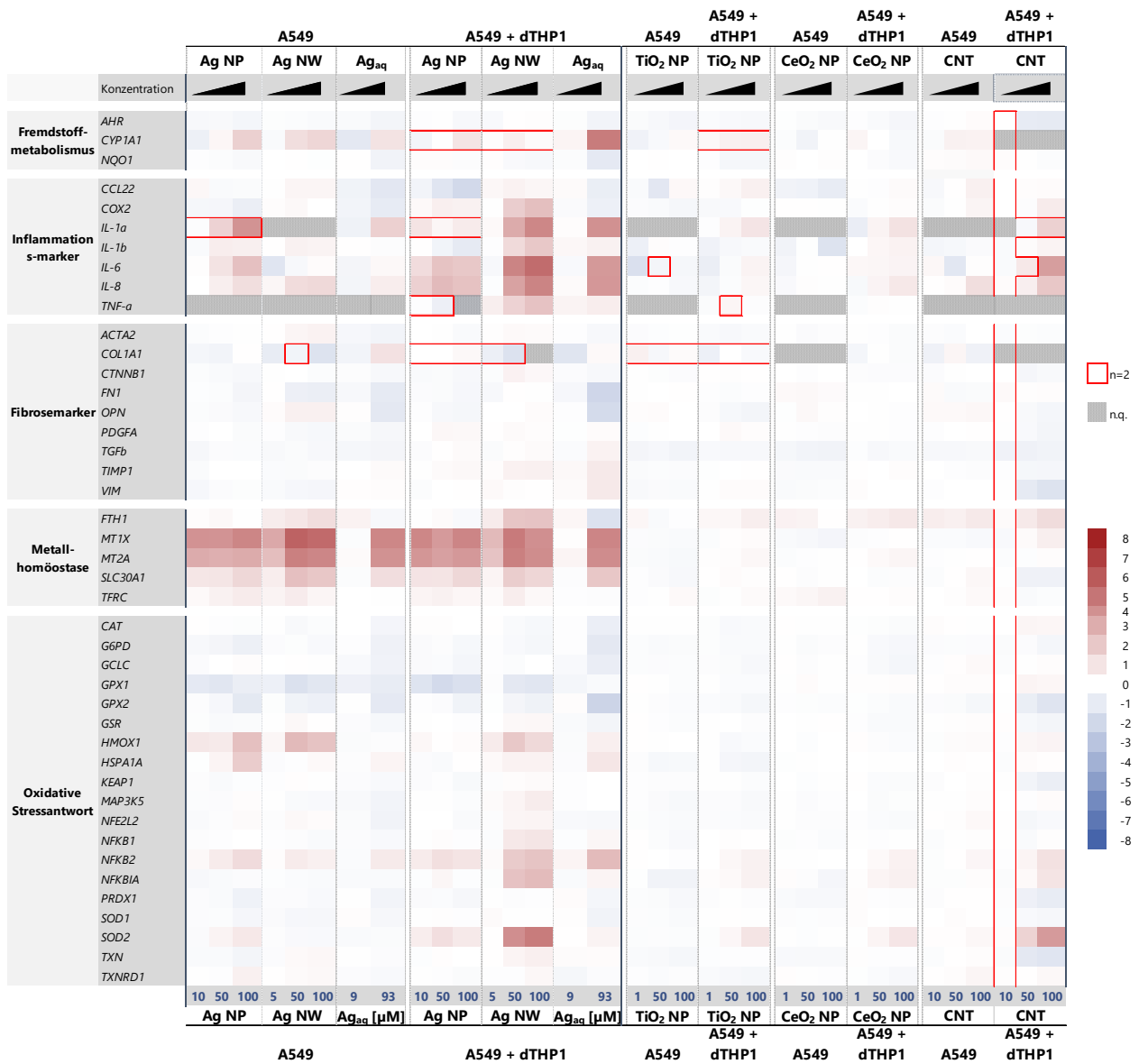
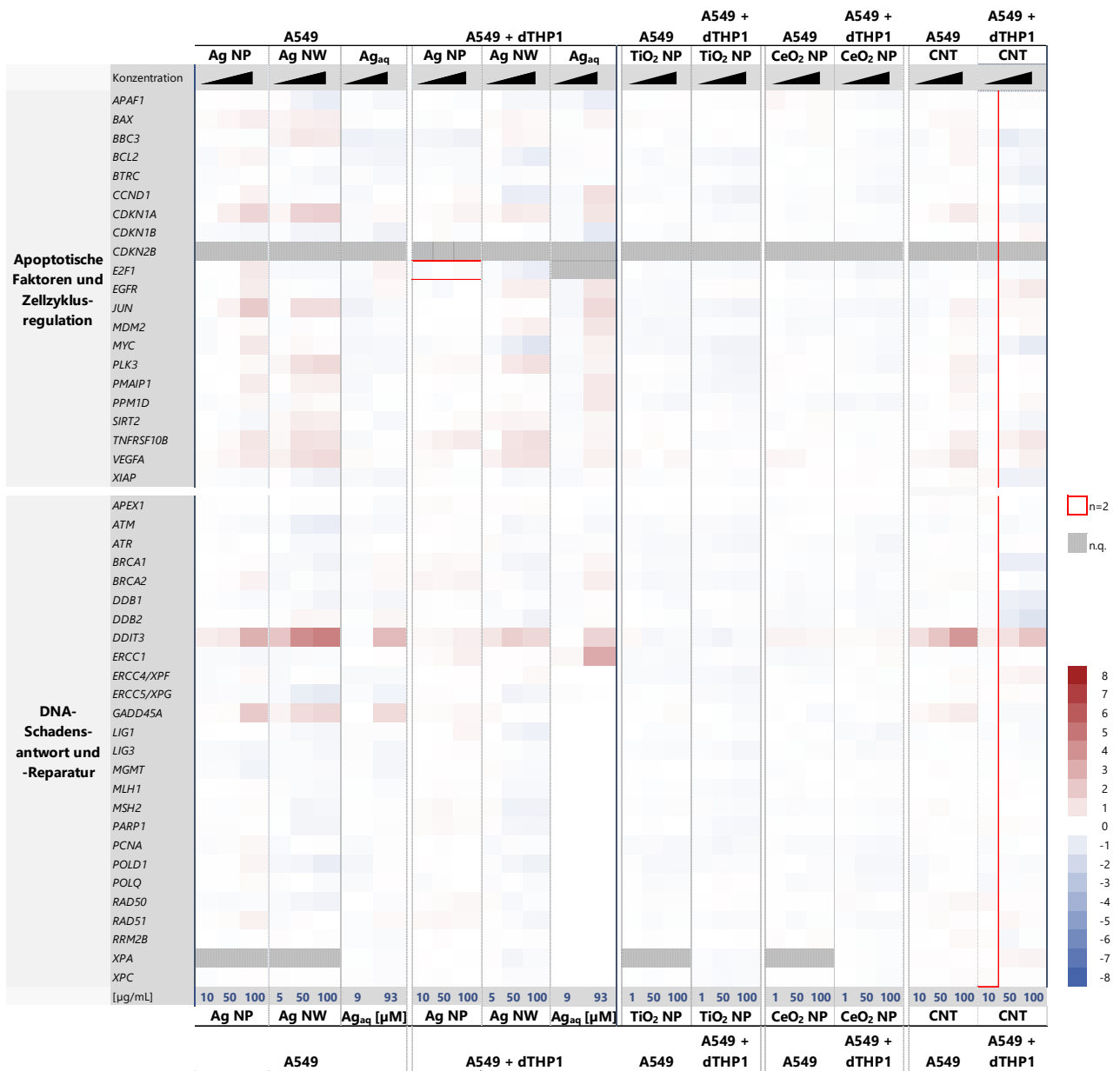


Abbildung 35 Beeinflussung der Genexpression durch Silber-basierte Nanomaterialien und eine lösliche Silberverbindung sowie CeO₂ NP, TiO₂ NP und Kohlenstoffnanoröhren (CNT) in A549-Monokultur und -Kokultur mit dTHP-1-Zellen. Gezeigt sind Gene des Fremdstoffmetabolismus, der inflammatorischen und fibrotischen Marker, der Metallhomöostase sowie der oxidativen Stressantwort.

Eine rote Färbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine verminderte Genexpression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen, sofern nicht anders angegeben.

Anhang



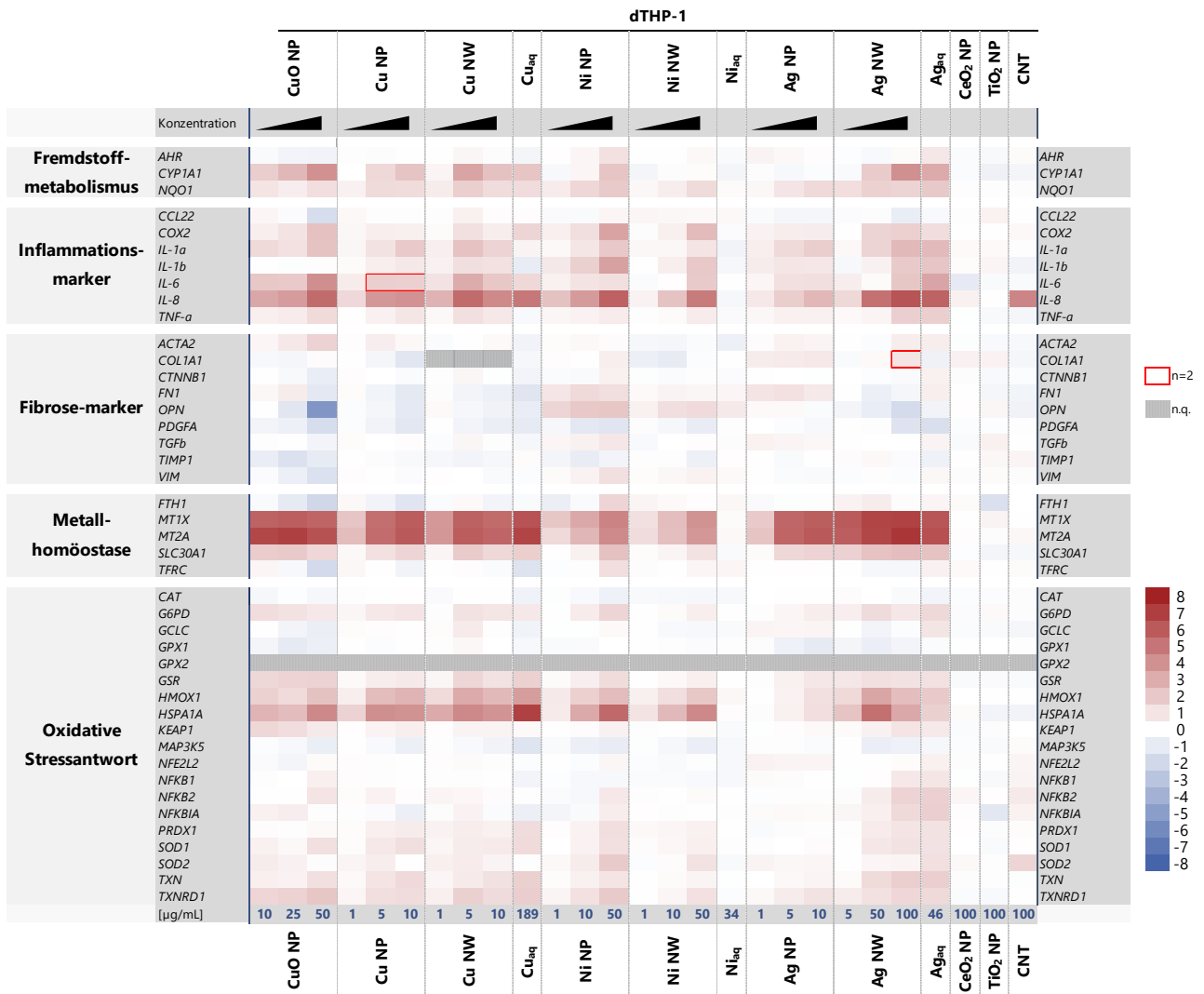


Abbildung 37 Beeinflussung der Genexpression durch Kupfer-, Nickel- und Silber-basierte Nanomaterialien, lösliche Kupfer-, Nickel- und Silberverbindungen sowie CeO₂ NP, TiO₂ NP und Kohlenstoffnanoröhren (CNT) in dTHP-1-Zellen. Gezeigt sind Gene des Fremdstoffmetabolismus, der inflammatorischen und fibrotischen Marker, der Metallhomöostase sowie der oxidativen Stressantwort.

Eine rote Färbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine verminderte Genexpression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen, sofern nicht anders angegeben.

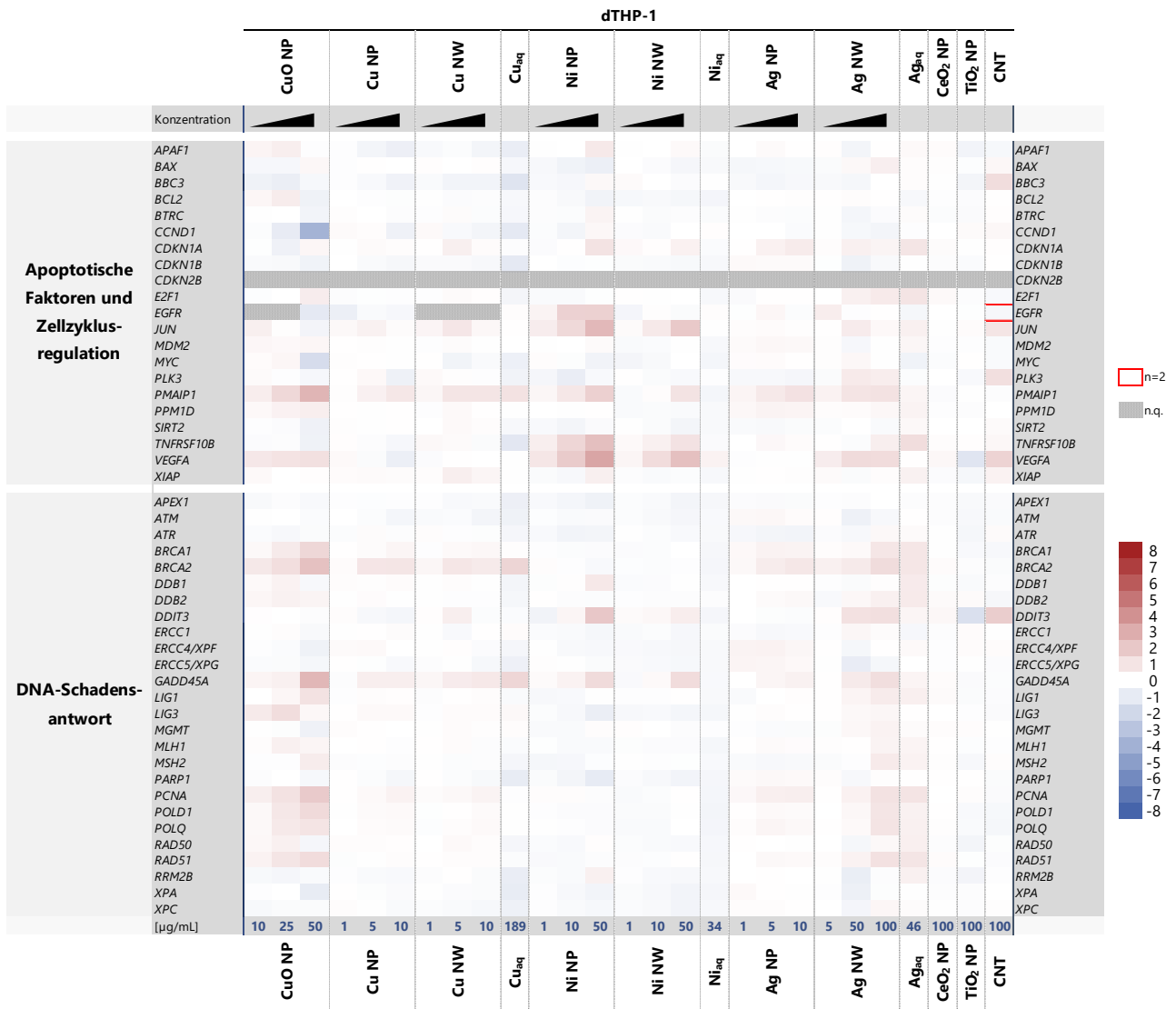


Abbildung 38 Beeinflussung der Genexpression durch Kupfer-, Nickel- und Silber-basierte Nanomaterialien, lösliche Kupfer-, Nickel- und Silberverbindungen sowie CeO₂ NP, TiO₂ NP und Kohlenstoffnanoröhren (CNT) in dTHP-1-Zellen. Gezeigt sind Gene der Apoptose und der Zellzyklusregulation sowie der DNA-Schadensantwort und -Reparatur.

Eine rote Färbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine verminderte Genexpression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen, sofern nicht anders angegeben.

8.4.2 Untersuchte Gene – Rattenproben

Tabelle 39 Untersuchte Gene des Ratten-bezogenen Gen-Sets und Einteilung in Signalwege.

Referenz-Gene	Fremdstoff-metabolismus	Inflammation	Fibrose	Metall-homöostase	Oxidative Stressantwort	Apoptose u. Zellzyklusregulation	Autophagie	DNA-Schadensantwort
B2M	CYP1A1	CCL22	ACTA2	FTH1	CAT	APAF1	ATG7	APEX1
GUSB	NAT1	PTGS2 (COX2)	COL1A1	MT1	G6PD	BAK1	MAP1LC3B	ATM
HPRT1	NQO1	IL1A	CTNNB1	SLC30A1	GCLC	BBC3		ATR
MAPK14		IL1B	FN1	TFRC	GPX1	BCL2		BRCA1
MARCHF5		IL6	SPP1 (OPN)		GPX2	BIK		BRCA2
		CXCL1 (IL8)	PDGFA		GSR	BTRC		DDB1
		TNF	TGFB1		HMOX1	CCND1		DDB2
			TIMP1		HSPA1A	CDKN1A		ERCC1
			VIM		KEAP1	CDKN1B		ERCC4 (XPF)
					MAP3K5	CDKN2B		ERCC5 (XPG)
					MFE2L2	E2F1		GADD45A
					NFKB1	EGFR		LIG1
					NFKB2	JUN		LIG3
					NFKBIA	MDM2		MGMT
					PRDX1	MYC		MLH1
					SOD1	PLK3		MSH2
					SOD2	PPM1D		PARP1
					TXN	SIRT2		PCNA
					TXNRD1	TNFRSF10B		POLD1
						VEGFA		POLQ
						XIAP		RAD50
								RAD51
								RPRM
								XPA
								XPC

8.4.2.1 Vollständige Ergebnisse der Rattenproben

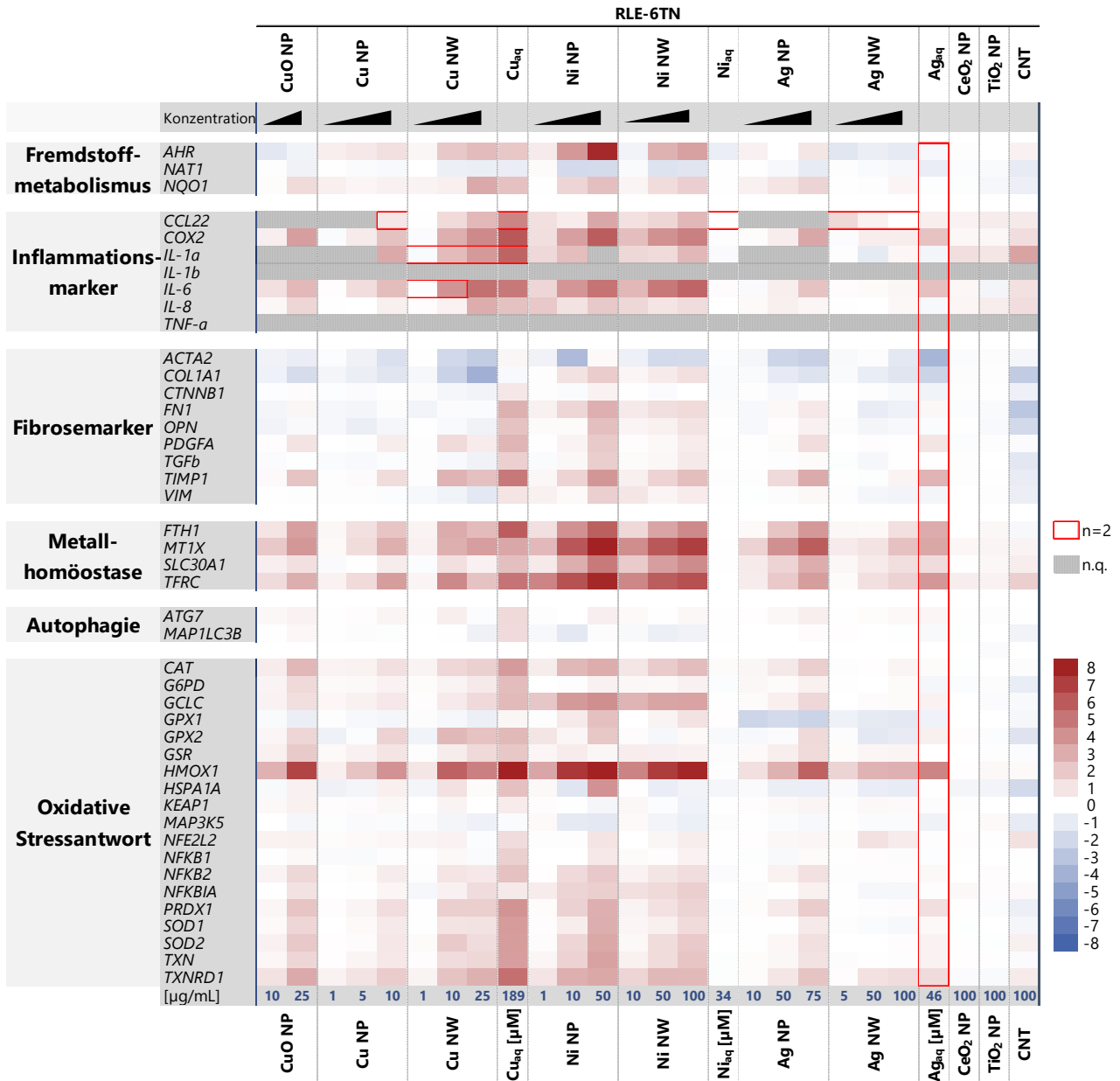


Abbildung 39 Beeinflussung der Genexpression durch Kupfer-, Nickel- und Silber-basierte Nanomaterialien, lösliche Kupfer-, Nickel- und Silberverbindungen sowie CeO₂ NP, TiO₂ NP und Kohlenstoffnanoröhren (CNT) in RLE-6TN-Zellen. Gezeigt sind Gene des Fremdstoffmetabolismus, der inflammatorischen und fibrotischen Marker, der Metallhomöostase, der Autophagie sowie der oxidativen Stressantwort.

Eine rote Färbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine verminderte Genexpression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen, sofern nicht anders angegeben.

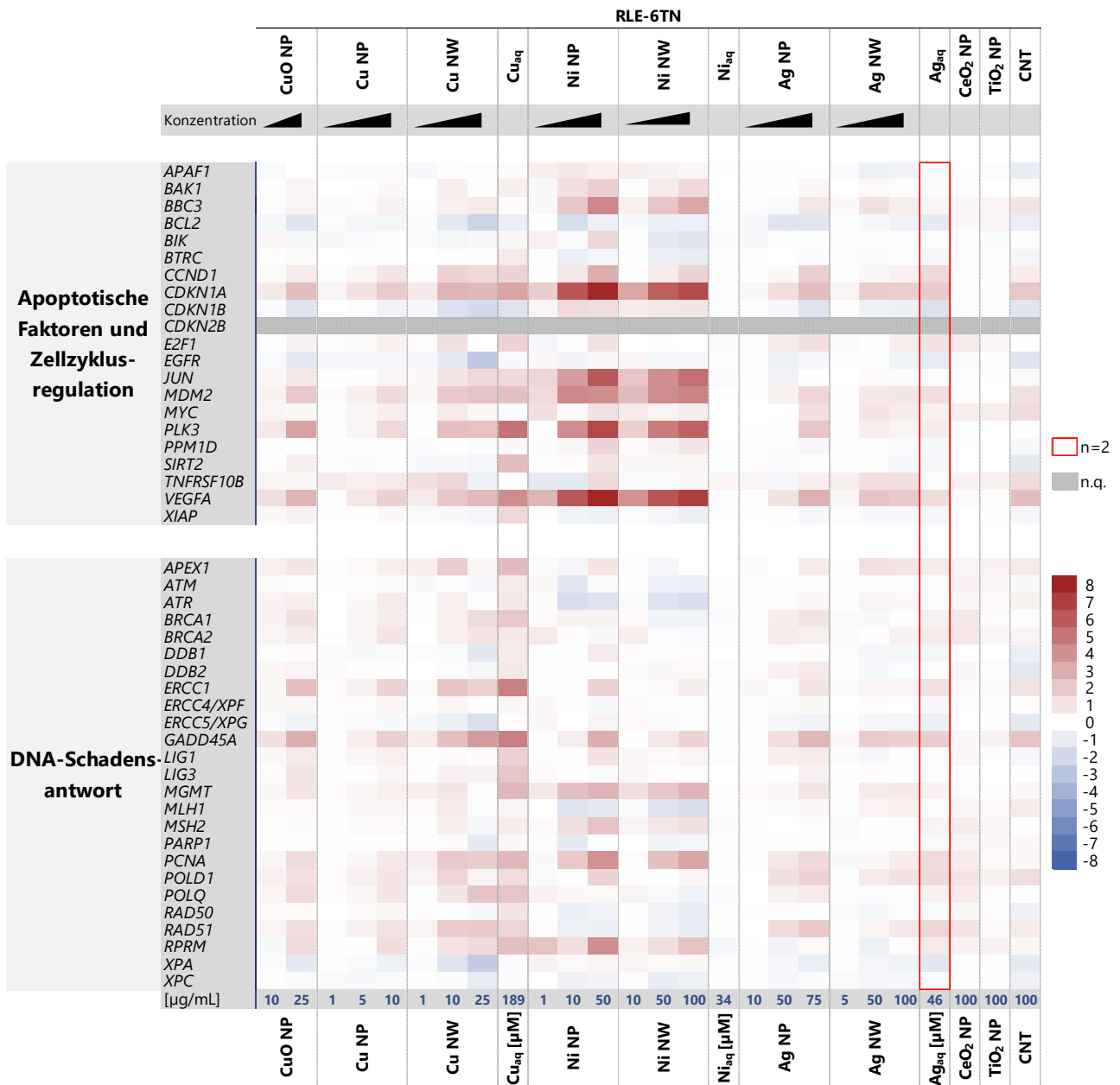


Abbildung 40 Beeinflussung der Genexpression durch Kupfer-, Nickel- und Silber-basierte Nanomaterialien, lösliche Kupfer-, Nickel- und Silberverbindungen sowie CeO₂ NP, TiO₂ NP und Kohlenstoffnanoröhren (CNT) in RLE-6TN-Zellen. Gezeigt sind Gene der Apoptose und der Zellzyklusregulation sowie der DNA-Schadensantwort und -Reparatur.

Eine rote Färbung stellt eine Induktion der Genexpression dar, eine blaue Färbung steht für eine verminderte Genexpression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen, sofern nicht anders angegeben.

8.5 Abkürzungsverzeichnis

AAF	künstliche alveoläre Flüssigkeit
AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
ALF	künstliche lysosomale Flüssigkeit
ALI	<i>Air liquid interface</i>
ANOVA	Varianzanalyse
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Alkalische Entwindung
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CNT	Kohlenstoffnanoröhren
CYP	Cytochrom P450
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMSO	Dimethylsulfoxid
dTHP-1	differenzierte THP-1-Zellen
EMA	Ethidium-Monoazidbromid
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FKS	fetales Kälberserum
GF-AAS	Graphitrohr AAS
GSH	Glutathion

GSSG	Glutathiondisulfid
HT	<i>High Throughput</i>
HT RT-qPCR	<i>High Throughput</i> quantitative PCR mit reverser Transkription
HTS	<i>High Throughput Sampler</i>
IARC	Internationale Agentur für Krebsforschung
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
IL	Interleukin
MMC	Mitomycin C
MN	Mikrokerne
mRNA	messenger RNA
MT	Metallothionein
MWCNT	Mehrwandige Kohlenstoffnanoröhren
NM	Nanomaterial/Nanomaterialien
NP	Nanopartikel
NW	Nanodrähte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBS/PI	PBS/Phosphataseinhibitor
PVP	Polyvinylpyrrolidon
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> , Zellkulturmedium
RT	reverse Transkriptase

SB	Strangbrüche
SD	Standardabweichung
SOD	Superoxiddismutase
SWCNT	Einwandige Kohlenstoffnanoröhren
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
VEGFA	<i>Vascular endothelial growth factor A</i>

8.6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schematische Darstellung verschiedener Aufnahmemechanismen von Nanomaterialien und deren weitere Prozessierung (modifiziert nach Sahay <i>et al.</i> , 2010).....	9
Abbildung 2	Schematische Darstellung der Beeinträchtigung von DNA-Reparaturprozessen durch Nanopartikel (modifiziert nach Carriere <i>et al.</i> , 2017).....	13
Abbildung 3	Schematische Darstellung einer Mono- sowie einer Kokultur unter submersen Bedingungen.....	19
Abbildung 4	Beispielhafte Darstellung der finalen Gate-Setzung.....	39
Abbildung 5	Exemplarische Darstellung eines Agarosegels zur Ermittlung der Spezifität von Primerpaaren im Rahmen der Etablierung eines Gen-Sets zur Untersuchung von Rattenproben.....	43
Abbildung 6	Zellviabilität von A549-, A549 + dTHP-1- sowie RLE-6TN-Zellen nach Inkubation mit Kupfer-basierten Nanopartikeln (NP) und <i>Nanowire</i> (NW).	48
Abbildung 7	Bioverfügbarkeit der Kupfernanomaterialien in den Zelllinien A549, dTHP-1 und RLE-6TN.....	51
Abbildung 8	Beeinflussung der Genexpression durch Kupfer-basierte Nanomaterialien in A549-Monokultur sowie -Kokultur mit dTHP-1-Zellen nach einer Inkubationsdauer von 24 h. Gezeigt sind Gene des Fremdstoffmetabolismus, der Inflammations- und Fibrosemarker, der Metallhomöostase, der oxidativen Stressantwort, der Apoptose und der Zellzyklusregulation sowie der DNA-Schadensantwort.....	53
Abbildung 9	Beeinflussung der Genexpression durch Kupfer-basierte Nanomaterialien in RLE-6TN-Zellen. Gezeigt sind Gene des Fremdstoffmetabolismus, der Inflammations- und Fibrosemarker, der Metallhomöostase, der oxidativen Stressantwort, der Apoptose und der Zellzyklusregulation sowie der DNA-Schadensantwort.....	57
Abbildung 10	Induktion von DNA-Strangbrüchen sowie von Mikrokernen nach der Inkubation mit Kupfermaterialien.....	60
Abbildung 11	Schematische Darstellung der Zusammensetzung der metallischen Kupfernanopartikel (links) sowie der Kupferoxidnanopartikel (rechts).	62
Abbildung 12	Zellviabilität von A549-, A549 + dTHP-1- sowie RLE-6TN-Zellen nach Inkubation mit Nickel-basierten Nanopartikeln (NP) und <i>Nanowire</i> (NW).	68
Abbildung 13	Bioverfügbarkeit (links) und intrazelluläre Verteilung (rechts) der Nickelnanomaterialien in den Zelllinien A549, dTHP-1 und RLE-6TN.....	70
Abbildung 14	Beeinflussung der Genexpression durch Nickel-basierte Nanomaterialien in A549-Monokultur sowie -Kokultur mit dTHP-1-Zellen. Gezeigt sind Gene des Fremdstoffmetabolismus, der Metallhomöostase, der oxidativen Stressantwort, der DNA-Schadensantwort sowie inflammatorische Marker.....	71

Abbildung 15	Beeinflussung der Genexpression durch Nickel-basierte Nanomaterialien in RLE-6TN-Zellen. Gezeigt sind Gene des Fremdstoffmetabolismus, der Metallhomöostase, der DNA-Schadensantwort, der Apoptose sowie der Zellzyklusregulation, der oxidativen Stressantwort und inflammatorische und fibrotische Marker.....	73
Abbildung 16	Gegenüberstellung der Induktion von DNA-Strangbrüchen sowie der Induktion von Mikrokernen nach der Inkubation mit Nickelmaterialien.	75
Abbildung 17	Zellviabilität von A549-, A549 + dTHP-1- sowie RLE-6TN-Zellen nach Inkubation mit Silber-basierten Nanopartikeln (NP) und <i>Nanowire</i> (NW).	81
Abbildung 18	Bioverfügbarkeit (links) und intrazelluläre Verteilung (rechts) der Silbernanomaterialien in den Zelllinien A549, dTHP-1 und RLE-6TN.	82
Abbildung 19	Beeinflussung der Genexpression durch Silber-basierte Nanomaterialien in A549-Monokultur sowie -Kokultur mit dTHP-1-Zellen. Gezeigt sind Gene des Fremdstoffmetabolismus, der Metallhomöostase, der oxidativen Stressantwort sowie inflammatorische Marker.	83
Abbildung 20	Veränderung der Genexpression den Gens <i>SOD2</i> nach der Inkubation mit Silbernanopartikeln (Ag NP) und Silbernanowire (Ag NW) für 24 h in A549-Zellen sowie in der entsprechenden Kokultur mit dTHP-1-Zellen.	84
Abbildung 21	Beeinflussung der Genexpression durch Silber-basierte Nanomaterialien in RLE-6TN-Zellen. Gezeigt sind Gene der Metallhomöostase, der DNA-Schadensantwort, der Apoptose sowie der Zellzyklusregulation, der oxidativen Stressantwort und inflammatorische und fibrotische Marker.....	85
Abbildung 22	Gegenüberstellung der Induktion von DNA-Strangbrüchen sowie der Induktion von Mikrokernen nach der Inkubation mit Silbermaterialien.	87
Abbildung 23	Zellviabilität von A549-, A549 + dTHP-1- sowie RLE-6TN-Zellen nach Inkubation mit CeO ₂ NP, TiO ₂ NP sowie Kohlenstoffnanoröhren.	95
Abbildung 24	Bioverfügbarkeit der CeO ₂ NP und TiO ₂ NP in den Zelllinien A549, dTHP-1 und RLE-6TN.....	97
Abbildung 25	Beeinflussung der Genexpression durch Kohlenstoffnanoröhren (CNT) in A549-Monokultur sowie -Kokultur mit dTHP-1-Zellen. Gezeigt sind ausgewählte Gene der DNA-Schadensantwort, der oxidativen Stressantwort sowie inflammatorische Marker.	98
Abbildung 26	Beeinflussung der Genexpression durch Kohlenstoffnanoröhren (CNT) in RLE-6TN-Zellen. Gezeigt sind ausgewählte Gene der DNA-Schadensantwort, der Apoptose sowie der Zellzyklusregulation, der oxidativen Stressantwort sowie inflammatorische und fibrotische Marker.	99
Abbildung 27	Gegenüberstellung der Induktion von DNA-Strangbrüchen sowie der Induktion von Mikrokernen nach der Inkubation mit CeO ₂ NP, TiO ₂ NP und Kohlenstoffnanoröhren (CNT).....	102
Abbildung 28	Schematische Darstellung des toxischen Wirkmechanismus von lysosomal löslichen und redox-aktiven Nanomaterialien.....	117
Abbildung 29	Schematische Darstellung des toxischen Wirkmechanismus von unlöslichen sowie faserförmigen Nanomaterialien.....	118

Abbildung 30	Schematische Darstellung der Phagozytose einer kurzen Faser, die vollständig aufgenommen werden konnte, sowie einer langen Faser, die eine sog. „frustrierte Phagozytose“ auslöst (Modifiziert nach Schinwald und Donaldson, 2012).....	119
Abbildung 31	Bioverfügbarkeit der Kupfer-, Nickel- und Silbrenanomaterialien sowie der CeO ₂ NP und TiO ₂ NP in den Zelllinien A549, dTHP-1 und RLE-6TN.....	149
Abbildung 32	Beispielhafte Darstellung der Evaluation der Primer-Effizienz.	152
Abbildung 33	Beeinflussung der Genexpression durch Kupfer- und Nickel-basierte Nanomaterialien sowie lösliche Kupfer- und Nickelverbindungen in A549-Monokultur und –Kokultur mit dTHP-1-Zellen. Gezeigt sind Gene des Fremdstoffmetabolismus, der inflammatorischen und fibrotischen Marker, der Metallhomöostase sowie der oxidativen Stressantwort.....	166
Abbildung 34	Beeinflussung der Genexpression durch Kupfer- und Nickel-basierte Nanomaterialien sowie lösliche Kupfer- und Nickelverbindungen in A549-Monokultur und –Kokultur mit dTHP-1-Zellen. Gezeigt sind Gene der Apoptose und der Zellzyklusregulation sowie der DNA-Schadensantwort und -Reparatur.....	167
Abbildung 35	Beeinflussung der Genexpression durch Silber-basierte Nanomaterialien und eine lösliche Silberverbindung sowie CeO ₂ NP, TiO ₂ NP und Kohlenstoffnanoröhren (CNT) in A549-Monokultur und –Kokultur mit dTHP-1-Zellen. Gezeigt sind Gene des Fremdstoffmetabolismus, der inflammatorischen und fibrotischen Marker, der Metallhomöostase sowie der oxidativen Stressantwort.....	168
Abbildung 36	Beeinflussung der Genexpression durch Silber-basierte Nanomaterialien und eine lösliche Silberverbindung sowie CeO ₂ NP, TiO ₂ NP und Kohlenstoffnanoröhren (CNT) in A549-Monokultur und –Kokultur mit dTHP-1-Zellen. Gezeigt sind Gene der Apoptose und der Zellzyklusregulation sowie der DNA-Schadensantwort und -Reparatur.....	169
Abbildung 37	Beeinflussung der Genexpression durch Kupfer-, Nickel- und Silber-basierte Nanomaterialien, lösliche Kupfer-, Nickel- und Silberverbindungen sowie CeO ₂ NP, TiO ₂ NP und Kohlenstoffnanoröhren (CNT) in dTHP-1-Zellen. Gezeigt sind Gene des Fremdstoffmetabolismus, der inflammatorischen und fibrotischen Marker, der Metallhomöostase sowie der oxidativen Stressantwort.....	170
Abbildung 38	Beeinflussung der Genexpression durch Kupfer-, Nickel- und Silber-basierte Nanomaterialien, lösliche Kupfer-, Nickel- und Silberverbindungen sowie CeO ₂ NP, TiO ₂ NP und Kohlenstoffnanoröhren (CNT) in dTHP-1-Zellen. Gezeigt sind Gene der Apoptose und der Zellzyklusregulation sowie der DNA-Schadensantwort und -Reparatur.....	171
Abbildung 39	Beeinflussung der Genexpression durch Kupfer-, Nickel- und Silber-basierte Nanomaterialien, lösliche Kupfer-, Nickel- und Silberverbindungen sowie CeO ₂ NP, TiO ₂ NP und Kohlenstoffnanoröhren (CNT) in RLE-6TN-Zellen. Gezeigt sind Gene des Fremdstoffmetabolismus, der inflammatorischen und fibrotischen Marker, der Metallhomöostase, der Autophagie sowie der oxidativen Stressantwort.....	173

Abbildung 40 Beeinflussung der Genexpression durch Kupfer-, Nickel- und Silber-basierte Nanomaterialien, lösliche Kupfer-, Nickel- und Silberverbindungen sowie CeO₂ NP, TiO₂ NP und Kohlenstoffnanoröhren (CNT) in RLE-6TN-Zellen. Gezeigt sind Gene der Apoptose und der Zellzyklusregulation sowie der DNA-Schadensantwort und -Reparatur..... 174

8.7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Unterschiede des Respirationstrakts von Mensch und Ratte (modifiziert nach Olin, 2000; Fröhlich und Salar-Behzadi, 2014).....	20
Tabelle 2	Zusammenstellung der verwendeten Nanomaterialien.....	24
Tabelle 3	Zelldichten der verschiedenen Zelllinien in den Zellkulturexperimenten.....	29
Tabelle 4	Temperaturprogramm der cDNA-Synthese.....	33
Tabelle 5	Temperaturprogramm der Präamplifikation.....	33
Tabelle 6	Temperaturprogramm des Exonukleaseverdaus.....	33
Tabelle 7	Temperaturprogramm der HT RT-qPCR und anschließender Schmelzkurvenanalyse.....	34
Tabelle 8	Temperaturprogramm der qPCR mit anschließender Schmelzkurvenanalyse zur Untersuchung der Primer-Spezifität.....	36
Tabelle 9	Physikochemische Eigenschaften der Kupfernanomaterialien.....	45
Tabelle 10	Löslichkeit der Kupfermaterialien nach 24 h in den verwendeten Zellkulturmedien sowie in relevanten biologischen Flüssigkeiten.....	47
Tabelle 11	Dosisauswahl für die weiterführenden Experimente aufgrund der Daten des ATP-Assays.....	50
Tabelle 12	Physikochemische Eigenschaften der Nickelnanomaterialien.....	67
Tabelle 13	Löslichkeit der Nickelmaterialeien nach 24 h in den verwendeten Zellkulturmedien sowie in relevanten biologischen Flüssigkeiten.....	67
Tabelle 14	Dosisauswahl für die weiterführenden Experimente aufgrund der Daten des ATP-Assays.....	69
Tabelle 15	Physikochemische Eigenschaften der Silbernanomaterialien.....	79
Tabelle 16	Löslichkeit der Silbermaterialien nach 24 h in den verwendeten Zellkulturmedien sowie in relevanten biologischen Flüssigkeiten.....	80
Tabelle 17	Dosisauswahl für die weiterführenden Experimente aufgrund der Daten des ATP-Assays.....	81
Tabelle 18	Physikochemische Eigenschaften der CeO ₂ NP und TiO ₂ NP sowie der Kohlenstoffnanoröhren (CNT).....	94
Tabelle 19	Löslichkeit von CeO ₂ NP und TiO ₂ NP nach 24 h in den verwendeten Zellkulturmedien sowie in relevanten biologischen Flüssigkeiten.....	95
Tabelle 20	Dosisauswahl für die weiterführenden Experimente aufgrund der Daten des ATP-Assays.....	96

Anhang

Tabelle 21	Ergebnisübersicht über die Untersuchungen der Löslichkeit, Bioverfügbarkeit, intrazellulären Verteilung, Zytotoxizität, alkalischen Entwindung (AU) und des Mikrokerntests (MN-Test).....	109
Tabelle 22	Ergebnisübersicht über die Genexpressionsanalysen.....	111
Tabelle 23	Verwendete Nanomaterialien.....	138
Tabelle 24	Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen sowie deren Zusammensetzung.....	139
Tabelle 25	Temperaturprogramm der Graphitrohr-AAS-Analyse von Kupfer.....	146
Tabelle 26	Temperaturprogramm der Graphitrohr-AAS-Analyse von Nickel.....	146
Tabelle 27	Temperaturprogramm der Graphitrohr-AAS-Analyse von Silber.....	146
Tabelle 28	Geräteeinstellungen am HTS (<i>High Throughput Sampler</i>)-Modul während der durchflusszytometrischen Bestimmung von Mikrokernen.....	146
Tabelle 29	Herstellung der Nanomaterial-Suspensionen.....	147
Tabelle 30	Dosisauswahl für Zellkulturexperimente basierend auf Daten des ATP-Assays.....	148
Tabelle 31	Löslichkeit der verwendeten Nanomaterialien im dynamischen System nach 168 h in phagolysosomaler Modellflüssigkeit (PSF).....	148
Tabelle 32	Korrespondierende Proteine zu den Inflammations- und Fibrose-bezogenen Genen zur Ergänzung des humanen Gen-Sets.....	150
Tabelle 33	Gen-Namen, Gen-IDs, Reference Sequence Accession Nummern (RefSeq) sowie forward (fwd) und reverse (rev) Primer-Sequenzen.....	151
Tabelle 34	Zusammenstellung der Parameter zur Beurteilung der Primer-Effizienz.....	152
Tabelle 35	Korrespondierende Proteine der ausgewählten Gene zur Untersuchung der Genexpression in Rattenzellen.....	153
Tabelle 36	Gen-Namen, Gen-IDs, Reference Sequence Accession Nummern (RefSeq) sowie forward (fwd) und reverse (rev) Primer-Sequenzen.....	156
Tabelle 37	Zusammenstellung der Parameter zur Beurteilung der Primer-Effizienz.....	161
Tabelle 38	Untersuchte Gene innerhalb des humanen Gen-Sets und Einteilung in Signalwege.....	165
Tabelle 39	Untersuchte Gene des Ratten-bezogenen Gen-Sets und Einteilung in Signalwege.....	172

8.8 Publikationsliste

Publikationen

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

Wall, J., Ag Seleci, D., Schworm, F., **Neuberger, R.**, Link, M., Hufnagel, M., Schumacher, P., Schulz, F., Heinrich, U., Wohlleben, W., Hartwig, A. *Comparison of Metal-Based Nanoparticles and Nanowires: Solubility, Reactivity, Bioavailability and Cellular Toxicity*. Nanomaterials (2021).

Vorträge auf Fachtagungen

Neuberger, R., Wall, J., Grove, A., Weschenfelder, E., Schumacher, P., Hufnagel, M., Schulz, F., Honarvar, N., Hartwig, A. *Comparison of the genotoxic potential of different metal-based nanoparticles and nanowire with respect to DNA strand breaks and micronuclei*. 7th German Pharm-Tox Summit, 7.-10.03.2022, Bonn (DE)/online.

Posterbeiträge auf Fachtagungen

Neuberger, R., Wall, J., Link, M., Hufnagel, M., Hartwig, A. *Toxicity profiling of particular and fibrous nanomaterials using High-Throughput RT-qPCR*. NanoTox 2021, 10th International Conference on Nanotoxicology, 20.-22.04.2021, Edinburgh (UK)/online.

Neuberger, R., Wall, J., Link, M., Schumacher, P., Hufnagel, M., Schulz, F., Honarvar, N., Hartwig, A. *Toxikologische Untersuchungen von partikulären und faserförmigen Nanomaterialien mittels High-Throughput RT-qPCR*. Clustertreffen der NanoCare4.0-Förderung des BMBF, 21.09.2021, Frankfurt (DE)/online.

Neuberger, R., Schumacher, P., Lichter, J., Blömeke, B., Hartwig, A. *Cytotoxicity and gene expression profiling of CuO nanoparticles compared to water soluble CuCl₂ in skin cells*. 12th International Particle Toxicology Conference, 11.-13.09.2019, Salzburg (AUT).