

Vergleich der pulmonalen Wirkmechanismen partikulärer und
faserförmiger Metall-basierter Nanomaterialien in submersen Studien
und über ein *air-liquid interface*

Zur Erlangung des akademischen Grades einer
DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

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

DISSERTATION

von

M.Sc. Johanna Wall

1. Referentin: Prof. Dr. Andrea Hartwig
 2. Referent: PD Dr. Carsten Weiss
- Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2022

*Für
meine Familie*

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

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

Karlsruhe, den 07.12.2022

Johanna Wall

ZUSAMMENFASSUNG.....	1
ABSTRACT (ENG).....	4
1 EINLEITUNG.....	7
1.1 ANWENDUNGEN UND RISIKEN VON NANOMATERIALIEN	7
1.1.1 Expositionswege und pulmonale Aufnahmemechanismen	7
1.1.2 Kupfer-basierte Nanomaterialien	10
1.1.3 Silber-basierte Nanomaterialien	11
1.1.4 Nickel-basierte Nanomaterialien.....	12
1.1.5 Titan(IV)-dioxid Nanopartikel und Cerium(IV)-dioxid Nanopartikel	14
1.1.6 <i>Carbon nanotubes</i> (CNT).....	15
1.2 <i>IN VITRO</i> -METHODEN ZUR UNTERSUCHUNG VON NANOMATERIALIEN	16
1.2.1 Kombination verschiedener Zelltypen zu einer Kokultur	16
1.2.2 Vergleich der submersen Exposition und einer Exposition über ein <i>air-liquid interface</i>	17
2 FRAGESTELLUNG.....	20
3 MATERIAL UND METHODEN.....	22
3.1 MATERIAL	22
3.2 METHODEN	22
3.2.1 Probenvorbereitung nach NANOGENOTOX.....	22
3.2.2 Transmissions- und Rasterelektronenmikroskopie	23
3.2.3 Untersuchung der hydrodynamischen Größenverteilung durch dynamische Lichtstreuung und Messung des Zetapotentials	23
3.2.4 Messung der Reinheit.....	24
3.2.5 Löslichkeitsuntersuchungen in unterschiedlichen Medien	24
3.2.6 Zellkulturexperimente.....	25
3.2.6.1 Zellkultivierung der Zelllinie Beas-2B.....	26
3.2.6.2 Zellkultivierung der Zelllinie THP-1.....	26
3.2.6.3 Kryokonservierung und Inkulturnahme	27
3.2.6.4 Submerse Exposition in Mono- und Kokultur	28
3.2.6.5 ALI-Exposition an der Vitrocell® <i>Cloud</i>	28
3.2.7 Zytotoxizitätsuntersuchungen über Bestimmung des ATP-Gehalts.....	29
3.2.8 Untersuchungen zur zellulären Verfügbarkeit.....	30
3.2.8.1 Messung des intrazellulären Ionengehalts.....	30
3.2.8.2 Messung der intrazellulären Ionenverteilung	31
3.2.9 Messung des genotoxischen Potentials mittels alkalischer Entwindung.....	32
3.2.10 Genexpressionsanalysen mittels <i>High-Troughput</i> RT-qPCR.....	34
3.2.11 Statistische Auswertung	39

4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	40
4.1	KUPFER-BASIERTE NANOMATERIALIEN.....	40
4.1.1	Physikochemische Eigenschaften.....	40
4.1.2	Untersuchungen zur Löslichkeit.....	42
4.1.3	Toxikologisches Wirkprofil.....	44
4.1.3.1	Zytotoxizität.....	44
4.1.3.2	Zelluläre Verfügbarkeit.....	47
4.1.3.3	Genexpressionsanalysen.....	49
4.1.3.4	Genotoxizität.....	55
4.2	SILBER-BASIERTE NANOMATERIALIEN.....	57
4.2.1	Physikochemische Eigenschaften.....	57
4.2.2	Untersuchungen zur Löslichkeit.....	59
4.2.3	Toxikologisches Wirkprofil.....	60
4.2.3.1	Zytotoxizität.....	60
4.2.3.2	Zelluläre Verfügbarkeit.....	63
4.2.3.3	Genexpressionsanalysen.....	65
4.2.3.4	Genotoxizität.....	70
4.3	NICKEL-BASIERTE NANOMATERIALIEN.....	72
4.3.1	Physikochemische Eigenschaften.....	72
4.3.2	Untersuchungen zur Löslichkeit.....	73
4.3.3	Toxikologisches Wirkprofil.....	75
4.3.3.1	Zytotoxizität.....	75
4.3.3.2	Zelluläre Verfügbarkeit.....	76
4.3.3.3	Genexpressionsanalysen.....	78
4.3.3.4	Genotoxizität.....	82
4.4	TITAN(IV)-DIOXID NANOPARTIKEL, CERIUM(IV)-DIOXID NANOPARTIKEL UND CARBON NANOTUBES (CNT).....	85
4.4.1.1	Physikochemische Eigenschaften.....	85
4.4.1.2	Untersuchungen zur Löslichkeit.....	86
4.4.2	Toxikologisches Wirkprofil.....	87
4.4.2.1	Zytotoxizität.....	87
4.4.2.2	Zelluläre Verfügbarkeit.....	89
4.4.2.3	Genexpressionsanalysen.....	90
4.4.2.4	Genotoxizität.....	93
5	ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION.....	96
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	111
7	ANHANG.....	128
7.1	CHEMIKALIEN UND INSTRUMENTE.....	128
7.1.1	Chemikalien.....	128
7.1.2	Verwendete Kits.....	131

7.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	132
7.1.4	Lösungen, Puffer und Gele	133
7.1.5	Geräte und Software.....	135
7.2	ERGÄNZENDE DATEN.....	137
7.2.1	Temperaturprogramme zur Quantifizierung der Metalle mittels Atomabsorptionsspektrometrie	137
7.2.2	Nachweis einer erfolgreichen Fraktionierung mittels Western Blot	138
7.2.3	Daten zu Genexpressionsanalysen	139
7.2.4	Etablierung der ALI-Kultivierung.....	147
7.2.5	Ergänzende Daten zur zellulären Verfügbarkeit der Nickel-basierten Nanomaterialien.....	148
7.3	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	149
7.4	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	151
7.5	TABELLENVERZEICHNIS.....	155
8	PUBLIKATIONSLISTE	157

ZUSAMMENFASSUNG

Aufgrund der Weiterentwicklung in der Nanotechnologie wird ein immer breiter werdendes Spektrum an unterschiedlichen Nanomaterialien produziert. Metall-basierte Nanomaterialien sind dabei von großem Interesse, vor allem wegen ihrer antimikrobiellen Eigenschaften, der hohen Leitfähigkeit und ihrer katalytischen Funktion. Aufgrund ihrer Größe besitzen Nanomaterialien ein vergrößertes Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis, weshalb von ihnen eine erhöhte Reaktivität und damit Toxizität ausgeht. Neben partikulären Materialien werden auch zunehmend faserförmige Materialien, sog. *Nanowire*, verwendet, die zusätzlich eine faserspezifische Wirkung aufweisen können. Durch die Vielfalt an Nanomaterialien lässt sich häufig kein einzelner Wirkmechanismus eines Materials auf andere Materialien übertragen. Das Ziel des Projekts *MetalSafety*, in das sich diese Arbeit eingliedert, war daher die Entwicklung von Bewertungskonzepten für Metall-basierte Nanomaterialien unterschiedlicher Morphologien.

Hierzu wurden in der vorliegenden Arbeit zehn partikuläre bzw. faserförmige Metall-basierte Nanomaterialien im Hinblick auf ihre physikochemischen Eigenschaften und ihr toxikologisches Wirkprofil untersucht und verglichen. Als Zellmodelle wurde zum einen eine Monokultur aus der Bronchialepithelzelllinie Beas-2B verwendet, außerdem fand eine Kokultur aus Beas-2B-Zellen und makrophagenähnlichen differenzierten THP-1-Zellen Anwendung. Alle Materialien wurden zunächst umfassend charakterisiert, wobei der Fokus auf der Löslichkeit der Materialien in künstlichen physiologischen Medien lag. Die intrazelluläre Freisetzung von Metallionen wurde weiterhin in beiden Zelllinien bestimmt. Dabei zeigte sich eine hohe Verfügbarkeit aller Kupfer-basierter Materialien, unabhängig von Morphologie und Zellsystem. Silber- und Nickel-basierte Materialien wiesen hingegen nur eine moderate Freisetzung von Metallionen auf, wobei sowohl eine Morphologie-Abhängigkeit als auch eine Abhängigkeit von der Zelllinie beobachtet wurde. Hierbei wurde eine vermehrte Aufnahme in makrophagenähnliche Zellen gefunden, wodurch auf einen phagozytotischen Aufnahmemechanismus geschlossen werden kann. Unlösliche Partikel wie TiO₂ NP und CeO₂ NP zeigten wie erwartet eine vernachlässigbar geringe Freisetzung von Metallionen. Studien zur intrazellulären Ionenverteilung zeigten starke Akkumulationen von Kupfer- und Silberionen im Zellkern der Zellen, wohingegen freigesetzte Nickelionen eher im Zytoplasma verblieben.

Zur Erfassung des toxikologischen Wirkprofils wurden die Zytotoxizität und die Potenz der Materialien zur Induktion von DNA-Strangbrüchen bestimmt. Genexpressionsanalysen mittels einer Hochdurchsatz RT-qPCR-Methode dienten der Erfassung einer Aktivierung oder Hemmung von Genclustern wie Metallhomöostase, Inflammation, oxidative Stressantwort, DNA-Schadensantwort und Zellzyklusregulation.

Kupfer-basierte Materialien zeigten Morphologie-unabhängige, jedoch dosisabhängige zytotoxische und genotoxische Wirkungen sowie Änderungen im Genexpressionsprofil. Letztere deuteten auf einen Mechanismus durch Ionenfreisetzung und dadurch induzierte Inflammation und oxidativen Stress hin, der in der Literatur als *trojan horse type* Mechanismus beschrieben ist. Für Silber-basierte Materialien wurden Morphologie-spezifische Unterschiede beobachtet. Während Ag NP eine starke zytotoxische Wirkung aufwies, konnte für Ag NW keine Zytotoxizität festgestellt werden. Beide Materialien verursachten dagegen dosisabhängig DNA-Strangbrüche. Das Genexpressionsprofil gab für beide Materialien Hinweise auf ein Vorhandensein von freien Silberionen, jedoch wurde ebenfalls eine inflammatorische Wirkung beobachtet. Sowohl für Kupfer- als auch für Silber-basierte Materialien wurde eine schwächere Toxizität in der Kokultur beobachtet, wodurch hier auf einen protektiven Effekt durch Makrophagen geschlossen werden kann. Neben submersen Untersuchungen wurden für Kupfer- und Silber-basierte Materialien zusätzliche Untersuchungen nach Exposition über ein *air-liquid interface* (ALI) durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen an einer Grenzfläche zwischen Luft und Flüssigkeit kultiviert. Dieses Szenario soll den Bronchioalveolarbereich simulieren, außerdem ist während der ALI-Exposition eine simultane Erfassung der absolut deponierten Dosis mittels einer Quarzkristall-Mikrowaage (QCM) möglich. Während das Toxizitätsprofil nach ALI-Exposition die Beobachtungen nach submerser Inkubation qualitativ widerspiegelte, wurden toxikologisch relevante Effekte bereits bei geringeren Dosen verursacht. Dies unterstreicht die Bedeutsamkeit der ALI-Exposition zur genaueren Abschätzung einer Toxizität von Nanomaterialien.

Nickel-basierte Materialien wiesen unabhängig von dem verwendeten Kultivierungssystem und der Morphologie lediglich geringe zytotoxische und keine genotoxischen Effekte auf. Bezüglich der Änderungen im Genexpressionsprofil ergaben sich dagegen signifikante Unterschiede zwischen Mono- und Kokultur. Während durch beide Materialien in beiden Kultivierungssystemen inflammatorische Effekte verursacht wurden, wurden vor allem die Gene der oxidativen

Stressantwort deutlich vermehrt in der Kokultur exprimiert. Dies deutet auf einen „oxidativen *Burst*“ durch in der Kokultur befindliche Makrophagen und eine sekundäre Toxizität hin.

TiO₂ NP und CeO₂ NP, die keine lysosomale Löslichkeit aufwiesen, zeigten unabhängig vom Kultivierungssystem in keinem der untersuchten Endpunkte toxikologisch relevante Effekte. Um einen möglichen Fasereffekt durch unlösliche Materialien zu untersuchen, wurden als faserförmiges Referenzmaterial *carbon nanotubes* (CNT) ausgewählt. Diese zeigten in Mono- und Kokultur eine Abnahme der Viabilität und vor allem in der Kokultur inflammatorische Effekte in der Genexpression, was auf eine sog. „frustrierte Phagozytose“ durch Makrophagen hindeutet.

Zusammengefasst stellt diese Arbeit erstmals eine systematische Untersuchung der Toxizität unterschiedlicher Metall-basierter Nanomaterialien in Abhängigkeit ihrer physikochemischen Eigenschaften vor. Es konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre Löslichkeit sowohl für partikuläre als auch für faserförmige Materialien ausschlaggebend für deren toxische Wirkung ist. Die Verwendung von Kokulturen veränderte die Intensität des Toxizitätsprofils ebenfalls in Abhängigkeit von der intrazellulären Löslichkeit. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine ALI-Exposition gegenüber einer herkömmlichen submersen Exposition zu ausgeprägteren Ergebnissen führt, wodurch die Relevanz von weiterentwickelten *in vitro*-Testsystemen in der Partikel- und Fasertoxikologie unterstrichen wird.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse legen gemeinsam mit den von Ronja Neuberger erhobenen Daten einen Grundstein für die Zielsetzung des Gesamtprojekts *MetalSafety*. Auf dieser Basis können im Projekt aufbauende *ex vivo*- und *in vivo*-Untersuchungen stattfinden, welche in ihrer Gesamtheit eine Prädiktion auf die Wirkung im Menschen möglich machen sollen.

ABSTRACT (ENG)

Nanomaterials are increasingly being used in manifold applications. Metal-based nanomaterials are of great interest, mainly due to their antimicrobial properties, high conductivity, and catalytic function. Their small size results in an increased surface-to-volume-ratio. Therefore, nanomaterials have an increased reactivity and thus toxicity. In addition to particulate materials, fibrous materials, so-called *nanowires*, are increasingly being used. Due to their structure these *nanowires* can also have a fiber-specific effect. The variety of nanomaterials makes it difficult to transfer the mode of action from one material to other materials. The aim of the *MetalSafety* project was therefore to develop concepts of risk assessment for metal-based nanomaterials of different morphologies.

For this purpose, in this work, ten different metal-based nanomaterials were compared with respect to their physicochemical properties and their toxicological profile. As cell models a monoculture of the bronchial epithelial cell Beas-2B and a coculture consisting of Beas-2B cells and macrophage-like differentiated THP-1 cells were used. In a first step, all materials were characterized with respect to their solubility in artificial physiological media. The release of metal ions was further determined intracellularly in both, Beas-2B and dTHP-1 cells. All copper-based materials showed a high release of copper ions, independent of morphology and cell system. In contrast, Silver and nickel-based materials showed only a moderate release of metal ions. For both a morphology dependence and a cell line dependence were observed, with dTHP-1 cells showing increased uptake, indicating a phagocytic uptake mechanism. As expected, insoluble particles such as TiO₂ NP and CeO₂ NP showed no intracellular release of metal ions. Studies on intracellular ion distribution showed strong accumulations of copper and silver ions in the nucleus of the cells, whereas released nickel ions tended to remain in the cytoplasm.

To assess the toxicological profile, cytotoxicity and the potency of the materials to induce DNA strand breaks were determined. Furthermore, gene expression analyses using a high-throughput RT qPCR method were used to detect the activation or inhibition of gene clusters such as metal homeostasis, inflammation, oxidative stress response, DNA damage response and cell cycle regulation.

For copper-based materials morphology-independent but dose-dependent cytotoxic and genotoxic effects as well as changes in the gene expression profile were seen. The changes in the gene expression profile indicated a mechanism through ion release followed by inflammation and oxidative stress, which is described in the literature as a trojan horse type mechanism. For silver based materials, morphology specific differences were seen. While Ag NP showed a strong cytotoxic effect, no cytotoxicity was observed for Ag NW. However, both materials caused DNA strand breaks in a dose-dependent manner. The gene expression profile indicated the presence of free silver ions for both materials, but an inflammatory effect was also observed. Comparing monoculture and coculture, a weaker toxicity in coculture was observed for both copper and silver-based materials. This suggests a protective effect by macrophages. In addition to a submerged approach, investigations of copper and silver based materials were carried out after exposure via an air liquid interface (ALI) via the Vitrocell® *Cloud*. This scenario is intended to simulate the bronchioalveolar region. In addition, during ALI exposure, simultaneous recording of the absolute deposited dose is possible using a quartz crystal microbalance (QCM). While no changes in the toxicity profile were observed, toxicologically relevant effects were already caused at lower doses after ALI exposure. This underlines the importance of ALI exposure for a more accurate assessment of the toxicity of nanomaterials.

Nickel-based materials showed only minor cytotoxic and no genotoxic effects, regardless of the cultivation system and morphology used. However, there were significant differences between monoculture and coculture concerning the gene expression profile. While inflammatory effects were observed by both materials in both cultivation systems, genes of the oxidative stress response in particular were expressed significantly more in the coculture. This indicates an oxidative burst by macrophages in the coculture and a secondary toxicity.

Both insoluble materials TiO₂ NP and CeO₂ NP showed no toxic effects at any of the endpoints investigated, regardless of the cultivation system. In order to investigate a possible fibre effect by insoluble materials, carbon nanotubes (CNT) were selected as a fibrous reference material. CNT showed a decrease in viability in monoculture and coculture and, especially in coculture, inflammatory effects in gene expression, indicating so-called frustrated phagocytosis by macrophages.

In summary, a systematic investigation of the toxicity of different metal-based nanomaterials depending on their physicochemical properties was presented for the first time by this work. Intracellular solubility was shown to be crucial for both particulate and fibrous materials in

determining their mode of action. The use of cocultures altered the intensity of the toxicity profile. Furthermore, ALI exposure was shown to give more sensitive results compared to conventional submerged exposure, thus underlining the relevance of more advanced *in vitro* test systems in particle and fibre toxicology.

Together with the data collected by Ronja Neuberger, the results obtained in this work lay the foundation for further *ex vivo* and *in vivo* studies within the project, which in their entirety should give a prediction of the effect of the nanomaterials in humans.

1 EINLEITUNG

1.1 ANWENDUNGEN UND RISIKEN VON NANOMATERIALIEN

Die stetige Weiterentwicklung der Nanotechnologie sorgt für ein immer breiter werdendes Spektrum an Nanomaterialien (NM). Die chemische Beschaffenheit von NM ist dabei vielfältig. NM können zum Beispiel aus Metallen und Metalloxiden, Carbon oder aus organischen Polymeren bestehen. Vor allem Metall-basierte NM werden zunehmend verwendet. Durch ihre im Vergleich zum Rohmaterial einzigartigen Eigenschaften, wie das vergrößerte Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis und ihre dadurch erhöhte Reaktivität werden sie beispielsweise im elektronischen, kosmetischen oder biomedizinischen Bereich eingesetzt (Salem *et al.*, 2022). Zunehmend werden neben sphärischen Nanopartikeln (NP) auch faserförmige Materialien, sogenannte *Nanowire* (NW) eingesetzt, welche durch ihre hohe Leitfähigkeit und Flexibilität vor allem in der Optoelektronik angewendet werden (Kwon *et al.*, 2018).

Nach ISO und einer Definition der Europäischen Kommission sind NM als solche definiert, wenn sie mindestens eine äußere nanoskalige (1-100 nm) Dimension enthalten. NP werden hierbei solche Materialien genannt, die drei äußere nanoskalige Dimensionen aufweisen, NW besitzen zwei Dimensionen im nanoskaligen Bereich (Laux *et al.*, 2018).

1.1.1 Expositionswege und pulmonale Aufnahmemechanismen

Mit zunehmender Verwendung von Nanomaterialien steigt auch die mögliche Exposition am Arbeitsplatz, sowie die von Endverbrauchern, wie zum Beispiel durch NM-haltige Sprays oder durch freigesetzte Nanomaterialien in der Umwelt (Bierkandt *et al.*, 2018). Hinzu kommen auch alle natürlichen Quellen von Nanomaterialien wie Stäube aus Mineralien, deren gesundheitliche Relevanz auch erst teilweise verstanden wird. Die Aufnahme der Materialien kann dermal, oral oder inhalativ erfolgen, wobei die Inhalation die toxikologisch relevanteste Exposition darstellt (Kuhlbusch *et al.*, 2018). Dabei stellt sich die Frage, welche Eigenschaften der NM die Toxizität nach Inhalation in menschlichen Lungenzellen maßgeblich beeinflussen. So kann die toxikologische Antwort der Zellen beispielsweise von der Morphologie des Materials, seiner

chemischen Zusammensetzung, der Persistenz oder seiner Löslichkeit abhängen (Bierkandt *et al.*, 2018).

In Abhängigkeit von der Größe können NM in verschiedene Bereiche des Respirationstrakts gelangen. Materialien bis zu einer Größe von 10 µm können effektiv inhaliert werden. Während größere Partikel mit einer Größe von 2,5-10 µm über den mukoziliären Apparat aus der Lunge heraus transportiert werden können, gelangen Partikel die eine Größe kleiner als 2,5 µm aufweisen bis in die Bronchiolen und die Alveolen (Li *et al.*, 2010). Neben sphärischen Nanopartikeln können auch Fasern durch Inhalation in die Lunge gelangen. Als Fasern werden solche Materialien bezeichnet, die ein Länge-zu-Durchmesser-Verhältnis von mindestens 3:1 besitzen. Dabei gilt, je geringer der Durchmesser, desto tiefer gelangen Fasern in die Lunge (Hoet *et al.*, 2004). Die *World Health Organization* (WHO) hat insbesondere solche Fasern als bedenklich eingestuft, die eine minimale Länge von 5 µm und eine maximale Breite von 3 µm aufweisen. Fasern die diese Eigenschaften erfüllen, können kanzerogene Eigenschaften aufweisen und werden WHO-Fasern genannt (BAuA, 2008). In die Bronchiolen und Alveolen vorgedrungene NM können über die alveoläre *Clearance* eliminiert werden. Diese erfolgt durch Makrophagen, die die Materialien phagozytieren und anschließend über den mukoziliären Apparat ausschleusen können. Die alveoläre *Clearance* erfolgt jedoch nicht effizient, sodass eine Interaktion von NM mit in den Bronchiolen und Alveolen befindlichen Epithelzellen wahrscheinlich ist (Puisney *et al.*, 2018).

Die Aufnahme von Nanomaterialien in die Zelle erfolgt über endozytotische Mechanismen. Generell wird hierbei zwischen zwei Hauptaufnahmemechanismen unterschieden: Phagozytose und Pinozytose. Phagozytose beschreibt die Aufnahme von Strukturen welche eine Größe von mehr als 0,5 µm aufweisen. Diese Strukturen können zum einen Pathogene wie zum Beispiel Viren oder Bakterien darstellen, aber auch apoptotische Zellen werden durch diesen Mechanismus von Immunzellen aufgenommen und so eliminiert. Die Phagozytose lässt sich generell in vier Stadien gliedern: Zunächst erfolgt die Identifizierung der Zielsubstanz durch Oponisierung und anschließende Bindung an Rezeptoren, welche eine Signalweiterleitung zur Aktivierung des Internalisierungsprozesses zur Folge hat. Dabei wird die Zielsubstanz durch Polymerisierung von Actin und dadurch entstehende Ausstülpungen in die Zelle aufgenommen. Anschließend wird das Phagosom gebildet, welches schließlich durch Fusionierung mit Lysosomen zu einem Phagolysosom heranreift. Zwar können Epithelzellen ebenfalls phagozytotische Aktivitäten aufweisen, generell ist die Phagozytose jedoch eher Immunzellen wie zum Beispiel Makrophagen vorbehalten. Die Pinozytose wird dagegen von allen Zelltypen als Aufnahmemechanismus von

Nanomaterialien verwendet und lässt sich in Clathrin- und Claveolae-vermittelte und davon unabhängige Endozytose sowie Makropinozytose einteilen. Die Clathrin-vermittelte Endozytose stellt den gängigsten Aufnahmemechanismus von Nanomaterialien in allen Zellen mit Ausnahme der Makrophagen dar und wird durch die Polymerisierung von Clathrin an der zytoplasmatischen Seite des beginnenden Vesikels initiiert. In diesem „Clathrinmantel“ bildet sich anschließend das Membranvesikel (Makvandi *et al.*, 2021). Innerhalb der Zellen reifen die gebildeten Endosomen ebenfalls zu Lysosomen heran. Eine Übersicht zu den unterschiedlichen Aufnahmewegen ist in Abbildung 1 dargestellt.

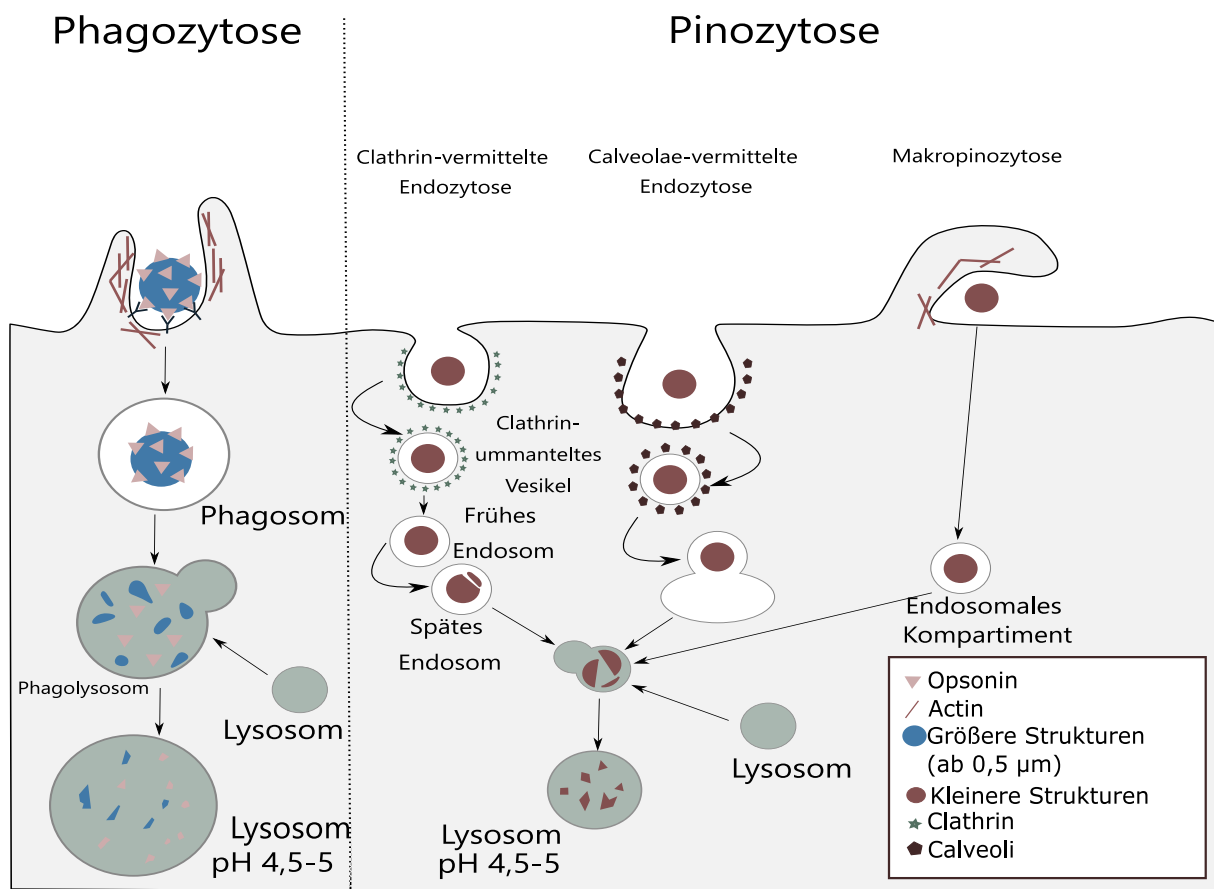


Abbildung 1: Schematische Darstellung endozytotischer Aufnahmemechanismen. In Abhängigkeit ihrer Größe werden Nanomaterialien entweder über Phagozytose oder Pinozytose aufgenommen. Die nach Internalisierung entstandenen Phagosomen bzw. Endosomen reifen unter Verschmelzung mit Lysosomen zu Phagolysosomen heran. In diesen können in Abhängigkeit der Löslichkeit des aufgenommenen Materials Ionen freigesetzt werden (modifiziert nach Makvandi *et al.*, 2021).

Die lysosomale Löslichkeit von Nanomaterialien stellt einen entscheidenden Faktor für die Toxikokinetik der Materialien dar: Für schnell lösliche Materialien wird die Toxizität hauptsächlich durch ihre freigesetzten Ionen bestimmt. Diese verursachen hauptsächlich akute Effekte wie zum

Beispiel die Auslösung des Zelltods oder die Aktivierung pro-inflammatorischer Signalwege (Braakhuis *et al.*, 2021). Der Mechanismus einer endozytotischen Aufnahme von Nanomaterialien mit anschließender Ionenfreisetzung wird als *trojan horse type* Mechanismus bezeichnet (Limbach *et al.*, 2007). Aufgrund ihrer Biopersistenz spielen dagegen für schwer- bis unlösliche Nanomaterialien die Materialeigenschaften wie zum Beispiel die Morphologie und die Oberflächenreaktivität eine größere Rolle bei der Toxizität (Braakhuis *et al.*, 2021).

1.1.2 Kupfer-basierte Nanomaterialien

Kupfer-basierte Nanomaterialien werden aufgrund ihrer einzigartigen Eigenschaften in unterschiedlichsten Bereichen eingesetzt. Kupfer Nanopartikel (Cu NP) und Kupferoxid Nanopartikel (CuO NP) finden beispielsweise als Halbleitermetalle Anwendung in Superkondensatoren, Nahinfrarot-Filtern, magnetischen Speichermedien, Sensoren oder Katalysatoren (Grigore *et al.*, 2016). Darüber hinaus werden die antimikrobiellen und bioziden Eigenschaften im biomedizinischen Bereich, in der Textilindustrie aber auch zur Produktion von Antifouling-Beschichtungen und Biozidprodukten ausgenutzt (Verma & Kumar, 2019; Ben-Sasson *et al.*, 2016). Kupfer *Nanowire* (Cu NW) zeigen Fähigkeiten zur Anwendung als transparente Leiter in der Optoelektronik, durch ihre optischen, elektrischen und mechanischen Eigenschaften. Ein großer Vorteil von Cu NW zu den bisher verwendeten Materialien stellt hierbei die kostengünstigere Produktion dar (Nam & Lee, 2016).

Einer der Hauptnachteile der Verwendung von Kupfer-basierten Nanomaterialien ist ihre Toxizität. Vor allem für CuO NP liegen hierfür bereits zahlreiche Nachweise vor. CuO NP führen *in vivo* nach intratrachealer Instillation zu Inflammation und Ödemen (Yokohira *et al.*, 2009). Weiterhin werden nach intratrachealer Instillation und nasaler Aufnahme in Ratten und Mäusen fibrotische Auswirkungen auf das pulmonale Gewebe beschrieben (Rani *et al.*, 2013; Lai *et al.*, 2018). Neben der pulmonalen Toxizität von CuO NP werden nach oraler Aufnahme außerdem eine hepatische Toxizität und eine Auswirkung auf das kognitive Zentrum beschrieben (Ouni *et al.*, 2020; Anreddy, 2018).

Der Mechanismus der Toxizität von Kupfer-basierten Nanomaterialien ist weiterhin Gegenstand der Forschung. Es wurde gezeigt, dass die Toxizität von CuO NP vor allem von deren hoher Löslichkeitsrate abhängt (Naz *et al.*, 2020; Semisch *et al.*, 2014; Strauch *et al.*, 2017). Über den *trojan horse type* Mechanismus können intrazelluläre Kupferionen freigesetzt werden, die

maßgeblich für die Toxizität verantwortlich sind. Die freien Ionen können durch Fenton-ähnliche Reaktionen die Bildung von Hydroxylradikalen und anderen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) katalysieren (Ahamed *et al.*, 2015). Hydroxylradikale stellen reaktive Komponenten dar, die schnell an viele in der näheren Umgebung befindlichen Zellbestandteile wie z.B. Proteine oder die DNA binden können und so zum Zelltod führen (Jomova *et al.*, 2012). Für Cu NP wurde bereits eine stärkere Reaktivität im Vergleich zu CuO NP gezeigt (Denluck *et al.*, 2018). Im Gegensatz dazu liegen in der Literatur noch keine Daten zur Toxizität von Cu NW vor.

1.1.3 Silber-basierte Nanomaterialien

Silber Nanopartikel (Ag NP) werden in Bereichen wie der Biomedizin, der Kosmetik, der Textilindustrie oder auch in der Lebensmittelindustrie eingesetzt. Die Verwendung von Ag NP basiert dabei hauptsächlich auf deren antibakterieller Eigenschaft. Durch Freisetzung von Silberionen können sie die Aktivität von Bakterien beeinflussen: Freigesetzte Silberionen haben eine starke Affinität zu Thiolgruppen, binden an diese und stören so den bakteriellen Metabolismus durch Inhibierung der Enzymaktivität (Marambio-Jones & Hoek, 2010). Das Hauptanwendungsgebiet von Silber *Nanowire* (Ag NW) stellt dagegen die Optoelektronik dar. Durch ihre hohe Leitfähigkeit und ihre hohe Flexibilität können sie in faltbaren OLED-Displays eingesetzt werden, die in mobilen Elektrogeräten Anwendung finden (Kwon *et al.*, 2018). Außerdem werden Ag NW aufgrund ihrer mikrobiellen Eigenschaften in Wasserfiltern verwendet (Jain & Pradeep, 2005).

Für Ag NP gibt es mehrere mechanistische Vorschläge für Aufnahme und Toxizität. Viele Studien beschrieben einen *trojan horse type* Mechanismus, der auf endozytotischer Aufnahme der Ag NP mit intrazellulärer Freisetzung von Silberionen beruht (Liu & Hurt, 2010; Loza *et al.*, 2014; Kluska *et al.*, 2020; Singh & Ramarao, 2012). Vor allem nach akuter Inkubation können freigesetzte Silberionen die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) katalysieren, was zu einer Schädigung von Proteinen und der DNA führen kann. Außerdem wird ein Beitrag mitochondrieller Signalwege diskutiert (Haase *et al.*, 2012). Neben der direkten toxischen Wirkung von Silberionen kann die Toxizität auch auf der hohen Affinität zu Thiol- und Chloridgruppen beruhen. Diese führt zu einer möglichen Interaktion mit zellulären schwefelreichen Makromolekülen (McShan *et al.*, 2014). So wurde beispielsweise eine Interaktion mit zellulären Zinkfingerstrukturen durch

Silberionen beobachtet, die mit einer Beeinträchtigung zellulärer Prozesse einherging (Kluska *et al.*, 2020).

In vivo-Studien in Ratten haben gezeigt, dass Ag NP eine dosisabhängige Inflammation verursachen können. Sung *et al.* beobachteten nach subchronischer Exposition in Ratten inflammatorische Effekte und eine Beeinträchtigung der Lungenfunktion. Eine Kurzzeit-Inhalationsstudie zeigte dabei, dass der Grad der Inflammation abhängig von der Größe der Ag NP war. Während große Partikel mit 410 nm nach 24 h in den oberen Atemwegen verblieben und keine Inflammation verursachten, wurden kleine Partikel mit einer Größe von 15 nm in den Alveolen deponiert und führten zu einer inflammatorischen Antwort bereits nach 24 h. Darüber hinaus wurde eine Veränderung der in den Alveolen befindlichen Ag NP beobachtet, welche in einer Abnahme der Partikelgröße resultierte. Es wurde daraus auf eine inflammatorische Wirkung geschlossen, die auf der Auflösung der Ag NP basiert (Braakhuis *et al.*, 2014).

Für Ag NW wurde in zellulären Testsystemen gezeigt, dass Prozesse wie eine „frustrierte Phagozytose“ eine Rolle spielen. Längen-abhängig führten Ag NW *in vivo* zu Inflammation und zur Bildung von Granulomen (Silva *et al.*, 2014). Andere Autoren beschreiben dagegen einen phagozytotischen Abbau von Ag NW, der mit der Bildung von Sekundärpartikeln wie Ag₂S einhergeht (Chung *et al.*, 2017). Für Ag NW scheinen also sowohl faserspezifische Effekte als auch die intrazelluläre Degradation eine Rolle zu spielen.

1.1.4 Nickel-basierte Nanomaterialien

Zunehmend wird metallisches Nickel in der Industrie verwendet. Besonders interessant sind hierbei Nickel Nanopartikel (Ni NP), die durch ihre einzigartigen, auf die Nanogröße beschränkten physikochemischen Eigenschaften in vielen Gebieten verwendet werden. Dazu zählen beispielsweise ihre ferromagnetischen Eigenschaften, ein niedriger Schmelzpunkt, eine hohe Oberflächenenergie und ein hoher Brennpunkt. Ni NP zeigen sich daher geeignet, um als Elektrodenmaterial in Keramikkondensatoren verbaut zu werden. Darüber hinaus werden sie beispielsweise als Grundlage für die Herstellung von Magnetbändern zur Datenspeicherung, von Wärmeleitpasten, als elektrische Leiter, als Pigmente oder zur Lichtabsorption verwendet (Magaye & Zhao, 2012; Zhang *et al.*, 2003; More *et al.*, 2021). Neben partikulären Nickelverbindungen steigt außerdem der Bedarf an faserförmigem Nickel, sog. Nickel *Nanowire*

(Ni NW). Diese zeichnen sich wie auch Ni NP durch ihre elektrische und thermische Leitfähigkeit, sowie die ferromagnetischen Eigenschaften aus. Durch ihr hohes Länge-zu-Durchmesser-Verhältnis weisen Ni NW zudem eine hohe Stabilität und eine hohe Belastbarkeit auf (Wang *et al.*, 2018). Die Kombination aus magnetischen und strukturell bedingten Eigenschaften von Ni NW lässt deren potentielle Anwendung beispielsweise in der Mikrowellenelektronik, in Aufzeichnungsmedien aber auch in der Biomedizin zu (Samardak *et al.*, 2012). Besonders letzteres erweist sich als innovative Anwendung: Durch magnetische Anisotropie und einem starken magnetischen Moment können Ni NW zur Zellmanipulation und –separation eingesetzt werden und so potentielle Kandidaten für die Krebstherapie darstellen (Wu *et al.*, 2018; Pinheiro *et al.*, 2013).

Die einzigartigen Eigenschaften von Nickelmaterialien führen jedoch auch zu einer erhöhten zellulären Verfügbarkeit und Reaktivität und damit verbundenen nachteiligen Auswirkungen auf die Gesundheit. Vor allem die Belastung am Arbeitsplatz durch luftgetragene Materialien stellt ein Risiko für Arbeiter in Raffinerien, im Bergbau oder in der Stahlindustrie dar (More *et al.*, 2021; Iqbal *et al.*, 2021). So werden Nickel-haltige Aerosole beispielsweise mit berufsbedingtem Asthma in Verbindung gebracht (Jesus Cruz *et al.*, 2006). Berichten des *International Committee on Nickel Carcinogenesis in Man* (ICNCM) und der *International Agency for Research on Cancer* (IARC) zufolge besteht außerdem eine Korrelation zwischen berufsbedingter Exposition gegenüber Nickel und dem Auftreten von malignen Veränderungen des Respirationstrakts (Sivulka, 2005). Nickelmaterialien wurden daher als Humankanzerogen der Gruppe I eingestuft (IARC, 2012).

Als möglicher Toxizitätsmechanismus von nanoskaligen Nickelmaterialien wird deren Potenz zur Induktion von oxidativem Stress und von inflammatorischen Signalwegen angesehen (Wu & Kong, 2020). Die durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) induzierten Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 können die Induktion der Apoptose oder aber der Tumor-Progression zur Folge haben (Iqbal *et al.*, 2021). Sowohl für partikuläres (Ni NP und NiO NP) als auch für faserförmiges (Ni NW) Nickel wurden *in vivo* nach intratrachealer Instillation toxische Wirkungen aufgrund oxidativer Schäden und Inflammation festgestellt (Zhang *et al.*, 2003; Poland *et al.*, 2012; Cho *et al.*, 2010; Horie *et al.*, 2016).

1.1.5 Titan(IV)-dioxid Nanopartikel und Cerium(IV)-dioxid

Nanopartikel

Die Produktion von Titan(IV)-dioxid Nanopartikeln (TiO_2 NP) stellt einen großen Anteil in der Nanotechnologie dar. TiO_2 NP liegen als nichtbrennbares, geruchsneutrales und weißes Pulver vor, weshalb sie in der Farb- und Papierindustrie verwendet werden. Außerdem finden sie Anwendung als Photokatalysatoren in Solarzellen, als Korrosionsschutz in Knochenimplantaten und in kosmetischen Produkten (Wang & Fan, 2014). Die häufigsten in der Natur vorkommenden und industriell verarbeiteten Formen von TiO_2 sind Anatase, Rutil und Brookit. Während Anatase und Rutil in einer tetragonalen Struktur vorliegen, weist Brookit eine orthorhombische Struktur auf. Alle drei Formen können durch ihre photokatalytische Aktivität unter Einfluss von UV-Strahlung die Generierung von ROS hervorrufen (Zhang *et al.*, 2015b). Während Anatase aufgrund der hohen photokatalytischen Aktivität zu einer starken Induktion von ROS neigt (Yu *et al.*, 2017; Jin *et al.*, 2011; Srivastava *et al.*, 2013), wurden in der Literatur nur geringfügige Effekte durch ein Gemisch aus Anatase und Rutil und durch reines Rutil beschrieben (Bhattacharya *et al.*, 2009; García-Rodríguez *et al.*, 2019b; Di Bucchianico *et al.*, 2017; Gu *et al.*, 2017).

Cerium(IV)-dioxid Nanopartikel (CeO_2 NP) werden dagegen als Additive in Dieselmotoren oder in Katalysatoren in der Automobilindustrie verwendet (Kašpar *et al.*, 1999; Sujesh *et al.*, 2020). Eine Exposition gegenüber CeO_2 NP durch Fahrzeugemissionen ist daher wahrscheinlich (Gosens *et al.*, 2014). Die Toxizität von CeO_2 NP *in vitro* zeigt keine klare Tendenz. Während eine Induktion von ROS und Inflammation durch einige Autoren beobachtet wurde, zeigten andere Autoren keine adversen Effekte bis hin zu einer antioxidativen Wirkung (Gosens *et al.*, 2014).

TiO_2 NP und CeO_2 NP gelten als schwer lösliche, nicht-faserförmige Nanopartikel mit geringer Toxizität (Oberdörster, 2002). Dennoch werden für diese Materialien *in vivo* chronische Effekte wie pulmonäre Inflammation, Fibrose und Lungenkrebs beschrieben. Für beide Materialien wird die Tumorpromotion dabei auf verringerte *Clearance*-Raten zurückgeführt (Braakhuis *et al.*, 2021), wobei Prozesse wie durch chronische Inflammation verursachter oxidativer Stress, sekundäre Genotoxizität und erhöhte Zellproliferation beteiligt sein können (Greim & Ziegler-Skylakakis, 2007). Für CeO_2 NP wurde *in vivo* nach 90-tägiger Exposition eine beeinträchtigte *Clearance*-Rate bei Ratten beobachtet, die auf einen *overload* durch CeO_2 NP hindeutete (Schwotzer *et al.*, 2017). Darüber hinaus wurde die Ausschüttung von Interleukinen wie IL-1 α und IL-1 β sowie die Induktion von oxidativem Stress beschrieben (Schwotzer *et al.*, 2018). TiO_2 NP verursachten *in vivo* in

Abhängigkeit ihrer photokatalytischen Aktivität Inflammation, oxidativen Stress und makrozytäre Anämie (Hadei *et al.*, 2022). Aufgrund möglicher genotoxischer Effekte hat die EFSA im Jahr 2022 TiO₂ NP als nicht sicher bewertet und daher ein Verbot für die Verwendung von TiO₂ NP in Lebensmitteln ausgesprochen (EFSA, 2022).

1.1.6 Carbon nanotubes (CNT)

Kohlenstoffnanoröhren (*Carbon nanotubes*; CNT) beschreiben eine Ansammlung von aus Kohlenstoffringen bestehenden Graphenschichten, die zylindrisch aufgerollt wurden. Je nach Anzahl der Graphenschichten wird von einwandigen CNT (*single-walled* CNT; SWCNT) gesprochen, wenn die Nanoröhren aus einer Schicht bestehen. Mehrwandige CNT (*multi-walled* CNT; MWCNT) bestehen dagegen aus mehreren Schichten, wobei größere MWCNT hunderte Schichten enthalten können (Francis & Devasena, 2018). Sie besitzen eine hohe elektrische und thermische Leitfähigkeit, weshalb sie in der Industrie vielseitig eingesetzt werden können. Beispielsweise werden sie in Lithium-Ionen-Batterien verwendet. Durch weitere Vorteile wie eine hohe Robustheit und ein geringes Gewicht, finden sie zum Beispiel in der Automobilindustrie, in Flugzeugen oder im Schiffsbau Anwendung (Aoki & Saito, 2020). Hierbei werden vor allem Arbeiter exponiert, die innerhalb der Produktionskette mit CNT in Berührung kommen. Es ist aber auch eine Exposition während der CNT-Synthese möglich (Barbarino & Giordano, 2021).

Ihre toxikologische Relevanz besitzen CNT, ähnlich wie Asbest, durch ihre Größe und ihre Biobeständigkeit, wodurch sie in die tiefen Regionen der Atemwege abgelagert werden können (Yang & Zhang, 2019). Einige Studien demonstrierten bereits eine pulmonale Toxizität von CNT. *In vitro*-Studien zeigten zytotoxische Effekte, Inflammation und klastogene genotoxische Effekte (Ventura *et al.*, 2020; García-Rodríguez *et al.*, 2019a; Fukai *et al.*, 2018). *In vivo* wurde nach inhalativer Aufnahme in Mäusen von einer Asbest-ähnlichen Wirkung aufgrund von Inflammation und Gewebeneubildung berichtet (Inoue *et al.*, 2010; Poland *et al.*, 2008). In epidemiologischen Studien wurden das Vorkommen von Lungenfibrose, Krankheiten des bronchialen Parenchyms und Granulomen in Verbindung mit einem Vorhandensein an CNT im Lungengewebe der untersuchten Patienten gebracht (Wu *et al.*, 2010). Aufgrund dieser zahlreichen bekannten Auswirkungen wurden CNT im Jahr 2014 von der IARC als möglicherweise humankanzerogen eingestuft (Gruppe 2B) (Grosse *et al.*, 2014).

1.2 *IN VITRO*-METHODEN ZUR UNTERSUCHUNG VON NANOMATERIALIEN

Die umfassende toxikologische Risikobewertung von Nanomaterialien erfordert ein möglichst realitätsnahes Expositionsszenario. Tierversuche spielen dabei nach wie vor eine große Rolle. Ein großer Vorteil hierbei ist die Möglichkeit der Toxizitätsbetrachtung über den gesamten Lebenszyklus der Tiere. Physiologische und metabolische Unterschiede zwischen Mensch und Tier limitieren allerdings die Übertragbarkeit von *in vivo*-Versuchen auf den Menschen. Außerdem limitieren die hohen Kosten, der Arbeitsaufwand und vor allem ethische Gründe die Verwendung von *in vivo*-Modellen. Daher werden mehr und mehr *in vitro*-Modelle entwickelt, die zur Umsetzung des 3R-Prinzips (*replace, reduce, refine*) beitragen sollen (Fröhlich, 2018). Die folgenden Abschnitte sollen einen Überblick auf die in dieser Arbeit verwendeten *in vitro*-Modelle geben.

1.2.1 Kombination verschiedener Zelltypen zu einer Kokultur

Das am häufigsten verwendete Modell in zur Untersuchung der pulmonalen Toxizität ist die Verwendung von Epithelzellen in Monokultur. Diese Art der Kultivierung ist jedoch nur begrenzt dazu geeignet, durch Nanomaterialien verursachte toxikologische Effekte vorherzusagen. Das Gewebe der Lunge stellt einen Zusammenschluss aus verschiedenen Zelltypen dar. Epithelzellen üben dabei eine Barriere-Funktion gegenüber Fremdstoffen aus. Gleichzeitig sind sie für die Aufnahme physiologisch relevanter Substanzen, wie zum Beispiel die Aufnahme von O₂ zum Gasaustausch in den Alveolen zuständig (Kasper *et al.*, 2011). Gerade im Hinblick auf eine mögliche Toxizität von Nanomaterialien ist die Anwesenheit von pulmonalen Makrophagen relevant, da diese durch ihre phagozytotischen Eigenschaften im Rahmen der bereits beschriebenen alveolären *Clearance* zur erhöhten Aufnahme von Nanomaterialien befähigt sind. Darüber hinaus können Makrophagen wichtige Regulatoren der inflammatorischen Antwort darstellen. Eine Möglichkeit der Integration von Makrophagen in das pulmonale Testsystem ist beispielsweise die Kokultivierung von Epithelzellen mit THP-1-Monozyten, die durch Differenzierung einen makrophagenähnlichen Phänotyp aufweisen (Upadhyay & Palmberg, 2018). Die Kombination von Epithelzellen mit differenzierten THP-1-Zellen (dTHP-1) wurde schon mehrfach demonstriert, beispielsweise bei Inkubation mit Ag NP (Kletting *et al.*, 2018) oder bei Inkubation mit CuO NP

(Hufnagel *et al.*, 2021). Eine schematische Darstellung einer Mono- und einer Kokultur ist in Abbildung 2 gezeigt.

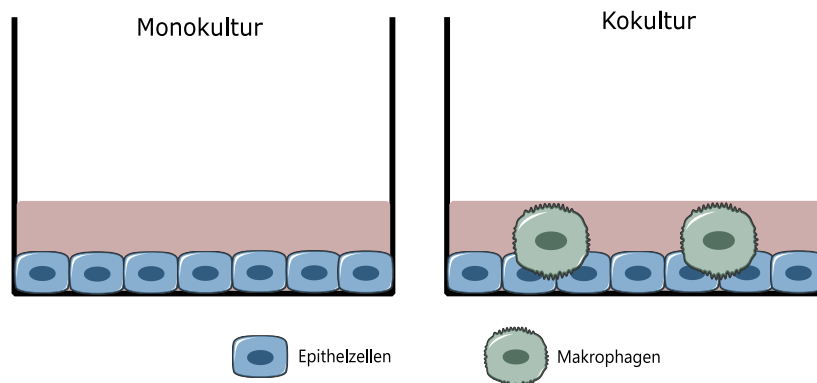


Abbildung 2: Schematische Darstellung einer Monokultur (links) und einer Kokultur (rechts) unter submersen Bedingungen.

1.2.2 Vergleich der submersen Exposition und einer Exposition über ein *air-liquid interface*

Zur Ermittlung einer möglichen Toxizität *in vitro* wird meist ein submerser Ansatz gewählt. Hierbei werden die Zellen auf einer Oberfläche, die mit Medium bedeckt ist, kultiviert. Die Inkubation gegenüber der Testsubstanz erfolgt durch Zugabe einer Lösung oder Suspension in das auf den Zellen befindliche Medium. Es handelt sich dabei um eine unkomplizierte und schnelle Methode. Vor allem für die Untersuchung von Nanomaterialien weist dieses Testsystem jedoch starke Limitierungen auf. So ist beispielsweise die absolute Dosis schwer abschätzbar, da diese von der Größe, der Löslichkeit und dem Agglomerationsverhalten der Materialien im Suspensionsmedium abhängt. Zusätzlich kann die Ausbildung einer Proteincorona durch Mediumbestandteile wie zum Beispiel fetales Kälberserum die Depositionsrate verändern (Lacroix *et al.*, 2018; Lenz *et al.*, 2013). Diese Einflüsse können die physikochemischen Eigenschaften der Nanomaterialien im Medium und somit die Toxizität der Materialien stark beeinflussen. Dies wurde beispielsweise bereits für ZnO NP und TiO₂ NP unter submersen Bedingungen beobachtet (Lenz *et al.*, 2013; Medina-Reyes *et al.*, 2020).

Ein weiterer Aspekt der Limitierung von submersen Testsystemen ist deren physiologische Relevanz als Lungenmodell. Die Epithelzellen der Lunge sind auf apikaler Seite gegenüber Luft ausgesetzt um den Gasaustausch zu gewährleisten, während die basale Seite dem Blut zugewandt

ist. Diese Eigenschaften könnten Epithelzellen unter submersen Bedingungen nicht erfüllen. Daher stellt die submerse Exposition kein realitätsnahes Modell zur Untersuchung der pulmonalen Toxizität dar (Upadhyay & Palmberg, 2018). Die Exposition von Lungenzellen an einer Luft-Flüssigkeit-Grenzschicht (engl. *air-liquid interface* (ALI)) spiegelt dagegen ein realitätsnäheres Expositionsszenario wider. Dabei wachsen die Zellen auf einer porösen Membran und werden nur von der basalen Seite mit Medium versorgt. Die apikale Seite der Zellen ist, analog zur Situation in der Lunge, der Luft ausgesetzt. (Fröhlich, 2018). Neben der Kultivierung einer Monokultur über ein ALI ist darüber hinaus eine Kokultivierung aus zwei oder mehreren Zelltypen möglich. Ein Vorteil hierbei ist eine Zell-Zell-Kommunikation, wie sie auch *in vivo* auftritt (Upadhyay & Palmberg, 2018). Die Kombination aus einer ALI-Kultivierung und einer Kokultivierung mehrerer Zelltypen besitzt eine hohe physiologische Relevanz. Eine schematische Darstellung zu verschiedenen Kultivierungsmöglichkeiten am ALI ist in Abbildung 3 zu sehen.

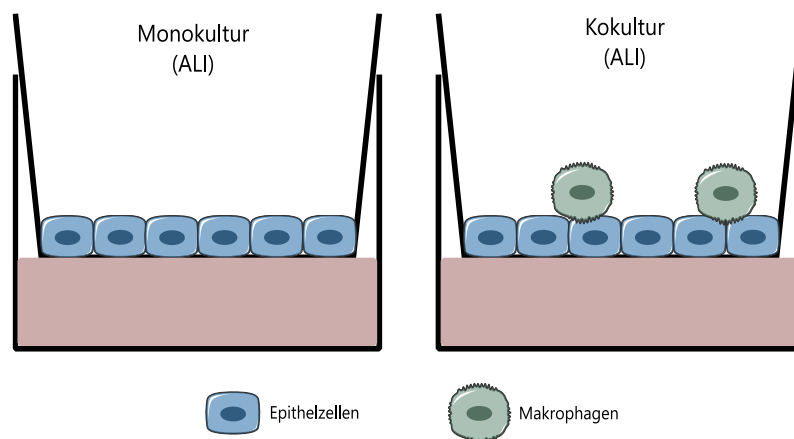


Abbildung 3: Schematische Darstellung einer Monokultur (links) und einer Kokultur (rechts) unter *air-liquid interface* (ALI)-Bedingungen. Die Zellen werden auf einer porösen Membran kultiviert und von basaler Seite mit Medium versorgt, während die apikale Seite der Luft ausgesetzt ist.

Die Exposition über ein *air-liquid interface* beschreibt das Aufbringen eines Partikel- oder Faseraerosols auf die am ALI kultivierten Zellen. Es wird dabei zwischen einer kontinuierlichen und diskontinuierlichen Exposition unterschieden. Die kontinuierliche Exposition ermöglicht eine Materialdeposition über einen längeren Zeitraum hinweg. Dagegen erfolgt die diskontinuierliche Exposition durch eine einmalige Generierung eines Aerosols zum Beispiel mittels der Vitrocell® *Cloud*, die auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wird. Die schematische Darstellung einer diskontinuierlichen ALI-Exposition ist in Abbildung 4 zu sehen. Das Aerosol wird dabei durch Vibration einer porösen Membran in einem Vernebler gebildet. Das entstandene

Aerosol besteht aus Flüssigkeitströpfchen, in die die Partikel oder Fasern eingeschlossen sind (Dhand, 2004). Innerhalb einer 10-minütigen Inkubationsdauer wird das Aerosol auf der Oberfläche der Zellen deponiert, wobei die Depositionsrates nur von der Sedimentation und der Brown'schen Molekularbewegung bestimmt wird (Secondo *et al.*, 2017). Die deponierte Dosis kann mittels einer Quarzkristall-Mikrowaage ermittelt werden. Dabei wird die Änderung der Schwingungsfrequenz des Quarzkristalls gegenüber einem Referenzkristall verglichen und über eine entsprechende Software erfasst (Secondo *et al.*, 2017; Ding *et al.*, 2020).

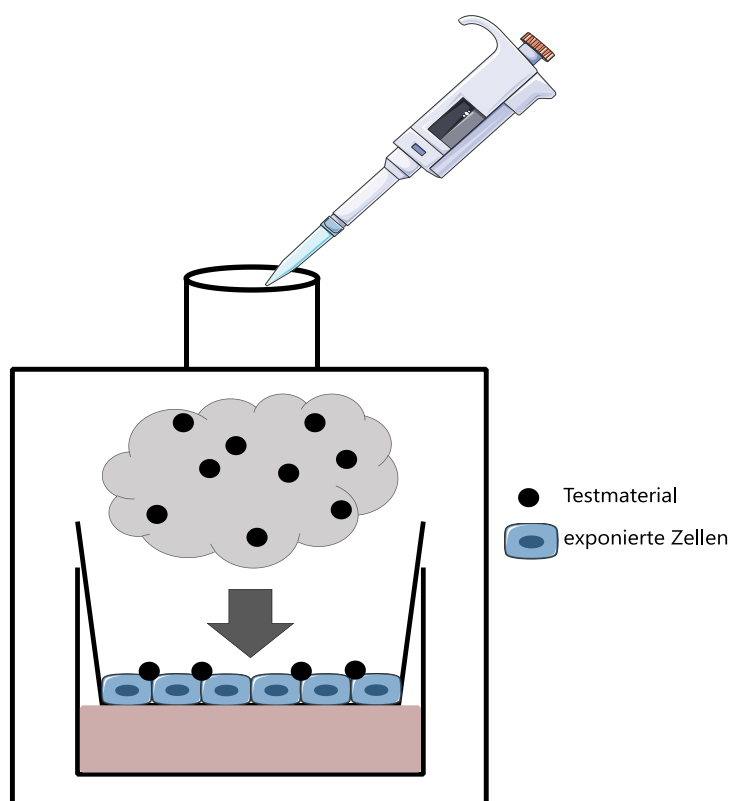


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Exposition über ein *air-liquid interface* durch eine Aerosolwolke (modifiziert nach Lacroix *et al.*, 2018).

Die Expositions-kammer der Vitrocell® *Cloud* besteht aus zwei Kompartimenten. Dadurch ist eine simultane Exposition einer Negativkontrolle gegenüber eines Kontrollaerosols unter gleichen Bedingungen möglich. Es ist außerdem möglich, an die Expositions-kammer ein *PowerVent*-System anzuschließen, um Partikel- und Faserrückstände in der Luft nach Exposition abzusaugen und so eine sichere Arbeitsatmosphäre zu gewährleisten. Die Vitrocell® *Cloud* wurde bereits in diversen Studien verwendet. So wurden beispielsweise CuO NP und TiO₂ NP (Hufnagel *et al.*, 2020), Quarzstäube (Friesen *et al.*, 2022) aber auch Ag NP und Ag NW (Fizeşan *et al.*, 2019) erfolgreich über dieses Expositionssystem vernebelt.

2 FRAGESTELLUNG

Metall-basierte Nanomaterialien werden aufgrund einzigartiger Eigenschaften in einer Vielzahl an industriellen Bereichen eingesetzt. Die zunehmende Verwendung sorgt für ein immer breiter werdendes Spektrum dieser Nanomaterialien und erschwert deren toxikologische Beurteilung. Vor allem die Exposition über den Respirationstrakt spielt dabei eine Rolle. Zunehmend werden auch faserförmige Nanomaterialien, sog. *Nanowire* (NW) verwendet, die sich aufgrund ihrer Morphologie in ihrer zellulären Antwort anders verhalten können als Nanopartikel der gleichen Spezies. Während es für einzelne Metall-basierte Nanomaterialien bereits Hinweise auf ihre Wirkweise gibt, fehlen zum Vergleich partikulärer und faserförmiger Verbindungen der gleichen Metallspezies sowie zur Metallspezies-spezifischen Wirkung bislang jedoch systematische toxikologische Untersuchungen. Die erstmalige systematische Untersuchung partikulärer und faserförmiger Metall-basierter Nanomaterialien ist Gegenstand des BMBF-geförderten Projektes *MetalSafety*, in welches sich die vorliegende Arbeit eingliedert. Basierend auf dem Projektvorhaben werden zehn Nanomaterialien ausgewählt, die sich in ihren physikochemischen Eigenschaften unterscheiden. Diese beinhalten neben Materialien, die sich im sauren Milieu lösen, auch solche Materialien, die eine hohe Biopersistenz aufweisen. Jede Materialgruppe besteht außerdem aus partikulären und aus faserförmigen Verbindungen.

Zur Aufklärung der Wirkmechanismen werden in der vorliegenden Arbeit unterschiedliche Zellmodelle verwendet. Es erfolgt zum einen ein Vergleich zwischen einer herkömmlichen Monokultur aus Zellen des Bronchialepithels (Beas-2B) und einer Kokultur aus Epithelzellen und makrophagenähnlichen Zellen (differenzierte THP-1), die der Situation im Zielorgan Lunge besser angenähert sein soll. Für ausgewählte Nanomaterialien wird neben einer submersen Inkubation zusätzlich eine Exposition über ein *air-liquid interface* durchgeführt. Diese ermöglicht realitätsnähere Bedingungen, da hierbei die Grenzfläche zwischen Luft und Blut in der Bronchioalveolarregion simuliert wird. Außerdem ist durch die Exposition über ein ALI eine Erfassung der absoluten Dosis durch eine direkte Messung des deponierten Materials über eine Quarzkristall-Mikrowaage möglich.

Die Materialien werden zunächst umfassend physikochemisch charakterisiert. Der Fokus liegt hierbei auf der Löslichkeit in unterschiedlichen physiologischen Flüssigkeiten, wie zum Beispiel einer künstlichen lysosomalen Modellflüssigkeit, um die intrazelluläre lysosomale Auflösungsrate zu bestimmen. Diese wird zusätzlich mittels der Untersuchung der intrazellulären Verfügbarkeit in beiden in der Arbeit verwendeten Zelllinien Beas-2B und differenzierte THP-1 überprüft. Außerdem wird für beide Zelllinien die intrazelluläre Verteilung der freigesetzten Ionen in Zytoplasma und Zellkern untersucht. Im Anschluss erfolgt eine Untersuchung von Mono- und Kokultur hinsichtlich ihrer zellulären Antwort gegenüber den zehn Nanomaterialien. Hierbei wird zunächst die Zytotoxizität über die Messung des ATP-Gehalts bestimmt. Mittels Genexpressionsanalysen soll der Effekt der Nanomaterialien auf Gene verschiedener Gencluster, wie z.B. Inflammation, oxidative Stressantwort, DNA-Schadensantwort oder Zellzyklusregulation untersucht werden. Außerdem wird eine mögliche genotoxische Wirkung der Materialien anhand der Induktion von DNA-Strangbrüchen quantifiziert.

Anhand der erhaltenen Ergebnisse soll eine Abschätzung der Wirkmechanismen der Materialien stattfinden und mögliche Eigenschaften, die den Wirkmechanismus beeinflussen, herausgearbeitet werden. Neben der in dieser Arbeit verwendeten Mono- und Kokultur, werden im Rahmen des Projekts *MetalSafety* A549-Zellen als weitere humane Zelllinie in Mono- und Kokultur, sowie eine Lungenepithelzelllinie aus der Spezies Ratte (RLE-6TN) zum Vergleich herangezogen. Diese Untersuchungen werden von M.Sc. Ronja Neuberger gemacht. Die erhaltenen *in vitro*-Daten sollen die Grundlage für *ex vivo*- und *in vivo*-Versuche darstellen, welche in ihrer Gesamtheit eine Prädiktion auf die Wirkung im Menschen möglich machen sollen. Als Gesamtziel des Projekts sollen so vergleichsweise einfache Bewertungskonzepte zur zukünftigen Ableitung von Grenzwerten und Sicherheitsfaktoren entwickelt werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIAL

Alle verwendeten Chemikalien, Puffer, Geräte und Verbrauchsmaterialien sind tabellarisch im Anhang (Kapitel 7) aufgeführt.

3.2 METHODEN

3.2.1 Probenvorbereitung nach NANOGENOTOX

Zur Herstellung einer Materialsuspension wurden die Materialien vor den Experimenten nach dem NANOGENOTOX Dispersions-Protokoll aufgearbeitet (Jensen *et al.*, 2017). Dazu wurden die Materialien in ein 10 mL Schraubdeckelglas eingewogen, zunächst mit 30 μ L 96 %-igem Ethanol benetzt und anschließend mit 970 μ L 0,05 %-iger BSA-Lösung auf 1 mL ergänzt. Anschließend wurde das Schraubdeckelglas etwa 1 Minute abwechselnd auf eine Oberfläche geklopft und leicht geschüttelt. Schließlich wurde die Suspension mit 5 mL 0,05 %-igem BSA auf eine Endkonzentration von 2,56 mg/mL gebracht. Alle Partikel wurden anschließend für 13 Minuten und 25 Sekunden unter einer Ultraschallspitze mit 10 % Amplitude sonifiziert. Anschließend wurden die Partikelsuspensionen entweder für Experimente verwendet oder aliquotiert und bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert. Um eingefrorene Aliquote zu verwenden, wurde die Partikelsuspension bei 60 °C für mindestens 1 Minute im Ultraschallbad sonifiziert. Für die Aufarbeitung der *Nanowire* musste das Dispersions-Protokoll zeitlich so angepasst werden, dass eine gute Dispergierung unter Beibehaltung der Fasermorphologie erreicht wurde. Die Dispersions-Parameter für alle faserförmigen Materialien sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Verwendete Sonifizierungsdauer für faserförmige Materialien.

Material	Dauer der Sonifizierung
Cu NW	20 Sekunden
Ag NW	Keine Sonifizierung, rühren auf dem Magnetrührer
Ni NW	13:25 Minuten
<i>Carbon nanotubes</i>	13:25 Minuten

3.2.2 Transmissions- und Rasterelektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie ermöglicht eine Bildgebung, die auf der Ablenkung beschleunigter Elektronen basiert. Für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden 0,5-1 μL der Materialsuspensionen auf ein Gitternetzchen (TEM-*grid*) aufgetragen. Um die Morphologie der vernebelten Materialien zu überprüfen, wurde ein TEM-*grid* während einer Exposition in die Expositions-kammer der *Cloud* gelegt. Zur Vermessung der Größenverteilung wurden anschließend Bilder der partikulären Materialien mittels eines Transmissions-elektronenmikroskops (TEM) und der faserförmigen Materialien mittels eines Rasterelektronenmikroskops (REM) aufgenommen. Die Partikel-Aufnahmen wurden von Heike Störmer mit einem TEM CM 200 FEG der Firma PHILIPS und die Faser-Aufnahmen von Volker Zibat mit einem REM 1530 Gemini LEO der Firma Zeiss angefertigt. Zur Auswertung der Größenverteilung der Nanomaterialien wurden je Material drei TEM-*grids* beladen und elektronenmikroskopisch betrachtet. Je TEM-*grid* wurden anschließend zehn Aufnahmen gemacht und aus diesen Aufnahmen mindestens 300 Partikel bzw. Fasern mithilfe der Software *ImageJ* vermessen und der Mittelwert bestimmt.

3.2.3 Untersuchung der hydrodynamischen Größenverteilung durch dynamische Lichtstreuung und Messung des Zetapotentials

Der hydrodynamische Durchmesser (d_h) beschreibt den Durchmesser eines Nanopartikels mitsamt seiner in Suspension ausgebildeten Hydrathülle. Er kann mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) bestimmt werden. Die Partikelgröße wird dabei über die zeitliche Veränderung des gestreuten Lichts abgeleitet. Das Zetapotential beschreibt im allgemeinen die Stabilität einer Suspension. Bei einem Zetapotential von weniger als -30 mV oder mehr als +30 mV wird von einer stabilen Suspension gesprochen. Ein Zetapotential von 0 mV beschreibt hingegen eine komplett instabile Suspension. Um den hydrodynamischen Durchmesser zu

bestimmen, wurden die Nanopartikel zunächst wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben aufgearbeitet und anschließend in einer Konzentration von 100 µg/mL in Zellkulturmedium verdünnt. 1 mL der verdünnten Nanopartikel-Suspension wurde anschließend in eine Polystyrolküvette überführt und der hydrodynamische Durchmesser mittels eines Zetasizer Nano ZS der Firma Malvern gemessen. Neben dem hydrodynamischen Durchmesser wurde zusätzlich der Polydispersitäts-Index (PDI) bestimmt, der die Homogenität einer Suspension beschreibt. Der PDI kann zwischen 0 und 1 liegen, wobei 0 eine monodisperse Suspension beschreibt, in der alle Partikel gleich groß sind, und 1 eine polydisperse Suspension mit Partikeln unterschiedlicher Größen beschreibt.

Zur Bestimmung des Zetapotentials wurde eine gefaltete Kapillarzelle angewendet. Diese wurde zuvor mit bidestilliertem Wasser und 96 %-igem Ethanol gespült. Anschließend wurde die Partikelsuspension mithilfe einer Plastikspritze in die Kapillarzelle gefüllt.

3.2.4 Messung der Reinheit

Zur Messung der Reinheit wurde die Material-Stammlösung zunächst auf einem Heizschüttler eingedampft. Anschließend erfolgte ein Aufschluss mit 500 µL einer 1:1 Mischung (v/v) HNO₃ (69%)/H₂O₂ (31%) durch schrittweises Erhitzen von 60 °C auf 95 °C und der verbleibende Rückstand wurde in 0,2 %-iger HNO₃ aufgenommen. Die Messung von 21 Elementen fand in Kooperation mit Frau Dr. Elisabeth Eiche (Institut für Angewandte Geowissenschaften, KIT) mittels eines Massenspektrometers mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) statt.

3.2.5 Löslichkeitsuntersuchungen in unterschiedlichen Medien

Um die Löslichkeit der Nanomaterialien zu untersuchen, wurde die Auflösungsrate in unterschiedlichen physiologisch relevanten Medien bestimmt. Die genauen Zusammensetzungen sind im Anhang zu finden. Außerdem wurde die Löslichkeit in den in der Arbeit verwendeten Zellkulturmedien bestimmt. Nach Aufarbeitung wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben wurden die Materialien in einer Konzentration von 100 µg/ml in 10 mL des jeweiligen Mediums verdünnt und in einem 15 mL-Röhrchen bei 37 °C und 150 rpm für 24 h, 48 h oder 7 Tage inkubiert. Zum Abbruch der Inkubation wurde die Suspension zunächst für 60 Minuten bei 3000 g zentrifugiert, um eine grobe Abtrennung der nicht-gelösten Rückstände zu erreichen. Anschließend wurden viermal 2 mL entnommen, in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei 16.000 g für 60 Minuten bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Jeweils 1 mL aus jedem Reaktionsgefäß

wurden schließlich vereint, daraus nochmals 2 mL entnommen und bei 16.000 g für 60 Minuten bei RT zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde 1 mL auf einem Heizschüttler bei 95 °C eingedampft und anschließend mit 500 µL einer 1:1 Mischung (v/v) HNO₃ (69%)/H₂O₂ (31 %) durch schrittweises Erhitzen von 60 °C auf 95 °C aufgeschlossen. Der verbleibende Rückstand wurde in 0,2 %-iger HNO₃ aufgenommen und der Metallgehalt mittels Graphitrohr-AAS oder ICP-MS gemessen. Ein möglicher Rückstand von Partikel- und Faserrückständen wurde über eine Messung mittels DLS ausgeschlossen.

AAS- und ICP-MS-Messungen

Die Quantifizierung erfolgte durch eine externe Kalibriergerade im Bereich von 0-12 µg/L für die Nickel-basierten Materialien und im Bereich von 0-25 µg/L für Kupfer- und Silber-basierte Materialien. Zusätzlich wurde zur Messung der Kupfer- und Silber-basierten Materialien ein Pd/Mg-Modifier verwendet, welcher mit einem Volumen von 5 µL zusammen mit 20 µL der Probelösung in das Graphitrohr gegeben wurde. Die verwendeten AAS-Temperaturprogramme sind im Anhang 7.2.1 zusammengefasst.

Die Quantifizierung von Ti und Ce erfolgte mittels ICP-MS-Messung über eine Kalibriergerade im Bereich von 0-100 µg/L in 1 %-iger HNO₃.

Berechnung der Ionenkontrollen auf Basis der Löslichkeit

Auf Basis der Löslichkeit der Materialien im Zellkulturmedium KGM wurde die Konzentration einer Ionenkontrolle berechnet, die während der submersen Inkubation den Beitrag von extrazellulär im Zellkulturmedium gelöstem Nanomaterial widerspiegeln sollte.

Die Konzentration der Ionenkontrolle berechnete sich wie folgt:

$$\text{Konzentration (Ionenkontrolle)}[\mu\text{M}] = \frac{L_{\text{max}} * c_{\text{max}}}{1000 * M} * 1000000$$

L_{max} : maximale Löslichkeit der Materialien in Zellkulturmedium

c_{max} : maximale Inkubationskonzentration

M : molare Masse des Metalls

3.2.6 Zellkulturexperimente

In der vorliegenden Arbeit wurde mit zwei unterschiedlichen Zelllinien gearbeitet, die eine wichtige Rolle in der Inhalationstoxikologie spielen. Neben der Bronchialepithel-Zelllinie Beas-2B

wurden differenzierte Monozyten (THP-1-Zellen) verwendet, um eine makrophagenähnliche Zelllinie zu erhalten.

Mit Ausnahme der Exposition an der Vitrocell® *Cloud* wurden alle Experimente unter sterilen Bedingungen unter der *Laminar Flow* Sicherheitswerkbank (Stufe II) durchgeführt. Alle Verbrauchsmaterialien wurden vor Verwendung autoklaviert, alle verwendeten Medien und Lösungen wurden sterilfiltriert und alle Materialien wurden vor Verwendung mit 80 % Ethanol sterilisiert. Für alle Zellkulturversuche wurden die benötigten Lösungen vor Verwendung auf 37 °C erwärmt.

3.2.6.1 Zellkultivierung der Zelllinie Beas-2B

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde als Basiszelllinie die Beas-2B-Zellen verwendet (ATCC® CRL-9609). Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine Zelllinie, die aus dem humanen Bronchialepithel erhalten und durch eine Transfektion mit dem Adenovirus 12-SV40 immortalisiert wurde (Reddel *et al.*, 1988). Beas-2B-Zellen weisen sowohl Merkmale des Bronchial- als auch des Alveolarepithels auf (Bhowmick & Gappa-Fahlenkamp, 2016). Die Kultivierung der Zellen fand in *Keratinocyte Growth Medium* (KGM) statt. Vor der Aussaat mussten alle verwendeten Zellkulturgefäße für mindestens 30 Minuten mit einer Proteinmischung aus 10 µg/mL bovinem Fibronectin, 30 µg/mL Collagen und 10 µg/mL Rinderserumalbumin (BSA) vorbehandelt werden. Nach Vorbehandlung wurde die Proteinmischung abgesaugt und die Zellen konnten subkultiviert werden. Die Subkultivierung fand ein- bis zweimal pro Woche statt. Dazu wurden die Zellen mit 2 mL Accutase® benetzt und für 3-5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgelöst, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 3 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in frischem KGM-Medium resuspendiert und eine definierte Zellzahl in eine neue Zellkulturschale gegeben.

Die Zellen wurden freundlicherweise von PD Dr. Carsten Weiss (Institut für Biologische und Chemische Systeme, KIT) zur Verfügung gestellt und von Passage 50 bis 70 verwendet.

3.2.6.2 Zellkultivierung der Zelllinie THP-1

Als Ergänzung zur Epithelzelllinie und zur Bildung einer Kokultur zur Erfassung von spezifischen Eigenschaften wurde die Zelllinie THP-1 verwendet (ATCC® TIB-202). Es handelt sich hierbei um eine Monozyten-Zelllinie die einem einjährigen männlichen Patienten mit akuter monozytärer

Leukämie entnommen wurde. Durch Differenzierung mithilfe von Phorbol-12-myristat-13-acetat können die Zellen einen makrophagenähnlichen Phänotyp aufweisen (Tsuchiya *et al.*, 1980). Ein Vorteil der differenzierten THP-1-Zellen (dTHP-1) ist ihre breite Immunantwort gegenüber verschiedenen Stimulanzen, was für die Untersuchung einer Immunantwort nach Nanomaterial-Exposition ausgenutzt werden kann (Chanput *et al.*, 2014). THP-1-Zellen wurden undifferenziert in Suspension in RPMI-1640 mit 10 % FKS und 100 U/mL Penicillin sowie 100 µg/mL Streptomycin in T75-Zellkulturflaschen kultiviert. Die Subkultivierung erfolgte einmal pro Woche. Dazu wurde zunächst die Zellzahl bestimmt und anschließend eine definierte Anzahl an Zellen in eine frische Zellkulturflasche überführt. Vor experimenteller Verwendung mussten die Zellen mit 30 ng/mL PMA differenziert werden. Dazu wurde eine definierte Zellzahl aus der Zellkulturflasche entnommen, für 3 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert und in eine Zellkulturschale gegeben. Anschließend wurden die Zellen mit 30 ng/mL PMA für 4 Tage inkubiert. Zum Abbruch der PMA-Inkubation wurde das Medium abgesaugt, der Zellrasen mit PBS gewaschen und anschließend für weitere 3 Tage in frischem Medium inkubiert. Eine erfolgreiche Differenzierung wurde mikroskopisch durch die adhärenente Eigenschaft der Zellen überprüft. Zur Nutzung in einem Zellkulturexperiment wurden die dTHP-1-Zellen mit Accutase® für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Zellrasen abgelöst und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation für 3 Minuten bei 1300 rpm wurde eine Zellzählung durchgeführt und eine definierte Zellzahl ausgestreut.

Die Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Richard Gminski (Abteilung für Umweltmedizin und Hygiene, Albert-Ludwig-Universität Freiburg) zur Verfügung gestellt und von Passage 3 bis 30 verwendet.

3.2.6.3 Kryokonservierung und Inkulturnahme

Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen zu Beginn der Arbeit kryokonserviert. Ziel der Kryokonservierung war dabei die Erstellung einer Reserve an vitalen Zellen für die spätere Verwendung. Dazu wurden die Zellen abgelöst und die Zellzahl wurde ermittelt. Anschließend wurden je 3×10^6 Zellen in 1 mL Tieffriermedium (FKS mit 10 % DMSO) in einem 2 mL Kryogefäß suspendiert und es erfolgte ein mehrstufiger Einfrierprozess. Dazu wurden die Zellen zunächst über Nacht bei -80 °C eingefroren und anschließend bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Verwendung der Zellen wurde das Kryogefäß im Wasserbad bei 37 °C zügig aufgetaut und die Zellsuspension in ein vorbereitetes Zentrifugenröhrchen mit frischem Medium überführt. Zur

Entfernung des Tieffriermediums erfolgte eine anschließende Zentrifugation für 3 Minuten bei 1300 rpm. Schließlich wurde das erhaltene Zellpellet in frischem Medium aufgenommen und in eine frische Zellkulturschale oder –flasche überführt.

3.2.6.4 Submerse Exposition in Mono- und Kokultur

Für die submerse Exposition in Monokultur wurden Beas-2B-Zellen in einer Zelldichte von 4×10^5 Zellen/cm² und dTHP-1-Zellen mit einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen/cm² ausgestreut und für 24 h kultiviert. Im Falle der Kokultur wurden 4 h nach Ausstreuen der Beas-2B-Zellen die dTHP-Zellen zu den Epithelzellen hinzugegeben. Die Zellzahl der dTHP-1-Zellen wurde dabei so gewählt, dass sie zum Zeitpunkt der Inkubation etwa 10 % der Zellzahl der Beas-2B-Zellen betrug. Nach 24 h wurden die Nanomaterialien wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben aufgearbeitet und die Materialsuspensionen in entsprechenden Verdünnungen im Kulturmedium hergestellt. Für alle Experimente wurden dabei Materialsuspensionen in einem Volumen von 313 µL/cm² auf die Zellen gegeben. Eine Übersicht über die verwendeten Suspensionskonzentrationen und den dazu korrelierenden Dosen in µg/cm² ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Verwendete Suspensions-Konzentrationen und dazu korrelierende Materialdosen für submerse Experimente.

Konzentration [µg/mL]	1	5	10	25	50	100
Dosis [µg/cm ²]	0,3	1,5	3	7,5	15	30

3.2.6.5 ALI-Exposition an der Vitrocell® Cloud

Ausstreuen der Zellen

Für die Exposition an der Vitrocell® Cloud wurden die Zellen auf sogenannten *transwells* kultiviert. Diese bestehen aus 12-well Platten mit Zellkultureinsätzen (*inserts*), welche eine Membran enthalten, auf denen die Zellen als Monolayer kultiviert werden können. Vor dem Ausstreuen auf die Membran mussten die *transwells* gecoatet und für 30 Minuten vorkonditioniert werden. Für die Vorkonditionierung wurde 1 mL Zellkulturmedium in das basolaterale Kompartiment gegeben und bei 37 °C inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen abgelöst und gezählt. Für die Monokultur aus Beas-2B-Zellen wurden $4,5 \times 10^6$ Zellen in das apikale Kompartiment der *transwells* gegeben und für 24 h kultiviert. Im Falle einer Kokultur wurden 4 Stunden nach

Ausstreuen der Beas-2B-Zellen dTHP-1-Zellen in das apikale Kompartiment hinzugegeben. Die Zellzahl wurde hierbei wieder so gewählt, dass die Zahl der dTHP-1-Zellen zum Zeitpunkt der Exposition etwa 10 % der Zellzahl der Beas-2B-Zellen betrug.

Vorbereitung der Expositions-kammer und der Materialsuspensionen

Die Expositions-kammer wurde am Tag vor der Exposition gereinigt und mit 80 %-igem Ethanol sterilisiert. Außerdem wurde der Heizblock auf 37 °C vorgewärmt. Am Tag der Exposition wurde die *quarz crystal microbalance* (QCM) in die Expositions-kammer eingesetzt und die Software zur Erfassung der Materialdeposition gestartet. Nachdem die Schwingung der QCM konstant war, wurde die jeweilige Materialsuspension hergestellt. Hierzu wurden die Materialien entweder wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben aufgearbeitet oder aufgetaut. Vor Exposition wurden alle Kavitäten der Expositions-kammer außerdem entweder mit 3,3 mL Medium oder sterilem H₂O befüllt.

Exposition

Vor der Exposition wurde das apikale Medium von den Zellen entfernt und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mithilfe einer sterilen 12-*well* Platte zur Expositions-kammer transportiert und schließlich in die Expositions-kavitäten eingesetzt. Die Negativkontrolle wurde dabei zunächst mit einem Aerosol aus 66,7 µL 0,1 %-igem PBS exponiert. Anschließend erfolgte die Exposition der Proben mit der entsprechenden Materialsuspension. Dazu wurden 200 µL der Suspension mit einer definierten Konzentration mittels Aerosolgenerator auf die Zellen aufgebracht und für 10 Minuten auf die Zellen absedimentiert. In der Zwischenzeit erfolgte ein Mediumswechsel der basalen Kompartimente in der 12-*well* Platte. Anschließend wurden die Zellen auf den *transwell*-Membranen wieder in die 12-*well* Platte überführt und für weitere 24 h am ALI kultiviert. Zur Ermittlung der Depositionsdosis wurde die deponierte Masse für eine weitere Stunde mittels der QCM aufgezeichnet und der Mittelwert aus den letzten 300 Datenpunkten gebildet.

3.2.7 Zytotoxizitätsuntersuchungen über Bestimmung des ATP-Gehalts

Die Messung des ATP-Gehalts ist eine gängige Methode zur Messung der Zytotoxizität. Dabei steht der ATP-Gehalt direkt in Relation zur Anzahl lebender Zellen. Die Messung des ATP-Gehalts beruht auf der Messung des biolumineszierenden Oxyluciferin, welches durch ein Vorhandensein von ATP aus Luciferin entsteht.

Submerse Durchführung

Für die Ermittlung der Zytotoxizität aller Nanomaterialien wurde der ATP-Gehalt nach Inkubation mit fünf verschiedenen Konzentrationen bestimmt. Dazu wurden die Zellen zunächst in einer weißwandigen 96-*well* Platte wie in Kapitel 3.2.6.4 beschrieben ausgestreut und nach 24 h mit den entsprechenden Nanomaterialien inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit (24 h) wurde der Versuch durch Absaugen des Zellkulturmediums abgebrochen und 60 µL frisches Zellkulturmedium hinzugegeben. Anschließend wurden 60 µL CellTiter-Glo®-Reagenz in jede Kavität hinzugegeben. Die Messung der Biolumineszenz fand am Mikrotiterplattenlesegerät Infinite® 200 Pro statt. Zur Messung wurde die Platte zunächst 2 Minuten geschüttelt und anschließend für 10 Minuten äquiliert. Die anschließende Messung fand bei 562 nm statt. Neben den Zellproben wurde außerdem eine Materialkontrolle mitgeführt, indem vor der Messung ebenfalls 60 µL der jeweils höchsten Konzentration einer Materialsuspension in die Platte gegeben und gleichzeitig mit den Zellproben angefärbt wurde.

Durchführung nach ALI-Exposition

Für die Durchführung des ATP-Gehalts nach ALI-Exposition wurden die Zellen abgelöst und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden in Doppelbestimmung je 50.000 Zellen in 50 µL PBS in eine 96-*well* Platte pipettiert und mit 50 µL CellTiter-Glo®-Reagenz angefärbt. Die anschließende Messung der Lumineszenz fand am Mikrotiterplattenlesegerät Infinite® 200 Pro wie bereits oben beschrieben statt.

3.2.8 Untersuchungen zur zellulären Verfügbarkeit

3.2.8.1 Messung des intrazellulären Ionengehalts

Für die Untersuchung des intrazellulären Ionengehalts wurden die Zellen wie in Kapitel 3.2.6.4 beschrieben in 12-*well* Platten ausgestreut und inkubiert. Anschließend erfolgte eine bereits im Arbeitskreis etablierte Zellyse (Semisch *et al.*, 2014). Dazu wurden die Zellen mit Accutase® zunächst abgelöst und die Lebend- und die Gesamtzellzahl sowie das Zellvolumen ermittelt. Anschließend wurde durch Zentrifugation ein Zellpellet erstellt. Zur Abtrennung der ungelösten intrazellulären Materialien und der nicht aufgenommenen, an der Zellmembran haftenden Materialrückstände wurde anschließend eine Zellyse durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in 1 mL RIPA-Puffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend ebenfalls bei

Raumtemperatur bei 16.000 g für 1 Stunde zur Abtrennung des Zell- und Nanomaterialrückstands zentrifugiert. Schließlich wurden 380 µL des Überstands entnommen und entweder bei -20 °C gelagert oder zur Bestimmung der gelösten Ionenkonzentration mittels GF-AAS oder ICP-MS, wie bereits in Kapitel 3.2.5 beschrieben, gemessen. Ein möglicher Rückstand von Partikel- und Faserrückständen wurde über eine Messung mittels DLS ausgeschlossen.

3.2.8.2 Messung der intrazellulären Ionenverteilung

Für die Untersuchung der intrazellulären Ionenverteilung wurde eine an Semisch *et al.* angelehnte Fraktionierungsmethode mittels *Nuclear Extract Kit* (Active Motif®) verwendet (Semisch *et al.*, 2014). Dazu wurden die Zellen zunächst in 35 mm-Zellkulturschalen ausgestreut und inkubiert. Anschließend wurde das Inkubationsmedium zunächst abgesaugt und mit 2 mL kaltem PBS/Phosphatase-Inhibitor (PBS/PI) gewaschen und anschließend erneut 3 mL PBS/PI zugegeben. Das Ablösen der Zellen von der Kulturschale erfolgte mithilfe eines Zellschabers. Nach Überführung der abgelösten Zellen in ein Zentrifugenröhrchen wurde die Lebend-, die Gesamtzellzahl und das mittlere Zell- bzw. Kernvolumen mittels des CASY®-Zellzählgeräts ermittelt. Danach erfolgte eine anschließende Zentrifugation (4 °C, 200 g, 5 min) um das Zellpellet zu erhalten.

Um die zytoplasmatische Fraktion zu isolieren, wurden die Zellen in 250 µL hypotonischer Pufferlösung resuspendiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Um ein Anschwellen der Zellmembran zu erreichen, wurden die Zellen anschließend für mindestens 20 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Zerstörung der Zellmembran wurden die Zellen auf einem Vortex für 2 Minuten geschüttelt und mikroskopisch wurde die erfolgreiche Lyse der Zellen überprüft. Anschließend wurde die Zellsuspension für 30 s bei 4 °C und 14.000 g zentrifugiert und eine definierte Menge des Überstands, welcher die lösliche Fraktion des Zytoplasmas enthielt, abgenommen. Die Fraktion konnte bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

Vor der Kernlyse erfolgte die Bestimmung des Kernvolumens mittels CASY®-Zellzählgerät. Um die lösliche Kernfraktion zu erhalten, wurde das abzentrifugierte Zellpellet in 25 µL *complete lysis buffer* (CLB) aufgenommen und mit 1,25 µL Detergenz versetzt. Anschließend wurde die Suspension zunächst für 10 Sekunden auf einem Vortex gemischt und 30 Minuten bei 150 U/min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine weitere Durchmischung mittels eines Vortex. Die Abtrennung der löslichen Kernfraktion fand schließlich durch Zentrifugation (10 min, 14.000 g,

4 °C) statt. Ein definiertes Volumen der im Überstand enthaltenen löslichen Kernfraktion konnte anschließend entnommen und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

Die Ionenkonzentration wurde in beiden Fraktionen, wie bereits in Kapitel 3.2.5 beschrieben, gemessen. Mögliche Partikel- und Faserrückstände wurden über eine Messung mittels DLS ausgeschlossen.

Die erfolgreiche Separation von Zytoplasma und Zellkern wurde im Vorfeld mittels Western Blot überprüft. Dazu wurden die kompartimentsspezifischen Proteine α -Tubulin (Zytoplasma) und Lamin b (Zellkern) zunächst elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mittels Immunoblot nachgewiesen. Die Ergebnisse der Vorversuche sind in Anhang 7.2.2 zusammengefasst.

3.2.9 Messung des genotoxischen Potentials mittels alkalischer Entwindung

Die Messung des genotoxischen Potentials der Materialien erfolgte über die Quantifizierung von DNA-Strangbrüchen mittels alkalischer Entwindung (AU) (Hartwig *et al.*, 1993). Grundlage dieser Methode ist die Entwindung der DNA an Strangbrüchen unter Zugabe einer alkalischen Lösung. Durch chromatographische Auftrennung der einzel- und doppelsträngigen DNA mit anschließender fluorometrischen Detektion mit einem DNA-interkalierenden Farbstoff kann die Anzahl an DNA-Strangbrüchen ermittelt werden.

Submerse Durchführung

Die Zellen wurden wie in Kapitel 3.2.6.4 beschrieben in einer 24-*well* Platte ausgestreut und inkubiert. Zusätzlich zu den inkubierten Proben wurde eine unbehandelte Negativkontrolle und eine Positivkontrolle mitgeführt. Außerdem wurden je Versuch für alle Proben drei Replikate gemessen. Eine Stunde vor Abbruch der Inkubation wurden die Positivkontrollen mit 100 μ M Menadion inkubiert. Zum Abbruch der Inkubation wurde das Inkubationsmedium abgesaugt und 1,5 mL kaltes PBS zu den Zellen hinzugegeben. Der Start der alkalischen Entwindung erfolgte durch Absaugung des PBS mit anschließender Zugabe von 1,5 mL alkalischer Lösung (pH~12,3). Unter Lichtausschluss erfolgte anschließend eine 30-minütige Entwindung der DNA. Zum Abbruch der DNA-Entwindung wurde mit einem zuvor austitrierten, definierten Volumen an 0,1 molarer HCl ein pH-Wert von $6,8 \pm 0,02$ eingestellt und die Lösung in ein Glasröhrchen überführt. Zum Zerkleinern der entwundenen DNA wurde die Lösung anschließend 15 Sekunden

an einer Ultraschallspitze sonifiziert (10 % Amplitude) und die DNA danach mit 15 μL 10 %-iger Natrium-dodecylsulfat (SDS)-Lösung stabilisiert. Bis zur chromatographischen Trennung der einzel- und doppelsträngigen DNA wurden die Proben bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Durchführung nach ALI-Exposition

Die Zellen wurden wie in Kapitel 3.2.6.5 beschrieben exponiert und anschließend abgelöst. Dazu wurde das Zellkulturmedium basal abgesaugt, die Zellen apikal mit 300 μL Accutase® abgelöst und in PBS überführt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellzahl und es wurde eine Zellsuspension der Konzentration 10.000.000 Zellen/mL hergestellt. Zur alkalischen Entwindung wurden 15 μL dieser Suspension in ein Glasröhrchen gegeben und mit 1,5 mL alkalischer Lösung versetzt. Die alkalische Entwindung wurde anschließend wie bereits beschrieben durchgeführt: nach 30 Minuten erfolgte der Abbruch durch Zugabe von 0,1 M HCl und eine Sonifizierung für 15 Sekunden. Anschließend wurden 15 μL 10%-ige SDS-Lösung hinzugegeben und die DNA bis zur chromatographischen Trennung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Säulenchromatographische Trennung und Quantifizierung

Alle Schritte der säulenchromatographischen Trennung erfolgten bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zur Trennung der einzel (ss)- und doppelsträngigen (ds)DNA wurde eine Hydroxylapatitsäule verwendet. Diese musste vor der Separation zunächst vorbereitet werden. Dazu wurde eine Hydroxylapatit-Suspension mit einer Konzentration von 0,1 g/mL hergestellt und für 30 Minuten im Wasserbad bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ äquilibriert. Alle zwei Minuten erfolgte eine Durchmischung der Suspension zur Vermeidung von Agglomeraten. Je Säule wurde anschließend 1 mL der Hydroxylapatit-Suspension zwischen zwei Glasfaserfilter gegeben und anschließend mit 1,5 mL 0,5 M Kaliumpuffer (KP) gespült. Anschließend wurden die Säulen mit 1,5 mL 0,01 M Natriumpuffer (NaP) gewaschen, bevor die Säulen mit den Proben beladen wurden. Zur effektiven Beladung wurden die Säulen anschließend nochmals mit 0,01 M NaP gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution der ssDNA (1,5 mL 0,15 M KP) und schließlich die Elution der dsDNA (1,5 mL 0,35 M KP). Die Proben wurden in eine 24-well Platte eluiert und anschließend mit dem Höchst-Farbstoff 33258 bei Raumtemperatur angefärbt. Nach 20 Minuten Anfärbezeit wurde die Fluoreszenz am Mikrotiterplattenlesegerät bestimmt.

Berechnung der DNA-Strangbrüche

Zur Berechnung der induzierten DNA-Strangbrüche wurde zunächst die Extinktion der mitgeführten Blindwerte (KP) von allen Proben abgezogen:

$$E = E_{Probe} - E_{Blindwert}$$

E: Extinktion

Anschließend erfolgte die Berechnung des relativen Anteils an ssDNA und dsDNA unter Berücksichtigung eines Korrekturfaktors, aufgrund der stärkeren Interkalation des Farbstoffs in die dsDNA (Hartwig *et al.*, 1993):

$$\text{Anteil dsDNA} = \frac{E_{dsDNA}}{E_{dsDNA} + 2,1 * E_{ssDNA}}$$

Die Anzahl induzierter Strangbrüche im Verhältnis zur Anzahl an DNA-Basenpaaren wurde anschließend über das Verhältnis des Anteils dsDNA der behandelten Proben mit dem Anteil dsDNA der unbehandelten Kontrollen berechnet. Die Strangbruchrate pro DNA-Basenpaare wurde dabei mittels einer Kalibrierung ermittelt, wobei 10^3 induzierte Strangbrüche pro Zelle nach Bestrahlung mit 1 Gy zugrunde gelegt wurden. Die Steigung der Kalibriergeraden von 0,06 wurde dabei aus früheren Ergebnissen übernommen (Hartwig *et al.*, 1996). Die anschließende Berechnung der Strangbrüche pro 10^6 Basenpaare erfolgte unter der Annahme, dass das menschliche Genom aus 6×10^9 Basenpaaren besteht (Venter *et al.*, 2001):

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

$$\text{Strangbrüche pro } 10^6 \text{ Basenpaare} = \text{Strangbrüche pro Zelle} \frac{10^6}{6 * 10^9}$$

3.2.10 Genexpressionsanalysen mittels *High-Troughput* RT-qPCR

Zur Analyse der Genexpression wurde eine Hochdurchsatz-PCR unter Verwendung einer Reversen Transkriptase (HT RT-qPCR) durchgeführt, die bereits zuvor im Arbeitskreis etabliert wurde (Fischer *et al.*, 2016). Durch Umschreibung der mRNA aus den Zellproben in DNA und anschließender *Real-Time*-PCR ist es möglich, die Menge an Gentranskripten ausgewählter Gene mit der Menge einer Negativkontrolle zu vergleichen. Es handelt sich hierbei um eine

Hochdurchsatz-Methodik, wodurch 95 Gene in 96 unterschiedlichen Proben zeitgleich quantifiziert werden können. Das ursprüngliche Genset wurde im Rahmen des Projekts um Gene inflammatorischer und fibrotischer Signalwege erweitert. Eine Auflistung der verwendeten Gene und der korrespondierenden Proteine ist im Anhang 7.2.3 zu finden. Alle Schritte der Genexpressionsanalyse wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Gewinnung der Proben

Zur Durchführung der Genexpressionsanalysen wurden die Zellen zunächst wie in Kapitel 3.2.6.4 und 3.2.6.5 dem entsprechenden Nanomaterial gegenüber exponiert. Anschließend wurden die Zellen mit Accutase® abgelöst und abzentrifugiert. Die Zellpellets wurden bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

RNA-Isolierung und –Quantifizierung

Die Isolierung der RNA erfolgte auf Eis mithilfe des *NucleoSpin® RNA Plus Kits* von Macherey Nagel. Die Durchführung erfolgte wie vom Hersteller vorgegeben.

Zunächst wurden die Zellpellets in 350 µL Lysepuffer resuspendiert, mit einem Vortex geschüttelt und anschließend auf eine *gDNA Removal* Säule überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 30 Sekunden bei 11.000 rcf und 4 °C zum Abtrennen der für den weiteren Verlauf störenden gDNA, welche in der Säule verblieb. Zum Filtrat wurden 100 µL *Binding Solution* gegeben und nach Resuspendieren wurde das Filtrat auf eine weitere Säule gegeben und erneut zentrifugiert. Die auf der Säule verbliebene RNA wurde anschließend drei Waschschritten unterzogen (200 µL Waschpuffer 1, 600 µL Waschpuffer 2, 250 µL Waschpuffer 2). Zwischen den einzelnen Waschritten wurde für 20 Sekunden bei 11.000 rcf und 4 °C zentrifugiert und das Zentrifugat wurde verworfen. Zum Eluieren der aufgereinigten RNA wurde die Säule schließlich auf ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß gesetzt und die RNA wurde mit einer definierten Menge DNase-freiem Wasser eluiert (Zentrifugation für 1 Minute bei 11.000 rcf und 4 °C). Das Volumen des Wassers wurde dabei je nach erwartetem RNA-Gehalt angepasst und lag zwischen 23 und 30 µL. Zum Aufkonzentrieren der RNA wurde das Eluat anschließend erneut auf die Säule gegeben und zentrifugiert. Die RNA-Proben wurden für bis zu zwei Wochen bei -80 °C gelagert.

Synthese der cDNA

Vor Synthese der cDNA erfolgte eine Bestimmung der Reinheit der RNA und eine RNA-Quantifizierung mittels einer NanoQuant-Platte am Mikotiterplattenlesegerät *Infinite*

M200 Pro bei 260 nm. Zunächst wurde ein Blindwert mit DNase-freiem Wasser gemessen, anschließend erfolgte die Messung der Proben. Dazu wurden in Doppelbestimmung jeweils 2 μL RNA-Probe auf die Platte aufgetragen. Die Probenreinheit wurde über die Berechnung des Quotienten von RNA zu Proteinen (260 nm/280 nm) bestimmt und sollte mindestens einen Wert von 2 aufweisen.

Die anschließende Umschreibung der RNA in cDNA wurde für jede Probe in zwei technischen Replikaten durchgeführt, die auch im weiteren Verlauf der Genexpressionsanalyse unabhängig voneinander behandelt wurden. Zur Umschreibung wurde das *qScript cDNA Synthesis Kit* von Quantabio verwendet. Dazu wurden je Replikat 1 μL *iScript Reverse Transcriptase*, 4 μL *Reaction Mix* (5x) und 1 μg RNA eingesetzt und auf ein Gesamtvolumen von 20 μL mit Nuklease-freiem Wasser ergänzt. Nach Durchmischung mithilfe einer Zentrifugation und eines Vortex wurde erneut zentrifugiert, um das Reaktionsgemisch am Boden des Reaktionsgefäßes zu sammeln. Anschließend erfolgte die Umschreibung im Thermocycler nach dem in Tabelle 3 beschriebenen Temperaturprogramm. Nach Umschreibung konnte die cDNA für mehrere Wochen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

Tabelle 3: Temperaturprogramm zur cDNA-Synthese.

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

Präamplifikation und Exonuklease-Verdau

Die Präamplifikation dient dazu, die Target-Genabschnitte vorab zu amplifizieren, um eine ausreichende Template-Menge zu gewährleisten. Dazu wurde eine Mischung aus allen Primerpaaren des Gen-Sets der Hochdurchsatz-PCR hergestellt. Dieser *Pooled Primer Mix* wurde auf eine Konzentration von 500 nM eingestellt. Anschließend wurde jeweils zu 0,5 μL des *Pooled Primer Mix* 2,5 μL *TaqMan PreAmp Master Mix* (2x), 1,25 μL cDNA und 0,75 μL PCR-zertifiziertes Wasser gegeben. Zusätzlich zu den cDNA-Proben wurden Kontrollen mitgeführt, die entweder RNA oder Wasser statt cDNA enthielten. Anschließend erfolgte die Präamplifikation nach dem in Tabelle 4 dargestellten Temperaturprogramm.

Tabelle 4: 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	

Nach erfolgreicher Präamplifikation wurden die Proben einem Exonuklease-I-Verdau unterzogen, um einzelsträngige DNA zu entfernen. Dazu wurde jeweils 0,2 µL Exonuklease Reaktionspuffer (10x), 0,4 µL Exonuclease I (20U/µL) und 1,4 µL PCR-zertifiziertes Wasser zur Probe gegeben und mit dem in Tabelle 5 dargestellten Temperaturprogramm verdaut.

Tabelle 5: Temperaturprogramm des Exonukleaseverdaus.

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

Nach Beendigung des Exonuklease-Verdaus wurden die Proben durch Zugabe von TRIS-EDTA-Puffer fünffach verdünnt, indem zu jeder Probe 18 µL des Puffers gegeben wurden. Anschließend erfolgte eine Durchmischung der Proben durch einen Vortex und anschließende Zentrifugation und die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Vorbereitung der Primer und der Proben

Die für die qPCR verwendeten Primer wurden vor Gebrauch auf eine Endkonzentration von 5 µM verdünnt, indem 2,5 µL jedes Primerpaars (100 µM) zu 25 µL 2x *Assay Loading Reagent* und 22,5 µL DNA-Suspensionspuffer hinzugegeben wurde. Außerdem wurde eine *no reagent control* (NRC) mit 2,5 µL PCR-zertifiziertem Wasser mitgeführt. Die Primer-Paare konnten bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

Zur Probenvorbereitung wurden je 2,25 µL der Probelösung mit 2,5 µL 2x *SsoFast EvaGreen Supermix with Low ROX* und 0,25 µL 20x *DNA Binding Dye Sample Loading Reagent* gut vermischt und zentrifugiert. Zusätzlich zu den Proben wurde eine *no template control* (NTC) mitgeführt, die PCR-zertifiziertes Wasser statt der Probelösung enthielt.

96 x 96 *Dynamic Array IFC* qPCR Analyse

Die qPCR fand mithilfe eines *Dynamic Array integrated fluidic circuit* (IFC), im folgenden Chip genannt, statt. In einem ersten Schritt wurden beide Akkumulatoren mit 150 μL *Control Line Fluid* beladen, die Schutzfolie entfernt und der Chip anschließend in den *IFC Controller HX* überführt. Durch das Leiten der Kontrollflüssigkeit in die Kanäle des Mikrofluidik-Systems fand das sogenannte *Priming* statt. Anschließend fand die Beladung des Chips statt. Dazu wurden je 5 μL der Primer- und Probengemische möglichst luftblasenfrei in die hierfür vorgesehenen Kavitäten pipettiert. Anschließend erfolgte eine Zusammenführung der Proben mit den Primern in den Reaktionskammern mithilfe des Programms *Load Mix* im *IFC Controller HX*. Nachdem mögliche an der Oberfläche haftende Staubpartikel vom Chip entfernt wurden, wurde der Chip in das BioMark™-System überführt und es erfolgte die Durchführung der qPCR sowie die Schmelzkurvenanalyse nach dem in Tabelle 6 dargestellten Temperaturprogramm.

Tabelle 6: Temperaturprogramm der HT RT-qPCR mit anschließender Schmelzkurvenanalyse.

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

Datenanalyse

Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mithilfe der Software *Fluidigm Real-Time PCR Analysis*. Hierzu wurde durch den passiven Referenz-Farbstoff ROX zunächst sichergestellt, dass die PCR-Reaktionskammern gleichmäßig beladen wurden. Zur Feststellung der C_q -Werte (*Cycle of Quantification*) wurde anschließend das Fluoreszenzsignal des DNA-interkalierenden Farbstoffs *EvaGreen* ausgewertet. Mittels einer *Heatmap* konnten die Daten zunächst übersichtlich dargestellt werden, was eine optische Qualitätskontrolle möglich machte.

Anschließend wurden die C_q -Werte in der Software *GenEx* weiter ausgewertet. Dazu wurde zunächst ein *Cut off* der C_q -Werte bei 27 gesetzt und eine optimale Auswahl an Referenzgenen getroffen. Zur Ermittlung der relativen Genexpression wurde die von Livak und Schmittgen

entwickelte $\Delta\Delta C_q$ -Methode verwendet (Livak & Schmittgen, 2001). Hierbei erfolgte zunächst eine Normierung der ausgewählten Referenzgene:

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

Im Anschluss wurden die unbehandelten Kontrollen subtrahiert und auf einen relativen Wert von 1 festgelegt:

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

Zur Berechnung der relativen Veränderung der Genexpression wurden die \log_2 -Werte der Proben berechnet, wobei die unbehandelte Kontrolle auf den Wert 0 festgelegt wurde.

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

Als biologisch relevante Effekte wurden solche Veränderungen angesehen, die eine \log_2 -fache Änderung der Genexpression von mindestens $\pm 1,5$ aufwiesen (Clancy *et al.*, 2012; Andrew *et al.*, 2003).

3.2.11 Statistische Auswertung

Für alle Untersuchungen in dieser Arbeit wurden drei Stichproben unabhängig voneinander durchgeführt, mit jeweils mindestens zwei technischen Replikaten. Unterschiede zwischen Mono- und Kokultur wurden mit einem Test auf Varianzhomogenität nach Levene und anschließend mit einem gepaarten, zweiseitigen t-Test analysiert.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Ergebnisse, die im Rahmen dieser Dissertation vorgestellt werden, wurden in Zusammenarbeit mit Ronja Neuberger im Rahmen des BMBF-geförderten Forschungsprojektes *MetalSafety* erhoben und einzelne Daten wurden bereits veröffentlicht. Diese umfassen die Charakterisierungsstudien, die Löslichkeitsstudien und Untersuchungen zur zellulären Verfügbarkeit (Wall *et al.*, 2021).

Zur Ermittlung des toxikologischen Wirkprofils wurden die Materialien zunächst physikochemisch charakterisiert. Anschließend erfolgte die Untersuchung der zytotoxischen Wirkung in einer Monokultur aus der Bronchialepithelzelllinie Beas-2B und in einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen mit makrophagenähnlichen differenzierten THP-1-Zellen (dTHP-1). Anhand der Zytotoxizität wurden für die weiteren Untersuchungen drei Dosen ausgewählt, die eine geringe, eine moderate und eine hohe Zytotoxizität aufwiesen. In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse nach Metallspezies sortiert dargestellt und diskutiert.

4.1 KUPFER-BASIERTE NANOMATERIALIEN

Zur Simulation unterschiedlicher Expositionsszenarien wurden die Mono- und Kokultur submers mit CuO NP, Cu NP und Cu NW inkubiert oder mit einem NM-haltigen Aerosol bestehend aus entweder Cu NP oder Cu NW exponiert. Für die submersen Studien wurde darüber hinaus eine Kontrolle mit löslichem CuCl₂ inkubiert, dessen Konzentration in Löslichkeitsexperimenten mit Zellkulturmedium ermittelt wurde (siehe Kapitel 4.1.2). Diese Kontrolle sollte dazu dienen, Effekte durch extrazellulär im Medium gelöste Kupferionen zu erfassen.

4.1.1 Physikochemische Eigenschaften

Nach Aufarbeitung der Materialien wurde die Größenverteilung mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) bzw. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) bestimmt, sowie Messungen durch *dynamic light scattering* (DLS) durchgeführt. In Abbildung 5 sind repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahmen der Kupfer-basierten Materialien dargestellt und in Tabelle 7 sind die Ergebnisse der physikochemischen Eigenschaften

zusammengefasst. Beide untersuchten Kuper-basierten Nanopartikel wiesen primäre Durchmesser in der Größenordnung eines Nanomaterials auf (CuO NP: 17,1 nm; Cu NP: 55,2 nm). Im Fall der CuO NP ist der Primärdurchmesser mit Literaturangaben derselben Partikel vergleichbar (SUN, 2017).

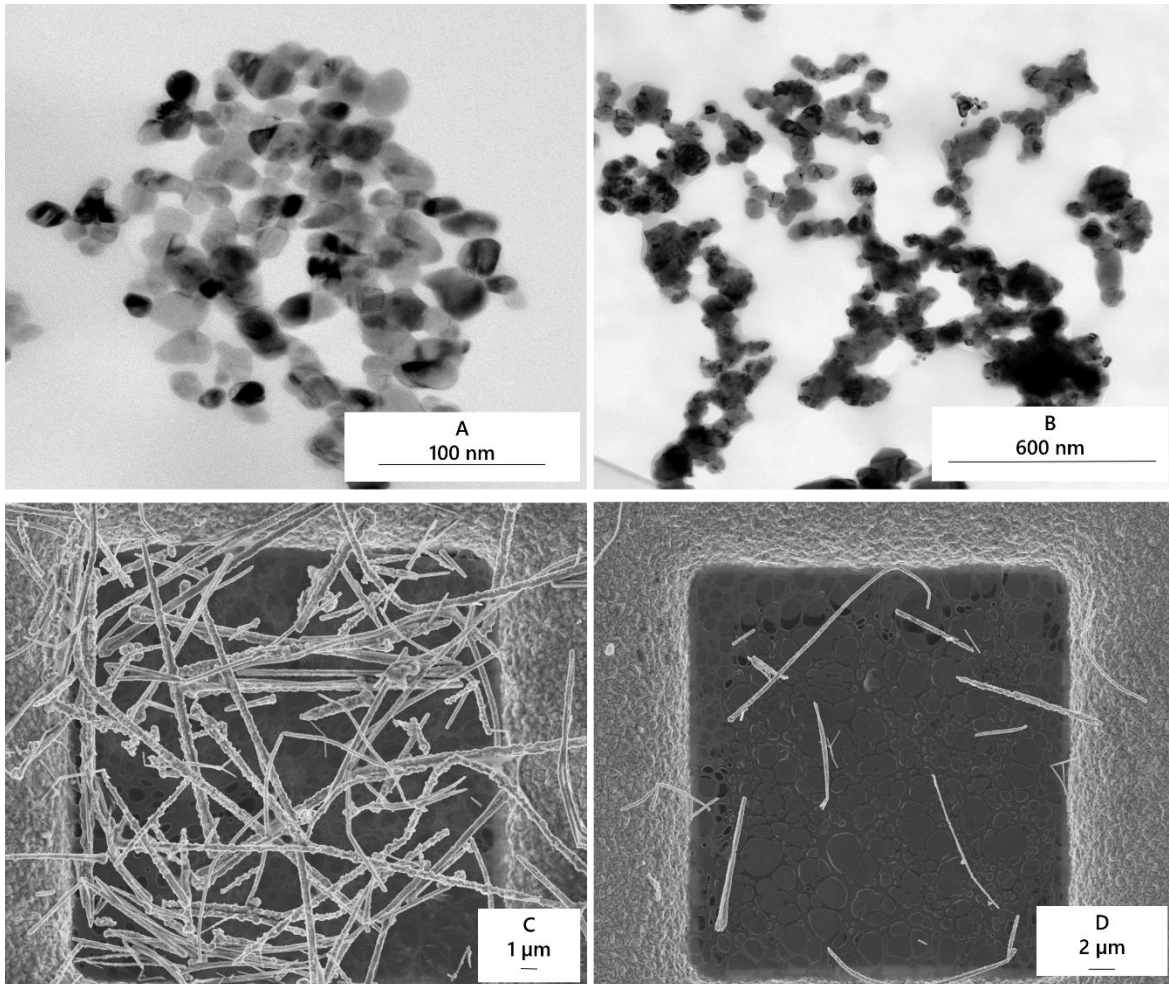


Abbildung 5: Exemplarische elektronenmikroskopische Aufnahmen von CuO NP (A), Cu NP (B), Cu NW (C) und vernebelten Cu NW (D). Die Materialien wurden nach Aufarbeitung nach dem NANOGENTOX-Protokoll in einer Konzentration von 2,56 mg/mL auf ein TEM-Grid aufgetragen oder mittels der Vitrocell® Cloud vernebelt und anschließend elektronenmikroskopisch betrachtet.

Der hydrodynamische Durchmesser beschreibt die Größenverteilung der Partikel in Suspension und lag für CuO NP bei 160,3 nm bzw. bei 302,2 nm für Cu NP. Die Polydispersitätsindizes deuteten auf eine relativ polydisperse Suspension der CuO NP hin (PDI: 0,48) während der PDI für Cu NP von 0,23 für eine monodispersere Suspension spricht. Vergleichbare Ergebnisse der gleichen Partikelspezies wurden in früheren Studien erzielt (Ortelli *et al.*, 2017; Schlich *et al.*, 2016; Hua *et al.*, 2014).

Tabelle 7: Physikochemische Eigenschaften Kupfer-basierter Nanomaterialien. *Herstellerangaben.

Materialspezies	CuO NP	Cu NP	Cu NW	Cu NW (vernebelt)
Länge (μm)	-	-	$6,3 \pm 0,4$	$4,0 \pm 0,8$
Breite (nm)	-	-	300 ± 6	410 ± 6
d_p (nm)	$17,1 \pm 0,4$	$55,2 \pm 1,5$	-	-
d_H (nm)	$160,3 \pm 42,1$	$302,2 \pm 40,3$	-	-
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)	$98,7 \pm 0,81$	$98,6 \pm 0,4$	$>99,5^*$	-

Cu NW erfüllten mit einer mittleren Länge von $6,2 \mu\text{m}$ und einer Breite von 300 nm typische Eigenschaften einer WHO-Faser, welche ein Länge-zu-Breite-Verhältnis von mindestens 3:1 und eine mittlere Länge von mindestens $5 \mu\text{m}$ aufweisen müssen. Nach Verneblung ist hingegen eine Kürzung der Cu NW auf eine mittlere Länge von $4 \mu\text{m}$ zu beobachten. Alle drei untersuchten Kupfermaterialien wiesen zudem ein Zetapotential zwischen -30 und 30 mV auf, was auf instabile Suspensionen und ein schnelles Absedimentieren der Materialien hindeutet.

4.1.2 Untersuchungen zur Löslichkeit

Um erste Aussagen über das zelluläre Verhalten der Nanomaterialien treffen zu können, wurde die Löslichkeit der Materialien in unterschiedlichen physiologischen Modellflüssigkeiten untersucht. Zunächst wurde die Löslichkeit in artifizieller alveolärer Flüssigkeit gemessen, um eine extrazelluläre Auflösung der Partikel und somit einen Effekt, der durch Ionenfreisetzung in der Lungenflüssigkeit ausgelöst wird, auszuschließen. Außerdem wurde die Löslichkeit in artifizieller lysosomaler Flüssigkeit untersucht, um die intrazelluläre, lysosomale Auflösungsrate zu bestimmen. Um den Ionenbeitrag während der submers durchgeführten *in vitro*-Versuche festzustellen, wurde außerdem die Löslichkeit im Zellkulturmedium bestimmt und diese für weitere Versuche berücksichtigt. Die Daten der Löslichkeitsuntersuchungen sind in Abbildung 6 dargestellt.

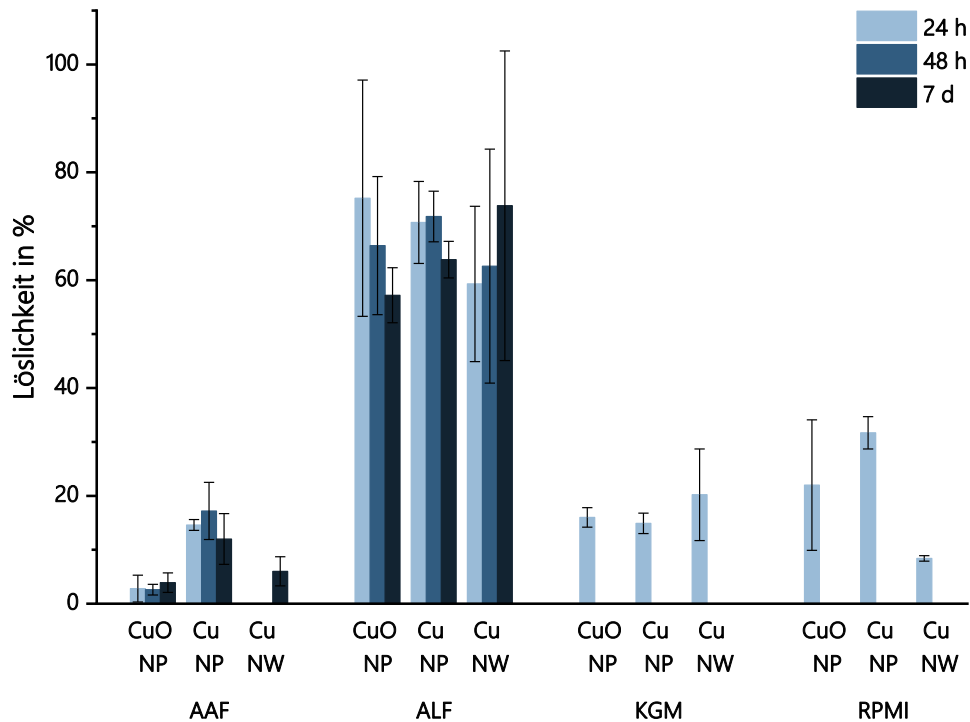


Abbildung 6: Zeitabhängige Löslichkeit Kupfer-basierter Materialien in verschiedenen physiologischen und Zellkultur-relevanten Medien. Die Materialien wurden in einer Konzentration von 100 µg/mL für den jeweiligen Zeitraum bei 37 °C inkubiert. Nach Abtrennung der nicht-gelösten Rückstände durch Zentrifugation wurde der Ionengehalt im Überstand mittels GF-AAS bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD aus drei unabhängigen Versuchen. AAF: artifizielle alveoläre Flüssigkeit (pH 7,4); ALF: artifizielle lysosomale Flüssigkeit (pH 4,5); KGM: *keratinocyte growth medium*. RPMI: *Roswell Park Memorial Institute Medium*;

Alle Kupfer-basierten Nanomaterialien zeigten nach 7 d eine moderate Löslichkeit in artifizieller alveolärer Flüssigkeit (AAF; pH 7,4), die das physiologische Milieu der Lunge simulieren soll (Semisch *et al.*, 2014). Lediglich für Cu NP wurde eine Löslichkeit von 12 % nach 7 Tagen beobachtet. Dagegen wurde eine hohe Löslichkeit aller drei Materialien bereits nach 24 h in artifizieller lysosomaler Modellflüssigkeit beobachtet, die im Bereich von 70-80 % liegt. Dies deutet auf eine lysosomale Freisetzung der Materialien innerhalb der Zelle hin und wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit diskutiert. Insgesamt ist die Löslichkeit aller drei Materialien vergleichbar, wodurch die morphologischen Eigenschaften der Materialien nur einen geringen Effekt auf die lysosomale Löslichkeit zu haben scheinen. Die Löslichkeit von CuO NP wurde bereits in mehreren Studien untersucht, wobei eine Löslichkeit in ALF von nahezu 100 % und eine Löslichkeit von 1 % in AAF beobachtet wurde (Semisch *et al.*, 2014; Karlsson *et al.*, 2008; Jeong *et al.*, 2018). Zur Ermittlung der extrazellulär im Medium gelösten Ionen wurde zusätzlich die Löslichkeit in den in der Arbeit verwendeten Medien KGM und RPMI nach 24 h untersucht. Hier

wurde eine Löslichkeit von bis zu 20 % für KGM und 35 % für RPMI beobachtet, die als Basis für die Berechnung einer Ionenkontrolle verwendet wurde.

4.1.3 Toxikologisches Wirkprofil

Die Untersuchung des toxikologischen Wirkprofils der Materialien umfasste die Untersuchung des ATP-Gehalts, der zellulären Verfügbarkeit, Feststellungen der Änderungen im Genexpressionsprofil sowie die Quantifizierung von DNA-Strangbrüchen. Die Ergebnisse dieser Endpunkte werden in den folgenden Kapiteln dargestellt und diskutiert.

4.1.3.1 Zytotoxizität

Zur Untersuchung der Zytotoxizität wurde der ATP-Gehalt nach Inkubation mit Kupfer-basierten Materialien bestimmt. Die Ergebnisse nach submerser Inkubation sind in Abbildung 7 dargestellt. Alle Materialien verursachten nach submerser Inkubation eine dosisabhängige Abnahme des ATP-Gehalts in Mono- und Kokultur. Die stärksten Effekte wurden hierbei nach Inkubation der Monokultur mit Cu NP verursacht, wo bereits nach 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ eine Reduktion des ATP-Gehalts auf 40 % zu beobachten war. Die Kokultur scheint hierbei robuster gegenüber den Cu NP zu sein, wobei nach gleicher Dosis ein ATP-Gehalt von 75 % zu sehen war. Bei einer Dosis von 30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ sank der ATP-Gehalt weiter ab auf 10 % für die Monokultur und 30 % für die Kokultur. Eine ähnliche Tendenz wurde auch nach Inkubation mit CuO NP beobachtet: Bei einer Dosis von 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ist in der Monokultur eine Reduktion des ATP-Gehalts auf 60 % zu sehen, während der ATP-Gehalt der Kokultur bei gleicher Dosis noch 90 % betrug. Eine Inkubation mit 30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ führte zu einer weiteren Verringerung des ATP-Gehalts auf 30 % für die Monokultur und 60 % für die Kokultur. Für die Cu NW ergibt sich hingegen ein konträres Bild, wobei die in Kokultur kultivierten Zellen sensitiver gegenüber den Cu NW reagierten im Vergleich zu der Monokultur. So führte eine Inkubation mit 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ zu einer Reduktion des ATP-Gehalts auf 80 % in der Monokultur und auf 60 % in der Kokultur. Bei einer Konzentration der Cu NW von 30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ist hingegen für beide Kultivierungssysteme eine vergleichbare zytotoxische Wirkung zu sehen. Insgesamt zeigt sich kein deutlicher Unterschied im ATP-Gehalt der Zellen zwischen den Inkubationen mit den einzelnen Materialien und Kultivierungssystemen. Es zeigt sich jedoch eine Tendenz auf eine höhere Robustheit der Kokultur gegenüber der Monokultur nach Inkubation mit den einzelnen Nanomaterialien.

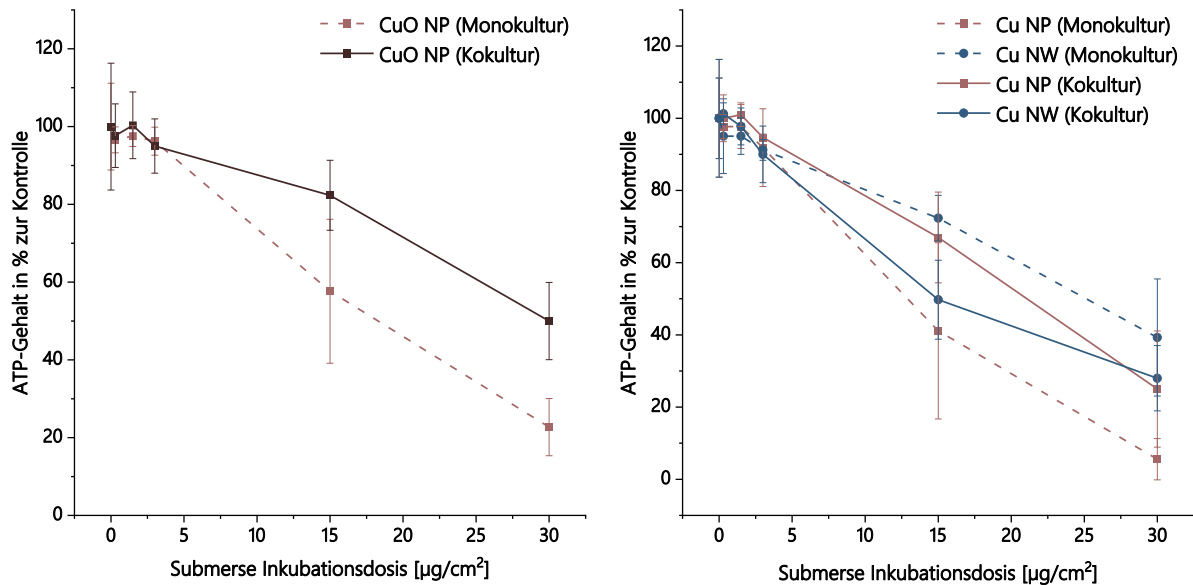


Abbildung 7: Einfluss submers inkubierter, Kupfer-basierter Nanomaterialien auf den ATP-Gehalt in einer Monokultur aus Beas-2B-Zellen und einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen und differenzierten Monozyten mit makrophagenähnlichen Eigenschaften (dTHP-1). Die Zellen wurden in Monokultur und in Kokultur für 24 Stunden mit dem entsprechenden Nanomaterial submers inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen \pm SD.

Die Zytotoxizität von Cu NP und Cu NW wurde am ALI in Mono- und Kokultur untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt. Insgesamt ist nach ALI-Exposition eine größere Sensitivität gegenüber Cu NP und Cu NW in beiden untersuchten Zellkultursystemen zu sehen. So verursachten bereits Dosen von $2,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ für Cu NP und $2,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ für Cu NW eine Abnahme des ATP-Gehalts auf 40-50 %. Eine höhere Sensitivität nach ALI-Exposition wurde bereits für CeO_2 NP, TiO_2 NP, SnO_2 NP und weitere NP beobachtet. Als möglicher Grund wurde hier die tatsächlich deponierte Dosis angeführt, wobei nach submerser Exposition nur ein Bruchteil der im Expositionsmedium enthaltenen Partikel auf die Oberfläche der Zellen gelangt. Dagegen ist nach ALI-Kultivierung durch die Depositionsermittlung die Bestimmung der genauen Dosis möglich (Bessa *et al.*, 2021; Diabaté *et al.*, 2020). In Zellkulturmedium neigten die Kupfer-basierten Materialien außerdem zur Agglomeration, was im hydrodynamischen Durchmesser zu sehen ist. Dies kann die Zytotoxizität nach submerser Inkubation weiter verringern. Ein solcher Effekt wurde bereits für Ag NP und Au NP beobachtet (Albanese & Chan, 2011; Lankoff *et al.*, 2012).

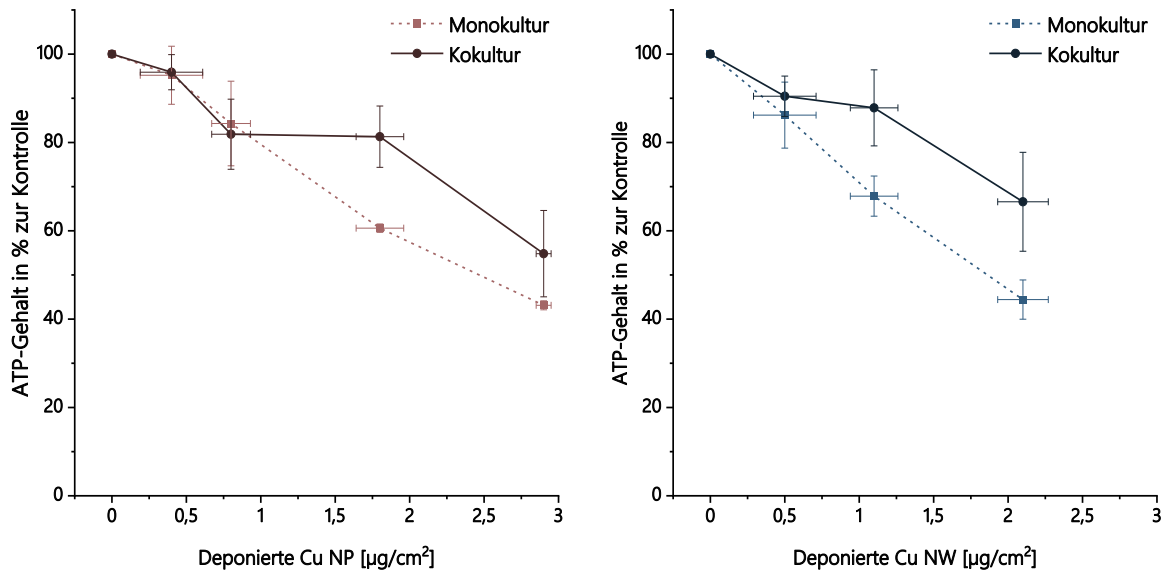


Abbildung 8: Einfluss von Kupfer-basierten Nanomaterialien auf den ATP-Gehalt von Beas-2B Zellen und einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen und differenzierten Monozyten mit makrophagenähnlichen Eigenschaften (dTHP-1) nach ALI-Exposition. Die Zellen wurden für 10 Minuten an der Vitrocell® Cloud gegenüber einem NM-haltigen Aerosol exponiert und für 24 Stunden am ALI inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen \pm SD. Horizontale Fehlerbalken zeigen die Varianz in der deponierten Dosis an.

Während am ALI sowohl für Cu NP als auch für Cu NW bei niedriger Dosierung bis ca. $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ kein Unterschied in der Zytotoxizität in Mono- und Kokultur zu sehen ist, zeigte die Monokultur bei höheren Dosen eine stärkere Sensitivität gegenüber beiden Materialien. So wurde für Cu NP bei höchster Dosierung in der Kokultur eine Reduktion der Viabilität auf 55 % festgestellt, während der Wert in der Monokultur bei 43 % lag. Für Cu NW war der protektive Effekt der Kokultur noch stärker ausgeprägt. Hier war nach Exposition mit $2,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ eine Restviabilität von 67 % in der Kokultur zu sehen, während die Exposition derselben Dosis zu einer Reduktion der Viabilität auf 44 % in der Monokultur führte. Bisher gibt es keine Daten zum Vergleich der Zytotoxizität in Mono- und Kokultur in Beas-2B-Zellen nach Exposition mit Kupfer-basierten Materialien. Bereits veröffentlichte Ergebnisse in A549-Zellen stehen jedoch im Kontrast zu den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Effekten. Hier wurde kein Unterschied in der LDH-Freisetzung in Mono- und Kokultur nach ALI-Exposition mit CuO NP beobachtet (Wang *et al.*, 2020). Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zwischen Literaturdaten und den in dieser Arbeit beobachteten Ergebnissen ist die Verwendung unterschiedlicher Endpunkte zur Ermittlung der Toxizität und die unterschiedlichen Zelllinien. Für eine Kokultur aus Beas-2B mit dTHP-1-Zellen gibt es bereits Daten zu einem protektiven Effekt im Vergleich zur Monokultur nach Inkubation mit WC-Co. Der

protektive Effekte wurde hierbei auf eine Barrierefunktion der dTHP-1-Zellen zurückgeführt, wodurch eine direkte Interaktion des Nanomaterials mit den Epithelzellen verhindert wird (Armstead & Li, 2016). Außerdem wurden protektive Effekte einer Kokultur aus alveolären Epithel- und Endothelzellen nach submerser Inkubation mit SiO₂ NP beschrieben (Kasper *et al.*, 2011). Sowohl nach submerser Inkubation als auch nach ALI-Exposition wurden keine Unterschiede in der Zytotoxizität zwischen partikulärem und faserförmigen Kupfer beobachtet, was für eine zytotoxische Wirkung durch intrazellulär freigesetzte Kupferionen spricht.

4.1.3.2 Zelluläre Verfügbarkeit

Die zelluläre Verfügbarkeit der Materialien wurde submers über den Gehalt an intrazellulär freigesetzten Metallionen in beiden in der Arbeit verwendeten Zelllinien Beas-2B und dTHP-1 bestimmt. Um eine Überbestimmung durch an der Zellmembran haftende, nicht aufgenommene Materialien zu vermeiden, erfolgte in der vorliegenden Arbeit ein Ansatz, der durch eine Zellyse nur die löslichen Fraktionen der Zelle und die darin befindlichen aus den Materialien herausgelösten Ionen erfasst. In Abbildung 9 sind die Ergebnisse nach submerser Inkubation mit Kupfer-basierten Nanomaterialien zusammengefasst.

Nach Inkubation mit allen Kupfer-basierten Nanomaterialien zeigte sich eine Steigerung des intrazellulären Kupferionen-Gehalts. Während die basale Kupferionen-Konzentration in Beas-2B-Zellen bei 19 µM lag, wiesen die dTHP-1-Zellen eine Basalkonzentration von 35 µM auf. Für alle untersuchten Materialien zeigte sich bei einer Dosis von 3 µg/cm² eine vergleichbare Erhöhung der intrazellulären Ionenkonzentration auf etwa 500 µM, wobei kein Unterschied zwischen beiden Zelllinien beobachtet wurde. Für die Cu NW wurde nach Inkubation beider Zelllinien mit 15 µg/cm² außerdem eine sprunghafte Erhöhung der intrazellulären Kupferionen-Konzentration auf 3000-5000 µM beobachtet. Insgesamt spiegeln die beobachteten Ergebnisse die bereits in Kapitel 4.1.2 beschriebene, hohe lysosomale Löslichkeit der Kupfer-basierten Materialien wider und deuten auf eine Aufnahme der Materialien mit anschließender lysosomaler Freisetzung hin. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits in diversen Studien erzielt, die die intrazelluläre Ionenfreisetzung aus CuO NP, CuO Mikropartikeln (MP) und löslichem CuCl₂ in A549-Zellen bzw. Beas-2B-Zellen verglichen (Semisch *et al.*, 2014; Strauch *et al.*, 2017).

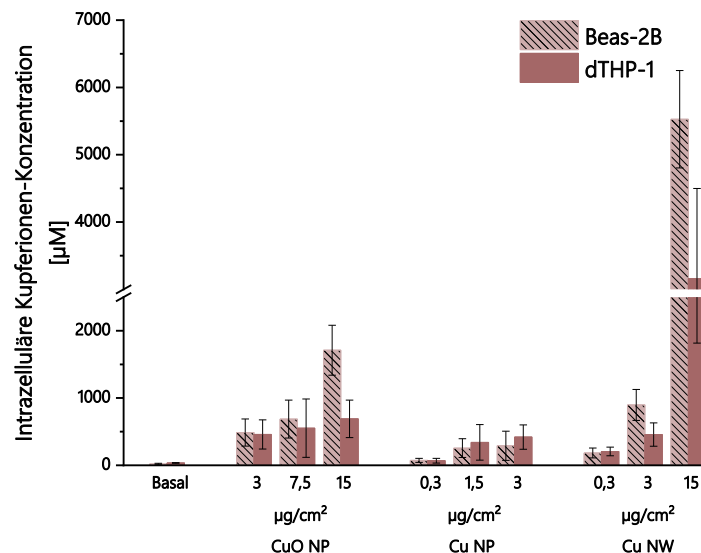


Abbildung 9: Intrazelluläre Kupferionen-Konzentration nach submerser Inkubation mit Kupfer-basierten Nanomaterialien in Beas-2B-Zellen und differenzierten THP-1-Zellen (dTHP-1). Die Zellen wurden für 24 h mit dem entsprechenden Nanomaterial inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Zellmembran abgetrennt und die Ionenkonzentration im Überstand mittels GF-AAS gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Kupfer-basierte Nanomaterialien besitzen eine hohe Löslichkeit im sauren Milieu, wie es beispielsweise in den Lysosomen vorkommt. Eine rasche lysosomale Auflösung erscheint daher wahrscheinlich, weshalb mögliche zelluläre Reaktionen vor allem durch die intrazellulär freigesetzten Kupferionen verursacht werden (Jeong *et al.*, 2018). Für Cu NP und Cu NW gibt es bislang keine Studien die den Fokus auf die intrazelluläre Aufnahme und Ionenfreisetzung legen. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass die intrazelluläre Ionenfreisetzung weitestgehend unabhängig von der Materialmorphologie ist.

Zur Untersuchung der intrazellulären Ionenverteilung wurde in der vorliegenden Arbeit an Fraktionierungsprotokoll angewandt, welches es ermöglichte die löslichen Fraktionen des Zytoplasmas und des Zellkerns voneinander zu separieren. Die Ergebnisse der intrazellulären Ionenverteilung sind in Abbildung 10 dargestellt. Insgesamt zeigte sich eine starke dosisabhängige Akkumulation von Kupferionen im Zellkern beider Zelllinien. So sind nach Inkubation mit allen drei Materialien millimolare Kupferkonzentrationen im Zellkern zu sehen, während die Konzentration im Zytoplasma bis zu einer maximalen Konzentration von 1 mM geringer ausgeprägt ist. Besonders ausgeprägt ist die Freisetzung von Kupferionen im Zellkern nach Inkubation mit Cu NP und Cu NW. Auch andere Studien mit Beas-2B- und A549-Zellen kamen zu einer ähnlichen intrazellulären Ionenverteilung nach Inkubation mit CuO NP, wonach die intrazelluläre Verteilung unabhängig von der verwendeten Zelllinie zu sein scheint (Semisch

et al., 2014; Strauch et al., 2017; Pem et al., 2021; Wang et al., 2012). Wang et al. zeigten darüber hinaus in A549 Zellen mikroskopisch eine endolysosomale Aufnahme von CuO NP in A549-Zellen und eine anschließende Freisetzung von CuO NP im Zellkern (Wang et al., 2012). Die beobachteten erhöhten Konzentrationen an Kupferionen im Zellkern nach Inkubation mit allen Kupfermaterialien und daraus resultierende mögliche genotoxische Effekte werden im weiteren Verlauf der Arbeit weiter diskutiert.

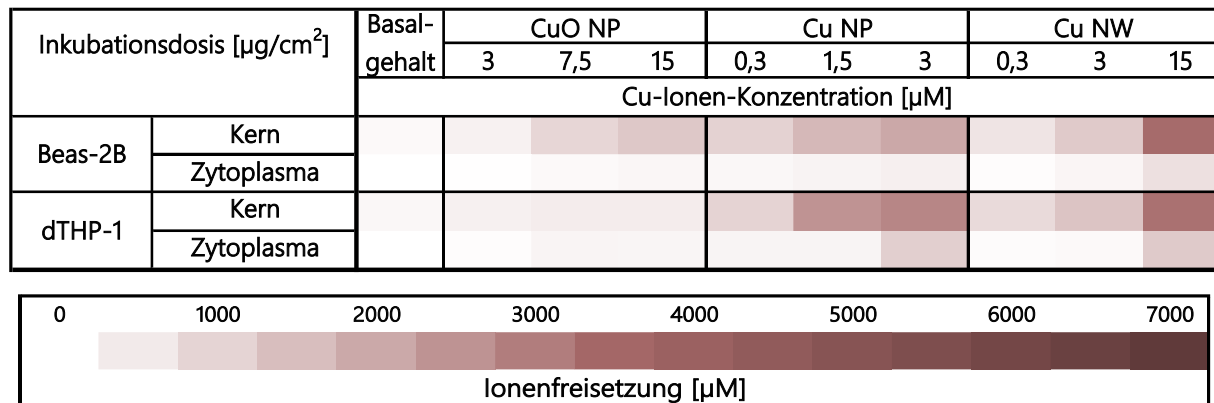


Abbildung 10: Intrazelluläre Ionenverteilung in Zytoplasma und Zellkern nach submerser Inkubation mit Kupfer-basierten Nanomaterialien. Die Zellen wurden für 24 h mit dem entsprechenden Material inkubiert und anschließend einem Fraktionierungsprotokoll unterzogen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

4.1.3.3 Genexpressionsanalysen

Teile der in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse wurden von Elisa Weschenfelder im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit angefertigt.

Zur Analyse des Einflusses von Kupfer-basierten Nanomaterialien auf die Genexpression, wurden die Genexpressionsprofile von Beas-2B-Zellen in Monokultur und in Kokultur mit dTHP-1-Zellen nach Inkubation mit Kupfer-basierten Nanomaterialien submers und am ALI untersucht. Die Veränderungen im Genexpressionsmuster sind in Abbildung 11 nach submerser Inkubation und in Abbildung 12 nach ALI-Exposition zusammengefasst. Mit Ausnahme quantitativer Unterschiede sind die Genexpressionsmuster nach submerser Inkubation und nach ALI-Exposition vergleichbar und auch hinsichtlich der unterschiedlichen Materialmorphologien waren lediglich quantitative Unterschiede zu erkennen. Daher wird im folgenden Abschnitt eine Übersicht über die veränderten Gene nach Inkubation mit Kupfer-basierten Materialien gegeben.

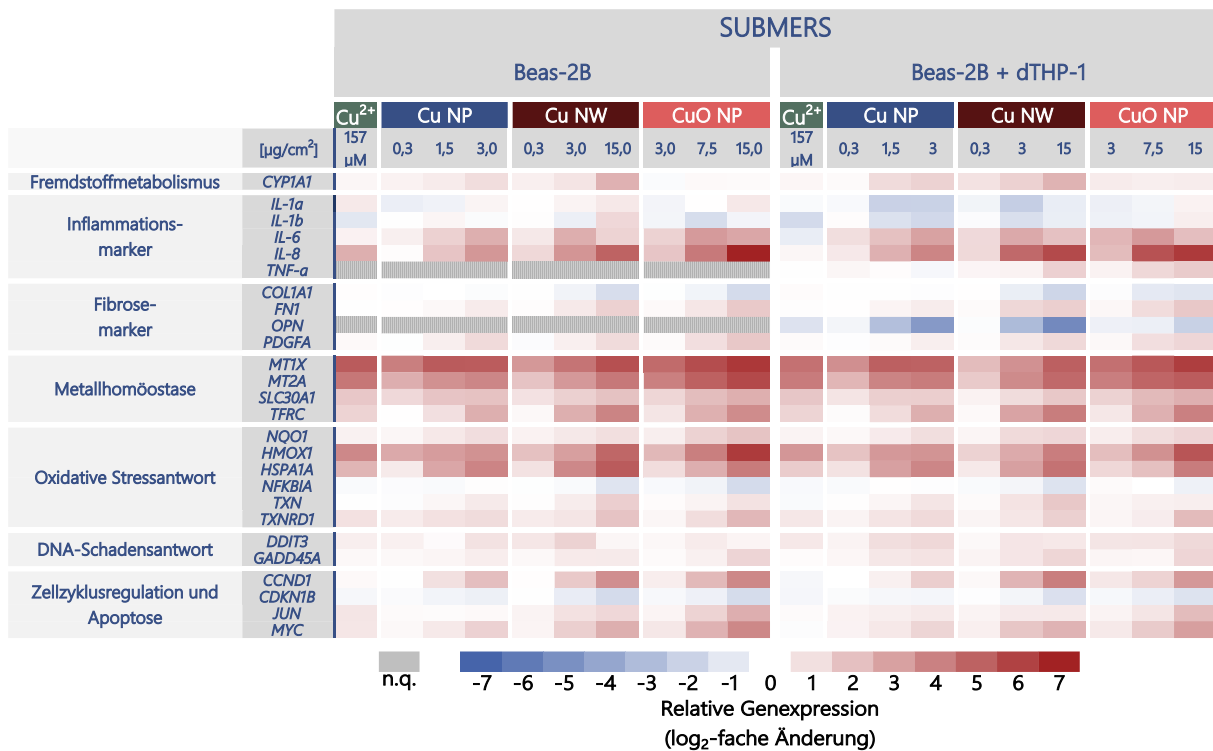


Abbildung 11: Änderung der Genexpressionsprofile einer Beas-2B-Monokultur und einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen und differenzierten THP-1-Zellen (dTHP-1) nach submerser Inkubation mit Kupfer-basierten Nanomaterialien. Die Zellen wurden für 24 h mit dem entsprechenden Nanomaterial submers inkubiert. Eine rote Färbung steht für eine Induktion, eine blaue Färbung für eine Repression der Gene. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. n.q.: nicht quantifizierbar.

Im Cluster des Fremdstoffmetabolismus wurde lediglich *CYP1A1* als Indikator für den oxidativen Metabolismus von Fremdstoffen geringfügig induziert (Fujii-Kuriyama *et al.*, 1992). Auffällig ist sowohl nach submerser Inkubation als auch nach ALI-Exposition die starke Induktion des Gen-Clusters der Metallhomöostase, vor allem jedoch der Gene *MT1X* und *MT2A*. Diese codieren für Proteine der metallbindenden Metallothionein (MT)-Familie und spielen somit eine Rolle in der Kupferhomöostase und in der Detoxifizierung von Metallionen (Calvo *et al.*, 2017). Eine Aktivierung dieser Gene durch die untersuchten Kupfer-basierten Materialien postuliert eine endozytotische Aufnahme dieser Materialien mit anschließender lysosomaler Freisetzung von Metallionen. Diese Beobachtung korreliert mit der in Kapitel 4.1.2 und Kapitel 4.1.3.2 bereits beschriebenen lysosomalen Löslichkeit und der daraus resultierenden zellulären Verfügbarkeit der Kupfer-Materialien und wurde für CuO NP bereits in der Literatur beschrieben (Semisch *et al.*, 2014; Strauch *et al.*, 2017). Außerdem wurde *TFRC* induziert, das für den Transferrin-Rezeptor TFR1 codiert und den Eisentransport in die Zelle reguliert (Liu *et al.*, 2020). Weiterhin ist eine Induktion im Cluster der oxidativen Stressantwort zu sehen. *NQO1*, welches durch alle Materialien

geringfügig induziert wurde, codiert für die NAD(P)H-abhängige Chinon-Oxidoreduktase, die auf eine Beteiligung des Nrf2-Signalwegs hindeutet. Nrf2 reguliert die zelluläre Antwort gegenüber Elektrophilen und Oxidantien und ist somit ein Indikator für oxidativen Stress (Baird & Yamamoto, 2020). Eine starke Induktion erfuhren weiterhin die Gene *HMOX1* und *HSPA1A*. *HMOX1*, das ebenfalls dem Nrf2-Signalweg unterliegt, fungiert dabei als Gen für das Enzym Hämoxigenase-1, das Häm zu Biliverdin abbaut und das durch verschiedene Transkriptionsfaktoren reguliert wird, die durch oxidativen Stress induziert werden (Holowiecki *et al.*, 2016; van der Veen *et al.*, 2016). *HSPA1A* codiert für das Chaperon *heat shock protein 70* (HSP70). Chaperone sind für die Erkennung und Eliminierung fehlgefalteter Proteine zuständig und werden unter oxidativem Stress ebenfalls vermehrt exprimiert (Kurashova *et al.*, 2020). Weitere, an der oxidativen Stressantwort beteiligte Proteine sind Thioredoxin und die Thioredoxinreduktase, deren codierende Gene *TXN* und *TXNRD1* ebenfalls durch alle Kupfer-basierten Materialien geringfügig induziert wurden. Thioredoxin spielt dabei eine wichtige Rolle bei der Reduktion oxidierter Proteine und die Thioredoxinreduktase sorgt wiederum für die Reduktion von Thioredoxin, wodurch dieses wieder zugänglich gemacht wird (Holmgren & Lu, 2010). Eine erhöhte Expression ist außerdem für die pro-inflammatorischen Gene *IL-6* und *IL-8* zu sehen, was auf eine inflammatorische Antwort der Kupfer-basierten Materialien hindeutet. Die inflammatorische Antwort ist dabei für die Mono- und die Kokultur vergleichbar und wird im Redox-aktiven Charakter von Kupfer begründet, wodurch Kupfer die Generation von ROS induzieren und so oxidativen, zellulären Stress auslösen kann (Oyinloye *et al.*, 2015; Wei *et al.*, 2014). Die Induktion von *IL-8* gibt darüber hinaus weitere Hinweise auf eine Aktivität von Nrf2 (Zhang *et al.*, 2005). Weitere Gene der inflammatorischen Antwort wie *IL-1a* und *IL-1b* erfuhren nach submerser und ALI-Exposition in der Monokultur keine Veränderung, wohingegen in der Kokultur eine Repression beobachtet wurde. Diese könnte durch das vermehrte Absterben der Makrophagen zustande kommen, wodurch im Vergleich zur unbehandelten Kokultur weniger inflammatorische Gene in der Probe vorhanden waren.

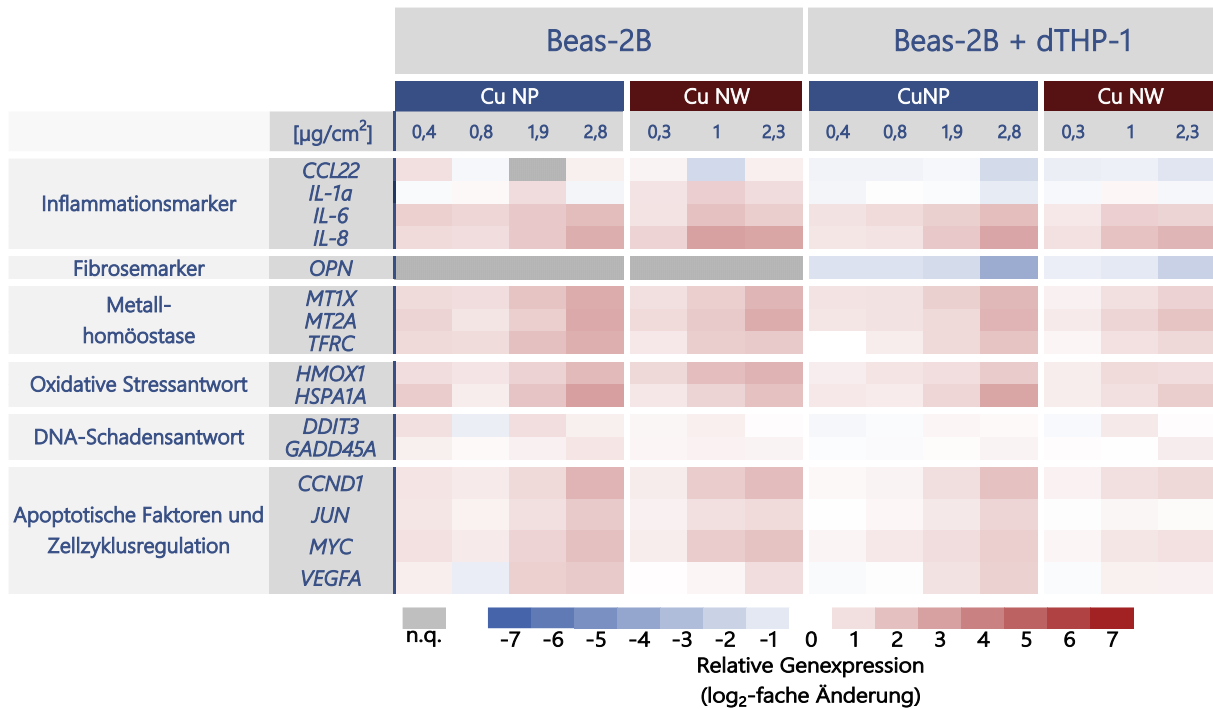


Abbildung 12: Änderung der Genexpressionsprofile einer Beas-2B-Monokultur und einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen und differenzierten THP-1-Zellen (dTHP-1) nach ALI-Exposition mit Cu NP und Cu NW. Die Zellen wurden für 10 Minuten gegenüber einem NM-haltigen Aerosol exponiert und anschließend für 24 h inkubiert. Eine rote Färbung steht für eine Induktion, eine blaue Färbung für eine Repression der Gene. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. n.q.: nicht quantifizierbar.

Eine Aktivierung des Activator Proteins 1 (AP-1) zeigte sich durch die gesteigerte Expression der Gene *JUN* und *MYC*, welche für die gleichnamigen Zellzyklusregulatoren codieren sowie durch die Induktion von Cyclin D (*CCND1*). AP-1 reguliert als Transkriptionsfaktor die Gene der zellulären Antwort gegenüber oxidativem oder inflammatorischem Stress (Shaulian & Karin, 2001) und eine Aktivierung von AP-1 wurde nach Inkubation mit CuO NP für A549-Zellen bereits in der Literatur beschrieben (Hanagata *et al.*, 2011). *MYC* wird darüber hinaus mit der Induktion der Apoptose über einen durch DNA-Schädigung ausgelösten G2/M-Phasen-Arrest in Verbindung gebracht (Sheen *et al.*, 2003). Die Induktion einer DNA-Schadensantwort wird durch eine geringfügig erhöhte Expression von *DDIT3* (*DNA damage induced transcript 3*) und *GADD45A*, das für das gleichnamige *Growth arrest and DNA-damage-inducible protein* codiert, angedeutet (Zhan, 2005; Guerrero-Castilla *et al.*, 2014).

Zahlreiche Studien beobachteten bereits ähnliche Genexpressionsprofile von CuO NP in pulmonalen Zelllinien (Hufnagel *et al.*, 2020; Strauch *et al.*, 2020). Außerdem wurde eine simultane Induktion von *MT2A*, *HMOX1* und *IL-8* in Caco-2-Zellen nach Inkubation mit CuO NP und

löslichem CuSO₄ von Ude *et al.* beobachtet. Dies liefert zusätzliche Evidenz, zum Wirkmechanismus von Kupfer-basierten Materialien durch intrazelluläre Freisetzung von Kupferionen, Induktion von oxidativem Stress und einer anschließenden inflammatorischen Antwort (Ude *et al.*, 2021).

Ein quantitativer Vergleich der am stärksten induzierten Gene nach submerser Inkubation und ALI-Exposition ist in Abbildung 13 dargestellt. Alle Gene erfuhren eine dosisabhängige Induktion. Dabei wurde nach submerser Inkubation für die Induktion von *MT1X* und *HMOX1* keine Abhängigkeit vom untersuchten Zellkultursystem beobachtet. *IL-8* wurde geringfügig höher in der Kokultur induziert, was durch den Beitrag der Zytokine aus Makrophagen erklärt werden kann. Trotz vergleichbarer Induktion der Metallothionein-codierenden Gene ist nach Inkubation mit 3 µg/cm² der CuO NP eine geringere Induktion der oxidativen Stressantwort und der inflammatorischen Antwort im Vergleich zu den Cu NP in Mono- und Kokultur zu sehen. Diese Beobachtung wurde bereits von Denluck *et al.* gemacht und wurde auf die erhöhte ROS-Generierung durch Cu NP zurückgeführt (Denluck *et al.*, 2018). Zusätzlich zu den untersuchten Nanomaterialien wurde eine Ionenkontrolle mitgeführt. Diese spiegelt den bereits extrazellulär im Zellkulturmedium gelösten Anteil an Kupferionen der höchsten verwendeten Konzentration an Kupfer-basierten Nanomaterialien wider. Auch diese Kontrolle führte zu einer erhöhten Expression aller drei Gene, wodurch ein Beitrag extrazellulär im Medium gelöster Ionen zur Wirkung der Nanomaterialien wahrscheinlich erscheint.

Nach ALI-Exposition ist eine schwächere Induktion der drei Gene zu beobachten. Diese Beobachtung kann darin begründet sein, dass über ein ALI kultivierte Zellen bereits einen höheren Basalwert an Zytokinen und Stressmarkern aufweisen. Des Weiteren ist nach ALI-Exposition vor allem nach Inkubation mit Cu NW und bei höheren Dosen der Cu NP eine verringerte Induktion von *MT1X* und *HMOX1* in der Kokultur zu erkennen. Da die Materialien nach ALI-Exposition zuerst mit den makrophagenähnlichen dTHP-1-Zellen in Berührung kommen ist es möglich, dass die Materialien bereits zu einem großen Teil von diesem Zelltyp aufgenommen wurden und dadurch eine verringerte Aufnahme durch die Epithelzellen erfolgte. Dieser Effekt wurde bereits bei der Untersuchung der Zytotoxizität der Materialien in der Kokultur beobachtet. Im Falle von *IL-8* ist für die submers inkubierten Proben eine erhöhte Induktion in der Kokultur zu erkennen, wobei dieser Unterschied jedoch jeweils nur für die mittlere Dosis und im Falle der Cu NP zusätzlich für die höchste Dosis signifikant war. Im Gegensatz dazu wurden nach ALI-Exposition mit Cu NP und Cu NW keine Unterschiede zwischen Mono- und Kokultur in der Expression von *IL-8* festgestellt.

Im Falle der inflammatorischen Antwort scheint der protektive Effekt durch die Kokultur also nicht ausgeprägt zu sein, was durch die vermehrte Ausschüttung von Zytokinen durch Makrophagen im Vergleich zu Epithelzellen erklärbar ist.

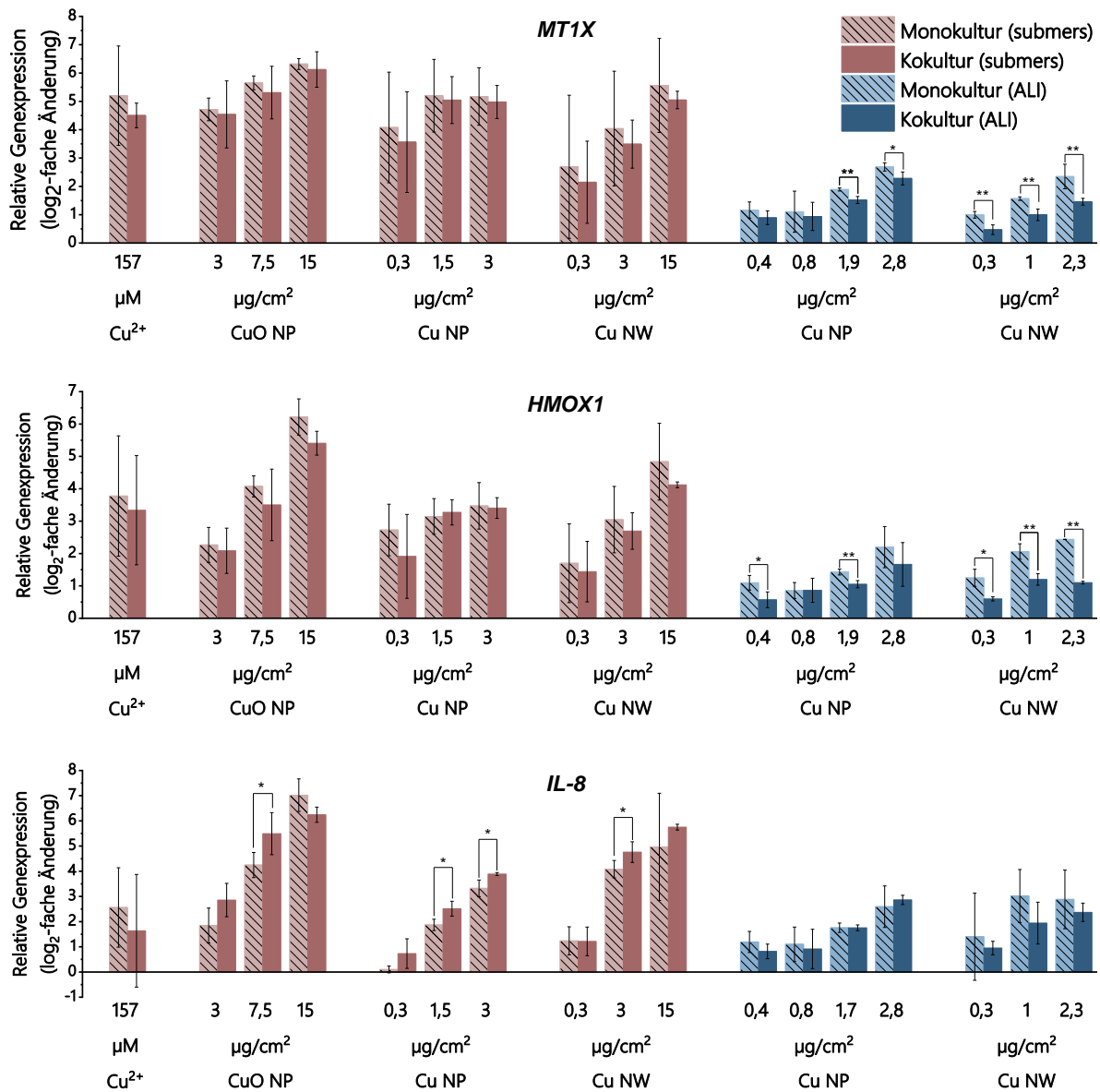


Abbildung 13: Induktion der Gene *MT1X*, *HMOX1* und *IL-8* durch Kupfer-basierte Nanomaterialien nach submerser Inkubation und nach Exposition über ein ALI. Beas-2B Zellen wurden in Monokultur und in Kokultur mit differenzierten THP-1 Zellen entweder für 24 h submers mit dem entsprechenden Nanomaterial inkubiert oder für 10 min an der Vitrocell® Cloud einem NM-haltigen Aerosol gegenüber exponiert und anschließend für 24 h am ALI kultiviert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen ± SD. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Kultivierungsmodellen: * ≤ 0,05, ** ≤ 0,01 (ungepaarter *t*-Test).

4.1.3.4 Genotoxizität

Teile der in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse wurden von Elisa Weschenfelder im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit angefertigt.

Die Ergebnisse der Genexpressionsstudien zeigten eine leichte Induktion von *DDIT3* und *GADD45A*, welche als Marker für eine DNA-Schadensantwort fungieren. Daher wurde zusätzlich die genotoxische Wirkung der Kupfer-basierten Materialien über die Quantifizierung von DNA-Strangbrüchen mittels alkalischer Entwindung untersucht. Die Ergebnisse nach submerser Inkubation und ALI-Exposition sind in Abbildung 14 dargestellt. Sowohl nach submerser Inkubation als auch nach Exposition über ein ALI ist eine konzentrationsabhängige Induktion von DNA-Strangbrüchen durch Kupfer-basierte Materialien sowohl in Monokultur als auch in Kokultur zu erkennen, die in ihrem Ausmaß vergleichbar war. In der Ionenkontrolle, die mit 157 μM CuCl_2 inkubiert wurde, ist keine erhöhte Induktion von DNA-Strangbrüchen im Vergleich zur Negativkontrolle zu sehen. Demnach leisten extrazellulär im Medium freigesetzte Kupferionen keinen Beitrag zur genotoxischen Wirkung der Kupfer-basierten Materialien.

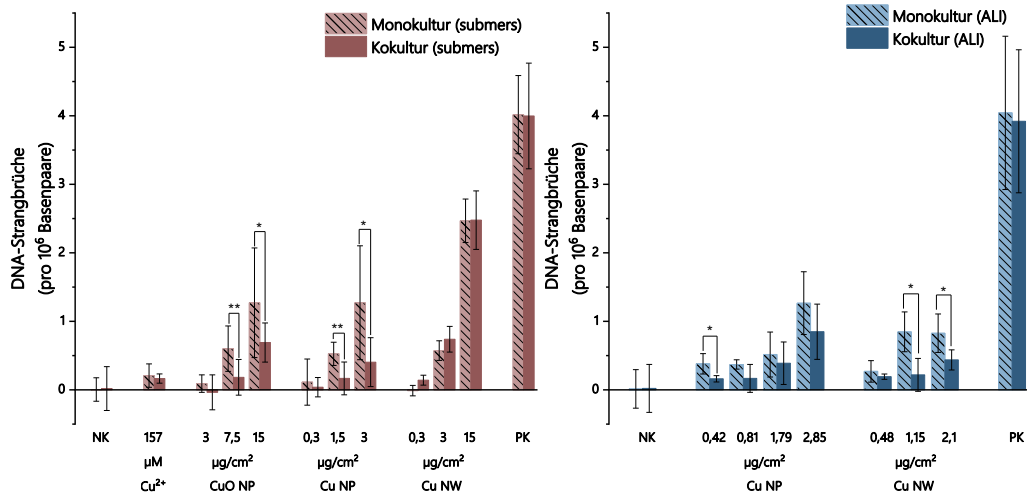


Abbildung 14: Induktion von DNA-Strangbrüchen durch Kupfer-basierte Nanomaterialien nach submerser Inkubation (links) und nach Exposition über ein ALI (rechts). Beas-2B Zellen wurden in Monokultur und in Kokultur mit differenzierten THP-1 Zellen entweder für 24 h submers mit dem entsprechenden Nanomaterial inkubiert oder für 10 Minuten an der Vitrocell® Cloud einem NM-haltigen Aerosol gegenüber exponiert und anschließend für 24 h am ALI inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen \pm SD. NK: Negativkontrolle, PK: Positivkontrolle (100 μM Menadion) Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Kultivierungsmodellen: * $\leq 0,05$, ** $\leq 0,01$ (ungepaarter *t*-Test).

Während DNA-Strangbrüche nach submerser Inkubation mit Cu NP und Cu NW bereits bei einer Dosis von $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ verursacht wurden, ist für CuO NP erst ab $7,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ eine erhöhte Strangbruchrate zu erkennen. *In vivo*-Studien belegen nach oraler Gabe ebenso eine erhöhte Genotoxizität von Cu NP im Vergleich zu CuO MP, wobei dieser Effekt auch im Größenunterschied der Materialien begründet sein könnte (Noureen *et al.*, 2017). Eine mögliche Erklärung der erhöhten Toxizität von Cu NP und Cu NW im Vergleich zu CuO NP stellt die erhöhte oxidative Reaktivität von Cu NP dar, die für die verwendeten Materialien bereits untersucht und publiziert wurde (Wall *et al.*, 2021). Auch andere Autoren stellten eine erhöhte Toxizität von Cu NP im Vergleich zu CuO NP fest, die ebenfalls auf eine erhöhte Fähigkeit ROS zu produzieren zurückgeführt wurde (Denluck *et al.*, 2018).

Im Vergleich zwischen Mono- und Kokultur ist außerdem eine erhöhte genotoxische Wirkung nach submerser Inkubation mit CuO NP und Cu NP in Monokultur zu erkennen, während das verwendete Zellkultursystem keinen Einfluss auf die Genotoxizität von submers inkubierten Cu NW hatte. Diese Beobachtung spiegelt die Ergebnisse der zytotoxischen Untersuchung wider. Nach ALI-Exposition ist wiederum für beide Materialien eine abgeschwächte genotoxische Wirkung in der Kokultur zu sehen. Dies spricht für eine protektive Wirkung durch die in der Kokultur vorhandenen differenzierten THP-1-Zellen, welche nach ALI-Exposition zuerst mit dem Nanomaterial in Berührung kommen und dadurch bereits vermutlich einen Großteil der Materialien aufnehmen können. Diese Beobachtung deckt sich auch mit der nach ALI-Exposition beobachteten Befunden zur Zytotoxizität und zur Genexpression.

Zahlreiche Studien bestätigen eine genotoxische Wirkung für CuO NP in humanen pulmonalen Zelllinien, wobei diese hauptsächlich durch die Freisetzung von Metallionen und der dadurch induzierten oxidativen Stressantwort zum Tragen kommt (Akhtar *et al.*, 2016; Karlsson *et al.*, 2008; Strauch *et al.*, 2017; Semisch *et al.*, 2014; Cronholm *et al.*, 2013). In dieser Arbeit wurde allerdings zum ersten Mal die *in vitro*-Genotoxizität von Cu NP und Cu NW nach submerser Inkubation und über ein ALI verglichen.

4.2 SILBER-BASIERTE NANOMATERIALIEN

Zur Untersuchung der Toxizität von Silber-basierten Nanomaterialien wurden Ag NP und Ag NW ausgewählt. Die Exposition von Mono- und Kokultur gegenüber Ag NP oder Ag NW fand über zwei Szenarien statt. Zum einen wurden die Zellen gegenüber beiden Materialien submers inkubiert. Weiterhin fand für beide Materialien eine Exposition über ein ALI statt.

4.2.1 Physikochemische Eigenschaften

Die Materialien wurden zunächst auf ihre physikochemischen Eigenschaften hin untersucht. Nach Aufarbeitung wurde dazu einerseits die Größenverteilung mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) bestimmt. Andererseits wurden für Ag NP Messungen durch *dynamic light scattering* (DLS) durchgeführt. Abbildung 15 zeigt typische elektronenmikroskopische Aufnahmen der Silber-basierten Materialien und in Tabelle 8 sind die Ergebnisse der physikochemischen Eigenschaften zusammengefasst.

Die Vermessung der Ag NP ergab einen mittleren primären Durchmesser von $15,5 \pm 0,04$ nm, während der hydrodynamische Durchmesser bei $72,4 \pm 10$ nm lag. In der Literatur wurden für dieselben Partikel vergleichbare Abmaße beschrieben (Bobyk *et al.*, 2021). Der PDI der Ag NP-Suspension von 0,31 deutet auf eine relativ monodisperse Suspension hin, was auch für die in Abbildung 15 dargestellten Ag NP ersichtlich ist. Insgesamt stimmen die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse der Charakterisierungsstudien von Ag NP mit den in der Literatur beschriebenen Eigenschaften der selben Partikel überein (Kleiven *et al.*, 2018). Die verwendeten Ag NW wiesen eine mittlere Länge von $10,6 \pm 0,28$ μm und eine mittlere Breite von $110 \pm 1,6$ nm auf und besitzen so die Eigenschaften einer WHO-Faser mit einer Mindestlänge von 5 μm und einem Länge-zu-Breite-Verhältnis von mindestens 3:1. Als Maß für die Stabilität der Suspension wurde das ζ -Potential gemessen, welches mit Werten zwischen -4 und -12 mV für beide Silber-basierten Materialien für eine eher instabile Suspension spricht. Die Verneblung der Ag NW verursachte eine Kürzung der Fasern auf eine mittlere Länge von $3,7 \pm 2,64$ μm (Abbildung 15C). Außerdem wiesen die Fasern nach Verneblung teilweise Knicke und Krümmungen auf. Insgesamt zeigten sich nach Verneblung jedoch dennoch typische Fasereigenschaften, wie z.B. ein Länge-zu-Breite-Verhältnis von mindestens 3:1.

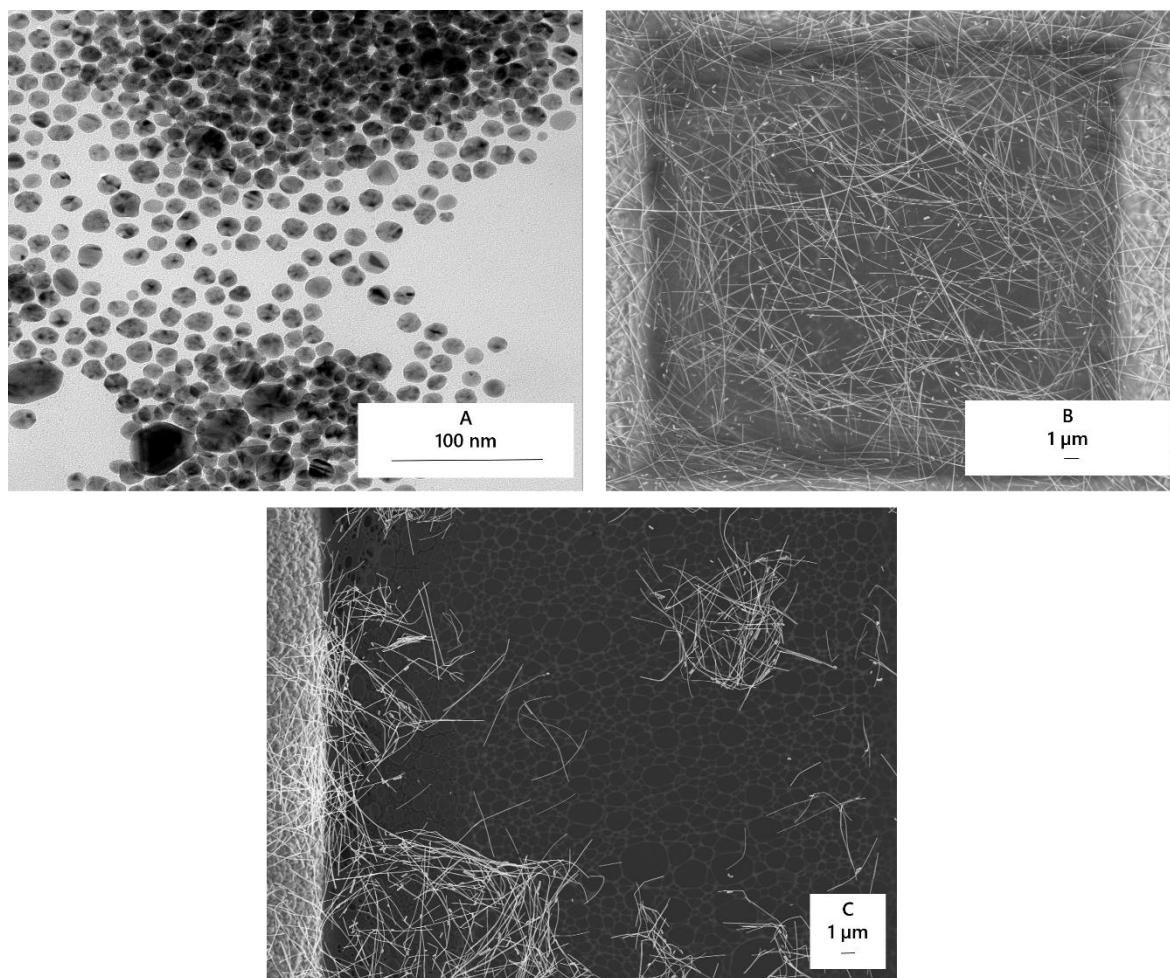


Abbildung 15: Exemplarische elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ag NP (A), Ag NW (B) und vernebelten Ag NW (C). Die Materialien wurden nach Aufarbeitung nach dem NANOGENOTOX-Protokoll in einer Konzentration von 2,56 mg/mL auf ein TEM-Grid aufgetragen oder mittels der Vitrocell® Cloud vernebelt und anschließend elektronenmikroskopisch betrachtet.

Tabelle 8: Physikochemische Eigenschaften Silber-basierter Nanomaterialien. d_p : Primärdurchmesser; d_H : hydrodynamischer Durchmesser; PDI: Polydispersitätsindex;

Materialspezies	Ag NP	Ag NW	Ag NW (vernebelt)
Länge (μm)	-	$10,6 \pm 0,28$	$3,68 \pm 2,64$
Breite (nm)	-	$110 \pm 1,6$	$110 \pm 1,6$
d_p (nm)	$15,5 \pm 0,04$	-	-
d_H (nm)	$72,4 \pm 10,0$	-	-
PDI	$0,31 \pm 0,06$	-	-
ζ-Potential (mV)	$-11,2 \pm 2,1$	$-4,1 \pm 0,1$	-
Reinheit (% wt)	$99,3 \pm 0,08$	$99,1 \pm 0,65$	-

4.2.2 Untersuchungen zur Löslichkeit

Die Löslichkeit von Ag NP und Ag NW wurde in alveolärer und lysosomaler Modellflüssigkeit, sowie in den verwendeten Zellkulturmedien untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 zusammengefasst. Sowohl Ag NP als auch Ag NW wiesen eine vernachlässigbar geringe Löslichkeit in allen vier untersuchten Medien auf. Dies steht im Widerspruch zu der bereits bekannten Löslichkeit von Silbermaterialien im sauren Milieu (Breitner *et al.*, 2018; Shimizu *et al.*, 2022). Auch Pem *et al.* stellten eine Löslichkeit der Ag NP fest, welche jedoch mit einer raschen Transformation über die Bildung von Schwefel-assoziierten Sekundärpartikeln einhergeht (Pem *et al.*, 2021). Die Transformation der Silbermaterialien wurde in dieser Arbeit nicht verifiziert, daher kann eine Lösung und anschließende Bildung von Sekundärstrukturen nicht ausgeschlossen werden.

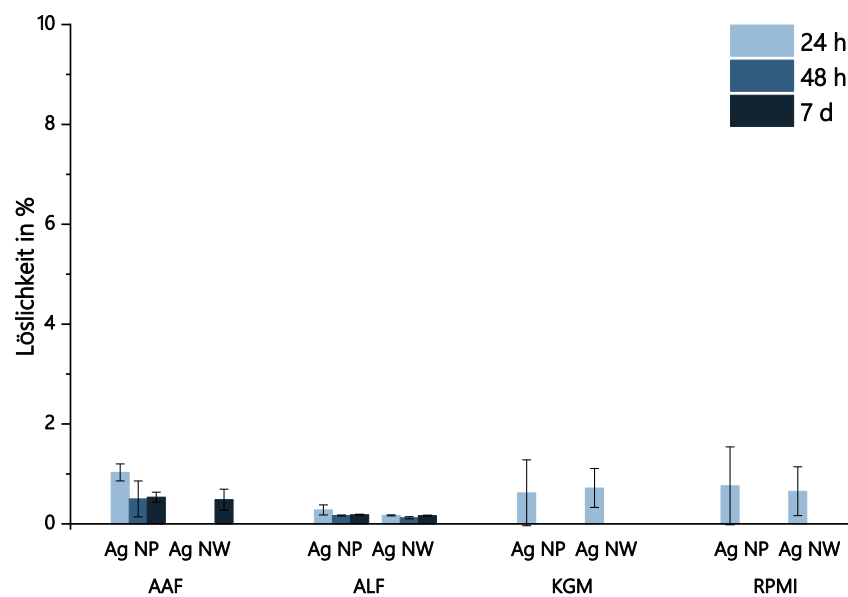


Abbildung 16: Löslichkeit Silber-basierter Nanomaterialien in verschiedenen physiologischen und Zellkultur-relevanten Medien. Die Materialien wurden in einer Konzentration von 100 µg/mL für den jeweiligen Zeitraum bei 37 °C inkubiert. Nach Abtrennung der nicht-gelösten Rückstände durch Zentrifugation wurde der Ionengehalt im Überstand mittels GF-AAS bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD aus drei unabhängigen Versuchen. AAF: artifizielle alveoläre Flüssigkeit (pH 7,4); ALF: artifizielle lysosomale Flüssigkeit (pH 4,5); KGM: *keratinocyte growth medium*; RPMI: *Roswell Park Memorial Institute Medium*;

4.2.3 Toxikologisches Wirkprofil

Die Untersuchung des toxikologischen Wirkprofils umfasste die Untersuchung des ATP-Gehalts, der zellulären Verfügbarkeit, Feststellungen von Änderungen im Genexpressionsprofil und die Induktion von DNA-Strangbrüchen. Die Ergebnisse dieser Endpunkte werden in den folgenden Kapiteln dargestellt und diskutiert.

4.2.3.1 Zytotoxizität

Teile der in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse wurden von Yvonne Köder im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit angefertigt.

Die Zytotoxizität der Silber-basierten Nanomaterialien wurde über die Ermittlung des ATP-Gehalts untersucht und ist für die submerse Inkubation in Abbildung 17 dargestellt. Für Ag NP ist in Mono- und Kokultur eine dosisabhängige Abnahme der Zellviabilität zu sehen. So wurde bereits bei einer Dosis von $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ eine Reduktion auf 90 % beobachtet. Bei einer Dosis von $15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ sank die Viabilität weiter auf etwa 50 %, bis hin zu 0 % Viabilität nach einer Inkubationsdosis von $30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, was mit der Zytotoxizität in A549-Zellen vergleichbar ist (Bobyk *et al.*, 2021). Ähnliche Ergebnisse für Beas-2B-Zellen wurden nach Inkubation mit Citrat-stabilisierten Ag NP beobachtet, wobei im MTS-Assay eine Reduktion der Viabilität auf 50 % nach einer Inkubation mit $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ (entspricht $15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) beobachtet wurde (Zhang *et al.*, 2015a). Jang *et al.* stellten dagegen bereits ab einer Konzentration von $0,75 \mu\text{g}/\text{mL}$ signifikante zytotoxische Effekte nach Inkubation mit 5 nm großen PVP-stabilisierten Ag NP fest. Dabei war die Zytotoxizität der Partikel jedoch abhängig von der Größe, da bei großen Partikeln, mit einer Größe von 100 nm, keine zytotoxischen Effekte beobachtet wurden (Jang *et al.*, 2021). Eine Abhängigkeit von der Partikelgröße beschreiben auch Gliga *et al.*, wobei 10 nm große Ag NP unabhängig von ihrer Beschichtung eine starke Zytotoxizität verursachten (Gliga *et al.*, 2014). Zu einem anderen Ergebnis kamen dagegen AshaRani *et al.*, die in der Hirntumorzelllinie U-251 und in Fibroblasten nach Inkubation mit $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ (entspricht etwa $30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) keine zytotoxischen Effekte festgestellt haben. Effekte wurden hier erst ab einem Inkubationszeitraum von 48 h beobachtet (AshaRani *et al.*, 2009). Diese divergierenden Ergebnisse zur Zytotoxizität von Ag NP können mit der Verwendung unterschiedlicher Zelllinien und einer daraus resultierenden unterschiedlichen Internalisierungsrate erklärt werden. Aber auch die Stabilisierung oder Beschichtung der Partikel kann die Internalisierungsrate beeinflussen.

Für Ag NW wurde hingegen selbst nach der höchsten Inkubationsdosis von 30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ wurde keine Verringerung des ATP-Gehalts festgestellt. Dabei war ebenfalls kein Unterschied zwischen Mono- und Kokultur zu sehen. In der Literatur gibt es bislang keine Daten zur zytotoxischen Wirkung von Ag NW in Beas-2B, jedoch wurde eine ausbleibende Zytotoxizität ebenso in der Typ-I-Alveolarzelllinie TT1 beobachtet (Chen *et al.*, 2013). Ergebnisse einer weiteren Studie zeigen zwar eine vorhandene Zytotoxizität von Ag NW in humanen Makrophagen, welche jedoch im Vergleich zu Ag NP geringer ausgeprägt war (Theodorou *et al.*, 2017). Im Gegensatz dazu verursachten PVP-stabilisierte Ag NW starke zytotoxische Effekte in A549-Zellen nach 48 h (Stoehr *et al.*, 2011). Es gibt also divergierende Beobachtungen bezüglich der Zytotoxizität von Ag NW. Neben dem verwendeten Zelltyp scheint zusätzlich die Länge der Ag NW, die Inkubationszeit und die Beschichtung eine Rolle zu spielen.

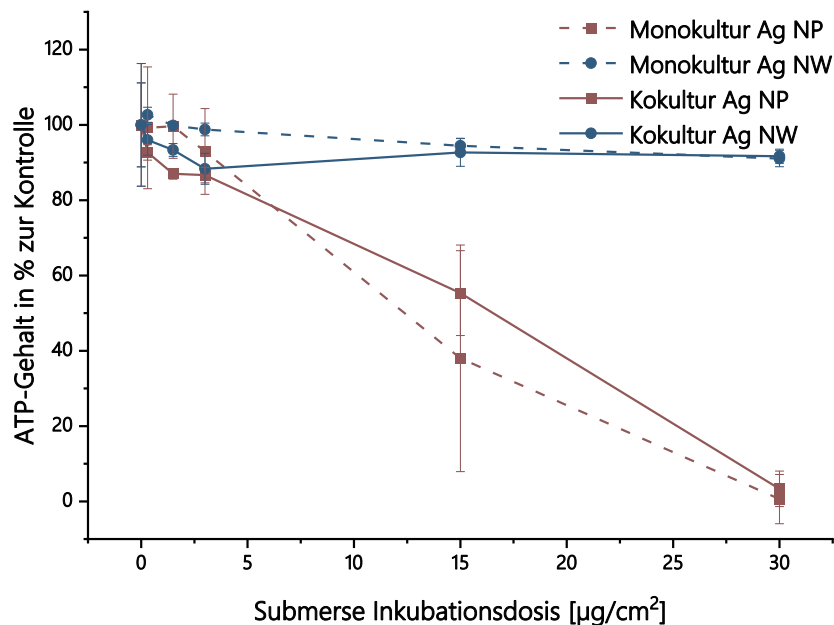


Abbildung 17: Einfluss submers inkubierter, Silber-basierter Nanomaterialien auf den ATP-Gehalt in Beas-2B-Zellen und einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen und differenzierten Monozyten mit makrophagenähnlichen Eigenschaften (dTHP-1). Beas-2B-Zellen wurden in Monokultur und in Kokultur mit differenzierten THP-1-Zellen für 24 Stunden mit dem entsprechenden Nanomaterial submers inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen \pm SD.

Nach ALI-Exposition ist für Ag NP bei einer Dosis von 4,9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ eine Reduktion des ATP-Gehalts auf 70 % in der Kokultur zu sehen, während die Monokultur keine zytotoxischen Effekte bei dieser Dosis zeigte. Erst ab einer Expositionsdosis von 8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ fiel der gemessene ATP-Gehalt in Mono- und in Kokultur auf ein vergleichbares Niveau von 70 %. Nach Exposition mit Ag NW ergibt sich ebenfalls eine stärkere Sensitivität in der Kokultur, wobei hier bereits ab einer Dosis

von $2,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ eine Reduktion des ATP-Gehalts auf 65 % zu sehen ist. Die gleiche Dosis an Ag NW zeigte in der Monokultur keine Effekte. Hier wurden leichte Effekte erst ab einer Dosis von $6,47 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ beobachtet (ATP-Gehalt 85 %). Nach Exposition mit der höchsten Dosis an Ag NW ($11,47 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) ist für beide Kultivierungssysteme eine starke Zytotoxizität zu erkennen, wobei die Kokultur sensibler reagierte. Es war außerdem zu beobachten, dass die Stärke der zytotoxischen Wirkung nach ALI-Exposition für Ag NP und Ag NW in etwa vergleichbar war. Diese Beobachtung wird auch in der Literatur beschrieben, wobei eine Tetrakultur aus Epithelzellen, Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen gegenüber Ag NP und Ag NW über ein ALI exponiert wurde und

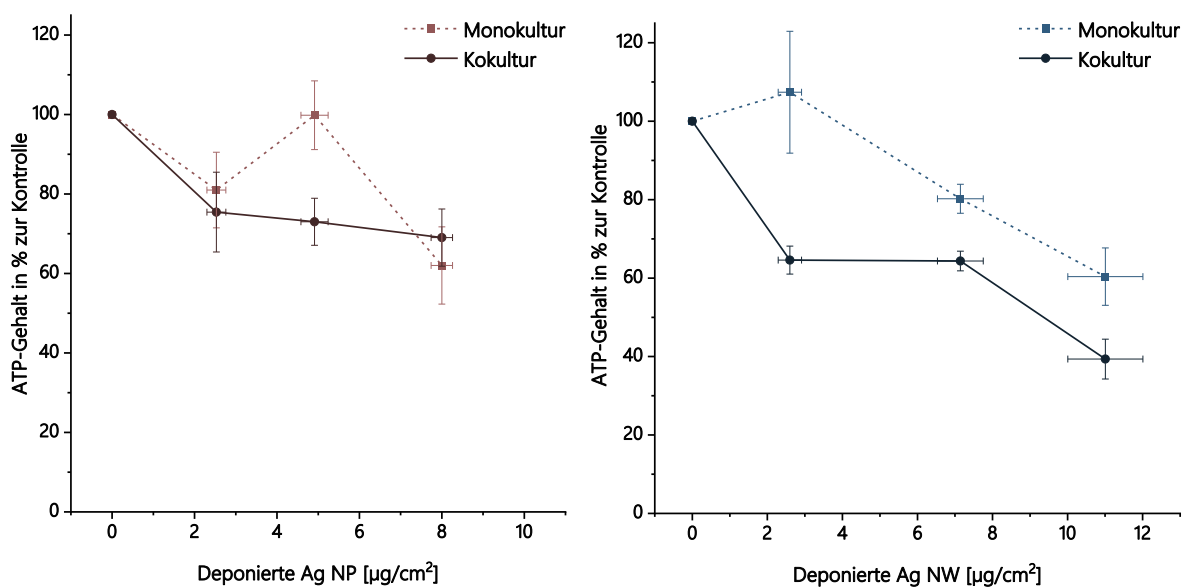


Abbildung 18: Einfluss von Silber-basierten Nanomaterialien auf den ATP-Gehalt von Beas-2B-Zellen und einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen und differenzierten Monozyten mit makrophagenähnlichen Eigenschaften (dTHP-1) nach ALI-Exposition. Die Zellen wurden für 10 Minuten an der Vitrocell® Cloud gegenüber einem NM-haltigen Aerosol exponiert und für 24 Stunden am ALI inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen \pm SD. Horizontale Fehlerbalken zeigen die Varianz in der deponierten Dosis an.

nach 24 h für beide Materialien eine Erhöhung der LDH-Freisetzung bei einer Inkubationsdosis von $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ beobachtet wurde (Fizeşan *et al.*, 2019). Die nach ALI-Exposition erhaltenen Zytotoxizitätsdaten sind im Falle der Ag NP mit den Ergebnissen nach submerser Inkubation vergleichbar. Sowohl die Mono- als auch die Kokultur reagierten nach ALI-Exposition dagegen weitaus sensibler auf Ag NW. Eine höhere Sensitivität nach ALI-Exposition gegenüber submerser Exposition wurde bereits für TiO_2 NP und CeO_2 NP beobachtet (Diabaté *et al.*, 2020). Als möglicher Grund kann hierfür die tatsächliche Depositionsdosis angegeben werden, welche nach submerser Inkubation nicht ermittelt wurde.

Eine weitere mögliche Erklärung für die vorhandene Zytotoxizität der Ag NW nach ALI-Exposition im Gegensatz zur submersen Inkubation kann in der Länge der Fasern begründet sein: Während die Fasern in der submersen Inkubation eine mittlere Länge von 10,6 μm aufwiesen, lagen die Fasern nach ALI-Exposition gekürzt auf eine Länge von 3,7 μm vor. In der Literatur wurde bereits beobachtet, dass kürzere Fasern mit einer mittleren Länge von 4 μm höhere zytotoxische Effekte aufweisen als längere Fasern mit einer mittleren Länge von 10-20 μm . Während kurze Ag NW komplett in Makrophagen phagozytiert wurden, neigten längere Ag NW zur Induktion einer proinflammatorischen Wirkung, die mit einem Ausbleiben zytotoxischer Effekte einherging (Toybou *et al.*, 2019).

Nach ALI-Exposition mit Ag NW wurde außerdem eine höhere zytotoxische Wirkung in der Kokultur beobachtet. Die in der Kokultur befindlichen Makrophagen scheinen also einen Einfluss auf die Zytotoxizität nach ALI-Kultivierung zu haben. Diese Beobachtung ist in der Literatur noch nicht beschrieben. Sie zeigt jedoch, dass die Kokultur ein empfindlicheres Zellsystem gegenüber Ag NW darstellt.

4.2.3.2 Zelluläre Verfügbarkeit

Die zelluläre Verfügbarkeit von Ag NP und Ag NW wurde als intrazelluläre Ionenfreisetzung submers in Beas-2B- und in differenzierten THP-1-Zellen untersucht. Um eine Überbestimmung der aufgenommenen Materialien durch an der Zellmembran anhaftende Materialrückstände zu verhindern, wurde ein Ansatz gewählt, der mittels einer Zellyse nur die löslichen Fraktionen der Zelle und die darin befindlichen freigesetzten Ionen erfasst. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt. Aufgrund der hohen Toxizität von Ag NP in dTHP-1-Zellen, wurden für diese Inkubation geringere Dosen ausgewählt. Nach Inkubation mit Ag NP stieg die intrazelluläre Silberionen-Konzentration vor allem in den differenzierten THP-1-Zellen stark an. So wurde bei einer Dosis von 3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ bereits eine Konzentration von 174 μM beobachtet, während die Exposition der Beas-2B-Zellen durch die Ag NP nach 3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ lediglich zu einer Erhöhung auf 60 μM führte und bei höheren Dosen auf maximal 119 μM anstieg. Ein ähnliches Bild ergab sich für die Ag NW. Hier wurde nach einer Inkubation der differenzierten THP-1-Zellen mit 30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ eine Silberionen-Konzentration von 324 μM festgestellt, während die intrazelluläre Ionenkonzentration nach Inkubation der Beas-2B-Zellen mit der gleichen Dosis 97 μM betrug.

Der erhöhte Ionengehalt in dTHP-1-Zellen spricht für eine erhöhte Aufnahme von Silber-basierten Nanomaterialien in Zellen mit makrophagenähnlichen Eigenschaften durch eine erhöhte Phagozytose-Aktivität. Die Ergebnisse werden durch Studien von Li & Wang unterstützt, die die Aufnahme von Ag NW in HaCaT-Zellen und Mausmakrophagen untersuchten. Hier wurde ebenfalls eine erhöhte Aufnahme von Ag NW in die Makrophagen beobachtet (Li & Wang, 2021). Eine Aufnahme von Ag NP und Ag NW und rasche intrazelluläre Freisetzung wurde bereits in einigen Studien in unterschiedlichen Zelllinien festgestellt (Matteis *et al.*, 2015; Theodorou *et al.*, 2017). Die Wirkweise der Silberionen wird dabei durch anschließende Bindung an zelluläre Thiol- und Chloridgruppen beschrieben, wodurch zelluläre Proteinfunktionen und antioxidative Mechanismen beeinflusst werden und somit zytotoxische Effekte auftreten (Jiang *et al.*, 2015; Hsiao *et al.*, 2015; Bobyk *et al.*, 2021).

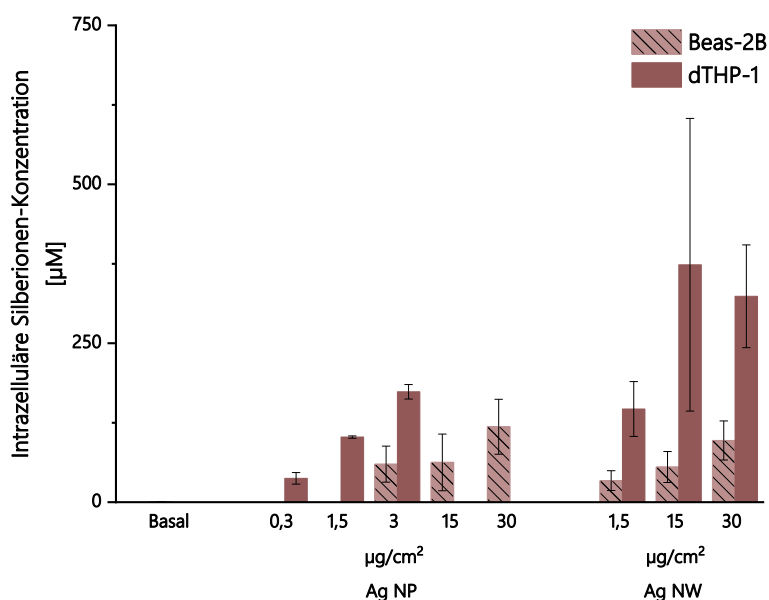


Abbildung 19: Intrazelluläre Silberionen-Konzentration nach submerser Inkubation mit Silber-basierten Nanomaterialien in Beas-2B-Zellen und differenzierten THP-1-Zellen (dTHP-1). Die Zellen wurden für 24 h mit dem entsprechenden Nanomaterial inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Zellmembran abgetrennt und die Ionenkonzentration im Überstand mittels GF-AAS gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen \pm SD.

Neben dem Ionengehalt in der gesamten Zelle, wurde die intrazelluläre Ionenverteilung in Zytoplasma und Zellkern beider Zelllinien untersucht. Dazu wurde eine Fraktionierungsmethode angewandt, wodurch die löslichen Fraktionen des Zytoplasmas und des Zellkerns isoliert werden konnten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 als *heatmap* dargestellt. Während nach Inkubation mit beiden Materialien geringe Konzentrationen von Silberionen im Zytoplasma detektiert

wurden, wurde eine erhöhte Akkumulation von beiden untersuchten Materialien im Zellkern der Beas-2B-Zellen und für Ag NW zusätzlich im Zellkern der differenzierten THP-1-Zellen gefunden.

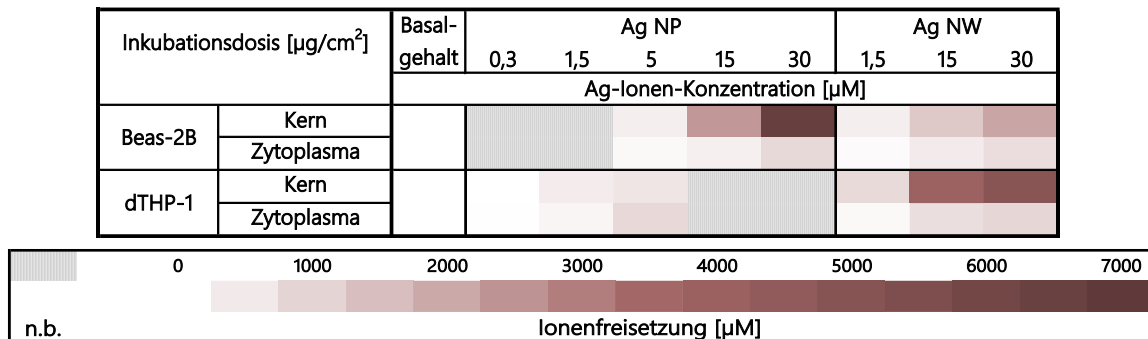


Abbildung 20: Intrazelluläre Ionenverteilung in Zytoplasma und Zellkern nach submerser Inkubation mit Silber-basierten Nanomaterialien. Die Zellen wurden für 24 h mit dem entsprechenden Material inkubiert und anschließend einem Fraktionierungsprotokoll unterzogen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Diese Arbeit betrachtet erstmals die intrazelluläre Verteilung von Silberionen, die aus Silber-basierten Nanomaterialien freigesetzt wurden. Dagegen gibt es Veröffentlichungen zur intrazellulären Verteilung von ungelösten Ag NP. Diese zeigen teilweise ein Vorhandensein von Ag NP im Zellkern (AshaRani *et al.*, 2009), teilweise jedoch auch den Verbleib der Ag NP im Zytoplasma mit Anlagerung um den Zellkern (Greulich *et al.*, 2011). Insgesamt zeigen jedoch alle veröffentlichten Daten zur intrazellulären Verteilung von Silber eine räumliche Nähe zwischen den Silbermaterialien und dem Zellkern. Dies deutet auf eine mögliche Interaktion der Materialien mit Zellkern-Bestandteilen wie beispielsweise der DNA und damit eine möglicherweise genotoxische Wirkung hin. Im Verlauf dieser Arbeit wird diese Korrelation weiter diskutiert.

4.2.3.3 Genexpressionsanalysen

Teile der in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse wurden von Yvonne Köder im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit angefertigt.

Zur Untersuchung des Genexpressionsprofils nach Inkubation mit Ag NP und Ag NW wurden die Änderungen im Genexpressionsmuster nach submerser und ALI-Exposition mit beiden Materialien untersucht. Die Genexpressionsmuster sind nach submerser Inkubation in Abbildung 21 und nach ALI-Exposition in Abbildung 22 in einer *heatmap* zusammengefasst. Insgesamt ist zu sehen, dass die ALI-Exposition mit Ag NP und Ag NW eine geringere Auswirkung auf die

Genexpression in Mono- und Kokultur hat. Mit Ausnahme der quantitativen Unterschiede zeigen beide Kultivierungssysteme jedoch nach submerser Inkubation und nach ALI-Exposition ein vergleichbares Genexpressionsmuster.

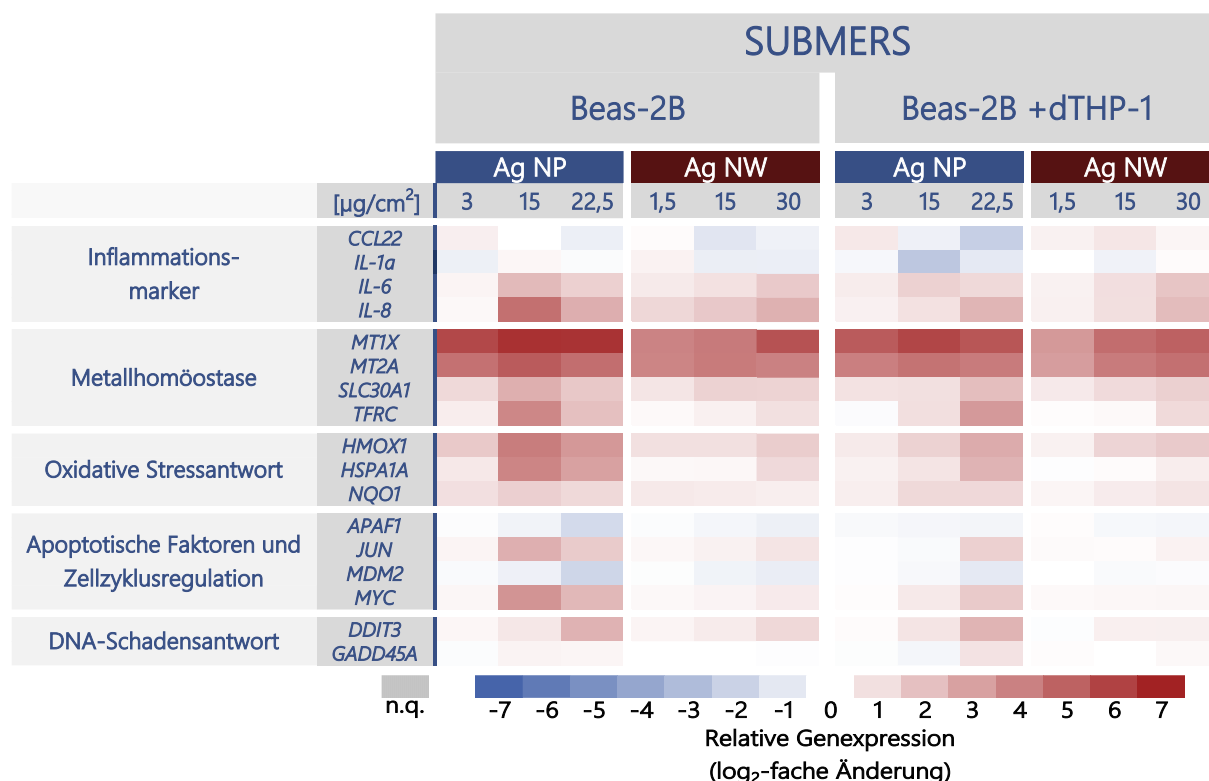


Abbildung 21: Änderung der Genexpressionsprofile einer Beas-2B-Monokultur und einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen mit differenzierten THP-1-Zellen (dTHP-1) nach submerser Inkubation mit Silber-basierten Nanomaterialien. Die Zellen wurden für 24 h mit dem entsprechenden Nanomaterial submers inkubiert. Eine rote Färbung steht für eine Induktion, eine blaue Färbung für eine Repression der Gene. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. n.q.: nicht quantifizierbar.

Die leichte Aktivierung des Gens der antioxidativ wirkenden NAD(P)H-abhängigen Chinon-Oxidoreduktase 1 (*NQO1*), deutet auf eine Detoxifizierung von oxidativem Stress und eine Beteiligung des Nrf2-Signalwegs hin. Nrf2 reguliert generell die zelluläre Antwort gegenüber Elektrophilen und Oxidantien. Bei Änderungen im Redox-Status der Zelle wird Nrf2 aktiviert und induziert Antioxidantien, Faktoren des Fremdstoffmetabolismus oder andere protektive Enzyme (Baird & Yamamoto, 2020). Nach Exposition gegenüber beiden Silbermaterialien wurde außerdem das Gen *TFRC* induziert. Dieses codiert für den Transferrin-Rezeptor *TFR1*, welcher den endozytotischen Transport von Eisen durch Transferrin in die Zelle sicherstellt (Liu *et al.*, 2020). Das Gen *SLC30A1*, welches für den Zinktransporter *ZNT1* codiert, wurde im schwächeren Maße induziert. Durch seine Aufgabe der Regulation der Kationenkonzentration in der Zelle, wird

jedoch ebenfalls eine Beteiligung an der Metallhomöostase diskutiert (Segal *et al.*, 2004; Kambe *et al.*, 2008). Weiterhin wurden durch oxidativen Stress aktivierte Gene induziert, wobei im Einzelnen die Gene *HMOX1* und *HSPA1A* zu nennen sind. *HMOX1* unterliegt dabei ebenfalls der Regulation des Nrf2-Signalwegs (Rushworth *et al.*, 2005). Die für die gleichnamigen Zytokine codierenden Gene *IL-6* und *IL-8* wurden durch beide Silbermaterialien ebenfalls induziert und deuten damit auf eine inflammatorische Wirkung beider Materialien hin, die ebenfalls über den Nrf2-Signalweg reguliert wird (Zhang *et al.*, 2005). Die Induktion von *MT1X* und *MT2A* als Gene für Proteine der Metallothioneinfamilie zeigt eine intrazelluläre Freisetzung von Silberionen. Eine Induktion Metallothionein-codierender Gene, Gene der oxidativen Stressantwort und *IL-8* nach Inkubation von Beas-2B-Zellen mit Ag NP wurde bereits von Jang *et al.* festgestellt und wurde auf eine Freisetzung von Silberionen und der damit erhöhten Induktion von oxidativem Stress zurückgeführt (Jang *et al.*, 2021). Weitere Studien zeigen eine Induktion der Zytokine IL-6 und IL-8 nach 24-stündiger Inkubation mit Ag NP in mesenchymalen Stammzellen (Hackenberg *et al.*, 2011). Für die Gene *CCL22* und *IL-1a* wurde nach Inkubation mit Ag NP in der Kokultur eine Repression beobachtet, die mit der zytotoxischen Wirkung der Ag NP in Makrophagen begründet werden kann.

Auffällig ist weiterhin eine Aktivierung des für c-Jun codierenden Gens *JUN*, welches an der Bildung des Transkriptionsfaktors AP-1 und damit direkt an der Zellzyklusregulation, der Apoptose und der Differenzierung beteiligt ist (Hess *et al.*, 2004). *JUN* wird analog zu den Genen der oxidativen Stressantwort vermehrt nach Inkubation mit Ag NP induziert, während nach Inkubation mit Ag NW nur geringe, biologisch nicht relevante Effekte zu sehen sind. Eine Aktivierung von *JUN* deutet ebenfalls auf eine oxidative Stressantwort hin (Ma, 2010). Darüber hinaus wurde eine Expression des für das gleichnamige Protein codierenden Gens *MYC* beobachtet, welche zu einem durch DNA-Schädigung ausgelösten G2/M-Phasen-Arrest führt und dadurch die Einleitung der Apoptose verstärkt (Sheen *et al.*, 2003). Die Auslösung einer DNA-Schädigung durch beide Silber-basierten Materialien wird darüber hinaus durch die Induktion von *DDIT3* (*DNA damage inducible transcript 3*) deutlich, das an der DNA-Schadensantwort beteiligt ist für das jedoch ebenfalls eine Beteiligung an der Apoptose diskutiert wird (Zhang *et al.*, 2020; Guerrero-Castilla *et al.*, 2014).

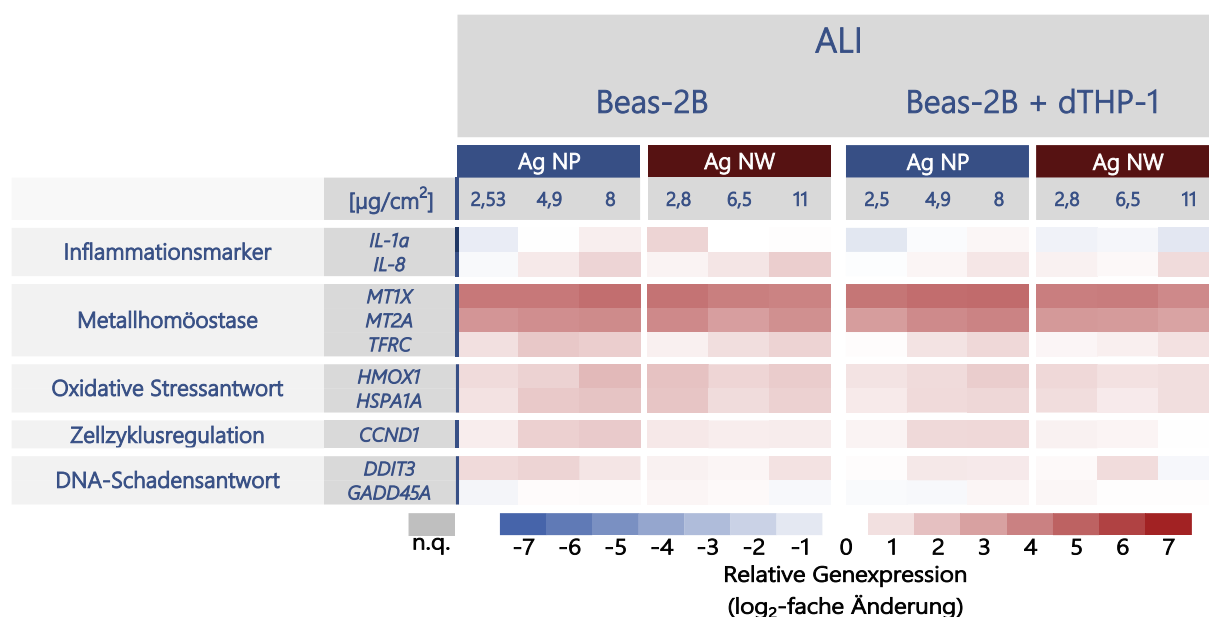


Abbildung 22: Änderung der Genexpressionsprofile einer Beas-2B-Monokultur und einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen mit differenzierten THP-1-Zellen (dTHP-1) nach ALI-Exposition mit Ag NP und Ag NW. Die Zellen wurden für 10 Minuten gegenüber eines NM-haltigem Aerosols exponiert und anschließend für 24 h inkubiert. Eine rote Färbung steht für eine Induktion, eine blaue Färbung für eine Repression der Gene. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. n.q.: nicht quantifizierbar.

Da die Veränderung der Genexpression für alle Gene innerhalb eines Genclusters etwa gleich war, werden im Folgenden die quantitativen Veränderungen der am stärksten veränderten Gene und Cluster diskutiert. Diese beinhalten *MT1X*, *HMOX1* und *IL-8* und sind nach submerser Inkubation und nach ALI-Exposition in Abbildung 23 dargestellt. Sowohl nach submerser Inkubation, als auch nach ALI-Exposition beider Silber-basierter Materialien ist eine 5-6-fache Induktion des Metallothionein-codierenden Gens *MT1X* zu sehen. Signifikante Unterschiede zwischen Mono- und Kokultur wurden dabei lediglich nach submerser Inkubation mit $22,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Ag NP festgestellt. Für *HMOX1* wurde nach Exposition gegenüber Ag NP eine tendenziell verringerte Induktion in der Kokultur beobachtet, wobei diese verringerte Induktion submers für die beiden geringeren Dosen und nach ALI-Exposition für die mittlere Dosis signifikant war. Im Vergleich dazu wurde nach Exposition gegenüber Ag NW kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Kultivierungssystemen festgestellt. Eine ähnliche Tendenz zeigte auch die Induktion von *IL-8*, wobei die abgeschwächte Induktion in der Kokultur nur für geringere Konzentrationen signifikant war.

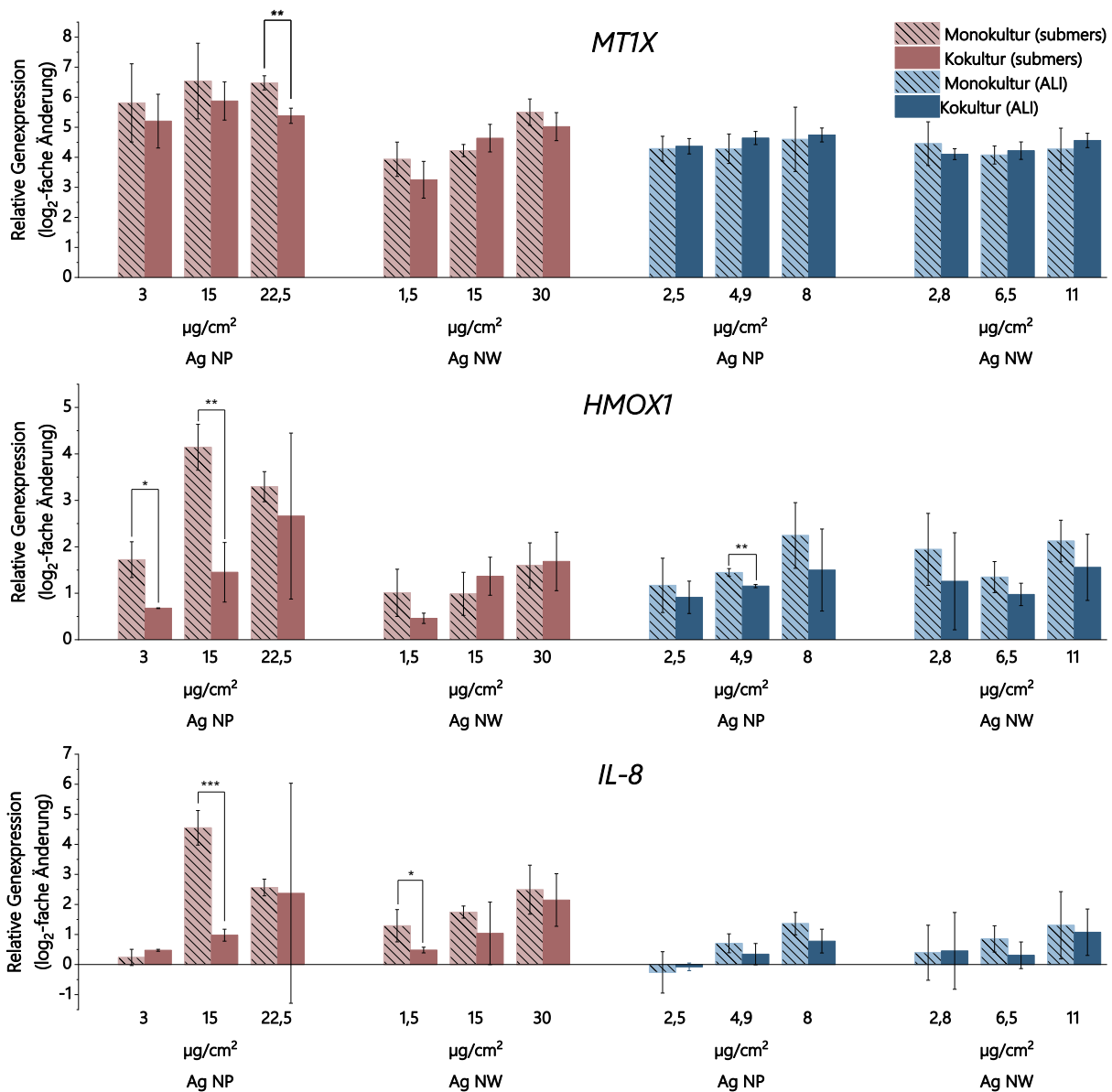


Abbildung 23: Induktion der Gene *MT1X*, *HMOX1* und *IL-8* durch Silber-basierte Nanomaterialien nach submerser Inkubation und nach Exposition über ein ALI. Beas-2B-Zellen wurden in Monokultur und in Kokultur mit differenzierten THP-1 Zellen entweder für 24 h submers mit dem entsprechenden Nanomaterial inkubiert oder für 10 Minuten an der Vitrocell® *Cloud* einem NM-haltigen Aerosol gegenüber exponiert und anschließend für 24 h am ALI inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen \pm SD. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Kultivierungsmodellen: * $\leq 0,05$, ** $\leq 0,01$, *** $\leq 0,001$ (ungepaarter *t*-Test).

Im Vergleich wurden zwischen submerser und ALI-Exposition sowohl mit Ag NP als auch mit Ag NW keine quantitativen Unterschiede in der Genexpression festgestellt. Nach submerser Inkubation mit Ag NW war im Vergleich mit Ag NP eine geringere Induktion aller Gene zu sehen, was mit der ebenfalls verringerten, in Kapitel 4.2.3.2 und Kapitel 4.2.3.1 beschriebenen Ionenfreisetzung aus Ag NW und der in verringerten Zytotoxizität einhergeht.

4.2.3.4 Genotoxizität

Teile der in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse wurden von Yvonne Köder im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit angefertigt.

Zur Ermittlung der Genotoxizität der Silber-basierten Materialien wurde die Detektion von DNA-Strangbrüchen mittels alkalischer Entwindung herangezogen. In Abbildung 24 sind die Ergebnisse sowohl nach submerser Inkubation als auch nach ALI-Exposition dargestellt. Bereits ab einer submersen Inkubationsdosis von $15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ konnte für Ag NP eine genotoxische Wirkung in der Monokultur beobachtet werden, während für die Kokultur noch keine Effekte beobachtet wurden. Der Unterschied zwischen beiden Kulturen wurde nach Inkubation mit $30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Ag NP noch verstärkt, wobei in der Monokultur mit 2,5 Strangbrüchen pro 10^6 Basenpaare mehr als doppelt so viele Strangbrüche induziert wurden wie bei gleicher Dosis in der Kokultur. In beiden Kultivierungssystemen kann die Induktion der DNA-Strangbrüche bei dieser Konzentration jedoch auch durch die hohe Zytotoxizität zustande kommen, die bereits in Kapitel 4.2.3.1 beschrieben ist.

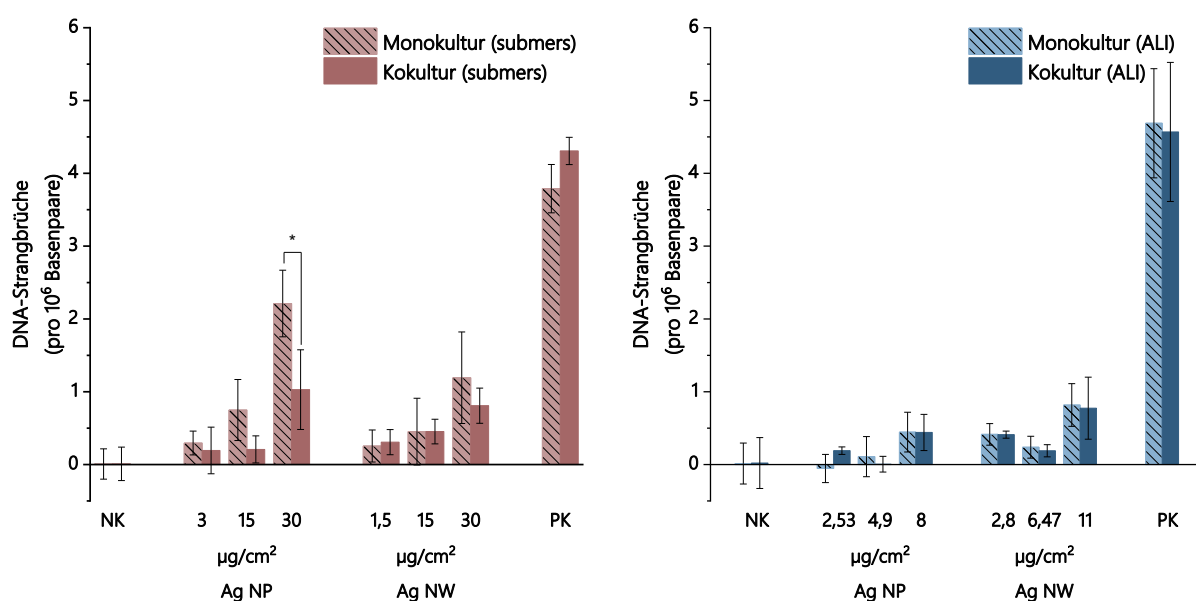


Abbildung 24: Induktion von DNA-Strangbrüchen durch Silber-basierte Nanomaterialien nach submerser Inkubation (rechts) und nach Exposition über ein ALI (links). Beas-2B-Zellen wurden in Monokultur und in Kokultur mit differenzierten THP-1-Zellen entweder für 24 h submers mit dem entsprechenden Nanomaterial inkubiert oder für 10 Minuten an der Vitrocell® Cloud einem NM-haltigen Aerosol gegenüber exponiert und anschließend für 24 h am ALI inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen \pm SD. NK: Negativkontrolle. PK: Positivkontrolle (100 μM Menadion). Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Kultivierungsmodellen: * $\leq 0,05$, (ungepaarter t -Test).

Die Inkubation mit Ag NW verursachte ebenfalls eine genotoxische Wirkung in beiden Kultivierungssystemen, jedoch ist diese erst bei der höchsten Konzentration von $30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ausgeprägt. Gleichzeitig wurde nach Inkubation mit Ag NW kein signifikanter Unterschied zwischen Mono- und Kokultur festgestellt. Auch nach ALI-Exposition mit beiden Materialien wurden genotoxische Effekte beobachtet, wobei die Effekte in Mono- und Kokultur ähnlich stark ausgeprägt waren. Die Dosis-Wirkungs-Beziehung war für Ag NP nach ALI-Exposition mit der submersen Inkubation vergleichbar. Äquivalent zur Zytotoxizität verursachten die über das ALI exponierten Ag NW bereits ab einer Dosis von $2,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ genotoxische Effekte, wobei Mono- und Kokultur vergleichbar waren.

Eine genotoxische Wirkung von Ag NP in Beas-2B-Zellen wurde submers bereits in mehreren Studien festgestellt, wobei diese teilweise schon bei geringeren Konzentrationen (García-Rodríguez *et al.*, 2019b; Gliga *et al.*, 2014), teilweise jedoch auch bei vergleichbarer Dosis verursacht wurde (Nymark *et al.*, 2013). Dabei wird die genotoxische Wirkung der Ag NP stets auf deren intrazelluläre Freisetzung von Silberionen und anschließende Induktion von oxidativem Stress zurückgeführt (Kim *et al.*, 2011; Nymark *et al.*, 2013; García-Rodríguez *et al.*, 2019b). Als weiterer Grund für eine genotoxische Wirkung wurde darüber hinaus zusätzlich das Vorhandensein von Ag NP im Zellkern und dadurch eine direkte Interaktion mit der DNA diskutiert (AshaRani *et al.*, 2009). Auch Li *et al.* (2017) untersuchten den genotoxischen Wirkmechanismus von Ag NP und stellten dabei fest, dass Ag NP zwar durch die Induktion von oxidativem Stress eine genotoxische Wirkung aufweisen können, jedoch auch zusätzliche Mechanismen der Genotoxizität auftreten, welche unabhängig von den freigesetzten Silberionen sind. Es wird beispielsweise die Bildung von ROS direkt durch Ag NP beschrieben (Foldbjerg *et al.*, 2011). Bislang gibt es nur zwei Studien, die die genotoxische Wirkung von Ag NW betrachten. Dabei wurden keine mutagenen Effekte von Ag NW im Ames-Test und in einem Chromosomenaberrations-Test beobachtet (Charehsaz *et al.*, 2017). Wang *et al.* stellten bei einer Inkubationskonzentration von $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) jedoch mehrkernige Zellen fest (Wang *et al.*, 2019).

4.3 NICKEL-BASIERTE NANOMATERIALIEN

Zur Untersuchung des toxikologischen Wirkprofils Nickel-basierter Nanomaterialien wurden Ni NP und Ni NW verwendet. Die Untersuchungen beider Materialien fand im Rahmen des Projekts nur submers statt.

4.3.1 Physikochemische Eigenschaften

Zunächst wurden beide Nickel-basierten Nanomaterialien physikochemisch charakterisiert. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Ni NP und Ni NW sind in Abbildung 25 zu sehen. In Tabelle 10 sind die wesentlichen Eigenschaften zusammengefasst.

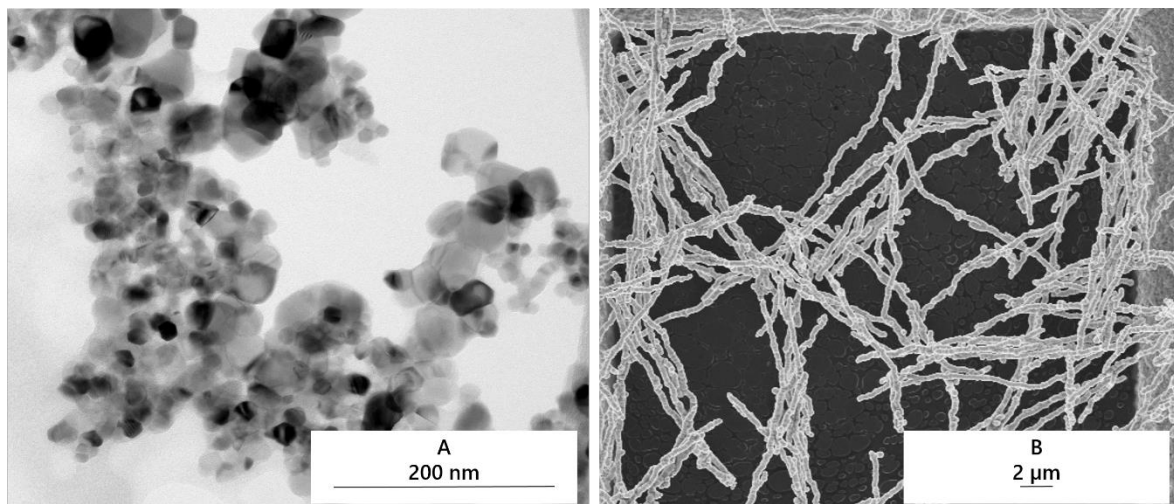


Abbildung 25: Exemplarische elektronenmikroskopische Aufnahmen der Nickelmaterialien. Die Materialien wurden nach Aufarbeitung nach dem NANOGENOTOX-Protokoll in einer Konzentration von 2,56 mg/mL auf ein TEM-Grid aufgetragen und elektronenmikroskopisch betrachtet. A: Ni NP; B: Ni NW;

Während Ni NP in elektronenmikroskopischen Aufnahmen einen Primärdurchmesser von $21,4 \pm 0,1$ nm aufwiesen, zeigten Aufnahmen über dynamische Lichtstreuung einen hydrodynamischen Durchmesser von $388,0 \pm 33,2$ nm, was auf eine starke Agglomeration der Partikel in Suspension hindeutet. Ein Polydispersitätsindex von $0,67 \pm 0,02$ spricht außerdem für eine polydisperse Suspension, was durch die Ausbildung unterschiedlich großer Partikelagglomerate aufgrund der ferromagnetischen Eigenschaften der Ni NP erklärt werden kann. Ni NW wiesen eine mittlere Länge von $9,97 \pm 0,29$ µm und eine Breite von 280 ± 6 nm auf, wodurch auch für diese Faserspezies die Kriterien einer WHO-Faser erfüllt sind.

Die ζ -Potentiale beider Materialien liegen in einem Bereich von ca. -15 mV und deuten damit auf eine instabile Suspension hin. Diese Tatsache konnte auch optisch durch ein schnelles Absedimentieren der Materialien beobachtet werden. Vor allem Ni NW zeigten außerdem magnetische Eigenschaften, was die Stabilität der Suspension weiter beeinflusste.

Tabelle 9: Physikochemische Eigenschaften Nickel-basierter Nanomaterialien. Die Daten wurden nach Aufarbeitung nach dem NANOGENOTOX-Protokoll erhoben.

Partikelspezies	Ni NP	Ni NW
Länge (μm)	-	9,97 \pm 0,29
Breite (nm)	-	280 \pm 6
d_p (nm)	21,4 \pm 0,1	-
d_H (nm)	388,0 \pm 33,2	-
PDI	0,67 \pm 0,02	-
ζ -Potential (mV)	-15,7 \pm 0,2	-14,5
Reinheit (% wt)	98,7 \pm 0,86	99,1

4.3.2 Untersuchungen zur Löslichkeit

Die Löslichkeit der Nickel-basierten Nanomaterialien wurde in alveolärer und lysosomaler Modellflüssigkeit sowie in den verwendeten Zellkulturmedien untersucht. Die Löslichkeit nach 24 h, 48 h und nach 7 Tagen ist in Abbildung 26 dargestellt. Nach 7 Tagen wurde für beide untersuchten Materialien eine maximale Löslichkeit von 5 % in artifizieller alveolärer Flüssigkeit festgestellt, welche ein Maß für eine extrazelluläre Löslichkeit in der Lungenflüssigkeit darstellt. Damit ist ein Beitrag von extrazellulär in der Lungenflüssigkeit gelösten Ionen zur Toxizität der Materialien ausgeschlossen. Ebenso wurde eine geringe Löslichkeit von beiden Nickel-basierten Nanomaterialien in den verwendeten Zellkulturmedien festgestellt, sodass auch *in vitro* ein Beitrag bereits im Medium gelöster Ionen vernachlässigbar ist. Um den Ionenbeitrag auf Basis dieser Löslichkeit dennoch zu überprüfen, wurde für die Untersuchung der Genotoxizität und der Genexpression eine Ionenkontrolle mitgeführt.

In artifizieller lysosomaler Flüssigkeit (ALF) zeigten beide Materialien dagegen eine zeitabhängige Freisetzung von Nickelionen, welche für Ni NP bereits nach 24 h bei 45 % lag und auf bis zu 55 % nach 7 Tagen anstieg. Eine Freisetzung von Nickelionen in ALF aus Ni NP wurde bereits in diversen Studien untersucht. Dabei wurde nach 24 h eine Freisetzung von 80-100 % beobachtet (Latvala *et al.*, 2016; Mazinianian *et al.*, 2013). Jedoch war hierbei der hydrodynamische

Durchmesser mit einem Median von 140 nm nur etwa halb so groß wie der in der vorliegenden Arbeit gemessene hydrodynamische Durchmesser von 388 nm. Ein geringerer hydrodynamischer Durchmesser deutet auf eine geringere Agglomerationsrate der Partikel hin, wodurch die höhere Auflösungsrate erklärt werden könnte (Latvala *et al.*, 2016).

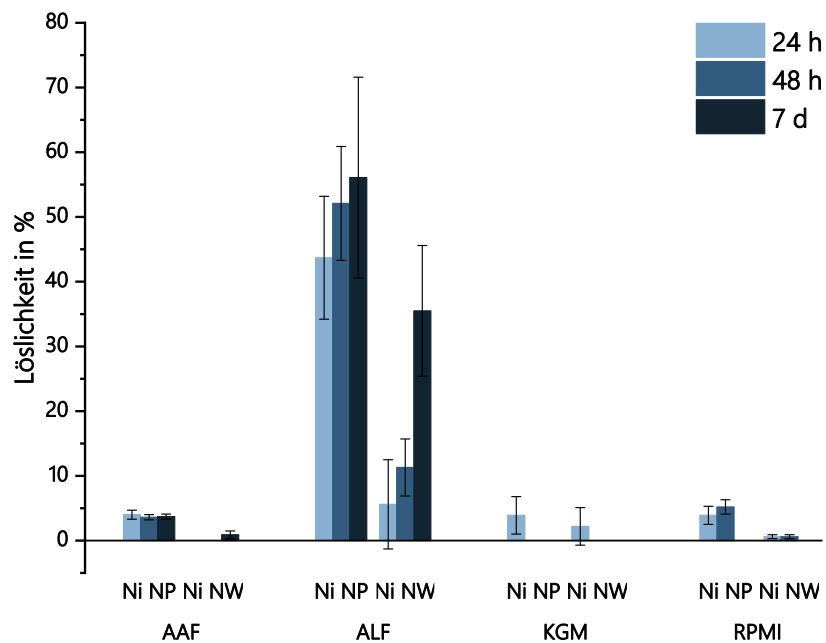


Abbildung 26: Zeitabhängige Löslichkeit Nickel-basierter Materialien in verschiedenen physiologischen und Zellkultur-relevanten Medien. Die Materialien wurden in einer Konzentration von 100 µg/mL für den jeweiligen Zeitraum bei 37 °C inkubiert. Nach Abtrennung der nicht-gelösten Rückstände durch Zentrifugation wurde der Ionengehalt im Überstand mittels GF-AAS bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD aus drei unabhängigen Versuchen. AAF: artifizielle alveoläre Flüssigkeit (pH 7,4); ALF: artifizielle lysosomale Flüssigkeit (pH 4,5); KGM: *keratinocyte growth medium*; RPMI: *Roswell Park Memorial Institute Medium*;

Die Freisetzung von Nickelionen aus Ni NW in ALF lag nach 24 h hingegen nur bei 5 %, stieg nach 7 Tagen jedoch auf 35 % an, was für eine langsame Auflösung der Ni NW spricht. Perez *et al.* untersuchten ebenfalls die Löslichkeit von Ni NW in einer physiologischen Modellflüssigkeit bei verschiedenen pH-Werten. Bei pH 4,8 zeigten die Ni NW eine Auflösungsrate von 3 % nach 24 h, die anschließend eine zeitabhängige Steigerung erfuhr. Gleiche Effekte wurden auch für die physiologische Modellflüssigkeit mit pH 7,4 beobachtet, wobei die Löslichkeit nach 24 h nur 0,5 % betrug (Perez *et al.*, 2016). Der pH-Wert scheint also einen Einfluss auf die Löslichkeit von Ni NW zu haben, was auch in dieser Arbeit beobachtet wurde.

4.3.3 Toxikologisches Wirkprofil

4.3.3.1 Zytotoxizität

Die Zytotoxizität von Ni NP und Ni NW wurde nach 24 h über die Abnahme des ATP-Gehalts bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 dargestellt. Beide Materialien verursachten eine dosisabhängige Abnahme des ATP-Gehalts sowohl in Mono- als auch in Kokultur auf 70 % bzw. 80 % im Falle der Ni NP respektive der Ni NW bei der höchsten Dosis. Sowohl im Vergleich der beiden Materialmorphologien, als auch zwischen Mono- und Kokultur wurde kein Unterschied in der Viabilität festgestellt. Die Zytotoxizität von Ni NP wurde bereits in diversen Zelllinien untersucht. Zytotoxische Effekte wurden dabei in A549-Zellen bereits bei geringeren Dosen von 5-7,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ beobachtet (Magaye *et al.*, 2016; Ahamed, 2011). Diese Tatsache könnte darin begründet sein, dass Ni NP effektiver durch A549-Zellen aufgenommen und freigesetzt werden im Vergleich zu Beas-2B-Zellen (Wall *et al.*, 2021).

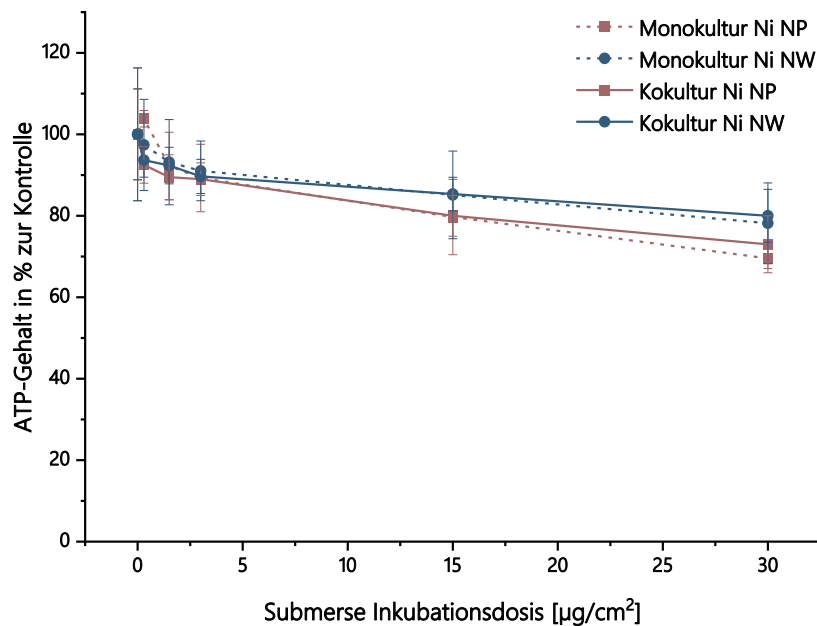


Abbildung 27: Einfluss submers inkubierter, Nickel-basierter Nanomaterialien auf den ATP-Gehalt in Beas-2B-Zellen und einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen und differenzierten Monozyten mit makrophagenähnlichen Eigenschaften (dTHP-1). Beas-2B-Zellen wurden in Monokultur und in Kokultur mit differenzierten THP-1-Zellen für 24 Stunden mit dem entsprechenden Nanomaterial submers inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen \pm SD.

Weitere Studien konnten dagegen keine oder lediglich eine geringe zytotoxische Wirkung von Ni NP nach 24 h in pulmonalen Zelllinien und Makrophagen nachweisen (Åkerlund *et al.*, 2019;

Latvala *et al.*, 2016) und auch für NiO NP wurde nur eine geringe Zytotoxizität in Beas-2B-Zellen beobachtet (Capasso *et al.*, 2014). Generell ist für Nickel-basierte Nanomaterialien eine zeitliche Abhängigkeit der Zytotoxizität zu sehen. So wurde von Latvala *et al.* eine signifikante zytotoxische Wirkung von Ni NP in A549-Zellen nach 48 h festgestellt (Latvala *et al.*, 2016). Auch für Ni NW wurde eine zytotoxische Wirkung in verschiedenen Zelllinien wie Colon-Karzinom-Zellen und humanen Fibroblasten erst nach einem längeren Inkubationszeitraum von mindestens 48 h festgestellt (Perez *et al.*, 2016; Felix *et al.*, 2016).

4.3.3.2 Zelluläre Verfügbarkeit

Nach Inkubation mit beiden Nickel-basierten Nanomaterialien wurde die intrazelluläre Ionenfreisetzung in den Monokulturen der Beas-2B- und dTHP-1-Zellen als Maß für die zelluläre Verfügbarkeit der Materialien gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 dargestellt. Es ist ersichtlich, dass Ni NP in beiden untersuchten Zellkulturen eine dosisabhängige Erhöhung des intrazellulären Nickelionen-Gehalts verursachten. In Beas-2B-Zellen ist bei einer Dosis von $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ eine Erhöhung der intrazellulären Nickelionen-Konzentration auf $336 \mu\text{M}$ zu sehen. Dieser Gehalt nimmt bei einer Dosis von $15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ bis zu einem Wert von $1217 \mu\text{M}$ weiter zu. Für dTHP-1-Zellen ist im Vergleich zu den Beas-2B-Zellen eine höhere Nickelionen-Freisetzung nach Inkubation mit Ni NP zu sehen. Bereits bei einer Dosis $0,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ betrug die Konzentration an intrazellulär freigesetzten Nickelionen $255 \mu\text{M}$, während bei einer Dosis von $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ schon ein Gehalt von $720 \mu\text{M}$ ermittelt wurde. Damit werden aus Ni NP bei der geringsten und der mittleren Dosis mehr als doppelt so viele Nickelionen in dTHP-1-Zellen freigesetzt wie in Beas-2B-Zellen. Die Inkubation mit $15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ verursachte schließlich eine mit den Beas-2B-Zellen vergleichbare Nickelionen-Konzentration von $1280 \mu\text{M}$. Bezogen auf die absolute Aufnahme je Zelle ist allerdings auch hier eine deutlich höhere Aufnahme in dTHP-1-Zellen zu sehen (siehe Anhang 7.2.5). Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Aufnahme der dTHP-1-Zellen ist deren erhöhte Phagozytoseaktivität. Es ist außerdem möglich, dass eine längere Inkubationszeit der Beas-2B-Zellen zu einer erhöhten Internalisierung und Freisetzung von Nickelionen führen könnte. Diese Beobachtung wurde bereits von Pietruska *et al.* gemacht, die eine zeitabhängige Erhöhung der intrazellulären Ionenfreisetzung aus Ni NP in der humanen primären Lungenepithelzelllinie H460 feststellten. Die Ionenfreisetzung wurde hierbei über den Fluoreszenzfarbstoff Newport Green untersucht, der in der Gegenwart von Nickelionen fluoresziert. 48 h nach Inkubation mit Ni NP beobachteten die Autoren ein intrazelluläres

Vorhandensein von Nickelionen (Pietruska *et al.*, 2011). Eine zeitabhängige Aufnahme von Ni NP in Beas-2B-Zellen wurde auch von Di Bucchianico *et al.* beobachtet: Während nach 24 h 20 $\mu\text{g}/10^6$ Zellen aufgenommen wurden, stieg dieser Wert nach 48 h auf 55 $\mu\text{g}/10^6$ Zellen.

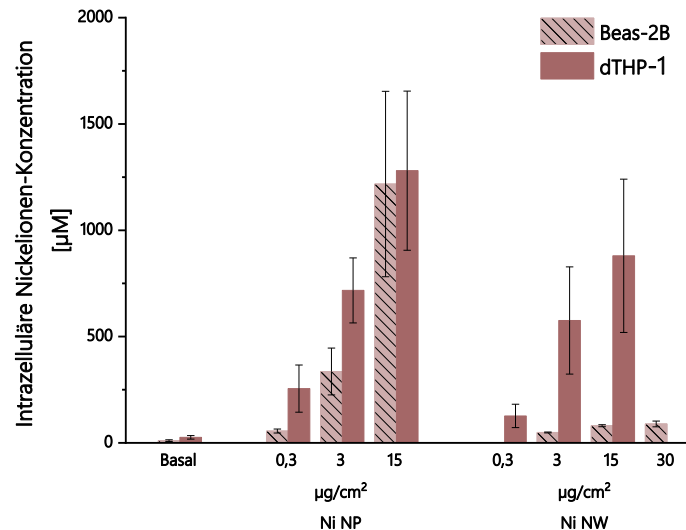


Abbildung 28: Intrazellulärer Nickelionen-Gehalt nach submerser Inkubation mit Nickel-basierten Nanomaterialien in Beas-2B-Zellen und differenzierten THP-1-Zellen (dTHP-1). Die Zellen wurden für 24 h mit dem entsprechenden Nanomaterial inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Zellmembran abgetrennt und die Ionenkonzentration im Überstand mittels GF-AAS gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Die Inkubation mit Ni NW verursachte eine dosisabhängige Steigerung der intrazellulären Nickelionen-Konzentration in dTHP-1-Zellen. So wurde bereits bei einer Dosis von 0,3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ die intrazelluläre Ionenkonzentration auf einen Wert von 126 μM erhöht. Bei einer Inkubationsdosis von 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ist eine intrazelluläre Ionenkonzentration von 576 μM zu erkennen. Im Gegensatz dazu wird in Beas-2B-Zellen selbst bei der höchsten Dosis von 30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ die Nickelionen-Konzentration nur auf einen maximalen Wert von 89 μM erhöht. Ni NW scheinen also effektiv durch dTHP-1-Zellen aufgenommen zu werden, während eine Aufnahme in Beas-2B-Zellen nur geringfügig erfolgt. Dies ist wiederum durch die unterschiedliche Phagozytoseaktivität der beiden Zelllinien zu erklären, wobei die Zelllinie Beas-2B als Epithelzelllinie nur eine geringe Phagozytoseaktivität besitzt. Perez *et al.* untersuchten den Aufnahmeweg von Ni NW in HCT 116-Zellen und stellten fest, dass Ni NW ausschließlich über Phagozytose in die Zellen aufgenommen werden (Perez *et al.*, 2016).

Die intrazelluläre Ionenverteilung für beide Nickel-basierten Materialien wurde in Beas-2B- und dTHP-1-Zellen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 dargestellt. Nach Inkubation mit

Ni NP wurden vergleichbare Konzentrationen an freigesetzten Nickelionen in den löslichen Fraktionen des Zellkerns und des Zytoplasmas beobachtet. Daraus ergibt sich, dass nur ein geringer Anteil der intrazellulär freigesetzten Nickelionen in den Zellkern gelangt. Diese Beobachtung wurde auch für NiO Mikropartikel gemacht, wobei eine geringere Konzentration von freigesetzten Nickelionen im Zellkern im Vergleich zum Zytoplasma zu sehen war (Schwerdtle & Hartwig, 2006). Laut einer Studie von Edwards *et al.* wurde darüber hinaus nach Inkubation mit Nickelchlorid weniger als die Hälfte der in Makrophagen gefundenen Nickelionen im Zellkern lokalisiert (Edwards *et al.*, 1998). Nach Inkubation mit Ni NW wurde ebenfalls eine vergleichbare Freisetzung in Zellkern und Zytoplasma beobachtet, diese ist jedoch im Vergleich zu der Freisetzung durch Ni NP deutlich geringer und spiegelt die verringerte Freisetzung in der gesamten Zelle wider (Abbildung 28).

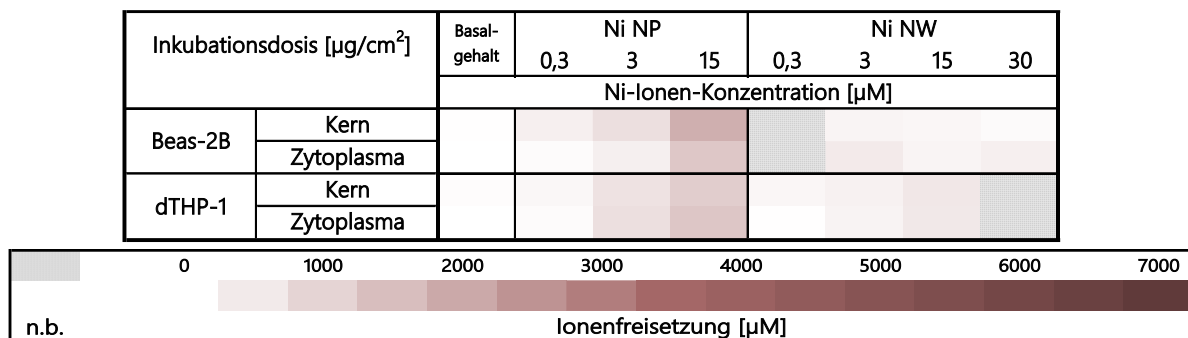


Abbildung 29: Intrazelluläre Ionenverteilung in Zytoplasma und Zellkern nach submerser Inkubation mit Nickel-basierten Nanomaterialien. Die Zellen wurden für 24 h mit dem entsprechenden Material inkubiert und anschließend einem Fraktionierungsprotokoll unterzogen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

4.3.3.3 Genexpressionsanalysen

Die Genexpression nach Inkubation mit Nickel-basierten Nanomaterialien wurde submers in Beas-2B-Zellen und in einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen mit differenzierten THP-1-Zellen durchgeführt. In Abbildung 30 sind die \log_2 -fachen Änderungen im Genexpressionsmuster als *heatmap* zusammengefasst. Die Inkubation mit $34 \mu\text{M}$ NiCl_2 ergab keine Änderung im Genexpressionsmuster, wonach ein Beitrag extrazellulär im Medium gelöster Nickelionen vernachlässigbar ist. Dagegen verursachten Nickel-basierte Nanomaterialien eine Induktion von Genen in Clustern der Inflammation, der Fibrose, der Metallhomöostase, der oxidativen Stressantwort, der Zellzyklusregulation und der DNA-Schadensantwort. Im Folgenden werden die

Unterschiede in der Genexpression hinsichtlich Mono- und Kokultur sowie der Materialmorphologie diskutiert.

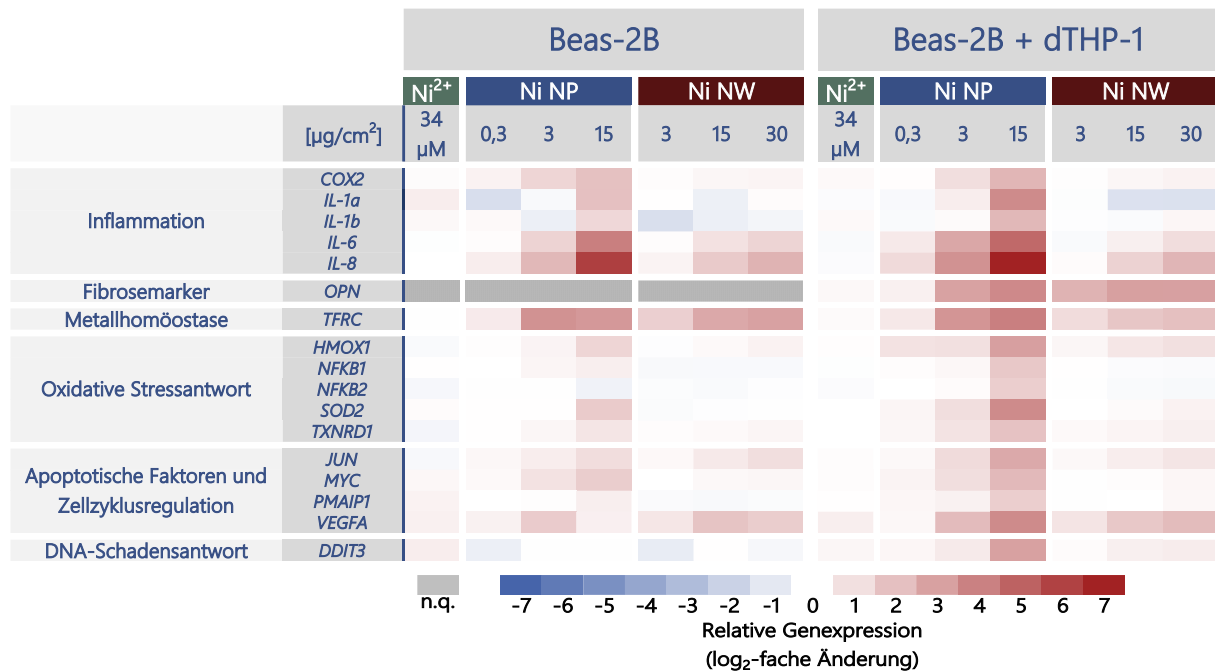


Abbildung 30: Änderung der Genexpressionsprofile einer Beas-2B-Monokultur und einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen mit differenzierten THP-1-Zellen (dTHP-1) nach submerser Inkubation mit Nickel-basierten Nanomaterialien. Die Zellen wurden für 24 h mit dem entsprechenden Nanomaterial submers inkubiert. Eine rote Färbung steht für eine Induktion, eine blaue Färbung für eine Repression der Gene. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. n.q.: nicht quantifizierbar.

Die inflammatorischen Gene, die nach Inkubation mit Nickel-basierten Materialien die auffälligste Veränderung erfuhren, sind in Abbildung 31 dargestellt. Nach Inkubation mit Ni NP wurden vor allem die für die gleichnamigen proinflammatorischen Zytokine codierenden Gene *IL-6* und *IL-8* um einen log₂-fachen Wert von 4 bzw. 6 in der Monokultur erhöht. Dieser Effekt trat gleichermaßen auch in der mit Ni NP inkubierten Kokultur auf. Außerdem induzierten Ni NP die verstärkte Expression der inflammatorischen Gene *IL-1a* und *IL-1b*, die für die gleichnamigen Interleukine codieren und dem Gen der Cyclooxygenase 2 *COX2*. Nach Inkubation mit Ni NW wurde dagegen lediglich das Gen *IL-8* unabhängig von der verwendeten Zellkultur auf einen log₂-fachen Wert von ca. 2,4 induziert, während andere inflammatorische Gene nur eine biologisch nicht relevante Induktion erfuhren. Sowohl nach Inkubation mit Ni NP als auch mit Ni NW ist außerdem eine Induktion des proinflammatorischen und profibrotischen Gens *OPN* zu sehen, das für Osteopontin codiert. Osteopontin kann als proinflammatorisches Zytokin fungieren, das unter anderem durch *IL-1β* und *IL-6* induziert werden kann (Lund *et al.*, 2009). Die

Induktion von *OPN* deutet also auch auf eine proinflammatorische Antwort durch beide Nickel-basierten Materialien hin.

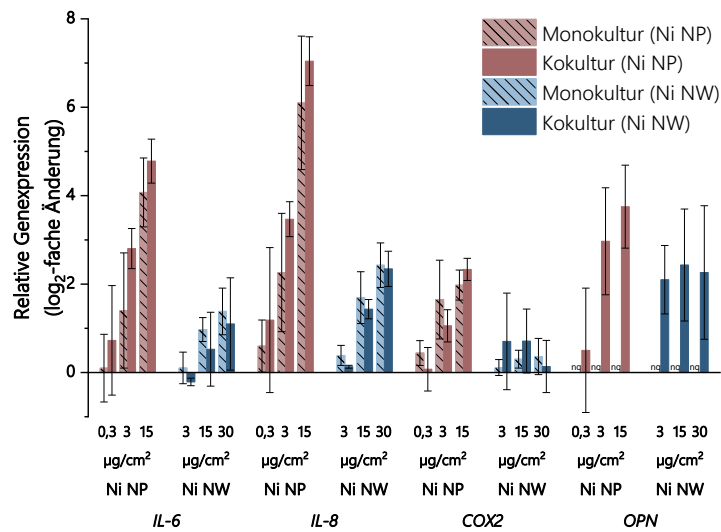


Abbildung 31: Induktion inflammatorischer Gene nach submerser Inkubation mit Nickel-basierten Materialien. Beas-2B-Zellen wurden in Monokultur und in Kokultur mit differenzierten THP-1 Zellen für 24 h submers inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen \pm SD. Signifikante Unterschiede zwischen Mono- und Kokultur wurden mittels ungepaartem *t*-Test ausgeschlossen. n.q. : nicht quantifizierbar.

Auf funktioneller Ebene konnte eine erhöhte IL-1 α - und IL-1 β -Ausschüttung nach Inkubation mit Ni NP in dTHP-1-Zellen bereits von Åkerlund *et al.* beobachtet werden, während eine Induktion von IL-6 und IL-8 in dieser Zelllinie ausblieb (Åkerlund *et al.*, 2019). Im Falle von NiO NP gibt es dagegen mehrere Studien, die eine Induktion von IL-6 und IL-8 in Beas-2B-Zellen belegen (Capasso *et al.*, 2014; Veranth *et al.*, 2007). Eine Induktion inflammatorischer Mediatoren wird unter anderem mit der Aktivierung des MAPK (*mitogen activated protein kinase*)-NF- κ B-(*nuclear factor κ B*)-Signalwegs in Verbindung gebracht (Ding *et al.*, 2006; Ke *et al.*, 2008). NF- κ B spielt dabei als Transkriptionsfaktor eine wichtige Rolle in der inflammatorischen Antwort und der Apoptose (Denkhaus & Salnikow, 2002). Die Induktion von *IL-1b*, *IL-1a* und *COX2* deutet darüber hinaus auf eine zusätzliche Beteiligung des NLRP3-Inflammasoms hin. Eine solche Induktion durch Nickel wurde sowohl für Makrophagen als auch für Beas-2B-Zellen bereits gezeigt (Guo *et al.*, 2019; Xin *et al.*, 2019).

Cai *et al.* stellten nach Inkubation von Beas-2B-Zellen mit NiCl₂ oder NiS eine Relation zwischen der Induktion von oxidativem Stress und der Expression von *COX2* her und schlossen daraus auf eine Interaktion der Signalwege von NF- κ B und NFAT (Cai *et al.*, 2011). Eine Induktion

von COX2 wurde darüber hinaus bereits in Beas-2B-Zellen für lösliches NiCl₂ und für unlösliches NiS beobachtet. Die Autoren führten diese Induktion auf eine Unterdrückung der Apoptose in Beas-2B-Zellen zurück (Ding *et al.*, 2006).

Die detaillierten Ergebnisse im Gencluster der oxidativen Stressantwort und der DNA-Schadensantwort nach Inkubation mit Ni NP und Ni NW sind in Abbildung 32 dargestellt. Hier zeigt sich insbesondere eine erhöhte Genexpression in der Kokultur, wobei nach Inkubation mit Ni NP die Gene *NFKB1*, *NFKB2* und *SOD2* um einen log₂-Faktor von 1,8-, 1,6- und 3,7 induziert wurden. Weitere induzierte Gene im Cluster der oxidativen Stressantwort stellen Gene für die Hämoxygenase 1 (*HMOX1*; 3-fach) und die Thioredoxinreduktase 1 (*TXNRD1*; 1,9-fach) dar. Nach Inkubation der Monokultur mit Ni NP wurde dagegen lediglich das Gen *HMOX1* in biologisch relevantem Maß induziert. Die durch die Kokultur verstärkte oxidative Stressantwort kann durch den „oxidativen *Burst*“ erklärt werden, wobei eine Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch Makrophagen gemeint ist (Babior, 2000). Dieser Effekt wurde für zweiwertiges Nickel bereits in Neutrophilen nachgewiesen (Freitas *et al.*, 2010). Die Abgabe von ROS durch Makrophagen in das umgebende Medium nach Stimulation mit Ni NP wurde bereits beschrieben. Die Autoren zeigten hierbei einen sekundären genotoxischen Effekt in Zellen des humanen Bronchialepithels nach Inkubation mit dem konditionierten Medium der Makrophagen (Åkerlund *et al.*, 2019). Eine mögliche sekundäre Genotoxizität, die durch Makrophagen verursacht wird, wird auch durch die vermehrte Induktion (log₂-Faktor 3) der Gene *DDIT3* und *GADD45A* deutlich, welche ausschließlich in der Kokultur exprimiert wurden und Marker der DNA-Schadensantwort darstellen. Weiterhin wurden nach Inkubation mit Ni NP vor allem in der Kokultur die Gene von Zellzyklusregulatoren beeinflusst. Hierbei sind vor allem die proapoptotischen Gene *JUN*, *MYC*, *PMAIP1* und *VEGFA* zu nennen. *PMAIP1* codiert für das proapoptotische Protein Noxa und kann durch die Interaktion mit p53 den Zellzyklusarrest auslösen und die Apoptose einleiten (Oda *et al.*, 2000). Die Induktion der Gene *JUN* und *MYC* in der Kokultur deuten darüber hinaus auf eine Aktivität von AP-1 hin, die ebenfalls über den „oxidativen *Burst*“ durch Makrophagen und damit der endogenen Produktion von ROS zustande kommt (Iles *et al.*, 2002). Nach Inkubation mit Ni NP ist weiterhin vor allem in der Kokultur die Induktion des Gens *VEGFA* auffällig, das für den *vascular endothelial growth factor α* (VEGF-A) codiert. VEGF-A reguliert den MAPK/ERK-Signalweg (Wu *et al.*, 2000), darüber hinaus wurde gezeigt, dass VEGF-A den NF-κB-Signalweg aktiviert (Kim *et al.*, 2001).

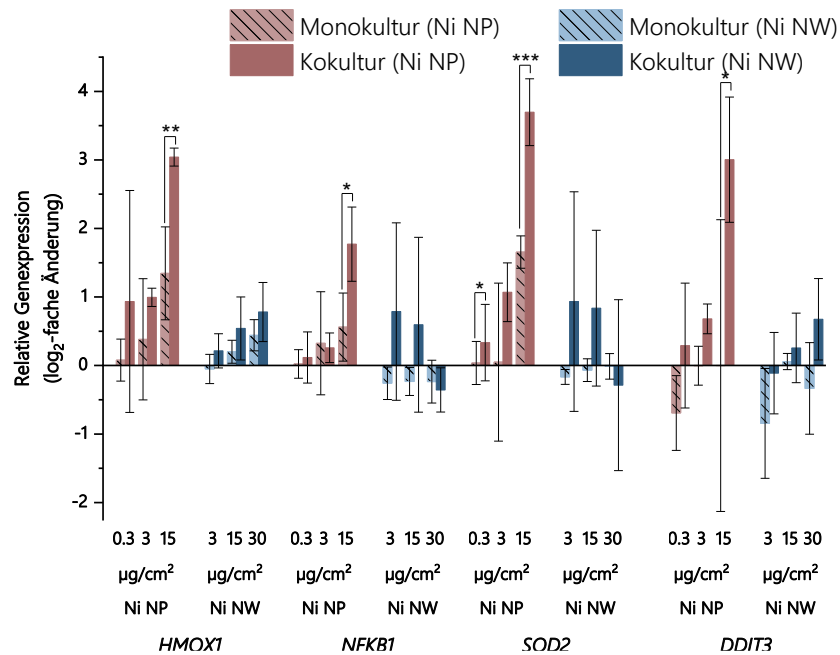


Abbildung 32: Induktion von Genen der oxidativen Stressantwort und der DNA-Schadensantwort nach submerser Inkubation mit Ni NP. Beas-2B-Zellen wurden in Monokultur und in Kokultur mit differenzierten THP-1 Zellen für 24 h submers inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen ± SD. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Kultivierungsmodellen: * ≤ 0,05, ** ≤ 0,01, *** ≤ 0,001 (ungepaarter *t*-Test).

In den Clustern der oxidativen Stressantwort und der DNA-Schadensantwort wurden keine Veränderungen im Genexpressionsmuster durch Ni NW verursacht. Dies könnte auf die langsame Auflösungsrate der Ni NW zurückgeführt werden (siehe Kapitel 4.3.2 und 4.3.3.2), wodurch nach 24 h nur eine sehr geringe Menge an freigesetzten Nickelionen aus Ni NW in Beas-2B-Zellen zu beobachten war. Es ist möglich, dass Effekte nach einer längeren Inkubationszeit mit Ni NW auftreten könnten. Eine Induktion von ROS wurde für Ni NW zwar bereits nach 24 h in HeLa-Zellen beobachtet, jedoch betrug die mittlere Länge der Ni NW in dieser Studie nur 1 µm, wodurch eine schnellere Internalisations- und Auflösungsrate vermutet werden kann (Ma *et al.*, 2014). Trotz der geringen Effekte durch Ni NW auf die oxidative Stressantwort, ist tendenziell eine höhere Genexpression in der Kokultur zu sehen. Dies gibt Hinweise auf eine durch Makrophagen induzierte Stressreaktion, die beispielsweise Folge einer „frustrierten Phagozytose“ sein kann.

4.3.3.4 Genotoxizität

Die genotoxische Wirkung der Nickel-basierten Materialien wurde submers über die Induktion von DNA-Strangbrüchen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 dargestellt. Sowohl für

Ni NP als auch für Ni NW wurde nach 24-stündiger Inkubation keine Induktion von DNA-Strangbrüchen in Mono- und Kokultur beobachtet.

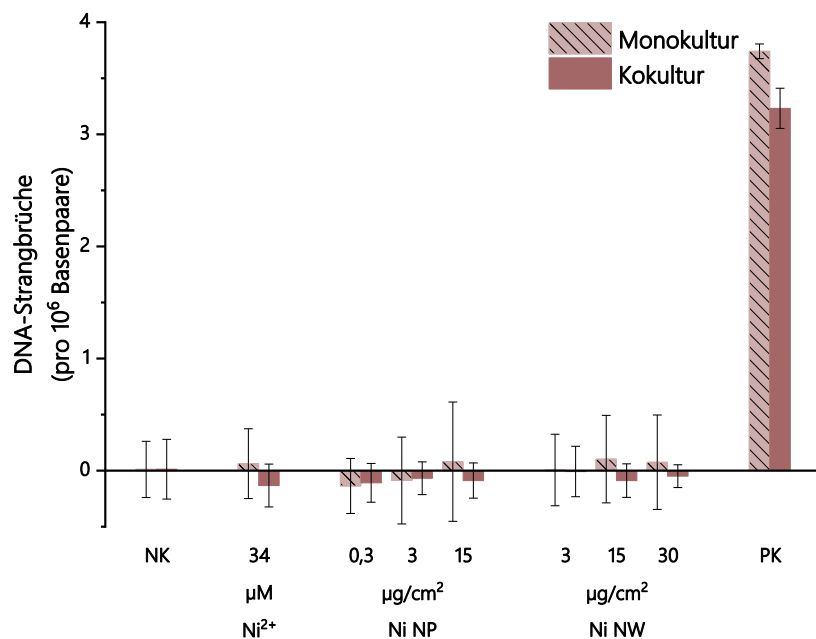


Abbildung 33: Induktion von DNA-Strangbrüchen durch Nickel-basierte Nanomaterialien nach submerser Inkubation. Beas-2B-Zellen wurden in Monokultur und in Kokultur mit differenzierten THP-1 Zellen für 24 h submers mit dem entsprechenden Nanomaterial inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen \pm SD. NK: Negativkontrolle. PK: Positivkontrolle (100 μ M Menadion).

Während für Ni NW noch keine publizierten Daten zur Genotoxizität vorliegen, gibt es im Falle der Ni NP zahlreiche Studien die eine genotoxische Wirkung zeigen. Magaye *et al.* wiesen nach 24-stündiger Inkubation eine genotoxische Wirkung in A549-Zellen im *Comet Assay* nach (Magaye *et al.*, 2016). Di Bucchianico *et al.* stellten dagegen nach 48-stündiger Inkubation nur eine geringe Genotoxizität in Beas-2B-Zellen in Form einer Induktion von DNA-Strangbrüchen fest. Dagegen zeigten die selben Autoren nach 48 h jedoch eine signifikante Induktion von Mikrokernen, nukleoplasmatischen Brücken und Chromatid-artigen Aberrationen, was eine aneugene Wirkung von Ni NP vermuten lässt (Di Bucchianico *et al.*, 2018). Der ausbleibende Effekt in der vorliegenden Arbeit und die von Di Bucchianico *et al.* beobachteten Effekte nach 48 h deuten darüber hinaus auf eine zeitabhängige Genotoxizität der Ni NP hin. Die Induktion von DNA-Strangbrüchen wurde in Beas-2B-Zellen auch nach einer 6-wöchigen *low dose* Inkubation beobachtet (Gliga *et al.*, 2020). Ein viel diskutierter genotoxischer Mechanismus von Ni NP ist außerdem die Induktion oxidativer DNA-Schäden. Åkerlund *et al.* beobachteten beispielsweise bereits nach dreistündiger Inkubation mit Ni NP ab einer Dosis von 25 μ g/mL (entspricht

7,5 µg/cm²) eine Induktion von oxidativen DNA-Schäden in Zellen des humanen Bronchialepithels (Åkerlund *et al.*, 2018). Diese sogenannte sekundäre Genotoxizität kommt vor allem über eine Entzündungsantwort der Zellen und einen „oxidativen *Burst*“ durch Makrophagen zustande (Åkerlund *et al.*, 2019).

4.4 TITAN(IV)-DIOXID NANOPARTIKEL, CERIUM(IV)-DIOXID NANOPARTIKEL UND CARBON NANOTUBES (CNT)

Zur Untersuchung von Materialien, für die keine relevante Löslichkeit bekannt ist, wurden TiO₂ NP und CeO₂ NP als partikuläre Verbindungen verwendet. Zusätzlich wurde eine Faserkontrolle bestehend aus unlöslichen *carbon nanotubes* (CNT) mitgeführt.

Die Untersuchung der physikochemischen Eigenschaften und der Löslichkeit erfolgten für die beiden Metall-basierten partikulären Verbindungen TiO₂ NP und CeO₂ NP. Für die Faserkontrolle CNT wurden keine Charakterisierungsstudien vorgenommen, da dieses Material lediglich als Faserkontrolle diente in der Literatur bereits umfassend charakterisiert ist (Rasmussen *et al.*, 2014).

4.4.1.1 Physikochemische Eigenschaften

Zur Vermessung der TiO₂ NP und CeO₂ NP wurden zunächst elektronenmikroskopische Aufnahmen gemacht. Exemplarische Aufnahmen hierzu sind in Abbildung 34 dargestellt. Die Ergebnisse der physikochemischen Untersuchungen sind weiterhin in Tabelle 10 zusammengefasst.

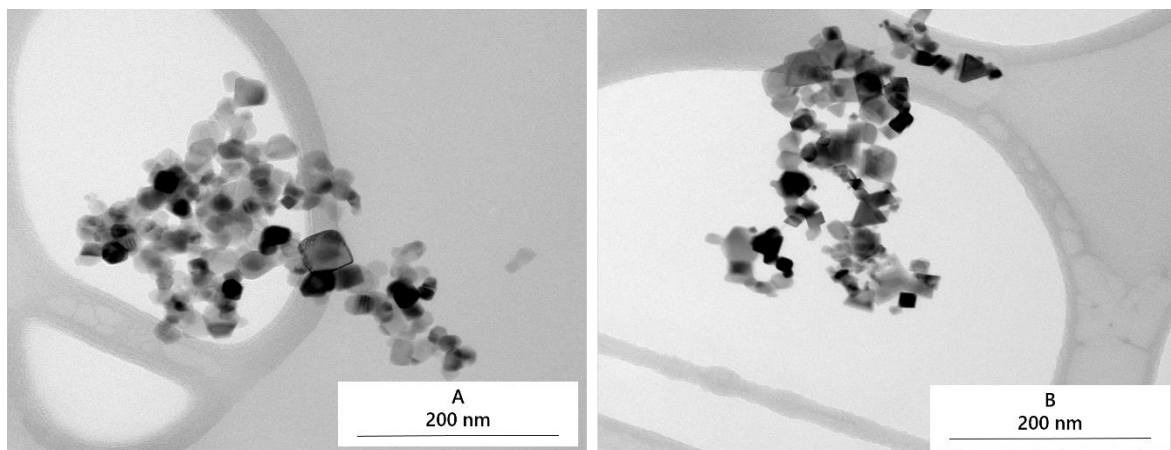


Abbildung 34: Exemplarische elektronenmikroskopische Aufnahmen von TiO₂ NP (A) und CeO₂ NP (B). Die Materialien wurden nach Aufarbeitung nach dem NANOGENOTOX-Protokoll in einer Konzentration von 2,56 mg/mL auf ein TEM-Grid aufgetragen und elektronenmikroskopisch betrachtet.

Beide Materialien wiesen Primärdurchmesser in ähnlicher Größenordnung von 20-25 nm auf, während sich die hydrodynamischen Durchmesser der Materialien zwischen 160 und 190 nm bewegten. Die gemessenen Polydispersitätsindizes von 0,14 bzw. 0,2 für TiO₂ NP bzw. für

CeO₂ NP deuten auf monodisperse Suspensionen hin. Das Zetapotential beider Materialien lag bei ca. -15 mV und ist mit Literaturdaten von TiO₂ NP und CeO₂ NP mit ähnlicher Partikelgröße vergleichbar (Xia *et al.*, 2008).

Tabelle 10: Physikochemische Eigenschaften von TiO₂ NP, CeO₂ NP und carbon nanotubes (CNT). Die Daten wurden nach Aufarbeitung nach dem NANOGENOTOX-Protokoll erhoben. * Daten wurden aus JRC-Bericht entnommen (Rasmussen *et al.*, 2014).

Partikelspezies	TiO ₂ NP	CeO ₂ NP	CNT*
Länge (µm)	-	-	4,048 ± 2,371
Breite (nm)	-	-	67 ± 24
d _P (nm)	23,7 ± 0,5	21,5 ± 0,3	-
d _H (nm)	165,8 ± 14,2	187,0 ± 7,3	-
PDI	0,14 ± 0,01	0,2 ± 0,02	-
ζ-Potential (mV)	-14,8 ± 0,2	-15 ± 0,6	-
Reinheit (% wt)	98,5	99,3 ± 0,08	>95

4.4.1.2 Untersuchungen zur Löslichkeit

Die Löslichkeit von TiO₂ und CeO₂ NP wurde sowohl nach sieben Tagen in artifizierter alveolärer und lysosomaler Flüssigkeit als auch nach 24 Stunden in den verwendeten Zellkulturmedien untersucht. Die Ergebnisse der Löslichkeitsuntersuchungen sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Nach sieben Tagen wurde weder für TiO₂ NP noch für CeO₂ NP eine Löslichkeit in beiden untersuchten physiologischen Flüssigkeiten festgestellt. Auch in den untersuchten Zellkulturmedien konnte keine Löslichkeit beobachtet werden. Eine geringe bis nicht vorhandene Löslichkeit für dieselben Materialien wurde nach sieben Tagen ebenfalls von Zaroni *et al.* festgestellt. Die Löslichkeit hing hierbei von der jeweiligen Zusammensetzung der lysosomalen Modellflüssigkeit ab, betrug für TiO₂ NP jedoch maximal 4 % und für CeO₂ NP maximal 0,3 %. Die minimalen Abweichungen zu den in dieser Arbeit ermittelten Löslichkeitsraten könnten durch die unterschiedlichen Versuchsansätze zustande kommen. Während in der vorliegenden Arbeit ein statisches System angewandt wurde, verwendeten Zaroni *et al.* ein dynamisches System und erreichten dadurch eine geringfügig höhere Löslichkeit (Zaroni *et al.*, 2022). Bahl *et al.* ermittelten darüber hinaus eine Löslichkeit von 0,013 ng/cm²/h für TiO₂ NP und eine Löslichkeit von 0,06 ng/cm²/h für CeO₂ NP. Im Vergleich mit der Löslichkeitsrate von bekanntermaßen gut löslichen Materialien wie CuO NP oder ZnO NP von 200-300 ng/cm²/h, wurde demnach auch hier für TiO₂ NP und CeO₂ NP eine vernachlässigbare Löslichkeit beobachtet (Bahl *et al.*, 2020). Gleiche

Beobachtungen wie in der vorliegenden Arbeit wurden für TiO₂ NP und CeO₂ NP auch von Koltermann-Jülly *et al.* gemacht (Koltermann-Jülly *et al.*, 2018).

Tabelle 11: Löslichkeit von TiO₂ NP und CeO₂ NP in unterschiedlichen physiologischen und Zellkultur-relevanten Medien. Die Materialien wurden in einer Konzentration von 100 µg/mL für den jeweiligen Zeitraum bei 37 °C inkubiert. Nach Abtrennung der nicht-gelösten Partikelrückstände durch Zentrifugation wurde die Ionenkonzentration im Überstand mittels ICP-MS bestimmt. AAF: artifizielle alveoläre Flüssigkeit (pH 7,4); ALF: artifizielle lysosomale Flüssigkeit (pH 4,5); KGM: *keratinocyte growth medium*; RPMI: *Roswell Park Memorial Institute Medium*;

Materialspezies	Löslichkeit nach 7 Tagen in %		Löslichkeit nach 24 h in %	
	AAF (pH 7,4)	ALF (pH 4,5)	KGM	RPMI
TiO ₂ NP	0,002	0,022	0,001	0,008
CeO ₂ NP	0,001	0,021	0,001	0,005

4.4.2 Toxikologisches Wirkprofil

Für die Untersuchung des toxikologischen Wirkprofils wurden Beas-2B-Zellen in Mono- und in Kokultur mit differenzierten Makrophagen für 24 h mit TiO₂ NP, CeO₂ NP und CNT submers inkubiert.

4.4.2.1 Zytotoxizität

Die Zytotoxizität der beiden partikulären Verbindungen TiO₂ NP und CeO₂ NP und der faserförmigen CNT wurde in Mono- und in Kokultur nach 24-stündiger Inkubation über die Ermittlung des ATP-Gehalts bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 35 dargestellt. Für beide partikulären Verbindungen TiO₂ NP und CeO₂ NP war selbst für die höchste Konzentration von 30 µg/cm² sowohl in Mono- als auch in Kokultur keine zytotoxische Wirkung zu sehen. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Literaturdaten. So wurden für TiO₂ NP keine bis maximal moderate zytotoxische Effekte in Beas-2B-Zellen und anderen Zellen des Bronchialepithels beobachtet (Biola-Clier *et al.*, 2017; Ghosh *et al.*, 2017). Auch in anderen pulmonalen Epithelzellen wie A549-Zellen wurde keine zytotoxische Wirkung von TiO₂ NP beobachtet (Gu *et al.*, 2017; Diabaté *et al.*, 2020). Hinsichtlich der Zytotoxizität von CeO₂ NP gibt es in der Literatur jedoch divergierende Aussagen: Während einige Autoren CeO₂ NP keine zytotoxischen Eigenschaften in verschiedenen Zelllinien zuschreiben (El Yamani *et al.*, 2017; García-Rodríguez *et al.*, 2019b; Diabaté *et al.*, 2020; Bhattacharya *et al.*, 2017), beschreiben andere Autoren eine Beeinflussung der Viabilität von Beas-2B- und Leberzellen durch CeO₂ NP bereits bei geringen Dosen

(Rosenkranz *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2008a). Darüber hinaus werden sogar zytoprotektive Effekte von CeO₂ NP beschrieben, die aufgrund der redoxaktiven und damit antioxidativen Eigenschaften von CeO₂ zustande kommen können (Xia *et al.*, 2008).

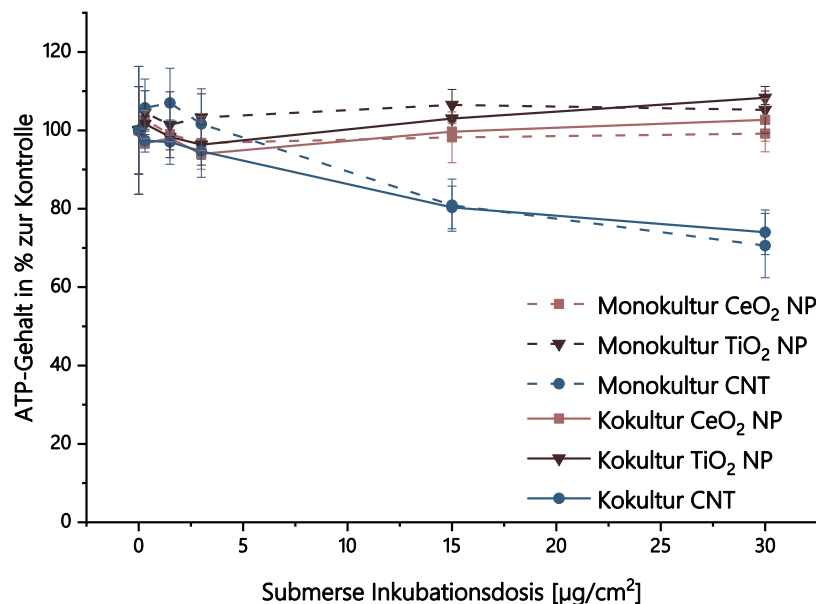


Abbildung 35: Einfluss von submers inkubierten TiO₂ NP, CeO₂ NP und *carbon nanotubes* (CNT) auf den ATP-Gehalt in Beas-2B-Zellen und einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen und differenzierten Monozyten mit makrophagenähnlichen Eigenschaften (dTHP-1). Beas-2B-Zellen wurden in Monokultur und in Kokultur mit differenzierten THP-1-Zellen für 24 Stunden mit dem entsprechenden Nanomaterial submers inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen ± SD.

Im Gegensatz zur ausbleibenden Zytotoxizität von TiO₂ NP und CeO₂ NP, zeigte sich im Falle der CNT eine dosisabhängige Abnahme des ATP-Gehalts, wobei jedoch erst ab einer Konzentration von 15 µg/cm² ein ausgeprägter Effekt mit einer reduzierten Viabilität von 80 % zu erkennen war. Bei einer Konzentration von 30 µg CNT/cm² sank die Viabilität sowohl in Mono- als auch in Kokultur weiter auf ein Niveau von 70 %. In der Literatur werden widersprüchliche Effekte hinsichtlich der Zytotoxizität von CNT beschrieben. Vergleichbare Auswirkungen auf die Viabilität in Beas-2B-Zellen wurden von García-Rodríguez *et al.* beschrieben, wobei die Viabilität bei einer Dosis von 100 µg/mL (entspricht 30 µg/cm²) auf ein Niveau von 40 % fiel (García-Rodríguez *et al.*, 2019b). Keine zytotoxischen Auswirkungen wurden hingegen nach Inkubation der Lungenepithelzelllinien Calu-3 und A549 beobachtet, während CNT in Mausmakrophagen eine leichte Zytotoxizität verursachten (Di Cristo *et al.*, 2019; García-Rodríguez *et al.*, 2019b). Im Gegensatz dazu wurde in der Literatur ein starker zytotoxischer Effekt von CNT in Beas-2B-Zellen beschrieben, die in serumhaltigem Medium kultiviert wurden (Hirano *et al.*, 2010). Haniu *et al.*

stellten fest, dass die zytotoxische Wirkung von CNT maßgeblich vom Inkubationsmedium abhängt. Während keine zytotoxische Wirkung in Beas-2B-Zellen festgestellt wurde, die mit CNT in serumfreiem Medium inkubiert wurden, sank die Viabilität der Zellen nach Inkubation mit CNT in serumhaltigem Medium signifikant ab. Dieser Effekt wird auf die Proteinzusammensetzung der Medien zurückgeführt, welche zu einer unterschiedlichen Internalisierungsrate der CNT in die Zellen führen kann. CNT die in serumfreien Medium suspendiert wurden werden demnach in geringerem Maße internalisiert und zeigen vielmehr eine Anheftung an die Zelloberfläche (Haniu *et al.*, 2013). Ursini *et al.* zeigten darüber hinaus, dass unterschiedliche Zytotoxizitätsassays zu unterschiedlichen Ergebnissen nach Inkubation mit CNT führen können. So wurde mittels WST1-Assay keine Zytotoxizität beobachtet, während die Zellen im MTT-Assay starke zytotoxische Reaktionen zeigten (Ursini *et al.*, 2014). Darüber hinaus gibt es in der Literatur Hinweise auf eine mögliche geringere Zytotoxizität einer Kokultur gegenüber CNT. Hierbei wurden eine A549-Monokultur und eine kontaktlose Kokultur aus A549- und dTHP-1-Zellen gegenüber CNT und Asbest exponiert (Ventura *et al.*, 2020). Eine solche Beobachtung wurde in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet. Ein möglicher Grund hierfür könnten die unterschiedlichen Zelllinien darstellen.

4.4.2.2 Zelluläre Verfügbarkeit

Die zelluläre Verfügbarkeit wurde für TiO₂ NP und CeO₂ NP nach 24-stündiger Inkubation in den beiden Monokulturen der Beas-2B- und dTHP-1-Zellen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 36 dargestellt. Bei einer Inkubationsdosis von 30 µg/cm² ist sowohl für TiO₂ NP als auch für CeO₂ NP nur eine geringe Erhöhung der intrazellulären Ionenkonzentration im Vergleich zu den Basalkonzentrationen auf maximal 25 µM zu sehen. Diese geringe Ionenfreisetzung durch TiO₂ NP und CeO₂ NP in beiden Zelllinien ist vereinbar mit der in Kapitel 4.4.1.2 beschriebenen lysosomalen Unlöslichkeit beider Materialien. Die intrazelluläre Ionenfreisetzung nach Inkubation mit TiO₂ NP und CeO₂ NP wurde in der Literatur bislang nicht untersucht. Es wird jedoch eine Aufnahme beider Materialien in die Zellen beschrieben (Xia *et al.*, 2008; Vales *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2008b). Singh *et al.* beobachteten außerdem eine Kollokalisierung von internalisierten CeO₂ NP mit Lysosomen und schlossen daraus auf eine endozytotische Aufnahme der Partikel (Singh *et al.*, 2010). Für die Faserkontrolle CNT wurden in der vorliegenden Arbeit keine Aufnahmestudien durchgeführt, in der Literatur wurde jedoch gezeigt, dass CNT in Bronchialepithelzellen aufgenommen werden (Maruyama *et al.*, 2015).

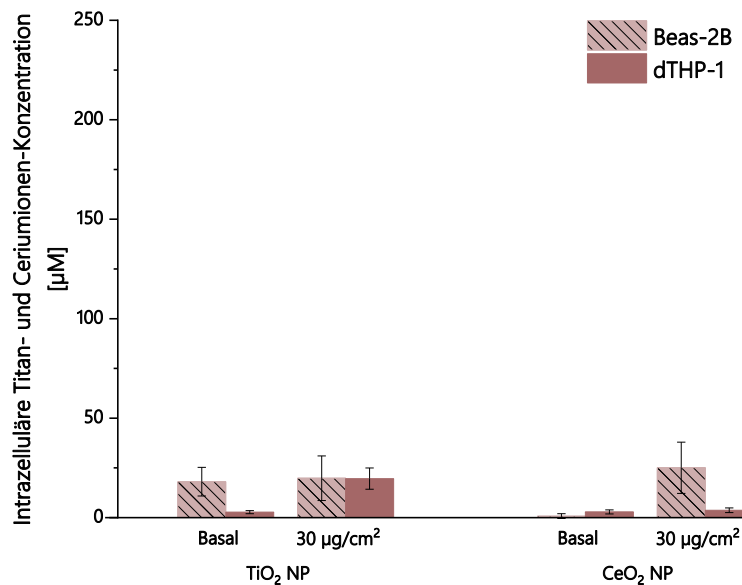


Abbildung 36: Intrazelluläre Titan- und Ceriumionen-Konzentration nach submerser Inkubation mit TiO_2 NP und CeO_2 NP in Beas-2B-Zellen und differenzierten THP-1-Zellen (dTHP-1). Die Zellen wurden für 24 h mit dem entsprechenden Nanomaterial inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Zellmembran abgetrennt und die Ionenkonzentration im Überstand mittels ICP-MS gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

4.4.2.3 Genexpressionsanalysen

Die Genexpression in Mono- und Kokultur wurde nach submerser Inkubation mit TiO_2 NP, CeO_2 NP und CNT untersucht. In Abbildung 37 sind die \log_2 -fachen Änderungen im Genexpressionsmuster als *heatmap* zusammengefasst und in Abbildung 38 werden die auffälligsten Veränderungen im Detail dargestellt.

Insgesamt werden nach Inkubation mit allen drei Materialien nur wenige Gencluster aktiviert. Eine biologisch relevante Änderung tritt nur im Cluster der Inflammation auf. Für TiO_2 NP und CeO_2 NP wurde keine biologisch relevante Änderung im Genexpressionsmuster sowohl in Mono- als auch in Kokultur beobachtet. Es ist tendenziell eine etwas stärker ausgeprägte Induktion der Inflammationsmarker in der Monokultur zu sehen, jedoch ist diese nicht signifikant. CeO_2 NP verursachten dagegen in der Monokultur eine Repression von *IL-1a* um einen \log_2 -fachen Wert von -1,6.

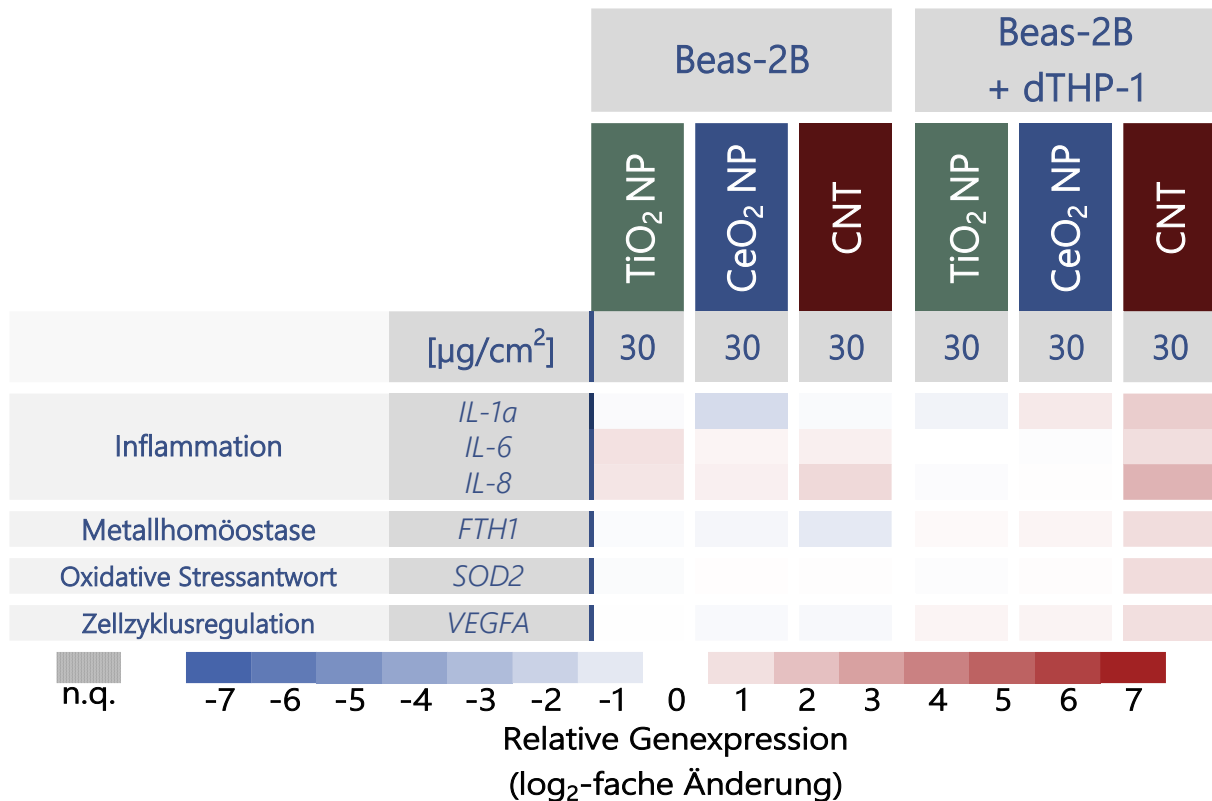


Abbildung 37: Änderung der Genexpressionsprofile einer Beas-2B-Monokultur und einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen mit differenzierten THP-1-Zellen (dTHP-1) nach submerser Inkubation mit TiO₂ NP, CeO₂ NP und carbon nanotubes (CNT). Die Zellen wurden für 24 h mit dem entsprechenden Nanomaterial submers inkubiert. Eine rote Färbung steht für eine Induktion, eine blaue Färbung für eine Repression der Gene. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. n.q.: nicht quantifizierbar.

Für TiO₂ NP wurde ein ausbleibender Einfluss auf das Transkriptom bereits in drei verschiedenen immunkompetenten Zellen beschrieben (Tuomela *et al.*, 2013). Im Gegensatz dazu zeigten weitere Autoren einen Einfluss durch TiO₂ NP auf die oxidative Stressantwort und die inflammatorische Antwort (Park *et al.*, 2008b). Auch Diabaté *et al.* zeigten nach submerser Inkubation in einer Kokultur aus A549- und dTHP-1-Zellen und nach ALI-Exposition in A549-Zellen inflammatorische Effekte. Hierbei wurde jedoch nach submerser Inkubation nur eine geringfügige Induktion von IL-8 beobachtet, während die inflammatorische Antwort nach ALI-Exposition stärker ausgeprägt war. Nach Inkubation mit CeO₂ NP wurden dagegen weder nach submerser Inkubation mit Makrophagen, noch nach ALI-Exposition proinflammatorische Effekte beobachtet. (Diabaté *et al.*, 2020).

Nach Inkubation mit CNT wurden in der Monokultur Gene der inflammatorischen Antwort lediglich geringfügig induziert. Im Vergleich dazu ist nach Inkubation der Kokultur mit CNT eine erhöhte Induktion von Inflammationsgenen zu erkennen. Vor allem das Gen *IL-8* wurde vermehrt

exprimiert. Weitere, im schwächeren Maße induzierte Gene der inflammatorischen Antwort stellten *IL-1a* und *IL-6* dar. Darüber hinaus wurden nach Inkubation mit CNT in der Kokultur die Gene *FTH1*, *SOD2* und *VEGFA* geringfügig, biologisch jedoch nicht relevant induziert.

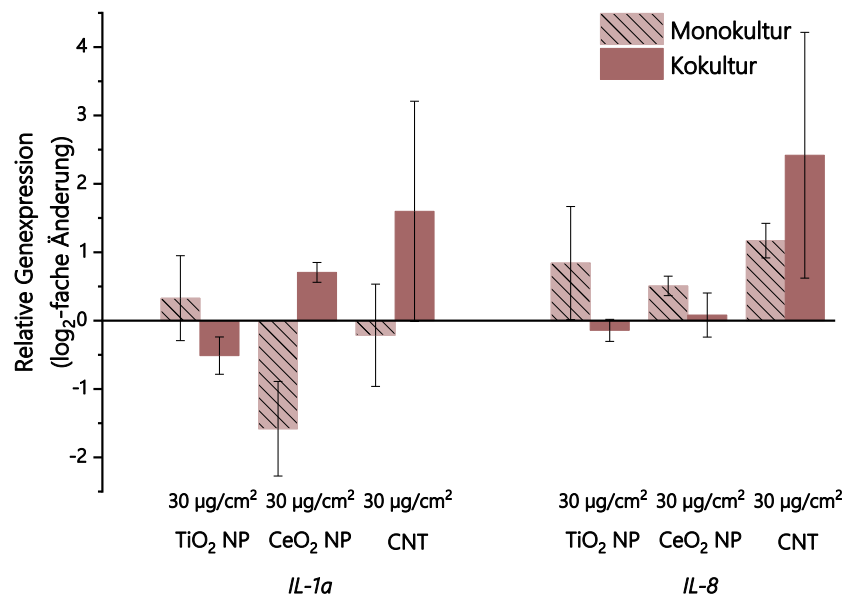


Abbildung 38: Induktion inflammatorischer Gene nach submerser Inkubation mit TiO₂ NP, CeO₂ NP und carbon nanotubes (CNT). Beas-2B-Zellen wurden in Monokultur und in Kokultur mit differenzierten THP-1 Zellen für 24 h submers inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen ± SD.

Eine erhöhte Expression von Inflamationsmarkern nach CNT-Inkubation wurde in Beas-2B-Zellen ebenfalls von Hirano *et al.* festgestellt. Hierbei wurden erhöhte mRNA-Gehalte von *IL-6* und *IL-8* in Verbindung mit einer Aktivierung von NF-κB beobachtet und auf eine Beteiligung des NF-κB-Signalwegs zurückgeführt (Hirano *et al.*, 2010). Die vermehrte Induktion inflammatorischer Gene in Kokulturen aus Epithelzellen und Makrophagen im Vergleich zu Monokulturen wurde nach Inkubation mit CNT schon mehrfach beschrieben (Fukai *et al.*, 2018; Ventura *et al.*, 2020). Di Ianni *et al.* wiesen außerdem eine erhöhte Induktion von *IL-8* in dTHP-1-Zellen im Vergleich zu A549-Zellen auf. Zusätzlich wurde hierbei eine Kokultur aus A549-Zellen, dTHP-1-Zellen und Lungenfibroblasten über ein ALI untersucht und ebenfalls eine erhöhte Expression von *IL-8* detektiert (Di Ianni *et al.*, 2021). Auf Proteinebene konnte *IL-8* dagegen nicht nachgewiesen werden (Haniu *et al.*, 2013). Die erhöhte Expression von inflammatorischen Markern und Markern der oxidativen Stressantwort in der Kokultur betont den Beitrag der Makrophagen bei der CNT-induzierten Toxizität. Eine inflammatorische Wirkung

durch CNT wird in der Literatur häufig auf eine „frustrierte Phagozytose“ zurückgeführt. Jedoch ist für kürzere CNT zusätzlich eine vollständige Phagozytose und eine darauffolgende Schädigung von Lysosomen denkbar. Dies führt zur Freisetzung von internalisierten CNT ins Zytoplasma und einer zusätzlichen Bildung von ROS (Di Cristo *et al.*, 2019).

4.4.2.4 Genotoxizität

Die genotoxische Wirkung von TiO₂ NP, CeO₂ NP und CNT wurde über die Induktion von DNA-Strangbrüchen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 39 dargestellt. Für alle drei Materialien zeigte sich keine Induktion von DNA-Strangbrüchen bei einer Inkubationsdosis von 30 µg/cm². Die ausbleibende genotoxische Wirkung ist dabei für die Monokultur sowie für die Kokultur zu sehen. Lediglich die Inkubation mit der Positivkontrolle führte zu einer starken Induktion von DNA-Strangbrüchen bis zu einem Wert von 3 Strangbrüchen pro 10⁶ Basenpaaren in der Monokultur und 3,6 Strangbrüchen pro 10⁶ Basenpaaren in der Kokultur.

In der Literatur werden teilweise widersprüchliche Effekte zur genotoxischen Wirkung von TiO₂ NP beschrieben. Während einige Autoren ebenfalls keine genotoxischen Effekte von TiO₂ NP in Beas-2B-Zellen und anderen Lungenepithelzellen in Monokultur und in Kokultur beobachteten (Brandão *et al.*, 2020; Cervena *et al.*, 2021; Bhattacharya *et al.*, 2009; Haase *et al.*, 2017; Vales *et al.*, 2015), zeigen Ergebnisse einer weiteren Studie in Beas-2B-Zellen eine genotoxische Wirkung (Biola-Clier *et al.*, 2017). Es wurde außerdem beschrieben, dass die genotoxische Wirkung von TiO₂ NP maßgeblich begleitender Lichteinstrahlung und deren Dauer abhängt. TiO₂ stellt ein photokatalytisches Material dar, wodurch die erhöhte Genotoxizität bei Lichtinkubation zustande kommen kann (Di Bucchianico *et al.*, 2017).

Im Falle der CeO₂ NP wird in der Literatur in Beas-2B-Zellen ebenfalls eine ausbleibende Induktion von DNA-Strangbrüchen bei einer Inkubationsdosis von 100 µg/mL (entspricht 30 µg/cm²) beschrieben (García-Rodríguez *et al.*, 2019b). Die gleichen Autoren beschreiben in Beas-2B-Zellen außerdem eine ausbleibende Induktion von Mikrokernen nach Inkubation mit CeO₂ NP (García-Rodríguez *et al.*, 2019a). Im Gegensatz dazu gibt es Hinweise auf eine genotoxische Wirkung von CeO₂ NP, welche in TK6-Zellen bereits ab einer Inkubationsdosis von 42 µg/mL auftrat (El Yamani *et al.*, 2017). Obwohl einige Autoren die genotoxische Wirkung von CeO₂ NP beschreiben, gibt es keine einheitliche Tendenz. Es werden sowohl prooxidative als auch antioxidative Eigenschaften

von CeO₂ NP, welche mit einer induzierten oder ausbleibenden Genotoxizität einhergehen (Souza *et al.*, 2018).

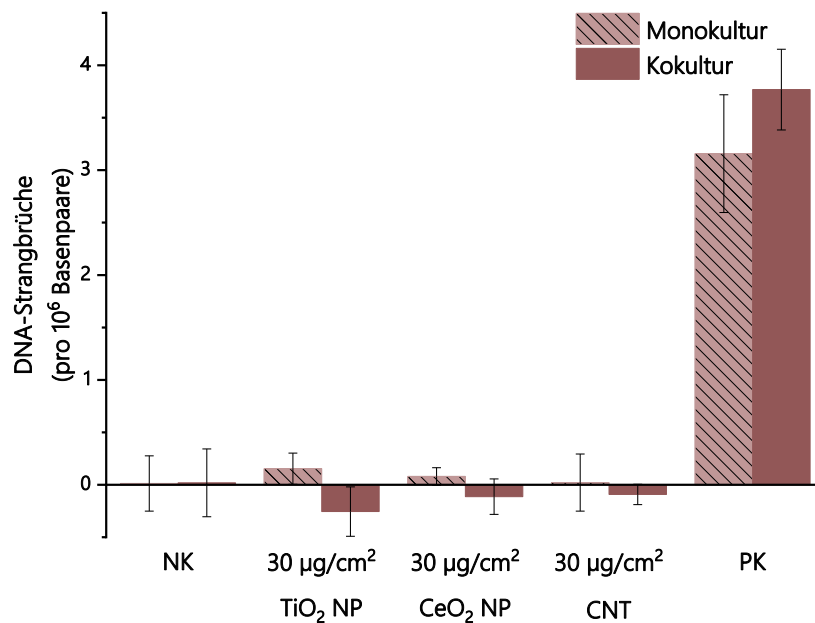


Abbildung 39: Induktion von DNA-Strangbrüchen durch TiO₂ NP, CeO₂ NP und *carbon nanotubes* (CNT) nach submerser Inkubation. Beas-2B-Zellen wurden in Monokultur und in Kokultur mit differenzierten THP-1 Zellen für 24 h mit dem entsprechenden Nanomaterial inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen ± SD. NK: Negativkontrolle, PK: Positivkontrolle (100 µM Menadion).

Die genotoxische Wirkung von CNT wurde in der Literatur bereits umfassend untersucht. Generell beobachteten die meisten Autoren keine genotoxische Wirkung in Form von einer Induktion von DNA-Strangbrüchen (Louro *et al.*, 2016; Di Ianni *et al.*, 2021; García-Rodríguez *et al.*, 2019b). Allerdings wird mehrfach eine Induktion von Mikrokernen nach Inkubation mit CNT beschrieben (Louro *et al.*, 2016; Pinto *et al.*, 2022; Ventura *et al.*, 2020; García-Rodríguez *et al.*, 2019a), was auf aneugene Effekte hindeutet. Die genotoxische Wirkung scheint außerdem Zelllinien-abhängig zu sein. Während für die Zelllinie Beas-2B weder eine Induktion von DNA-Strangbrüchen noch eine Induktion von Mikrokernen festgestellt wurde (Louro *et al.*, 2016), zeigte die Inkubation mit CNT genotoxische Wirkungen in dTHP-1-Zellen in Form von DNA-Strangbrüchen (Di Ianni *et al.*, 2021) und eine Induktion von Mikrokernen in A549-Zellen (Pinto *et al.*, 2022; Louro *et al.*, 2016). Ventura *et al.* stellten im Falle von A549-Zellen zusätzlich eine höhere Induktion von Mikrokernen nach Kokultivierung mit dTHP-1-Zellen fest, was eine synergistische Wirkung der Makrophagen zur Genotoxizität postuliert (Ventura *et al.*, 2020). Eine solche Beobachtung wurde in der vorliegenden

Arbeit jedoch nicht gemacht. Hier wurde sowohl in Mono- als auch in Kokultur keine genotoxische Wirkung beobachtet.

5 ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION

Das immer breiter werdende Spektrum der industriell produzierten Nanomaterialien erfordert stichhaltige Konzepte zur Bewertung toxikologischer Wirkmechanismen. Das Ziel des Projekts *MetalSafety*, in das sich diese Arbeit eingliedert, war daher die systematische Untersuchung Metall-basierter Nanomaterialien und die Entwicklung daraus resultierender Bewertungskonzepte. Innerhalb der vorliegenden Arbeit stand hierzu die Aufklärung des toxikologischen Wirkprofils und der zu Grunde liegenden Wirkmechanismen von zehn partikulären (NP) und faserförmigen (*Nanowire* (NW)) Metall-basierten Nanomaterialien in *in vitro*-Testmodellen im Fokus. Einige dieser Materialien wurden bereits umfassend untersucht, während es für andere Materialien in der Literatur noch keine Daten zum toxikologischen Wirkmechanismus gibt. Als Zellkulturmodelle wurden die gut etablierte Bronchialepithel-Zelllinie Beas-2B verwendet und vergleichend hierzu ein Kokultur-System bestehend aus Beas-2B-Zellen und differenzierten THP-1-Zellen mit makrophagenähnlichen Eigenschaften angewandt. Die Kokultur sollte die Situation im Zielorgan Lunge realistischer widerspiegeln als eine reine Monokultur aus Epithelzellen. Während alle Materialien nach submerser Inkubation untersucht wurden, fand für Kupfer- und Silber-basierte Materialien zusätzlich eine Exposition der Zellen über ein *air-liquid interface* (ALI) statt. Hierfür wurden die Zellen in Mono- und Kokultur an einer Vitrocell® *Cloud* mit einem Nanomaterial-haltigen Aerosol exponiert. Der Vorteil einer solchen Exposition gegenüber einer herkömmlichen submersen Exposition ist die Möglichkeit, durch eine integrierte Quarzkristall-Mikrowaage die tatsächlich deponierte Dosis der Nanomaterialien zu ermitteln. Eine ALI-Exposition spiegelt außerdem eine inhalative Aufnahme von Nanomaterialien besser wider. Zunächst wurden die Materialien physikalisch-chemisch charakterisiert. Der Fokus lag auf der Untersuchung der Löslichkeit in unterschiedlichen Medien. Die Löslichkeit in künstlicher lysosmaler Flüssigkeit sollte beispielsweise Aufschluss darüber geben, inwieweit die Materialien intrazellulär abgebaut werden und so zu einer intrazellulären Ionenfreisetzung führen. Anschließend wurde für jedes Material das toxikologische Wirkprofil untersucht. Als toxikologisch relevante Endpunkte wurde die zelluläre Verfügbarkeit der Materialien, die Zytotoxizität anhand der Modulation des zellulären ATP-Gehalts, die Untersuchung der Genotoxizität über die Quantifizierung von DNA-Strangbrüchen und die Erfassung von Änderungen im

Genexpressionsprofil der Cluster Inflammation, oxidative Stressantwort, DNA-Schadensantwort und Zellzyklusregulation ausgewählt. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse aufgeteilt nach Metallspezies zusammengefasst und diskutiert.

Kupfer-basierte Materialien

Alle Kupfer-basierten Nanomaterialien setzten intrazellulär Kupferionen frei. Diese Beobachtung wird durch Löslichkeitsversuche in künstlicher lysosomaler Flüssigkeit gestützt, wobei für alle Materialien eine Löslichkeit von 70-80 % nach 24 h beobachtet wurde. Zusätzliche Untersuchungen in Beas-2B-Zellen und dTHP-1-Zellen zeigten, dass alle Kupfer-basierten Nanomaterialien ebenfalls intrazellulär zu einer Freisetzung von Kupferionen führen. Hierbei wurde eine vergleichbare, Materialmorphologie-unabhängige, jedoch dosisabhängige Freisetzung von Kupferionen in beiden Zelllinien beobachtet. Zusätzlich wurden die freigesetzten Kupferionen hauptsächlich im Zellkern der Zellen lokalisiert, was Interaktionen mit Zellkernbestandteilen möglich werden lässt. Für CuO NP wurde eine endozytotische Aufnahme mit anschließender lysosomaler Ionenfreisetzung bereits in der Literatur beschrieben und als *trojan horse type* Mechanismus bezeichnet (Semisch *et al.*, 2014; Karlsson *et al.*, 2008; Jeong *et al.*, 2018; Strauch *et al.*, 2020).

Eine zytotoxische Wirkung wurde für alle Kupfer-basierten Materialien als Abnahme des ATP-Gehalts in Mono- und in Kokultur beobachtet. Die stärksten Effekte verursachten für Cu NP und Cu NW, wobei bereits bei einer Dosis von 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ eine Reduktion des ATP-Gehalts beobachtet wurde. Nach ALI-Exposition wurden zytotoxische Effekte bereits bei niedrigeren Dosen verursacht, wobei zytotoxische Effekte von Cu NP ab 0,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ und von Cu NW ab 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ auftraten. Dies kann auf die tatsächlich deponierte Dosis zurückgeführt werden und wurde schon nach ALI-Exposition weiterer Materialien beobachtet (Bessa *et al.*, 2021; Diabaté *et al.*, 2020).

Für alle drei Kupfer-basierten Materialien wurde eine starke Induktion der Gene *MT1X* und *MT2A* beobachtet, die für Proteine der metallbindenden Metallothionein-Familie codieren und eine Rolle bei der Detoxifizierung von Metallionen spielen (Calvo *et al.*, 2017). Die Induktion dieser Gene durch die Kupfer-basierten Materialien korreliert mit der lysosomalen Löslichkeit und der intrazellulären Freisetzung der Materialien und zeigt eine Freisetzung von Kupferionen. Weiterhin wurden Gene der oxidativen Stressantwort induziert. Es wurde beispielsweise eine starke Induktion der Gene für die Hämoxigenase-1 (*HMOX1*) und das Chaperon HSP70 (*HSPA1A*)

beobachtet, die für die Regulation von oxidativem Stress verantwortlich sind. Zusätzlich wurden die Gene für Thioredoxin (*TXN*) und die Thioredoxinreduktase (*TXNRD1*) induziert, die eine wichtige Rolle bei der Reduktion oxidierter Proteine einnehmen (Holmgren & Lu, 2010). Eine Entzündungsantwort durch alle Kupfer-basierten Materialien war durch die Induktion inflammatorischer Marker zu beobachten, wobei hier im Einzelnen vor allem *IL-6* und *IL-8* zu nennen sind. Diese wurden in der Kokultur geringfügig höher induziert, was durch den Beitrag der Zytokine aus den Makrophagen erklärt werden kann. Darüber hinaus zeigt die Induktion der Gene *JUN* und *MYC* eine Aktivierung des Proteins AP-1 welches als Transkriptionsfaktor ebenfalls die zelluläre Antwort gegenüber oxidativem und inflammatorischem Stress reguliert (Hanagata *et al.*, 2011). *MYC* wird darüber hinaus mit der Induktion der Apoptose in Verbindung gebracht (Sheen *et al.*, 2003). Das beobachtete Genexpressionsprofil deutet auf einen Wirkmechanismus der Kupfer-basierten Materialien hin, der auf einer Freisetzung von Kupferionen und einer dadurch induzierten oxidativen und inflammatorischen Stressantwort basiert und für CuO NP schon mehrfach gezeigt wurde (Hufnagel *et al.*, 2021; Strauch *et al.*, 2020; Ude *et al.*, 2021). Nach ALI-Exposition war generell eine schwächere Induktion aller Gene zu beobachten. Eine mögliche Begründung für diese Beobachtung könnte darin liegen, dass am ALI kultivierte Zellen bereits einen höheren Basalgehalt an Zytokinen und Stressmarkern aufweisen.

Sowohl die submerse Inkubation mit allen drei Kupfer-basierten Materialien als auch die ALI-Exposition mit Cu NP und Cu NW verursachten genotoxische Effekte, die sich in der Induktion von DNA-Strangbrüchen äußerten. CuO NP verursachten ab einer Dosis von $7,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ DNA-Strangbrüche in der Monokultur. Im Falle von Cu NP und Cu NW wurde ein genotoxischer Effekt hingegen bereits ab $1,5$ bzw. $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ beobachtet. Hinsichtlich der Cu NP kann diese Beobachtung mit deren erhöhter oxidativen Reaktivität im Vergleich zu CuO NP begründet werden (Denluck *et al.*, 2018). Nach ALI-Exposition waren genotoxische Effekte von Cu NP ab einer Dosis von $1,79 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und von Cu NW ab einer Dosis von $1,15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ersichtlich. Eine genotoxische Wirkung von CuO NP in humanen pulmonalen Zelllinien wurde in der Literatur schon mehrfach beschrieben (Akhtar *et al.*, 2016; Karlsson *et al.*, 2008; Cronholm *et al.*, 2013). Die genotoxische Wirkung aller drei Kupfer-basierter Materialien war darüber hinaus proportional zur Kupferionen-Konzentration im Zellkern beider Zelllinien. Dies spricht für eine genotoxische Wirkung durch direkt mit dem Zellkern interagierende Kupferionen, was in der Literatur für CuO NP bereits beschrieben wurde (Semisch *et al.*, 2014; Strauch *et al.*, 2017).

Alle Kupfer-basierten Materialien zeigten eine geringere Toxizität in den inkubierten Kokulturen. Besonders deutlich wurde dieser Effekt nach ALI-Kultivierung von Cu NP und Cu NW. Hier wurden neben der geringeren Zytotoxizität in der Kokultur auch weniger DNA-Strangbrüche verursacht. Darüber hinaus wurde auch die Genexpression in einem geringeren Maße beeinflusst. Frühere Studien zum Vergleich von Mono- und Kokultur beschreiben teilweise ein anderes Bild. In A549-Zellen wurde nach submerser Inkubation in der Kokultur eine höhere Zytotoxizität von CuO NP festgestellt (Hufnagel *et al.*, 2021). Nach ALI-Exposition einer Tripelkultur aus A549-, dTHP-1- und Endothelzellen wurde hingegen kein Unterschied zur A549-Monokultur festgestellt (Wang *et al.*, 2020). Für die Kokultur aus Beas-2B-Zellen und dTHP-1-Zellen wurde ein protektiver Effekt dagegen nach Inkubation mit WC-Co NP festgestellt, der auf eine Barrierefunktion der dTHP-1-Zellen zurückgeführt wird (Armstead & Li, 2016). Die unterschiedlichen Beobachtungen können auf die unterschiedliche Sensitivität der Zelllinien zurückgeführt werden. Mechanistisch scheinen für Kupfer-basierte Nanomaterialien unabhängig von ihrer Morphologie freigesetzte Kupferionen entscheidend für das toxikologische Wirkprofil zu sein.

Silber-basierte Materialien

Löslichkeitsuntersuchungen mit Ag NP und Ag NW zeigten eine vernachlässigbar geringe Löslichkeit in artifizierlicher lysosomaler Flüssigkeit. Dies steht im Widerspruch zu bereits veröffentlichten Ergebnissen zur lysosomalen Löslichkeit von Ag NP (Shimizu *et al.*, 2022; Breitner *et al.*, 2018). Der vermeintlichen Unlöslichkeit liegt vermutlich eine rasche Bildung von Sekundärstrukturen zugrunde, die eine Erfassung des ursprünglich gelösten Anteils nicht möglich macht (Pem *et al.*, 2021). Untersuchungen zur intrazellulären Ionenfreisetzung zeigten dagegen eine Zunahme der intrazellulären Silberionen-Konzentration in beiden in der Arbeit verwendeten Zelllinien, was auf eine Aufnahme und intrazelluläre Löslichkeit der Silbermaterialien schließen lässt. Es zeigten sich hierbei jedoch starke, Zelltyp-spezifische Unterschiede. Während nur eine geringe Freisetzung von Silberionen aus Ag NP und Ag NW in Beas-2B-Zellen zu beobachten war, zeigten beide Materialien eine starke Freisetzung von Silberionen in dTHP-1-Zellen. Diese Beobachtung wird auf die erhöhte phagozytotische Aktivität von Makrophagen zurückgeführt, welche bereits in der Literatur beschrieben wurde (Li & Wang, 2021). Weiterhin wurde die intrazelluläre Silberionen-Verteilung untersucht. Dabei wurde eine starke Akkumulation von Silberionen im Zellkern beider Zelllinien nach Inkubation mit beiden Silber-basierten Materialien beobachtet, was eine Interaktion mit Zellkernbestandteilen möglich macht. Die Untersuchung der intrazellulären Verteilung von Silberionen wurde in dieser Arbeit erstmals untersucht. Jedoch

wurde ein Vorhandensein von Ag NP in räumlicher Nähe zum Zellkern schon in mehreren Studien gezeigt (AshaRani *et al.*, 2009; Greulich *et al.*, 2011).

Ag NP verursachten in beiden Zellsystemen eine starke zytotoxische Wirkung, bereits ab einer Dosis von 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Auch in der Literatur wurde eine starke zytotoxische Wirkung von Ag NP in Beas-2B-Zellen und anderen Lungenepithelzellen beschrieben (Bobyk *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2015a). Für Ag NW wurde hingegen selbst für die höchste Konzentration von 30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ keine Zytotoxizität beobachtet. Frühere Untersuchungen zur Zytotoxizität von Ag NW zeigen unterschiedliche Ergebnisse. Einerseits wird ebenfalls eine ausbleibende Zytotoxizität von Ag NW in der Typ-I-Alveolarzelllinie TT1 beobachtet (Chen *et al.*, 2013), andererseits werden leichte zytotoxische Effekte in dTHP-1-Zellen beobachtet (Theodorou *et al.*, 2017). In A549-Zellen wird sogar eine höhere Zytotoxizität von Ag NW im Vergleich zu Ag NP nach 48 h beschrieben (Stoehr *et al.*, 2011). Neben der verwendeten Zelllinie scheint also auch die zeitliche Komponente eine Rolle bei der Zytotoxizität von Silber-basierten Materialien zu spielen. In ALI-Versuchen konnte die bereits submers beobachtete dosisabhängige Zytotoxizität von Ag NP bestätigt werden. Mit Ausnahme der mittleren Dosis war hier ebenfalls kein Unterschied zwischen Mono- und Kokultur zu sehen. Ag NW verursachten nach ALI-Exposition dagegen stärkere Effekte im Vergleich zur submersen Inkubation. Diese Beobachtung könnte einerseits auf die absolut deponierte Dosis zurückzuführen sein, die nach submerser Inkubation nicht ermittelt wurde. Andererseits wiesen die über die *Cloud* exponierten Fasern eine geringere mittlere Länge auf, was die zytotoxische Wirkung der Fasern zusätzlich erhöhen kann und bereits in der Literatur gezeigt wurde (Toybou *et al.*, 2019). Die Kokultur reagierte nach ALI-Exposition mit Ag NW bereits ab 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ mit einer zytotoxischen Antwort, während die Monokultur erst ab 7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ zytotoxische Effekte zeigte. Diese Beobachtung deutet auf eine Faser-spezifische Wirkung der Ag NW in der Kokultur hin, die speziell nach ALI-Exposition auftritt. Im Vergleich zu Ag NP ist eine etwa vergleichbare Zytotoxizität beobachtet worden, was mit Literaturdaten übereinstimmt (Fizeşan *et al.*, 2019).

Die Veränderungen im Genexpressionsmuster nach Inkubation mit Silber-basierten Materialien deuten auf einen Wirkmechanismus über oxidative Stressfaktoren hin. Weitestgehend unabhängig vom Expositionsszenario wurden MT-codierende Gene, Gene der oxidativen Stressantwort und Inflammationsmarker induziert. Dieses Genexpressionsmuster deutet auf eine intrazelluläre Freisetzung von Silberionen und dadurch induzierten oxidativen Stress hin und wurde für Ag NP bereits in der Literatur beschrieben (Jang *et al.*, 2021). Eine Aktivierung der Gene *JUN* und *MYC* spiegelt darüber hinaus die Einleitung der Apoptose wider, welche durch einen

durch DNA-Schädigung ausgelösten G2/M-Phasen-Arrest zustande kommt (Sheen *et al.*, 2003). Nach submerser Inkubation wurde zudem das Gen *DDIT3* als Marker einer DNA-Schadensantwort in biologisch relevanter Menge induziert. Vor allem im Cluster der oxidativen Stressantwort und der Inflammation ist darüber hinaus ein teilweise signifikanter protektiver Effekt durch die Kokultur zu sehen. Vor allem die Gene *HMOX1* und *IL-8* wurden nach Inkubation mit Ag NP in der Kokultur in geringerem Maße induziert, was in der stark erhöhten intrazellulären Ionenfreisetzung von Ag NP in Makrophagen und einer dadurch abfangenden Funktion durch Makrophagen begründet sein kann (Armstead & Li, 2016).

Analog zur starken zytotoxischen Wirkung wurde eine starke Induktion von DNA-Strangbrüchen durch die submers inkubierten Ag NP ab einer Dosis von 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ verursacht, wobei die Monokultur hierbei noch etwas sensitiver reagierte. Trotz ausbleibender Zytotoxizität verursachten die submers inkubierten Ag NW DNA-Strangbrüche ab einer Dosis von 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, bei vergleichbarer Intensität für Mono- und Kokultur. Nach ALI-Exposition verursachten Ag NP ab einer Dosis von 8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ genotoxische Effekte in Mono- und Kokultur. Für Ag NW wurden nach ALI-Exposition hingegen bereits ab 2,8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ genotoxische Effekte beobachtet. Sowohl eine genotoxische Wirkung von Ag NP als auch von Ag NW wurde nach submerser Inkubation bereits mehrfach gezeigt (García-Rodríguez *et al.*, 2019b; Nymark *et al.*, 2013; Gliga *et al.*, 2014), wobei neben der Induktion von ROS (Tavares *et al.*, 2012; Foldbjerg *et al.*, 2011) auch eine direkte Interaktion von Ag NP mit der DNA diskutiert wurde (AshaRani *et al.*, 2009). Neben der Induktion von ROS durch Silberionen (Armstead & Li, 2016) werden für Ag NP zusätzliche genotoxische Effekte beschrieben, die in der oxidativen Reaktivität der Partikel begründet sind (Li *et al.*, 2017; Foldbjerg *et al.*, 2011).

Nickel-basierte Materialien

Ni NP zeigten in artifizieller lysosomaler Flüssigkeit eine Auflösungsrate von 45 % nach 24 h, die zeitabhängig weiter auf bis zu 55 % anstieg. Für Ni NW wurde nach 24 h hingegen nur eine Löslichkeitsrate von 5 % ermittelt, die zeitabhängig auf bis zu 35 % nach sieben Tagen anstieg. Eine zeitabhängige Auflösung von Ni NW wurde bereits in der Literatur beschrieben (Perez *et al.*, 2016). Untersuchungen zur intrazellulären Ionenfreisetzung in Beas-2B-Zellen und dTHP-1-Zellen spiegelten die lysosomale Löslichkeit teilweise wider. So wurde nach 24-stündiger Inkubation mit Ni NP in beiden Zelllinien eine dosisabhängige intrazelluläre Freisetzung von Nickelionen beobachtet, wobei bei einer Dosis von 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ die intrazelluläre Nickelionenkonzentration auf

1200-1300 μM in Beas-2B-Zellen und dTHP-1-Zellen anstieg. Die Inkubation mit Ni NW führte nach 24 h dagegen nur in dTHP-1-Zellen zu einer dosisabhängigen Freisetzung von Nickelionen auf bis zu 880 μM , während in Beas-2B-Zellen nur eine geringe, dosisunabhängige Freisetzung von Ni NW zu sehen war. Dies lässt sich mit den unterschiedlichen phagozytotischen Aktivitäten der beiden Zelllinien erklären, wobei Beas-2B-Zellen nur eine geringe Phagozytoseaktivität aufweisen und Ni NW ausschließlich über Phagozytose in die Zellen aufgenommen werden (Perez *et al.*, 2016). Die Untersuchung der intrazellulären Verteilung beider Materialien deutet auf einen Verbleib der Nickelionen im Zytoplasma der Zellen hin, wonach lediglich geringe Konzentrationen an Nickelionen im Zellkern beider Zelllinien gefunden wurden. Diese Beobachtung steht im Einklang mit bereits publizierten Daten zur Lokalisation von Nickelionen in der Zelle (Schwerdtle & Hartwig, 2006; Edwards *et al.*, 1998).

Sowohl Ni NP als auch Ni NW verursachten in beiden untersuchten Zellsystemen ab einer Dosis von 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ leichte zytotoxische Effekte, die zu einer Reduktion des ATP-Gehalts auf 80-85 % führten. Die Viabilität der Zellen sank mit zunehmender Konzentration von 30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ auf einen Wert von 70-80 % weiter ab. Ähnliche Wirkungen durch Ni NP und Ni NW wurden bereits in der Literatur gezeigt (Åkerlund *et al.*, 2019; Latvala *et al.*, 2016; Capasso *et al.*, 2014). Darüber hinaus wurde sowohl für Ni NP als auch für Ni NW eine zeitabhängige Zytotoxizität beschrieben, die erst nach 48 h eintritt (Perez *et al.*, 2016; Felix *et al.*, 2016; Latvala *et al.*, 2016). Es ist daher möglich, dass stärkere zytotoxische Effekte nach einem längeren Zeitraum auftreten.

In Genexpressionsanalysen zeigte sich sowohl in Mono- als auch in Kokultur eine durch Ni NP verursachte inflammatorische Antwort. Dies äußerte sich in der Induktion von Genen wie *IL-6*, *IL-8* und *COX2* um \log_2 -fache Werte von 4-5, 6-7 und 2-2,5. In der Kokultur ist dabei meist eine höhere Induktion zu sehen, jedoch ist dieser Unterschied nicht signifikant. Für Ni NW wurde im Cluster der Inflammation lediglich das Gen *IL-8* in biologisch relevanter Menge um einen \log_2 -fachen Wert von 2,3 induziert. Die Induktion von *IL-8* durch Ni NW war dabei für Mono- und Kokultur vergleichbar. Diese Beobachtung ist vor allem im Falle der Monokultur interessant. Trotz einer geringen Freisetzung von Nickelionen durch Ni NW in Beas-2B-Zellen, ist eine starke Induktion von *IL-8* zu sehen, was auf eine inflammatorische Wirkung hindeutet, die aufgrund der nicht-gelösten Ni NW zustande kommt. Es wird hier also ein faserspezifischer Effekt deutlich. Die Genexpressionsanalysen beider Nickel-basierter Materialien zeigen deutlich einen Beitrag einer sekundären Toxizität. Während in der Monokultur lediglich Gene der inflammatorischen Antwort induziert wurden, sind in der Kokultur zusätzlich weitere Gencluster aktiviert worden. Besonders

auffällig war hierbei eine Aktivierung der Gene der oxidativen Stressantwort und der DNA-Schadensantwort, welche ausschließlich in der Kokultur nach Inkubation mit Ni NP in biologisch relevanter Menge induziert wurden. Ausgeprägt war dieser Effekt besonders für die Gene *HMOX1*, *NFKB1*, *SOD2* und *DDIT3*. Diese Gene waren in der Kokultur mindestens doppelt so hoch induziert wie in der Monokultur. Weitere in der Kokultur induzierte Gene, die mit der oxidativen Stressantwort in Verbindung gebracht werden können, waren *MYC* und *JUN*. Diese deuten auf eine Aktivität von AP-1 hin, was ebenfalls ein Anzeichen auf oxidativen Stress ist. Die Induktion des Gens *VEGFA* in Verbindung mit der Induktion von inflammatorischen Marken und *NF-κB* gibt einen Hinweis auf eine Beteiligung des NF-κB-Signalwegs. Eine Aktivität von AP-1 in Verbindung mit der Induktion von NF-κB wird außerdem mit dem Auftreten von Tumoren in Verbindung gebracht (Wu & Kong, 2020; Magaye *et al.*, 2014). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Inkubation der Kokultur mit Ni NP einen „oxidativen *Burst*“ verursacht. Dieser wird durch endogene, durch Makrophagen produzierte reaktive Sauerstoffspezies charakterisiert. Eine solche Reaktion von Kokulturen auf Nickel wurde bereits in der Literatur beschrieben und mit einer genotoxischen Wirkung von Ni NP in Verbindung gebracht (Freitas *et al.*, 2010; Åkerlund *et al.*, 2019).

Die Untersuchung der Genotoxizität ergab keine Induktion von DNA-Strangbrüchen durch Ni NP und Ni NW, unabhängig vom verwendeten Kultivierungssystem. Dies steht im teilweisen Widerspruch zu bereits publizierter Literatur, in der eine genotoxische Wirkung von Ni NP teilweise schon nach kurzer Inkubationszeit beschrieben wurde (Magaye *et al.*, 2014). Andere Autoren beschreiben dagegen eine zeitabhängige Genotoxizität von Ni NP, wobei eine Induktion von DNA-Strangbrüchen erst nach einer Inkubationszeit von mindestens 48 h beobachtet wurde (Di Bucchianico *et al.*, 2018; Gliga *et al.*, 2020). In der vorliegenden Arbeit wurde nur eine geringe Konzentration an Nickelionen im Zellkern der untersuchten Zelllinien gefunden. Das lässt die Vermutung zu, dass der in der Literatur beobachteten genotoxischen Wirkung kein primärer Mechanismus durch Interaktion von Nickelionen mit der DNA zugrunde liegt. Eine genotoxische Wirkung von Nickel wird auch über die Induktion einer sekundären Genotoxizität über einen durch Makrophagen ausgelösten „oxidativen *Burst*“ beschrieben (Åkerlund *et al.*, 2019). Darüber hinaus sind oxidative DNA-Schäden denkbar (Åkerlund *et al.*, 2018). Für Ni NW liegen bislang keine publizierten Daten zur genotoxischen Wirkung vor.

Titan(IV)-dioxid Nanopartikel, Cerium(IV)-dioxid Nanopartikel und Carbon Nanotubes

TiO₂ NP, CeO₂ NP und CNT wurden in der vorliegenden Arbeit als unlösliche Materialien verwendet. Alle drei Materialien wurden durch das *Joint Research Center* (JRC) bereits umfassend charakterisiert und eignen sich daher als Referenzmaterialien, für einen Partikel- bzw. Fasereffekt (Landsiedel *et al.*, 2014). Weder TiO₂ NP noch CeO₂ NP wiesen eine Löslichkeit in lysosomaler Flüssigkeit auf, was bereits mehrfach in der Literatur beschrieben wurde (Bahl *et al.*, 2020; Zanoni *et al.*, 2022; Koltermann-Jüly *et al.*, 2018). Die gleiche Beobachtung wurde auch für die intrazelluläre Freisetzung der Materialien gemacht. Nach 24 h wurde keine relevante Steigerung des Titanionen-Gehalts in beiden untersuchten Zelllinien beobachtet und auch im Hinblick auf CeO₂ NP war die intrazelluläre Ionen-Freisetzung vernachlässigbar gering. In der Literatur wurde die intrazelluläre Freisetzung von TiO₂ NP und CeO₂ NP bislang nicht untersucht, jedoch wurde gezeigt, dass beide Materialien durch Endozytose in die Zellen aufgenommen werden (Xia *et al.*, 2008; Vales *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2008b; Singh *et al.*, 2010). Eine endozytotische Aufnahme von CNT in Bronchialepithelzellen wurde ebenfalls gezeigt (Maruyama *et al.*, 2015). Daher wurden im Folgenden mögliche zelluläre Effekte untersucht.

Der beobachtete toxikologische Wirkmechanismus von TiO₂ NP und CeO₂ NP war vergleichbar und auch zwischen den einzelnen Kultivierungssystemen wurde kein Unterschied in der zellulären Antwort auf die Nanomaterialien festgestellt. Selbst bei einer Dosis von 30 µg/cm² wurden keine zytotoxischen Wirkungen beider Materialien beobachtet. Die ausbleibenden Effekte sind auch hinsichtlich der genotoxischen Wirkung ersichtlich. Hier wurde keine Induktion von DNA-Strangbrüchen mittels alkalischer Entwindung festgestellt. Zusätzlich wurden sowohl durch TiO₂ NP als auch durch CeO₂ NP keine Gene in biologisch relevantem Ausmaß induziert oder reprimiert. Hinsichtlich des Literaturvergleichs sind Diskrepanzen zwischen den einzelnen Studien ersichtlich. Einige Autoren beschreiben in Beas-2B-Zellen ebenfalls keine Zytotoxizität von TiO₂ NP und CeO₂ NP (Bhattacharya *et al.*, 2009; García-Rodríguez *et al.*, 2019b; El Yamani *et al.*, 2017; Diabaté *et al.*, 2020; Brandão *et al.*, 2020). Es gibt jedoch auch Hinweise auf eine geringe Zytotoxizität von TiO₂ NP nach 24 h (Biola-Clier *et al.*, 2017) und auch für CeO₂ NP wurden teilweise schon bei geringen Dosen zytotoxische Effekte beschrieben (Park *et al.*, 2008a). Darüber hinaus werden für CeO₂ NP in der Literatur teilweise zusätzliche zytoprotektive Effekte beschrieben, die in der Redoxaktivität begründet sind (Xia *et al.*, 2008). Die beobachtete ausbleibende Genotoxizität der Materialien spiegelt ebenfalls zumeist die in der Literatur beschriebenen Beobachtungen wider (Brandão *et al.*, 2020; Cervena *et al.*, 2021; Haase *et al.*, 2017;

García-Rodríguez *et al.*, 2019b). Lediglich einzelne Studien beschreiben eine vorhandene genotoxische Wirkung von TiO₂ (Biola-Clier *et al.*, 2017) die sich in einer Induktion von DNA-Strangbrüchen zeigt. Die unterschiedlichen Beobachtungen hinsichtlich der zytotoxischen und genotoxischen Wirkung von TiO₂ NP können neben der Verwendung unterschiedlicher Zelllinien und toxikologischer Endpunkte auch durch die Proteinzusammensetzung des Mediums begründet werden (Prasad *et al.*, 2014). Speziell für TiO₂ NP spielen außerdem die physikochemischen Eigenschaften eine Rolle. TiO₂ NP sind photoaktiv, weshalb die genotoxische Wirkung dieser Materialien häufig abhängig von der Exposition gegenüber UV-Strahlung ist (Di Bucchianico *et al.*, 2017). Eine besonders hohe photokatalytische Eigenschaft besitzt die Kristallstruktur Anatase, die aufgrund dieser Eigenschaft spontan zur Induktion von ROS neigt (Charles *et al.*, 2018; Braydich-Stolle *et al.*, 2009). Aufgrund dieser Eigenschaft ist reines Anatase meist toxischer als das in der vorliegenden Arbeit verwendete Gemisch aus Anatase und Rutil (Charles *et al.*, 2018).

Carbon nanotubes (CNT) hatten ab einer Dosis von 15 µg/cm² einen Einfluss auf die Viabilität in beiden Kultivierungssystemen. Bei einer Dosis von 30 µg/cm² war eine Reduktion der Viabilität auf 70 % zu beobachten. Die zytotoxische Wirkung von CNT in Beas-2B-Zellen wurde schon ausführlich beschrieben (García-Rodríguez *et al.*, 2019b; Hirano *et al.*, 2010). In der Literatur wurden für eine Kokultur aus A549-Zellen und dTHP-1-Zellen im Vergleich zur A549-Monokultur außerdem geringere zytotoxische Effekte beobachtet (Ventura *et al.*, 2020). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Möglicherweise könnte diese Beobachtung in der Verwendung unterschiedlicher Zelllinien begründet sein. Selbst bei der höchsten verwendeten Konzentration von 30 µg/cm² konnte für CNT keine Induktion von DNA-Strangbrüchen in beiden Kulturen nachgewiesen werden. Eine solche Beobachtung ist in der Literatur schon zahlreich beschrieben (García-Rodríguez *et al.*, 2019b; Louro *et al.*, 2016; Di Ianni *et al.*, 2021). Es werden jedoch aneugene Effekte wie zum Beispiel die Induktion von Mikrokernen beobachtet (Louro *et al.*, 2016; Pinto *et al.*, 2022; Ventura *et al.*, 2020; García-Rodríguez *et al.*, 2019a). CNT verursachten vor allem in der Kokultur bei einer Dosis von 30 µg/cm² inflammatorische Effekte, die sich in der Induktion der Gene *IL-1α*, *IL-6* und *IL-8* äußerten. Diese Beobachtung deutete auf eine vermehrte Zytokinausschüttung durch in der Kokultur befindliche Makrophagen hin. Ähnliche Effekte wurden bereits in Kokulturen aus verschiedenen Epithelzellen mit Makrophagen gezeigt (Fukai *et al.*, 2018; Ventura *et al.*, 2020). Eine Induktion von *IL-6* und *IL-8* wurde von Hirano *et al.* mit der Aktivierung des NF-κB-Signalwegs in Verbindung gebracht (Hirano *et al.*, 2010). Mögliche Gründe

für die vermehrte inflammatorische und oxidative Stressantwort der Makrophagen kann eine „frustrierte Phagozytose“ in die Makrophagen sein. Des Weiteren ist durch eine vollständige Phagozytose kürzerer Fasern eine Schädigung der Lysosomen denkbar (Di Cristo *et al.*, 2019).

Zusammenfassung

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse ermöglichen erstmals einen systematischen Vergleich der toxikologischen Wirkprofile unterschiedlicher partikulärer und faserförmiger, Metall-basierter Nanomaterialien. Anhand der intrazellulären Verfügbarkeit und Verteilung sowie toxikologisch relevanter Endpunkte wie Genotoxizität, Entzündung und oxidative Stressantwort konnten Toxizitätsmuster für einzelne Materialgruppen herausgearbeitet werden. Eine Übersicht über die Ergebnisse der toxikologischen Endpunkte für die in dieser Arbeit untersuchten Nanomaterialien gibt Abbildung 40.

		Löslichkeit nach 7 d (in %)		Intrazelluläre Freisetzung		Konzentration im Zellkern		Zytotoxizität		Genotoxizität		Inflammation		ox. Stressantwort		Apoptose	
		AAF pH 7,4	ALF pH 4,5	Beas-2B	dTHP-1	Beas-2B	dTHP-1	Mono	Ko	Mono	Ko	Mono	Ko	Mono	Ko	Mono	Ko
CuO NP	submers	3,9 ± 1,8	57,2 ± 5,1	↑↑↑	↑↑↑	↑↑	↑	↑↑↑	↑	↑↑	↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑
Cu NP	submers	12 ± 4,7	63,8 ± 3,4	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑
	ALI							↑↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑
Cu NW	submers	6,0 ± 2,7	57 ± 3,1	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑
	ALI							↑↑↑	↑	↑↑↑	↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑
Ag NP	submers	0,5 ± 0,1	0,2 ± 0,0	↑	↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑
	ALI							↑↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑	↑↑↑	↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑
Ag NW	submers	0,5 ± 0,2	0,2 ± 0,0	↑	↑↑	↑↑	↑↑↑	0	0	↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑	↑	↑
	ALI							↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑
Ni NP	submers	3,7 ± 0,4	56,1 ± 15,5	↑↑	↑↑↑	↑	↑	↑↑	↑↑	0	0	↑↑↑	↑↑↑	↑	↑↑↑	↑	↑↑↑
Ni NW	submers	0,9 ± 0,6	35,5 ± 10,1	↑	↑↑↑	0	0	↑↑	↑↑	0	0	↑↑	↑↑	0	↑	↑↑	↑↑
TiO2 NP	submers	0,002	0,022	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CeO2 NP	submers	0,001	0,021	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CNT	submers							↑↑	↑↑	0	0	↑	↑↑	0	↑	0	↑

nicht durchgeführt
 0 keine Induktion
↑↑ moderate Induktion
↑ geringe Induktion
↑↑↑ hohe Induktion

Abbildung 40: Übersicht über die toxikologischen Endpunkte verschiedener Nanomaterialien in einer Monokultur aus Beas-2B-Zellen und einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen mit differenzierten THP-1-Zellen mit makrophagenähnlichen Eigenschaften. AAF: artifizielle alveoläre Flüssigkeit; ALF: artifizielle lysosomale Flüssigkeit;

Dabei wurde auch deutlich, dass die Zellsysteme nach ALI-Exposition sensibler reagierten. Die submerse Inkubation macht eine Abschätzung der absolut deponierten Dosis schwierig, da die

Materialien durch Ausbildung einer Proteincorona im Medium stabilisiert werden können und somit nicht absedimentieren oder weil die Materialien bereits extrazellulär im Medium Ionen freisetzen können. Vor allem letzteres könnte eine Begründung dafür sein, warum eine verstärkte Toxizität nach ALI-Exposition vor allem für die vergleichsweise leichter löslichen Kupfer-basierten Materialien beobachtet wurde.

Durch den Vergleich einer Mono- und einer Kokultur konnte ferner gezeigt werden, dass sich die Wirkmechanismen in beiden Zellkultursystemen in Abhängigkeit des untersuchten Materials unterscheiden. Während die Kokultur gegenüber schnell löslichen Materialien einen protektiven Effekt aufwies, zeigte sie sich gegenüber schlechter löslichen Materialien als sensitiveres System. Die lysosomale Löslichkeit stellt also einen wichtigen Faktor für die Vorhersage einer toxischen Wirkung dar. Von dieser Löslichkeit hängt unter anderem ab, ob eine Morphologie-spezifische Wirkung vorliegt. Für Materialien mit einer hohen lysosomalen Löslichkeit ist eine Wirkung, die ausschließlich durch freigesetzte Ionen verursacht wird, wahrscheinlich. Als Beispiel hierfür können die Kupfer-basierten Materialien herangezogen werden, für die trotz unterschiedlicher partikulärer und faserförmiger Morphologien ein vergleichbares Toxizitätsprofil ermittelt werden konnte. Der zugrundeliegende Mechanismus für diese Materialgruppe ist der vielfach demonstrierte *trojan horse type* Mechanismus, der auf einer endozytotischen Aufnahme gefolgt von einer intrazellulären Freisetzung von Metallionen beruht (Strauch *et al.*, 2020; Jeong *et al.*, 2018; Karlsson *et al.*, 2008; Semisch *et al.*, 2014). Eine schematische Darstellung über den Wirkmechanismus von Nanomaterialien, die eine hohe Löslichkeit im sauren Milieu aufweisen, ist in Abbildung 41 zu sehen.

Materialien mit geringerer Löslichkeit zeigten dagegen Morphologie-spezifische Unterschiede. Besonders deutlich war dieser Effekt für die in dieser Arbeit untersuchten unlöslichen Materialien zu sehen: Während TiO₂ NP und CeO₂ NP nach 24 h keine toxikologisch relevanten Effekte verursachten, zeigten sich im Falle der unlöslichen CNT Effekte in der zytotoxischen und inflammatorischen Wirkung. Vor allem in der Kokultur wurde eine faserspezifische Toxizität beobachtet. Folgender Wirkmechanismus kann daher für unlösliche Materialien abgeleitet werden: Die Aufnahme aller unlöslichen Materialien verläuft über endozytotische Mechanismen in die Zelle ab. CNT werden vor allem von Makrophagen über Phagozytose aufgenommen. Ab einer Länge von 10 µm können Makrophagen die Fasern nicht mehr vollständig phagozytieren und es kommt zu einer sog. „frustrierten Phagozytose“. Dies verursacht eine zelluläre Antwort durch Ausschüttung von Stressfaktoren wie Zytokinen, wodurch eine inflammatorische Antwort

der Zelle über den NF- κ B-Signalweg ausgelöst wird (Padmore *et al.*, 2017). Kürzere Fasern, die vollständig phagozytiert werden können, können darüber hinaus einen Lysosomenbruch verursachen, der wiederum mit der Induktion von oxidativem Stress und Inflammation einhergeht (Keshavan *et al.*, 2021). Eine Übersicht über den Wirkmechanismus unlöslicher *Nanowire* ist in Abbildung 42 zu sehen.

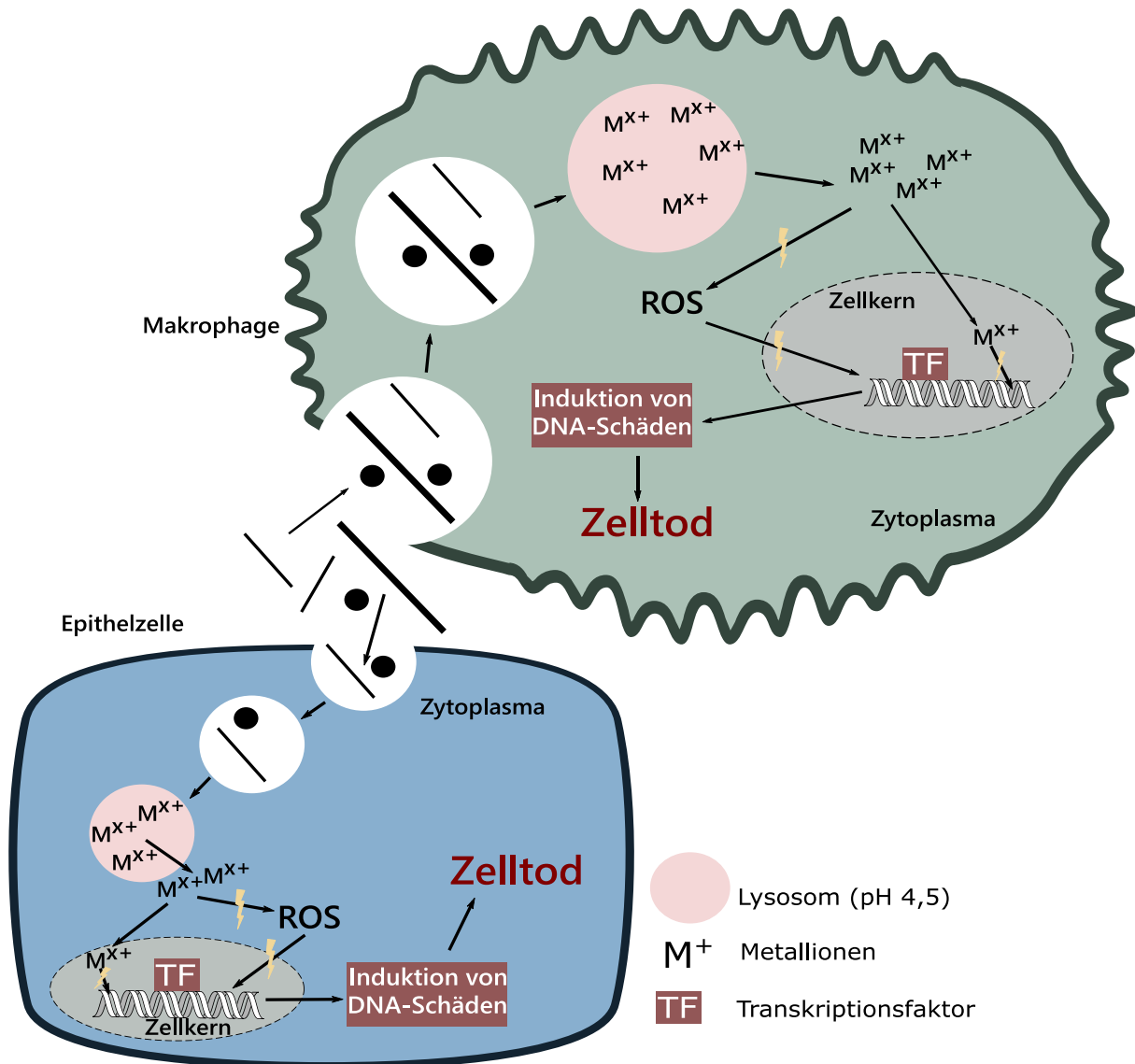


Abbildung 41: Schematische Darstellung des Wirkmechanismus leicht löslicher Metall-basierter Nanomaterialien. Die Materialien werden unabhängig von ihrer Morphologie endo- bzw. phagozytotisch in die Zellen aufgenommen und lysosomal freigesetzt. Freigesetzte Metallionen können entweder zur Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und damit zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führen oder durch räumliche Nähe zum Zellkern direkt mit der DNA interagieren.

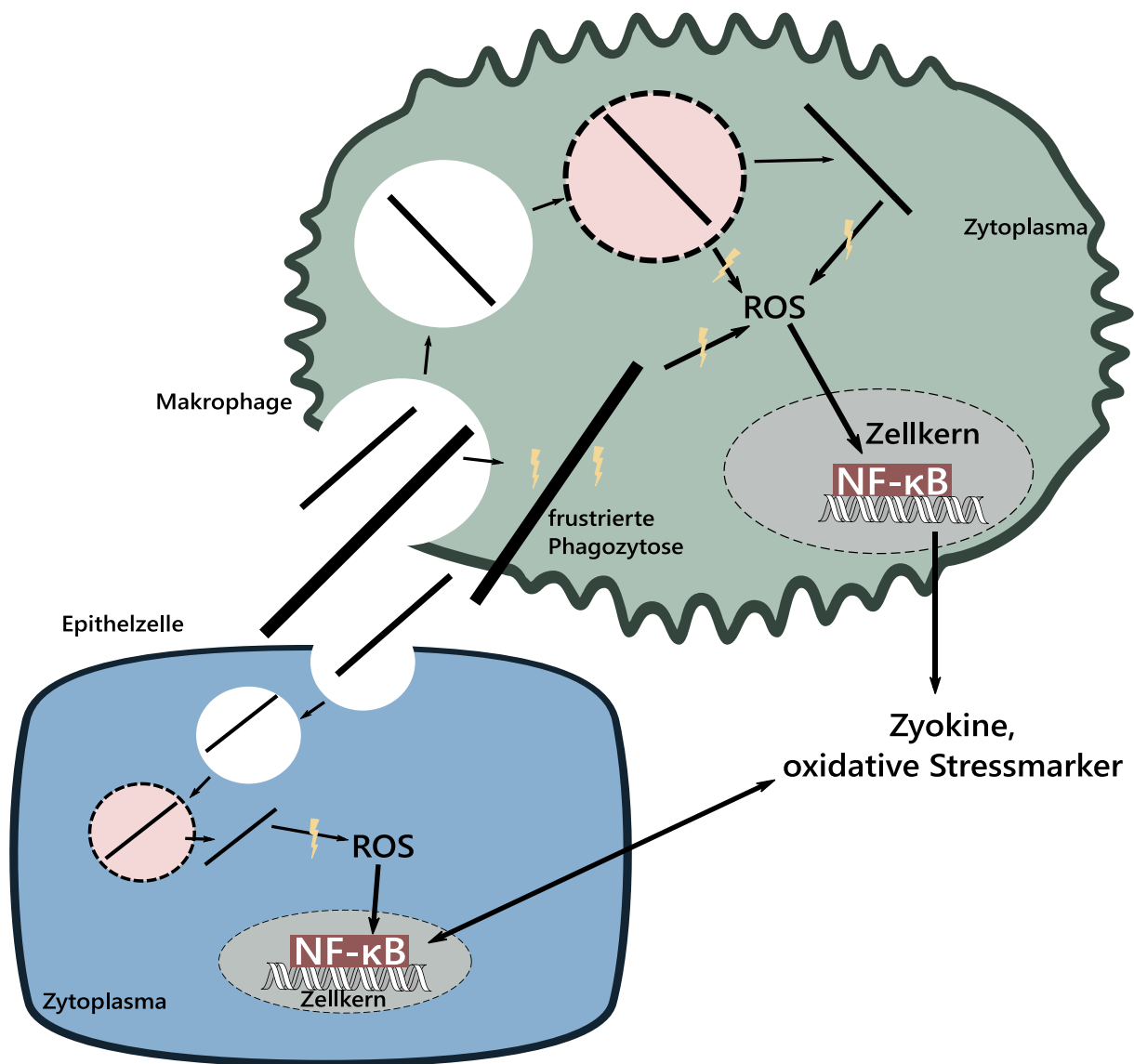


Abbildung 42: Schematische Darstellung des Wirkmechanismus unlöslicher *Nanowire*. Die Aufnahme erfolgt über Phagozytose. Je nach Länge der Fasern kommt es zu einer „frustrierten Phagozytose“ oder zu einer vollständigen Aufnahme gefolgt von einem Lysosomenbruch. Beides führt zur Induktion des NF-κB-Signalwegs, wodurch eine Ausschüttung an Zytokinen und oxidativen Stressmarkern verursacht wird.

Für Silber- und Nickel-basierte Materialien konnte kein klarer Zusammenhang zwischen lysosomaler Freisetzung von Metallionen und der Wirkweise beobachtet werden. Beide Metalle zeigten in der zellulären Verfügbarkeit starke Unterschiede in den Zelllinien. Während die Materialien in Epithelzellen nur geringfügig Ionen freisetzen, führten sie zu einer höheren Ionenfreisetzung in den Makrophagen. Diese Diskrepanz war vor allem für die untersuchten *Nanowire* zu sehen, was mit dem Aufnahmemechanismus dieser Materialien über Phagozytose

begründet werden kann. Vor allem für Nickel-basierte Materialien wurde außerdem eine zeitabhängige Auflösung beobachtet.

Ag NP zeigten trotz der geringeren Freisetzung an Metallionen einen Wirkmechanismus, der ähnlich zu dem der Kupfer-basierten Materialien war. Auch hier wurden hohe Konzentrationen an Silberionen im Zellkern gefunden und beide Materialien wiesen einen Wirkmechanismus über Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und Nrf2 und eine genotoxische Wirkung auf. Zumindest für Ag NP kann eine lysosomale Auflösung als wahrscheinlich angesehen werden, die aufgrund einer raschen Bildung von Sekundärstrukturen nur teilweise detektiert werden konnte. Darüber hinaus gibt es allerdings auch Hinweise auf eine Partikelwirkung von Ag NP. Für Ag NW konnte kein einheitliches Bild gezeichnet werden. ALI-Untersuchungen zur Zytotoxizität geben Hinweise auf eine Fasertoxizität der Ag NW, diese konnte jedoch submers und in Genexpressionsanalysen nicht bestätigt werden.

Die Beobachtungen zum Wirkmechanismus der Nickel-basierten Materialien zeigten sowohl Effekte, die auf der Freisetzung von Nickelionen beruhen als auch Morphologie-spezifische Effekte, vor allem für Ni NW. Die Kokultur reagierte hierbei wesentlich empfindlicher, was mit einem durch Makrophagen verursachten „oxidativen *Burst*“ begründet werden kann.

Zusammengefasst zeigt die vorgelegte Arbeit, dass die Toxizität von Metall-basierten Nanomaterialien unter anderem von physikochemischen Eigenschaften wie der Löslichkeit, insbesondere unter sauren Bedingungen, wie sie in den Lysosomen herrschen, abhängt. Diese bestimmt im Wesentlichen den Wirkmechanismus der Materialien. Kokulturen geben dabei ein realitätsnäheres Bild, indem sie entweder protektive Effekte oder eine synergistische Toxizität beispielsweise durch einen „oxidativen *Burst*“ aufweisen. Die ALI-Exposition hat sich als sensitiveres System im Vergleich zur submersen Kultivierung herausgestellt. Die Beobachtungen dieser Arbeit unterstreichen die Notwendigkeit erweiterter Inhalationsmodelle in der Partikel- und Fasertoxikologie, die eine *in vivo*-Situation besser widerspiegeln und somit zu einer Reduktion herkömmlicher *in vivo*-Experimente beitragen können.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- AHAMED, M. (2011). Toxic response of nickel nanoparticles in human lung epithelial A549 cells. *Toxicology In Vitro*, 25 (4), 930–936.
- AHAMED, M., AKHTAR, M. J., ALHADLAQ, H. A. & ALROKAYAN, S. A. (2015). Assessment of the lung toxicity of copper oxide nanoparticles: current status. *Nanomedicine*, 10 (15), 2365–2377.
- ÅKERLUND, E., CAPPELLINI, F., DI BUCCHIANICO, S., ISLAM, S., SKOGLUND, S., DERR, R., ODNEVALL WALLINDER, I., HENDRIKS, G. & 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. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 59 (3), 211–222.
- ÅKERLUND, E., ISLAM, M. S., MCCARRICK, S., ALFARO-MORENO, E. & KARLSSON, H. L. (2019). Inflammation and (secondary) genotoxicity of Ni and NiO nanoparticles. *Nanotoxicology*, 13 (8), 1060–1072.
- AKHTAR, M. J., KUMAR, S., ALHADLAQ, H. A., ALROKAYAN, S. A., ABU-SALAH, K. M. & AHAMED, M. (2016). Dose-dependent genotoxicity of copper oxide nanoparticles stimulated by reactive oxygen species in human lung epithelial cells. *Toxicology and Industrial Health*, 32 (5), 809–821.
- ALBANESE, A. & CHAN, W. C. (2011). Effect of gold nanoparticle aggregation on cell uptake and toxicity. *ACS Nano*, 5 (7), 5478–5489.
- ANDREW, A. S., WARREN, A. J., BARCOWSKY, A., TEMPLE, K. A., KLEI, L., SOUCY, N. V., O'HARA, K. A. & HAMILTON, J. W. (2003). Genomic and proteomic profiling of responses to toxic metals in human lung cells. *Environmental Health Perspectives*, 111 (6), 825–835.
- ANREDDY, R. N. (2018). Copper oxide nanoparticles induces oxidative stress and liver toxicity in rats following oral exposure. *Toxicology Reports*, 2018 (5), 903–904.
- AOKI, K. & SAITO, N. (2020). Biocompatibility and Carcinogenicity of Carbon Nanotubes as Biomaterials. *Nanomaterials*, 10 (2).
- ARMSTEAD, A. L. & LI, B. (2016). In vitro inflammatory effects of hard metal (WC-Co) nanoparticle exposure. *International Journal of Nanomedicine*, 11 (), 6195–6206.
- ASHARANI, P. V., LOW KAH MUN, G., HANDE, M. P. & VALIYAVEETIL, S. (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*, 3 (2), 279–290.
- BABIOR, B. M. (2000). Phagocytes and oxidative stress. *Physiology in Medicine* (109), 33–44.
- BAHL, A., HELLACK, B., WIEMANN, M., GIUSTI, A., WERLE, K., HAASE, A. & WOHLLEBEN, W. (2020). Nanomaterial categorization by surface reactivity: A case study comparing 35 materials with four different test methods. *NanoImpact*, 19 (2), 100234.
- BAIRD, L. & YAMAMOTO, M. (2020). The molecular mechanisms regulating the KEAP1-NRF2 pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 40 (13).
- BARBARINO, M. & GIORDANO, A. (2021). Assessment of the carcinogenicity of carbon nanotubes in the respiratory system. *Cancers*, 13 (6).

- BAuA (2008). The world health report 1997: Conquering suffering; enriching humanity. *Technische Regeln für Gefahrstoffe* (521), 3.
- BEN-SASSON, M., LU, X., NEJATI, S., JARAMILLO, H. & ELIMELECH, M. (2016). In situ surface functionalization of reverse osmosis membranes with biocidal copper nanoparticles. *Desalination*, 388 (), 1–8.
- BESSA, M. J., BRANDÃO, F., FOKKENS, P. H., LESEMAN, D. L., BOERE, A. J., CASSEE, F. R., SALMATONIDIS, A., VIANA, M., VULPOI, A., SIMON, S. & MONFORT, E. ET AL. (2021). In vitro toxicity of industrially relevant engineered nanoparticles in human alveolar epithelial cells: air-liquid interface versus submerged cultures. *Nanomaterials*, 11 (12).
- BHATTACHARYA, K., DAVOREN, M., BOERTZ, J., SCHINS, R. P., HOFFMANN, E. & DOPP, E. (2009). Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. *Particle and Fibre Toxicology*, 6 (17).
- BHATTACHARYA, K., KILIÇ, G., COSTA, P. M. & FADEEL, B. (2017). Cytotoxicity screening and cytokine profiling of nineteen nanomaterials enables hazard ranking and grouping based on inflammogenic potential. *Nanotoxicology*, 11 (6), 809–826.
- BHOWMICK, R. & GAPPA-FAHLENKAMP, H. (2016). Cells and culture systems used to model the small airway epithelium. *Lung*, 194 (3), 419–428.
- BIERKANDT, F. S., LEIBROCK, L., WAGENER, S., LAUX, P. & LUCH, A. (2018). The impact of nanomaterial characteristics on inhalation toxicity. *Toxicology Research*, 7 (3), 321–346.
- BIOLA-CLIER, M., BEAL, D., CAILLAT, S., LIBERT, S., ARMAND, L., HERLIN-BOIME, N., SAUVAIGO, S., DOUKI, T. & CARRIERE, M. (2017). Comparison of the DNA damage response in BEAS-2B and A549 cells exposed to titanium dioxide nanoparticles. *Mutagenesis*, 32 (1), 161–172.
- 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. ET AL. (2021). Toxicity and chemical transformation of silver nanoparticles in A549 lung cells: Dose-rate-dependent genotoxic impact. *Environmental Science: Nano*, 8 (3), 806–821.
- BRAAKHUIS, H. M., GOSENS, I., KRYSZEK, P., BOERE, J. A., CASSEE, F. R., FOKKENS, P. H., POST, J. A., VAN LOVEREN, H. & Park, M. V. D. Z. (2014). Particle size dependent deposition and pulmonary inflammation after short-term inhalation of silver nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology*, 11 (49), 1–16.
- BRAAKHUIS, H. M., MURPHY, F., MA-HOCK, L., DEKKERS, S., KELLER, J., OOMEN, A. G. & STONE, V. (2021). An integrated approach to testing and assessment to support grouping and read-across of nanomaterials after inhalation exposure. *Applied In Vitro Toxicology*, 7 (3), 112–128.
- BRANDÃO, F., FERNÁNDEZ-BERTÓLEZ, N., ROSÁRIO, F., BESSA, M. J., FRAGA, S., PÁSARO, E., TEIXEIRA, J. P., LAFFON, B., VALDIGLESIAS, V. & COSTA, C. (2020). Genotoxicity of TiO₂ nanoparticles in four different human cell Lines (A549, HEPG2, A172 and SH-SY5Y). *Nanomaterials*, 10 (3).
- BRAYDICH-STOLLE, L. K., SCHAEUBLIN, N. M., MURDOCK, R. C., JIANG, J., BISWAS, P., SCHLAGER, J. J. & HUSSAIN, S. M. (2009). Crystal structure mediates mode of cell death in TiO₂ nanotoxicity. *Journal of Nanoparticle Research*, 11 (6), 1361–1374.
- BREITNER, E. K., BURNS, K. E., HUSSAIN, S. M. & COMFORT, K. K. (2018). Implementation of physiological fluids to provide insight into the characterization, fate, and biological interactions of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 29 (25).

- CAI, T., LI, X., DING, J., LUO, W., LI, J. & HUANG, C. (2011). A cross-talk Between NFAT and NF- κ B pathways is crucial for nickel-induced Cox-2 expression in Beas-2B Cells. *Current Cancer Drug Targets*, 11 (5), 548–559.
- CALVO, J., JUNG, H. & MELONI, G. (2017). Copper metallothioneins. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 69 (4), 236–245.
- CAPASSO, L., CAMATINI, M. & GUALTIERI, M. (2014). Nickel oxide nanoparticles induce inflammation and genotoxic effect in lung epithelial cells. *Toxicology Letters*, 226 (1), 28–34.
- CERVENA, T., ROSSNEROVA, A., ZAVODNA, T., SIKOROVA, J., VRBOVA, K., MILCOVA, A., TOPINKA, J. & ROSSNER, P. (2021). Testing strategies of the in vitro micronucleus assay for the genotoxicity assessment of nanomaterials in BEAS-2B cells. *Nanomaterials*, 11 (8).
- CHANPUT, W., MES, J. J. & WICHERS, H. J. (2014). THP-1 cell line: An *in vitro* cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology*, 23 (1), 37–45.
- CHAREHSAZ, M., COSKUN, S., UNALAN, H. E., REIS, R., HELVACIOGLU, S., GIRI, A. K. & AYDIN, A. (2017). Genotoxicity study of high aspect ratio silver nanowires. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 99 (5-6), 837–847.
- CHARLES, S., JOMINI, S., FESSARD, V., BIGORGNE-VIZADE, E., ROUSSELLE, C. & MICHEL, C. (2018). Assessment of the in vitro genotoxicity of TiO₂ nanoparticles in a regulatory context. *Nanotoxicology*, 12 (4), 357–374.
- 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. *ET AL.* (2013). Sulfidation of silver nanowires inside human alveolar epithelial cells: A potential detoxification mechanism. *Nanoscale*, 5 (20), 9839–9847.
- CHO, W.-S., DUFFIN, R., POLAND, C. A., HOWIE, S. E., MACNEE, W., BRADLEY, M., MEGSON, I. L. & DONALDSON, K. (2010). Metal oxide nanoparticles induce unique inflammatory footprints in the lung: important implications for nanoparticle testing. *Environmental Health Perspectives*, 118 (12), 1699–1706.
- CHUNG, K. F., SEIFFERT, J., CHEN, S., THEODOROU, I. G., GOODE, A. E., LEO, B. F., MCGILVER, C. M., HUSSAIN, F., WIEGMAN, C., ROSSIOS, C. & ZHU, J. *ET AL.* (2017). Inactivation, clearance, and functional effects of lung-instilled short and long silver nanowires in rats. *ACS Nano*, 11 (3), 2652–2664.
- CLANCY, H. A., SUN, H., PASSANTINO, L., KLUZ, T., MUÑOZ, A., ZAVADIL, J. & COSTA, M. (2012). Gene expression changes in human lung cells exposed to arsenic, chromium, nickel or vanadium indicate the first steps in cancer. *Metallomics : Integrated Biometal Science*, 4 (8), 784–793.
- CRONHOLM, P., KARLSSON, H. L., HEDBERG, J., LOWE, T. A., WINNBERG, L., ELIHN, K., WALLINDER, I. O. & MÖLLER, L. (2013). Intracellular uptake and toxicity of Ag and CuO nanoparticles: A comparison between nanoparticles and their corresponding metal ions. *Small*, 9 (7), 970–982.
- DENKHAUS, E. & SALNIKOW, K. (2002). Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. *Critical Reviews in Oncology* (42), 35–56.
- DENLUCK, L., WU, F., CRANDON, L. E., HARPER, B. J. & HARPER, S. L. (2018). Reactive oxygen species generation is likely a driver of copper based nanomaterial toxicity. *Environmental Science: Nano*, 5 (6), 1473–1481.
- DHAND, R. (2004). New frontiers in aerosol delivery during mechanical ventilation. *Respiratory Care*, 49 (6), 666–677.

- DI BUCCHIANICO, S., CAPPELLINI, F., LE BIHANIC, F., ZHANG, Y., DREIJ, K. & KARLSSON, H. L. (2017). Genotoxicity of TiO₂ nanoparticles assessed by mini-gel comet assay and micronucleus scoring with flow cytometry. *Mutagenesis*, 32 (1), 127–137.
- DI BUCCHIANICO, S., GLIGA, A. R., ÅKERLUND, E., SKOGLUND, S., WALLINDER, I. O., FADEEL, B. & KARLSSON, H. L. (2018). Calcium-dependent cyto- and genotoxicity of nickel metal and nickel oxide nanoparticles in human lung cells. *Particle and Fibre Toxicology*, 15 (1), 32.
- DI CRISTO, L., BIANCHI, M. G., CHIU, M., TAURINO, G., DONATO, F., GARZARO, G., BUSSOLATI, O. & BERGAMASCHI, E. (2019). Comparative *in vitro* cytotoxicity of realistic doses of benchmark multi-walled carbon nanotubes towards macrophages and airway epithelial cells. *Nanomaterials*, 9 (7), 982.
- 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. & JACOBSEN, N. R. (2021). *In vitro-in vivo* correlations of pulmonary inflammogenicity and genotoxicity of MWCNT. *Particle and Fibre Toxicology*, 18 (1), 25.
- DIABATÉ, S., ARMAND, L., MURUGADOSS, S., DILGER, M., FRITSCH-DECKER, S., SCHLAGER, C., BÉAL, D., ARNAL, M.-E., BIOLA-CLIER, M., AMBROSE, S. & MÜLHOPT, S. ET AL. (2020). Air-liquid interface exposure of lung epithelial cells to low doses of nanoparticles to assess pulmonary adverse effects. *Nanomaterials*, 11 (1).
- DING, J., ZHANG, X., LI, J., SONG, L., OUYANG, W., ZHANG, D., XUE, C., COSTA, M., MELÉNDEZ, J. A. & HUANG, C. (2006). Nickel compounds render anti-apoptotic effect to human bronchial epithelial Beas-2B cells by induction of cyclooxygenase-2 through an IKKbeta/p65-dependent and IKKalpha- and p50-independent pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 281 (51), 39022–39032.
- DING, Y., WEINDL, P., LENZ, A.-G., MAYER, P., KREBS, T. & SCHMID, O. (2020). Quartz crystal microbalances (QCM) are suitable for real-time dosimetry in nanotoxicological studies using VITROCELL® Cloud cell exposure systems. *Particle and Fibre Toxicology*, 17 (1), 44.
- EDWARDS, D. L., WATAHA, J. C. & HANKS, C. T. (1998). Uptake and reversibility of uptake of nickel by human macrophages. *Journal of Oral Rehabilitation* (25), 2–7.
- EFSA (2022). Commission regulation (EU) 2022/63 of 14 January 2022 amending Annexes II and III to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council as regards the food additive titanium dioxide (E 171). *Official Journal of the European Union* (63).
- EL YAMANI, N., COLLINS, A. R., RUNDÉN-PRAN, E., FJELLSBØ, L. M., SHAPOSHNIKOV, S., ZIENOLDDINY, S. & 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 (1), 117–126.
- FELIX, L. P., PEREZ, J. E., CONTRERAS, M. F., RAVASI, T. & KOSEL, J. (2016). Cytotoxic effects of nickel nanowires in human fibroblasts. *Toxicology Reports* (3), 373–380.
- FISCHER, B. M., NEUMANN, D., PIBERGER, A. L., RISNES, S. F., KÖBERLE, B. & HARTWIG, A. (2016). Use of high-throughput RT-qPCR to assess modulations of gene expression profiles related to genomic stability and interactions by cadmium. *Archives of Toxicology*, 90 (11), 2745–2761.
- FIZEŞAN, I., CAMBIER, S., MOSCHINI, E., CHARY, A., NELISSEN, I., ZIEBEL, J., AUDINOT, J.-N., WIRTZ, T., KRUSZEWSKI, M., POP, A. & KISS, B. ET AL. (2019). *In vitro* exposure of a 3D-tetraculture representative for the alveolar barrier at the air-liquid interface to silver particles and nanowires. *Particle and Fibre Toxicology*, 16 (1), 14.

- FOLDBJERG, R., DANG, D. A. & AUTRUP, H. (2011). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Archives of Toxicology*, 85 (7), 743–750.
- FRANCIS, A. P. & DEVASENA, T. (2018). Toxicity of carbon nanotubes: A review. *Toxicology and Industrial Health*, 34 (3), 200–210.
- FREITAS, M., GOMES, A., PORTO, G. & FERNANDES, E. (2010). Nickel induces oxidative burst, NF- κ B activation and interleukin-8 production in human neutrophils. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 15 (8), 1275–1283.
- FRIESEN, A., FRITSCH-DECKER, S., HUFNAGEL, M., MÜLHOPT, S., STAPF, D., HARTWIG, A. & WEISS, C. (2022). Comparing α -Quartz-Induced Cytotoxicity and Interleukin-8 Release in Pulmonary Mono- and Co-Cultures Exposed under Submerged and Air-Liquid Interface Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 23 (12).
- FRÖHLICH, E. (2018). Comparison of conventional and advanced in vitro models in the toxicity testing of nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46 (2), 1091–1107.
- FUJII-KURIYAMA, Y., IMATAKA, H., SOGAWA, K., YASUMOTO, K. & KIKUCHI, Y. (1992). Regulation of CYP1A1 expression. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 6 (2), 706–710.
- FUKAI, E., SATO, H., WATANABE, M., NAKAE, D. & TOTSUKA, Y. (2018). Establishment of an in vivo simulating co-culture assay platform for genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes. *Cancer Science*, 109 (4), 1024–1031.
- GARCÍA-RODRÍGUEZ, A., KAZANTSEVA, L., VILA, L., RUBIO, L., VELÁZQUEZ, A., RAMÍREZ, M. J., MARCOS, R. & HERNÁNDEZ, A. (2019a). Micronuclei detection by flow cytometry as a high-throughput approach for the genotoxicity testing of nanomaterials. *Nanomaterials*, 9 (12).
- GARCÍA-RODRÍGUEZ, A., RUBIO, L., VILA, L., XAMENA, N., VELÁZQUEZ, A., MARCOS, R. & HERNÁNDEZ, A. (2019b). The comet assay as a tool to detect the genotoxic potential of nanomaterials. *Nanomaterials*, 9 (10).
- GHOSH, M., ÖNER, D., DUCA, R.-C., COKIC, S. M., SEYS, S., KERKHOFS, S., VAN LANDUYT, K., HOET, P. & GODDERIS, L. (2017). Cyto-genotoxic and DNA methylation changes induced by different crystal phases of TiO₂-np in bronchial epithelial (16-HBE) cells. *Mutation Research* (796), 1–12.
- GLIGA, A. R., DI BUCCHIANICO, S., ÅKERLUND, E. & 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 (4).
- GLIGA, A. R., SKOGLUND, S., WALLINDER, I. O., FADEEL, B. & KARLSSON, H. L. (2014). Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Particle and Fibre Toxicology*, 11 (11), 1–17.
- GOSENS, I., MATHIJSSSEN, L. E., BOKKERS, B. G., MUIJSER, H. & CASSEE, F. R. (2014). Comparative hazard identification of nano- and micro-sized cerium oxide particles based on 28-day inhalation studies in rats. *Nanotoxicology*, 8 (6), 643–653.
- GREIM, H. & ZIEGLER-SKYLAKAKIS, K. (2007). Risk assessment for biopersistent granular particles. *Inhalation Toxicology*, 19 (1), 199–204.
- GREULICH, C., DIENDORF, J., SIMON, T., EGGELER, G., EPPLE, M. & KÖLLER, M. (2011). Uptake and intracellular distribution of silver nanoparticles in human mesenchymal stem cells. *Acta Biomaterialia*, 7 (1), 347–354.

- GRIGORE, M. E., BISCU, E. R., HOLBAN, A. M., GESTAL, M. C. & GRUMEZESCU, A. M. (2016). Methods of synthesis, properties and biomedical applications of CuO nanoparticles. *Pharmaceuticals*, 9 (4).
- GROSSE, Y., LOOMIS, D., GUYTON, K. Z., LAUBY-SECRETAN, B., EL GHISSASSI, F., BOUVARD, V., BENBRAHIM-TALLAA, L., GUHA, N., SCOCCIANI, C., MATTOCK, H. & STRAIF, K. (2014). Carcinogenicity of fluoroedenite, silicon carbide fibres and whiskers, and carbon nanotubes. *The Lancet Oncology*, 15 (13), 1427–1428.
- GU, Y., CHENG, S., CHEN, G., SHEN, Y., LI, X., JIANG, Q., LI, J. & CAO, Y. (2017). The effects of endoplasmic reticulum stress inducer thapsigargin on the toxicity of ZnO or TiO₂ nanoparticles to human endothelial cells. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 27 (3), 191–200.
- GUERRERO-CASTILLA, A., OLIVERO-VERBEL, J. & MARRUGO-NEGRETE, J. (2014). Heavy metals in wild house mice from coal-mining areas of Colombia and expression of genes related to oxidative stress, DNA damage and exposure to metals. *Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis* (762), 24–29.
- GUO, H., LIU, H., JIAN, Z., CUI, H., FANG, J., ZUO, Z., DENG, J., LI, Y., WANG, X., ZHAO, L. & GENG, Y. ET AL. (2019). Nickel induces inflammatory activation via NF- κ B, MAPKs, IRF3 and NLRP3 inflammasome signaling pathways in macrophages. *Aging*, 11 (23), 11659–11672.
- HAASE, A., DOMMERSHAUSEN, N., SCHULZ, M., LANDSIEDEL, R., REICHARDT, P., KRAUSE, B.-C., TENTSCHERT, J. & LUCH, A. (2017). Genotoxicity testing of different surface-functionalized SiO₂, ZrO₂ and silver nanomaterials in 3D human bronchial models. *Archives of Toxicology*, 91 (12), 3991–4007.
- HAASE, A., ROTT, S., MANTION, A., GRAF, P., PLENDL, J., THÜNEMANN, A. F., MEIER, W. P., TAUBERT, A., LUCH, A. & REISER, G. (2012). Effects of silver nanoparticles on primary mixed neural cell cultures: uptake, oxidative stress and acute calcium responses. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, 126 (2), 457–468.
- HACKENBERG, S., SCHERZED, A., KESSLER, M., HUMMEL, S., TECHNAN, A., FROELICH, K., GINZKEY, C., KOEHLER, C., HAGEN, R. & KLEINSASSER, N. (2011). Silver nanoparticles: evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. *Toxicology Letters*, 201 (1), 27–33.
- HADEI, M., RABBANI, S., NABIZADEH, R., MAHVI, A. H., MESDAGHINIA, A. & NADDAFI, K. (2022). Comparison of the toxic effects of pristine and photocatalytically used TiO₂ nanoparticles in mice. *Biological Trace Element Research*, 200 (5), 2298–2311.
- HANAGATA, N., ZHUANG, F., CONNOLLY, S., LI, J., OGAWA, N. & XU, M. (2011). Molecular responses of human lung epithelial cells to the toxicity of copper oxide nanoparticles inferred from whole genome expression analysis. *ACS Nano*, 5 (12), 9326–9338.
- HANIU, H., SAITO, N., MATSUDA, Y., TSUKAHARA, T., MARUYAMA, K., USUI, Y., AOKI, K., TAKANASHI, S., KOBAYASHI, S., NOMURA, H. & OKAMOTO, M. ET AL. (2013). Culture medium type affects endocytosis of multi-walled carbon nanotubes in BEAS-2B cells and subsequent biological response. *Toxicology In Vitro*, 27 (6), 1679–1685.
- HARTWIG, A., DALLY, H. & SCHLEPEGRELL, R. (1996). Sensitive analysis of oxidative DNA damage in mammalian cells: use of the bacterial Fpg protein in combination with alkaline unwinding. *Toxicology Letters* (88), 85–90.
- HARTWIG, A., KLYSZCZ-NASKO, H., SCHLEPEGRELL, R. & BEYERSMANN, D. (1993). Cellular damage by ferric nitrilotriacetate and ferric citrate in V79 cells: interrelationship between lipid peroxidation, DNA strand breaks and sister chromatid exchanges. *Carcinogenesis*, 14 (1), 107–112.

- HESS, J., ANGEL, P. & SCHORPP-KISTNER, M. (2004). AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *Journal of Cell Science*, 117 (25), 5965–5973.
- HIRANO, S., FUJITANI, Y., FURUYAMA, A. & KANNO, S. (2010). Uptake and cytotoxic effects of multi-walled carbon nanotubes in human bronchial epithelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 249 (1), 8–15.
- HOET, P. H., BRÜSKE-HOHLFELD, I. & SALATA, O. V. (2004). Nanoparticles - known and unknown health risks. *Journal of Nanobiotechnology*, 2 (1), 12.
- HOLMGREN, A. & LU, J. (2010). Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396 (1), 120–124.
- HOLOWIECKI, A., O'SHIELDS, B. & JENNY, M. J. (2016). Characterization of heme oxygenase and biliverdin reductase gene expression in zebrafish (*Danio rerio*): Basal expression and response to pro-oxidant exposures. *Toxicology and Applied Pharmacology* (311), 74–87.
- HORIE, M., YOSHIURA, Y., IZUMI, H., OYABU, T., TOMONAGA, T., OKADA, T., LEE, B.-W., MYOJO, T., KUBO, M., SHIMADA, M. & MORIMOTO, Y. (2016). Comparison of the pulmonary oxidative stress caused by intratracheal instillation and inhalation of NiO nanoparticles when equivalent amounts of NiO are retained in the lung. *Antioxidants*, 5 (1).
- HSIAO, I.-L., HSIEH, Y.-K., WANG, C.-F., CHEN, I.-C. & HUANG, Y.-J. (2015). Trojan-horse mechanism in the cellular uptake of silver nanoparticles verified by direct intra- and extracellular silver speciation analysis. *Environmental Science & Technology*, 49 (6), 3813–3821.
- HUA, J., VIJVER, M. G., AHMAD, F., RICHARDSON, M. K. & PEIJNENBURG, W. J. (2014). Toxicity of different-sized copper nano- and submicron particles and their shed copper ions to zebrafish embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33 (8), 1774–1782.
- HUFNAGEL, M., NEUBERGER, R., WALL, J., LINK, M., FRIESEN, A. & HARTWIG, A. (2021). Impact of differentiated macrophage-like cells on the transcriptional toxicity profile of CuO nanoparticles in co-cultured lung epithelial cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (9).
- HUFNAGEL, M., SCHOCH, S., WALL, J., STRAUCH, B. M. & HARTWIG, A. (2020). Toxicity and gene expression profiling of copper- and titanium-based nanoparticles using air-liquid interface exposure. *Chemical Research in Toxicology*, 33 (5), 1237–1249.
- IARC (2012). Nickel and nickel compounds. *IARC Monographs* (100C).
- ILES, K. E., DICKINSON, D. A., WATANABE, N., IWAMOTO, T. & FORMAN, H. J. (2002). AP-1 activation through endogenous H₂O₂ generation by alveolar macrophages. *Free Radical Biology & Medicine*, 32 (12), 1304–1313.
- INOUE, K.-I., YANAGISAWA, R., KOIKE, E., NISHIKAWA, M. & TAKANO, H. (2010). Repeated pulmonary exposure to single-walled carbon nanotubes exacerbates allergic inflammation of the airway: Possible role of oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 48 (7), 924–934.
- IQBAL, S., JABEEN, F., CHAUDHRY, A. S., SHAH, M. A. & BATIHA, G. E.-S. (2021). Toxicity assessment of metallic nickel nanoparticles in various biological models: An interplay of reactive oxygen species, oxidative stress, and apoptosis. *Toxicology and Industrial Health*, 37 (10), 635–651.
- JAIN, P. & PRADEEP, T. (2005). Potential of silver nanoparticle-coated polyurethane foam as an antibacterial water filter. *Biotechnology and Bioengineering*, 90 (1), 59–63.

- JANG, J., PARK, S. & CHOI, I.-H. (2021). Increased Interleukin-11 and stress-related gene expression in human endothelial and bronchial epithelial cells exposed to silver nanoparticles. *Biomolecules*, 11 (2).
- JENSEN, K. A., KEMBOUCHE, Y., CHRISTIANSEN, E., JACOBSEN, N., WALLIN, H., GUIOT, C., SPALLA, O. & WITSCHGER, O. (2017). Final protocol for producing suitable manufactured nanomaterial exposure media-Standard Operation Procedure (SOP) and background documentation ().
- JEONG, J., KIM, S.-H., LEE, S., LEE, D.-K., HAN, Y., JEON, S. & CHO, W.-S. (2018). Differential contribution of constituent metal ions to the cytotoxic effects of fast-dissolving metal-oxide nanoparticles. *Frontiers in Pharmacology* (9), 15.
- JESUS CRUZ, M., COSTA, R., MARQUILLES, E., MORELL, F. & MUÑOZ, X. (2006). Occupational asthma caused by chromium and nickel. *Archivos de Bronconeumología*, 42 (6), 302–306.
- JIANG, X., MICLĂUȘ, T., WANG, L., FOLDBJERG, R., SUTHERLAND, D. S., AUTRUP, H., CHEN, C. & BEER, C. (2015). Fast intracellular dissolution and persistent cellular uptake of silver nanoparticles in CHO-K1 cells: implication for cytotoxicity. *Nanotoxicology*, 9 (2), 181–189.
- JIN, C., TANG, Y., YANG, F. G., LI, X. L., XU, S., FAN, X. Y., HUANG, Y. Y. & YANG, Y. J. (2011). Cellular toxicity of TiO₂ nanoparticles in anatase and rutile crystal phase. *Biological Trace Element Research*, 141 (1-3), 3–15.
- JOMOVA, K., BAROS, S. & VALKO, M. (2012). Redox active metal-induced oxidative stress in biological systems. *Transition Metal Chemistry*, 37 (2), 127–134.
- KAMBE, T., WEAVER, B. P. & ANDREWS, G. K. (2008). The genetics of essential metal homeostasis during development. *Genesis*, 46 (4), 214–228.
- KARLSSON, H. L., CRONHOLM, P., GUSTAFSSON, J. & MÖLLER, L. (2008). Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chemical Research in Toxicology*, 21 (9), 1726–1732.
- KAŠPAR, J., FORNASIERO, P. & GRAZIANI, M. (1999). Use of CeO₂-based oxides in the three-way catalysis. *Catalysis Today*, 50 (2), 285–298.
- KASPER, J., HERMANN, M. I., BANTZ, C., MASKOS, M., STAUBER, R., POHL, C., UNGER, R. E. & KIRKPATRICK, J. C. (2011). Inflammatory and cytotoxic responses of an alveolar-capillary coculture model to silica nanoparticles: Comparison with conventional monocultures. *Particle and Fibre Toxicology*, 8 (1), 6.
- KE, Q., LI, Q., ELLEN, T. P., SUN, H. & COSTA, M. (2008). Nickel compounds induce phosphorylation of histone H3 at serine 10 by activating JNK-MAPK pathway. *Carcinogenesis*, 29 (6), 1276–1281.
- KESHAVAN, S., GUPTA, G., MARTIN, S. & FADEEL, B. (2021). Multi-walled carbon nanotubes trigger lysosome-dependent cell death (pyroptosis) in macrophages but not in neutrophils. *Nanotoxicology*, 15 (9), 1125–1150.
- KIM, H. R., KIM, M. J., LEE, S. Y., OH, S. M. & CHUNG, K. H. (2011). Genotoxic effects of silver nanoparticles stimulated by oxidative stress in human normal bronchial epithelial (BEAS-2B) cells. *Mutation Research*, 726 (2), 129–135.
- KIM, I., MOON, S. O., KIM, S. H., KIM, H. J., KOH, Y. S. & KOH, G. Y. (2001). Vascular endothelial growth factor expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through nuclear factor-kappa B activation in endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (10), 7614–7620.

- KLEIVEN, M., ROSSBACH, L. M., GALLEGU-URREA, J. A., BREDE, D. A., OUGHTON, D. H. & COUTRIS, C. (2018). Characterizing the behavior, uptake, and toxicity of NM300K silver nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37 (7), 1799–1810.
- KLETTING, S., BARTHOLD, S., REPNIK, U., GRIFFITHS, G., LORETZ, B., SCHNEIDER-DAUM, N., SOUZA CARVALHO-WODARZ, C. de & LEHR, C.-M. (2018). Co-culture of human alveolar epithelial (hAELVi) and macrophage (THP-1) cell lines. *ALTEX*, 35 (2), 211–222.
- KLUSKA, K., PERIS-DÍAZ, M. D., PŁONKA, D., MOYSA, A., DADLEZ, M., DENIAUD, A., BAL, W. & KRĘŻEL, A. (2020). Formation of highly stable multinuclear Ag_nSn clusters in zinc fingers disrupts their structure and function. *Chemical Communications*, 56 (9), 1329–1332.
- KOLTERMANN-JÜLLY, J., KELLER, J. G., VENNEMANN, A., WERLE, K., MÜLLER, P., MA-HOCK, L., LANDSIEDEL, R., WIEMANN, M. & 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.
- KUHLBUSCH, T. A., WIJNHOFEN, S. W. & HAASE, A. (2018). Nanomaterial exposures for worker, consumer and the general public. *NanoImpact*, 10 (5), 11–25.
- KURASHOVA, N. A., MADAIEVA, I. M. & KOLESNIKOVA, L. I. (2020). Expression of HSP70 Heat-Shock Proteins under Oxidative Stress. *Advances in Gerontology*, 10 (1), 20–25.
- KWON, J., SUH, Y. D., LEE, J., LEE, P., HAN, S., HONG, S., YEO, J., LEE, H. & KO, S. H. (2018). Recent progress in silver nanowire based flexible/wearable optoelectronics. *Journal of Materials Chemistry*, 6 (28), 7445–7461.
- LACROIX, G., KOCH, W., RITTER, D., GUTLEB, A. C., LARSEN, S. T., LORET, T., ZANETTI, F., CONSTANT, S., CHORTAREA, S., ROTHEN-RUTISHAUSER, B. & HIEMSTRA, P. S. ET AL. (2018). Air-Liquid Interface In Vitro Models for Respiratory Toxicology Research: Consensus Workshop and Recommendations. *Applied In Vitro Toxicology*, 4 (2), 91–106.
- LAI, X., ZHAO, H., ZHANG, Y., GUO, K., XU, Y., CHEN, S. & ZHANG, J. (2018). Intranasal delivery of copper oxide nanoparticles induces pulmonary toxicity and fibrosis in C57BL/6 mice. *Scientific Reports*, 8 (1), 4499.
- LANDSIEDEL, R., SAUER, U. G., MA-HOCK, L., SCHNEKENBURGER, J. & WIEMANN, M. (2014). Pulmonary toxicity of nanomaterials: a critical comparison of published in vitro assays and in vivo inhalation or instillation studies. *Nanomedicine*, 9 (16), 2557–2585.
- LANKOFF, A., SANDBERG, W. J., WEGIEREK-CIUK, A., LISOWSKA, H., REFSNES, M., SARTOWSKA, B., SCHWARZE, P. E., MECZYNSKA-WIELGOSZ, S., WOJEWODZKA, M. & KRUSZEWSKI, M. (2012). The effect of agglomeration state of silver and titanium dioxide nanoparticles on cellular response of HepG2, A549 and THP-1 cells. *Toxicology Letters*, 208 (3), 197–213.
- LATVALA, S., HEDBERG, J., DI BUCCHIANICO, S., MÖLLER, L., ODNEVALL WALLINDER, I., ELIHN, K. & KARLSSON, H. L. (2016). Nickel Release, ROS Generation and Toxicity of Ni and NiO Micro- and Nanoparticles. *PLoS One*, 11 (7).
- LAUX, P., TENTSCHERT, J., RIEBELING, C., BRAEUNING, A., CREUTZENBERG, O., EPP, A., FESSARD, V., HAAS, K.-H., HAASE, A., HUND-RINKE, K. & JAKUBOWSKI, N. ET AL. (2018). Nanomaterials: certain aspects of application, risk assessment and risk communication. *Archives of Toxicology*, 92 (1), 121–141.
- LENZ, A.-G., KARG, E., BRENDEL, E., HINZE-HEYN, H., MAIER, K. L., EICKELBERG, O., STOEGER, T. & SCHMID, O. (2013). Inflammatory and oxidative stress responses of an alveolar epithelial cell line to airborne

- zinc oxide nanoparticles at the air-liquid interface: a comparison with conventional, submerged cell-culture conditions. *BioMed Research International* (2013), 652632.
- LI, J. J., MURALIKRISHNAN, S., NG, C.-T., YUNG, L.-Y. L. & BAY, B.-H. (2010). Nanoparticle-induced pulmonary toxicity. *Experimental Biology and Medicine*, 235 (9), 1025–1033.
- LI, Y., QIN, T., INGLE, T., YAN, J., HE, W., YIN, J.-J. & CHEN, T. (2017). Differential genotoxicity mechanisms of silver nanoparticles and silver ions. *Archives of Toxicology*, 91 (1), 509–519.
- LI, Y. & WANG, W.-X. (2021). Uptake, intracellular dissolution, and cytotoxicity of silver nanowires in cell models. *Chemosphere* (281), 130762.
- LIMBACH, L. K., WICK, P., MANSER, P., GRASS, R. N., BRUININK, A. & STARK, W. J. (2007). Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. *Environmental Science & Technology*, 41 (11), 4158–4163.
- LIU, J. & HURT, R. H. (2010). Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. *Environmental Science & Technology*, 44 (6), 2169–2175.
- LIU, J., KUANG, F., KROEMER, G., KLIONSKY, D. J., KANG, R. & TANG, D. (2020). Autophagy-dependent ferroptosis: Machinery and regulation. *Cell Chemical Biology*, 27 (4), 420–435.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25 (4), 402–408.
- LOURO, H., PINHÃO, M., SANTOS, J., TAVARES, A., VITAL, N. & SILVA, M. J. (2016). Evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of benchmark multi-walled carbon nanotubes in relation to their physicochemical properties. *Toxicology Letters* (262), 123–134.
- LOZA, K., DIENDORF, J., SENGSTOCK, C., RUIZ-GONZALEZ, L., GONZALEZ-CALBET, J. M., VALLET-REGI, M., KÖLLER, M. & EPPLE, M. (2014). The dissolution and biological effects of silver nanoparticles in biological media. *Journal of Materials Chemistry*, 2 (12), 1634–1643.
- LUND, S. A., GIACHELLI, C. M. & SCATENA, M. (2009). The role of osteopontin in inflammatory processes. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 3 (3-4), 311–322.
- MA, C., SONG, M., ZHANG, Y., YAN, M., ZHANG, M. & BI, H. (2014). Nickel nanowires induce cell cycle arrest and apoptosis by generation of reactive oxygen species in HeLa cells. *Toxicology Reports* (1), 114–121.
- MA, Q. (2010). Transcriptional responses to oxidative stress: pathological and toxicological implications. *Pharmacology & Therapeutics*, 125 (3), 376–393.
- MAGAYE, R., GU, Y., WANG, Y., SU, H., ZHOU, Q., MAO, G., SHI, H., YUE, X., ZOU, B., XU, J. & ZHAO, J. (2016). In vitro and in vivo evaluation of the toxicities induced by metallic nickel nano and fine particles. *Journal of Molecular Histology*, 47 (3), 273–286.
- MAGAYE, R. & ZHAO, J. (2012). Recent progress in studies of metallic nickel and nickel-based nanoparticles' genotoxicity and carcinogenicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34 (3), 644–650.
- MAGAYE, R., ZHOU, Q., BOWMAN, L., ZOU, B., MAO, G., XU, J., CASTRANOVA, V., ZHAO, J. & DING, M. (2014). Metallic nickel nanoparticles may exhibit higher carcinogenic potential than fine particles in JB6 cells. *PLoS One*, 9 (4).
- MAKVANDI, P., CHEN, M., SARTORIUS, R., ZARRABI, A., ASHRAFIZADEH, M., DABBAGH MOGHADDAM, F., MA, J., MATTOLI, V. & TAY, F. R. (2021). Endocytosis of abiotic nanomaterials and nanobiovectors: Inhibition of membrane trafficking. *Nano Today* (40), 101279.

- MARAMBIO-JONES, C. & HOEK, E. M. (2010). A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*, 12 (5), 1531–1551.
- MARUYAMA, K., HANIU, H., SAITO, N., MATSUDA, Y., TSUKAHARA, T., KOBAYASHI, S., TANAKA, M., AOKI, K., TAKANASHI, S., OKAMOTO, M. & KATO, H. (2015). Endocytosis of Multiwalled Carbon Nanotubes in Bronchial Epithelial and Mesothelial Cells. *BioMed Research International* (2015), 793186.
- MATTEIS, V. de, MALVINDI, M. A., GALEONE, A., BRUNETTI, V., LUCA, E. de, KOTE, S., KSHIRSAGAR, P., SABELLA, S., BARDI, G. & POMPA, P. P. (2015). Negligible particle-specific toxicity mechanism of silver nanoparticles: The role of Ag⁺ ion release in the cytosol. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 11 (3), 731–739.
- MAZINANIAN, N., HEDBERG, Y. & ODNEVALL WALLINDER, I. (2013). Nickel release and surface characteristics of fine powders of nickel metal and nickel oxide in media of relevance for inhalation and dermal contact. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 65 (1), 135–146.
- MC SHAN, D., RAY, P. C. & YU, H. (2014). Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *Journal of Food and Drug analysis*, 22 (1), 116–127.
- MEDINA-REYES, E. I., DELGADO-BUENROSTRO, N. L., LESEMAN, D. L., DÉCIGA-ALCARAZ, A., HE, R., GREMMER, E. R., FOKKENS, P. H., FLORES-FLORES, J. O., CASSEE, F. R. & CHIRINO, Y. I. (2020). Differences in cytotoxicity of lung epithelial cells exposed to titanium dioxide nanofibers and nanoparticles: Comparison of air-liquid interface and submerged cell cultures. *Toxicology in vitro : an International Journal Published in Association with BIBRA* (65), 104798.
- MORE, S. L., KOVOCHICH, M., LYONS-DARDEN, T., TAYLOR, M., SCHULTE, A. M. & MADL, A. K. (2021). Review and evaluation of the potential health effects of oxidic nickel nanoparticles. *Nanomaterials*, 11 (3).
- NAM, V. B. & LEE, D. (2016). Copper nanowires and their applications for flexible, transparent conducting films: A review. *Nanomaterials*, 6 (3).
- NAZ, S., GUL, A. & ZIA, M. (2020). Toxicity of copper oxide nanoparticles: a review study. *IET Nanobiotechnology*, 14 (1), 1–13.
- NOUREEN, A., JABEEN, F., YAQUB, S. & FAKHR E ALAM, M. (2017). Assessment of genotoxicity and nephrotoxicity induced by copper nanoparticles and copper (II) oxide in *Cyprinus carpio*. *International Journal of Biosciences*, 11 (1), 360–371.
- NYMARK, P., CATALÁN, J., SUHONEN, S., JÄRVENTAU, H., BIRKEDAL, R., CLAUSEN, P. A., JENSEN, K. A., VIPPOLA, M., SAVOLAINEN, K. & NORPPA, H. (2013). Genotoxicity of polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles in BEAS 2B cells. *Toxicology*, 313 (1), 38–48.
- OBERDÖRSTER, G. (2002). Toxicokinetics and effects of fibrous and nonfibrous particles. *Inhalation Toxicology*, 14 (1), 29–56.
- ODA, E., OHKI, R., MURASAWA, H., NEMOTO, J., SHIBUE, T., YAMASHITA, T., TOKINO, T., TANIGUCHI, T. & TANAKA, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* (288), 1053–1058.
- ORTELLI, S., COSTA, A. L., BLOSI, M., BRUNELLI, A., BADETTI, E., BONETTO, A., HRISTOZOV, D. & MARCOMINI, A. (2017). Colloidal characterization of CuO nanoparticles in biological and environmental media. *Environmental Science: Nano*, 4 (6), 1264–1272.

- OUNI, S., ASKRI, D., JEJELI, M., ABDELMALEK, H., SAKLY, M. & AMARA, S. (2020). Toxicity and effects of copper oxide nanoparticles on cognitive performances in rats. *Archives of Environmental & Occupational Health*, 75 (7), 384–394.
- OYINLOYE, B. E., ADENOWO, A. F. & KAPPO, A. P. (2015). Reactive oxygen species, apoptosis, antimicrobial peptides and human inflammatory diseases. *Pharmaceuticals*, 8 (2), 151–175.
- PADMORE, T., STARK, C., TURKEVICH, L. A. & CHAMPION, J. A. (2017). Quantitative analysis of the role of fiber length on phagocytosis and inflammatory response by alveolar macrophages. *Biochimica et Biophysica acta. General Subjects*, 1861 (2), 58–67.
- PARK, E.-J., CHOI, J., PARK, Y.-K. & PARK, K. (2008a). Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology*, 245 (1-2), 90–100.
- PARK, E.-J., YI, J., CHUNG, K.-H., RYU, D.-Y., CHOI, J. & PARK, K. (2008b). Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology Letters*, 180 (3), 222–229.
- PEM, B., ČURLIN, M., DOMAZET JURAŠIN, D., VRČEK, V., BARBIR, R., MICEK, V., FRATILA, R. M., LA FUENTE, J. M. de & VINKOVIĆ VRČEK, I. (2021). Fate and transformation of silver nanoparticles in different biological conditions. *Beilstein Journal of Nanotechnology* (12), 665–679.
- PEREZ, J. E., CONTRERAS, M. F., VILANOVA, E., FELIX, L. P., MARGINEANU, M. B., LUONGO, G., PORTER, A. E., DUNLOP, I. E., RAVASI, T. & KOSEL, J. (2016). Cytotoxicity and intracellular dissolution of nickel nanowires. *Nanotoxicology*, 10 (7), 871–880.
- PIETRUSKA, J. R., LIU, X., SMITH, A., MCNEIL, K., WESTON, P., ZHITKOVICH, A., HURT, R. & KANE, A. B. (2011). Bioavailability, intracellular mobilization of nickel, and HIF-1 α activation in human lung epithelial cells exposed to metallic nickel and nickel oxide nanoparticles. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, 124 (1), 138–148.
- PINHEIRO, P. C., SOUSA, C. T., ARAÚJO, J. P., GUIOMAR, A. J. & TRINDADE, T. (2013). Functionalization of nickel nanowires with a fluorophore aiming at new probes for multimodal bioanalysis. *Journal of Colloid and Interface Science* (410), 21–26.
- PINTO, F., LOURENÇO, A. F., PEDROSA, J. F., GONÇALVES, L., VENTURA, C., VITAL, N., BETTENCOURT, A., FERNANDES, S. N., DA ROSA, R. R., GODINHO, M. H. & LOURO, H. ET AL. (2022). Analysis of the in vitro toxicity of nanocelluloses in human lung cells as compared to multi-walled carbon nanotubes. *Nanomaterials*, 12 (9).
- POLAND, C. A., BYRNE, F., CHO, W.-S., PRINA-MELLO, A., MURPHY, F. A., DAVIES, G. L., COEY, J. M., GOUNKO, Y., DUFFIN, R., VOLKOV, Y. & DONALDSON, K. (2012). Length-dependent pathogenic effects of nickel nanowires in the lungs and the peritoneal cavity. *Nanotoxicology* (6), 899–911.
- POLAND, C. A., DUFFIN, R., KINLOCH, I., MAYNARD, A., WALLACE, W. A., SEATON, A., STONE, V., BROWN, S., MACNEE, W. & DONALDSON, K. (2008). Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nature nanotechnology*, 3 (7), 423–428.
- PRASAD, R. Y., SIMMONS, S. O., KILLIUS, M. G., ZUCKER, R. M., KLIGERMAN, A. D., BLACKMAN, C. F., FRY, R. C. & DEMARINI, D. M. (2014). Cellular interactions and biological responses to titanium dioxide nanoparticles in HepG2 and BEAS-2B cells: role of cell culture media. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 55 (4), 336–342.
- PUISNEY, C., BAEZA-SQUIBAN, A. & BOLAND, S. (2018). Mechanisms of uptake and translocation of nanomaterials in the lung. *Advances in Experimental Medicine and Biology* (1048), 21–36.

- RANI, V. S., KUMAR, A. K., KUMAR, C. P. & REDDY, A. R. (2013). Pulmonary toxicity of copper oxide (CuO) nanoparticles in rats. *Journal of Medical Sciences*, 13 (7), 571–577.
- RASMUSSEN, K., COTOGNO, G., MAST, J., TEMMERMAN, P.-J. D., VERLEYSSEN, E., WAEGENEERS, N., VAN STEEN, F. & PIZZOLON, J. C. (2014). Multi-walled carbon nanotubes, NM-400, NM-401, NM-402, NM-403: characterisation and physico-chemical properties. *JRC Reports* (JRC91205).
- REDDEL, R. R., KE, Y., GERWIN, B. I., MCMENAMIN, M. G., LECHNER, J. F., SU, R. T., BRASH, D. E., PARK, J.-B., RHIM, J. S. & HARRIS, C. C. (1988). Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or Adenovirus-12 SV40 Hybrid Virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Research* (48), 1904–1909.
- ROSENKRANZ, P., FERNÁNDEZ-CRUZ, M. L., CONDE, E., RAMÍREZ-FERNÁNDEZ, M. B., FLORES, J. C., FERNÁNDEZ, M. & NAVAS, J. M. (2012). Effects of cerium oxide nanoparticles to fish and mammalian cell lines: An assessment of cytotoxicity and methodology. *Toxicology In Vitro*, 26 (6), 888–896.
- RUSHWORTH, S. A., CHEN, X.-L., MACKMAN, N., OGBORNE, R. M. & O'CONNELL, M. A. (2005). Lipopolysaccharide-induced heme oxygenase-1 expression in human monocytic cells is mediated via Nrf2 and protein kinase C. *Journal of Immunology*, 175 (7), 4408–4415.
- SALEM, S., HAMMAD, E., MOHAMED, A. & EL-DOUGDOUG, W. (2022). A comprehensive review of nanomaterials: Types, synthesis, characterization, and applications. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 13 (1), 41.
- SAMARDAK, A. S., SUKOVATITSINA, E. V., OGNIEV, A. V., CHEBOTKEVICH, L. A., MAHMOODI, R., PEIGHAMBARI, S. M., HOSSEINI, M. G. & NASIRPOURI, F. (2012). High-density nickel nanowire arrays for data storage applications. *Journal of Physics: Conference Series*, 345 (), 12011.
- SCHLICH, K., BEULE, L. & HUND-RINKE, K. (2016). Single versus repeated applications of CuO and Ag nanomaterials and their effect on soil microflora. *Environmental Pollution* (215), 322–330.
- SCHWERDTLE, T. & HARTWIG, A. (2006). Bioavailability and genotoxicity of soluble and particulate nickel compounds in cultured human lung cells. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, 37 (6), 521–525.
- SCHWOTZER, D., ERNST, H., SCHAUDIEN, D., KOCK, H., POHLMANN, G., DASENBROCK, C. & CREUTZENBERG, O. (2017). Effects from a 90-day inhalation toxicity study with cerium oxide and barium sulfate nanoparticles in rats. *Particle and Fibre Toxicology*, 14 (1), 23.
- SCHWOTZER, D., NIEHOF, M., SCHAUDIEN, D., KOCK, H., HANSEN, T., DASENBROCK, C. & CREUTZENBERG, O. (2018). Cerium oxide and barium sulfate nanoparticle inhalation affects gene expression in alveolar epithelial cells type II. *Journal of Nanobiotechnology*, 16 (1), 16.
- SECONDO, L. E., LIU, N. J. & LEWINSKI, N. A. (2017). Methodological considerations when conducting in vitro, air-liquid interface exposures to engineered nanoparticle aerosols. *Critical Reviews in Toxicology*, 47 (3), 225–262.
- SEGAL, D., OHANA, E., BESSER, L., HERSHFINKEL, M., MORAN, A. & SEKLER, I. (2004). A role for ZnT-1 in regulating cellular cation influx. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 323 (4), 1145–1150.
- SEMISCH, A., OHLE, J., WITT, B. & HARTWIG, A. (2014). Cytotoxicity and genotoxicity of nano - and microparticulate copper oxide: role of solubility and intracellular bioavailability. *Particle and Fibre Toxicology* (11), 10.
- SHAULIAN, E. & KARIN, M. (2001). AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* (20), 2390–2400.

- SHEEN, J.-H., WOO, J.-K. & DICKSON, R. B. (2003). c-Myc alters the DNA damage-induced G2/M arrest in human mammary epithelial cells. *British Journal of Cancer*, 89 (8), 1479–1485.
- SHIMIZU, K., KASHIWADA, S. & HORIE, M. (2022). Cellular effects of silver nanoparticle suspensions on lung epithelial cells and macrophages. *Applied Sciences*, 12 (7), 3554.
- SILVA, R. M., XU, J., SAIKI, C., ANDERSON, D. S., FRANZI, L. M., VULPE, C. D., GILBERT, B., VAN WINKLE, L. S. & PINKERTON, K. E. (2014). Short versus long silver nanowires: a comparison of in vivo pulmonary effects post instillation. *Particle and Fibre Toxicology* (11), 52.
- SINGH, R. P. & RAMARAO, P. (2012). Cellular uptake, intracellular trafficking and cytotoxicity of silver nanoparticles. *Toxicology Letters*, 213 (2), 249–259.
- SINGH, S., KUMAR, A., KARAKOTI, A., SEAL, S. & SELF, W. T. (2010). Unveiling the mechanism of uptake and sub-cellular distribution of cerium oxide nanoparticles. *Molecular BioSystems*, 6 (10), 1813–1820.
- SIVULKA, D. J. (2005). Assessment of respiratory carcinogenicity associated with exposure to metallic nickel: a review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 43 (2), 117–133.
- SOUZA, T. A. de, ROCHA, T. L. & FRANCHI, L. P. (2018). Detection of DNA damage induced by cerium dioxide nanoparticles: From models to molecular mechanism activated. *Advances in Experimental Medicine and Biology* (1048), 215–226.
- SRIVASTAVA, R. K., RAHMAN, Q., KASHYAP, M. P., SINGH, A. K., JAIN, G., JAHAN, S., LOHANI, M., LANTOW, M. & PANT, A. B. (2013). Nano-titanium dioxide induces genotoxicity and apoptosis in human lung cancer cell line, A549. *Human & Experimental Toxicology*, 32 (2), 153–166.
- STOEHR, L. C., GONZALEZ, E., STAMPFL, A., CASALS, E., DUSCHL, A., PUNTES, V. & OOSTINGH, G. J. (2011). Shape matters: effects of silver nanospheres and wires on human alveolar epithelial cells. *Particle and Fibre Toxicology*, 8 (36), 1–15.
- STRAUCH, B. M., HUBELE, W. & HARTWIG, A. (2020). Impact of endocytosis and lysosomal acidification on the toxicity of copper oxide nano- and micro-sized particles: Uptake and gene expression related to oxidative stress and the DNA damage response. *Nanomaterials*, 10 (4).
- STRAUCH, B. M., NIEMAND, R. K., WINKELBEINER, N. L. & HARTWIG, A. (2017). Comparison between micro- and nanosized copper oxide and water soluble copper chloride: interrelationship between intracellular copper concentrations, oxidative stress and DNA damage response in human lung cells. *Particle and Fibre Toxicology*, 14 (1), 28.
- SUJESH, G., GANESAN, S. & RAMESH, S. (2020). Effect of CeO₂ nano powder as additive in WME-TPO blend to control toxic emissions from a light-duty diesel engine – An experimental study. *Fuel* (278), 118177.
- SUN, SUN, 2017. Deliverable D 1.4. report on characterization of pristine nanomaterials for (exo)toxicological testing. EU FP-7. http://www.sun-fp7.eu/wp-content/uploads/2017/01/SUN_Deliverable_1.4.pdf (17.06.2022).
- 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. ET AL. (2008). Lung function changes in Sprague-Dawley rats after prolonged inhalation exposure to silver nanoparticles. *Inhalation Toxicology*, 20 (6), 567–574.
- TAVARES, P., BALBINOT, F., OLIVEIRA, H. M. de, FAGUNDES, G. E., VENÂNCIO, M., RONCONI, J. V., MERLINI, A., STRECK, E. L., DA SILVA PAULA, M. M. & ANDRADE, V. M. de (2012). Evaluation of genotoxic effect of silver nanoparticles (Ag-Nps) *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Nanoparticle Research*, 14 (4).

- THEODOROU, I. G., MÜLLER, K. H., CHEN, S., GOODE, A. E., YUFIT, V., RYAN, M. P. & PORTER, A. E. (2017). Silver nanowire particle reactivity with human monocyte-derived macrophage cells: Intracellular availability of silver governs their cytotoxicity. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 3 (10), 2336–2347.
- TOYBOU, D., CELLE, C., AUDE-GARCIA, C., RABILLOUD, T. & SIMONATO, J.-P. (2019). A toxicology-informed, safer by design approach for the fabrication of transparent electrodes based on silver nanowires. *Environmental Science: Nano*, 6 (2), 684–694.
- TSUCHIYA, S., YAMABE, M., YAMAGUCHI, Y., KOBAYASHI, Y. & KONNO, T. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International Journal of Cancer* (26), 171–176.
- TUOMELA, S., AUTIO, R., BUERKI-THURNHERR, T., ARSLAN, O., KUNZMANN, A., ANDERSSON-WILLMAN, B., WICK, P., MATHUR, S., SCHEYNIUS, A., KRUG, H. F. & FADEEL, B. ET AL. (2013). Gene expression profiling of immune-competent human cells exposed to engineered zinc oxide or titanium dioxide nanoparticles. *PloS One*, 8 (7).
- UDE, V. C., BROWN, D. M., STONE, V. & JOHNSTON, H. J. (2021). Time dependent impact of copper oxide nanomaterials on the expression of genes associated with oxidative stress, metal binding, inflammation and mucus secretion in single and co-culture intestinal in vitro models. *Toxicology in vitro : an International Journal Published in Association with BIBRA* (74), 105161.
- UPADHYAY, S. & PALMBERG, L. (2018). Air-liquid interface: Relevant in vitro models for investigating air pollutant-induced pulmonary toxicity. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, 164 (1), 21–30.
- URSINI, C. L., CAVALLO, D., FRESEGNA, A. M., CIERVO, A., MAIELLO, R., BURESTI, G., CASCIARDI, S., BELLUCCI, S. & IAVICOLI, S. (2014). Differences in cytotoxic, genotoxic, and inflammatory response of bronchial and alveolar human lung epithelial cells to pristine and COOH-functionalized multiwalled carbon nanotubes. *BioMed Research International* (2014), 359506.
- VALES, G., RUBIO, L. & MARCOS, R. (2015). Long-term exposures to low doses of titanium dioxide nanoparticles induce cell transformation, but not genotoxic damage in BEAS-2B cells. *Nanotoxicology*, 9 (5), 568–578.
- VAN DER VEEN, J. W., PASKEL, R. F., SMITS, N. A., HODEMAEKERS, H., VAN LOVEREN, H. & EZENDAM, J. (2016). The involvement of the Toll-like receptor signaling and Nrf2-Keap1 pathways in the in vitro regulation of IL-8 and HMOX1 for skin sensitization. *Journal of Immunotoxicology*, 13 (1), 1–6.
- VENTER, C., ADAMS, MARK, D., MYERS, EUGENE, W., LI, PETER, W., MURAL, R. J., SUTTON, GRANGER, G., SMITH, H. O., YANDELL, M., EVANS, C., HOLT, R. A. & GOCAYNE, J. D. ET AL. (2001). The sequence of the human genome. *Science*, 291 (5507), 1304–1351.
- VENTURA, C., PEREIRA, J. F., MATOS, P., MARQUES, B., JORDAN, P., SOUSA-UVA, A. & 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 (4), 479–503.
- VERANTH, J. M., KASER, E. G., VERANTH, M. M., KOCH, M. & YOST, G. S. (2007). Cytokine responses of human lung cells (BEAS-2B) treated with micron-sized and nanoparticles of metal oxides compared to soil dusts. *Particle and Fibre Toxicology* (4), 2.
- VERMA, N. & KUMAR, N. (2019). Synthesis and Biomedical Applications of Copper Oxide Nanoparticles: An Expanding Horizon. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 5 (3), 1170–1188.

- WALL, J., SELECI, D. A., SCHWORM, F., NEUBERGER, R., LINK, M., HUFNAGEL, M., SCHUMACHER, P., SCHULZ, F., HEINRICH, U., WOHLLEBEN, W. & HARTWIG, A. (2021). Comparison of metal-based nanoparticles and nanowires: Solubility, reactivity, bioavailability and cellular toxicity. *Nanomaterials*, 12 (1).
- WANG, F., CHEN, Y., WANG, Y., YIN, Y., QU, G., SONG, M. & WANG, H. (2019). Ultra-long silver nanowires induced mitotic abnormalities and cytokinetic failure in A549 cells. *Nanotoxicology*, 13 (4), 543–557.
- WANG, J. & FAN, Y. (2014). Lung injury induced by TiO₂ nanoparticles depends on their structural features: size, shape, crystal phases, and surface coating. *International Journal of Molecular Sciences*, 15 (12), 22258–22278.
- WANG, S., CHEN, K., WANG, M., LI, H., CHEN, G., LIU, J., XU, L., JIAN, Y., MENG, C., ZHENG, X. & LIU, S. ET AL. (2018). Controllable synthesis of nickel nanowires and its application in high sensitivity, stretchable strain sensor for body motion sensing. *Journal of Materials Chemistry*, 6 (17), 4737–4745.
- WANG, Y., ADAMCAKOVA-DODD, A., STEINES, B. R., JING, X., SALEM, A. K. & THORNE, P. S. (2020). Comparison of in vitro toxicity of aerosolized engineered nanomaterials using air-liquid interface mono-culture and co-culture models. *NanoImpact* (18).
- WANG, Z., LI, N., ZHAO, J., WHITE, J. C., QU, P. & XING, B. (2012). CuO nanoparticle interaction with human epithelial cells: cellular uptake, location, export, and genotoxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 25 (7), 1512–1521.
- WEI, H., ZHANG, W.-J., LEBOEUF, R. & FREI, B. (2014). Copper induces - and copper chelation by tetrathiomolybdate inhibits - endothelial activation in vitro. *Redox Report : Communications in Free Radical Research*, 19 (1), 40–48.
- WU, L. W., MAYO, L. D., DUNBAR, J. D., KESSLER, K. M., OZES, O. N., WARREN, R. S. & DONNER, D. B. (2000). VRAP is an adaptor protein that binds KDR, a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (9), 6059–6062.
- WU, M., GORDON, R. E., HERBERT, R., PADILLA, M., MOLINE, J., MENDELSON, D., LITTLE, V., TRAVIS, W. D. & GIL, J. (2010). Case report: Lung disease in World Trade Center responders exposed to dust and smoke: carbon nanotubes found in the lungs of World Trade Center patients and dust samples. *Environmental Health Perspectives*, 118 (4), 499–504.
- WU, X., XIAO, T., LUO, Z., HE, R., CAO, Y., GUO, Z., ZHANG, W. & CHEN, Y. (2018). A micro-/nano-chip and quantum dots-based 3D cytosensor for quantitative analysis of circulating tumor cells. *Journal of Nanobiotechnology*, 16 (1), 65.
- WU, Y. & KONG, L. (2020). Advance on toxicity of metal nickel nanoparticles. *Environmental Geochemistry and Health*, 42 (7), 2277–2286.
- XIA, T., KOVOCHICH, M., LIONG, M., MÄDLER, L., GILBERT, B., SHI, H., YEH, J. I., ZINK, J. I. & NEL, A. E. (2008). Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano*, 2 (10), 2121–2134.
- XIN, R., PAN, Y.-L., WANG, Y., WANG, S.-Y., WANG, R., XIA, B., QIN, R.-N., FU, Y. & WU, Y.-H. (2019). Nickel-refining fumes induce NLRP3 activation dependent on mitochondrial damage and ROS production in Beas-2B cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (676), 108148.
- YANG, M. & ZHANG, M. (2019). Biodegradation of Carbon Nanotubes by Macrophages. *Frontiers in Materials*, 6 (225).

- YOKOHIRA, M., HASHIMOTO, N., YAMAKAWA, K., SUZUKI, S., SAOO, K., KUNO, T. & IMAIDA, K. (2009). Lung carcinogenic bioassay of CuO and TiO₂ nanoparticles with intratracheal instillation using F344 male rats. *Journal of Toxicologic Pathology* (22), 71–78.
- YU, Q., WANG, H., PENG, Q., LI, Y., LIU, Z. & LI, M. (2017). Different toxicity of anatase and rutile TiO₂ nanoparticles on macrophages: Involvement of difference in affinity to proteins and phospholipids. *Journal of hazardous materials* (335), 125–134.
- ZANONI, I., KELLER, J. G., SAUER, U. G., MÜLLER, P., MA-HOCK, L., JENSEN, K. A., COSTA, A. L. & WOHLLEBEN, W. (2022). Dissolution rate of nanomaterials determined by ions and particle size under lysosomal conditions: Contributions to standardization of simulant fluids and analytical methods. *Chemical Research in Toxicology*, 35 (6), 963–980.
- ZHAN, Q. (2005). Gadd45a, a p53- and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage. *Mutation Research*, 569 (1-2), 133–143.
- ZHANG, H., WANG, X., WANG, M., LI, L., CHANG, C. H., Ji, Z., XIA, T. & NEL, A. E. (2015a). Mammalian cells exhibit a range of sensitivities to silver nanoparticles that are partially explicable by variations in antioxidant defense and metallothionein expression. *Small*, 11 (31), 3797–3805.
- ZHANG, Q., KUSAKA, Y., ZHU, X., SATO, K., MO, Y., KLUZ, T. & DONALDSON, K. (2003). Comparative toxicity of standard nickel and ultrafine nickel in lung after intratracheal instillation. *Journal of Occupational Health* (45), 23–30.
- ZHANG, S., CHEN, H., ZHANG, J., LI, J., HOU, H. & HU, Q. (2020). The multiplex interactions and molecular mechanism on genotoxicity induced by formaldehyde and acrolein mixtures on human bronchial epithelial BEAS-2B cells. *Environment International* (143), 105943.
- ZHANG, X., CHEN, X., SONG, H., CHEN, H.-Z. & ROVIN, B. H. (2005). Activation of the Ntf2/antioxidant response pathway increases IL-8 expression. *Immunomodulation*, 35 (11), 3258–3267.
- ZHANG, X., LI, W. & YANG, Z. (2015b). Toxicology of nanosized titanium dioxide: an update. *Archives of Toxicology*, 89 (12), 2207–2217.

7 ANHANG

7.1 CHEMIKALIEN UND INSTRUMENTE

7.1.1 Chemikalien

Tabelle 12: Auflistung der verwendeten Chemikalien und deren Hersteller.

Chemikalie	Hersteller
20x DNA Binding Dye Sample Loading Reagent	Fluidigm (San Francisco)
2x Assay Loading Reagent	Fluidigm (San Francisco)
2x TaqMan PreAmp Master Mix	Applied Biosystems (Darmstadt)
AAS-Kupfer-Standard	Roth (Karlsruhe)
AAS-Magnesium-Matrixmodifier	Perkin Elmer (Rodgau)
AAS-Nickel-Standard	Roth (Karlsruhe)
AAS-Palladium-Matrixmodifier	Perkin Elmer (Rodgau)
AAS-Silber-Standard	Perkin Elmer (Rodgau)
Accutase®	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Albumin Fraktion V low endotoxin (BSA)	Roth (Karlsruhe)
Amersham ECL Western Blotting Detection	GE Healthcare (Buckinghamshire)
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth (Karlsruhe)
Bradford-Reagenz	BioRad (München)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Calciumchlorid	Roth (Karlsruhe)
CasyTon®	OLS (Bremen)
Cerium(IV)-dioxid Nanopartikel (NM212)	<i>Joint Research Centre</i> (Brüssel)
Collagen Type I <i>rat tail</i>	Corning (Glendale)
Cu(II)-oxid Nanopartikel	Plasmachem (Berlin)
di-Kaliumhydrogenphosphat, ≥99 %, p.A.	Roth (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO), ≥ 99,9 %	Sigma-Aldrich (Steinheim)
di-Natriumhydrogenphosphat, ≥ 99% p.A.	Roth (Karlsruhe)
DNA Away	Roth (Karlsruhe)
DNA-Suspensionspuffer	TEKnova (Kristiansand)
DOC	Roth (Karlsruhe)

Tabelle 12 - Fortsetzung

Chemikalie	Hersteller
EDTA ≥ 99%	Roth (Karlsruhe)
Ethanol (96 %ig)	Roth (Karlsruhe)
Exonuclease I	New England (Massachusetts)
Exonuclease Reaktionspuffer	New England (Massachusetts)
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen (Darmstadt)
Fibronectin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
Höchst-Farbstoff 33258	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Hydroxylapatit	MP Biomedicals (Eschwege)
IFC Control Line Fluid	Fluidigm (San Francisco)
Kaliumchlorid, ≥99,5 %, p.A.	Roth (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
KGM (Keratinocyte Growth Medium)	Lonza (Basel)
Kohlenstoffnanoröhren (carbon nanotubes; CNT) (NM401)	<i>Joint Research Centre</i> (Brüssel)
Kupfer Nanopartikel	Iolitec (Heilbronn)
Kupfer Nanowire	Plasmachem (Berlin)
Ladepuffer	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Menadion	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe)
Natriumacetat	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid, ≥ 99,5 %, p.A.	Roth (Karlsruhe)
Natriumcitrat	Roth (Karlsruhe)
Natriumdihydrogenphosphat, ≥ 99,5 %, p.A.	Roth (Karlsruhe)
Natrium-dodecylsulfat (SDS) 10 %ig	AppliChem (Darmstadt)
Natriumhydrogencarbonat	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid	Roth (Karlsruhe)
Natriumlactat	Roth (Karlsruhe)
Natriumpyruvat	Roth (Karlsruhe)
Natriumsulfat	Roth (Karlsruhe)
Natriumtartrat	Roth (Karlsruhe)
Natronlauge 1 N	Roth (Karlsruhe)
Nickel Nanopartikel	Sigma Aldrich (Steinheim)
Nickel Nanowire	Plasmachem (Berlin)
PAGE Ruler Prestained Protein Ladder (10-170 kDa)	Thermo Scientific (Rochester)

Tabelle 12 - Fortsetzung

Chemikalie	Hersteller
PCR-zertifiziertes Wasser	TEKnova (Kristiansand)
Penicillin (5 U/mL) / Streptomycin (5 mg/mL)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Phosphatidylcholin	Roth (Karlsruhe)
Primärantikörper GAPDH	Santa Cruz Biotechnology (Dallas)
Primärantikörper Lamin b	Santa Cruz Biotechnology (Dallas)
Primärantikörper α -Tubulin	Santa Cruz Biotechnology (Dallas)
Primer Fluidigm	Fluidigm (San Francisco)
Protease-Inhibitor	Roche (Basel)
Roti® -Load 4x konzentriert	Roth (Karlsruhe)
Rotiphorese® (Acrylamid-Bisacrylamid (40 %))	Roth (Karlsruhe)
RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute-Medium)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Salpetersäure (69 %ig)	Roth (Karlsruhe)
Salzsäure 0,1 N	Roth (Karlsruhe)
Salzsäure 4 N	Roth (Karlsruhe)
Sekundärantikörper m-IgGk BP-HRP	Santa Cruz Biotechnology (Dallas)
Sekundärantikörper mouse anti-goat-HRP	Santa Cruz Biotechnology (Dallas)
Silber Nanopartikel Agpure W10 (NM300k)	RAS AG (Regensburg)
Silber Nanowire (ECOS HC)	RAS AG (Regensburg)
SsoFast™ EvaGreen® Supermix mit Low ROX	BioRad (München)
TEMED	Roth (Karlsruhe)
Titan(IV)-dioxid Nanopartikel (NM104)	<i>Joint Research Centre</i> (Brüssel)
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Roth (Karlsruhe)
Tris	Roth (Karlsruhe)
TRIS-EDTA-Puffer	TEKnova (Kristiansand)
Triton-X 100	Roth (Karlsruhe)
Tween® 20	Roth (Karlsruhe)
Wasserstoffperoxid (31 %ig)	Merck Millipore (Darmstadt)
Zitronensäure	Roth (Karlsruhe)

Tabelle 13: Zusammensetzung der Gele und Puffer für SDS-PAGE und Western Blot.

Gele/Puffer	Zusammensetzung
Sammelgel (4 %)	500 µL Tris (1 M; pH 6,8) 40 µL SDS (10 %) 80 µL EDTA (0,1 M) 2,93 mL bidestilliertes H ₂ O 400 µL Acrylamid 40 µL APS (10 %) 10 µL TEMED 1 Spatelspitze Bromphenolblau
Trenngel (10 %)	1,25 mL Tris (1,5 M; pH 8,8) 50 µL SDS (10 %) 50 µL Glycerin 100 µL EDTA (0,1 M) 2,245 mL bidestilliertes H ₂ O 1,25 mL Acrylamid 50 µL APS (10 %) 5 µL TEMED
Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % SDS
Transferpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % Methanol
PBST	0,05 % Tween in PBS

7.1.2 Verwendete Kits

Tabelle 14: Auflistung der verwendeten Kits.

Verwendete Kits	Hersteller
CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay	Promega (Madison)
Nuclear Extract Kit	Active Motif (Carlsbad)
Keratinocyte Growth Medium BulletKit™	Lonza (Basel)
NucleoSpin® RNA Plus Kit	Macherey-Nagel (Düren)
qScript™ cDNA Synthesis Kit	QuantaBio (Beverly)

7.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 15: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien sowie deren Hersteller.

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
1,2 mL Sample Cups	Perkin Elmer (Waltham)
2,5 mL Sample Cups	Perkin Elmer (Waltham)
12-well/ 24-well Platten	Jet-Biofil (Guangzhou)
5 mL round bottom tube	Corning (Amsterdam)
96-well Platten white bottom	Thermo Scientific (Rochester)
Balzers™ AT Quarzkristalle	Colnatec (Gilbert)
Casy-Cups	Roche (Mannheim)
Corning Costar Transwell Zellkultureinsätze 12 well	Corning (Amsterdam)
Dynamic Array IFC	Fluidigm (San Francisco)
Einmalspritzen Omnifix® (3mL)	Braun (Melsungen)
Eppendorf-Reaktionsgefäß, 2 mL	Eppendorf (Hamburg)
Reaktionsgefäß, 1,5 mL	Brand (Wertheim)
Glasfilterfritte Whatman GF/D 10 mm	Cytiva (Marlborough)
Graphitrohr	Perkin Elmer (Waltham)
Handschuhe (Latex)	Braun (Meldungen)
Handschuhe (Nitril)	LLG Labware (Meckenheim)
Folded capillary cells	Malvern Panalytical (Herrenberg)
Küvetten (Polystyrol)	LLG Labware (Meckenheim)
Kryoröhrchen mit Gewinde	Sarstedt (Nümbrecht)
Multiply® Pro-Gefäße (0,5 mL)	Sarstedt (Nümbrecht)
Multiply® -µ-Strip (0,2-Kette) + Deckel	Sarstedt (Nümbrecht)
Parafilm	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Pipettenspitzen 20 µL	Mettler-Toledo (Gießen)
Pipettenspitzen 0,5-10 µL	Brand (Wertheim)
Pipettenspitzen 100-1000 µL	Brand (Wertheim)
Pipettenspitzen 2-200 µL	Brand (Wertheim)
Pipettenspitzen 500 µL- 5 mL	Eppendorf (Hamburg)
Sterilfilter	Thermo Scientific (Rochester)
Sterilindikatorband Autoklav	Roth (Karlsruhe)
Sterilindikatorband Heißluftsterilisator	Roth (Karlsruhe)
Schraubdeckelglas (10 mL)	Fisher Scientific (Schwerte)
TEM-Gitternetzchen	Plano (Wetzlar)
Wägeschiffchen	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturflasche, 150 cm ²	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturflasche, 75 cm ²	Sarstedt (Nümbrecht)

Tabelle 19 - Fortsetzung

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Zellkulturschalen (150 mm, 100 mm, 60 mm, 35 mm)	Sarstedt (Nümbrecht)
Zentrifugenröhrchen, 15 mL und 50 mL	LLG Labware (Meckenheim)

7.1.4 Lösungen, Puffer und Gele

Tabelle 16: Zusammensetzung der künstlichen physiologischen Flüssigkeiten für die Löslichkeitsuntersuchungen.

Lösungen	Zusammensetzung
Künstliche alveoläre Flüssigkeit (AAF; pH 7,4)	0,0952 g/L MgCl ₂ 6,0193 g/L NaCl 0,2982 g/L KCl 0,1420 g/L Na ₂ HPO ₄ 0,0710 g/L Na ₂ SO ₄ 0,3676 g/L CaCl ₂ *2 H ₂ O 0,9526 g/L NaAcetat*2 H ₂ O 2,6043 g/L NaHCO ₃ 0,0970 g/L NaCitrat* H ₂ O 0,1000 g/L Phosphatidylcholin in bidestilliertem H ₂ O
Künstliche lysosomale Flüssigkeit (ALF; pH 4,5)	3,210 g/L NaCl 6,000 g/L NaOH 20,800 g/L Zitronensäure 0,1285 g/L CaCl ₂ *2 H ₂ O 0,0710 g/L Na ₂ HPO ₄ 0,0390 g/L Na ₂ SO ₄ 0,0476 g/L MgCl ₂ 0,0590 g/L Glycin 0,0770 g/L Tri-Natriumcitrat-Dihydrat 0,0900 g/L NaTartrat*2 H ₂ O 0,0850 g/L Natriumlactat 0,0860 g/L Natriumpyruvat in bidestilliertem H ₂ O

Tabelle 17: Puffer für die Zellkultur.

Puffer	Zusammensetzung
PBS (pH 7,4)	0,1 M NaCl 0,0045 M KCl 0,007 M Na ₂ HPO ₄ 0,003 M KH ₂ PO ₄

Tabelle 18: Puffer und Lösungen für die alkalische Entwindung.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Alkalische Lösung	2,625 g NaCl 1 mL NaOH, 1 M 1 mL Na ₂ HPO ₄ , 0,5 M aufgefüllt auf 50 mL mit bidestilliertem H ₂ O
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 aufgefüllt auf 100 mL mit bidestilliertem H ₂ O
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 aufgefüllt auf 100 mL mit bidestilliertem H ₂ O
0,5 M KP-Puffer	51 mL KH ₂ PO ₄ , 0,5 M 49 mL K ₂ HPO 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 aufgefüllt auf 200 mL mit bidestilliertem H ₂ O
Hydroxylapatit-Lösung	pro Säule: 0,1 g Apatit in 1 mL 0,01 M NaP

Tabelle 19: Zusammensetzung RIPA-Puffer für intrazelluläre Verfügbarkeit.

Puffer	Zusammensetzung
RIPA-Puffer	10 mM Tris (pH 7,6) 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1% (v/v) Triton-X 100 1% DOC 0,01% SDS 1x Protease Inhibitor Cocktail

7.1.5 Geräte und Software

Tabelle 20: Auflistung der verwendeten Geräte und Softwares sowie deren Hersteller.

Gerät/Software	Firma
Aerosol Generator (Advanced Nebulizer)	Vitrocell (Waldkirch)
Atomabsorptionsspektrometer PinAAcle 900 T	Perkin Elmer (Waltham)
Autoklav D-150	Systemec (Linden)
Biofreezer Herafreeze Top	Thermo Scientific (Langenselbold)
Biomark	Fluidigm (San Francisco)
Brutschrank Heracell 150i	Thermo Scientific (Langenselbold)
Casy® TCC Cell Counter & Analyser System	Roche (Mannheim)
Cryo 1 °C Cooler	VWR International (Darmstadt)
Eismaschine	Ziegra (Isernhagen)
Eppendorf Pipette 1000-5000 µL	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Pipette 100-1000 µL	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Pipette 10-100 µL	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Pipette 2,5-10 µL	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Pipette 1-2,5 µL	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Pipette 2-20 µL	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Pipette 20-200 µL	Eppendorf (Hamburg)
Feinwaage Entris	Sartorius (Göttingen)
Feinwaage Cubis® II	Sartorius (Göttingen)
Galaxy Mini Centrifuge	VWR International (Darmstadt)
Glaspipetten 5, 10, 20 mL	Roth (Karlsruhe)
Glove-Box <i>Basic Vinyl Glove Bag</i>	COY Lab Products (Grass Lake)
Heißluftsterilisator	Memmert (Schwabach)
ICP-MS X-Series2	Thermo Scientific (Langenselbold)
IFC Controller HX	Fluidigm (San Francisco)
Kühl- und Gefrierschränke	Bosch (Gerlingen)
Laborspülmaschine Professional G7883	Miele (Gütersloh)
LAS 3000	Fujifilm (Ratingen)
Megafuge 1.0	Heraeus (Hanau)
Mehrkanalpipette 1-10 µL (8-Kanal)	Eppendorf (Hamburg)
MicroCentrifuge	Roth (Karlsruhe)
Mikroskop Axiovert 40C	Carl Zeiss AG (Feldbach)
Multipipette Pipete Lite XLS® 0,5-10 µL	Mettler Toledo (Gießen)
Multipipette Distriman	Gilson (Middleton)
NanoQuant Platte	Tecan Group (Crailsheim)
PCR Workstation Pro	Peqlab (Erlangen)
pH-Meter 3210	WTW (Weilheim)
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Reinstwasseranlage Milli-Q	Merck Millipore (Darmstadt)
REM 1530 Gemini LEO	Zeiss (Oberkochen)
Rotator	Labinco B.V. (Bredastadt)
Schüttelinkubator B15	Heraeus (Hanau)

Tabelle 20 - Fortsetzung

Gerät/Software	Hersteller
Software „Fluidigm Real Time PCR Analysis“	Fluidigm (San Francisco)
Software “GenEx”	MultiD Analyses (Göteborg)
Software “ImageJ”	Open Source
Software “Tecan iControl 1.10”	Tecan Group (Crailsheim)
Software “Vitrocell Monitor”	Vitrocell (Waldkirch)
Sonifier W-250 D	Branson Ultrasonics (Danbury)
Sonifier S-450 D	Branson Ultrasonics (Danbury)
Sterilwerkbank <i>laminar flow</i> HERAsafeKS	Thermo Scientific (Langenselbold)
T100 Thermal Cycler	BioRad (München)
Tecan Infinite M200 PRO	Tecan Group (Crailsheim)
Thermo Mixer C	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge	VWR International (Darmstadt)
Transmissionselektronenmikroskop CM 200 FEG	Philips (Amsterdam)
Ultraschallbad Sonorex RK 103 H	Bandelin (Berlin)
Umwälzthermostat MA-26	Julabo (Seelbach)
Vitrocell® Cloud 12/12	Vitrocell (Waldkirch)
Vortex-Genie 2T	Scientific Industries (New York)
Waage VWR 1502	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad	Memmert (Schwabach)
Zentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg)
Zetasizer Nano series	Malvern Panalytical (Herrenberg)

7.2 ERGÄNZENDE DATEN

7.2.1 Temperaturprogramme zur Quantifizierung der Metalle mittels Atomabsorptionsspektrometrie

Tabelle 21: Zusammenfassung des Temperaturprogramms zur atomabsorptionsspektrometrischen Quantifizierung von Kupfer.

	Temperatur in [°C]	Aufheizphase [s]	Haltezeit [s]	Gasstrom (Argon) [mL/min]
Trocknung 1	120	1	30	250
Trocknung 2	140	15	30	250
Pyrolyse	1200	10	20	250
Atomisierung	2000	0	5	0
Ausheizen	2450	1	3	250

Tabelle 22: Zusammenfassung des Temperaturprogramms zur atomabsorptionsspektrometrischen Quantifizierung von Silber.

	Temperatur in [°C]	Aufheizphase [s]	Haltezeit [s]	Gasstrom (Argon) [mL/min]
Trocknung 1	110	1	30	250
Trocknung 2	130	15	30	250
Pyrolyse	800	10	20	250
Atomisierung	1700	0	5	0
Ausheizen	2450	1	3	250

Tabelle 23: Zusammenfassung des Temperaturprogramms zur atomabsorptionsspektrometrischen Quantifizierung von Nickel. Nach jeweils sieben Messungen wurde eine erneute Kalibrierung durchgeführt.

	Temperatur in [°C]	Aufheizphase [s]	Haltezeit [s]	Gasstrom (Argon) [mL/min]
Trocknung 1	110	1	30	250
Trocknung 2	150	15	40	250
Pyrolyse	1100	10	20	250
Atomisierung	2300	0	5	0
Ausheizen	2500	1	3	250

7.2.2 Nachweis einer erfolgreichen Fraktionierung mittels Western Blot

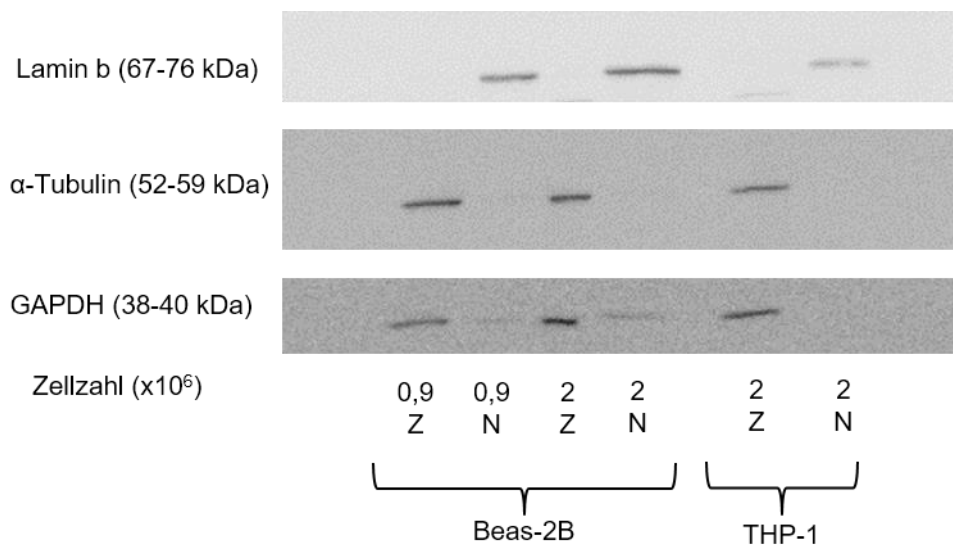


Abbildung 43: Nachweis einer erfolgreichen Fraktionierung von Zytoplasma und Zellkern in Beas-2B- und dTHP-1-Zellen. Die Zellen wurden mittels eines Zellfraktionierungs-Kits von ActiveMotif in eine zytoplasmatische (Z) und eine Kernfraktion (N) separiert. α -Tubulin diente dabei als Marker für die zytoplasmatische Fraktion, Lamin b diente als Marker für die Kernfraktion und GAPDH diente als Ladekontrolle.

7.2.3 Daten zu Genexpressionsanalysen

Eine Liste der in der HT RT-qPCR verwendeten Gene ist in Tabelle 24 dargestellt. Die Proteine, für welche die Gene codieren wurden bereits in Fischer *et al.* (2016) aufgeführt. Zum Genset hinzugefügte Gene und deren korrespondierende Proteine sind in Tabelle 25 zusammengefasst.

Tabelle 24: Liste der in der HT RT-qPCR verwendeten Gene nach Genclustern sortiert.

Referenz-gene	Fremdstoff-metabolismus	Inflammation	Fibrose	Metall-homöostase	Oxidative Stress-antwort	Apoptotische Faktoren und Zellzyklus-regulatoren	DNA-Schadens-antwort und Reparatur
<i>ACTB</i>	<i>AHR</i>	<i>CCL22</i>	<i>ACTA2</i>	<i>FTH1</i>	<i>CAT</i>	<i>APAF1</i>	<i>APEX1</i>
<i>B2M</i>	<i>CYP1A1</i>	<i>COX2</i>	<i>COL1A1</i>	<i>MT1X</i>	<i>G6PD</i>	<i>BAX</i>	<i>ATM</i>
<i>GAPDH</i>		<i>IL-1A</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>MT2A</i>	<i>GCLC</i>	<i>BBC3</i>	<i>ATR</i>
<i>GUSB</i>		<i>IL-1B</i>	<i>FN1</i>	<i>SLC30A1</i>	<i>GPX1</i>	<i>BCL2</i>	<i>BRCA1</i>
<i>HPRT1</i>		<i>IL-6</i>	<i>OPN</i>	<i>TFRC</i>	<i>GPX2</i>	<i>BTRC</i>	<i>BRCA2</i>
		<i>IL-8</i>	<i>PDGFA</i>		<i>GSR</i>	<i>CCND1</i>	<i>DDB1</i>
		<i>TNF-A</i>	<i>TGF-B</i>		<i>HMOX1</i>	<i>CDKN1A</i>	<i>DDB2</i>
			<i>TIMP1</i>		<i>HSPA1A</i>	<i>CDKN1B</i>	<i>ERCC1</i>
			<i>VIM</i>		<i>KEAP1</i>	<i>E2F1</i>	<i>ERCC4/XPF</i>
					<i>MAP3K5</i>	<i>EGFR</i>	<i>ERCC5/XPG</i>
					<i>NFE2L2</i>	<i>JUN</i>	<i>GADD45A</i>
					<i>NFKB1</i>	<i>MDM2</i>	<i>LIG1</i>
					<i>NFKB2</i>	<i>MYC</i>	<i>LIG3</i>
					<i>NFKBIA</i>	<i>PLK3</i>	<i>MGMT</i>
					<i>PRDX1</i>	<i>PMAIP1</i>	<i>MLH1</i>
					<i>SOD1</i>	<i>PPMID</i>	<i>MSH2</i>
					<i>SOD2</i>	<i>SIRT2</i>	<i>PARP1</i>
					<i>TXN</i>	<i>TNFRSF10B</i>	<i>PCNA</i>
					<i>TXNRD1</i>	<i>VEGFA</i>	<i>POLQ</i>
					<i>NQO1</i>	<i>XIAP</i>	<i>POLD1</i>
							<i>RAD50</i>
							<i>RAD51</i>
							<i>RRM2B</i>
							<i>XPA</i>
							<i>XPC</i>

Tabelle 25: Auflistung der zu Fischer *et al.* (2016) ergänzten Gene und deren korrespondierende Proteine.

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



Abbildung 44: Schematisch dargestellte Genexpressionsprofile einer Beas-2B-Monokultur und einer Kokkultur aus Beas-2B-Zellen mit differenzierte Makrophagen nach submerser Inkubation mit Kupferbasierten Nanomaterialien. Die Zellen wurden für 24 h mit dem entsprechenden Nanomaterial submers inkubiert. Eine rote Färbung steht für eine Induktion, eine blaue Färbung für eine Repression der Gene. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. n.q.: nicht quantifizierbar.

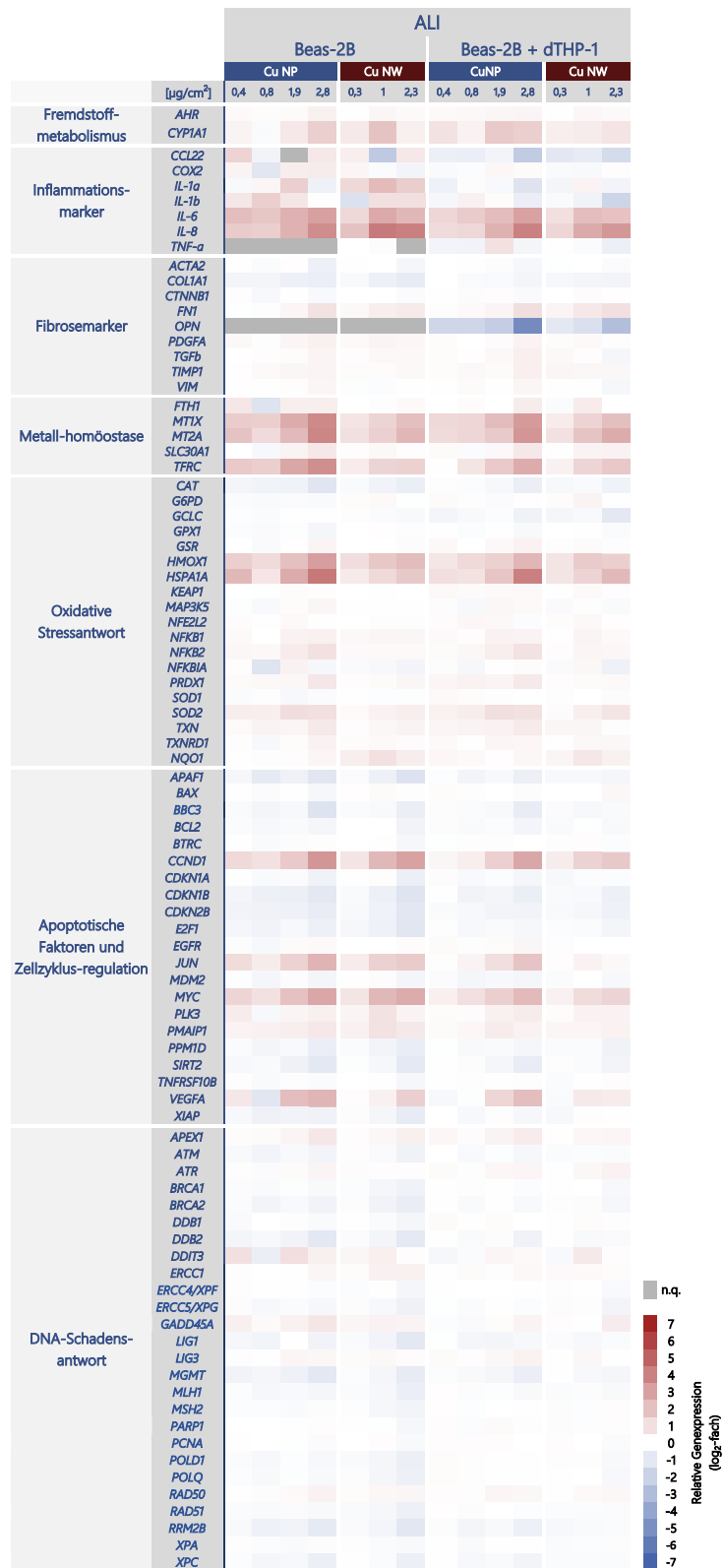


Abbildung 45: Schematisch dargestellte Genexpressionsprofile einer Beas-2B-Monokultur und einer Kokkultur aus Beas-2B-Zellen mit differenzierte Makrophagen nach ALI-Exposition mit Kupferbasierten Nanomaterialien. Die Zellen wurden für 10 Minuten gegenüber eines NM-haltigem Aerosols exponiert und anschließend für 24 h inkubiert. Eine rote Färbung steht für eine Induktion, eine blaue Färbung für eine Repression der Gene. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. n.q.: nicht quantifizierbar.

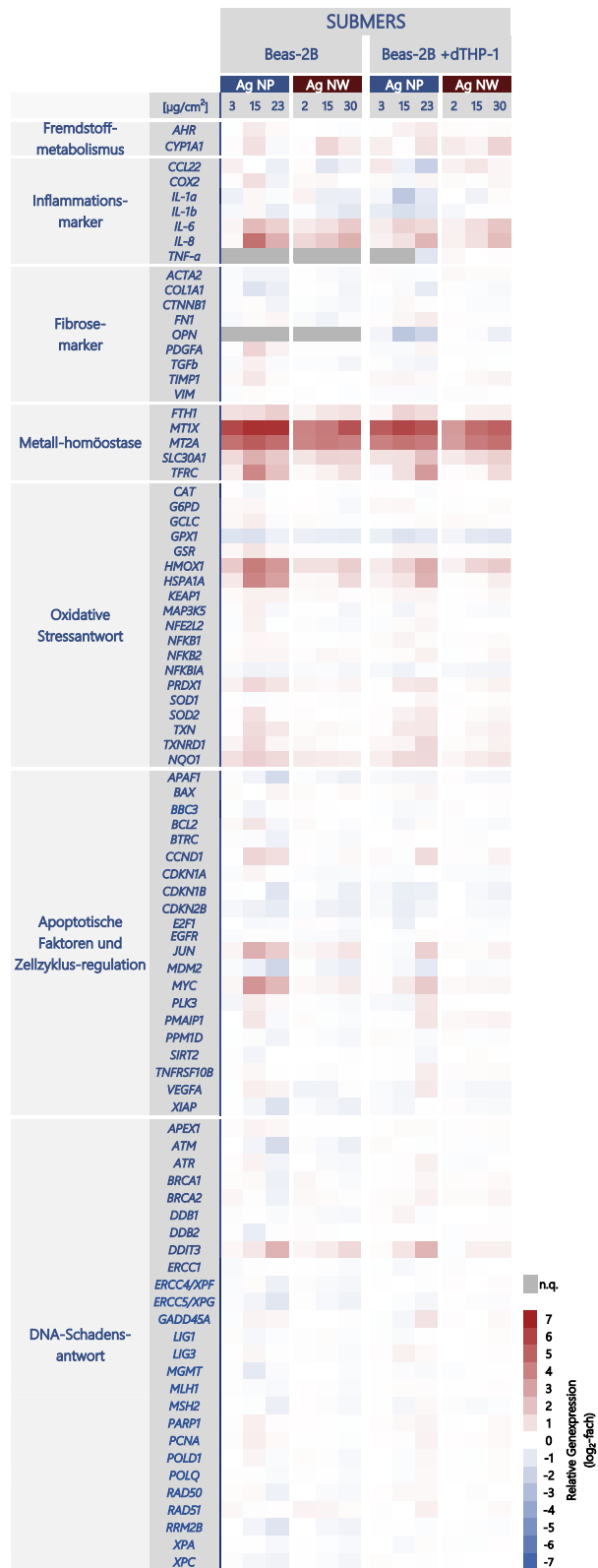


Abbildung 46: Schematisch dargestellte Genexpressionsprofile einer Beas-2B-Monokultur und einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen mit differenzierte Makrophagen nach submerser Inkubation mit Silberbasierten Nanomaterialien. Die Zellen wurden für 24 h mit dem entsprechenden Nanomaterial submers inkubiert. Eine rote Färbung steht für eine Induktion, eine blaue Färbung für eine Repression der Gene. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. n.q.: nicht quantifizierbar.

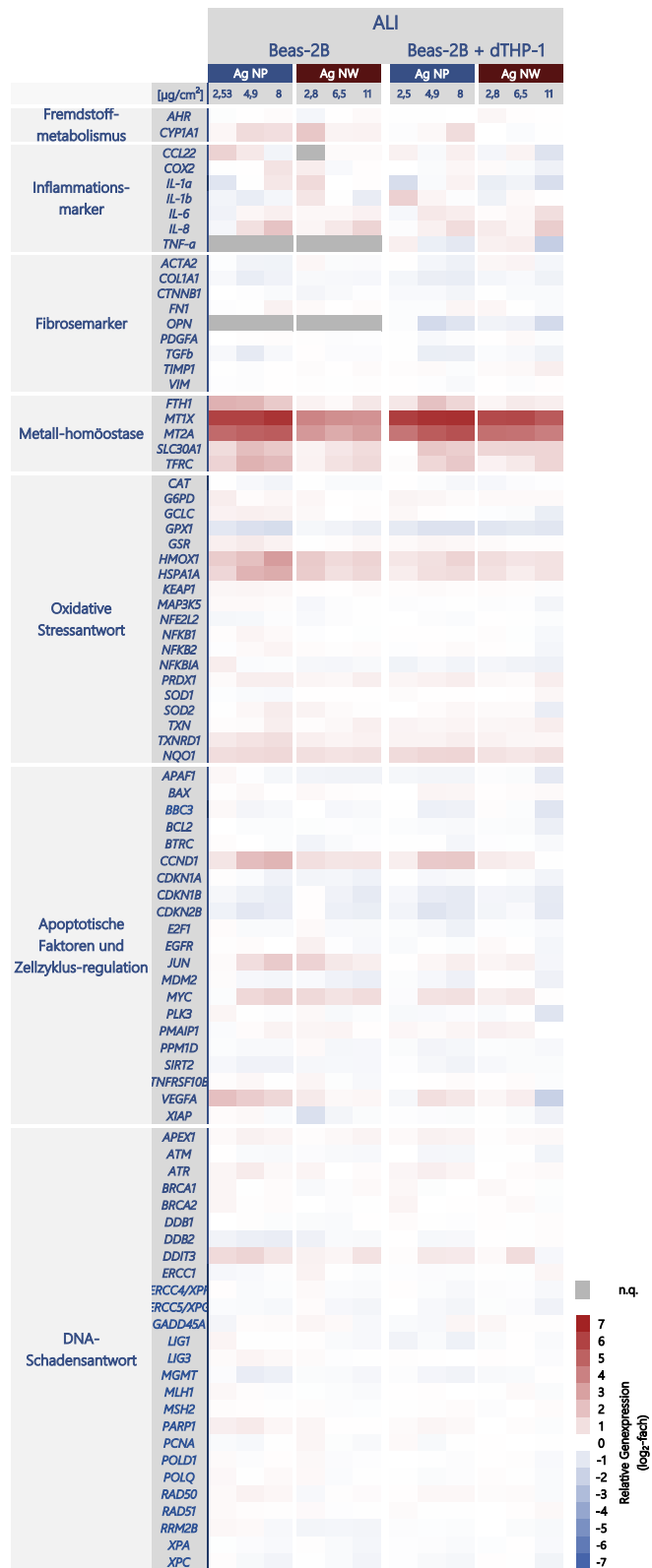


Abbildung 47: Schematisch dargestellte Genexpressionsprofile einer Beas-2B-Monokultur und einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen mit differenzierte Makrophagen nach ALI-Exposition mit Silberbasierten Nanomaterialien. Die Zellen wurden für 10 Minuten gegenüber eines NM-haltigem Aerosols exponiert und anschließend für 24 h inkubiert. Eine rote Färbung steht für eine Induktion, eine blaue Färbung für eine Repression der Gene. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. n.q.: nicht quantifizierbar.



Abbildung 48: Schematisch dargestellte Genexpressionsprofile einer Beas-2B-Monokultur und einer Kokkultur aus Beas-2B-Zellen mit differenzierte Makrophagen nach submerser Inkubation mit Nickel-basierten Nanomaterialien. Die Zellen wurden für 24 h mit dem entsprechenden Nanomaterial submerser inkubiert. Eine rote Färbung steht für eine Induktion, eine blaue Färbung für eine Repression der Gene. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. n.q.: nicht quantifizierbar.

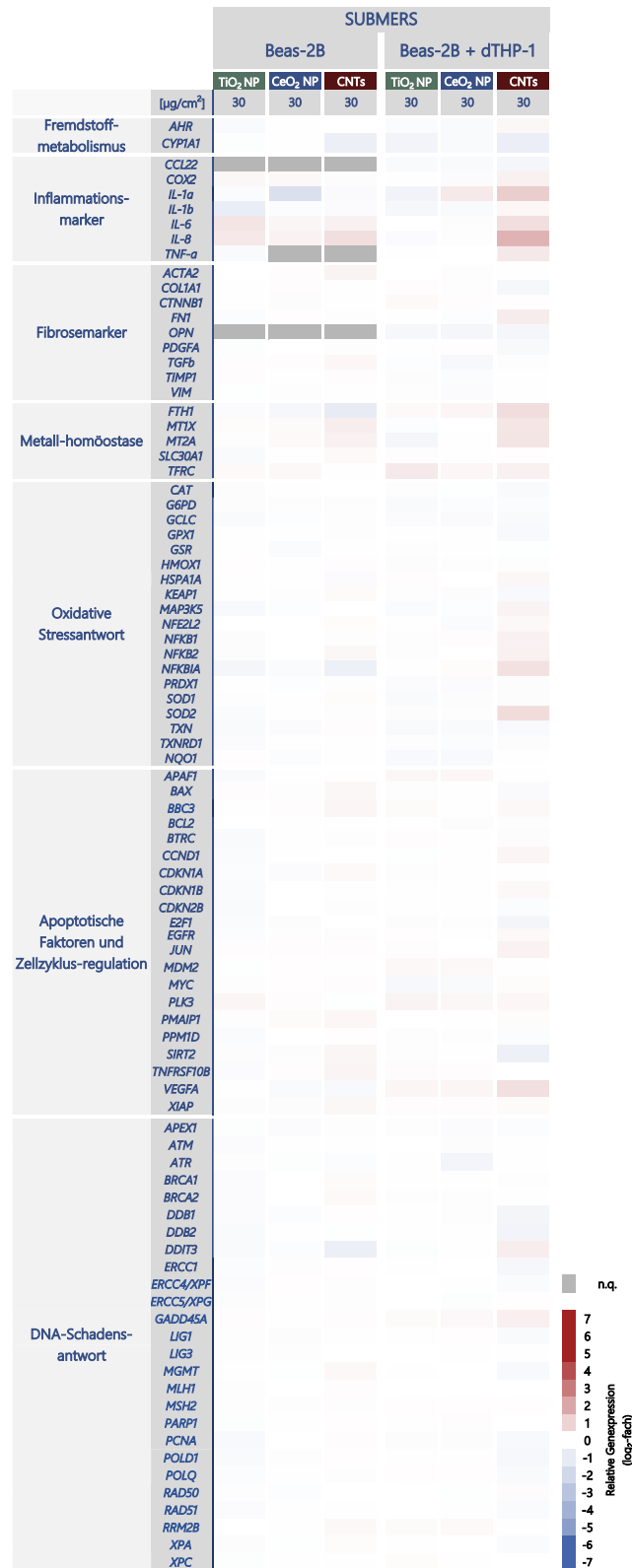


Abbildung 49: Schematisch dargestellte Genexpressionsprofile einer Beas-2B-Monokultur und einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen mit differenzierte Makrophagen nach submerser Inkubation mit TiO₂ NP, CeO₂ NP und carbon nanotubes (CNT). Die Zellen wurden für 24 h mit dem entsprechenden Nanomaterial submers inkubiert. Eine rote Färbung steht für eine Induktion, eine blaue Färbung für eine Repression der Gene. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. n.q.: nicht quantifizierbar.

7.2.4 Etablierung der ALI-Kultivierung

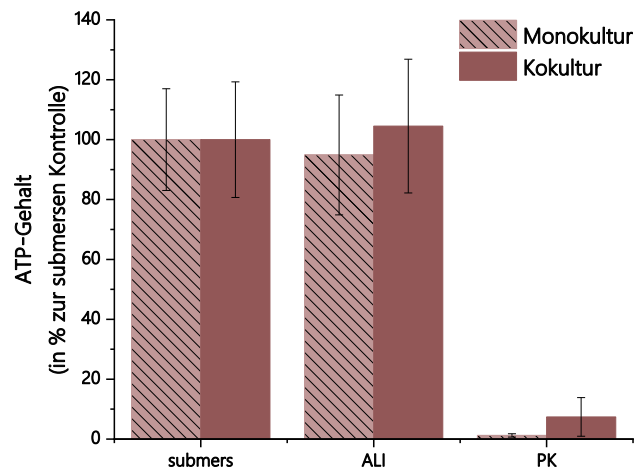


Abbildung 50: Untersuchung des ATP-Gehalts in Bezug auf die Kultivierungsmethode in Mono- und Kokultur. Beas-2B-Zellen wurden entweder in Monokultur oder in Kokultur mit differenzierten THP-1-Zellen entweder für 24 h submers kultiviert oder für 30 Sekunden über ein ALI mit einer 0,1 %-igen PBS-Lösung exponiert und anschließend 24 h kultiviert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. PK: Positivkontrolle (500 nM Staurosporin).

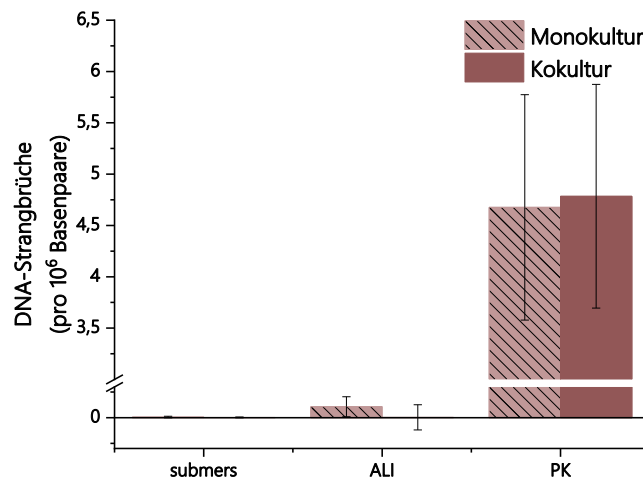


Abbildung 51: Untersuchung der Induktion von DNA-Strangbrüchen in Bezug auf die Kultivierungsmethode in Mono- und Kokultur. Beas-2B-Zellen wurden entweder in Monokultur oder in Kokultur mit differenzierten THP-1-Zellen entweder für 24 h submers kultiviert oder für 30 Sekunden über ein ALI mit einer 0,1 %-igen PBS-Lösung exponiert und anschließend 24 h kultiviert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. PK: Positivkontrolle (100 μ M Menadion).

7.2.5 Ergänzende Daten zur zellulären Verfügbarkeit der Nickel-basierten Nanomaterialien

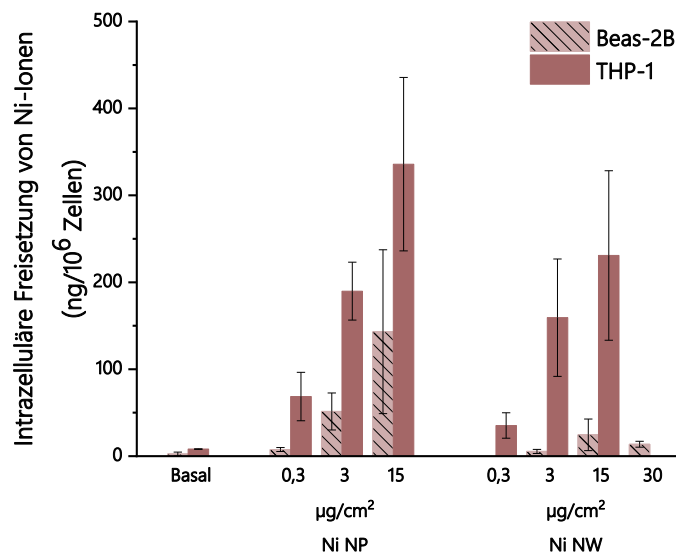


Abbildung 52: Intrazellulärer Nickelionen-Gehalt nach submerser Inkubation mit Nickel-basierten Nanomaterialien in Beas-2B-Zellen und differenzierten THP-1-Zellen (dTHP-1). Die Zellen wurden für 24 h mit dem entsprechenden Nanomaterial inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Zellmembran abgetrennt und die Ionenkonzentration im Überstand mittels GF-AAS gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

7.3 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAF	Artifizielle alveoläre Flüssigkeit
ALF	Artifizielle lysosomale Flüssigkeit
ALI	<i>Air-liquid interface</i>
AP-1	Aktivator-Protein 1
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Alkalische Entwindung
BSA	Bovines Serumalbumin
COX	Cyclooxygenase
CNT	<i>Carbon nanotubes</i>
DLS	Dynamische Lichtstreuung
dTHP-1	Differenzierte THP-1
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinases</i>
FKS	Fetales Kälberserum
GF-AAS	Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie
HT RT- qPCR	<i>High throughput RT-qPCR</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
ICNCM	<i>International Committee on Nickel Carcinogenesis in Man</i>
IL	Interleukin
KGM	<i>Keratinocyte Growth Medium</i>
KP	Kaliumpuffer
LDH	Lactatdehydrogenase
MAPK	<i>Mitogen activated protein-Kinase</i>

MT	Metallothionein
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt
MWCNT	<i>Multi-walled CNT</i>
NaP	Natriumpuffer
NK- κ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NLRP3	<i>NLR family pyrin domain containing 3-Inflammasom</i>
NM	Nanomaterialien
NP	Nanopartikel
NW	<i>Nanowire</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDI	Polydispersitätsindex
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
QCM	Quarzkristall-Mikrowaage
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SD	Standardabweichung
SOD	Superoxiddismutase
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
WHO	<i>World Health Organization</i>

7.4 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Darstellung endozytotischer Aufnahmemechanismen.	9
Abbildung 2: Schematische Darstellung einer Monokultur (links) und einer Kokultur (rechts) unter submersen Bedingungen.	17
Abbildung 3: Schematische Darstellung einer Monokultur (links) und einer Kokultur (rechts) unter <i>air-liquid interface</i> (ALI)-Bedingungen.	18
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Exposition über ein <i>air-liquid interface</i> durch eine Aerosolwolke (modifiziert nach Lacroix <i>et al.</i> , 2018).	19
Abbildung 5: Exemplarische elektronenmikroskopische Aufnahmen von CuO NP (A), Cu NP (B), Cu NW (C) und vernebelten Cu NW (D).	41
Abbildung 6: Zeitabhängige Löslichkeit Kupfer-basierter Materialien in verschiedenen physiologischen und Zellkultur-relevanten Medien.	43
Abbildung 7: Einfluss submers inkubierter, Kupfer-basierter Nanomaterialien auf den ATP-Gehalt in einer Monokultur aus Beas-2B-Zellen und einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen und differenzierten Monozyten mit makrophagenähnlichen Eigenschaften (dTHP-1).	45
Abbildung 8: Einfluss von Kupfer-basierten Nanomaterialien auf den ATP-Gehalt von Beas-2B Zellen und einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen und differenzierten Monozyten mit makrophagenähnlichen Eigenschaften (dTHP-1) nach ALI-Exposition.	46
Abbildung 9: Intrazelluläre Kupferionen-Konzentration nach submerser Inkubation mit Kupfer-basierten Nanomaterialien in Beas-2B-Zellen und differenzieren THP-1-Zellen (dTHP-1).	48
Abbildung 10: Intrazelluläre Ionenverteilung in Zytoplasma und Zellkern nach submerser Inkubation mit Kupfer-basierten Nanomaterialien.	49
Abbildung 11: Änderung der Genexpressionsprofile einer Beas-2B-Monokultur und einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen mit differenzierten Makrophagen nach submerser Inkubation mit Kupfer-basierten Nanomaterialien.	50
Abbildung 12: Änderung der Genexpressionsprofile einer Beas-2B-Monokultur und einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen mit differenzierten Makrophagen nach ALI-Exposition mit Cu NP und Cu NW.	52
Abbildung 13: Induktion der Gene <i>MT1X</i> , <i>HMOX1</i> und <i>IL-8</i> durch Kupfer-basierte Nanomaterialien nach submerser Inkubation und nach Exposition über ein ALI.	54

Abbildung 14: Induktion von DNA-Strangbrüchen durch Kupfer-basierte Nanomaterialien nach submerser Inkubation (links) und nach Exposition über ein ALI (rechts).	55
Abbildung 15: Exemplarische elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ag NP (A), Ag NW (B) und vernebelten Ag NW (C).....	58
Abbildung 16: Löslichkeit Silber-basierter Nanomaterialien in verschiedenen physiologischen und Zellkultur-relevanten Medien.	59
Abbildung 17: Einfluss submers inkubierter, Silber-basierter Nanomaterialien auf den ATP-Gehalt in Beas-2B-Zellen und einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen und differenzierten Monozyten mit makrophagenähnlichen Eigenschaften (dTHP-1).....	61
Abbildung 18: Einfluss von Silber-basierten Nanomaterialien auf den ATP-Gehalt von Beas-2B-Zellen und einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen und differenzierten Monozyten mit makrophagenähnlichen Eigenschaften (dTHP-1) nach ALI-Exposition.	62
Abbildung 19: Intrazelluläre Silberionen-Konzentration nach submerser Inkubation mit Silber-basierten Nanomaterialien in Beas-2B-Zellen und differenzieren THP-1-Zellen (dTHP-1).	64
Abbildung 20: Intrazelluläre Ionenverteilung in Zytoplasma und Zellkern nach submerser Inkubation mit Silber-basierten Nanomaterialien.....	65
Abbildung 21: Änderung der Genexpressionsprofile einer Beas-2B-Monokultur und einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen mit differenzierten Makrophagen nach submerser Inkubation mit Silber-basierten Nanomaterialien.....	66
Abbildung 22: Änderung der Genexpressionsprofile einer Beas-2B-Monokultur und einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen mit differenzierten Makrophagen nach ALI-Exposition mit Ag NP und Ag NW.....	68
Abbildung 23: Induktion der Gene <i>MT1X</i> , <i>HMOX1</i> und <i>IL-8</i> durch Silber-basierte Nanomaterialien nach submerser Inkubation und nach Exposition über ein ALI.	69
Abbildung 24: Induktion von DNA-Strangbrüchen durch Silber-basierte Nanomaterialien nach submerser Inkubation (rechts) und nach Expositon über ein ALI (links).....	70
Abbildung 25: Exemplarische elektronenmikroskopische Aufnahmen der Nickelmaterialien.....	72
Abbildung 26: Zeitabhängige Löslichkeit Nickel-basierter Materialien in verschiedenen physiologischen und Zellkultur-relevanten Medien.....	74

Abbildung 27: Einfluss submers inkubierter, Nickel-basierter Nanomaterialien auf den ATP-Gehalt in Beas-2B-Zellen und einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen und differenzierten Monozyten mit makrophagenähnlichen Eigenschaften (dTHP-1).....	75
Abbildung 28: Intrazellulärer Nickelionen-Gehalt nach submerser Inkubation mit Nickel-basierten Nanomaterialien in Beas-2B-Zellen und differenzieren THP-1-Zellen (dTHP-1).....	77
Abbildung 29: Intrazelluläre Ionenverteilung in Zytoplasma und Zellkern nach submerser Inkubation mit Nickel-basierten Nanomaterialien.....	78
Abbildung 30: Änderung der Genexpressionsprofile einer Beas-2B-Monokultur und einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen mit differenzierten Makrophagen nach submerser Inkubation mit Nickel-basierten Nanomaterialien.....	79
Abbildung 31: Induktion inflammatorischer Gene nach submerser Inkubation mit Nickel-basierten Materialien.	80
Abbildung 32: Induktion von Genen der oxidativen Stressantwort und der DNA-Schadensantwort nach submerser Inkubation mit Ni NP.....	82
Abbildung 33: Induktion von DNA-Strangbrüchen durch Nickel-basierte Nanomaterialien nach submerser Inkubation.....	83
Abbildung 34: Exemplarische elektronenmikroskopische Aufnahmen von TiO ₂ NP (A) und CeO ₂ NP (B).	85
Abbildung 35: Einfluss von submers inkubierten TiO ₂ NP, CeO ₂ NP und <i>carbon nanotubes</i> (CNT) auf den ATP-Gehalt in Beas-2B-Zellen und einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen und differenzierten Monozyten mit makrophagenähnlichen Eigenschaften (dTHP-1).	88
Abbildung 36: Intrazelluläre Titan- und Ceriumionen-Konzentration nach submerser Inkubation mit TiO ₂ NP und CeO ₂ NP in Beas-2B-Zellen und differenzierten THP-1-Zellen (dTHP-1).	90
Abbildung 37: Änderung der Genexpressionsprofile einer Beas-2B-Monokultur und einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen mit differenzierten Makrophagen nach submerser Inkubation mit TiO ₂ NP, CeO ₂ NP und <i>carbon nanotubes</i> (CNT).....	91
Abbildung 38: Induktion inflammatorischer Gene nach submerser Inkubation mit TiO ₂ NP, CeO ₂ NP und <i>carbon nanotubes</i> (CNT).....	92
Abbildung 39: Induktion von DNA-Strangbrüchen durch TiO ₂ NP, CeO ₂ NP und <i>carbon nanotubes</i> (CNT) nach submerser Inkubation.	94

Abbildung 40: Übersicht über die toxikologischen Endpunkte verschiedener Nanomaterialien in einer Monokultur aus Beas-2B-Zellen und einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen mit differenzierten THP-1-Zellen mit makrophagenähnlichen Eigenschaften.	106
Abbildung 41: Schematische Darstellung des Wirkmechanismus leicht löslicher Metall-basierter Nanomaterialien.....	108
Abbildung 42: Schematische Darstellung des Wirkmechanismus unlöslicher <i>Nanowire</i>	109
Abbildung 43: Nachweis einer erfolgreichen Fraktionierung von Zytoplasma und Zellkern in Beas-2B- und dTHP-1-Zellen.	138
Abbildung 44: Schematisch dargestellte Genexpressionsprofile einer Beas-2B-Monokultur und einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen mit differenzierte Makrophagen nach submerser Inkubation mit Kupfer-basierten Nanomaterialien.....	141
Abbildung 45: Schematisch dargestellte Genexpressionsprofile einer Beas-2B-Monokultur und einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen mit differenzierte Makrophagen nach ALI-Exposition mit Kupfer-basierten Nanomaterialien.....	142
Abbildung 46: Schematisch dargestellte Genexpressionsprofile einer Beas-2B-Monokultur und einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen mit differenzierte Makrophagen nach submerser Inkubation mit Silber-basierten Nanomaterialien.....	143
Abbildung 47: Schematisch dargestellte Genexpressionsprofile einer Beas-2B-Monokultur und einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen mit differenzierte Makrophagen nach ALI-Exposition mit Silber-basierten Nanomaterialien.....	144
Abbildung 48: Schematisch dargestellte Genexpressionsprofile einer Beas-2B-Monokultur und einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen mit differenzierte Makrophagen nach submerser Inkubation mit Nickel-basierten Nanomaterialien.....	145
Abbildung 49: Schematisch dargestellte Genexpressionsprofile einer Beas-2B-Monokultur und einer Kokultur aus Beas-2B-Zellen mit differenzierte Makrophagen nach submerser Inkubation mit TiO ₂ NP, CeO ₂ NP und <i>carbon nanotubes</i> (CNT).....	146
Abbildung 50: Untersuchung des ATP-Gehalts in Bezug auf die Kultivierungsmethode in Mono- und Kokultur.....	147
Abbildung 51: Untersuchung der Induktion von DNA-Strangbrüchen in Bezug auf die Kultivierungsmethode in Mono- und Kokultur.....	147
Abbildung 52: Intrazellulärer Nickelionen-Gehalt nach submerser Inkubation mit Nickel-basierten Nanomaterialien in Beas-2B-Zellen und differenzieren THP-1-Zellen (dTHP-1).....	148

7.5 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Verwendete Sonifizierungsdauer für faserförmige Materialien.....	23
Tabelle 2: Verwendete Suspensions-Konzentrationen und dazu korrelierende Materialdosen für submerse Experimente.....	28
Tabelle 3: Temperaturprogramm zur cDNA-Synthese.	36
Tabelle 4: Temperaturprogramm der Präamplifikation.	37
Tabelle 5: Temperaturprogramm des Exonukleaseverbaus.	37
Tabelle 6: Temperaturprogramm der HT RT-qPCR mit anschließender Schmelzkurvenanalyse. .	38
Tabelle 7: Physikochemische Eigenschaften Kupfer-basierter Nanomaterialien.	42
Tabelle 8: Physikochemische Eigenschaften Silber-basierter Nanomaterialien.....	58
Tabelle 9: Physikochemische Eigenschaften Nickel-basierter Nanomaterialien.....	73
Tabelle 10: Physikochemische Eigenschaften von TiO ₂ NP, CeO ₂ NP und CNT.....	86
Tabelle 11: Löslichkeit von TiO ₂ NP und CeO ₂ NP in unterschiedlichen physiologischen und Zellkultur-relevanten Medien.	87
Tabelle 12: Auflistung der verwendeten Chemikalien und deren Hersteller.....	128
Tabelle 13: Zusammensetzung der Gele und Puffer für SDS-PAGE und Western Blot.	131
Tabelle 14: Auflistung der verwendeten Kits.....	131
Tabelle 15: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien sowie deren Hersteller.....	132
Tabelle 16: Zusammensetzung der künstlichen physiologischen Flüssigkeiten für die Löslichkeitsuntersuchungen.	133
Tabelle 17: Puffer für die Zellkultur.	134
Tabelle 18: Puffer und Lösungen für die alkalische Entwindung.....	134
Tabelle 19: Zusammensetzung RIPA-Puffer für intrazelluläre Verfügbarkeit.....	134
Tabelle 20: Auflistung der verwendeten Geräte und Softwares sowie deren Hersteller.....	135
Tabelle 21: Zusammenfassung des Temperaturprogramms zur atomabsorptions-spektrometrischen Quantifizierung von Kupfer.....	137
Tabelle 22: Zusammenfassung des Temperaturprogramms zur atomabsorptions-spektrometrischen Quantifizierung von Silber.....	137
Tabelle 23: Zusammenfassung des Temperaturprogramms zur atomabsorptionsspektrometrischen Quantifizierung von Nickel.	138
Tabelle 24: Liste der in der HT RT-qPCR verwendeten Gene nach Genclustern sortiert.....	139

Tabelle 25: Auflistung der zu Fischer <i>et al.</i> (2016) ergänzten Gene und deren korrespondierende Proteine.....	140
---	-----

8 PUBLIKATIONSLISTE

Publikationen in Fachzeitschriften

Hufnagel, M.; Schoch, S.; **Wall, J.**; Strauch, B. M.; Hartwig, A. (2020). Toxicity and Gene Expression Profiling of Copper- and Titanium-Based Nanoparticles Using Air-Liquid Interface Exposure. *Chemical Research in Toxicology*, 33 (5), 1237-1249.

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

Hufnagel, M.; May, N.; **Wall, J.**; Wingert, N.; Garcia-Käufer, M.; Arif, A.; Hübner, C.; Berger, M.; Mühlhopt, S.; Baumann, W.; Weis, F.; Krebs, T.; Becker, W.; Gminski, R.; Stapf, D.; Hartwig, A. (2021). Impact of Nanocomposite Combustion Aerosols on A549 Cells and a 3D Airway Model. *Nanomaterials*, 11 (7), 1685.

Wall, J.; Ag Seleci, D.; Schworm, F.; Neuberger, R.; Link, M.; Hufnagel, M.; Schumacher, P.; Schulz, F.; Heinrich, U.; Wohlleben, W.; Hartwig, A. (2021). Comparison of Metal-Based Nanoparticles and Nanowires: Solubility, Reactivity, Bioavailability and Cellular Toxicity. *Nanomaterials*, 12 (1), 147.

Vorträge auf Fachtagungen

Wall, J.; Schworm, F.; Link, M.; Neuberger, R.; Hufnagel, M.; Hartwig, A.: Subcellular and Intracellular Dissolution of Particulate and Fibrous Metal-Based Nanomaterials in Pulmonary Cell Lines. Nanotox 2021, 19.-22.04.2021, Edinburgh (UK)/online.

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

Posterbeiträge auf Fachtagungen

Wall, J.; Hufnagel, M.; Teuscher, N.; Mackert, M.; Müllhopt, S.; Hartwig, A.: ProCycle – Impact of nanocomposite combustion-generated aerosols on genomic stability. International Particle Toxicology Conference 2019, 11.-13.09.2019, Salzburg.

Wall, J.; Ag Seleci, D.; Schworm, F.; Neuberger, R.; Link, M.; Hufnagel, M.; Schumacher, P.; Schulz, F.; Heinrich, U.; Wohlleben, W.; Hartwig, A.: MetalSafety – Abiotische und intrazelluläre Untersuchungen zur Reaktivität und Bioverfügbarkeit granulärer und faserförmiger, metallbasierter Nanomaterialien. Clustertreffen der NanoCare4-Förderung des BMBF, 21.09.2021, Frankfurt/ online.