

# **In vitro Charakterisierung der toxischen Komponenten von Holzverbrennungsemissionen**

Dissertation von

Marco Dilger

an der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften  
Institut für Toxikologie und Genetik (ITG)

Erstgutachter: PD Dr. Carsten Weiss

Zweitgutachter: Prof. Dr. Andrea Hartwig

Dekan: Prof. Dr. Willem Klopper

01. März 2012 – 07. Januar 2016

Karlsruher Institut für Technologie  
Institut für Toxikologie und Genetik (ITG)  
Campus Nord  
Hermann-von-Helmholtz-Platz 1  
761344 Eggenstein-Leopoldshafen

# **In vitro Charakterisierung der toxischen Komponenten von Holzverbrennungsemissionen**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften  
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Diplom-Lebensmittelchemiker Marco Dilger

aus

Rottweil

Dekan: Prof. Dr. Willem Klopper

Referent: PD Dr. Carsten Weiss

Korreferent: Prof. Dr. Andrea Hartwig

Tag der mündlichen Prüfung: 12.2.2016



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung –  
Weitergabe unter gleichen Bedingungen 3.0 Deutschland Lizenz  
(CC BY-SA 3.0 DE): <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/de/>

---

Ich versichere wahrheitsgemäß, die Arbeit selbstständig angefertigt, alle benutzten Hilfsmittel vollständig und genau angegeben und alles kenntlich gemacht zu haben, was aus Arbeiten anderer unverändert oder mit Änderungen entnommen wurde. Die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis, sowie zur Archivierung der Primärdaten des KIT wurden beachtet. Ich erkläre ebenfalls, dass außerhalb der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften keine weiteren Promotionsverfahren anhängig sind oder erfolglos beendet wurden.

Karlsruhe, 7.1.2016

.....  
(Marco Dilger)



# Zusammenfassung

Rund ein Drittel der Weltbevölkerung verwendet täglich Biomasse als Brennstoff zum Heizen und Kochen. Die Emissionen der häuslichen Biomasseverbrennung verursachen nach Schätzungen der WHO weltweit pro Jahr über 4 Millionen Todesfälle. Holz ist bereits jetzt der wichtigste Brennstoff aus Biomasse und der globale Trend zur stärkeren Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen wird die Emissionen aus der Holzverbrennung weiter erhöhen. Trotz der negativen gesundheitlichen Auswirkungen der Verbrennungsaerosole, sind deren problematische Bestandteile und ihre molekularen Wirkmechanismen weitgehend unbekannt.

Daher war das Ziel dieser Arbeit, die toxischen Substanzen im Holzrauch zu identifizieren und ihre Wirkung zu charakterisieren. Hierzu wurden kultivierte humane Lungenzellen aus Alveolen (A549) und Bronchiolen (BEAS-2B) verwendet und mit frisch generiertem Holzrauch oder gesammelten Holzrauchpartikeln behandelt. Das Testen des unveränderten Verbrennungsaerosols, das heißt sowohl der Partikel, als auch der gasförmigen Verbrennungsprodukte, erfordert die Verwendung eines neuartigen Air-Liquid-Interface (ALI) Expositionssystems. Bei der gegenwärtigen Standardmethode zur Untersuchung von Verbrennungsemissionen werden gesammelte Partikel in Zellkulturmedium suspendiert und anschließend auf Zellen gegeben. Mit Hilfe eines ALI-Systems können die Zellen jedoch, ohne Kulturmedium auf der apikalen Seite, direkt den unveränderten Verbrennungsprodukten ausgesetzt werden. Ein solches System wurde weiterentwickelt und biologisch validiert. Die wichtigsten Neuerungen sind die Implementierung einer Referenzbehandlung mit Reinluft und die Möglichkeit, die Partikeldosis durch Verwendung eines elektrostatischen Feldes zu erhöhen.

Bei den Holzrauch-exponierten Zellen wurden die Veränderungen der globalen Genregulierung mit einer mRNA-Sequenzierung untersucht. Die vierstündige Behandlung mit 1:10 verdünnten Emissionen führte in beiden Zelllinien zur differentiellen Regulation von über 2000 Genen. Überraschenderweise waren gasförmige Substanzen für nahezu alle Änderungen in der Genexpression verantwortlich. Die Gasphase führte zur Aktivierung der auf Stress reagierenden Kinasen p38, JNK und ERK1/2 und bewirkte eine Verschiebung der metabolischen Gleichgewichte im Energiestoffwechsel, darunter eine Akkumulation von Succinat und Verstärkung der anaeroben Glykolyse. Darüber hinaus wurden Markergene der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition induziert, die eine Rolle in der Pathogenese von Fibrose und Tumormetastasierung spielt. Die Gasphase induzierte DNA-Einzelstrangbrüche und die Bildung von  $\gamma$ -H2AX Foci, einem Marker der DNA-Schadensantwort. Mit einem systembiologischen Ansatz konnten Aldehyde, die im Holzrauch vor allem in Form von Formaldehyd und Acetaldehyd vorhanden sind, als Verursacher der  $\gamma$ -H2AX Foci Bildung identifiziert werden. Diese Stoffklasse kann auch in Zusammenhang mit den anderen durch Holz-

rauch hervorgerufenen Effekte gebracht werden. Inwiefern weitere Gasphasenkomponenten zu den Wirkungen des Holzrauchs beitragen, muss in zukünftigen Studien geklärt werden.

Nach ALI-Exposition wurde auch eine zytotoxische Wirkung der partikulären Emissionen festgestellt. Außerdem induzierten die Partikel die Genexpression von CYP1A1 eine Antwort auf im Holzrauch vorkommende kanzerogene polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) mit hoher Relevanz für Mutagenese und Kanzerogenese. In der Submersexposition wurde festgestellt, dass die Bioverfügbarkeit von partikelgebundenen PAKs besonders hoch ist. Ebenfalls erhöhten submers applizierte Holzrauchpartikel die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies, für deren Bildung Rußanteile und Metalle verantwortlich waren.

Interventionstrategien zur Vermeidung negativer gesundheitlicher Effekte durch Verbrennungsabgase zielen bislang vorwiegend auf die Reduzierung partikulärer Emissionen ab. Aufgrund der Akkumulation von inhalierten Partikeln haben die partikelspezifischen Effekte langfristig eine hohe gesundheitliche Relevanz. Die partikulären Bestandteile Ruß, Metalle und besonders PAKs wurden in der vorliegenden Arbeit als wichtige Parameter der Toxizität identifiziert. Die dargestellten Ergebnisse verdeutlichen aber auch, dass bei der toxikologischen Beurteilung von Verbrennungsaerosolen der Gasphase eine größere Aufmerksamkeit zukommen muss. Insbesondere gilt dies für reaktive Aldehyde, die *in vitro* maßgeblich für die biologischen Wirkungen des Holzverbrennungsaerosols sind. Die Relevanz von gasförmigen Verbrennungsprodukten – besonders der entstehenden Aldehyde – für gesundheitsschädliche Wirkungen auf den Menschen sollte daher genauer überprüft werden.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>i</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Holzverbrennungsemissionen . . . . .	1
1.1.1. Motivation zur toxikologischen Charakterisierung von Holzrauch . . . . .	1
1.1.2. Physikochemische Zusammensetzung des Holzrauchs . . . . .	1
1.1.3. Zur Toxikologie des Holzrauchs . . . . .	5
1.2. <i>In vitro</i> Testsysteme . . . . .	10
1.2.1. Submers vs Air-Liquid-Interface Exposition . . . . .	10
1.2.2. Expositionssysteme zur Untersuchung von Aerosolen . . . . .	12
1.3. Zielsetzung . . . . .	15
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1. Kultivierung und Behandlung der Zellen . . . . .	17
2.1.1. Kultivierung der Zellen . . . . .	17
2.1.2. Vorbereitung der Zellen zur Behandlung . . . . .	17
2.1.3. Submersexposition von Partikeln . . . . .	18
2.1.4. Exposition von Zellen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht . . . . .	19
2.2. Chemische Analytik . . . . .	20
2.2.1. Organische Verbindungen . . . . .	20
2.2.2. EC/OC-Gehalt . . . . .	20
2.2.3. Metallanalytik . . . . .	21
2.2.4. Carbonylanalytik . . . . .	21
2.3. Elektronenmikroskopische Untersuchungen . . . . .	21
2.3.1. Morphologie der Partikelproben . . . . .	21
2.3.2. Untersuchung von aufgenommenen Partikeln . . . . .	21
2.4. Zytotoxizitätstests . . . . .	22
2.4.1. Metabolische Aktivität . . . . .	22
2.4.2. Membranintegrität . . . . .	22
2.5. Proteinanalytik . . . . .	23
2.5.1. Western Blot . . . . .	23
2.5.2. Zytokinfreisetzung . . . . .	23
2.5.3. Cytochrom P450 Enzymaktivität . . . . .	23

2.6.	Gentoxizitätsassays . . . . .	24
2.6.1.	Analyse von $\gamma$ -H2AX Foci . . . . .	24
2.6.2.	Alkalische Entwindung . . . . .	24
2.7.	Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies . . . . .	25
2.8.	RNA-Analytik . . . . .	25
2.8.1.	Quantitative Real-Time PCR . . . . .	25
2.8.2.	Genomweite mRNA-Sequenzierung . . . . .	26
2.9.	Metaboliten-Analytik . . . . .	27
2.10.	Systembiologische Methoden . . . . .	28
2.10.1.	GO-Term Analyse . . . . .	28
2.10.2.	Connectivity Map Analyse . . . . .	28
2.11.	Statistik . . . . .	28
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>31</b>
3.1.	Toxikologische Untersuchung gesammelter Partikel aus der Holzverbrennung . .	31
3.1.1.	Partikelcharakterisierung . . . . .	32
3.1.2.	Holzrauchpartikel führen zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, lösen aber keine antioxidative Zellantwort aus . . . . .	37
3.1.3.	Partikelgebundene PAKs induzieren Cytochrom P450 1A1 . . . . .	40
3.1.4.	Bedeutung der Ergebnisse in Bezug auf die toxischen Komponenten . . .	43
3.2.	Etablierung eines ALI-Expositionssystems zur toxikologischen Untersuchung von Aerosolen . . . . .	45
3.2.1.	Implementierung eines zusätzlichen Befeuchtungssystems zur gleichzeiti- gen Begasung von Referenzzellen mit Reinluft . . . . .	45
3.2.2.	Die Zellvitalität wird durch Anlegen eines elektrischen Feldes nicht beeinflusst	47
3.2.3.	Bioverträglichkeit des verwendeten Konstruktionsmaterials . . . . .	48
3.2.4.	Weitere Verbesserungen und Einsatz des Systems auf Messkampagnen . .	49
3.3.	Untersuchung von Holzrauchemissionen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht .	51
3.3.1.	Aerosolcharakterisierung . . . . .	51
3.3.2.	Die akute Toxizität des Holzrauchaerosols ist abhängig von der partikulären Phase . . . . .	56
3.3.3.	Die Gasphase des Holzrauchaerosols ist maßgeblich für die globale Genre- gulation . . . . .	61
3.3.4.	Vergleich der differentiellen Genexpression zwischen A549 und BEAS-2B Zellen . . . . .	64
3.3.5.	GO-Term Analyse . . . . .	68
3.3.6.	Verifizierung ausgewählter Wirkmechanismen . . . . .	79
3.3.7.	Identifizierung toxischer Gasphasenkomponenten . . . . .	95

<b>4. Zusammenfassende Diskussion</b>	<b>105</b>
4.1. Die Weiterentwicklung des Air-Liquid-Interface Expositionssystems erlaubt eine bessere Untersuchung von Verbrennungsaerosolen . . . . .	105
4.2. Die Gasphase ist maßgeblich für die toxikologischen Wirkungen von Holzverbren- nungsemissionen <i>in vitro</i> . . . . .	106
4.3. Reaktive Aldehyde als Hauptverursacher der toxischen Wirkungen von Holzrauch	109
4.4. Wirkung partikulärer Holzrauchemissionen . . . . .	111
4.5. Relevanz der Ergebnisse . . . . .	114
 <b>Literatur</b>	 <b>117</b>
 <b>Abkürzungsverzeichnis</b>	 <b>139</b>
 <b>A. Anhang</b>	 <b>141</b>
A.1. Material und Methoden . . . . .	141
A.2. Verwendete Formeln . . . . .	146
A.3. Toxikologische Untersuchung gesammelter Partikel aus der Holzverbrennung . .	147
A.4. Etablierung eines Air-Liquid-Interface Expositionssystems . . . . .	153
A.5. Untersuchung von Holzrauchemissionen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht .	154
 <b>Publikationsliste</b>	 <b>177</b>



# 1. Einleitung

## 1.1. Holzverbrennungsemissionen

### 1.1.1. Motivation zur toxikologischen Charakterisierung von Holzrauch

Weltweit verwendet rund ein Drittel der Weltbevölkerung täglich Biomasse als Brennstoff zum Heizen und Kochen (Bonjour et al. 2013). In den letzten Jahren sind die Emissionen aus der Biomasseverbrennung als eine wichtige Quelle negativer gesundheitlichen Auswirkungen verstärkt in das wissenschaftliche Interesse gerückt. Nach Schätzungen der WHO verursachen Emissionen aus der häuslichen Biomasseverbrennung weltweit pro Jahr über 4 Millionen Todesfälle. Die menschliche Exposition gegenüber Verbrennungsprodukten von Biomasse ist in Entwicklungsländern besonders hoch, wo die Brennstoffe häufig in Innenräumen ohne angemessene Belüftung verbrannt werden. In Industrienationen ist die Exposition in Innenräumen aufgrund geringerer Nutzung von Verbrennungsöfen und besserer Belüftung in der Regel geringer. Aber selbst in diesen Ländern stammt Feinstaub in der Außenluft zu 10 - 15 % aus der Biomasseverbrennung (Belis et al. 2013; Thurston et al. 2011).

Holz ist bereits jetzt der wichtigste Brennstoff der häuslichen Biomasseverbrennung (Straif et al. 2013) und wird aufgrund des globalen Trends zur stärkeren Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen in der Zukunft noch populärer werden. Eine starke Zunahme der Holzverbrennung wird auch beobachtet, wenn wirtschaftliche Schwierigkeiten für eine Verknappung der Heizölverfügbarkeit sorgen. So wurde in Griechenland während der jüngsten Wirtschaftskrise ein 2.5-facher Anstieg der Biomasseverbrennung beobachtet (Sigsgaard et al. 2015).

Die gesundheitsschädliche Wirkung von Feinstaub ist bereits seit längerer Zeit bekannt und er ist mittlerweile als Kanzerogen anerkannt (Dockery und Pope 1994; Straif et al. 2013). Holzrauch wurde jedoch erst in den letzten Jahren als Gesundheitsrisiko wahrgenommen und seine Auswirkungen sind in wissenschaftlichen Studien bisher wenig untersucht (Kocbach Bølling et al. 2009; Naehrer et al. 2007).

### 1.1.2. Physikochemische Zusammensetzung des Holzrauchs

Die Holzverbrennung ist ein komplexer Prozess, der aus vielen aufeinanderfolgenden homogenen und heterogenen Reaktionen besteht. Die grundlegenden Phasen einer Verbrennung sind Trocknung, Zersetzung und Vergasung des Holzes und Oxidation der entstandenen brennbaren Gase (Nussbaumer 2003). Bei der Holzverbrennung entstehen Emissionen in Form eines Aerosols, das heißt ein heterogenes Stoffgemisch aus festen bzw. flüssigen Partikeln in einer Gasphase.

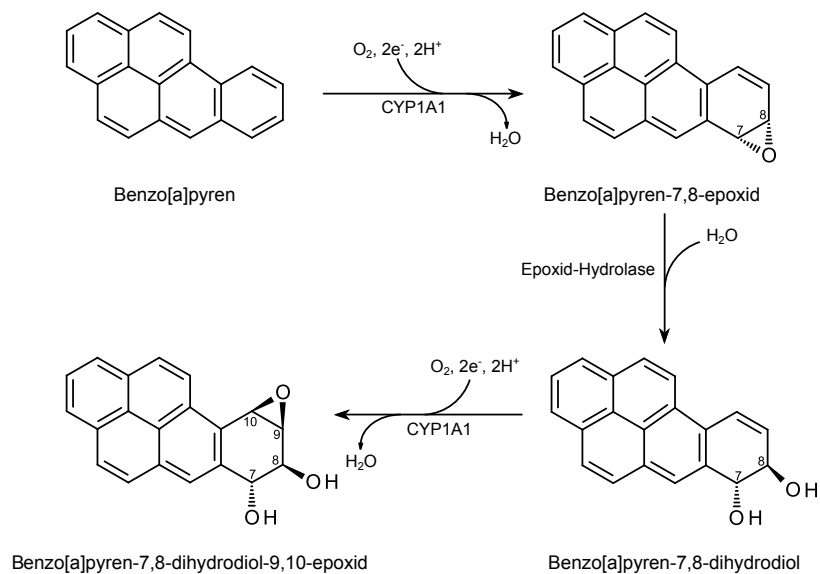
Die Qualität der Verbrennung hat Einfluß auf die Menge und Art der entstehenden Emissionen und ist maßgeblich vom stöchiometrischen Verhältnis des angebotenen sowie zur vollständigen Verbrennung notwendigen Sauerstoffs bestimmt (Nussbaumer 2003).

Die Trockenmasse von Holz besteht nahezu ausschließlich aus Zellulose (50 - 70%) und Lignin (30%). Abhängig von der verwendeten Holzsorte sind in geringen Mengen ebenfalls niedermolekulare organische Verbindungen wie Harze, Wachse und Zucker und anorganische Salze vorhanden (Naehler et al. 2007). Die vollständige Verbrennung der organischen Bestandteile resultiert in der Bildung der typischen Verbrennungsgase  $\text{CO}_2$  und  $\text{NO}_x$  ( $\text{NO}$  und  $\text{NO}_2$ ). In der Realität wird eine vollständige Verbrennung aller organischen Bestandteile aber nicht erreicht (Lamberg et al. 2011).

Deshalb entstehen je nach Verbrennungsbedingungen unterschiedliche Mengen an Produkten der unvollständigen Verbrennung. Im Holzrauch können typischerweise mehrere Hundert verschiedene unvollständige Verbrennungsprodukte gefunden werden. Zu den wichtigsten gehören polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs), Ruß,  $\text{CO}$  und Aldehyde (Naehler et al. 2007; Nussbaumer 2003). Die unbrennbaren Bestandteile, vor allem Alkalisalze, aber auch im Brennholz vorhandene Schwermetalle, bleiben in der Asche zurück oder werden in partikulärer Form emittiert (Lamberg et al. 2011; Nussbaumer 2003). Die partikulären Emissionen entstehen durch Verdampfung der unbrennbaren Bestandteile im heißen Glutbett, die nach Abkühlen des Rauchgases zu anorganischen Partikeln kondensieren. Bei der unvollständigen Verbrennung werden die partikulären Emissionen hingegen durch Ruß und kondensierte schwerflüchtige organische Verbindungen dominiert (Lamberg et al. 2011). In realen Verbrennungen existieren diese beiden Partikeltypen gleichzeitig und können während der Entstehung und Abkühlung miteinander interagieren. So kommt es während des Abkühlens zur zunehmenden Kondensation von semivolatilen organischen Verbindungen und die primär gebildeten Partikel können zu größeren Sekundärpartikel agglomerieren bzw. aggregieren (Kochbach Bølling et al. 2009; Naehler et al. 2007). Die resultierende Größe der emittierten Partikel liegt üblicherweise in Größenbereichen von 50-400 nm (Kochbach Bølling et al. 2009; Naehler et al. 2007).

### 1.1.2.1. Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

PAKs gehören zu den am besten untersuchten Produkten der unvollständigen Verbrennung. Der Wirkmechanismus der PAKs ist gut bekannt und viele Vertreter der PAKs sind Humankanzero gene (Baird et al. 2005). Einer der stärksten kanzerogenen PAKs ist Benzo[a]pyren (B[a]P). B[a]P wird durch die Phase-I-Enzyme der Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen metabolisch aktiviert und in der Folge detoxifiziert. Die metabolische Aktivierung führt aber auch zu hochreaktiven genotoxischen Intermediaten, den Dihydrodiolepiden, die zur DNA-Schädigung und, bei hohen Konzentrationen, auch zum Zelltod führen können (Baird et al. 2005; Donauer et al. 2012; Schreck et al. 2009) (Abb. 1.1). Eine wichtige Monooxygenase bei der Aktivierung von PAKs ist CYP1A1 (Cytochrom P450, Familie 1, Subfamilie A, Polypeptid 1). CYP1A1 wird durch Bindung von PAKs an den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) transkriptionell induziert. Aus diesem Grund



**Abbildung 1.1.: Metabolische Aktivierung von Benzo[a]pyren durch CYP1A1.** Die durch PAKs induzierbare Monooxygenase CYP1A1 epoxidiert Benzo[a]pyren zum Benzo[a]pyren-7,8-Epoxid. Bei der nachfolgenden Hydrolyse durch die Epoxid-Hydrolase wird das inaktive Dihydrodiol gebildet. Durch erneute Oxidation durch CYP1A1 entstehen hochreaktive Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide (Baird et al. 2005).

kann die relative Genexpression von CYP1A1 als spezifischer Marker für die Bioverfügbarkeit von PAKs verwendet werden (Baird et al. 2005). Andere PAKs haben analoge Wirkmechanismen, verfügen aber über ein im Vergleich zu B[a]P unterschiedlich ausgeprägtes kanzerogenes Potential. In der Umwelt kommen PAKs nur als Mischungen vor, weshalb zur Beschreibung der Toxizität eines PAK-Gemischs häufig sogenannte B[a]P-Toxizitätsäquivalente (TEQ) verwendet werden. Für die wichtigsten PAKs wurden Toxizitätsäquivalenzfaktoren (TEF) ermittelt, welche die relative Toxizität zu B[a]P ausdrücken. Zum Beispiel bewirkt ein PAK mit einem TEF von 0.1 bei gleicher Konzentration wie B[a]P eine 10%ige Aktivierung des AhR. Die Konzentrationen der in der Mischung vorhandenen PAKs werden mit ihren TEF multipliziert und aufsummiert. Die resultierende TEQ-Konzentration des PAK-Gemischs entspricht der Konzentration von reinem B[a]P mit der gleichen Toxizität.

### 1.1.2.2. Ruß

Ruß entsteht wie PAKs bei der unvollständigen Verbrennung. Im wesentlichen besteht Ruß aus elementarem Kohlenstoff (EC). Er kann aber auch wenige Massenprozent Wasserstoff enthalten, der von den Kohlenwasserstoffen stammt, aus denen der Ruß während der unvollständigen Verbrennung gebildet wird. Strukturell bestehen Rußpartikel aus konzentrisch angeordneten Graphenschichten. Die Graphen-Domänen an der Oberfläche können reduktive und oxidative Prozesse beschleunigen, indem sie organische Moleküle adsorbieren und durch ihr delocalisiertes  $\Pi$ -System Elektronenübergänge erleichtern (Oh et al. 2012). Diese katalytische Aktivität wird durch das hohe Oberflächen-Volumenverhältnis von Rußpartikeln begünstigt. Die Oberflächenreaktivität ist von

toxikologischem Interesse, da sie die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) begünstigen kann (Garza et al. 2008; Nel et al. 2006).

### 1.1.2.3. Metalle

Während PAKs und Ruß bei effizienteren Verbrennungsbedingungen abnehmen, nimmt die Emission von Metallen zu. Dies liegt an der stärkeren Evaporation durch die höheren Verbrennungstemperaturen und der Bildung von flüchtigen Metallchloriden (Sippula et al. 2008). Wenn der Metallgehalt relativ zur Partikelmasse betrachtet wird, wie es in der Toxikologie üblich ist, scheinen die Emissionen aus effizienten Verbrennungsprozessen besonders metallreich. Werden die Metallemissionen stattdessen auf die verbrannte Holzmenge bezogen, ist dies nicht zwangsläufig der Fall (Lamberg et al. 2011; Orasche et al. 2012). In der Regel ist Zink die häufigste Metallspezies in Holzrauchpartikeln (WSP, wood smoke particles). Neben der Volatilität während der Verbrennung wird die Häufigkeit von Metallen in den partikulären Emissionen aber auch durch die Metallgehalte des Brennholzes selbst bestimmt. Deshalb können sich die Metallgehalte in Emissionen von Brennholz unterschiedlicher Holzsorten oder Herkunftsregionen deutlich unterscheiden und unter Umständen können auch andere Metalle, wie Eisen, Kupfer oder Chrom in ähnlichen Konzentrationen wie Zink in WSP vorkommen (Schmidl et al. 2008).

Viele Metalle (bzw. ihre Salze und Oxide) sind für ihre zytotoxischen und kanzerogenen Eigenschaften bekannt (Beyersmann und Hartwig 2008). Die Toxizität bzw. Kanzerogenität der Metalle beruht zum Beispiel auf der Generierung von ROS, die sie durch Katalyse von Fenton und Fenton-ähnlichen Reaktionen oder der Inhibierung von Enzymen, die an der Detoxifizierung von ROS beteiligt sind, bewirken können. Zusätzlich können Metalle durch Inaktivierung von DNA-Reparaturprozessen die genomische Stabilität negativ beeinflussen (Beyersmann und Hartwig 2008; Stohs und Bagchi 1995). Von besonderer Bedeutung in Hinblick auf ihre Toxizität ist die partikuläre Natur der Metalle in WSP. Partikuläre Metallspezies können über einen „Trojanisches Pferd“-Mechanismus über endozytotische Mechanismen die Zellmembran passieren und so intrazellulär viel höhere Konzentrationen erreichen als lösliche Verbindungen (Gebel et al. 2014; Limbach et al. 2007). Dieser Mechanismus ist für Metalle am Besten untersucht, ähnliche Überlegungen gelten aber auch für Ruß und PAKs (Dilger et al. 2016).

### 1.1.2.4. Gasförmige Bestandteile

Neben den partikulären Emissionen enthält Holzrauch auch gasförmige Schadstoffe wie CO, NO<sub>x</sub> und leichtflüchtige organische Verbindungen wie z.B. Benzol, Phenole oder Aldehyde (Naehrer et al. 2007).

Stickoxide führen zu Reizungen der Atemwege und Entzündungserscheinungen. Bei einer chronischen NO<sub>x</sub>-Exposition können wiederkehrende Schädigungen und Reparaturprozesse möglicherweise die Entstehung von Fibrose begünstigen (Persinger et al. 2002; Weinberger et al. 2001).

Benzol ist ein von der Internationalen Agentur für Krebsforschung (IARC) als humankanzerogen eingestufte Aromat. Um toxisch zu wirken, muss Benzol, wie die PAKs, metabolisiert werden. Die



Metabolisierung geschieht ebenfalls CYP-abhängig, wodurch unter anderem Phenol, Hydrochinon und Catechol entstehen kann. Hydrochinone und Catechole können durch Redox-Cycling ROS generieren. Darüber hinaus entstehen reaktive Epoxide, die mit Proteinen und DNA reagieren können und so zyto- und gentoxisch wirken (Snyder et al. 1993).

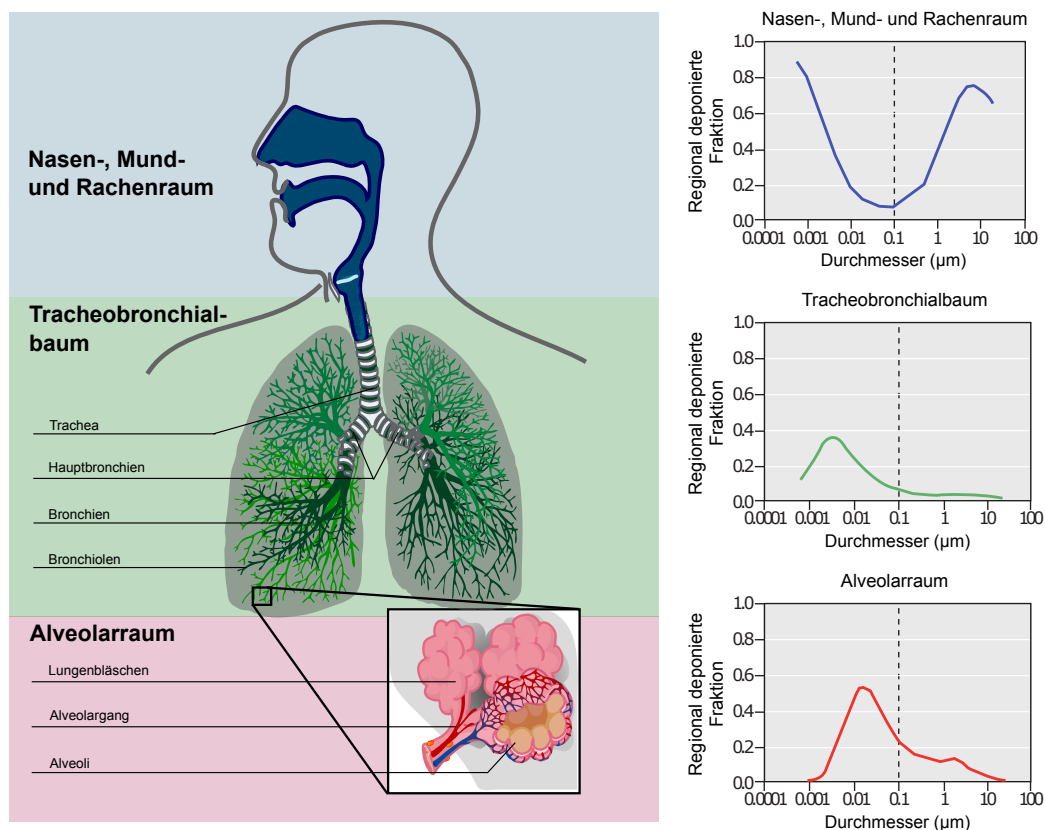
Bei den Aldehyden im Holzrauch handelt es sich hauptsächlich um Formaldehyd (FA) und Acetaldehyd (AA), welche aufgrund ihrer kanzerogenen respektive potentiell kanzerogenen Eigenschaften (Baan et al. 2009; IARC 1999) intensiv untersucht wurden. Für die kanzerogene Wirkung spielt die Reaktion der elektrophilen Aldehyde mit primären und sekundären Aminen eine wichtige Rolle, wobei intra- und intermolekulare Verknüpfungen von biologischen Makromolekülen wie DNA und Proteine gebildet werden (Kawanishi et al. 2014; Stingle und Jentsch 2015).

### 1.1.3. Zur Toxikologie des Holzrauchs

#### 1.1.3.1. Inhalation von Verbrennungsaerosolen

Die Exposition gegenüber Holzrauch erfolgt inhalativ über die Lungen. Über den Atemtrakt können sowohl partikuläre als auch gasförmige Verbindung in den Körper gelangen. Eingeatmeter Holzrauch gelangt über den Nasen-Mund-Rachenraum und die Luftröhre (Trachea) in die Bronchien (Abb. 1.2). Die Bronchien verzweigen sich in bis zu 22 Generationen in die Bronchiolen und enden in den Alveolen (Yeh und Schum 1980). In den Alveolen findet auf einer Oberfläche von rund 150 m<sup>2</sup> (bei Erwachsenen) der Gasaustausch statt (Gehr et al. 1978). Die hohe Oberfläche der Alveolen führt aber auch dazu, dass inhalierte Partikel leicht über Diffusion abgeschieden werden können.

Die Deposition von inhalierten Partikeln in der Lunge ist größenabhängig (Abb. 1.2). In jedem der drei Bereiche des Atemtrakts, dem Nasen-, Mund- und Rachenraum, dem Tracheobronchialbaum und Alveolarraum, werden signifikante Mengen Partikel verschiedener Größe abgeschieden. Oberdörster et al. (2005) beschreiben die größenabhängige Partikeldeposition basierend auf Daten der International Commission for Radiological Protection (ICRP). Demnach werden 90% der Partikel unter 1 nm im Nasen-, Mund- und Rachenraum abgeschieden, ebenso wie der größte Teil von Partikeln über 1 µm. Partikel zwischen 1 nm und 1 µm erreichen die unteren Atemwege. Partikel von etwa 10 nm bis 100 nm werden zu hohen Anteilen in den Alveolen deponiert. Die typische Größenverteilung der Partikel eines Holzrauchsaerosols liegt bei 50-400 nm (Kocbach Bølling et al. 2009; Naeher et al. 2007), wovon rund 40% nach Inhalation in der Lunge abgeschieden werden (Muala et al. 2015b). Unlösliche Partikel können über den Mukus und Zilienschlag aus den oberen Atemwegen und Bronchien entfernt werden. In den Alveolen hingegen, müssen die Partikel von Makrophagen entfernt werden. Die Makrophagen phagozytieren die Partikel und bewegen sich langsam in Richtung des mukoziliären Apparats. Die Entfernung durch Makrophagen verläuft aber nur sehr langsam. Im Menschen wird eine Retentionszeit von bis zu 700 Tagen angenommen, weshalb es bei wiederholter Aerosolinhalation zu einer Akkumulation der Partikel kommt (Oberdörster et al. 2005).



**Abbildung 1.2.: Der aerodynamische Durchmesser von Partikeln bestimmt die regionale Depositionswahrscheinlichkeit in der Lunge.** Partikel unter 1 nm und über 1  $\mu\text{m}$  werden vorwiegend im Nasen-, Mund- und Rachenraum abgeschieden. Partikel zwischen 1 nm und 1  $\mu\text{m}$  erreichen die unteren Atemwege. In den Alveolen verbleiben vor allem die Partikel zwischen 10 und 100 nm. Adaptiert nach Oberdörster et al. (2005).

Die regionale Absorption von gasförmigen Substanzen ist maßgeblich durch ihre Wasserlöslichkeit bestimmt. Stark wasserlösliche Substanzen werden bereits in den oberen Atemwegen absorbiert, schlechter wasserlösliche Gase gelangen hingegen in die unteren Atemwege bis in die Alveolen (Asgharian et al. 2012; Bein und Leikauf 2011; Davies 1985).

### 1.1.3.2. Epidemiologische Studien

Mehrere epidemiologische Studien stellten einen Zusammenhang zwischen Emissionen aus der Holzverbrennung und einem erhöhten Erkrankungs- und Sterblichkeitsrisiko fest, zum Beispiel durch Untersuchung von Bevölkerungsgruppen aus Gegenden mit Waldbränden (Johnston et al. 2012) oder besonders hoher Verwendung von Holz als Brennstoffquelle (Ezzati et al. 2000; Sanhueza et al. 2009). In Gegenden mit hoher Verbreitung von Holzverbrennung konnten Pilotprojekte durch Bereitstellung von moderneren Öfen mit besseren Verbrennungseffizienzen bei den Studienteilnehmern eine Senkung des Blutdrucks bzw. geringere Häufigkeit an Erkrankungen wie Bronchitis und Grippe erzielen (McCracken et al. 2007; Noonan et al. 2012). Darüber hinaus weisen Arbeiter, die berufsbedingt einer erhöhten Exposition gegenüber Holzrauch unterliegen, verstärkt systemische

und pulmonale Beschwerden auf (Greven et al. 2012; Kato et al. 2004; Neitzel et al. 2009; Swiston et al. 2008).

### 1.1.3.3. Kontrollierte humane Inhalationsstudien

Kontrollierte Kurzzeit-Inhalationsstudien mit freiwilligen Probanden bekräftigen die epidemiologischen Studienergebnisse (Sigsgaard et al. 2015). Zum Beispiel konnten nach zweimaliger Kurzzeitinhalation von vier Stunden Dauer (Partikelkonzentration 240-280  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) in einwöchigem Abstand erhöhte Mengen von ausgeatmetem Malondialdehyd und dem urinären Marker Prostaglandin  $\text{F}_{2\alpha}$  nachgewiesen werden, welche beide auf erhöhten oxidativen Stress hinweisen (Barregard et al. 2008; Barregard et al. 2006). Muala et al. (2015a) stellten nach der dreistündigen Inhalation von Holzrauch (314  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) aus der unvollständigen Verbrennung deutliche Abnahmen der Makrophagen, Neutrophilen und Lymphozyten in der bronchialen und broncheoalveolären Lavage von Freiwilligen fest. Ebenfalls beobachteten sie eine schwache Zunahme von Entzündungsmarkern in Biopsieproben. In der gleichen Probandenstudie wurde ebenfalls eine transiente Erhöhung der arteriellen Versteifung und eine Modulation der Herzfrequenzvariabilität festgestellt (Unosson et al. 2013). Weitere Studien im Konzentrationsbereich von 200-500  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  und ein- bis zweimaliger Inhalationsdauer von zwei bis vier Stunden stellten neben pneumologischen ebenfalls systemische Entzündungsmarker fest (Ghio et al. 2012; Riddervold et al. 2012). Es gibt allerdings auch Humanstudien unter diesen Bedingungen, die nach Untersuchung vergleichbarer Parameter keine oder lediglich sehr schwache Effekte feststellten (Bønløkke et al. 2014; Forchhammer et al. 2012; Jensen et al. 2014; Sehlstedt et al. 2010; Stockfelt et al. 2012; Stockfelt et al. 2013).

### 1.1.3.4. *In vivo* Studien

Viele der epidemiologisch mit Holzrauch assoziierten schädlichen Wirkungen könnten mit einer chronischen Exposition gegenüber Holzrauch zusammenhängen. Langzeitstudien mit freiwilligen Probanden sind unter kontrollierten Bedingungen nicht möglich, in begrenztem Umfang wurden solche Studien aber mit Nagern durchgeführt. Chronische Inhalationsstudien über wenige Tage bis Wochen, stützen überwiegend die epidemiologischen Erkenntnisse. Die Folgen der chronischen Exposition umfassen die Bildung von Lungenödemen und -emphysemen, die Beeinträchtigung des Gasaustauschs sowie akute und chronische Entzündungsreaktionen, zusammengefasst in Naeyer et al. (2007). Zwei Studien untersuchten mit chronischer Exposition über einen Zeitraum von mehreren Monaten, ob die Inhalation von Holzrauch zu einer höheren Inzidenz von Lungentumoren in Mäusen führt. Nach 19 monatiger Exposition gegenüber hohen Konzentrationen Holzrauch (14.9  $\text{mg}/\text{m}^3$ ) wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutlich erhöhte Lungenkrebshäufigkeit festgestellt. Eine andere Studie, die Mäuse über 6 Monate lang mit realistischeren Konzentrationen an Holzrauch exponierte (0.3-1  $\text{mg}/\text{m}^3$ ), stellte hingegen keine Zunahme der Tumorraten fest (Naeyer et al. 2007). Zou et al. (2014) stellten nach 4 bis 7 monatiger Exposition erhöhte Werte für Marker der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition (EMT) fest, die eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Fibrose, aber auch der Tumormetastasierung, spielt.

Durch Instillation von gesammelten WSP werden in der Regel hohe Partikelkonzentrationen in der Lunge erzielt, die der Partikelbelastung einer Inhalation über lange Zeiträume entsprechen. Aufgrund der einmaligen Dosisapplikation als Bolus anstelle der Akkumulation über einen längeren Zeitraum könnten sich die Auswirkungen allerdings von einer echten chronischen Exposition unterscheiden (Oberdörster et al. 2005).

In einer aktuellen Instillationsstudie untersuchten Happonen et al. (2013) die Wirkungen von Holzrauchpartikeln aus Verbrennungen in verschiedenen Holzheizkesseln in Mäusen. Dabei induzierten die gesammelten Partikel aus den Emissionen eines Pelletbrenners die Bildung von DNA-Strangbrüchen im Lungengewebe. Verbrennungsprodukte aus anderen Heizkesseln führten darüber hinaus zur Induktion von Entzündungsmarkern und stützen somit die weiteren publizierten *in vivo* Studien.

### 1.1.3.5. *In vitro* Studien

*In vitro* Untersuchungen verfügen im Vergleich zu *in vivo* Studien über eine verringerte experimentelle Komplexität. In Hinblick auf die Zielsetzung dieser Arbeit können sie daher besonders wertvoll sein, weil so der Fokus der Untersuchungen stärker auf die physikochemischen Parameter, die die Wirkungen von WSP bestimmen, und ihre molekularen Wirkmechanismen gesetzt werden kann.

Uski et al. (2014) stellten fest, dass WSP aus ineffizienter und glimmender Verbrennung mehr PAKs enthalten als Partikel aus effizienten Verbrennungsprozessen und dass die PAK-Gehalte mit der Genotoxizität in murinen Makrophagen korrelierten. Zur Zytotoxizität und Generierung von oxidativem Stress bestand hingegen keine Korrelation. Gauggel-Lewandowski et al. (2013) berichteten hingegen von einer deutlichen Aktivierung des AhR, selbst bei der Untersuchung von Partikeln aus effizienten Verbrennungsbedingungen, was möglicherweise durch eine höhere Bioverfügbarkeit der PAKs als bei den Partikeln der Studie von Uski et al. (2014) erklärt werden kann. Eine andere Studie untersuchte WSP aus verschiedenen Verbrennungsbedingungen mit einem Kokultur-Modell. Obwohl die Sekretion inflammatorischer Zytokine durch die organischen Extrakte der Partikel unterschiedlich stark angeregt wurde, konnte keine Korrelation zum PAK-Gehalt festgestellt werden (Bølling et al. 2012).

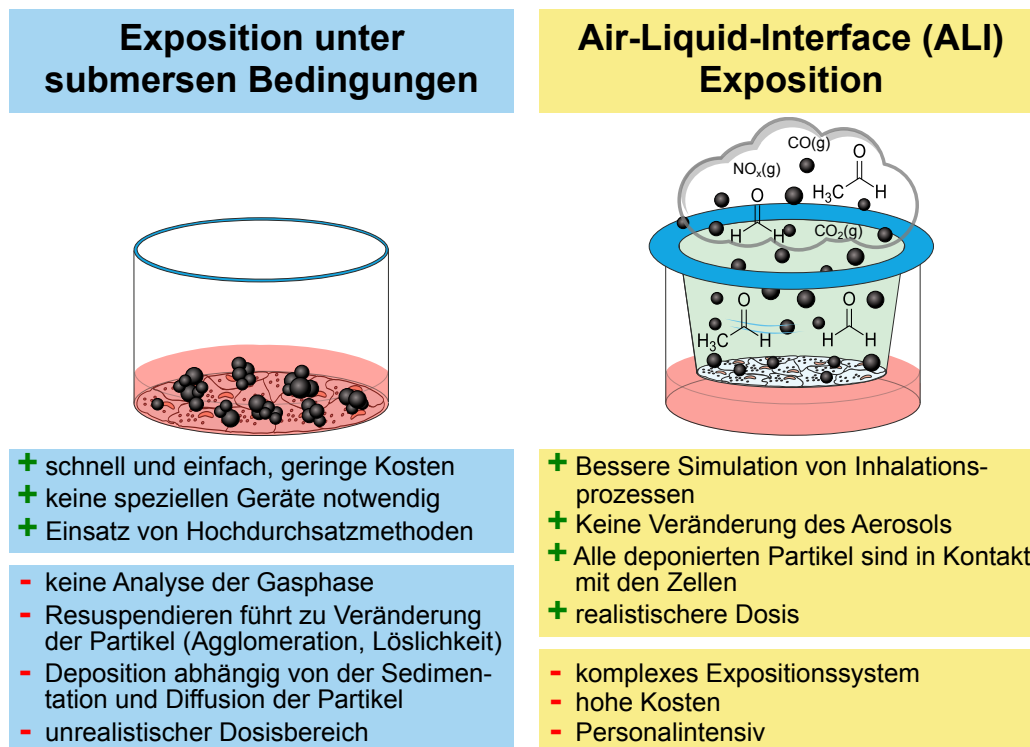
Ruß wird, wie PAKs, verstärkt während der unvollständigen Verbrennung gebildet. Deshalb weisen PAK-reiche Emissionen in der Regel auch einen hohen Rußgehalt auf. Allerdings ist nur wenig über die toxikologische Wirkung von Ruß in WSP bekannt. Mehrere Studien, die sich mit anderen Verbrennungspartikeln beschäftigten, stellten eine Korrelation zwischen Rußgehalt und oxidativem Stress fest (Chuang et al. 2011; Garza et al. 2008). Die Oberfläche von Rußpartikeln spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Nel et al. 2006; Stoeger et al. 2009). Carbon Black, das aus chemisch nahezu reinem elementarem Kohlenstoff besteht, wurde in mehreren Studien als Surrogat für Rußpartikel verwendet und induzierte sowohl Entzündungsreaktionen als auch ROS (Aam und Fonnum 2007; Diabaté et al. 2011; Garza et al. 2008; Monteiller et al. 2007; Pulskamp et al. 2007). Metalle finden sich in relativ hohen Gehalten in Partikelproben

von effizienten Verbrennungsprozessen (siehe Kapitel 1.1.2.3) und wurden bereits mit der Toxizität von Verbrennungsemissionen in Verbindung gebracht (Diabaté et al. 2011; Fritsch-Decker et al. 2011). Ihre Rolle bei der Wirkung von WSP wurde bisher aber kaum untersucht. In einer Makrophagenzelllinie bewirkten metallreiche WSP im Vergleich mit anderen WSP eine stärkere akute Zytotoxizität und Bildung von ROS (Uski et al. 2014). Unter den toxikologisch relevanten Metallen hat Zink normalerweise den größten Anteil in WSP. Daher wurden Zinkoxid Nanopartikel sowie zinkhaltige künstliche Referenzpartikel im Vergleich mit WSP untersucht und konnten die WSP vermittelte Toxizität (Sekretion von inflammatorischen Zytokinen und Generierung von ROS) teilweise imitieren (Torvela et al. 2014b). Die Wirkungen von allein gasförmigen Komponenten in Holzrauch wurden bisher nicht charakterisiert. Zwei Gruppen untersuchten bislang die Wirkungen von Holzrauch auf Lungenzellen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht, bei der neben den partikulären Emissionen ebenfalls Komponenten der Gasphase mit den Zellen in Kontakt treten (siehe Abschnitt 1.4). In beiden Studien wurde allerdings nicht zwischen partikulären und gasförmigen Emissionen unterschieden (Hawley und Volckens 2013; Künzi et al. 2013). Hawley und Volckens (2013) leiteten die Emissionen einer offenen Feuerstelle sowie von zwei einfachen Holzöfen auf kultivierte primäre Lungenzellen. Lediglich die Emissionen der offenen Feuerstelle führten dabei zu einer mäßigen Induktion von inflammatorischen und anti-oxidativen Genen. Künzi et al. (2013) konnten hingegen keine Anzeichen von Entzündungsreaktionen feststellen. In dieser Studie befand sich über den Zellen allerdings ein Flüssigkeitsfilm, der die Zellen möglicherweise vor schädlichen Wirkungen des Aerosols schützte. Darüber hinaus schätzten die Autoren die Partikeldosis deutlich geringer als in der Studie von Hawley und Volckens (2013). Die Verbrennungsgase aus anderen Biomasseverbrennungen sind in gewissem Rahmen mit der Holzverbrennung vergleichbar, weshalb Erkenntnisse über die Gasphasentoxizität anderer Emissionen eventuell auf den Holzrauch extrapoliert werden können.

Zigarettenrauch ist das mit Abstand am besten toxikologisch charakterisierte Aerosol. Eine aktuelle Studie führte interessanterweise die Reduzierung der metabolischen Aktivität von mit Zigarettenrauch behandelten Zellen zu 90% auf dampf- bzw. gasförmige Bestandteile zurück, während die anderen untersuchten Parameter, die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen, auf die partikuläre Phase zurückzuführen war (Azzopardi et al. 2015). Manche der potentiell toxischen gasförmigen Verbindungen im Holzrauch wurden unabhängig von ihrer Rolle bei Verbrennungsaerosolen toxikologisch untersucht. Mögel et al. (2011) testeten zum Beispiel die flüchtigen Aromaten Styrol und Benzol, die auch im Holzrauch zu finden sind, an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht und konnten zeigen, dass diese über die Generierung von ROS die MAP-Kinasen aktivieren und pro-inflammatorische Prozesse einleiten können.

## 1.2. *In vitro* Testsysteme

### 1.2.1. Submers vs Air-Liquid-Interface Exposition



**Abbildung 1.3.: Die ALI-Exposition hat einige Vorteile gegenüber der klassischen Submersexposition.** Bei der ALI-Exposition werden Zellen direkt mit dem gegebenenfalls verdünnten aber ansonsten unveränderten Aerosol exponiert, während bei der Submersexposition resuspendierte Partikel in Zellkulturmedium auf die Zellen gegeben werden. Im Gegensatz zur Submersexposition, können mit der ALI-Exposition gasförmige Bestandteile von Aerosolen getestet werden. Weitere Unterschiede der Methoden werden im Text erklärt.

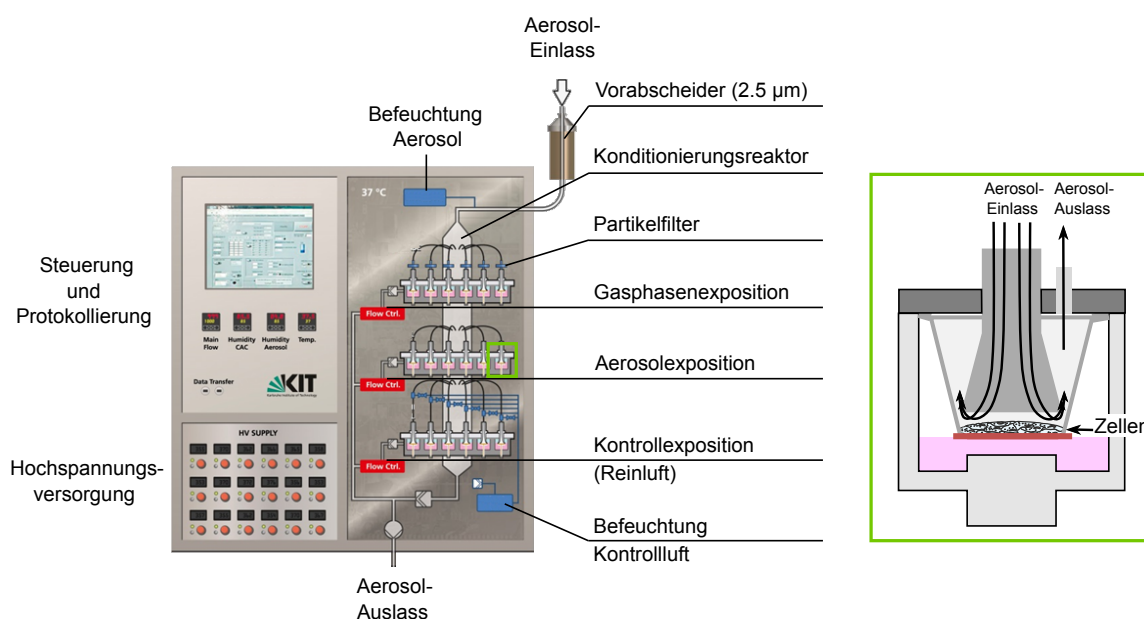
Die *de facto* Standardmethode zum Testen der Toxizität von Aerosolen *in vitro* ist die submerse Applizierung von gesammelten Partikeln. Hierbei werden Partikel aus Verbrennungsprozessen, zum Beispiel mit Hilfe von Filtern, aerodynamischen Abscheidern oder elektrostatischer Deposition gesammelt. Die Partikelproben werden in Zellkulturmedium dispergiert und anstelle des reinen Kulturmediums auf Zellkulturen gegeben. Diese Methode ist aus der klassischen Toxikologie mit löslichen Substanzen entstanden, ihre Popularität beruht auf ihrer Einfachheit und Schnelligkeit. Außerdem benötigt diese Methode keine speziellen Geräte und verursacht relativ geringe Kosten (Paur et al. 2011).

Die Methode hat aber einige Nachteile für die toxikologische Charakterisierung von Verbrennungsaerosolen. Der gravierendste Nachteil ist der Verlust der Gasphase bei der Probenahme. Verbrennungsaerosole enthalten verschiedenste toxische oder potentiell toxische Gase bzw. leicht flüchtige organische Verbindungen, die mit der Submersmethode nicht getestet werden können. Ebenfalls führt die Resuspension der Partikel im Zellkulturmedium zu einer Veränderung der

physiko-chemischen Eigenschaften der Partikelproben. Zum Beispiel können Partikel oder aufkondensierte Substanzen durch das Dispergieren gelöst und im Kulturmedium verdünnt werden. Ebenfalls kann sich das Agglomerationsverhalten verändern. Der Agglomerationszustand in Partikelsuspensionen stellt einen kritischen Einflußfaktor für die Ergebnisse von *in vitro* Studien dar (Gualtieri et al. 2011; Sharma et al. 2014; Wick et al. 2007). Zum Beispiel hat der Agglomerationszustand, und damit die Partikelgröße, einen erheblichen Einfluss auf die Dosis in Submersstudien, denn die Sedimentation und Diffusion bestimmt welcher Anteil der applizierten Partikel mit den Zellen wechselwirken. Dieser Anteil kann experimentell nur mit größerem Aufwand bestimmt werden. Meistens muss er über Modelle abgeschätzt werden, die einen stabilen Agglomerationszustand erfordern, welcher aber oft nicht gegeben ist. Zudem werden in Submersstudien in der Regel Konzentrationen eingesetzt, die mehrere Größenordnungen über den in der Lunge möglichen Partikelbelastungen liegen (Paur et al. 2011).

Die Air-Liquid-Interface (ALI) Exposition ist der Submersexposition in diesen Punkten überlegen. Charakteristisch für die ALI-Exposition ist, dass die Zellen auf der apikalen Seite nicht mit Kulturmedium bedeckt sind. Auf diese Weise kann das Testaerosol ohne Artefakte, wie sie bei der Probenahme entstehen, auf die Zellen geleitet werden. Beispiele für solche Artefakte sind die oben genannte zusätzliche Agglomeration der Partikel oder der Verlust der Gasphase des Aerosols. Damit die Zellen während der Exposition mit Kulturmedium versorgt werden können, werden sie auf einer permeablen Membran kultiviert und stehen über die basolateralen Seite mit dem Medium in Kontakt. Diese Exposition stellt somit eine realistischere Simulation der Inhalation von Aerosolen dar. Auch die Dosis ist in ALI-Experimenten besser definiert, denn alle abgeschiedenen Partikel sind in Kontakt mit den Zellen. Die erzielte Partikeldosis bei Verwendung der ALI-Technik bewegt sich üblicherweise in realistischeren Bereichen als bei Anwendung der Submersmethode (Paur et al. 2011). Zu den Nachteilen der ALI-Exposition gehört vor allen Dingen, dass die Methode zur reproduzierbaren Durchführung ein aufwendiges Expositionssystem benötigt. Ein solches System steht bisher nur wenigen Laboren zur Verfügung, was vermutlich der Hauptgrund ist, dass die Methode nur in einer geringen Zahl von Studien verwendet wird. Weitere Nachteile sind die deutlich höheren Kosten für Verbrauchsmaterialien im Vergleich zu Submersversuchen und dass Instandhaltung und Betrieb in der Regel zusätzliches Personal erfordern. Ein in der heutigen Zeit nicht zu unterschätzender Nachteil ist, dass die Anzahl der individuell exponierbaren Zellkulturen genauso wie die Anzahl der gleichzeitig verwendbaren Testaerosole stark limitiert ist, während die Kultivierung und Inkubation unter submersen Bedingungen ohne Probleme hochdurchsatzfähig ist. Ausführlicher sind die Charakteristika und Möglichkeiten der ALI-Exposition in Mülhopt et al. (2016) und im Übersichtsartikel von Paur et al. (2011) beschrieben.

## 1.2.2. Expositionssysteme zur Untersuchung von Aerosolen



**Abbildung 1.4.: Aufbau des Karlsruher Expositionssystems.** Das Testaerosol gelangt über einen Vorabscheider in den Konditionierungsreaktor. Von dort wird das Aerosol auf die Zellkulturen geleitet. Die Verwendung von Filtern zur Entfernung der Partikel erlaubt das separate Testen der Gasphase. Zusätzlich können die Zellen für eine Kontrollbehandlung mit Reinluft exponiert werden. Auf der rechten Seite ist der Aufbau einer einzelnen Expositionskammer im Detail abgebildet. Das Aerosol trifft durch einen trompetenförmigen Einlass gleichmäßig auf den Zellen auf und wird danach aus der Expositionskammer herausgeleitet.

Die Exposition von Zellen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht setzt die Verwendung eines speziellen Geräts voraus, das in erster Linie für einen gleichmäßigen Kontakt des Aerosols mit der Oberfläche der Zellkulturen sorgt. In Abbildung 1.4 ist der Aufbau des in Karlsruhe entwickelten Expositionssystems abgebildet. Das Aerosol gelangt über einen Vorabscheider in einen Konditionierungsreaktor. Der Vorabscheider imitiert die Funktion des oberen Atemtrakts, der große Partikel abscheidet bevor sie in die Bronchiolen und Alveolen gelangen. Im Konditionierungsreaktor wird das Aerosol auf 37°C temperiert und mit Wasserdampf befeuchtet, um die Zellen vor dem Austrocknen zu schützen. Aus dem Konditionierungsreaktor erfolgt die Probenahme für die Zellexposition auf isokinetische Weise: die Entnahme des Probevolumenstromes erfolgt mit der gleichen Strömungsgeschwindigkeit wie im Konditionierungsreaktor. Auf diese Weise werden Verfälschungen des Testaerosols aufgrund der größenabhängigen Trägheit der Partikel vermieden. Aus dem Konditionierungsreaktor kann auf gleiche Weise auch die Probenahme für andere Analysetechniken stattfinden, wie z.B. die Bestimmung der Partikelanzahl- und Partikelgrößenverteilung des Aerosols oder die chemische Analytik. Vom Konditionierungsreaktor führen die Probenahmeleitungen in die Expositionsmodule, in denen die Zellkulturen in individuellen Expositionskammern (Abbildung 1.4, rechts) mit dem Aerosol in Kontakt treten. In den Expositionskammern befindet sich Zellkulturmedium, das die Zellen während der Exposition versorgt. Im Rahmen der vorgelegten Arbeit



wurden für Kontrollbehandlungen die Zellen auch mit gefilterter Reinluft begast (siehe Kapitel 3.2.1). Um spezifisch nur die Wirkungen der Gasphase zu untersuchen, können Partikelfilter in die Probeleitungen eingebracht werden. So gelangen lediglich die gasförmigen Aerosolbestandteile auf die Zellen. Die deponierte Partikelmasse kann mit einer Quarzmikrowaage (QCM) in einer speziellen Expositionskammer ohne Zellen gemessen werden (Mülhopt et al. 2009). In der aktuellen Entwicklungsstufe verfügt das Karlsruher System außerdem über die Möglichkeit, die Partikeldosis mit Hilfe eines elektrostatischen Feldes bis zu einer Abscheiderate von 9% zu erhöhen (Mülhopt et al. 2016).

Andere Arbeitsgruppen verfügen über ALI-Expositionssysteme mit teilweise unterschiedlichen technischen Lösungen. Die meisten Systeme arbeiten mit einem kontinuierlichen Fluß, der aus einem frisch generierten Aerosol entnommen wird. Die Systeme von Aufderheide et al. (2013), Bitterle et al. (2006), Bruijne et al. (2009), Kim et al. (2013), Mertes et al. (2013), Savi et al. (2008) und Tippe et al. (2002) verwenden, wie das Karlsruher System, eine durch Diffusion bestimmte Partikelabscheidung durch das Überströmen der Zellkulturen mit dem Aerosol auf der apikalen Seite. Broßell et al. (2013) hingegen benutzen ein unterschiedliches Prinzip. Sie kultivieren die Zellen auf der Unterseite der permeablen Membran der Zellkulturgefäße und verwenden thermophoretische Kräfte um Partikel im Vorbeiströmen von der Unterseite auf den Zellen abzuscheiden. Diese Methode hat den Vorteil einer sehr hohen Depositionseffizienz von bis zu 20%.

Manche Systeme verfügen ebenfalls über die Möglichkeit, die Partikeldosis mit einem elektrostatischen Feld zu erhöhen und erreichen so Depositionseffizienzen von rund 8% (Mertes et al. 2013; Savi et al. 2008). Höhere Partikeldosen können erreicht werden, wenn die Partikel zusätzlich aufgeladen werden. Mit dieser Methode werden Depositionsraten von über 90% erzielt (Bruijne et al. 2009; Sillanpää et al. 2008). Diese beiden Systeme verfügen allerdings nicht über eine Befeuchtung, um die Zellen vor dem Austrocknen zu schützen, wie sie zum Beispiel in den Systemen von Bitterle et al. (2006), Mertes et al. (2013) und Panas et al. (2014) umgesetzt wurde. Das von Lenz et al. (2009) entwickelte System unterscheidet sich von den bisher beschriebenen ALI-Systemen, die mit einer kontinuierlichen Aerosolquelle arbeiten. Stattdessen werden in diesem System flüssige Proben vernebelt. Die Nebeltröpfchen sinken aufgrund des sogenannten „cloud-settling“ rasch auf Zellkulturen ab, weshalb in kurzer Zeit hohe Dosen erzielt werden können. Das System ist besonders für Aerosole aus Flüssigkeiten geeignet, wurde aber auch bereits verwendet um Partikelproben auf Zellen zu testen (Endes et al. 2014; Lenz et al. 2014). Diese Methode zeichnet sich durch ihren einfachen Betrieb und Handhabung aus. Da die Partikel hierfür in einer Flüssigkeit dispergiert werden müssen, teilt die Methode aber einige der damit verbundenen Nachteile mit der Submerskultur.

ALI-Expositionssysteme wurden bereits mehrfach erfolgreich für die toxikologische Analyse von Verbrennungsaerosolen verwendet. Das mit Abstand am besten untersuchte Verbrennungsaerosol ist Zigarettenrauch. Mit Hilfe der ALI-Technik konnte zum Beispiel wiederholt gezeigt werden, dass gasförmige Bestandteile eine Rolle bei der Toxizität von Zigarettenrauch spielen (Azzopardi et al. 2015; Fukano et al. 2004; Fukano et al. 2006; Nara et al. 2013; Okuwa et al. 2010). Die Emissionen von Diesel- oder Benzinmotoren zeigten bei Verwendung der ALI-Exposition mehrfach eine höhere

Toxizität als bei Verwendung der Submersmethode (Cooney und Hickey 2011; Lichtveld et al. 2012). Auch die Rolle der Gasphase dieser Aerosole wurde untersucht. Holder et al. (2008) und Knebel et al. (2002) konnten nach Entfernung der Partikel keine Veränderung der Toxizität der Motorabgase beobachten, was vermuten lässt, dass die Gasphase für die Toxizität verantwortlich ist. Seagrave et al. (2007) konnten dieses Ergebnis allerdings nicht bestätigen. Oeder et al. (2015) verglichen die Emissionen eines mit Diesel oder Schweröl betriebenen Schiffsdieselmotors. Mit mehreren Omics-Techniken wurde festgestellt, dass das Dieselabgas ein breiteres Spektrum an molekularen Veränderungen bewirkt als die Schwerölemissionen. Möglicherweise war hierfür ein hoher Anteil kleiner Rußpartikel in den Dieselemissionen verantwortlich. Mit der Wirkung von Holzrauch an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht beschäftigten sich bisher lediglich zwei Studien in geringem Umfang. Die Ergebnisse dieser Studien wurden bereits in Kapitel 1.1.3.5 beschrieben.

### 1.3. Zielsetzung

Um negative gesundheitliche Auswirkungen durch Holzverbrennungsemissionen zu vermeiden, sind geeignete Interventionsstrategien nötig. In Deutschland wurden beispielsweise mit dem Bundes-Immissionsschutzgesetz (BImSchG) strenge rechtliche Auflagen implementiert um Emissionen von Verbrennungsanlagen zu limitieren. Grenzwerte für Emissionen aus kleinen und mittleren Feuerungsanlagen basieren derzeit auf der Masse von CO und partikulären Emissionen. Für industrielle Großfeuerungsanlagen bestehen darüber hinaus auch Grenzwerte für anorganische Gase wie Stickoxide und Schwefeldioxid und Quecksilber. Bei der Holzverbrennung entsteht allerdings eine Vielzahl verschiedener Substanzen die hinsichtlich ihrer biologischen Wirkung nur zum Teil gut untersucht sind. Insbesondere zu den Wirkungen von organischen Verbindungen in der Gasphase ist nur sehr wenig bekannt. Daher ist die Charakterisierung der gesundheitlich bedenklichen Substanzen von größter Bedeutung, um besser definierte Grenzwerte festzulegen oder Emissionen gezielt verändern zu können.

Ziel dieser Arbeit war es, **die toxikologisch relevanten Bestandteile von Holzverbrennungsemissionen zu identifizieren** und ihre Wirkung auf kultivierte Lungenzellen zu charakterisieren. Gemäß des Expositionsweges gegenüber Verbrennungsemissionen wurden hierfür zwei epitheliale Lungenzelllinien alveolären und bronchialen Ursprungs verwendet, A549 und BEAS-2B.

**Zunächst standen gesammelte Partikelproben aus der Holzverbrennung im Fokus**, die mit der herkömmlichen Submersexposition überprüft und mit den Wirkungen repräsentativer Substanzen für die Bestandteile der Holzverbrennungspartikel verglichen werden sollten. Da die Exposition unter Submersbedingungen aber eine Reihe von Nachteilen mit sich bringt, insbesondere dass gasförmige Verbrennungsprodukte nicht getestet werden können, bestand der **Schwerpunkt der Arbeiten darin, die Wirkungen von Holzrauch an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht zu untersuchen**.

Hierfür sollte in Kooperation mit der Abteilung Aerosol- und Partikeltechnologie am Institut für Technische Chemie ein dort entwickeltes System für die Exposition an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht weiterentwickelt und biologisch validiert werden. Dies beinhaltet in erster Linie die Implementierung der Möglichkeit Zellen für Referenzbehandlungen im Expositionssystem mit Reinluft zu exponieren.

Um einen umfassenden Überblick hinsichtlich der Wirkungen des Holzrauchs zu bekommen, sollten die Zellen mit dem kompletten Holzrauch, der Gasphase und mit Reinluft behandelt werden und die Wirkungen auf die globale Genexpression mit einer mRNA-Sequenzierung analysiert werden. Die so gewonnen Daten dienen nach bioinformatischer Auswertung als Grundlage für die Auswahl weiterer zu untersuchender Endpunkte um die Wirkmechanismen zu bestätigen. Hierzu gehört unter anderem eine Metabolomanalyse in Zusammenarbeit mit Partnern von der Universität Luxemburg. Außerdem sollte, ausgehend von der Transkriptomanalyse, mit systembiologischen Methoden untersucht werden, ob sich relevante toxische Substanzen im Holzrauch identifizieren lassen.



## 2. Material und Methoden

Eine Liste der verwendeten Puffer und Lösungen ist im Anhang zu finden, sofern nicht direkt im Text beschrieben. Alle nicht explizit aufgeführten Chemikalien wurden von Roth, Karlsruhe bezogen. Alle nicht explizit aufgeführten Verbrauchsmaterialien in der Zellkultur stammen von Greiner, Frickenhausen.

### 2.1. Kultivierung und Behandlung der Zellen

#### 2.1.1. Kultivierung der Zellen

In dieser Arbeit wurden zwei humane Lungenepithelzelllinien verwendet, A549 und BEAS-2B. Bei der A549 Zelllinie handelt es sich um alveolare Zellen die aus einem Lungenkarzinom gewonnen wurden (Giard et al. 1973). BEAS-2B stammen aus dem bronchialen Epithel. Im Gegensatz zu A549 Zellen handelt es sich um keine Krebszelllinie, sondern um Zellen aus einer gesunden Spenderlunge, die durch Infektion mit einem SV40 Adenovirus immortalisiert wurden (Reddel et al. 1988). Die Zellen wurden bei 37 °C, 95% relativer Luftfeuchte und 5% CO<sub>2</sub> im RPMI-1640 Medium (Gibco) (A549) mit 10% FKS (Sigma-Aldrich) und 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco) bzw. KGM Medium (BEAS-2B) (Lonza, Walkersville, MD, USA, mit allen Supplementen außer Gentamycin/Amphotericin, stattdessen 1% Penicillin-Streptomycin) kultiviert. Bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 80-90% (A549: 2-3 Tage, BEAS-2B: 3-5 Tage) wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurden die A549 Zellen mit PBS gewaschen und 1.5 mL Trypsin (0.25%, Gibco) auf den Zellen verteilt, abgesaugt und für etwa 3 min bei 37°C inkubiert. Mit 10 mL frischem Medium wurden die Zellen vereinzelt und ein Aliquot in etwa 15 mL frischem Medium weiterkultiviert (T75). BEAS-2B Zellen wurden nach dem Waschen mit PBS mit 1 mL Trypsin (0.05%) bedeckt und 7 min später nach Zugabe von 9 mL frischem Medium vereinzelt. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 150 g zentrifugiert, das Pellet in frischem Medium resuspendiert und ein Aliquot in etwa 15 mL frischem Medium in T75 Flaschen weiterkultiviert. Für die Kultivierung von BEAS-2B Zellen wurden zur besseren Adhärerung und Expansion alle Zellkulturgefäße für mindestens 30 min mit einer Coating-Mischung beschichtet (10 µg/mL Fibronectin (Biopure), 30 µg/mL Collagen (Roche), 10 µg/mL BSA (Sigma-Aldrich) in PBS) und vor Verwendung einmal mit PBS gewaschen.

#### 2.1.2. Vorbereitung der Zellen zur Behandlung

Zur Behandlung der Zellen wurden beide Zelllinien wie oben beschrieben aus Zellkulturflaschen abgelöst und in den zur Behandlung verwendeten Multiwellplatten oder Transwell-Inserts (Trans-

well® 3450 Clear, 24 mm Durchmesser, 0,4 µm Porengröße, Polyestermembran, Corning) kultiviert. Dabei wurde das Volumen der Suspensionen sowie die Zelldichte so gewählt, dass in allen Versuchen, unabhängig vom verwendeten Kulturgefäß, das Verhältnis von Zellzahl zu Grundfläche des Kulturgefäßes konstant war. Eine Übersicht der verwendeten Volumina und Zelldichten ist in Tabelle A.1 zu finden. Für die Behandlung wurden BEAS-2B Zellen in RPMI-1640 statt KGM kultiviert, da KGM nicht in glutamin- bzw. glucosefreier Formulierung für die Versuche mit Isotopenmarkierung (Analyse metabolischer Flüsse, S. 27) erhältlich ist. Nach 24 h wurde das Medium entfernt und ohne Waschen durch serumfreies Medium mit suspendierten Partikeln oder gelösten Substanzen für Submersversuche bzw. für ALI-Versuche auf der basolateralen Seite mit serumfreiem Medium, das zusätzlich HEPES enthielt, ersetzt (Details siehe 2.1.4.2).

### 2.1.3. Submersexposition von Partikeln

#### 2.1.3.1. Verwendete Partikel

Die verwendeten Partikel aus der Holzverbrennung (WSP, wood smoke particles) wurden während einer Feldkampagne des Technologie- und Förderzentrum (TFZ) Straubing aus den Emissionen eines Kachelofens in einem Privathaushalt abgeschieden. Entsprechend den Feuerungsgewohnheiten im privaten Sektor, wurden die Partikel bei der unvollständigen Verbrennung von gemischtem Brennholz gesammelt. Das Brennholz bestand aus Holzbriketts, Spaltholz aus Hart- und Weichhölzern sowie Holzabfällen. Die Partikel wurden von Gauggel et al. (2012) bereits beschrieben (Probe „PM#2“) und wurden von Sonja Mülhopt (ITC-TAB, KIT) zur Verfügung gestellt. In Abschnitt 3.1 wurden zusätzlich zwei weitere Partikeltypen verwendet: Carbon Black Nanopartikel (CB14, Printex® 90, Primärpartikelgröße 14 nm), zur Verfügung gestellt von Evonik (Frankfurt), und Zinkoxid Nanopartikel (ZnO, Primärpartikelgröße < 100 nm), erworben von Sigma-Aldrich (Katalognr.: 54906, Taufkirchen). Alle Partikel wurden mit dem LAL-Test (Lonza) auf Endotoxine getestet. Partikelsuspensionen von 1 mg/mL in VE Wasser wurden 10 min bei 20.000 g zentrifugiert und der Überstand nach Herstellerprotokoll getestet. Bei allen Partikeln war der Messwert nicht vom Blank zu unterscheiden, eine Beeinflussung der Testergebnisse durch Endotoxine kann daher ausgeschlossen werden.

#### 2.1.3.2. Herstellung von Partikelsuspensionen

Zur Herstellung der Partikelsuspensionen für die Submersbehandlung wurden zunächst Stammsuspensionen mit einer Konzentration von 1 mg/mL aus 5 - 15 mg Partikelprobe in serumfreiem RPMI-1640 Medium hergestellt. Die Stammsuspensionen wurden mit einer Ultraschallspitze für 15 s sonifiziert (duty cycle 50, output control 5, Branson Sonifier® 250, Schwäbisch Gmünd). Die Endkonzentrationen zur Zellbehandlung wurden in einem Schritt durch Verdünnung der Stammsuspension mit serumfreiem Medium hergestellt und direkt vor Applikation auf die Zellen im Vortex geschüttelt. Das eingesetzte Volumen zur Inkubation wurde so gewählt, dass in allen Versuchen, unabhängig vom verwendeten Kulturgefäß, die Partikeldosis pro Zellfläche konstant

war. Eine Umrechnung der eingesetzten Volumenkonzentrationen (in  $\mu\text{g/mL}$ ) in eine Flächendosis (in  $\mu\text{g/cm}^2$ ) unter Annahme vollständiger Deposition der Partikel ist in Tabelle 2.1 zu finden.

**Tabelle 2.1.:** Umrechnungstabelle der verwendeten Partikelsuspensionen von  $\mu\text{g/mL}$  nach  $\mu\text{g/cm}^2$

5	10	50	100	$\mu\text{g/mL}$
1.57	3.16	15.8	31.6	$\mu\text{g/cm}^2$

## 2.1.4. Exposition von Zellen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht

### 2.1.4.1. Generierung und Charakterisierung des Holzrauchaerosols

Das untersuchte Aerosol wurde durch Verbrennung von Buchenscheitholz in einem für Privathaushalte typischen Kaminofen (8kW, Modell Toronto, Fa. Haase) erzeugt. Das Brennholz wurde im Technikum gelagert um möglichst konstante Lagerbedingungen zu gewährleisten. Der Ofen wurde rund eine Stunde vor dem Start eines Zellexperimentes angefeuert, um während der Zellexposition eine möglichst konstante Betriebstemperatur zu erzielen. Durch vergleichbare Feuerungsintervalle und Holzmenge wurde versucht die Emissionsschwankungen zwischen Versuchen gering zu halten. Während eines 4 h Expositionsversuchs wurden typischerweise zwischen 5 und 7 kg Brennholz in 5 - 6 Chargen verbrannt. Der Holzrauch wurde in einer Verdünnungsanlage (Diabaté et al. 2008) im Verhältnis 1:10 mit gefilterter Umgebungsluft verdünnt. Die Probenahme zur Charakterisierung des Holzrauchs fand innerhalb des Expositionssystems an der gleichen Stelle statt, an der auch die Aerosolproben für die Zellexposition genommen wurden. Für die Metall- und PAK-Analytik wurden Quarzglasfilter verwendet. Zur Probenahme der Carbonyle wurden zwei Orbo 555 DNPH-Kartuschen (Sigma-Aldrich) in Reihe geschaltet und wie bei einer Zellexposition das gefilterte Aerosol vor einzelnen Expositions-kammern durch die Kartuschen geleitet. Metall-, PAK- und Carbonylanalytik wurde durch Kooperationspartner durchgeführt (für die verwendeten Methoden siehe Punkt 2.2). Die Partikelgrößen- und Partikelanzahlverteilung wurde mit SMPS im Größenbereich von 14 bis 780 nm ermittelt.

### 2.1.4.2. Zellbehandlung im Expositionssystem

Um die Zellen in  $\text{CO}_2$ -armer Atmosphäre außerhalb des Inkubators zu verwenden, wurde ein Kulturmedium mit Zusatz eines  $\text{CO}_2$ -unabhängigen Puffers (25 mM HEPES) verwendet. Vor Transport der Zellen zum Ort der Exposition wurde das Zellkulturmedium zur Anzucht der Zellen auf der apikalen Seite entfernt und auf der basolateralen Seite durch 1.5 mL RPMI-1640 Medium mit HEPES und ohne FKS ersetzt. In die Becher der Expositions-kammern wurde 6.5 mL des selben Mediums gefüllt und die Zellen luftblasenfrei eingesetzt. Für die Analyse der metabolischen Flüsse wurde für diese Schritte das entsprechende isotopenmarkierte Medium verwendet. Das Aerosol wurde mit einem Volumenstrom von  $2.66 \text{ m}^3/\text{h}$  aus der Verdünnungsanlage über einen Partikelabscheider (Abscheidgrenze  $2.5 \mu\text{m}$ ) in den Konditionierungsreaktor geleitet. Dort wurde das

Aerosol auf 85% r.H. und 37°C konditioniert und isokinetisch 100 mL/min Proben in jede der Expositions-kammern in Vitrocell CF Stainless® Modulen geleitet, in denen sich die Zellkulturen befinden. Um das Aerosol von Partikeln zu befreien, wurden HEPA Filter vor den Einlass in die Expositions-kammern eingebaut. In den Versuchen bei denen die Carbonyle entfernt wurden, wurden zusätzlich je eine DNPH-Kartuschen vor den Expositions-kammern verwendet, die vor Versuchsbeginn mit Feuchtigkeit gesättigt wurden. Für die Reinluftkontrollen wurden Zellen auf gleiche Weise statt Aerosol mit gefilterter Umgebungsluft exponiert. Zusätzlich wurden Inkubator-kontrollen mitgeführt, dabei wurden die Zellen in den Transwell-Inserts während der Behandlungszeit in 6-Well Platten in einen CO<sub>2</sub>-freien Inkubator gestellt.

### 2.2. Chemische Analytik

Die chemische Analytik wurde durch Kooperationspartner vom Joint Mass Spectrometry Centre (JMSC) am Helmholtz Zentrum München durchgeführt. Die Carbonyle wurden durch Ahmed Reda, die restlichen Parameter durch Jürgen Orasche analysiert.

#### 2.2.1. Organische Verbindungen

Für die Analytik der Partikelproben in Kapitel 3.1 wurden etwa 10 mg Partikelproben mit gemischten internen Standards versetzt (für Details siehe Orasche et al. (2011) sowie Tabelle A.3) und wie in Dilger et al. (2016) beschrieben analysiert. Kurz zusammengefasst, wurden die Proben separat mit Dichlormethan (ultrapur) bzw. Toluol (ultrapur) extrahiert und im Ultraschallbad extrahiert. Dichlormethanextrakte wurden zur Trockne eingedampft und durch Zugabe von 100 µL MSTFA (N-Methyl-N-tri-methylsilyltrifluoroacetamid, Macherey-Nagel) derivatisiert. Die Toluolextrakte wurden auf 100 µL eingengt und ohne Derivatisierung analysiert. Die Proben wurden mit GC-MS (Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu, Japan) mit einer 60 m BPX-5 Säule (0.22 mm ID, 0.25 µm Schicht, SGE, Australien) analysiert. Die relativen Standardabweichungen der Methode wurden anhand der Konfidenzintervalle einer Kalibrierung mit dem gleichen Standardgemisch ermittelt (Orasche et al. 2011). Die Filterproben des Holzrauch-aerosols aus Kapitel 3.3.1 wurden mit der in Orasche et al. (2012) beschriebenen Thermodesorptionsmethode mit *in situ* Derivatisierung analysiert. Dabei wurden abhängig von der Partikelbelastung Filterstücke von 4 bis 20 mm<sup>2</sup> ausgestanzt und mit Isotopenmarkierten Standards gespiked. Nach Derivatisierung wurden die desorbierten Moleküle auf einer 60 m BPX-5 Säule (0.22 mm ID, 0.25 µm Schicht, SGE, Australien) aufgetrennt und mit einem Pegasus III TOF Massenspektrometer (LECO, St. Joseph, MI, USA) analysiert.

#### 2.2.2. EC/OC-Gehalt

Der EC- und OC-Gehalt wurde thermisch-optisch mit dem IMPROVE-A Protokoll analysiert. Die Analyse wurde mit den gleichen ausgestanzten Filterstücken durchgeführt, mit denen auch die Analyse der organischen Verbindungen durchgeführt wurde (Orasche et al. 2011).



### 2.2.3. Metallanalytik

Die Metallanalytik wurde wie in Orasche et al. (2012) beschrieben durchgeführt, mit der Ausnahme dass lediglich ICP-MS verwendet wurde. Kurz zusammengefasst, wurden Filteraliquote in  $\text{HClO}_4$  und  $\text{HNO}_3$  aufgeschlossen und mit ICP-MS analysiert (Orasche et al. 2012).

### 2.2.4. Carbonylanalytik

Die Carbonyle wurden wie in Reda et al. (2015) beschrieben analysiert. Dabei wurden die DNPH-Kartuschen mit Acetonitril eluiert und mit GC-MS (Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu, Japan) mit einer 60 m BPX-5 Säule (0.22 mm ID, 0.25  $\mu\text{m}$  Schicht, SGE, Australien) analysiert. Durch die Probenahme mit zwei in Reihe geschalteten DNPH-Kartuschen wurde sichergestellt, dass keine Carbonyle durch die Kartusche durchgebrochen sind. Geöffnete Kartuschen, über die während der Probenahmezeit kein Gas strömte, wurden als Blank mit analysiert und vom Analyseergebnis abgezogen.

## 2.3. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

### 2.3.1. Morphologie der Partikelproben

Mit dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) EM 109 von Zeiss (Oberkochen) wurde die Morphologie von Partikelproben untersucht. Hierzu wurde eine 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Partikelsuspension in bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  hergestellt und 10  $\mu\text{L}$  auf ein mit Formvar beschichtetes 75 mesh Kupfergrid getropft, bei Raumtemperatur (RT) getrocknet und direkt mit dem TEM analysiert.

### 2.3.2. Untersuchung von aufgenommenen Partikeln

Für die Untersuchung, ob Partikel nach der ALI-Exposition in die Zellen aufgenommen wurden, wurden Querschnitte fixierter Zellen unter dem TEM analysiert. Die Zellen wurden auf Transwells mit einer Polycarbonatmembran, statt wie üblich einer Polyestermembran, ausgesät und nach Behandlung im ALI-System an verschiedenen Stellen der Membran kreisrunde Stücke von 6 mm Durchmesser ausgestanzt und fixiert. Nach Postfixierung mit Osmiumtetroxid (Polysciences) und Kontrastierung mit Uranylacetat (Merck) wurden die Zellen in EtOH entwässert und im Epoxidharz EPON 812 (Serva Electrophoresis) eingebettet. Aus dem Epoxidharzblock wurden mit einem Ultramikrotom (EM UC6K, Leica, Solms) 70 nm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf einem Kupfergrid gesammelt und mit dem TEM EM109 von Zeiss (Oberkochen) analysiert. Um ein umfangreiches Bild der aufgenommenen Partikeln zu erhalten, wurde von jeder untersuchten Bedingung mindestens 20 Zellen untersucht.

## 2.4. Zytotoxizitätstests

### 2.4.1. Metabolische Aktivität (AlamarBlue®)

Die metabolische Aktivität wurde mit dem AlamarBlue®-Reagenz (AbD Serotec) untersucht. Der AlamarBlue®-Assay untersucht die Fähigkeit von Zellen den nicht-fluoreszierenden Farbstoff Resazurin durch mitochondriale Dehydrogenasen zum fluoreszierenden Resorufin zu reduzieren (O'Brien et al. 2000). Die Zellen wurden in einer 24-Well Platte (Submersexperimente) oder Transwell-Inserts im 6-Well Format (ALI-Experimente) ausgesät. Nach der Behandlung in 24-Well Platten wurde das Medium im Überstand entfernt und 300 µL einer 10% (v/v) AlamarBlue®-Lösung in RPMI-1640 ohne FKS auf die Zellen gegeben. Bei Versuchen mit Transwell-Inserts wurde das basolaterale Medium gründlich entfernt, so dass keine Flüssigkeitsbrücken zwischen Transwell-membran und Boden der 6-Well Platte entstehen und 500 µL 10% AlamarBlue® auf die apikale Seite gegeben. Die Zellen wurden mit dem Reagenz für 1 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Je 100 µL des Überstands wurden in 96-Well Platten überführt und die Fluoreszenz des reduzierten Reagenz im Mikroplattenleser bei 580 nm Anregung und 620 nm Emission quantifiziert (Bio-Tek FL600, Software KC4, MWG-Biotech AG). 10%ige AlamarBlue®-Lösung ohne Kontakt zu Zellen wurde als Blank verwendet. Die Messwerte des Blanks wurden von allen Probenmesswerten abgezogen und die Messwerte der Proben relativ auf die Kontrollen bezogen, welche als 100% festgelegt wurden.

### 2.4.2. Membranintegrität (LDH-Freisetzung)

Die Membranintegrität wurde anhand der Freisetzung des intrazellulären Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) ins Zellkulturmedium gemessen. Die Zellen wurden, wie im Abschnitt 2.4.1 beschrieben, behandelt und 100 µL Aliquote des Überstands (Submersversuche) bzw. des Mediums unter der Membran (ALI-Versuche) für die enzymatische Quantifizierung des freigesetzten LDH mit dem LDH-Test Kit (Roche) verwendet. Der Test wurde mit geringfügigen Abweichungen vom Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Farbstofflösung wurde 1:1 (v/v) mit PBS verdünnt um die Reaktionsgeschwindigkeit aufgrund der hohen verwendeten Zelldichte zu vermindern. Die Absorption der umgesetzten Probenlösung wurde bei 490 nm am Mikroplattenleser (Molecular Devices, Software SoftMaxPro, Ismaning) analysiert. Zellfreies Medium, welches ansonsten gleich behandelt wurde wie die Proben, wurde als Blank mitgeführt. Unbehandelte Kontrollzellen, die 30 min mit 0.1 - 1% Triton-X vollständig lysiert wurden, dienten als Positivkontrolle und Referenz für die maximal freisetzbare LDH-Menge. Nach Abzug des Blanks wurden alle Proben relativ zu den Positivkontrollen gesetzt, welche als 100% LDH-Freisetzung definiert wurden.

## 2.5. Proteomanalytik

### 2.5.1. Western Blot

Die verwendeten Puffer, Antikörper und Verdünnungen befinden sich im Anhang. Die Zellen wurden in einer 6-Well Platte (Submersexperimente) bzw. Transwell-Inserts im 6-Well Format (ALI-Experimente) ausgesät und behandelt. Die Lyse erfolgte mit 200  $\mu$ L (Submersversuche) bzw. 100  $\mu$ L (ALI-Versuche) 2x Laemmli Puffer (125 mM Tris-HCl, 4% SDS, 20% Glycerin, 8%  $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 6.8). Nach dem Denaturieren bei 95°C für 5 min und sonifizieren im Ultraschallbad bzw. mit Ultraschallspitze (duty cycle 50%, output control 1) wurden gleiche Probenvolumen in einem 15% ( $\gamma$ -H2AX), 12% (HO-1) bzw. 10% (restliche Proteine) Gel mit SDS-PAGE getrennt. Zur Identifizierung der Proteingrößen wurde ein Molekulargewichtsmarker (peqGOLD Protein-Marker IV (Prestained), peqlab) mitgeführt. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf eine Immobilon-P Membran (Millipore) transferiert. Im Anschluss wurde die Membran mit Odyssey Blockierpuffer (LICOR, Biosciences) für 1 h blockiert und danach über Nacht bei 4°C mit primären Antikörpern in Odyssey Blockierpuffer und TBS-T (1:1) inkubiert. Die Inkubation mit Sekundärantikörpern erfolgte für 1 h bei 4°C. Zur Detektion wurden die Membranen am Odyssey® Classic Infrared Imaging System (LICOR, Biosciences) gescannt. Die Bildprozessierung und Quantifizierung der Banden erfolgte mit Image Studio Lite 4.0 (LICOR, Biosciences) mit automatischer Hintergrundkorrektur (Einstellungen: Median, Breite 5, alle Segmente).

### 2.5.2. Zytokinfreisetzung (ELISA)

Die Sezernierung des Entzündungsmediators Interleukin-8 (IL-8) wurde nach der Behandlung aus dem Überstand, wie bereits im Abschnitt 2.4.2 beschrieben, mit OptEIA™ ELISA-Kits von BD Biosciences nach Angaben des Herstellers analysiert. Zur Messung der Absorption und der Datenanalyse wurde ein Mikroplattenleser (Molecular Devices, Software SoftMaxPro, Ismaning) verwendet. Die Quantifizierung erfolgte anhand einer Standardreihe aus rekombinanten IL-8.

### 2.5.3. Cytochrom P450 Enzymaktivität (EROD-Assay)

Die Aktivität von CYP-Isoformen lassen sich mit dem EROD (Ethoxyresorufin-O-deethylase)-Assay bestimmen. Dabei wird 7-Ethoxyresorufin (7-ER, Sigma-Aldrich) CYP450 abhängig zum fluoreszierenden Produkt Resorufin umgesetzt. Die Zellen wurden in einer 96-Well Platte, wie im Abschnitt 2.7 beschrieben, ausgesät. Nach 48 h Behandlung wurde das Medium im Überstand entfernt und 100  $\mu$ L einer 8  $\mu$ M 7-ER Lösung in RPMI-1640 Medium ohne Phenolrot (Gibco) unter Ausschluss von Licht auf die Zellen gegeben. Nach 30 min wurde die Fluoreszenz am Mikroplattenleser bei einer Anregungswellenlänge von 530 nm und einer Emission von 590 nm (Molecular Devices, Software SoftMaxPro, Ismaning) gemessen. Die Hintergrundfluoreszenz von 8  $\mu$ M 7-ER in zellfreien Medium wurde als Blank von allen Proben subtrahiert und relativ zur Kontrolle gesetzt.

## 2.6. Gentoxizitätsassays

### 2.6.1. Analyse von $\gamma$ -H2AX Foci

Für den immunologischen Nachweis der  $\gamma$ -H2AX Foci wurden die Zellen auf Transwell-Inserts im 6-Well Format (ALI-Experimente) oder auf Deckgläschen (12 mm) in einer 12-Well Platte (Submersexperimente mit FA) ausgesät und behandelt. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 4% Formaldehyd in PBS für 10 min bei RT. Anschließend wurden die Deckgläschen in 12-Well Platte dreimal mit PBS gewaschen. Die Transwell-Inserts wurden ebenfalls durch Waschen mit PBS von Formaldehydresten befreit und die Membranen mit einem Skalpell ausgeschnitten. Nach Waschen wurden die Zellen mit 0.2% Triton X-Lösung (v/v in PBS) für 5 min bei 4°C permeabilisiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS wurden die Proben für 1.5 h bei RT oder über Nacht bei 4°C mit 2% BSA-Lösung (w/v gelöst in PBS, Sigma-Aldrich) geblockt. Die Inkubation mit primären Antikörpern anti- $\gamma$ -H2AX in 2% BSA-Lösung erfolgte für 3 h bei 37°C. Anschließend wurden die Deckgläschen bzw. die Membranstücke dreimal mit 2% BSA-Lösung gewaschen und 1 h bei 37 °C mit dem sekundären Antikörper in 2% BSA-Lösung inkubiert. Die Zellkerne wurden mit 300  $\mu$ M DAPI-Lösung (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochlorid, Invitrogen) für 15 min gefärbt. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Deckgläser mit Mounting Medium auf einem Objektträger fixiert. Die Membranstücke wurden mit Mounting Medium zwischen einem Objektträger und Deckglas fixiert. Am Fluoreszenzmikroskop (Leica DM IRE 2) wurden mit der Digitalkamera ORCA-ER (Hamamatsu) und der Software  $\mu$ Manager 1.4.21 (Edelstein et al. 2014) je 20 Bilder pro Probe von zufällig gewählten Regionen aufgenommen. Zur automatisierten Quantifizierung der  $\gamma$ -H2AX Foci wurde die Software ScanR (Olympus) verwendet. Hierfür wurden zunächst im DAPI-Kanal die Objektkanten durch sprunghaften Anstieg der Signalintensität detektiert. Aus den erkannten Objekten wurden mittels Auswahlregeln (Größe, Intensität, Morphologie) die Zellkerne selektiert und eine Kernmaske generiert. Anschließend wurde innerhalb der Kernmaske im GFP-Kanal nach fokalen Objekten gesucht. Die Objekte, die die Auswahlregeln (Größe, Intensität, Morphologie) für  $\gamma$ -H2AX Foci erfüllten, wurden auf Einzelzellebene quantifiziert. Die Auswahlkriterien wurden Versuchsweise so angepasst, dass möglichst alle Zellkerne und Foci erkannt und gezählt wurden (Abb. A1).

### 2.6.2. Alkalische Entwindung

Zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen wurden die Zellen wie oben beschrieben in Transwell-Inserts ausgesät und mit Holzrauch behandelt. Nach der Exposition wurden die Zellen mit 2.5 mL kaltem PBS gewaschen und durch Zugabe von 1.5 mL alkalischer Lösung im Dunkeln bei RT für 30 min die DNA entwunden. Die Proben wurden mit 0.1 M HCl auf pH  $6.8 \pm 0.02$  neutralisiert, auf Eis 15 s lang sonifiziert (Duty Cycle: Constant; Output Control 1, Branson Sonifier® 250), zur Stabilisierung der DNA mit 15  $\mu$ L 10% SDS-Lösung (AppliChem) versetzt und bei -20°C gelagert. Die chromatographische Trennung in einzelsträngige DNA (ssDNA) und doppelsträngige DNA (dsDNA) erfolgte am Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung für Lebensmittelchemie und

Toxikologie. Hierfür wurde in 0.01 M Natriumphosphatpuffer eine 10% Hydroxylapatit-Suspension (w/v) (Sigma-Aldrich) bei 60°C für 30 min aufgeschlämmt und je 0.1 g Hydroxylapatit zwischen Glasfaserfilter (Whatman) auf Säulen gepackt. Die Säulen wurden mit 1.5 mL 0.5 M Kaliumphosphatpuffer, gefolgt von 1.5 mL 0.01 M Natriumphosphatpuffer gewaschen und konditioniert. Die vortemperierten Proben wurden durchmischt und komplett auf die Säulen gegeben. Die Säulen wurden mit 2.5 mL 0.01 M Natriumphosphatpuffer gewaschen und anschließend nacheinander zuerst mit 0.15 M Kaliumphosphatpuffer die ssDNA, und anschliessend mit 0.35 M Kaliumphosphatpuffer die dsDNA in 24-Well Platten eluiert. Die Eluate wurden mit Höchst-Farbstoff 33258 versetzt (Endkonzentration 0.75 µM, Sigma-Aldrich) und nach 30 min die Fluoreszenz am Mikroplattenleser (Tecan Infinite M200 Pro) bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm und einer Emission von 455 nm gemessen. Die Häufigkeit der induzierten DNA-Schäden wurde anhand der Kalibriergerade und Formeln in Hartwig et al. (1993) und Hartwig (1996) berechnet. Die genaue Zusammensetzung aller verwendeten Puffer und Lösungen befindet sich im Anhang.

## 2.7. Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (DCF-Assay)

Der DCF-Assay wurde durchgeführt wie in Panas et al. (2013) beschrieben. Kurz zusammengefasst, wurden die Zellen in 96-Well Platten ausgesät, nach Behandlung die Zellen gewaschen und für 40 min mit 50 µM des Farbstoffs H<sub>2</sub>DCF – DA (2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat, Molecular Probes, Leiden, NL) beladen. Anschließend wurden die Zellen erneut mit HBSS (Gibco) gewaschen, um Partikel und extrazelluläres DCF wegzuwaschen und in 100 µL HBSS/Well für 2 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Menge des oxidierten H<sub>2</sub>DCF – DA wurde fluorimetrisch bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm mit einem Plattenleser (MWG Biotech AG, Ebersberg) gemessen. Der Metall-Chelator Deferoxamin-Mesylat (DFO, Sigma-Aldrich) wurde verwendet um die metallbedingte ROS Generierung zu reduzieren. Für diese Experimente wurden die Zellen für 15 min mit 50 µL 10 mM DFO (Endkonzentration 5 mM) oder reinem Medium vorinkubiert, bevor 50 µL der 2-fach konzentrierten Partikelsuspensionen zugesetzt wurden.

## 2.8. RNA-Analytik

### 2.8.1. Quantitative Real-Time PCR

Die Zellen wurden in 12-Well Platten (Submers) bzw. Transwell-Inserts (ALI-Exposition) ausgesät. Nach der Behandlung wurden die Zellen mit 500 µL Trizol Reagenz (peqGold Trifast, peqlab) lysiert. Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Konzentration und Reinheit der mRNA wurde mittels des Nanodrop 1000U (Thermo Scientific, Wilmington, USA) bei einer Absorption von 260 nm und 280 nm bestimmt. Mindestens 0.5 bis 1 µg Total-RNA wurden mit DNase (Promega) behandelt und mit 200 U reverser Transkriptase (Promega) in einem 22 µL Reaktionsansatz mit 91 µM jedes dNTP (Promega), 200 ng Random-Hexamere (Metabion,

Planegg-Martinsried) und 40 U RNase Inhibitor (RiboLock, Fermentas) nach dem Herstellerprotokoll umgeschrieben. Um Verunreinigungen mit genomischer DNA auszuschließen, wurden zusätzliche Probenaliquots ohne Einsatz von reverser Transkriptase transkribiert und nach einer PCR im Agarosegel überprüft. Die quantitative RT-PCR wurde in 20 µL Reaktionen mit 10 µL 2x Quantitect SYBR Green mastermix (Qiagen, Hilden) und 10 pmol der Vorwärts- und Rückwärtsprimer im ABI StepOnePlus System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) mit den folgendem Programm untersucht: 15 min Aktivierung bei 95°C, 40 Amplifikationszyklen (15 s Denaturierung bei 95°C, 30 s Hybridisierung und Elongation bei 60°C). Die relative Genexpression wurde mit der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode (Schmittgen und Livak 2008) mit Normalisierung auf das Referenzgen *large ribosomal protein P0* (RPLP0) ermittelt. Die folgenden Primersequenzen wurden verwendet (Metabion, Planegg-Martinsried):

RPLP0:	5'-GAAGGCTGTGGTGCTGATGG-3'
	5'-CCGGATATGAGGCAGCAG-3'
CYP1A1:	5'-GAGCCTCATGTATTTGGTGATG-3'
(Val et al. 2011)	5'-TTGTGTCTCTTGTGTGCTGTG-3'
IL-8:	5'-GAATGGGTTTGCTAGAATGTGATA-3'
	5'-CAGACTAGGGTTGCCAGATTTAAC-3'
HO-1:	5'-TTCTCCGATGGGTCCTTACACT-3'
	5'-GGCATAAAGCCCTACAGCAACT-3'

### 2.8.2. Genomweite mRNA-Sequenzierung

Die mRNA-Sequenzierung wurde durch Olivier Armant von der Sequencing-Core-Facility des Programms BioInterfaces in Technology and Medicine am ITG durchgeführt. Die RNA aus A549 Zellen wurde wie unter 2.8.1 beschrieben isoliert. Die RNA aus BEAS-2B wurde aus den Interphasen aus der Extraktion der Metabolomics-Experimente isoliert (Sapcariu et al. 2014). Hierfür wurden die Interphasen von polarer und organischer Phase befreit und nach Zugabe von 500 µL Trizol Reagenz (peqGold Trifast, peqlab) nach dem Herstellerprotokoll die RNA isoliert. Die extrahierten RNA-Proben wurden mit RNA-Nanochips (Bioanalyser 2100, Agilent) analysiert und zeigten keine Anzeichen von Degradation (RIN » 8). 1 µg (A549) bzw. 0.5 µg (BEAS-2B) Total-RNA pro Probe wurden verwendet um die individuellen Sequenzierungsbibliotheken mit dem TruSeq mRNA Kit V2 (Illumina, San Diego, CA, USA) nach Herstellerprotokoll zu erstellen. Die Größe und Konzentration der Bibliotheken wurde mit DNA-Chips (Bioanalyser 2100) bestimmt und die Konzentrationen auf 8 pM eingestellt. Mit dem HiSeq1500 (Illumina) und SBS V3 Kits (Illumina) wurde die Sequenzierung mit gepaarten Enden (2 x 50 Nukleotide) nach Standardprotokoll durchgeführt. Die Clustererdetektion und Basenzuordnung wurde mit RTA 1.13 und die Qualität der Lesezyklen mit CASAVA 1.8.1 (Illumina) analysiert. Der durchschnittliche Phred-Wert war in allen Proben > 30. Die abgelesenen Sequenzen wurden mit Tophat v2.0.11 (Trapnell et al. 2012) dem menschlichen Genom (GRCh37) zugeordnet, unter Verwendung der Optionen `-r 180 --mate-std-dev 80 --b2-sensitive --no-novel-juncs`

-a 5 -p 5 --library-type fr-unstranded

und unter Verwendung bekannter Exon-Junctions (Ensembl Release 75). Mit HTSeq 0.5.3p3 wurde die Genexpression ermittelt, indem für jedes Transkript die Anzahl überlappender Sequenzen mit bekannten Genen gezählt wurde (Anders et al. 2013). Die differentielle Genexpression wurde mit DESeq2 (Anders et al. 2013) in R 3.1.3 (R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich) berechnet.

## 2.9. Metaboliten-Analytik

Die Metabolomanalyse wurde in Kooperation mit Sean C. Sapcariu aus der Arbeitsgruppe von Karsten Hiller an der Universität Luxemburg durchgeführt.

### Markierung mit stabilen Isotopen

Um die Metaboliten mit stabilen Isotopen zu markieren fand die Kultivierung und Behandlung der Zellen in selbst zusammengestelltem Medium statt. Die Formulierung des Mediums entsprach RPMI-1640, mit dem Unterschied, dass entweder anstelle von herkömmlicher Glucose ausschließlich vollständig mit  $^{13}\text{C}$ -markierter Glucose (Glucose- $^{13}\text{C}_6$ , Euriso-Top, Saarbrücken), bzw. anstelle von Glutamin ausschließlich Glutamin- $^{13}\text{C}_5$  (Campro, Berlin) zugesetzt wurde. Mit diesen Medien wurden in separaten Experimenten die metabolischen Flüsse von Glucose bzw. Glutamin verfolgt. Da die Formulierung des KGM Mediums von BEAS-2B Zellen nicht verfügbar ist, bzw. nicht in glutamin- oder glucosefreier Form erhältlich ist, wurde zur Behandlung von BEAS-2B Zellen ebenfalls RPMI-1640 Medium verwendet.

### Extraktion polarer Metabolite

Die Extraktion der Metaboliten ist ausführlich im Methodenpaper von Sapcariu et al. (2014) beschrieben. Kurz zusammengefasst, wurde der Metabolismus der Zellen sofort nach Ende der ALI-Exposition mit 400  $\mu\text{L}$   $-20^\circ\text{C}$  kaltem Methanol (LiChrosolv, Merck), gefolgt von 400  $\mu\text{L}$  bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  gestoppt und die Zellen mit einem Zellschaber quantitativ in ein Reaktionsgefäß mit 400  $\mu\text{L}$  Chloroform bei  $-20^\circ\text{C}$  (LiChrosolv, Merck) überführt. Die Proben wurden 20 min bei 1400 rpm und  $4^\circ\text{C}$  geschüttelt und danach für 5 min bei 16100 g und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Die polare Phase wurde für die Bestimmung der Metaboliten in einem Vakuum-Rotationsevaporator (Centrivap, Labconco, Kansas City, MO, USA) bei  $-4^\circ\text{C}$  und 1725 rpm zur Trockne eingengt.

### Bestimmung von Metabolitkonzentrationen

Die Quantifizierung der Metaboliten wurde mit GC-MS durchgeführt und ist ausführlich in Wegner et al. (2013) beschrieben. Kurz zusammengefasst, wurden die trockenen Metabolite mit MSTFA derivatisiert und mit GC-MS (Agilent 6890) analysiert. Für die MS Detektion wurde mit Elektronenstoß-Ionisation bei 70 eV gearbeitet. Die Identifizierung der Fragmente erfolgte anhand der

Retentionszeit und Fragmentmuster anhand einer hausinternen Bibliothek mit dem Programm MetaboliteDetector (Hiller et al. 2009). Mit MetaboliteDetector wurde ebenfalls die Quantifizierung der Metabolite, der Isotopomeren-Verteilung und der anteiligen Kohlenstoffquellen der Metabolite wie in Wegner et al. (2013) beschrieben durchgeführt.

## 2.10. Systembiologische Methoden

### 2.10.1. GO-Term Analyse

Die GO-Term Analyse wurde mit DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) (Huang et al. 2009) durchgeführt. Für die Analyse wurden die Ensembl Gen IDs aller Transkripte verwendet, die zwischen Reinluft- und Gasphasenbehandlung mindestens 2-fach differenziell mit  $p < 0.001$  reguliert waren (A549: 3485, BEAS-2B: 2099). Als Hintergrundliste dienten alle Transkripte, die in jeder Probe mindestens einmal erkannt wurden (A549: 8946, BEAS-2B: 18287). Für die Berechnung des prozentualen Anteils der modulierten Genen eines GO-Terms, wurde für jeden Term die Anzahl der regulierten Gene, die diesem Term angehören, auf die Anzahl der Genen dieses Terms in der Hintergrundliste bezogen. Für die ausführliche Liste der angereicherten GO-Terme in Tabelle A.9 wurden redundante GO-Terme mit großer semantischer Überlappung mit REVIGO entfernt (Supek et al. 2011).

### 2.10.2. Connectivity Map Analyse

Als Basis für die Connectivity Map (<https://www.broadinstitute.org/cmap/>) wurden im Einklang mit den Empfehlungen der Entwickler (Lamb et al. 2006), die 100 signifikantesten induzierten und reprimierten Transkripte in A549 und BEAS-2B Zellen bei Vergleich der Bedingungen Gasphase und Reinluft selektiert. Da die Connectivity Map die Eingabe von Affymetrix-Gen IDs arbeitet, wurden die Ensembl Gen IDs mit Biomart (Durinck et al. 2009) konvertiert. Für die PCA Analyse wurden manuell Gentoxine ausgewählt und für diese Gentoxine die normierten differentielle Genexpression als XML Daten vom Webserver der Connectivity Map extrahiert. Die PCA wurde mit R 3.2.2 durchgeführt.

## 2.11. Statistik

Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) unabhängiger Versuchswiederholungen angegeben, sofern in den Abbildungslegenden nicht explizit anders beschrieben. Die statistischen Analysen wurden mit R in der Version ab 3.2.1 (R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich) durchgeführt. Hiervon ausgenommen ist die Statistik der differentielle Genexpression der mRNA-Sequenzierung, die mit DESeq2 (Anders et al. 2013) durchgeführt wurde. Die Signifikanzwerte (p-Werte) wurden, sofern in den Abbildungslegenden nicht explizit anders angegeben, für normalverteilte Daten mit einer ANOVA und Dunnetts post hoc Test (aus dem „multicomp“-Packet) unter Verwendung der Kontrollbehandlungen als Referenzniveau ermittelt. Nicht-normalverteilte Daten wurden mit dem Kruskal-Wallis Test mit Dunn’s post hoc Test (aus



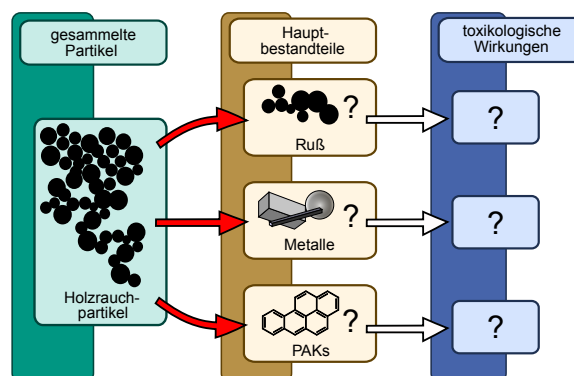
dem „FSA“-Paket) unter Verwendung der Benjamini & Hochberg Korrektur analysiert. Die Signifikanzwerte wurden wie in den Legenden angegeben in den Abbildungen annotiert und Ergebnisse ab  $p < 0.05$  als signifikant erachtet.



## 3. Ergebnisse und Diskussion

### 3.1. Toxikologische Untersuchung gesammelter Partikel aus der Holzverbrennung

Für eine bessere Gefährdungsbeurteilung von Holzrauch oder um Verbrennungsprozesse dahingehend zu modifizieren, dass weniger toxische Emissionen freigesetzt werden, ist es von großem Nutzen die Bestandteile im Holzrauch zu identifizieren, die für die toxischen Wirkungen verantwortlich sind. Ein Ansatz hierfür ist, aus der Mischung der im Holzrauch vorkommenden Substanzen, toxikologisch relevante Bestandteile auszuwählen und individuell zu testen, inwiefern sie für die Wirkungen des Holzrauchs in Frage kommen. Hierfür wurde zunächst die Wirkung der gesammelten Partikel auf A549 Zellen mit verschiedenen Endpunkten bestimmt: Akute Zytotoxizität, PAK-spezifische Antworten, Entzündungssignalwege und oxidativer Stress. Die Hypothese war, dass die so ermittelten Wirkungen der Holzverbrennungspartikel (WSP, wood smoke particles) durch die kombinierte Wirkung von einzelnen Bestandteilen der WSP reproduzierbar ist. Basierend auf der eigenen chemischen Analyse und Literaturwerten wurden PAKs, Ruß und metallische Bestandteile als kritische Komponenten ausgewählt. Als repräsentative Vertreter dieser Substanzgruppen wurden Benzo[a]pyren (B[a]P), Carbon Black Nanopartikel (CB14) und Zinkoxid Nanopartikel (ZnO) auf ihre Wirkungen auf A549 Zellen getestet und mit den WSP verglichen (Abb. 3.1).



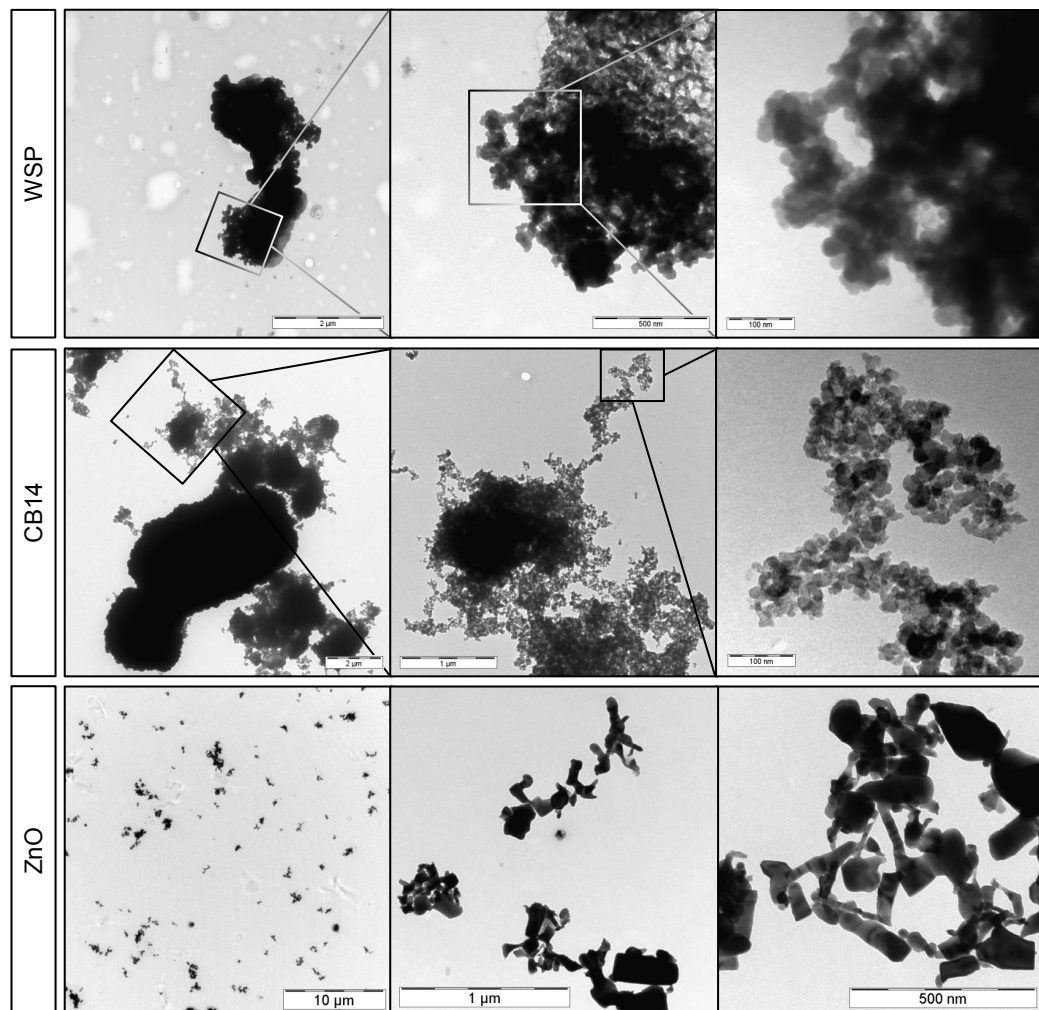
**Abbildung 3.1.:** Mit einem Kandidatenansatz wurde der Beitrag von PAKs, Ruß und Metallen, repräsentiert durch Benzo[a]pyren (B[a]P), Carbon Black Nanopartikel (CB14) und Zinkoxid Nanopartikel (ZnO NP), zur Toxizität von gesammelten Holzrauchpartikeln in A549 Zellen überprüft.

#### 3.1.1. Partikelcharakterisierung

Die Größenverteilung, Agglomeration und Morphologie der untersuchten WSP wurde mit Hilfe der Elektronenmikroskopie untersucht (Abb. 3.2). Die Partikel bestehen aus sphärischen Primärpartikeln in der Größe von 20 - 40 nm, die allerdings stark agglomeriert sind. Sogar nach Ultraschallbehandlung der Partikelsuspension waren noch immer Agglomerate vorhanden, die bis zu wenigen  $\mu\text{m}$  groß waren. In der Nähe von WSP waren gelegentlich Flächen mit kristalliner Struktur zu erkennen. Diese Strukturen stammen vermutlich von anorganischen Salzen, die aus den WSP herausgelöst wurden und während des Trocknens der Partikelsuspension auf dem Probenträger wieder auskristallisierten. Die Carbon Black Nanopartikel (CB14) bestehen ebenfalls aus sphärischen Primärpartikeln. Die Primärpartikel haben eine Größe von 10 - 20 nm und bilden ebenfalls große Agglomerate, die in Form und Größe mit den WSP übereinstimmen. Im Gegensatz zu den WSP enthalten diese allerdings keine Verunreinigungen wie zum Beispiel durch anorganische Salze. Die Zinkoxid Nanopartikel (ZnO NP) haben eine heterogene Morphologie und Größe. Die Primärpartikelgröße reicht von 10 nm bis über 100 nm. Auch die ZnO NP lagen als Agglomerate vor, die allerdings kleiner waren, als die der WSP und CB14 Partikel, und selten mehr als 1  $\mu\text{m}$  erreichten. Die Agglomeration der 3 untersuchten Partikelsorten konnte auch in den Zellkulturexperimenten beobachtet werden, wo alle Partikel in kurzer Zeit auf die Zelloberfläche sedimentierten und dort unter dem Lichtmikroskop erkennbar waren. Vergleichbare Ergebnisse wurden zuvor bei der Untersuchung von Partikelproben aus der Holzverbrennung (Danielsen et al. 2011), CB14 (Diabaté et al. 2011; Saber et al. 2012) und ZnO NP (Karlsson et al. 2008) beobachtet.

Die chemische Analyse der WSP auf die 16 von der US EPA priorisierten PAKs ist in Tabelle 3.1 dargestellt. PAKs induzieren durch Bindung an den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) die Expression metabolisierender Enzyme, die zur Detoxifizierung der PAKs führen. B[a]P ist eines der stärksten Kanzerogene unter den PAKs. B[a]P ist ein Beispiel, wie diese Metabolisierung aber auch zu hochreaktiven Intermediaten führen kann, die neben der Bildung von genotoxischen DNA-Addukten auch zum Zelltod führen können (Donauer et al. 2012; Schreck et al. 2009).

Die PAKs haben unterschiedliche Affinitäten zum AhR und werden unterschiedlich metabolisiert. Um die Toxizität einer PAK-Mischung zu beschreiben werden daher gerne Toxizitätsäquivalente verwendet. Das Toxizitätsäquivalent einer PAK-Mischung entspricht jener Konzentration von B[a]P, die ein gleich hohes toxisches Potential besitzt wie die PAK-Mischung (Nisbet und LaGoy 1992). In dieser Arbeit wurde daher B[a]P ausgewählt, um mit einer definierten Substanz die Wirkungen von PAK-Mischungen abzubilden. Neben PAKs wurden noch weitere organische Kontaminanten analysiert, die zur Interpretation der Ergebnisse allerdings weniger relevant sind. Das vollständige Analysenergebnis und die internen Standards, die zur Quantifizierung verwendet wurden, befinden sich im Anhang in Tabelle A.3. Zusätzliche chemische Analysen der gleichen Partikelprobe, nämlich die Bestimmung des Gehalts an elementarem Kohlenstoff, organisch gebundenen Kohlenstoffs (OC), anorganischen Salzen und Metallen wurden durch andere Arbeitsgruppen bereits publiziert (Gauggel et al. 2012; Gauggel-Lewandowski et al. 2013). Diese Analysenergebnisse befinden sich ebenfalls im Anhang in Tabelle A.4.



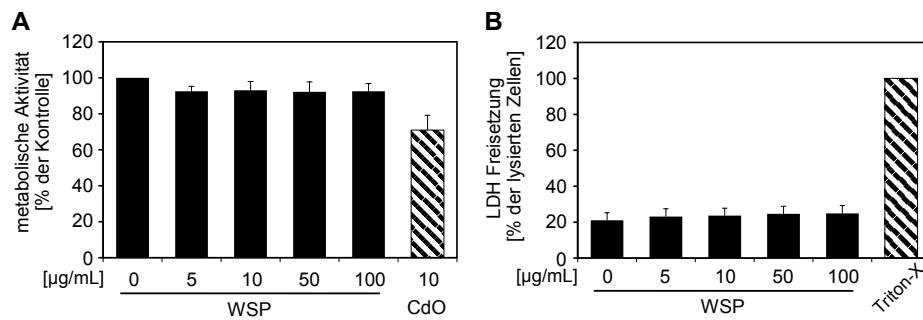
**Abbildung 3.2.: Charakterisierung der untersuchten Partikel.** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der gesammelten Holzverbrennungspartikel (WSP), Carbon Black Nanopartikel (CB14) und Zinkoxid Nanopartikel (ZnO NP) in unterschiedlichen Vergrößerungen.

Die WSP stammen aus der Holzofenfeuerung eines Privathaushalts. Als Brennstoff wurde eine Mischung aus Holzbriketts, Scheitholz aus Hart- und Weichhölzern sowie Holzabfällen verwendet. Der verbrannte Holzabfall ist vermutlich für den untypisch hohen Gehalt an Eisen in den Partikel verantwortlich (Gauggel et al. 2012; Gauggel-Lewandowski et al. 2013). Alle weiteren analysierten Parameter liegen in dem normalen Konzentrationsbereich für typische Holzverbrennungsemissionen (Orasche et al. 2012; Orasche et al. 2013; Schmidl et al. 2008; Torvela et al. 2014b). Die CB14 und ZnO Partikel sind vom Hersteller als >99 % reiner Kohlenstoff bzw. ZnO spezifiziert. Obwohl in der Vergangenheit festgestellt wurde, dass CB14 Partikel geringe, aber biologisch nicht vernachlässigbare, Verunreinigungen mit PAKs aufwiesen (Borm et al. 2005), wurden in der hier untersuchten CB14 Probe keine biologisch verfügbaren PAKs detektiert (Tabelle A.3). Die ZnO NP enthielten hohe Mengen an Fettsäuren, die vermutlich als Dispersionshilfsmittel zugesetzt sind und, abgesehen von der Dispergierung der Partikel selbst, vermutlich wenig Einfluss auf die toxikologischen Ergebnisse haben (Tabelle A.3).

**Tabelle 3.1.:** Konzentrationen ausgewählter PAKs in den Holzverbrennungspartikeln (rel. SD = relative Standardabweichung).

PAK	Konzentration [mg/kg]	rel. SD
Acenaphthen	<0.037	2%
Acenaphthylen	2.59	2%
Anthracen	6.3	5%
Benz[a]anthracen	23.3	2%
Benz[a]pyren	18.6	2%
Benzo[ghi]perylen	17	2%
Chrysen	42.3	2%
Dibenz[ah]anthracen	1.4	2%
Fluoranthen	103	2%
Fluoren	0.929	1%
Indeno[1,2,3-cd]pyren	11	2%
Naphthalen	0.715	5%
Phenanthren	52.1	1%
Pyren	109	1%
Summe Benzo[b,k]fluoranthen	52.2	3%
Summe aller erfassten PAKs	948.0	
B[a]P Toxizitätsäquivalente (Nisbet und LaGoy 1992)	35.2	

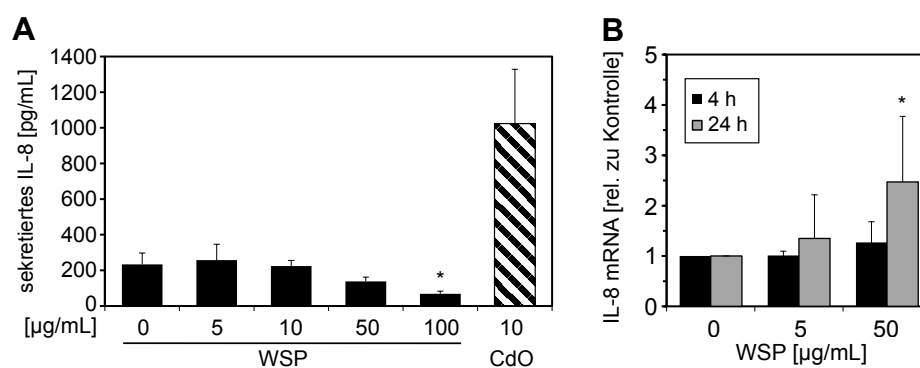
Die Zytotoxizität der WSP wurde mit zwei Methoden analysiert. Der AlamarBlue®-Assay wurde zur Messung der mitochondrialen Aktivität durchgeführt und die Membranintegrität wurde anhand der Freisetzung von LDH in das Kulturmedium bestimmt. Nach 24 h Behandlung zeigen die A549 Zellen bei allen getesteten Konzentrationen weder eine Abnahme der mitochondrialen Aktivität, noch eine erhöhte LDH-Freisetzung (Abb. 3.3). Ebenfalls waren keine Änderungen in der Menge der extrahierten RNA für die PCR-Analysen (Daten nicht gezeigt) und der Proteinmengen für die Western Blot Analysen (Abb. 3.6A) feststellbar, was die negativen Zytotoxizitätsergebnisse zusätzlich bestätigt. Die Mehrheit der publizierten Studien, die die Wirkungen von WSP auf Zell-



**Abbildung 3.3.: WSP haben keinen Einfluss auf die metabolische Aktivität und Membranintegrität von A549 Zellen.** Die Zellen wurden 24 h mit 5, 10, 50 und 100 µg/mL gesammelten Holzpartikeln, 10 µg/mL CdO in Zellkulturmedium ohne FKS oder mit partikelfreiem Medium (Kontrolle) behandelt. Die metabolische Aktivität wurde mit AlamarBlue® ermittelt (A) und auf die Kontrolle bezogen (100%). Die Membranintegrität wurde anhand der Freisetzung von LDH ins Kulturmedium ermittelt (B) und auf die LDH Menge, die durch vollständige Lyse von unbehandelten Zellen mit 1% Triton X-100 freigesetzt wurde, bezogen (100%). Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung der Mittelwerte von je 3 Replikaten aus 6 unabhängigen Experimenten. Statistische Signifikanz der Unterschiede zur Kontrolle getestet mit ANOVA und Dunnetts post-hoc Test.

kulturen untersuchten, stellten ebenfalls keine akute Toxizität fest (Danielsen et al. 2011; Korbach Bølling et al. 2009). In hohen Dosen scheinen WSP allerdings zytotoxische Wirkungen auf murine Makrophagen zu haben (Tapanainen et al. 2011). Ähnlich wie die WSP, zeigen auch CB14 über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich keine Anzeichen von Zelltoxizität (Abb. A2A,B). Die metabolische Aktivität scheint nach CB14 Behandlung sogar leicht erhöht zu sein. Möglicherweise handelt es sich hierbei um ein Artefakt aufgrund der katalytischen Aktivität der Partikeloberfläche, die die intra- oder extrazelluläre Reduktion des AlamarBlue®-Reagenz begünstigt (Oh et al. 2012). Im Gegensatz dazu zeigen beide Assays nach bereits moderaten Konzentrationen eine stark toxische Wirkung von ZnO NP an (Abb. A2C,D). CdO wurde als Positivkontrolle für den AlamarBlue®-Assay verwendet, da es die metabolische Aktivität vermindert, aber in der getesteten Konzentration gleichzeitig die Membranintegrität nicht beeinträchtigt (Abb. A3).

Die Freisetzung des pro-inflammatorischen Zytokins IL-8 in den Mediumsüberstand nach WSP Behandlung wurde mit einem ELISA gemessen. Nach 24 h Behandlungszeit konnte keine erhöhte IL-8 Freisetzung festgestellt werden (Abb. 3.4A). Stattdessen führte die höchste getestete Konzentration sogar zu einer signifikanten Abnahme von detektierbarem IL-8. A549 Zellen setzen, selbst wenn sie nicht stimuliert werden, geringe Mengen IL-8 frei. Die hohe spezifische Oberfläche der getesteten Partikel könnte eine Erklärung für die beobachtete IL-8 Abnahme darstellen, denn es ist möglich, dass Zytokine auf der Partikeloberfläche adsorbiert werden. Um dies experimentell zu überprüfen, wurde rekombinantes IL-8 mit den WSP gemischt und nach Zentrifugation im Überstand der IL-8 Gehalt mittels ELISA bestimmt. Tatsächlich nahm die Wiederfindung des eingesetzten IL-8 mit zunehmender Partikelkonzentration ab (Abb. A4). Dieses Artefakt wurde bereits zuvor für WSP und anderen Partikeltypen beobachtet (Herseth et al. 2013). Die Gehalte von IL-8 mRNA, gemessen mit quantitativer PCR (qPCR), bestätigen die negativen Ergebnisse des ELISA. Außer für die höchste Konzentration konnte nach 4 und 24 h Behandlungszeit keine signifikante Änderung der IL-8

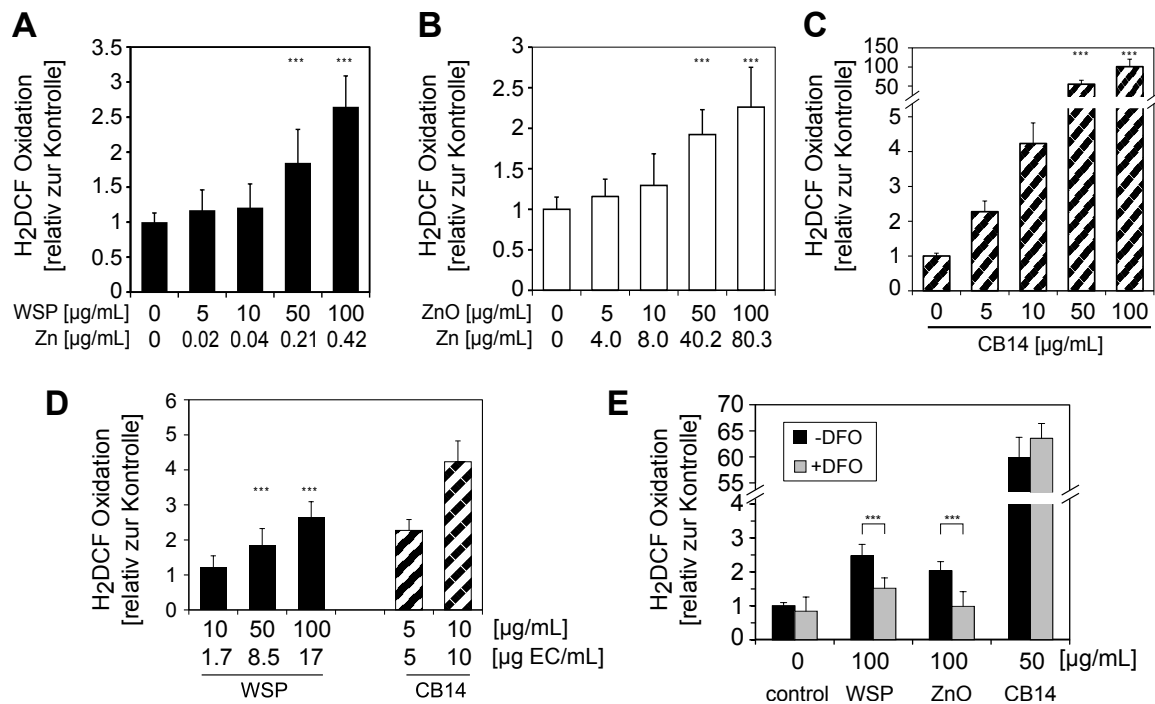


**Abbildung 3.4.: WSP haben keinen Einfluss auf die Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-8, aber induzieren geringfügig die Genexpression von IL-8.** A549 Zellen wurden mit 0, 5, 10, 50 und 100 µg/mL gesammelten Holzpartikeln oder 10 µg/mL CdO in Zellkulturmedium ohne FKS behandelt. Nach 24 h wurde sekretiertes IL-8 im Zellkulturmedium mittels ELISA bestimmt (A). CdO diente als Positivkontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von 9 Proben aus 3 unabhängigen Experimenten. IL-8 mRNA Levels wurden nach 4 h und 24 h mit qRT-PCR analysiert (B). Die abgebildeten Ergebnisse sind die Mittelwerte + SD aus 4 Proben aus 2 unabhängigen Experimenten. Statistische Signifikanz der Unterschiede zur Kontrolle getestet mit ANOVA und Dunnetts post-hoc Test (\* =  $p < 0.05$ ).

Expression festgestellt werden (Abb. 3.4B). Publierte Ergebnisse anderer Gruppen zeigen ein uneinheitliches Bild. Es gibt sowohl Studien, die im gleichen Konzentrationsbereich das Ausbleiben einer Induktion inflammatorischer Gene in A549 Zellen bestätigen (Danielsen et al. 2011), als auch Studien die eine Zunahme der Genexpression und Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen feststellen (Corsini et al. 2013; Kocbach Bølling et al. 2009).

Die divergierenden Ergebnisse sind vermutlich durch Unterschiede in den physikochemischen Eigenschaften der Partikel oder der Testsysteme zu erklären. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass Unterschiede in den PAK- und Metallkonzentrationen verschiedener Dieselpartikel zu quantitativ und qualitativ unterschiedlichen Entzündungsantworten führen (Totlandsdal et al. 2015). Ebenso scheinen Monozyten, sowohl in Monokultur, als auch in Kokultur mit Epithelzellen, sensitiver zu sein, da in diesem Fall Holzrauchpartikel zu einer erhöhten Freisetzung von Entzündungsmediatoren führten (Kocbach et al. 2008a; Kocbach et al. 2008b). In manchen Inhalationsstudien mit Probanden wurden Hinweise für eine schwache Entzündungsreaktion in den Atemwegen gefunden (Ghio et al. 2012; Riddervold et al. 2012). Hierbei muss berücksichtigt werden, dass es sich um Inhalationsstudien mit dem kompletten Verbrennungsaerosol handelt, also die bei der Verbrennung gebildeten Gase ebenfalls inhaliert wurden. Die *in vitro* Studien untersuchten dagegen lediglich die partikuläre Phase. In mehreren Probandenstudien wurde allerdings auch für das komplette Aerosol keine Erhöhung von Biomarkern für systemische Entzündungsprozesse festgestellt (Forchhammer et al. 2012; Jensen et al. 2014; Sehlstedt et al. 2010; Stockfelt et al. 2012). Daher ist die Relevanz einer festgestellten Entzündungsreaktion bei einer *in vitro* Studie mit gesammelten Partikeln diskutabel und bedarf komplexeren Untersuchungen, bei denen auch der Einfluss gasförmiger Komponenten berücksichtigt werden kann. Solche Studien könnten *in vitro* mit Zellkulturen, die an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht kultiviert werden oder *in vivo* mit Tiermodellen oder menschlichen Probanden durchgeführt werden.





**Abbildung 3.5.: Elementarer Kohlenstoff und Metalle sind die Hauptverursacher für die Bildung von zellulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch WSP.** A549 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von WSP (A,D), ZnO NP (B) und CB14 (C,D) 3 h lang behandelt. Zusätzlich wurden behandelte Zellen mit dem Komplexbildner DFO koinkubiert um die metallabhängige ROS Bildung zu vermindern (E). Die ROS Bildung wurde anhand der Oxidation von H<sub>2</sub>DCF ermittelt und die gemessenen Werte relativ zu den unbehandelten Kontrollen dargestellt. In (A,B) wurde zur besseren Vergleichbarkeit der Zinkgehalt der verwendeten WSP und ZnO Partikelsuspensionen angegeben. Analog dazu wurde in (D) der Gehalt an elementarem Kohlenstoff für die verschiedenen WSP und CB14 Konzentrationen angegeben. Die dargestellten Ergebnisse sind die Mittelwerte + Standardabweichung von mindestens 9 (A, E) bzw. 6 (B,C,D) Proben aus mindestens 3 (A) bzw. 2 (B-E) unabhängigen Experimenten. \*\*\* = p<0.001 relativ zur jeweiligen Kontrolle (ANOVA mit Dunnetts post hoc Test). In (E) wurden einseitige Welch's T-Tests für ungleiche Varianzen verwendet um auf verminderte H<sub>2</sub>DCF Oxidation durch DFO zu testen.

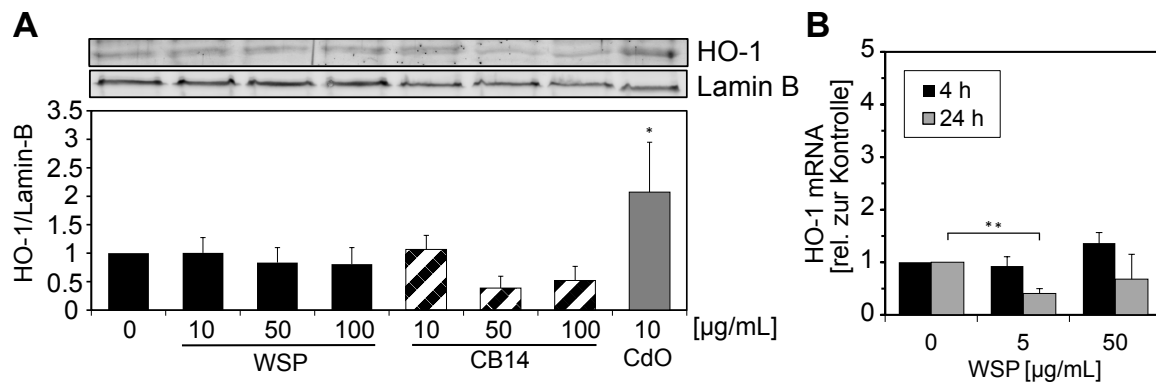
### 3.1.2. Holzrauchpartikel führen zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, lösen aber keine antioxidative Zellantwort aus

Die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ist einer der meistdiskutierten Mechanismen für die Toxizität von Partikeln (Donaldson et al. 2005; Nel et al. 2006). Die Bildung von ROS durch Behandlung mit WSP wurde über die intrazelluläre Oxidation von Dihydro-Dichlorofluorescein (H<sub>2</sub>DCF) zum fluoreszierenden DCF gemessen. Nach 3 h Behandlung wurde in A549 Zellen ein signifikanter und dosisabhängiger Anstieg der H<sub>2</sub>DCF Oxidation festgestellt (Abb. 3.5 a). WSP enthalten zwei Hauptbestandteile die Grund für eine partikelinduzierte ROS Bildung sein könnten: Ruß und metallische Verbindungen. Von den metallischen Verbindungen spielen die Zinkspezies vermutlich die wichtigste Rolle (Torvela et al. 2014b). Ruß besteht hauptsächlich aus elementarem Kohlenstoff und kann aufgrund seiner hohen spezifischen Oberfläche oxidative Prozesse katalysieren (Oberdörster et al. 2005). Übergangsmetalle hingegen können z.B. über Fenton-ähnliche Reaktionen oder der Inhibierung von anti-oxidativen Prozessen zu ROS Bildung führen (Limbach

et al. 2007; Nel et al. 2006; Unfried et al. 2007). Um den Einfluss dieser beiden Komponenten auf die ROS induzierende Wirkung von WSP zu testen, wurden CB14 und ZnO NP als Surrogat für die Ruß- bzw. Zinkfraktion der WSP ausgewählt. Die Partikel wurden getrennt voneinander auf ihre ROS induzierenden Eigenschaften getestet, um zu untersuchen ob sich so die ROS Bildung durch WSP nachstellen lässt. Tatsächlich führten CB14, wie auch ZnO NP, zur H<sub>2</sub>DCF Oxidation in A549 nach 3 h Inkubationszeit (Abb. 3.5B,C). Das Ausmaß ihrer Wirkung unterschied sich allerdings beträchtlich: die zelluläre ROS Bildung nach ZnO Behandlung war deutlich geringer als nach Behandlung mit CB14. Da im Fall der ZnO NP die ROS Bildung nur bei sehr hohen, bereits zytotoxischen (Abb. A2C,D), Konzentrationen signifikant zunahm, ist es unwahrscheinlich, dass der Zinkanteil in WSP die ROS Bildung erklärt. Stattdessen führen CB14 Partikel bereits in sehr niedrigen Konzentrationen zu einer starken H<sub>2</sub>DCF Oxidation (Abb. 3.5B). Wird die WSP bedingte H<sub>2</sub>DCF Oxidation auf den EC-Gehalt der eingesetzten Konzentration normiert, zeigen die WSP Partikel interessanterweise ähnlich starke Effekte wie die reinen Kohlenstoffpartikel (Abb. 3.5D). Dieses Ergebnis legt nahe, dass EC ein wichtiger Parameter für das oxidative Potential von WSP Partikeln ist. Um den Beitrag von metallischen Verbindungen genauer zu überprüfen, wurde die Bioverfügbarkeit von Metallionen mit dem Übergangsmetallchelator DFO gesenkt. DFO hat eine hohe Komplexbildungskonstante für Fe<sup>3+</sup>, komplexiert mit niedriger Spezifität aber auch gut Zn<sup>2+</sup> und andere Metallionen. Während DFO alleine oder in Verbindung mit CB14 keinen Einfluss auf die ROS Bildung hatte, wurden ROS durch ZnO in Anwesenheit des Chelators komplett unterdrückt (Abb. 3.5E).

Die WSP-vermittelte H<sub>2</sub>DCF Oxidation wurde hingegen nur zum Teil durch DFO verhindert. Dieses Ergebnis ist in Einklang mit der Hypothese, dass der Rußanteil eine entscheidende Rolle für den oxidativen Stress durch WSP spielt. Da der Einsatz von DFO aber dennoch zur Abnahme von ROS führte, müssen Metallspezies hier trotzdem zusätzlich einen signifikanten Beitrag leisten. Aufgrund des relativ geringen Zinkgehaltes der getesteten WSP, scheinen Zinkspezies für diese Wirkung nicht der ausschlaggebende Faktor zu sein. Stattdessen könnte der erhöhte Eisengehalt der WSP für die partikelvermittelte ROS Bildung verantwortlich sein. Eisen wurde bereits in künstlich hergestellten Nanopartikeln und Flugaschepartikel als die verantwortliche Komponente für ROS identifiziert (Fritsch-Decker et al. 2011; Limbach et al. 2007).

Die Zellen können auf oxidative Stimuli mit einer anti-oxidativen Abwehr reagieren. Ein gut untersuchtes Schlüsselenzym der anti-oxidativen Antwort ist Hämoxxygenase-1 (HO-1). HO-1 wirkt oxidativem Stress entgegen, indem es den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der oxidativen Häm-Degradation katalysiert, wobei zusätzlich das anti-oxidativ wirksame Biliverdin gebildet wird (Choi und Alam 1996). Die Regulierung von HO-1 wurde untersucht, um die Zellantwort auf die mit dem DCF-Test festgestellte Störung des Redox-Gleichgewichts zu überprüfen. Entgegen der Erwartung führten selbst hohe WSP Konzentrationen nicht zu einer Induktion von HO-1, weder auf der Ebene der mRNA, noch des Proteins (Abb. 3.6). Selbst die Behandlung mit CB14, die eine noch viel stärkere H<sub>2</sub>DCF Oxidation bewirkte, führte zu keinem Anstieg des HO-1 Enzyms.



**Abbildung 3.6.: Trotz der ROS Bildung durch WSP und CB14, induzieren beide Partikel keine Hämoxigenase-1.** A549 Zellen wurden mit 0, 5, 10, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$  WSP oder CB14 behandelt, 10  $\mu\text{g/mL}$  CdO diente als Positivkontrolle. Nach 24 h wurden die Gehalte an HO-1 Protein im Western Blot analysiert (A). Lamin B diente als Ladekontrolle. Abgebildet ist ein repräsentativer Blot (oben) und das auf die Kontrolle normierte HO-1/Lamin-B Verhältnis in Form des Mittelwerts + Standardabweichung von 4 Bestimmungen aus 2 unabhängigen Versuchen (unten). (B) HO-1 mRNA Levels wurden nach 4 h und 24 h mit qRT-PCR bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert + Standardabweichung aus 4 Proben von 2 unabhängigen Versuchen (\* =  $p < 0.05$  zum abgebildeten Bezugspunkt). Statistische Signifikanz der Unterschiede zur Kontrolle getestet mit ANOVA und Dunnetts post-hoc Test.

Eine Korrelation zwischen  $\text{H}_2\text{DCF}$  Oxidation und Oberfläche von rußartigen Partikeln wurde bereits in der Literatur beschrieben (Chuang et al. 2011; Garza et al. 2008). Wird der EC-Gehalt als Dosisparameter verwendet, führen die hier getesteten WSP zu einer vergleichbaren, aber etwas schwächeren  $\text{H}_2\text{DCF}$  Oxidation als die CB14 Partikel. Organische und anorganische Substanzen auf der Oberfläche der WSP führen vermutlich zu einer Verminderung der verfügbaren Oberfläche und somit der biologischen Aktivität. Neben der EC-Komponente könnte der hohe Eisengehalt der WSP für die zusätzliche Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies verantwortlich sein. Zink stellt normalerweise das häufigste Schwermetall in WSP dar, jedoch ist der Zinkgehalt der hier getesteten Partikel zu gering um nennenswert zur Bildung von ROS beizutragen. Bessere Verbrennungsbedingungen führen zu einer Verminderung der partikulären Emissionen und so indirekt zu einer Anreicherung des Zinkgehalts in den Verbrennungspartikeln. Tatsächlich konnte mit gesammelten Partikeln aus einer effizienten Verbrennung gezeigt werden, dass diese in kultivierten murinen Makrophagen zu erhöhter ROS Bildung und Zelltoxizität sowie in der Lunge von Mäusen zu Entzündungsreaktionen führten. Die gleiche Partikeldosis aus schlechteren Verbrennungsbedingungen zeigte diese Effekte hingegen nicht (Happo et al. 2013; Uski et al. 2014).

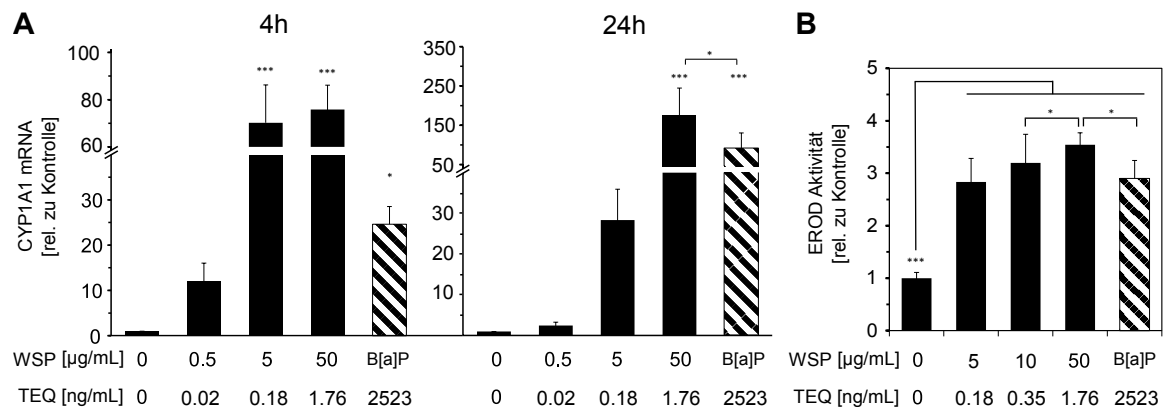
Das Ausbleiben einer anti-oxidativen Antwort, trotz Bildung von ROS infolge der Behandlung mit WSP, wurde ebenfalls in einer anderen Studie mit A549 Zellen festgestellt (Danielsen et al. 2011). Das Ergebnis war allerdings zellspezifisch, denn in der Monozytenzelllinie THP-1 war die Genexpression von HO-1 hingegen induziert. Wie in vielen aus Lungentumoren hervorgegangenen Zelllinien, ist in A549 Zellen das anti-oxidativ regulatorische Protein KEAP1 mutiert. Diese Mutation führt zu einer beständigen Stabilisierung des Transkriptionsfaktors NRF2, was zu einer permanent erhöhten Genexpression von anti-oxidativen Genen führt (Singh et al. 2006). Mit CdO Partikeln,

die in dieser Arbeit als Positivkontrolle dienten, und mit Verbrennungspartikeln aus anderen Quellen (Fukano et al. 2006) konnte gezeigt werden, dass in A549 Zellen die Expression von HO-1 durchaus induziert werden kann. Dennoch ist es plausibel, dass ein erhöhter Grundspiegel an anti-oxidativer Genexpression eine geringere Anfälligkeit von A549 Zellen gegenüber oxidativem Stress bewirkt. Daher könnte die eher moderate H<sub>2</sub>DCF Oxidation nach der Behandlung mit WSP nicht ausreichen um eine weitergehende anti-oxidative Antwort in den Zellen auszulösen. Eine Untersuchung einer Zelllinie mit intaktem NRF2-Signalweg, wie zum Beispiel die bronchiale Zelllinie BEAS-2B könnte diese Frage beantworten. Versuche mit CB14 Partikeln weisen allerdings daraufhin, dass die Degeneration des NRF2 Signalweges hier nicht ausschlaggebend ist. CB14 bewirkte eine viel deutlichere ROS Bildung als die WSP, löste aber ebenfalls keine erhöhte HO-1 Genexpression aus. Ein gleiches Ergebnis wurde mit BEAS-2B Zellen, also mit intaktem NRF2-Signalweg, beobachtet (Diabaté et al. 2011). Eine alternative Erklärung für die fehlende Verbindung zwischen H<sub>2</sub>DCF Oxidation und HO-1 Induktion könnte die örtliche Lokalisierung oder chemische Natur der ROS sein. So kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass die H<sub>2</sub>DCF Oxidation kompartimentiert oder gar extrazellulär stattfindet oder das oxidative Potential der gebildeten ROS zwar ausreicht um H<sub>2</sub>DCF zu oxidieren, nicht aber um den NRF2-Signalweg zu aktivieren. Aufgrund der fehlenden anti-oxidativen Antwort könnten ROS möglicherweise besonders schädlich wirken, da die anti-oxidative Kapazität schneller erschöpft sein könnte. Dies könnte zu oxidativen DNA-Schäden führen, wie für A549 Zellen bereits gezeigt wurde (Danielsen et al. 2009).

Die Relevanz von oxidativem Stress für die gesundheitlichen Effekte von Holzrauchpartikeln sollte tiefergehend untersucht werden, speziell in Hinblick auf die unterschiedlichen Gehalte an EC und Metallen bei verschiedenen Verbrennungsbedingungen. Neben EC und Metallen enthalten Holzrauchpartikel aus herkömmlichen Verbrennungsöfen hohe Gehalte der toxikologisch relevanten PAKs. Aus diesem Grund wurde als nächstes die Rolle der PAKs bei den toxischen Wirkungen der WSP untersucht.

#### 3.1.3. Partikelgebundene PAKs induzieren Cytochrom P450 1A1

CYP1A1 (Cytochrom P450, Familie 1, Subfamilie A, Polypeptid 1) ist bei der metabolischen Aktivierung von PAKs beteiligt. Die CYP1A1 Expression wird transkriptionell durch Ligandenbindung an den AhR reguliert. Die PAKs sind starke Liganden des AhR. Daher kann die Genexpression von CYP1A1 als Marker verwendet werden, um die Bioverfügbarkeit von PAKs sowie ihrer Potenz den Rezeptor zu aktivieren anzuzeigen. Die CYP1A1 mRNA Gehalte waren nach 4 h und 24 h Behandlung mit WSP stark erhöht (Abb. 3.7A,B). Nach 4 h führte bereits eine niedrige Konzentration von 5 µg/mL zu einer 70-fachen CYP1A1 Induktion relativ zur Kontrolle. Höhere Partikelkonzentrationen führten zu diesem Zeitpunkt nicht zu einer weiteren Erhöhung der CYP1A1 Expression. Im Gegensatz dazu war nach 24 h über den kompletten getesteten Konzentrationsbereich eine dosisabhängige CYP1A1 Induktion zu beobachten. Interessanterweise fiel die Genexpression nach 24 h bei den niedrigen Konzentrationen von 0.5 und 5 µg/mL aber geringer aus als nach 4 h. 50



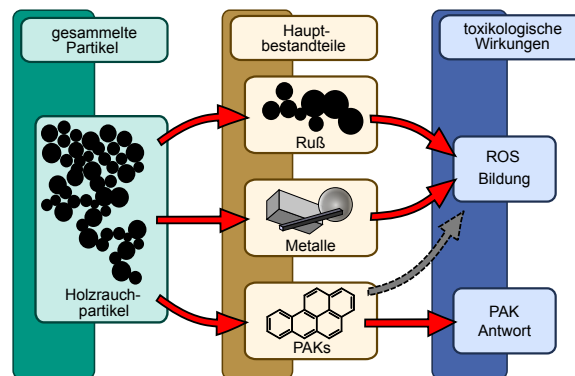
**Abbildung 3.7.: Partikelgebundene PAK bewirken eine stärkere CYP1A1 Expression und EROD Aktivität als ein lösliches Modell-PAK.** A549 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen WSP oder 10 µM des Modell-PAK B[a]P behandelt. Nach 4 und 24 h wurden die CYP1A1 mRNA Levels mit qRT-PCR bestimmt (A). Die CYP1A1 Enzymaktivität wurde nach 38 h Behandlung mit dem EROD-Test gemessen (B). Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die TEQ Konzentrationen für die verwendeten WSP und B[a]P Suspensionen angegeben. Abgebildet sind die Mittelwerte + Standardabweichung aus 4 (A) bzw. 6 (B) Proben aus 2 unabhängigen Experimenten. Für den statistischen Vergleich mehrerer Behandlungen untereinander wurde nach ANOVA der Tukey HSD Test verwendet (\* =  $p < 0.05$ , \*\*\* =  $p < 0.001$  verglichen mit der Kontrolle sofern nicht anderweitig kenntlich gemacht).

µg/mL WSP und die viel höher konzentrierte Positivkontrolle B[a]P induzierten CYP1A1 nach 24 h dagegen stärker als nach 4 h.

Die unterschiedlichen Dosis-Wirkungsbeziehungen können vermutlich durch eine zeit- und dosisabhängige Bioverfügbarkeit und Persistenz der PAKs erklärt werden. Besonders auffällig ist die Zellantwort auf das gelöste B[a]P im Vergleich zu den partikelgebundenen PAKs. Die Summe aller quantifizierten PAKs aus den WSP Partikelproben kann als toxische Äquivalente relativ zu B[a]P ausgedrückt werden (Nisbet und LaGoy 1992) (siehe hierzu auch Abschnitt 1.1.2.1). Vergleicht man die TEQ Konzentrationen der getesteten WSP Suspensionen mit der TEQ Konzentration des B[a]P (Details Anhang Tab A.3), fällt auf, dass die partikelgebundenen PAKs um mehrere Größenordnungen potenter scheinen als das lösliche B[a]P. Da die PAKs in Verbrennungspartikeln auf der Partikeloberfläche adsorbiert sind, könnten die Partikel als Vehikel für PAKs dienen, die so eine bessere Bioverfügbarkeit erlangen: durch Sedimentation der Partikel auf die Zelloberfläche erhöht sich die an den Zellen lokalisierte PAK Konzentration im Vergleich zu dem homogen verteilten B[a]P oder die Partikel könnten als „Trojanisches Pferd“ die PAK Aufnahme erhöhen, indem sie als Träger für organische Verbindungen fungieren (Gebel et al. 2014; Janssen et al. 2012). Ferner ist es möglich, dass es im Fall des gelösten B[a]P zu Verlusten durch Adsorption an Zellkulturmaterial aus Plastik kommt, wodurch die tatsächlich eingesetzte Konzentration niedriger ausfällt. Zusammengefasst ist es wahrscheinlich, dass die unterschiedliche CYP1A1 Induktion durch eine partikelbedingte höhere zelluläre PAK Dosis bei Behandlung mit WSP bedingt ist, während das suspendierte B[a]P größtenteils im Überstand oder an Zellkulturmaterialien verbleibt und nur eine Fraktion der eingesetzten Menge die Zellen erreicht.

Im Einklang mit den aus der qPCR erhaltenen Daten, induzieren WSP auch die Cytochrom P450-assoziierte Enzymaktivität. Diese wurde mit 7-Ethoxyresorufin (7-ER) im EROD (Ethoxyresorufin-O-deethylase) Assay untersucht (Abb. 3.7B). 7-ER wird CYP450 abhängig deethyliert und wird zum fluoreszierenden Resorufin umgesetzt, welches fluorometrisch einfach quantifiziert werden kann (Eichbaum et al. 2014). Die EROD Aktivität nahm dosisabhängig bei 48 h Behandlung mit den WSP zu, mit einer leicht höheren Aktivität als bei Behandlung mit B[a]P. Der mit qPCR festgestellte erhöhte CYP1A1 mRNA Gehalt manifestiert sich also tatsächlich auch in einer höheren CYP1A1 Enzymaktivität. Allerdings war die zum frühen Zeitpunkt (4 h) unterschiedliche Induzierbarkeit von CYP1A1 zwischen WSP und B[a]P Behandlung, die bereits nach 24 h weniger stark ausfiel, unter Berücksichtigung der Enzymaktivität, nach 48 h schwächer ausgeprägt. Die akkumulierte CYP1A1 Aktivität nach WSP und B[a]P Behandlung bewegt sich nach langer Behandlungszeit in vergleichbarem Ausmaß, bei nach wie vor erheblich niedrigeren TEQ Konzentrationen bei Behandlung mit WSP als mit B[a]P. Wie in Abschnitt 3.1.2 diskutiert (S.38), führt die Behandlung mit WSP zur Bildung von ROS. Neben den dort diskutierten Mechanismen können auch PAKs einen Beitrag zur ROS Generierung leisten (Briedé et al. 2004). Sie können durch Aldo-Keto-Reduktasen unter ROS Generierung metabolisiert werden, wie für A549 Zellen bereits gezeigt werden konnte (Park et al. 2008). In den bisher publizierten Arbeiten finden sich nur wenige Daten zur Wirkung von PAKs auf menschliche Zellen nach Exposition gegenüber Holzrauchpartikeln. Iba et al. (2006) verglichen in Ratten die Genexpression von CYP1A1 nach Inhalation von Zigarettenrauch und Holzrauch. Im Gegensatz zum höher konzentrierten Zigarettenrauch führte Holzrauch allerdings nicht zur CYP1A1 Induktion. Da die Induktion von CYP1A1 in Lungenexplantaten durch B[a]P in Anwesenheit von Holzrauchextrakt sogar abgeschwächt war, spekulierten die Autoren über AhR inhibierende Substanzen in den verwendeten WSP, stellten aber auch klar dass dieses Ergebnis mit anderen Holzsorten und Verbrennungsarten überprüft werden muss. Tatsächlich führten verschiedene WSP, und deren organische Extrakte, in kultivierten Rattenleberzellen in ähnlichem Ausmaß wie B[a]P, zur starken Aktivierung eines AhR abhängigen Luziferase-Reporterkonstrukts. Die Regulation von endogenem CYP1A1 wurde allerdings nicht untersucht (Gauggel et al. 2012). Rattenleberzellen reagieren zudem empfindlicher auf AhR Liganden als humane Zellen, aufgrund eines AhR Polymorphismus, der die Affinität der Ligandenbindung begünstigt (Moriguchi et al. 2003). Das hier präsentierte Ergebnis, dass WSP auch in humanen Lungenzellen zu einer deutlichen Aktivierung des AhR und der daraus resultierenden CYP1A1 Induktion führen, ist daher von großem Belang für die Risikobeurteilung von Holzrauchpartikeln, speziell in Anbetracht der wichtigen Rolle der Metabolisierung von PAKs in der Kanzerogenese (Nebert und Dalton 2006).

### 3.1.4. Bedeutung der Ergebnisse in Bezug auf die toxischen Komponenten



**Abbildung 3.8.: Behandlung mit WSP führt in A549 Zellen zur Induktion von PAK metabolisierenden Systemen und zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies.** Die WSP sind ein komplexes Stoffgemisch. Durch separates Testen der toxikologisch relevanten Hauptkomponenten Ruß, PAKs und Metalle repräsentiert durch CB14 NP, Benzo[a]pyren und ZnO NP konnten die Wirkungen von WSP rekapituliert werden. Details im Text.

Es konnte gezeigt werden, dass WSP, die bei der häuslichen Holzverbrennung gesammelt wurden, in A549 Zellen zur Bildung von ROS und einer deutlichen PAK spezifischen Zellantwort, gemessen in Form von Genexpression und Enzymaktivität von CYP1A1, führen. Hierbei führte die Bildung von ROS allerdings nicht zu einer weiterführenden anti-oxidativen Zellantwort, wie anhand der Genexpression und Proteingehalte von HO-1 gezeigt wurde. Ebenfalls hatten die WSP keinen Effekt auf die Freisetzung des pro-inflammatorischen Zytokins IL-8. Die WSP stellen ein komplexes Stoffgemisch mit vielen potentiell biologisch aktiven Substanzen dar. Die vermutlich wichtigsten Substanzen für die toxikologischen Wirkungen sind Ruß, PAKs und Metalle. Für diese Bestandteile wurden repräsentative Substanzen ausgewählt und ihre Wirkung auf A549 Zellen separat getestet. Tatsächlich konnten die Wirkungen des Stoffgemisches WSP durch die kombinierte Wirkung der Einzelkomponenten rekapituliert werden. So führten vor allem CB14 NP, repräsentativ für den Rußanteil, aber auch ZnO NP, stellvertretend für die metallische Komponente der Partikel, zur Bildung von ROS. Benzo[a]pyren, ein Modell-PAK, führte zur gleichen PAK spezifischen Zellantwort wie die WSP (siehe grafische Zusammenfassung Abb. 3.8). Auffallend war hier, dass die partikelgebundenen PAKs der WSP deutlich potenter waren als das dispergierte B[a]P. Vermutlich ist hierfür eine höhere Bioverfügbarkeit von partikelgetragenen PAKs verantwortlich, da die Partikel z.B. als Carrier die Aufnahme in die Zelle begünstigen oder durch Absinken auf die Zellen die lokal an der Zellmembran angebotene PAK Menge gegenüber dispergierten PAKs erhöhen könnten. Da die metabolische Aktivierung von PAKs einen kritischen Beitrag zu Mutagenese und Kanzerogenese leisten kann, sollte die hohe Potenz der partikelgebundenen PAKs von WSP in künftigen Studien genauer untersucht werden.

Die Bestandteile Ruß und PAKs, die den Großteil der untersuchten toxikologischen Wirkungen erklären, können durch effizientere Verbrennungsbedingungen in modernen Öfen wirksam gemindert werden. Die Metallemmissionen nehmen durch eine bessere Verbrennung allerdings nicht

ab, wodurch sich relativ zur Partikelmasse der Metallgehalt erhöht. Dies könnte zu einer Veränderung des Toxizitätsprofils, mit höherem Einfluss der Metallspezies, führen. Daher sollte auch eine Reduzierung der emittierten Metalle angestrebt werden, zum Beispiel mittels Abscheidung von Partikeln aus den Verbrennungsaerosol.

Alle hier vorgestellten Ergebnisse weisen allerdings einen wichtigen methodischen Mangel auf: es konnten lediglich die partikulären Holzverbrennungsemissionen getestet werden. Bei der Holzverbrennung entsteht allerdings auch eine Vielzahl gasförmiger Komponenten, darunter potentiell toxische Verbindungen. Eine Möglichkeit auch die gasförmigen Substanzen im Holzrauch zu testen, ist die Exposition von Zellen direkt mit dem Verbrennungsaerosol an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht. Daher wurde für die weiteren Untersuchungen in dieser Arbeit ein System entwickelt und verwendet, welches diese Art der Zellexposition ermöglicht. Im nächsten Abschnitt wird zunächst die biologische Validierung dieses Expositionssystems beschrieben.

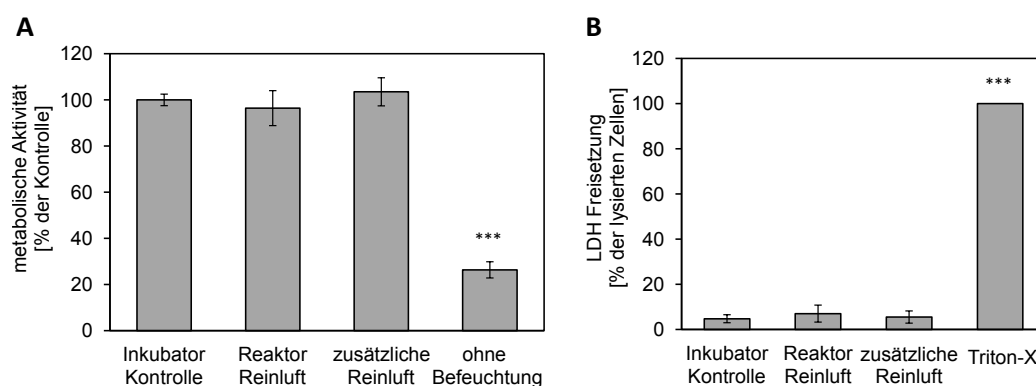


## 3.2. Etablierung eines ALI-Expositionssystems zur toxikologischen Untersuchung von Aerosolen

Im vorhergehenden Kapitel wurde nach Submersexposition der Beitrag verschiedener chemischer Komponenten zur Toxizität von Holzrauchpartikeln untersucht. Wie in der Einleitung (Abschnitt 1.2.1) ausführlicher beschrieben, hat diese Methode zur toxikologischen Charakterisierung von Verbrennungsemissionen eine Reihe von Nachteilen. Eine entscheidende Schwachstelle ist der Verlust der gasförmigen Emissionen beim Sammeln der Partikelproben. Verbrennungsaerosole, wie der in dieser Arbeit untersuchte Holzrauch, enthalten allerdings eine Vielzahl gasförmiger Verbindungen mit toxikologischer Relevanz (McDonald et al. 2000). Eine Methode, mit der das gesamte Verbrennungsaerosol auf seine Wirkung auf kultivierte Zellen getestet werden kann, ist die sogenannte Exposition an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht (ALI, engl. air-liquid interface). Am Institut für Technische Chemie wurde in der Abteilung Aerosol- und Partikeltechnologie ein ALI-Expositionssystem zum Testen von Aerosolen entwickelt (Mülhopt et al. 2009; Paur et al. 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wurden kooperativ eine Reihe von Weiterentwicklungen des bisherigen ALI-Expositionssystems umgesetzt, die das Testen von Verbrennungsaerosolen mit toxischen Gasphasenkomponenten ermöglichen. Die implementierten Neuerungen wurden technisch und biologisch validiert. In diesem Kapitel werden die wichtigsten biologischen Arbeiten hierzu beschrieben. Die technischen Etablierungs- und Validierungsarbeiten, die im wesentlichen die Bestimmung der Depositionseffizienz mit und ohne Verwendung eines elektrischen Felds, sowie die Implementierung einer zweiten Befeuchtungsanlage umfassen, können in der Publikation Mülhopt et al. (2016) nachgelesen werden.

### 3.2.1. Implementierung eines zusätzlichen Befeuchtungssystems zur gleichzeitigen Begasung von Referenzzellen mit Reinluft

Zellen, die an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht kultiviert werden, also ohne eine Flüssigkeitsschicht auf der apikalen Seite, werden sehr leicht durch Austrocknen geschädigt. Die Zellen sind derart anfällig für diese Art von Schäden, dass bereits ein kurzer Zeitraum, während dem die Zellen einem Strom von unbefeuchteter Luft ausgesetzt sind, zu starkem Zelltod führt (Abb. Fig A5). Damit die Zellen für Expositionsversuche einen längeren Zeitraum unbeschadet überstehen, wird das Testaerosol, das im System über die Zellen geleitet wird, in einem Konditionierungsreaktor mit Wasserdampf auf 85% r.F. befeuchtet (siehe Einleitung S. 12). Auf diese Weise lassen sich Aerosole untersuchen, die durch Suspension von gesammelten Partikeln in Luft generiert wurden. Ebenso kann durch die Verwendung von Filtern, welche die Partikel entfernen bevor das Testaerosol auf die Zellen gelangt, die partikelfreie Luft untersucht werden und diese Zellen als Kontrollreferenzen verwendet werden (Diabaté et al. 2008). Sollen allerdings Aerosole aus Verbrennungsprozessen analysiert werden, besteht die Gasphase nicht aus reiner Luft, sondern enthält potentiell toxische Verbindungen. In diesem Fall wird ein zweiter, getrennt vom Testaerosol befeuchteter, Luftstrom benötigt, damit weiterhin Kontrollzellen mit Reinluft begast werden können. Das dafür notwendige



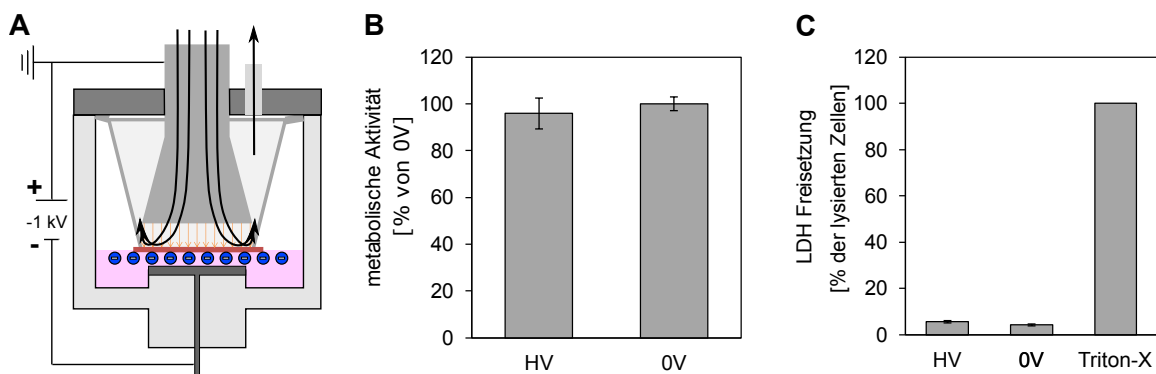
**Abbildung 3.9.: Die verwendeten Befeuchtungssysteme führen nicht zu einer verminderten Zellvitalität.** A549 Zellen wurden 4 h mit HEPA-gefilterter Raumluft begast, die entweder im Konditionierungsreaktor für Aerosole (Reaktor Reinluft) oder im zweiten Befeuchtungssystem für Kontrollpositionen (zusätzliche Reinluft) befeuchtet wurden. Die metabolische Aktivität wurde anhand der Reduzierung von AlamarBlue® (A) sowie die Membranintegrität anhand der Freisetzung von LDH ins Kulturmedium (B) ermittelt. Zellen, die in einem herkömmlichen Inkubator ohne künstliche CO<sub>2</sub> Anreicherung gehalten wurden, dienen als Negativkontrolle (Inkubatorkontrolle). Zellen, die mit 1% Triton-X 100 lysiert wurden, dienen als Referenz für die maximale freisetzbare LDH-Menge (100%). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD von 9 Proben aus 3 unabhängigen Versuchen (A), bzw. 3 Proben aus einem repräsentativen Experiment von insgesamt 3 unabhängigen Experimenten (B). Statistische Signifikanz der Unterschiede zur Inkubatorkontrolle getestet mit ANOVA und Dunnetts post-hoc Test, \*\*\* = p<0.001.

zweite Befeuchtungssystem wurde während dem Zeitraum dieser Arbeit integriert. Die Funktionalität der neuen Befeuchtungsquelle, das heißt keine Beeinträchtigung der Zellvitalität, wurde mit biologischen Tests validiert. Hierbei wurde gefilterte Umgebungsluft verwendet, wie sie bei regulären Experimenten sowohl zum Verdünnen des Testaerosols, als auch zum Begasen der Kontrollzellen eingesetzt wird. Die Zellen, die mit den unterschiedlichen Befeuchtungseinrichtungen getestet wurden, zeigten keinen Unterschied in der metabolischen Aktivität (Abb. Fig 3.9 A) und der LDH-Freisetzung (Abb. Fig 3.9 B) im Vergleich mit Zellen, die während des Versuchs im Inkubator kultiviert wurden. Zellen, über die während des Versuchszeitraums unbefeuchtete Luft strömte, wurden dagegen stark geschädigt (Abb. Fig 3.9 A, ohne Befeuchtung).

Somit ist die Möglichkeit gegeben, Zellen gleichzeitig mit einem kompletten Verbrennungsaerosol, einem partikelgefiltertem Aerosol als auch mit Reinluft zu behandeln. Dies stellt einen großen Fortschritt des in Karlsruhe entwickelten Expositionssystems dar, denn nur so können die Effekte der volatilen Komponenten eines Aerosols untersucht werden. Diese Neuerung stellt ebenfalls ein Alleinstellungsmerkmal im Vergleich zu ähnlichen Expositionssystemen dar, bei deren Verwendung die Kontrollbehandlung mit Reinluft entweder in separaten Experimenten oder einem zusätzlichen System stattfinden muss.

### 3.2.2. Die Zellvitalität wird durch Anlegen eines elektrischen Feldes nicht beeinflusst

Eine weitere wichtige technische Neuerung des Expositionssystems ist die Möglichkeit durch Anlegen einer Hochspannung ein elektrisches Feld zu erzeugen, das die Abscheidungsrate von Partikeln erhöht. Ohne elektrisches Feld unterliegt die Partikelabscheidung der Diffusion und Impaktion, womit sich eine Depositionseffizienz von etwa 1.5 - 2% erzielen lässt (Mülhopt et al. 2009; Tippe et al. 2002). Durch Anlegen eines Potentials von -1000 V lässt sich der Anteil der auf der Transwellmembran abgeschiedenen Partikel für ein Testaerosol aus Fluorescein-Natrium Partikeln um den Faktor 9.0 erhöhen. Für das Holzverbrennungsaerosol aus Kapitel 3.3.1 (siehe dort für eine detailliertere Dosisbetrachtung) beträgt der Steigerungsfaktor 3.9 (Mülhopt et al. 2016). Eine Erhöhung der Partikeldosis ist nützlich, um Aerosolquellen mit geringen Partikelemissionen zu untersuchen oder um Partikeleffekte gegenüber Gaseffekten zu betonen. Außerdem kann auf diese Weise, bei gleicher Verdünnung des Testaerosols, eine Dosisabhängigkeit der partikulären Effekte untersucht werden.



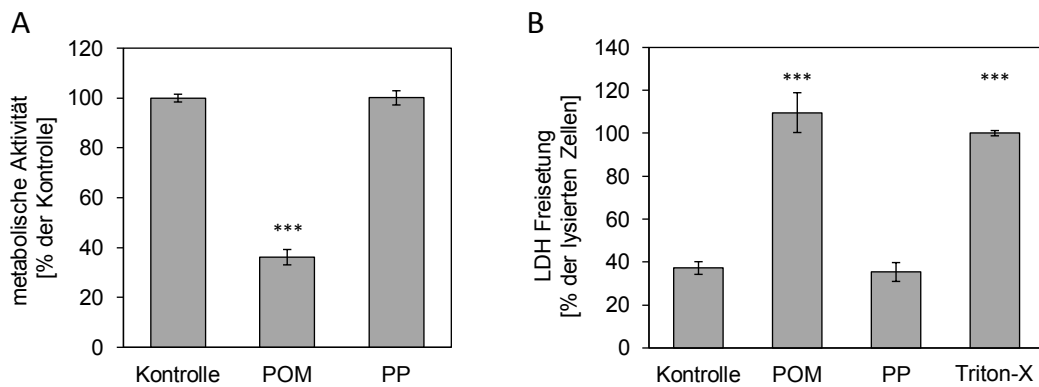
**Abbildung 3.10.: Die Verwendung eines elektrostatischen Feldes hat keinen Einfluss auf die metabolische Aktivität und Membranintegrität.** (A) Schematischer Querschnitt des Elektrodenbeckers mit Ladungsverteilung bei angelegter Hochspannung. Das Zellkulturmedium (rosa) wird in den isolierenden Kunststoffbecher (hellgrau) mit Elektrode (dunkelgrau) befüllt. Darauf wird die Membran platziert, auf der die Zellen wachsen (rot). Die schwarzen Linien zeigen den Aerosolfluss, die gelben Linien veranschaulichen die elektrischen Feldlinien. A549 Zellen wurden 4 h mit HEPA-gefilterter Umgebungsluft exponiert, mit (HV) oder ohne (0V) angelegtem Potenzial von -1000 V. Danach wurde die metabolische Aktivität anhand der Reduzierung von AlamarBlue® (B) und die Membranintegrität anhand der Freisetzung von LDH ins Kulturmedium (C) ermittelt. Die metabolische Aktivität wurde auf die Probe ohne elektrostatisches Feld normiert (100%), und die LDH-Freisetzung auf Zellen, die als Referenz für die maximale freisetzbare LDH Menge mit 1% Triton-X 100 lysiert wurden (100%). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von 6 Proben aus 2 unabhängigen Versuchen. Die ANOVA Analyse mit Dunnetts post-hoc Test ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Proben.

Da die Elektrodenflächen, zwischen denen sich das elektrische Feld aufbaut, keinen geschlossenen Stromkreis bilden, fließt kein Strom durch die Zellen (Abbildung 3.10A). Um sicherzustellen, dass das elektrische Feld bei einer angelegten Spannung von -1000 V dennoch keinen Einfluss auf die Zellvitalität hat, wurden A549 Zellen mit und ohne angelegter Hochspannung mit Reinluft begast und die Zellvitalität ermittelt. Nach 4 h Begasung mit Reinluft konnte kein Unterschied in der metabolischen Aktivität (Abb. 3.10B) und keine veränderte LDH-Freisetzung (Abb. 3.10C) bei Verwendung einer Hochspannung von -1000 V festgestellt werden. Andere Arbeitsgruppen, die bereits über ein ALI-System mit der Möglichkeit zur elektrostatischen Deposition verfügen, führten vergleichbare Experimente durch. Auch dort wurde keine Beeinträchtigung der Zellvitalität oder anderer biologischer Endpunkte beobachtet (Hawley et al. 2014; Zavala et al. 2014).

#### 3.2.3. Bioverträglichkeit des verwendeten Konstruktionsmaterials

Die Exposition der Zellen findet in Edelstahlmodulen statt. Um die elektrostatische Deposition zu ermöglichen, müssen die beiden Elektroden galvanisch getrennt werden. Dies kann durch das Einsetzen von elektrisch isolierenden Kunststoffbechern bewerkstelligt werden, in die das Zellkulturmedium gefüllt und die Zellen eingesetzt werden (Abb. 3.10A). Zwei häufig verwendete Konstruktionsmaterialien, Polyoxymethylen (POM) und Polypropylen (PP), wurden auf ihre Verträglichkeit mit der Zellkultur getestet. Zellkulturmedium wurde nach 24 h Kontakt mit Kunststoffbechern aus beiden Materialien auf A549 Zellen gegeben und nach weiteren 24 h die Zytotoxizität bestimmt. Becher aus POM sind nicht für die Zellkultur geeignet, denn das Medium, das mit POM in Kontakt war, führte zu einer Abnahme der metabolischen Aktivität (Abb. 3.11A) und erhöhter Freisetzung von LDH (Abb. 3.11B). Becher aus PP sind dagegen unbedenklich, hier wurde keine Beeinträchtigung der Zellen festgestellt. Das Ergebnis lässt vermuten, dass die Becher aus POM toxische Substanzen an das Medium abgeben. Für die Expositionsmodule wurden daher Becher aus PP verwendet.

Probleme bei der Bioverträglichkeit von POM wurden bereits in anderen Studien festgestellt, die Autoren machen dafür freigesetztes Formaldehyd durch Degradation des Kunststoffes verantwortlich (Kusy und Whitley 2005; LaIuppa et al. 1997). Neben Kunststoffen können auch andere Materialien, die in Geräten zur Zellexposition verwendet werden, wie zum Beispiel Metalle, problematische Komponenten an das Zellkulturmedium abgeben (Rach et al. 2013). In den Expositionsmodulen des am KIT entwickelten Systems, kommt neben Kunststoff ebenfalls eine Elektrode aus Edelstahl in Kontakt mit dem Medium. Die Tests zur Bioverträglichkeit wurden allerdings mit komplett montierten Kunststoffbechern, inklusive Elektroden, durchgeführt. Daher kann eine Toxizität aufgrund anderer Materialien, die mit dem Medium in Kontakt kommen, ausgeschlossen werden.



**Abbildung 3.11.: Kunststoffbecher aus POM, nicht aber aus PP, geben nach langen Kontaktzeiten toxische Bestandteile an das Kulturmedium ab.** RPMI-1640 Medium wurde in Kunststoffbecher aus Polyoxymethylen (POM) oder Polypropylen (PP) und in herkömmliche Zentrifugenröhrchen für die Zellkultur aus PP (Kontrolle) gefüllt. Die Kunststoffbecher waren gleich bestückt wie bei Zellexpositionsversuchen, inklusive der Elektroden. Nach 24 h Kontakt zu den Materialien wurde das Medium abgenommen, auf A549 Zellen gegeben und nach weiteren 24 h die Zytotoxizität anhand der AlamarBlue® Reduktion (A) und der LDH-Freisetzung (B) bestimmt. Zellen die mit 0.1% Triton-X 100 lysiert wurden, dienten als Referenz für die maximal freisetzbare LDH-Menge (100%). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von 6 Proben aus 2 unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanz der Unterschiede zur Kontrolle getestet mit ANOVA und Dunnetts post-hoc Test, \*\*\* =  $p < 0.001$ .

### 3.2.4. Weitere Verbesserungen und Einsatz des Systems auf Messkampagnen

Ferner trugen eine Reihe weiterer Verbesserungen zu einer hohen Reproduzierbarkeit der Experimente und Ausfallsicherheit des Systems bei. So wird nun vor jedem Start eines Experiments automatisiert die Dichtigkeit aller Leitungen und Verbindungen überprüft. In der Vergangenheit kam es gelegentlich, über nicht entdeckte Undichtigkeiten, zu einem Eintrag von unbefeuchteter Luft ins System, die die Zellvitalität beeinträchtigte. Diese Probleme ließen sich mit dem obligatorischen Dichtigkeitstest effizient zuverlässig vermeiden. Außerdem wurde eine Lüfterschaltung implementiert, die den Lüfter während des Einsetzens von Zellen deaktiviert. Eine Schädigung der Zellen durch den Luftstrom des Lüfters, wie in Abb. A5 gezeigt, ist hierdurch nicht mehr möglich. Schließlich wurde die Geometrie der Kunststoffbecher, in die die Zellen eingesetzt werden, verbessert. Zuvor kam es beim Einsetzen der Zellen auf das vorgelegte Zellkulturmedium leicht zur Bildung von Luftblasen unter den Transwell-Inserts und Kulturmedium stieg unkontrolliert im Zwischenraum zwischen Transwellwandung und Kunststoffbecher. Mit einem Innendurchmesser der Kunststoffbecher von 31 mm wurde eine optimale Geometrie gefunden, die die Bildung von Luftblasen unterbindet und ein problemloses Einsetzen der Transwell-Inserts ermöglicht. Weitere Details sind in der Publikation von Mülhopt et al. (2016) zu finden.

Das Expositionssystem wurde erfolgreich auf mehreren Messkampagnen des HICE-Projekts ([www.hice-vi.eu](http://www.hice-vi.eu)) zur Charakterisierung der Wirkung verschiedener Verbrennungsaerosole eingesetzt. An der Universität Rostock wurden die Emissionen eines mit Diesel und Schweröl betriebenen Schiffsdieselmotors untersucht. Die toxikologischen Ergebnisse dieser Kampagne sind in den Publikationen Oeder et al. (2015) und Sapcariu et al. (2016) veröffentlicht. Weitere Kampagnen

untersuchten die Emissionen verschiedener Holzverbrennungen (Universität Kuopio, Finnland) und eines PKW Motors, betrieben mit Bioethanol und Benzin (Universität Rostock). Die toxikologisch umfassendste Untersuchung von Verbrennungsemissionen fand während meiner Promotion zeitlich verteilt am KIT statt. Untersucht wurden die Auswirkungen des Abgases einer Buchenholzverbrennung. Die Ergebnisse sind im folgenden Kapitel beschrieben.

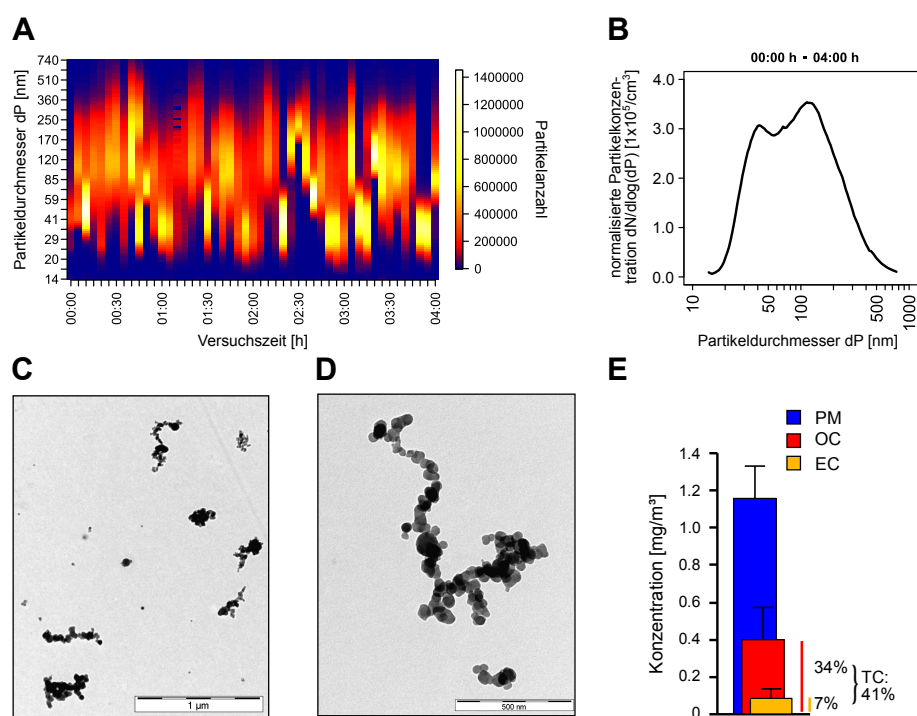
### 3.3. Untersuchung von Holzrauchemissionen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht

#### 3.3.1. Aerosolcharakterisierung

Für die toxikologische Charakterisierung von Holzrauchemissionen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht wurden die Zellen im Expositionssystem 4 h mit dem Verbrennungsaerosol einer Buchenholzverbrennung exponiert. Zur Erzeugung des Aerosols wurde ein handelsüblicher Kaminofen für Privathaushalte (8 kW) eingesetzt und die Emissionen in einer Verdünnungsanlage (Diabaté et al. 2008) im Verhältnis 1:10 mit gefilterter Umgebungsluft verdünnt. Dieses Aerosol wurde mit verschiedenen physikalischen und chemischen Methoden charakterisiert. Abbildung 3.12A zeigt den zeitlichen Verlauf der Partikelgrößen- und Partikelanzahlverteilung während eines typischen 4 h Verbrennungsexperiments. Die Partikelemissionen weisen einen dynamischen Verlauf auf, sowohl in den entstehenden Partikelgrößen, als auch den Partikelkonzentrationen. Instabile Emissionswerte sind inhärent für reale Verbrennungsprozesse, insbesondere bei der Scheitholzverbrennung, da hier der Brennstoff chargenweise verbrannt wird und es durch Ausbrand und Nachlegen von frischem Brennholz zwangsläufig zu drastischen Veränderungen der Verbrennungsbedingungen kommt.

Dies bedeutet für Zellexperimente, dass kein Experiment dem anderen gleicht und Abstriche in der Versuchsreproduzierbarkeit seitens der Aerosolquelle in Kauf genommen werden müssen. Dennoch wurde darauf geachtet, durch gleichbleibende Holzmengen und Feuerungsintervalle diese Schwankungen möglichst zu minimieren. Der Ofen wurde rund eine Stunde vor dem Start eines Zellexperimentes angefeuert, um während der Zellexposition eine möglichst konstante Betriebstemperatur zu erzielen. Die Temperatur eines Holzofens hat großen Einfluss auf die Effizienz der Verbrennung und damit auf die partikulären und gasförmigen Emissionen (Orasche et al. 2012; Reda et al. 2015). Wie in Abb. 3.12A zu erkennen, treten zu Beginn der Zellexposition keine erhöhten Partikelemissionen auf, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass der Ofen zu diesem Zeitpunkt ausreichend vorgeheizt war, um die besonders emissionsreiche Phase nach dem Betriebstart des Ofens auszublenden. Auf diese Weise wird eine bessere Reproduzierbarkeit des generierten Aerosols erzielt, und es ist möglich, mehrere vergleichbare Zellexpositionsexperimente hintereinander durchzuführen, ohne dass der Ofen zwischen den Experimenten wieder auf Raumtemperatur abkühlen muss. Es gilt allerdings auch zu bedenken, dass die emissionsreiche Anbrandphase im kalten Ofen bei realen Holzfeuerungen in Privathaushalten nicht vermieden wird. Somit werden die Emissionen diesbezüglich in den durchgeführten Laborexperimenten in ihrer Wirkung möglicherweise unterschätzt.

Abbildung 3.12B zeigt die durchschnittliche Partikelgröße und -zahl während der gesamten Versuchsdauer der Verbrennung aus Abb. 3.12A. Die Partikel besitzen eine Größenverteilung im Bereich von etwa 30 bis 300 nm. Das Maximum der Größenverteilung befindet sich bei etwa 120 nm. Daneben ist eine Schulter bei 30 - 40 nm vorhanden. Beides ist typisch für eine Holzverbrennung in einem Kaminofen der verwendeten Bauart (unvollständige Verbrennung bei erhöhten Ofentem-



**Abbildung 3.12.: Die Buchenholzverbrennung generiert ein dynamisches Aerosol mit einer Partikelgrößenverteilung im Nanometerbereich.** Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Partikelanzahl und Größenverteilung während eines typischen 4 h Experiments (A), gemessen im Expositionssystem mit SMPS, sowie die gemittelten Werte während dieses Experiments (B). Mit dem TEM wurden exemplarische Bilder von Holzrauchpartikeln in zwei verschiedenen Vergrößerungen aufgenommen (C,D). Diese wurden im Expositionssystem an gleicher Stelle an der sich sonst die Zellkulturen befinden, direkt auf Probenträger für die TEM abgeschieden. (E) Die OC/EC-Konzentrationen (Jürgen Orasche, HMGU München) und die Gesamtpartikelmasse (PM) sind die Mittelwerte + SD aus mindestens 6 Experimenten und beziehen sich auf das verdünnte Aerosol. Der EC/OC-Gehalt sowie der Gesamtkohlenstoffgehalt (Summe aus EC und OC) sind zusätzlich als prozentualer Anteil der PM angegeben.

peraturen). Bei den kleineren Partikeln handelt es sich um die Primärpartikel der Verbrennung, die zu Sekundärpartikeln mit einem aerodynamischen Durchmesser von typischerweise bis zu 400 nm agglomerieren (Kocbach Bølling et al. 2009; Naehrer et al. 2007). Agglomerate, die diese Größe wesentlich übersteigen, werden hingegen kaum gebildet und die Größenverteilung des Testaerosols lag zu jedem Zeitpunkt innerhalb des SMPS-Messbereich von 14 bis 740 nm. Am Aerosoleinlass des Expositionssystems befindet sich ein Vorabscheider zur Entfernung von Partikeln >2.5 µm. Die Messungen der Partikelgrößenverteilung haben gezeigt, dass das Aerosol durch den Vorabscheider nicht verändert wurde. Die festgestellten Partikelcharakteristika bestätigen sich bei Betrachtung der exemplarischen TEM-Aufnahmen von abgeschiedenen Partikeln. Die Übersichtsaufnahme zeigt hauptsächlich agglomerierte Sekundärpartikel im Größenbereich 100 - 400 nm, es sind allerdings auch einzeln vorliegende Primärpartikel vorhanden (Abb. 3.12C). In der Detailaufnahme (Abb. 3.12D) ist die Größe der Primärpartikel (30 - 70 nm) erkennbar. Damit entstehen bei der untersuchten Buchenholzverbrennung hauptsächlich Partikel, die beim Einatmen bis in die Alveolen vordringen können und daher toxikologisch von hoher Relevanz sind (Oberdörster et al. 2005).



Die Probenahme für die Bestimmung der Größenverteilung und die TEM-Aufnahmen erfolgte im ALI-Expositionssystem unter gleichen Bedingungen wie bei einer Zellexposition. Veränderungen des Testaerosols im System, wie zum Beispiel Wandverluste oder eine Veränderung der aerodynamischen Größe durch Wasseradsorption, wurden auf diese Weise berücksichtigt. Dies wurde genutzt um anhand der TEM-Aufnahmen und der Partikelgrößen- und Partikelanzahlverteilung die Depositionseffizienz bei Zellexperimenten abzuschätzen (siehe unten). Typische Partikelanzahlkonzentrationen des auf die Zellen geleiteten Aerosols lagen bei  $1 \times 10^5$  bis  $6 \times 10^5$  Partikel/cm<sup>3</sup> (Abb. A6). Die Partikelmassenkonzentration des Aerosols, bestimmt mittels Differenzwägung von Filterproben betrug  $1.16 \pm 0.17$  mg/m<sup>3</sup> (Abb. 3.12E). Auf die Relevanz von Partikelkonzentrationen dieser Größenordnung für reale Expositionssituationen wird in der übergreifenden Diskussion (Kapitel 4.5) eingegangen.

Bezieht man die Ergebnisse der thermisch-optischen Analyse des elementaren Kohlenstoffs (EC) und organischen gebundenen Kohlenstoffs (OC) auf die Gesamtpartikelmasse (PM), erhält man Massenanteile von 7% EC und 34% OC. Der Anteil des gesamten Kohlenstoffs (TC) an der Partikelmasse liegt somit bei 41% (Abb. 3.12E). Die Werte zu EC und OC fallen, verglichen mit publizierten Daten zur Buchenholzverbrennung in einem Kaminofen, eher niedrig aus (Orasche et al. 2012; Schmidl et al. 2008; Schmidl et al. 2011). Die angeschlossene Verdünnungsanlage sorgt bei der hier untersuchten Verbrennung für einen konstanten Luftzug am Kaminofen. Hierdurch kann es zu einer besseren Sauerstoffversorgung als bei einem offenem Kamin kommen, was eine plausible Erklärung für die tendenziell eher niedrig ausfallenden Emissionen darstellt. Auch muss berücksichtigt werden, dass die Analysenwerte zwischen verschiedenen Studien sehr starken Schwankungen unterliegen, insbesondere wenn weitere Harthölzer in die Analyse miteinbezogen werden (Fine et al. 2004).

Die chemische Zusammensetzung der partikulären Emissionen wurde anhand von Filterproben genauer analysiert. Zu den bekanntesten toxikologisch relevanten Bestandteilen im Holzrauch-aerosol gehören Metalle und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (Kocbach Bølling et al. 2009). In Tabelle 3.2 sind die mit ICP-MS bestimmten Metallgehalte aufgeführt. Das Aerosol enthielt detektierbare Mengen der Schwermetalle Al, Zn, Fe, Pb, Ni, Cr, Cu und Cd. Die Untersuchung des Beitrages von Metallen zur Toxikologie von Verbrennungsaerosolen ist insbesondere deshalb von großer Bedeutung, da sich ihre Emissionen nicht durch verbesserte Verbrennungsbedingungen reduzieren lassen und mitunter sogar durch höhere Verbrennungstemperaturen erhöhen (siehe hierzu auch Abschnitt 1.1.2). Zink ist normalerweise das häufigste Schwermetall im Holzrauch und steht im Verdacht eine Rolle bei negativen gesundheitlichen Auswirkungen infolge von Holzrauchexposition zu spielen (Torvela et al. 2014b; Uski et al. 2015). In den hier analysierten Partikelproben waren die Zinkgehalte allerdings nur geringfügig höher als die anderer, ebenso toxikologisch relevanter Metalle, wie z.B. Eisen. Wie schon in den Submersexperimenten gezeigt (Abschnitt 3.1.2 S. 38), muss daher auch bei den ALI-Experimenten davon ausgegangen werden, dass neben Zink auch andere Metalle für partikelinduzierte Effekte in Frage kommen.

**Tabelle 3.2.:** Elementanalyse (ICP-MS) gesammelter Partikel aus Filterproben (Jürgen Orasche, HMGU München). Die angegebenen Konzentrationen sind die Mittelwerte und SD aus 6 verschiedenen Verbrennungsexperimenten und beziehen sich auf das 1:10 verdünnte Aerosol. <LOD = in allen Proben unterhalb der Bestimmungsgrenze.

Element	Konzentration [ $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ]	SD [ $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ]
Al	16	10
As	<LOD	-
Ba	<LOD	-
Ca	45	21
Cd	0.6	0.2
Co	<LOD	-
Cr	1.50	0.5
Cu	1.3	0.3
Fe	8	5
K	139	40
Li	<LOD	-
Mg	<LOD	-
Mn	1.0	0.3
Mo	<LOD	-
Na	<LOD	-
Ni	1.3	n<2
P	<LOD	-
Pb	2.5	0.5
S	94	19
Sb	<LOD	-
Se	1.5	n<3
Sn	2.0	1.2
Sr	<LOD	-
Ti	<LOD	-
V	<LOD	-
Zn	9	2

Die Analytik der partikelgebundenen PAKs wurde aus den gleichen Proben mittels GC-MS durchgeführt. In Tabelle 3.3 sind die Analysendaten für ausgewählte PAKs aufgeführt, eine ausführlichere Liste mit weiteren analysierten organischen Verbindungen befindet sich im Anhang (Tab. A.5). Wie bei einer unvollständigen Verbrennung zu erwarten, war im Holzrauch ein breites Spektrum partikelgebundener PAKs detektierbar. Die toxische Aktivität einer PAK-Mischung kann vereinfacht in Toxizitätsäquivalenten (TEQ) angegeben werden (siehe Kapitel 1.1.2.1). Die auf B[a]P bezogene TEQ-Konzentration im verdünnten Aerosol lag bei  $115 \pm 51 \text{ ng}/\text{m}^3$ . Bezogen auf die Gesamtpartikelmasse betrug die TEQ-Konzentration rund  $100 \text{ ng}/\text{mg}$ . Auch die Konzentration der PAKs bewegte sich damit im typischen Bereich (Orasche et al. 2012).

Um die Partikeldosis der Zellen zu ermitteln, verfügt das ALI-System über die Möglichkeit mit einer QCM die abgeschiedene Partikelmasse in einer Expositions-kammer direkt zu messen. Die deponierte Masse von Nanopartikeln, wie im untersuchten Holzrauch, liegt allerdings unter dem Detektionslimit der QCM. Mit der elektrostatischen Deposition ist die QCM nicht kompatibel. Daher wurde die Partikeldosis der Holzrauchexposition mit zwei unterschiedlichen Methoden indirekt bestimmt. Ein Modellaerosol aus Natrium-Fluoresceinpartikeln mit einer vergleichbaren Größen-

**Tabelle 3.3.:** PAK-Analyse (GC-MS) gesammelter Partikel aus Filterproben (Jürgen Orasche, HMGU München). Die angegebenen Konzentrationen sind die Mittelwerte und SD aus 8 verschiedenen Verbrennungsexperimenten und beziehen sich auf das 1:10 verdünnte Aerosol. <LOD = unterhalb der Bestimmungsgrenze.

	Konzentration [ng/m <sup>3</sup> ]	SD [ng/m <sup>3</sup> ]
Pyren	764	308
Fluoranthen	400	109
Benz[a]anthracen	76	23
Chrysen	206	54
Benzo[b,k,j]fluoranthen	213	57
Benz[e]pyren	67	21
Benz[a]pyren	76	41
Perylen	15	5
Indeno[1,2,3-cd]pyren	92	37
Benzo[ghi]perylen	70	31
Coronen	35	24
TEQ [ng/m <sup>3</sup> ]	115	51

verteilung wie das Holzverbrennungsaerosol wurde generiert und über die Transwell-Membranen geleitet. Die abgeschiedene Partikelmasse wurde fluorimetrisch über eine Kalibrierkurve bestimmt und durch Vergleich mit der Natrium-Fluoresceinkonzentration im Aerosol die Abscheideeffizienz der Partikel berechnet. Bei der diffusionskontrollierten Partikelabscheidung stellt die Größe der Partikel den entscheidenden Parameter dar. Daher konnte die Abscheideeffizienz des Modellaerosols verwendet werden um für das Holzraucheraerosol, unter Annahme einer Dichte der Partikel von 2.70 g/cm<sup>3</sup> (Lanzerstorfer 2015) und der mit SMPS bestimmten Partikelgrößen- und Partikelanzahlkonzentration, die zelluläre Dosis zu ermitteln. Die so ermittelte Dosis  $c_{SMPS}$  lag bei 0.30 µg/cm<sup>2</sup> (Mülhopt et al. 2016). Eine direktere Methode zur Depositionsbestimmung ist das Zählen von abgeschiedenen Partikeln. Hierfür wurden Partikel mit und ohne elektrischem Feld auf TEM-Grids abgeschieden und manuell gezählt (Elihn et al. 2013). Mit dieser Methode wurde eine Partikeldosis  $c_{TEM}$  von 0.34 µg/cm<sup>2</sup> ohne, respektive 1.33 µg/cm<sup>2</sup> mit Verwendung des elektrischen Feldes ermittelt (Mülhopt et al. 2016). Die Dosis wurde durch Verwendung der Hochspannung um den Faktor 3.9 gesteigert. Die Dosis des Fluorescein-Modellaerosols war stattdessen um den Faktor 9.0 erhöht. Vermutlich haben die aus einer Verbrennung entstandenen Partikel einen anderen Ladungszustand als die zerstäubten Fluoresceinpartikel. Aus diesem Grund wurde der Steigerungsfaktor der TEM-Analyse verwendet um die  $c_{SMPS}$  Dosis unter Einfluss des elektrischen Feldes zu bestimmen. Die so ermittelte  $c_{SMPS}$  mit elektrischem Feld beträgt 1.18 µg/cm<sup>2</sup> (Mülhopt et al. 2016). Die ermittelten Partikeldosen mit beiden Methoden stimmen somit relativ gut überein. Dennoch können beide Methoden mit einem nicht zu unterschätzenden Fehler behaftet sein. Zum Beispiel kann das Modellaerosol nicht exakt die dynamische Partikelgrößen- und Partikelanzahlverteilung des Holzrauchs simulieren. Mit der TEM-Methode kann hingegen aus Agglomeraten nicht immer zuverlässig die Partikelanzahl bestimmt werden. Daher besteht ein dringender Bedarf an besseren Techniken zur Bestimmung der Partikeldeposition. Vielversprechend ist die indirekte Bestimmung

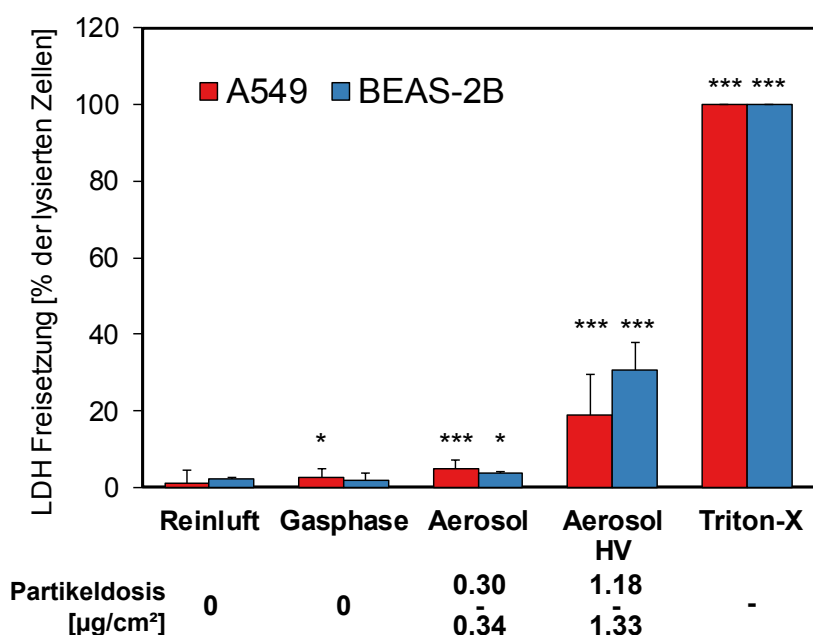
der Partikelmasse anhand eines möglichst konstanten und gut zu analysierenden Leitanalyten. Levoglucosan, ein Anhydrozucker, der bei der unvollständigen Verbrennung gebildet wird, kommt in relativ hohen Konzentrationen in Holzrauchpartikeln vor und kann empfindlich detektiert werden (Orasche et al. 2011; Simoneit et al. 1999). Da Levoglucosan offenbar von Säugern nicht metabolisiert wird und in wässrigen Umgebungen ausreichend stabil ist (Migliaccio et al. 2009) könnte es zur Bestimmung der deponierten zellulären Dosis verwendet werden.

Nach der physikalisch-chemischen Charakterisierung wurde im Folgenden die Wirkung des kompletten Aerosols bzw. der Partikel- und Gasfraktion auf humane Lungenzellen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht genauer untersucht.

#### **3.3.2. Die akute Toxizität des Holzrauchaerosols ist abhängig von der partikulären Phase**

Die Untersuchung der akuten Toxizität des Verbrennungsaerosols, bestimmt anhand der Freisetzung von Laktatdehydrogenase (LDH) in das Kulturmedium, zeigte in beiden verwendeten Zelllinien, A549 und BEAS-2B, das gleiche Bild. Nach 4 h Behandlung konnte eine deutliche LDH Freisetzung festgestellt werden, wenn unter Verwendung des elektrostatischen Felds die deponierte Partikeldosis erhöht wurde (Abb. 3.13). Bei Behandlung mit dem gefilterten Aerosol, also nur den gasförmigen Bestandteilen des Aerosols, und dem kompletten Aerosol ohne Verwendung des elektrostatischen Felds wurde dagegen nur eine vernachlässigbare Toxizität festgestellt. Aufgrund der hohen Anzahl von Versuchswiederholungen war aber selbst diese geringe LDH Freisetzung teilweise im Vergleich zur Kontrolle mit Reinluft statistisch signifikant erhöht. Dieses Ergebnis bedeutet, dass partikuläre Aerosolbestandteile im Stande sind A549 und BEAS-2B Zellen zu schädigen, und zwar innerhalb sehr kurzer Zeiträume (4 h). Die zelluläre Partikeldosis beträgt je nach verwendeter Bestimmungsmethode (siehe 3.3.1) zwischen  $0.30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (SMPS) und  $0.34 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (TEM) ohne angelegtes Feld, respektive zwischen  $1.18$  und  $1.33 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  bei Verwendung der elektrostatischen Deposition. Nach Formel A.1 und A.2 entspricht dies einer Belastung von 800 - 940 Partikeln pro Zelle ohne, respektive 3200 - 3700 Partikeln pro Zelle mit Verwendung der Hochspannung.

In dieser Arbeit, wie auch in den meisten Studien anderer Arbeitsgruppen, wurde nach Submersexposition von A549 Zellen gegenüber Holzverbrennungspartikeln keine Zytotoxizität festgestellt. Aber selbst in Studien die akut zytotoxische Effekte feststellen, traten diese erst in Konzentrationen auf, die mehrere Größenordnungen über den hier abgeschätzten Dosen in der ALI Exposition liegen (Tapanainen et al. 2011). Paur et al. (2011) schätzten die in der menschlichen Lunge abgesetzte Partikelmasse bei vierstündiger Inhalation von realistischen Umweltkonzentrationen ( $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) dem „Worst-Case-Szenario“ ( $5000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) auf  $1.2 \cdot 10^{-4} \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , respektive  $2 \cdot 10^{-2} \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Die Partikelzahl pro Zelle wurde in den beiden Szenarien auf unter 10, respektive 1200 geschätzt. Somit entspricht bereits die Partikeldosis ohne Verwendung des elektrischen Felds etwa der höchsten anzunehmenden Exposition, die Partikeldosis bei Verwendung der Hochspannung ist in der Realität nicht mehr zu erreichen.



**Abbildung 3.13.: Die akute Toxizität des Holzrauchaerosols ist abhängig von der partikulären Phase.** A549 und BEAS-2B Zellen wurden 4h mit HEPA gefilterter Umgebungsluft (Reinluft) oder mit partikelgefiltertem (Gasphase) oder ungefiltertem (Aerosol) Holzrauchaerosol (1:10 verdünnt) behandelt. Mit elektrostatischer Deposition wurde die deponierte Partikeldosis bei der Behandlung mit ungefiltertem Aerosol erhöht (Aerosol HV). Die Menge an freigesetzter LDH in das Medium unter den Insert Membranen wurde analysiert und auf die LDH Menge, die durch vollständige Lyse von unbehandelten Zellen mit 0.1% Triton X-100 freigesetzt wurde, bezogen (100%). Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung von mindestens 21 Proben aus mindestens 7 unabhängigen Versuchen. Signifikant unterschiedlich zur Kontrolle mit \* =  $p < 0.05$ , \*\*\* =  $p < 0.001$  (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's post-hoc Test). Die angegebene Partikeldosis ergibt sich aus der Spanne der Abschätzung nach den Methoden in Kapitel 3.3.1.

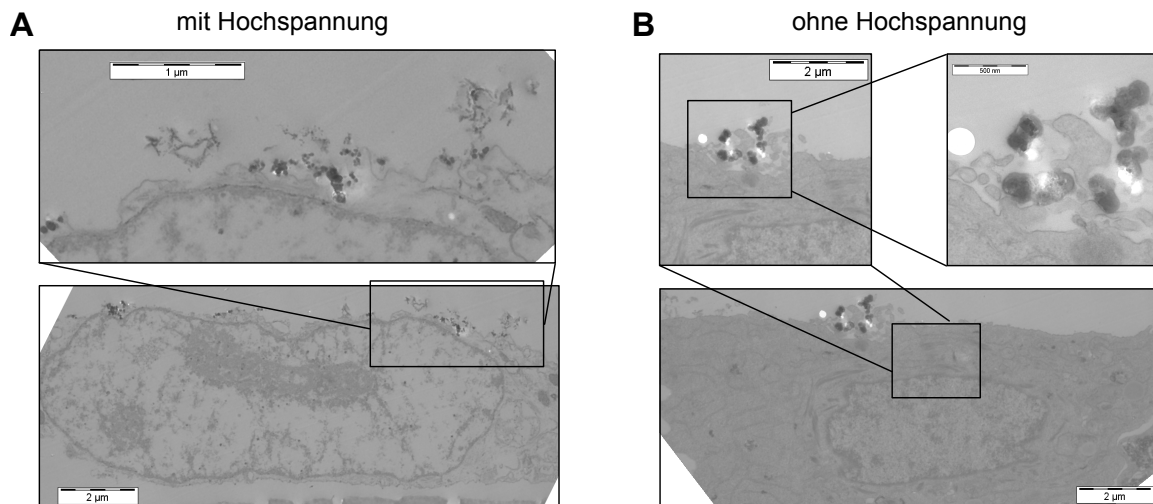
Im Gegensatz zu Submersstudien können die Partikel bei Deposition an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche direkt mit den Zellen wechselwirken, daher ist die zelluläre Dosis der beiden Methoden, wenn überhaupt, nur eingeschränkt vergleichbar. Bislang gibt es nur zwei publizierte Studien, die die Toxizität von Holzverbrennungspartikeln an der ALI untersuchten. Künzi et al. (2013) konnten keine Zytotoxizität feststellen, schätzten die zelluläre Partikeldosis allerdings deutlich geringer als bei den Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit. Interessanterweise konnte auch in der zweiten Studie, die aufgrund elektrostatischer Präzipitation eine ähnliche Dosis erzielte wie in der vorliegenden Arbeit, ebenfalls kein Zelltod festgestellt werden (Hawley und Volckens 2013). Dies lässt vermuten, dass entweder die dort verwendeten Zellen (Primärzellkulturen) weniger sensitiv reagieren, oder die Partikel weniger toxisch waren.

Da die hier dargestellte Partikeltoxizität ohne elektrostatische Deposition vernachlässigbar klein war, muss ausgeschlossen sein, dass es sich bei der hohen LDH Freisetzung um ein Artefakt, bedingt durch die Verwendung des elektrischen Feldes, handelt. Im Abschnitt 3.10 wurde bereits gezeigt, dass das elektrische Feld per sé keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen hat. Es erscheint zunächst möglich, dass das elektrische Feld in Anwesenheit von Partikeln dennoch zu artifizierender Membranschädigung führen könnte. Zum Beispiel könnten die Partikel im elektrischen Feld als

Ladungsüberträger fungieren, so dass es zu einem Stromfluss durch die Zellen kommen könnte. Da die elektrische Aufladung von Partikeln dieses Größenbereichs in einem elektrischen Feld auf wenige Elementarladungen pro Partikel limitiert ist (Hinds 2012), kann es hier selbst bei großzügigen Abschätzungen lediglich zu Stromflüssen kommen, die viele Größenordnungen unterhalb problematischer Ströme liegen ( $10^{-19}$  -  $10^{-16}$  A).

Die Holzrauchpartikel enthalten Metalle, die für die Toxizität in Frage kommen. Die Partikeldosis von etwa  $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  liegt deutlich niedriger als typische Dosen bei denen in Submersstudien von metallischen Nanopartikel toxische Effekte beobachtet werden (Panas et al. 2013; Semisch et al. 2014). Anhand der chemischen Analyse der Partikel (Abschnitt 3.2) kann nach Formel A.3 eine Abschätzung der Zellbelastung bezüglich der toxischen Komponenten in der Partikelphase gemacht werden. Die Dosen der analysierten Substanzen liegen nach dieser Abschätzung im Bereich mehrerer  $\text{pg}/\text{cm}^2$  bis weniger  $\text{ng}/\text{cm}^2$  (Tab. A.6).

In ALI Expositionsstudien wurde für die in den Holzverbrennungspartikeln ebenfalls vorkommenden Metalle Kupfer (Kim et al. 2013) und Zink (Lenz et al. 2013; Raemy et al. 2012) zwar gezeigt, dass die Zellen bereits auf niedrigere Dosen reagieren als in Submersstudien, die dafür notwendige Dosis war aber trotzdem noch um ein vielfaches höher als in den hier beschriebenen Versuchen. Da für die anderen toxischen Metalle in den Holzpartikeln keine ALI Studien publiziert sind, wurde mittels Formel A.3 die maximal mögliche intrazelluläre Konzentration der analysierten Substanzen abgeschätzt. Mit dieser Methode wurden Konzentrationen im teilweise hohen mikromolaren Bereich berechnet (Tabelle A.6), für die toxische Effekte nicht ausgeschlossen werden können. Für diese Abschätzung wurde allerdings der ungünstigste Fall angenommen, das heißt eine quantitative Aufnahme der Partikel binnen 4 h, sowie die vollständige Akkumulation der enthaltenen Metalle in den Zellen. Dies scheint bei weitem nicht der Realität zu entsprechen (Semisch et al. 2014), wie auch die weiter unten diskutierten TEM Ergebnisse verdeutlichen. Daher sind die metallischen Bestandteile vermutlich nicht alleine für die Partikeltoxizität nach nur 4 h verantwortlich. Dass die partikelgebundenen Metalle in den Zellen nicht toxisch wirken wird zusätzlich durch die Transkriptomanalyse gestützt, bei der keine auffällige Induktion von durch Metallen regulierbarer Gene festgestellt werden konnte. Neben Metallen finden sich in Holzverbrennungsemissionen im Allgemeinen relativ hohe Gehalte an Produkten aus der unvollständigen Verbrennung, darunter auch toxische PAKs. Tatsächlich war die bioverfügbare Menge von partikelgebundenen PAKs nach ALI Exposition ausreichend, um in A549 Zellen eine deutliche CYP1A1 Induktion zu bewirken (Abb. A7). Die CYP1A1 Induktion war vergleichbar zu den Submersuntersuchungen mit Holzverbrennungspartikeln, wo jedoch selbst nach 24 h keine Toxizität festgestellt wurde. Außerdem spielt für die Toxizität von PAKs die metabolische Aktivierung eine wichtige Rolle. Daher ist es angesichts des kurzen Zeitraums nochmals unwahrscheinlicher, dass PAKs für die partikelinduzierte Toxizität verantwortlich sind. Die Ursache des Verlusts der Membranintegrität nach 4 h Exposition konnte nicht abschließend geklärt werden. Neben der möglichen toxischen intrazellulären Konzentrationen können Metalle auch extrazellulär toxisch wirken. Wenn sich Metallsalze aus Partikeln lösen, könnten unter ALI-Bedingungen an der Zelloberfläche lokal hochkonzentrierte Metallionen



**Abbildung 3.14.: TEM Aufnahmen zeigen eine erhöhte Anzahl von Partikeln auf der Zelloberfläche bei Verwendung von elektrostatischer Deposition.** A549 Zellen wurden mit Reinluft (nicht gezeigt) und 1:10 verdünntem Holzrauch aerosol mit (A) und ohne (B) Verwendung eines elektrischen Felds behandelt. Nach 4 h wurden die Zellen fixiert, auf den Transwellmembranen eingebettet und Mikroschnitte mit dem TEM analysiert. Es wurden 23 (A) bzw. 30 (B) Zellen aus 2 unabhängigen Versuchen analysiert.

entstehen. Metalle können extrazellulär die Zellmembran schädigen, zum Beispiel durch lokale ROS Generierung, die zur Oxidation der Membranlipide oder Thiolgruppen in Membranständigen Proteinen führt (Stohs und Bagchi 1995). Andere toxische Substanzen, die auf der Partikeloberfläche adsorbiert sind, könnten auf ähnliche Weise ebenfalls in hohen Konzentrationen auf die Zellen wirken, während sie in Submersexperimenten im Zellkulturmedium stark verdünnt werden.

Von A549 Zellen wurden TEM Aufnahmen nach Aerosolbehandlung mit und ohne Hochspannung erstellt. Die TEM Aufnahmen können verwendet werden, um die Abscheidung der Partikel auf den Zellen zu untersuchen. Ebenso kann beurteilt werden, ob die Partikel von den Zellen internalisiert worden sind, wodurch Rückschlüsse auf den Mechanismus hinter der beobachteten Toxizität möglich sind. Die TEM Aufnahmen zeigen eine höhere Anzahl von abgeschiedenen Partikeln bei Verwendung des elektrostatischen Feldes (Abb. 3.14A) gegenüber Zellen, die ohne elektrischem Feld exponiert wurden (Abb. 3.14B). Es wurden aber nicht auf allen analysierten Zellen Partikel gefunden. Auf den Aufnahmen sind im Zytoplasma unabhängig von der Behandlung viele punktförmige Strukturen erkennen, bei diesen wurde mit höherer Vergrößerung verifiziert dass es sich nicht um Partikel handelt. Bei den Zellen, die im elektrischen Feld behandelt wurden, konnten auf 14 von 23 untersuchten Zellen Partikel gefunden werden, ohne elektrischem Feld dagegen lediglich auf 2 von 30 untersuchten Zellen. Somit kann auch auf Zellebene die verstärkte Deposition in Anwesenheit eines elektrischen Feldes belegt werden. Abschätzungen der deponierten Partikel pro Zelle (siehe oben) ergaben Werte von 800 - 940 (ohne Hochspannung) und 3200 - 3700 Partikeln pro Zelle (mit Hochspannung). Dass auf den TEM Aufnahmen dennoch nur wenige Partikel zu sehen sind erklärt sich durch die Dicke der Zellquerschnitte, die lediglich 70 nm beträgt, während sich adhärenzte A549 Zellen über einige µm erstrecken. Außerdem umfasst die Aufarbeitung der Proben

eine Vielzahl von Waschschrinen bei denen Partikel, aber auch ganze Zellen, weg gewaschen werden können. Ferner konnten in keiner der analysierten Zellen internalisierte Partikel gefunden werden. Dies ist ein wichtiges Ergebnis zur Beurteilung der partikelbedingten Toxizität, denn eine Aufnahme der Partikel in die Zellen scheint dafür nicht ausschlaggebend zu sein. Dennoch kann eine Partikelaufnahme nicht vollständig ausgeschlossen werden, denn durch die Waschschrine beim Prozessieren der TEM-Proben könnten eben genau die geschädigten Zellen präferentiell weg gewaschen worden sein.

Nachdem in den Untersuchungen ohne Verwendung der elektrostatischen Deposition keine toxischen Wirkungen des Aerosols festgestellt wurden, aber bei einer hohen, unrealistischen Dosis ein Verlust der Membranintegrität eintrat, wurden im folgenden unter den nicht toxischen Bedingungen mit Hilfe einer genomweiten Transkriptionsanalyse die Wirkungen des Holzrauchs genauer untersucht.



### 3.3.3. Die Gasphase des Holzrauchaerosols ist maßgeblich für die globale Genregulation

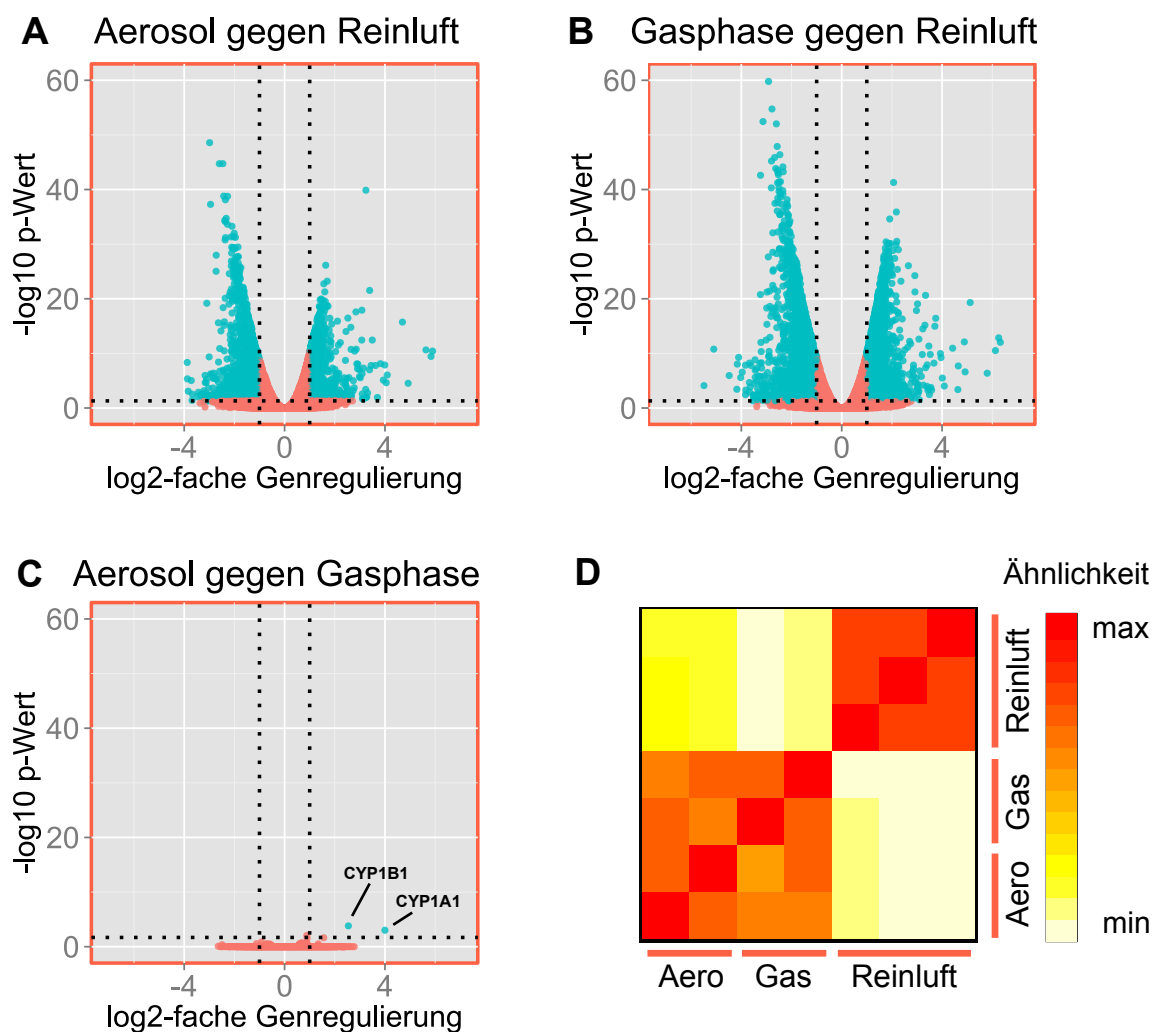
Eine Transkriptomanalyse mittels Next Generation Sequencing (RNA-Seq) wurde durchgeführt, um die Veränderungen der genomweiten Genexpression nach Holzrauchbehandlung zu untersuchen. RNA-Seq ist eine unvoreingenommene Methode, das heißt es findet keine Vorauswahl der analysierten Gene statt (Wang et al. 2009). Auf diese Weise können auch bisher unbekannte Wirkmechanismen des Verbrennungsaerosols identifiziert werden. Die RNA-Sequenzierung wurde mit beiden Zelllinien, A549 und BEAS-2B, nach 4 h Behandlung mit Reinluft, der partikelgefilterten Gasphase und dem kompletten Aerosol durchgeführt. Proben mit Verwendung des elektrischen Feldes wurden nicht sequenziert, da die zuvor beschriebene hohe Zytotoxizität zu indirekten oder unspezifischen Genexpressionsänderungen führen könnte. RNA-Seq liefert für jede analysierte Probe ein Maß für die Häufigkeit der vorhandenen mRNA Transkripte. Durch Vergleich der Häufigkeit aller quantifizierten Gentranskripte, die aus unterschiedlich behandelten Zellen isoliert wurden, kann der Einfluss der jeweiligen Behandlung auf die relative Genexpression zwischen beiden Bedingungen ermittelt werden. Abbildung 3.15 A-C zeigt die unterschiedliche Genexpression der drei möglichen Vergleichsbedingungen Reinluft, Gasphase und Aerosol in A549 Zellen. In den Abbildungen entspricht jeder Datenpunkt einem RNA Transkript, mit der Stärke der Genregulation (als log<sub>2</sub>-fache Änderung) und dem Signifikanzwert (als -log<sub>10</sub> p-Wert) der ermittelten Genregulation. Ein Transkript wurde als signifikant reguliert erachtet, wenn es die Auswahlkriterien von -log<sub>10</sub> p-Wert < 0.001 und |log<sub>2</sub>-fache Genregulation| > 1 erfüllt (in der Abbildung blau eingefärbt). Durch die vierstündige Behandlung mit dem Aerosol der Holzverbrennung waren über 2000 Gentranskripte signifikant reguliert (Abb. 3.15A).

Außerordentlich überraschend war das Ergebnis des Vergleichs Gasphase gegen Reinluft (Abb. 3.15B), denn das Ausmaß der Genregulation durch die Gasphase und durch das komplette Aerosol stimmt weitestgehend überein. Eine Korrelationsanalyse bestätigte zusätzlich, dass auch die Identität der regulierten Gene durch Aerosol und Gasphase in großem Maße übereinstimmt (Abb. 3.15D). Dementsprechend identifizierte der Vergleich des kompletten Aerosols mit der Gasphase (Abb. 3.15C) fast keine regulierten Gene. Lediglich zwei Gene genügen den oben genannten Auswahlkriterien: CYP1A1 und CYP1B1, klassische Markergene für PAKs, die erwartungsgemäß partikelgebunden im Aerosol vorkommen. Die Genexpression von CYP1A1 wurde exemplarisch mittels quantitativer RT-PCR bestätigt (Abb. A7). Ferner wurde eine verstärkte Induzierbarkeit festgestellt, wenn im elektrischen Feld die partikuläre Dosis erhöht wurde. Dies unterstreicht die partikelabhängigkeit der PAK-responsiven Genexpression. IL-8 wurde ebenfalls analysiert und war bei Verwendung der Hochspannungsdeposition signifikant erhöht. Vermutlich ließen sich mittels RNA-Seq in Zellen, die unter Verwendung der Hochspannung exponiert wurden, deutlichere partikelspezifische Effekte ermitteln. Diese Proben wurden aber aufgrund der bereits unrealistisch hohen Dosis und eintretender Toxizität nicht sequenziert.

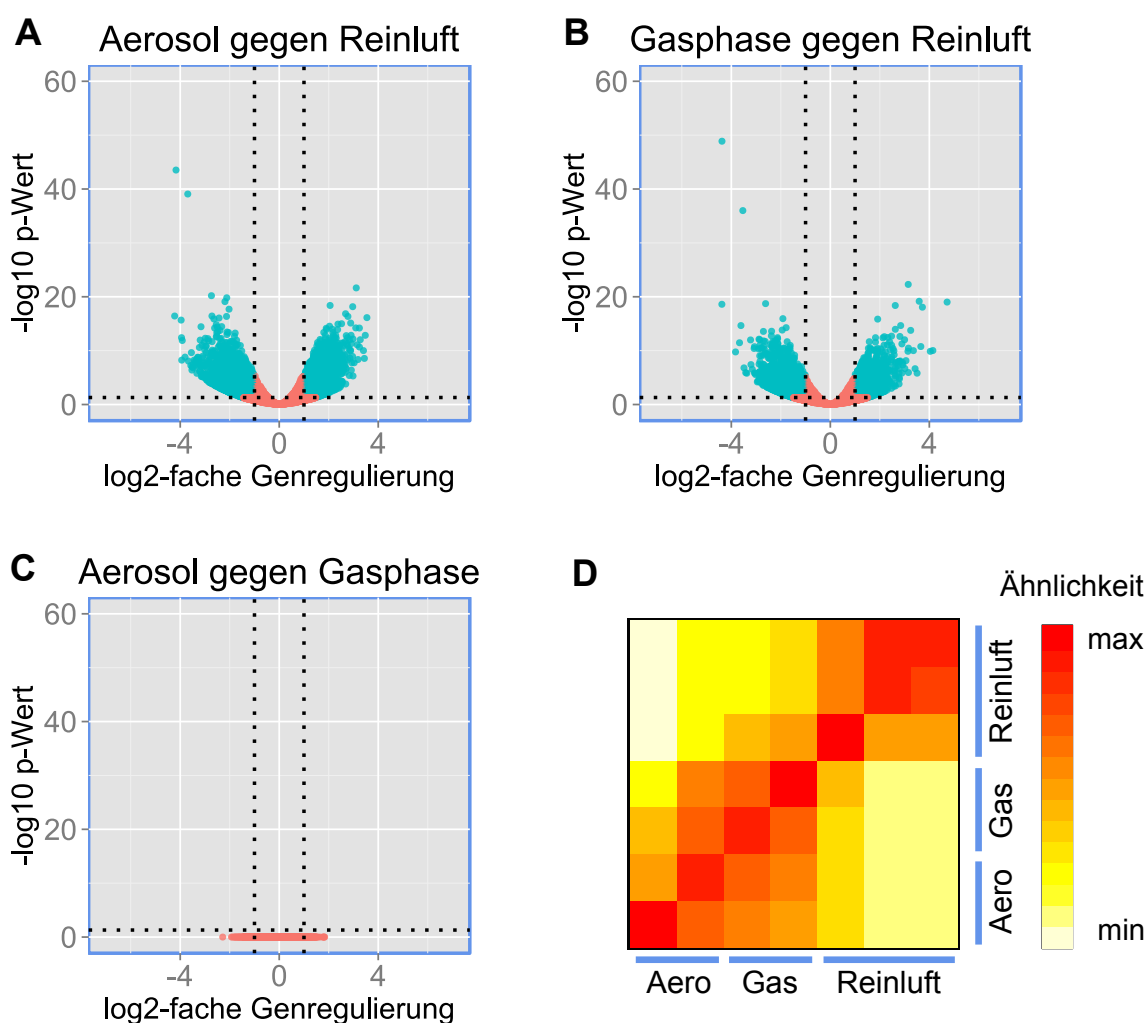
Die Effizienz der zur Entfernung der Partikel verwendeten Filter wurde mit dem SMPS überprüft. Die Partikelkonzentration des gefilterten Aerosols lag dabei unter dem Niveau der gefilterten

Umgebungsluft, so dass ausgeschlossen werden kann, dass die ähnliche Genregulation zwischen Aerosol und Gasphasenbehandlung auf eine unzureichende Filterwirkung zurückzuführen ist (Daten nicht gezeigt).

Die Transkriptomanalyse von BEAS-2B Zellen zeigt für die untersuchten Konditionen das gleiche Muster wie bei der Behandlung von A549 Zellen (Abb. 3.16). Auch hier bewirkte das komplette



**Abbildung 3.15.: Die Gasphase des Holzrauchaerosols ist maßgeblich für die globale Genregulation in A549 Zellen.** A549 Zellen wurden im ALI System 4h mit Reinluft, gefiltertem Aerosol aus der Buchenholzverbrennung (Gasphase) oder komplettem Aerosol (Aerosol) exponiert. Mittels Next-Generation-Sequencing wurden die Unterschiede der Genexpression in Abhängigkeit der drei Bedingungen untersucht (A-C). Analysiert wurden 3 (Reinluft) bzw 2 (Gasphase, Aerosol) Versuchswiederholungen mit je einer Probe pro Bedingung, erhalten durch Vereinigung gleicher Anteile aus 3 Replikaten. Aufgetragen ist der negativ logarithmische Signifikanzwert einer Genexpressionsänderung (-log<sub>10</sub> p-Wert) über die logarithmische Stärke der Genexpressionsänderung (log<sub>2</sub>-fache Genregulierung) für die drei Vergleichsbedingungen Aerosol gegen Reinluft (A), Gasphase gegen Reinluft (B), Aerosol gegen Gasphase (C). Gentranskripte, die den Auswahlkriterien von -log<sub>10</sub> p-Wert < 0.001 und |log<sub>2</sub>-fache Genregulierung| > 1 genügen, sind in blau dargestellt. (D) Abstandsmatrix der sequenzierten Proben. Rote Farbtöne bedeuten eine hohe Ähnlichkeit der Proben, helle Farbtöne stehen für große Unterschiede zwischen den Proben.



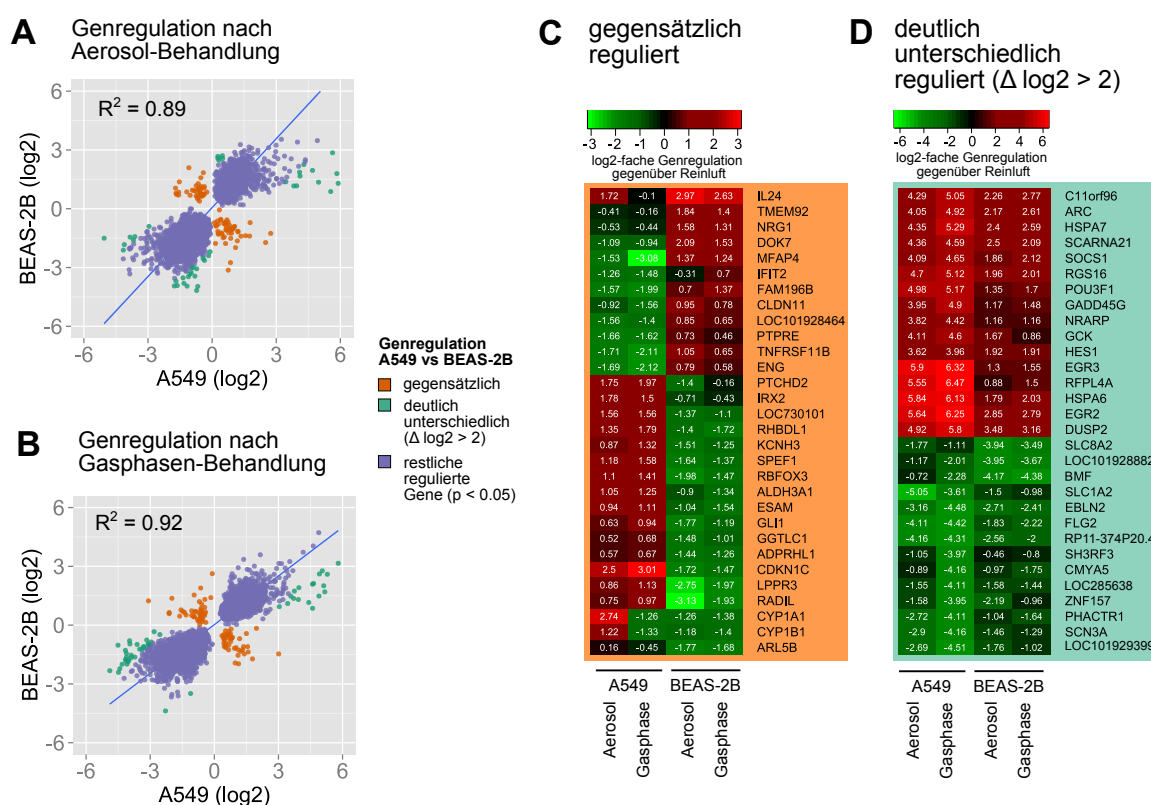
**Abbildung 3.16.: Die Gasphase des Holzrauchaerosols ist maßgeblich für die globale Genregulation in BEAS-2B Zellen.** BEAS-2B Zellen wurden im ALI-System 4 h mit Reinluft, gefiltertem Aerosol aus der Buchenholzverbrennung (Gasphase) oder komplettem Aerosol (Aerosol) exponiert. Mittels Next-Generation-Sequencing wurden die Unterschiede der Genexpression in Abhängigkeit der drei Bedingungen untersucht (A-C). Analysiert wurden 3 (Reinluft) bzw. 2 (Gasphase, Aerosol) Versuchswiederholungen mit je einer Probe pro Bedingung, erhalten durch Vereinigung gleicher Anteile aus 3 Replikaten. Aufgetragen ist der negativ logarithmische Signifikanzwert einer Genexpressionsänderung ( $-\log_{10}$  p-Wert) über die logarithmische Stärke der Genexpressionsänderung ( $\log_2$ -fache Genregulierung) für die drei Vergleichsbedingungen Aerosol gegen Reinluft (A), Gasphase gegen Reinluft (B), Aerosol gegen Gasphase (C). Gentranskripte, die den Auswahlkriterien von  $-\log_{10}$  p-Wert  $< 0.001$  und  $|\log_2$ -fache Genregulierung|  $> 1$  genügen, sind in blau dargestellt. (D) Abstandsmatrix der sequenzierten Proben. Rote Farbtöne bedeuten eine hohe Ähnlichkeit der Proben, helle Farbtöne stehen für große Unterschiede zwischen den Proben.

Aerosol (Abb. 3.16A), gleichermaßen wie die Gasphase (Abb. 3.16B), die signifikante Änderung einer großen Anzahl an Genen. Der Vergleich der Wirkungen des Aerosols gegenüber der Gasphase, also die Wirkungen der partikulären Phase, zeigte in BEAS-2B sogar kein einziges signifikant unterschiedlich exprimiertes Gen an. Obwohl in A549 Zellen die beiden Gene CYP1A1 und CYP1B1 deutlich durch die Partikel induziert wurden, sorgte in BEAS-2B Zellen die Partikelphase nicht zu

einer Veränderung dieser Gene. Auf die Induzierbarkeit von CYP1A1 und -1B1 wird beim direkten Vergleich der beiden Zelllinien auf S. 65 gesondert eingegangen. Auch die Korrelationsanalyse zeigt im Fall der BEAS-2B Zellen eine sehr hohe Ähnlichkeit der mit Aerosol und Gasphase behandelten Proben (Abb. 3.16D). Dies verdeutlicht, dass auch in BEAS-2B weitestgehend dieselben Gene nach Aerosol und Gasphasenbehandlung in vergleichbarer Stärke reguliert sind. Insgesamt zeigen die Ergebnisse der Transkriptomanalyse in beiden Zelllinien sehr deutlich, dass die Komponenten der Gasphase maßgeblich für die durch Holzrauch induzierten Effekte auf transkriptioneller Ebene sind. Dieses Ergebnis ist konträr zur vorherrschenden Annahme, die Partikelfraktion sei für die gesundheitlichen Wirkungen von Verbrennungsaerosolen verantwortlich. Die Vernachlässigung möglicher schädlicher Wirkungen der Gasphase zeigt sich auch am Versuchsdesign der meisten ALI-Studien, die sich mit Verbrennungsaerosolen beschäftigen, welches in der Regel keine Differenzierung zwischen Aerosol und Gasphaseneffekten vorsieht. So wurde auch in den bisher veröffentlichten ALI-Untersuchungen von Holzrauchemissionen, lediglich das komplette Aerosol auf Zellkulturen geleitet, weshalb keine Aussage über den Beitrag der Gasphase gemacht werden kann (Hawley und Volckens 2013; Künzi et al. 2013). Für andere Verbrennungsaerosole wurde vereinzelt der Beitrag der Gasphase untersucht. Zwei Studien, die die Wirkungen von Dieselabgasen unter ALI-Bedingungen untersuchen, führen die akute Toxizität (Knebel et al. 2002) bzw. die Erhöhung von Entzündungsmarkern (Holder et al. 2007) zumindest teilweise auf die Gasphase zurück. Azzopardi et al. (2015) konnten zeigen, dass die akute Toxizität von Zigarettenrauch zu 90% auf Bestandteile in der Dampfphase zurückgeht. Die Ergebnisse der hier beschriebenen Transkriptomanalyse zeigten hingegen, dass es im Fall der Behandlung mit Holzverbrennungsaerosol nicht nur einzelne Endpunkte sind, die durch die Gasphase moduliert werden, sondern nahezu die komplette differentielle Genregulation. Ergebnisse gemeinsamer Experimente mit Kooperationspartnern zeigten mit einem anderen unvoreingenommenen Ansatz, einer Metabolomanalyse, bei Untersuchung der Emissionen eines Schiffsdieselmotors ebenfalls einen starken Einfluss der Gasphase, wenn auch weniger prägnant als in den in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen (Sapcariu et al. 2016).

#### 3.3.4. Vergleich der differentiellen Genexpression zwischen A549 und BEAS-2B Zellen

Die Genregulation in A549 (Abb. 3.15A-C) und BEAS-2B (Abb. 3.16A-C) sieht qualitativ ähnlich aus. Um zu prüfen, ob auch die Identität der Gene und die Stärke ihrer Regulation vergleichbar ist, wurde die Genregulation der einzelnen Gene in A549 und BEAS-2B miteinander verglichen (Abb. 3.17). Abbildung 3.17A zeigt für alle modulierten Transkripte die Veränderung der Expression nach Holzrauchbehandlung in A549, aufgetragen gegen die Änderung der Expression in BEAS-2B. Erstaunlicherweise zeigen die beiden Zelllinien eine sehr gute Übereinstimmung ( $R^2 = 0.89$ ). Das gilt ebenfalls für die Genregulation in Folge der Behandlung mit der partikelgefilterten Gasphase ( $R^2 = 0.92$ ). Insgesamt ist die Genregulation in A549 und BEAS-2B Zellen nach Behandlung mit beiden Fraktionen des Holzverbrennungsaerosols also in großem Maße vergleichbar und nur wenige Gene sind in den beiden Zelllinien unterschiedlich reguliert. In Abbildung 3.17



**Abbildung 3.17.:** Die globale Genregulation zwischen A549 und BEAS-2B nach Holzrauchbehandlung ist weitgehend vergleichbar. Gezeigt ist die Korrelation aller regulierten Gene in A549 und BEAS-2B Zellen nach 4 h Behandlung mit Holzrauchaerosol **A** oder -gasphase **B**. Datengrundlage sind alle Gene, die in beiden Zelllinien in mindestens einem der beiden Vergleiche „Aerosol gegen Reinluft“ oder „Gasphase gegen Reinluft“ signifikant mit  $p < 0.05$  reguliert waren. Markiert sind Gene, die in beiden Zelllinien deutlich unterschiedlich ( $\Delta \log_2$ -fache Änderung  $> 2$ , grün) oder gegensätzlich ( $\Delta \log_2$ -fache Änderung in gegensätzlicher Richtung  $> 2$ , orange) reguliert sind.  $R^2$  = Pearson Korrelationskoeffizient. In den Heatmaps ist die  $\log_2$ -fache Änderung der Top 30 der gegensätzlich (**C**, orange hinterlegt) unterschiedlich stark regulierten Gene (**D**, grün hinterlegt) in Form des Zahlenwerts und einer Farbkodierung abgebildet.

A,B sind alle orange eingefärbten Gene in A549 und BEAS-2B gegensätzlich reguliert. Eine Liste der am stärksten gegensätzlich regulierten Gene ist in Abbildung 3.17C in Form einer Heatmap abgebildet. Auffallend ist die unterschiedliche Regulierung der Gene CYP1A1 und CYP1B1. Diese Gene waren in A549 Zellen die einzigen, deren Expression durch die Partikelphase signifikant verändert wurde. In BEAS-2B Zellen hatten die Partikel dagegen keinen feststellbaren Einfluss auf diese Gene. Garcia-Canton et al. (2013) zeigten, dass BEAS-2B Zellen nach Stimulierung mit dem AhR Liganden TCDD über eine schwächere Induzierbarkeit von CYP1A1 und -1B1 verfügen als A549 Zellen. Auch in den Lungen von Rauchern kann in den größeren Bronchien keine CYP1A1 Expression mehr festgestellt werden (Hukkanen et al. 2002), weshalb möglicherweise eine generell niedrigere Induzierbarkeit von CYP1A1 in den Bronchien die zelllinienspezifischen Unterschiede erklärt.

Interessant ist ebenfalls, dass in beiden Zelllinien die Gasphase des Aerosols im Vergleich zur Reinluftbehandlung eine Reprimierung von CYP1A1 und -1B1 bewirkt. Ke et al. (2001) konnten

zeigen, dass bereits die Überexpression von RelA, einer NF- $\kappa$ B Untereinheit, ausreicht um die CYP1A1 Expression zu supprimieren. Tatsächlich war RelA in beiden Zelllinien nach Gasphasenbehandlung stark erhöht (A549: 1.7-fach; BEAS-2B: 1.9-fach), was eine mögliche Erklärung der CYP1A1 Reprimierung in Abwesenheit von Partikeln darstellt. Obwohl die differentielle Genregulation zwischen A549 und BEAS-2B insgesamt recht ähnlich war, gibt es also Unterschiede zwischen den Zelllinien. Daher wurden speziell die unterschiedlich stark bzw. gegensätzlich regulierten Gene eingehender analysiert. Obwohl in der unvoreingenommenen GO-Term Analyse (Tabelle A.9), die im nächsten Abschnitt besprochen wird, die Regulation inflammatorischer Gene in beiden Zelllinien im Vergleich zur globalen Genregulation nicht auffallend erhöht war, scheinen bei näherer Betrachtung einzelner ausgewählter Gene inflammatorische Signalwege in BEAS-2B Zellen sensitiver auf die Holzverbrennungsgase zu reagieren als in A549 Zellen. TNFRSF1, ein TNF-Rezeptor, und IL24, ein pro-apoptisches Zytokin, sind beide im Stande NF- $\kappa$ B zu aktivieren, und waren nach Gasphasenbehandlung in BEAS-2B induziert, während sie in A549 reprimiert bzw. unverändert waren (Abb. 3.17C). Ein ähnliches Bild zeigt sich auch beim Blick auf die insgesamt am stärksten regulierten Gene in den beiden Zelllinien (Tabelle A.7 und A.8). Hier finden sich bei BEAS-2B, im Gegensatz zu den A549 Zellen, mehrere inflammatorische Zytokine (IL6, IL24, IL8) unter den induzierten Transkripten. Aufgrund der insgesamt sehr hohen Zahl differentiell regulierter Gene darf dieser Unterschied aber nicht überinterpretiert werden, denn viele der in BEAS-2B stark regulierten Transkripte sind ebenfalls in A549 stark unterschiedlich reguliert und lediglich aufgrund der Limitierung auf 100 Einträge nicht in der Tabelle aufgeführt. Im Fall der inflammatorischen Zytokine ist aber dennoch ein klarer Unterschied zwischen den Zelllinien zu erkennen (siehe hierzu neben IL24 auch die Genexpression von IL6 und CCL24 in Abbildung A9, S. 172).

Ferner fällt in der Liste der zwischen A549 und BEAS-2B gegensätzlich regulierten Gene auf, dass sich mehrere Gene finden, die bei der Zelldifferenzierung und -Motilität eine Rolle spielen (CLDN11, ENG, GLI1, RADIL, ESAM, NRG1). Eines der am deutlichsten gegensätzlich regulierten Gene ist CDKN1C, das den CDK Inhibitor p57/Kip2 kodiert. BEAS-2B Zellen sind durch Infektion mit dem Ad12-SV40-Hybridvirus immortalisiert worden, welcher mit der Zellzykluskontrolle interferiert und so möglicherweise die unterschiedliche Regulation von p57 bedingt. Dennoch waren im allgemeinen zellzyklus-assoziierte Gene in den beiden Zelllinien vergleichbar reguliert (Abb. A8). In BEAS-2B bewirkt die Holzrauchbehandlung also eventuell stärkere entzündliche Prozesse bzw. eine stärkere Wirkung auf Differenzierung und Motilität. Ob es sich hierbei um zelllinienspezifische Effekte handelt, oder ein genereller Unterschied zwischen Bronchien und Alveolen besteht, sollte in zukünftigen Studien adressiert werden.

Neben den Genen, die in A549 und BEAS-2B gegensätzlich reguliert sind, könnten auch die Gene interessant sein, die in den beiden Zelllinien stark unterschiedlich reguliert sind. Ein Gen wurde als unterschiedlich reguliert definiert, wenn die log<sub>2</sub>-fache Genexpression beim Vergleich der Aerosol- oder Gasphasenbehandlung mit der Reinluft zwischen A549 und BEAS-2B sich um mindestens den Faktor zwei unterschied. Nur wenige Gene erfüllen dieses Kriterium (Abb. 3.17A,B). Betrachtet

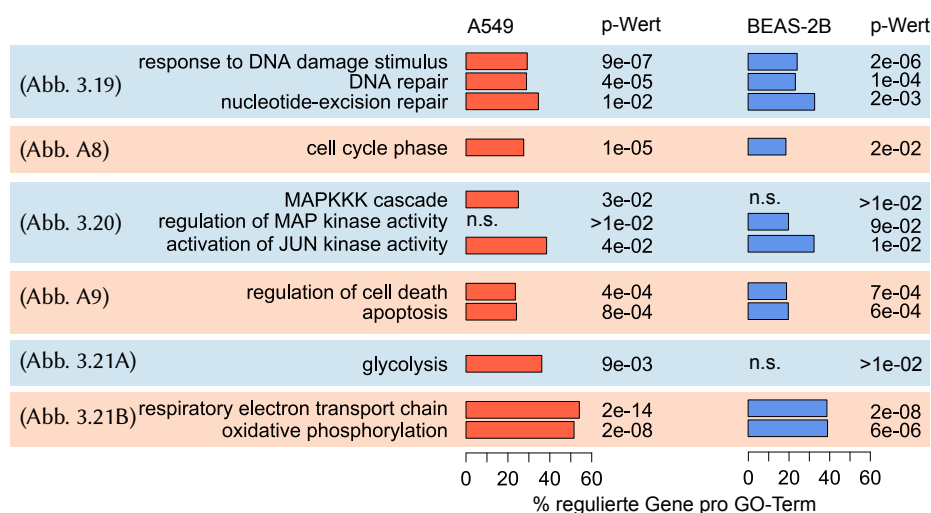
man die Heatmap der am stärksten unterschiedlich regulierten Gene (Abb. 3.17D) fällt auf, dass die Unterschiede meistens durch sehr hohe Werte in den A549 Zellen zustande kommen. Unter den betroffenen Genen finden sich EGR2 und -3, Vertreter der „early growth response“-Familie, die in A549 zu den am stärksten induzierten Transkripten überhaupt gehören (Tabelle A.7). EGR2 und -3 sind Transkriptionsfaktoren, die von verschiedenen Stimuli, darunter Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hypoxie, induziert werden und die Expression einer Vielzahl von Genen verschiedener Funktionen steuern. Besonders interessant im Kontext der Inhalationstoxikologie ist dabei die wichtige Rolle der EGR-Familie bei der Entstehung von Fibrose (Bhattacharyya et al. 2011). Ferner wurde in Lymphozyten gezeigt, dass EGR2 und -3 eine wichtige Rolle in der Regulation der Entzündungsreaktion spielen und unter anderem die Expression von SOCS1 (suppressor of cytokine signaling 1) stimulierten (Li et al. 2012). SOCS1 zählt ebenfalls zu den Transkripten, die in A549 erheblich stärker reguliert waren als in BEAS-2B Zellen und ist, wie der Name suggeriert, ein negativer Regulator der Signaltransduktion inflammatorischer Zytokine. SOCS1 kann von verschiedenen Zytokinen aber auch auf transkriptioneller Ebene induziert werden, weshalb es einen negativen Feedback Mechanismus für die inflammatorische Antwort darstellt (Davey et al. 2006). SOCS1, EGR2 und -3 waren alle in vergleichbarem Ausmaß in A549 stärker induziert als in BEAS-2B. Ob zwischen der Regulierung dieser Gene nach Holzrauchbehandlung ein direkter funktionaler Zusammenhang besteht, kann allein auf Grundlage der mRNA-Sequenzierung aber nicht festgestellt werden. Weitere toxikologisch relevante Gene, die in den untersuchten Zelllinien deutlich unterschiedlich reguliert waren, sind DUSP2, GADD45G sowie HSPA6 und -7. DUSP2 (dual specific phosphatase 2) gehört zu einer Familie von Phosphatasen, die ebenfalls via eines Feedback Mechanismus die Signaltransduktion der MAP-Kinasen modulieren, wobei DUSP2 präferentiell p-ERK und p-p38 dephosphoryliert (Owens und Keyse 2007). Die Familie der „Growth arrest and DNA-damage inducible“ Proteine, der GADD45G angehört, können ebenfalls durch MAP-Kinasen aktiviert werden und inhibieren durch Interaktion mit Cyclin B1 die G2/M Zellzyklusprogression (Liebermann und Hoffman 2008). HSPA6 und -7 kodieren weitgehend homologe Hitzeschockproteine der HSP70-Familie, die durch verschiedene Formen von zellulärem Stress induziert werden (Morimoto 1998; Tavaría et al. 1996).

Inwieweit die unterschiedlich starke Regulation der einzelnen Gene sich tatsächlich in einer veränderten Wirkung des Aerosols in A549 und BEAS-2B äußert ist allerdings unklar und müsste in weiteren Studien überprüft werden. Außerdem ist die Anzahl der gegensätzlich und deutlich unterschiedlich regulierten Gene (jeweils etwa 100) im Verhältnis zur Gesamtmenge der differentiell regulierten Gene (etwa 2000 - 3700) außerordentlich gering. Wie oben bereits diskutiert, ist die globale transkriptionelle Antwort in beiden Zelltypen sehr ähnlich. Insgesamt wurden bei der Transkriptomanalyse in beiden Zelllinien rund 34 000 unterschiedliche Transkripte detektiert. Diese Zahl entspricht aber nicht der Gesamtheit aller exprimierten Transkripte, da wenig abundante Transkripte aufgrund der limitierenden Sequenzierungstiefe nicht detektiert worden sein könnten. Ebenfalls sind die analysierten Gentranskripte nicht gleichzusetzen mit den rund 20 000 proteinkodierenden Genen, sondern beinhalten ebenfalls Spleissvarianten, Pseudogene sowie

nicht kodierende mRNA Transkripte. Dennoch stellen die, je nach verglichenen Bedingungen 2000 – 3700, signifikant regulierten Transkripte eine enorm hohe Zahl dar. Zum Verständnis von Wirkmechanismen und Signalwegen, die durch Aerosolexposition reguliert werden, reicht daher eine manuelle Analyse aller differentiell exprimierter Transkripte nicht mehr aus. Hierzu wird eine unvoreingenommene Interpretation durch bioinformatische Werkzeuge, wie der GO-Term Analyse verwendet.

### 3.3.5. GO-Term Analyse

Die GO-Term Analyse identifiziert aus der Vielzahl der modulierten Gene die am stärksten beeinflussten zellulären Prozesse. Das GO (Gene Ontology) Konsortium stellt eine manuell kuriierte Datenbank zur Verfügung, in der Gene jenen zellulären Prozessen zugeordnet werden, bei deren Regulation sie beteiligt sind, den sogenannten GO-Termen. Die GO-Term Analyse überprüft, ob von den differentiell regulierten Genen aus der mRNA-Sequenzierung, bestimmten GO-Termen überdurchschnittlich viele Vertreter zugeordnet werden können (Huang et al. 2009).



**Abbildung 3.18.: GO-Term Anreicherungsanalyse zur Identifizierung der beeinträchtigten zellulären Prozesse durch die Gaspase des Holzrauchaerosols.** Gezeigt ist eine Auswahl der angereicherten GO-Terme basierend auf den regulierten Genen des Vergleichs Gaspase gegen Reinluft in A549 (Abb. 3.15B) und BEAS-2B (Abb. 3.16B) mit  $p < 0.001$ . Dargestellt ist jeweils der prozentuale Anteil regulierter Gene von allen detektierten Genen des angereicherten Terms sowie der Signifikanzwert der Anreicherung. GO-Terme ohne Angabe des prozentualen Anteils regulierter Gene waren nicht signifikant erhöht ( $p > 0.01$ , n.s.). Die in Klammern angegebenen Abbildungen enthalten eine detaillierte Analyse der jeweiligen GO-Terme.

Auf diese Weise wurde eine Anreicherung von Genen gefunden, die bei DNA-Schadensantwort, Zellzyklusregulation, MAP-Kinasen Signaltransduktion, Apoptose und Energiestoffwechsel eine Rolle spielen (Abb. 3.18).

In der Abbildung sind ausgewählte GO-Terme dargestellt, für die jeweils der prozentuale Anteil der differentiell regulierten Transkripte von allen Transkripten eines GO-Terms angegeben ist. Als Hintergrund, dem sogenannten „gene universe“, dienten dabei alle Transkripte, die in der Sequenzierungsanalyse detektiert worden sind. Zusätzlich ist der Signifikanzwert (p-Wert) der gefundenen

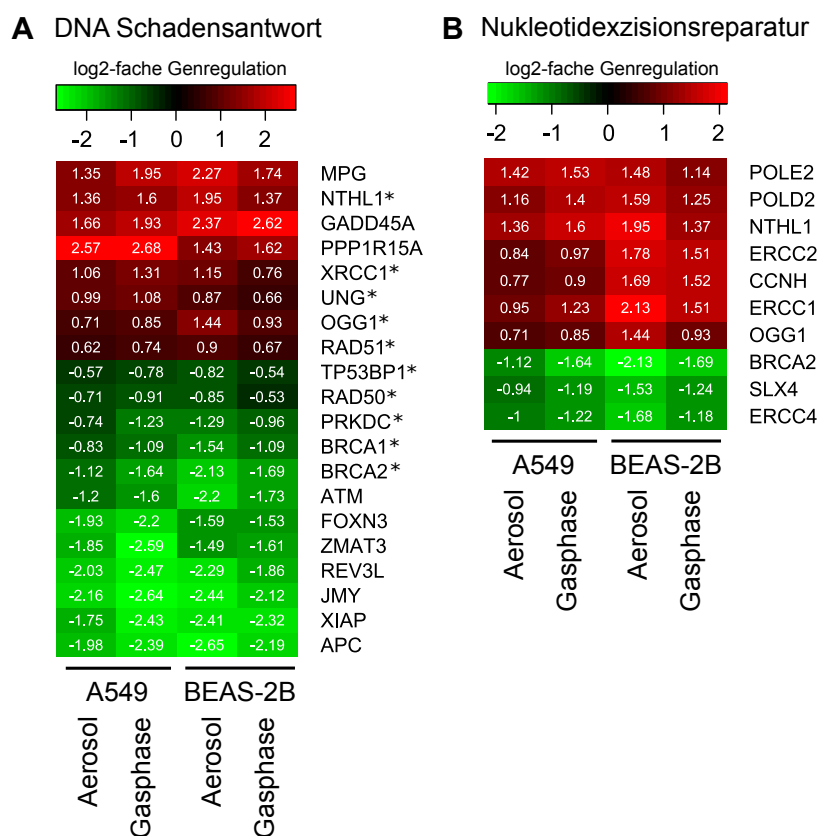


Anreicherung angegeben. Eine ausführliche Liste der angereicherten GO-Terme befindet sich in Tabelle A.9.

In der GO-Datenbank sind Gene lediglich qualitativ den GO-Termen zugeordnet, daher berücksichtigt die GO-Analyse nicht, wie stark und in welche Richtung die Transkripte moduliert wurden. Das heißt ein Gen, das einem zellulären Prozess zugeordnet ist, aber nur eine geringe Rolle spielt, hat in der GO-Analyse das gleiche Gewicht wie ein Gen mit einer Schlüsselrolle im entsprechenden Prozess. Ob sich die Genexpressionsänderung eines individuellen Gens begünstigend oder reprimierend auf den GO-Term auswirkt, wird in der GO-Term Analyse ebenfalls nicht berücksichtigt. Außerdem sind Gene in der Regel mit mehreren GO-Termen verknüpft und obwohl es sich um eine von Experten kurierte Datenbank handelt, sind manche Genklassifizierungen kritisierbar oder gut untersuchte Funktionen eines Gens nicht berücksichtigt. Aus diesen Gründen sollte die GO-Analyse zunächst lediglich als Mittel zur Hypothesengenerierung betrachtet werden und die identifizierten Prozesse anschließend verifiziert werden (Yon Rhee et al. 2008). Als erster Schritt dieser kritischen Überprüfung wurde die differentielle Regulierung der einzelnen Gene, die mit den GO-Termen verknüpft sind, hinsichtlich ihrer Bedeutung für den durch den GO-Term beschriebenen Prozess genauer betrachtet. Hierfür wurden für ausgewählte GO-Terme die 10 am stärksten differentiel regulierten Transkripte der Vergleichsbedingungen Aerosol gegen Reinluft und Gasphase gegen Reinluft in Form einer Heatmap dargestellt. Diese Genliste wurde zusätzlich manuell durch weitere Gene ergänzt, falls sich für die Interpretation wichtige Gene nicht unter den 10 am stärksten regulierten Transkripten befanden oder schlichtweg in der Datenbank dem GO-Term nicht zugeordnet waren (markiert mit „\*“).

#### 3.3.5.1. Genexpression der DNA-Schadensantwort

Unter den Genen der angereicherten GO-Terme der allgemeinen DNA-Schadensantwort (GO:0006974, GO:0006281) befinden sich Gene, die Proteine verschiedener DNA-Schadenserkennungs- und Reparaturprozesse kodieren (Abb. 3.19A). Mehrere Glykosylasen, die im Zuge der Basenexzisionsreparatur (BER) geschädigte DNA-Basen entfernen, wurden durch die Holzrauchgasphase induziert: MPG (DNA-3-Methyladenin Glykosylase) und UNG (Uracil-DNA Glykosylase) sind bekannte Glykosylasen mit Spezifität für methylierte Purinbasen bzw. Uracil, das durch Fehleinbau oder Deaminierung von Cytosin entsteht. Ebenso positiv reguliert waren OGG1 (8-Oxoguanin Glykosylase) und NTHL1 (Endonuclease III-like protein 1), die beide vorwiegend oxidierte Basen entfernen (Christmann und Kaina 2013; Krokan und Bjoras 2013). XRCC1 (X-ray repair cross-complementing protein-1) wird bei der BER benötigt, um nach Einsetzen der neuen Nukleobase den DNA-Strang wieder zu ligieren, spielt aber auch bei der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) und Einzelstrangbruchreparatur (SSBR) eine Rolle. Die genannten Glykosylasen und XRCC1 sind auch tatsächlich dafür bekannt, durch verschiedene BER-qualifizierende Basenschädigungen transkriptionell induziert zu werden, wenngleich für die tatsächliche BER Aktivität post-translationale Proteinmodifikationen ausschlaggebend sind (Christmann und Kaina 2013).



**Abbildung 3.19.: Detailanalyse der mit DNA-Schädigung assoziierten regulierten Gene.** Gezeigt ist die log2-fache Genregulation, hervorgerufen durch Behandlung von A549 und BEAS-2B Zellen mit Holzrauch aerosol und -gasphase in Form des Zahlenwerts und einer Farbkodierung. Die Auswahl der Gene basierte auf einer Kombination von manueller Selektion bekannter Reparaturgene (markiert mit „\*“) sowie den am stärksten regulierten Genen aus allgemeinen GO-Termen der DNA-Schadensantwort (GO:0006974, GO:0006281) (A) bzw. den 10 stärksten regulierten Genen des stärker abgegrenzten GO-Terms „Nukleotidexzisionsreparatur“ (GO:0006289) (B).

Ebenfalls waren einige bei der Doppelstrangbruchreparatur beteiligte Gentranskripte durch die Holzrauchbehandlung differentiell reguliert. ATM (ataxia-telangiectasia mutated) und PRKDC (katalytische Untereinheit der DNA-PK) sind Sensoren für Doppelstrangbrüche und leiten deren Reparatur über homologe Rekombination (HR) respektive non-homologous end-joining (NHEJ) ein. Zwar wurde sowohl ATM als auch PRKDC durch die Gasphasenbehandlung reprimiert, dies schließt aber nicht die Aktivierung von ATM und DNA-PK im Zuge einer DSB-Erkennung aus, da diese Proteine hauptsächlich posttranslational reguliert werden (Thompson 2012).

TP53BP1 (tumor protein p53 binding protein 1), moderat reprimiert, konkurriert an DSB mit BRCA1 (siehe unten) und beeinflusst hierbei die Wahl des Reparaturweges zugunsten von NHEJ (Chapman et al. 2012). RAD50 und -51, waren in unterschiedliche Richtungen und dabei auch nur gemäßigt reguliert. RAD50 spielt, als Bestandteil des MRN-Komplexes (bestehend aus MRE11, RAD50, NBS1), eine wichtige Rolle bei der Prozessierung von DSB um sie für die Reparatur via HR vorzubereiten. RAD51 ist eine Rekombinase und für den Einbau des homologen DNA-Strangs während der HR verantwortlich (Chapman et al. 2012). Über die transkriptionelle Regulierung von RAD50 und RAD51 ist wenig bekannt. Arias-Lopez et al. (2006) zeigten allerdings, dass die Genexpression von Rad51 durch Stabilisierung von p53 nach Behandlung mit Gentoxinen vermindert sein kann. BRCA1 und BRCA2 (breast cancer susceptibility gene 1 und 2) sind bekannte Tumorsuppressorgene, die in Brustkrebstumoren häufig mutiert vorliegen. BRCA2 ist essentieller Partner für die Funktion von RAD51 bei der HR (Yoshida und Miki 2004). Wie BRCA2, war auch BRCA1 in beiden Zelllinien durch die Holzrauchbehandlung reprimiert. BRCA1 wird ebenfalls für den korrekten Ablauf der HR benötigt, es übernimmt aber vorrangig regulatorische Funktionen, z.B. reguliert es die Aktivität des MRN-Komplexes und tritt bei der Entscheidungsfindung zwischen NHEJ und HR in Konkurrenz mit 53BP1 und begünstigt so die Einleitung von HR (Chapman et al. 2012). Neben der Interaktion mit Proteinen, fungiert BRCA1 auch als Transkriptionsfaktor, z.B. für GADD45A, welches durch die Holzrauchbehandlung deutlich induziert wurde. Zwar war die BRCA1-Genexpression reprimiert, aber auch hier gilt, dass seine Aktivität posttranslational gesteuert wird, unter anderem mittels Phosphorylierung durch ATM (Christmann und Kaina 2013). Unter den Transkripten der angereicherten GO-Terme befindet sich aber auch eine Reihe von Genen, die zwar indirekt durch DNA-Schädigungen moduliert werden, aber keine hohe Spezifität für diese Signalkaskade haben (ZMAT3, JMY, XIAP, APC, PPP1R15A).

Neben den deutlich angereicherten GO-Termen der allgemeinen DNA-Schadensantwort, ergab die GO-Analyse auch eine weniger signifikante Anreicherung von Genen, die der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) zugeordnet sind. In der Heatmap der am stärksten unterschiedlich exprimierten Transkripte dieses GO-Terms (Abb. 3.19B) befinden sich unter den modulierten Transkripten die ERCC-Proteine (Excision Repair Cross-Complementation Group) 1, 2 und 4. ERCC2 (auch bekannt als XPD) ist eine Helicase, die dafür sorgt, dass die DNA an der Stelle der Schädigung entwunden und für Endonukleasen zugänglich wird. ERCC1 und ERCC4 (XPF) vollziehen bei der NER gemeinsam den Schnitt auf der 5'-Seite des geschädigten DNA-Strangs. Die Neusynthese des entfernten DNA-Abschnittes übernehmen Polymerase  $\delta$  und  $\eta$  (Christmann und Kaina 2013), deren katalyti-

sche Untereinheiten (POLD2, POLE2) ebenfalls zu den stärksten regulierten Transkripten dieses GO-Terms zählen. Das deutlich reprimierte Transkript REV3L, kodiert die katalytische Untereinheit von Polymerase  $\zeta$ , welche dagegen primär für die Transläsions-Synthese bei nicht erfolgter oder nicht möglicher Exzisionsreparatur verantwortlich ist (Wood und Shivji 1997). Von vielen NER-Proteinen ist bekannt, dass sie in Folge verschiedener NER qualifizierender DNA-Schädigungen transkriptionell induziert werden (Christmann und Kaina 2013). Tatsächlich waren die bisher beschriebenen Transkripte auch mehrheitlich durch die Gasphasenkomponenten der Holzverbrennung induziert. Trotzdem ist die Anreicherung dieses GO-Terms ein gutes Beispiel, weshalb einer GO-Anreicherungsanalyse nicht ohne genauere Überprüfung der Ergebnisse vertraut werden sollte, denn die restlichen Transkripte aus Abbildung 3.19B sind schlechte Indikatoren für die NER Aktivität, denn sie spielen nur eine sehr indirekte Rolle (CCNH, SLX4) oder sind besser den zuvor diskutierten Reparaturmechanismen zuzuordnen (NTHL1, OGG1, BRCA2). Transkriptionsprofile sind prinzipiell geeignet um die zelluläre DNA-Schadensantwort zu kategorisieren (Caiment et al. 2014; Peng et al. 2014). Es muss aber auch festgestellt werden, dass die Anreicherung von GO-Termen der DNA-Schadenserkennung und -reparatur durchaus auch auf Transkripten beruht, deren Regulation allein auf transkriptioneller Ebene nicht indikativ für diese Prozesse ist. Da sich unter den unterschiedlich exprimierten Transkripten dennoch einige befinden, deren transkriptionelle Modulation in direktem Zusammenhang mit der Reparatur von Einzel- und Doppelstrangbrüchen steht, kann aber trotzdem davon ausgegangen werden, dass durch die Gasphasenkomponenten des untersuchten Holzraucherosols tatsächlich DNA-Läsionen induziert werden. Um diese Vermutung experimentell zu bestätigen, wurde in Kapitel 3.3.6.1 eine Analyse der DNA-Einzelstrangbruchrate sowie der DSB-Signalkaskade anhand der Phosphorylierung von  $\gamma$ -H2AX durchgeführt.

#### 3.3.5.2. Genexpression der Zellzykluskontrolle

Eine häufige Konsequenz der DNA-Schadenserkennung ist die Arretierung des Zellzyklus. Daher ist es wenig überraschend, dass die GO Analyse auch eine signifikante Anreicherung von Zellzyklus-assoziierten Transkripten ergab (Abb. A8). Unter diesen Transkripten befinden sich die CDK Inhibitoren CDKN3 und CDKN1C. CDKN3, auch bekannt als CIP2 oder KAP, dephosphoryliert und inhibiert die Cyclin abhängige Kinase CDK2, welche den Übergang von G1- in S-Phase steuert (Lee und Yang 2001). CDKN3 war im mRNA-Seq Experiment durch Gasphasenkomponenten induziert, was somit eine Arretierung der Zellen in G1 begünstigen würde. Der durch CDKN1C kodierte Inhibitor p57/Kip2 wurde bereits in Abschnitt 3.3.4 diskutiert, da er zu den wenigen Genen gehört, die in A549 und BEAS-2B Zellen in gegensätzliche Richtungen reguliert war. Eine Induktion der p57/Kip2 Expression führt zu einem G1-Arrest durch Inhibierung mehrerer CDKs (Lee et al. 1995). Mit CDK6 war auch eine CDK, die die Phosphorylierung des Retinoblastomproteins (RB) reguliert, direkt auf Transkriptebene reprimiert (Meyerson und Harlow 1994). RB spielt eine entscheidende Rolle bei der Überwindung des Restriktionspunkts zwischen G1- und S-Phase. Die Regulation dieses Prozesses erfolgt primär posttranslational durch die CDKs (Weinberg 1995), es wurden aber ebenfalls stressinduzierte MikroRNAs entdeckt, die die RB Translation senken und so zu

einer Inhibierung der Zellproliferation führen (Feng et al. 2011; Scarola et al. 2010). Darüber hinaus führte die Gasphasenbehandlung auch zu einer Reprimierung der RB Transkriptmengen selbst. CDC34 (cell division cycle 34), dessen Transkripte durch die Gasphasenbehandlung induziert waren, ist ein Ubiquitin konjugierendes Enzym, das den Abbau des CDK Inhibitors p27/Kip1 bedingt, der wiederum den G1/S-Übergang reguliert (Tsvetkov et al. 1999). Mit APC (anaphase promoting complex) und MAD2L2 (MAD2 related) sind auch Transkripte verändert, die den Vollzug der Mitose regulieren. APC bewerkstelligt dies durch seine Ubiquitin-Ligase Aktivität für Cycline, die abgebaut werden müssen um die M-Phase zu verlassen, MAD2L2 wiederum inhibiert die Wirkung von APC, so dass die gasphasenbedingte Repression von APC und Induktion von MAD2L2 auf einen Arrest in der M-Phase (Pfleger et al. 2001) hinweist. MAD2L2 spielt aber auch eine Rolle bei der Entscheidung zwischen NHEJ und HR bei der DSB-Reparatur (Boersma et al. 2015). Weitere modulierte Transkripte beinhalten z.B. GADD45A, das wie oben beschrieben durch BRCA1 induziert werden kann und die DNA-Schadenserkennung mit der Zellzykluskontrolle und der MAP-Kinase Kaskade verbindet (Zhan 2005), sowie MDM2 und ATM, die eher unspezifisch mit der Zellzykluskontrolle assoziiert sind. Auf eine Verifikation der Beeinflussung der Zellzykluskontrolle mit direkten Methoden, z.B. durch eine Untersuchung der Zellzyklusverteilung mit FACS, wurde verzichtet, da diese während der relativ kurzen Versuchszeit von 4 h kaum zu tragen kommen dürfte. Die veränderten Transkriptlevels dieses GO-Terms können aber als zusätzliches Indiz für das Auftreten von DNA-Schädigungen gewertet werden, da die Regulation des Zellzyklus und der DNA-Reparatur eng miteinander verknüpft ist. Passend zu einer DNA-Schädigung waren auch negative Effekte auf die allgemeine Translation, Transkription und Replikation analysiert worden (Tabelle A.9).

### 3.3.5.3. Expression von MAP-Kinasen assoziierter Gene

Ein weiterer angereicherter Prozess ist die Aktivierung der MAPK-Signalkaskade (Abb. 3.20.) Die prominenteste Funktion der MAPK ist die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren als Antwort auf verschiedene extrazelluläre Signale (Chang und Karin 2001). Der vermutlich am besten untersuchte Transkriptionsfaktor, der durch MAPK reguliert wird, ist AP-1. AP-1 ist ein Heterodimer, das aus verschiedenen Proteinen zusammengesetzt sein kann, darunter Mitglieder der Fos, Jun und ATF Proteinfamilie. Die Aktivität von AP-1 wird durch Phosphorylierung durch MAPK reguliert, als Teil eines positiven Rückkopplungsmechanismus wird aber auch die Genexpression von Fos, Jun und ATF induziert (Karin 1995; Kool et al. 2003; Whitmarsh und Davis 1996). Tatsächlich waren Fos, Jun und ATF kodierende Gentranskripte nach der Holzrauchbehandlung in beiden Zelllinien sehr stark induziert, was klar für eine Aktivierung der MAPK-Signalkaskade spricht. Weitere gut untersuchte Gene, deren transkriptionelle Regulation auf erhöhte MAPK-Aktivität schließen lässt, sind GADD45B (Yoo et al. 2003), DUSP2 und DUSP6 (Owens und Keyse 2007). Für die übrigen modulierten Transkripte, die diesem GO-Term zugeordnet sind, gilt dass ihre transkriptionelle Regulierung weniger prominent mit der Aktivierung der MAPK-Signalkaskade assoziiert ist. Trotz dieser Hinweise auf eine Aktivierung dieser Signalwege kann die Genexpressionsanalyse nicht eine



**Abbildung 3.20.: Detailanalyse der mit der MAP-Kinasenkaskade assoziierten regulierten Gene.** Gezeigt ist die log<sub>2</sub>-fache Genregulation, hervorgerufen durch Behandlung von A549 und BEAS-2B Zellen mit Holzrauch aerosol und -gasphase in Form des Zahlenwerts und einer Farbkodierung. Die Auswahl der Gene basierte auf den am stärksten regulierten Genen aus verschiedenen GO-Termen der MAP-Kinasenkaskade (GO:0000165, GO:0043405, GO:0007257), sowie manueller Selektion klassischer MAP-Kinasen Zielgene (markiert mit „\*“).

Verifizierung der MAPK-Aktivität auf Proteinebene ersetzen. Daher wurde im nächsten Kapitel die Phosphorylierung der MAP Kinasen mittels Western Blot überprüft.

#### 3.3.5.4. Expression von Genen der Apoptose

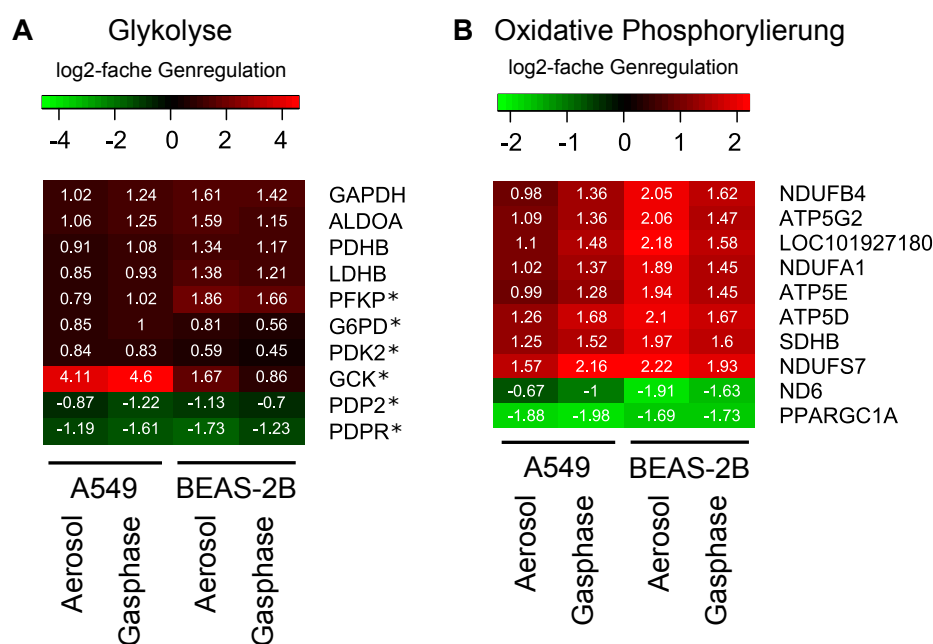
Alle bisher durch die GO-Analyse identifizierten Signalwege stehen in engem Zusammenhang mit der Apoptose, daher ist es wenig überraschend, dass auch GO-Terme dieses Signalweges angereichert waren (Abb. A9). Unter den differentiell regulierten Genen finden sich mehrere Vertreter der BCL-2 Familie. BCL-2 Proteine spielen eine entscheidende Rolle beim intrinsischen Apoptoseweg, bei dem sie die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran regulieren (Youle und Strasser 2008). BAX, BAD, BID und BMF sind Beispiele für pro-apoptotische Gene, die durch die Holzrauchbehandlung induziert waren. BCL2L11 (BIM), ebenfalls pro-apoptotisch, war nach Behandlung aber reprimiert. BCL2A1 hingegen verfügt über anti-apoptotische Aktivität und lag in erhöhten Mengen vor (Youle und Strasser 2008). Die Apoptose inhibierenden Gene XIAP (x-linked inhibitor of apoptosis) und NAIP (neuronal apoptosis inhibitor protein) (Liston et al. 1996) waren herunterreguliert, ebenso wie TIAF1 (TGF-β induced antiapoptotic factor), welches allerdings kon-

textabhängig auch die Apoptose begünstigen kann (Chang et al. 2012). Das durch EPHA7 kodierte Ephrin A7 hat während der Embryonalentwicklung eine caspasenabhängige pro-apoptotische Funktion (Depaepe et al. 2005). Seine Rolle bei der Apoptose nach exogenem Stress ist kaum untersucht, es ist aber eines der am häufigsten mutierten Gene in kleinzelligen Lungentumoren (Peifer et al. 2012). Die Transkripte von GADD45B (Yoo et al. 2003) und die Zytokine IL6, IL24 und CCL2 (MCP-1) waren stark differentiell reguliert und stehen im Zusammenhang mit der Apoptose (Commins et al. 2008; Heinrich et al. 2003; Zhou et al. 2006), sind aber weniger spezifisch für diesen Prozess als z.B. die Proteine der BCL-2 Familie. Insgesamt bestätigt sich bei der Detailbetrachtung der einzelnen Gene aber die Anreicherung dieses GO-Terms. Unter den Gasphasenkomponenten der Buchenholzverbrennung scheinen sich Verbindungen zu befinden, die nach 4 h Begasung im Expositionssystem in beiden getesteten Zelllinien auf Transkriptebene detektierbare apoptotische Vorgänge auslösen. Dass im LDH-Test nach 4 h keine Toxizität der Gasphase festgestellt werden konnte (Abb. 3.13), liegt vermutlich am frühen Zeitpunkt, zu dem die Apoptose vermutlich noch nicht vollzogen wurde. Daher wäre es sinnvoll, in anschließenden Experimenten den weiteren Verlauf der Apoptose genauer zu untersuchen, zum Beispiel über die biochemische Verifizierung von Apoptosemarkern.

### 3.3.5.5. Expression von Genen der Glykolyse und oxidativen Phosphorylierung

Unter den angereicherten GO-Termen befinden sich ebenfalls Teile des Energiestoffwechsels, darunter die Glykolyse und die oxidative Phosphorylierung. Beide sind Teil der primären energetischen Verwertung von Kohlenhydraten (KH), bei der Hexosen glykolytisch in Pyruvat gespalten werden, welches darauf im Citratzyklus (TCA) oxidativ abgebaut wird und die reduzierenden Substrate für die oxidative Phosphorylierung liefert (Vander Heiden et al. 2009). Zellen sind allerdings im Stande, ihren KH-Stoffwechsel zu Gunsten von weniger effizienten Stoffwechselwegen zu ändern, um auf physiologische Änderungen zu reagieren. Ein bekanntes Beispiel ist der sogenannte „Warburg Effekt“, der den gesteigerten anaerobischen Umsatz von Pyruvat zu Laktat bezeichnet, wodurch Krebszellen eine schnellere Proliferation ermöglicht wird (Vander Heiden et al. 2009). Auch transienter Stress kann die Umstellung des KH-Stoffwechsels bewirken. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass nach DNA-Schädigung Glucose vermehrt über den Pentosephosphatweg (PPP) metabolisiert wird, wodurch die Grundbausteine für die Nukleotidsynthese bereitgestellt werden (Cosentino et al. 2011).

Auch die Behandlung mit dem Holzraucheraerosol scheint eine Umstellung des Glucosemetabolismus zu bewirken, denn es waren mehrere Transkripte von Enzymen, die die Glykolyse regulieren, induziert (Abb. 3.21A). GCK kodiert Glucokinase, eine der Hexokinasen, die die Phosphorylierung von Glucose zu Glucose-6-Phosphat (G6P) katalysieren und gehört zu den wenigen Transkripten, die in A549 deutlich stärker reguliert waren als in BEAS-2B Zellen (Abb. 3.17B). In Leber- und Pankreaszellen ist die Genexpression von GCK an den Glucosestatus gekoppelt (Lenzen 2014). G6P kann sowohl über die Glykolyse, als auch über den PPP metabolisiert werden. Die erste Reaktion des PPP wird durch G6P-Dehydrogenase katalysiert, deren Transkript G6PD induziert vorlag. Der



**Abbildung 3.21.: Detailanalyse regulierter Gene aus dem Energiestoffwechsel.** Gezeigt ist die log<sub>2</sub>-fache Genregulierung, hervorgerufen durch Behandlung von A549 und BEAS-2B Zellen mit Holzrauchaerosol und -gasphase in Form des Zahlenwertes und einer Farbkodierung. Die Auswahl der Gene basierte auf den stärksten regulierten Genen des GO-Terms „Glykolyse“ (GO:0006096), ergänzt durch manuelle Selektion (markiert mit „\*“) (A) bzw. von GO-Termen der oxidativen Phosphorylierung und Atmungskette (GO:0006119, GO:0022904) (B).

PPP kann durch aktiviertes ATM in Folge von DNA-Schädigung begünstigt werden (Cosentino et al. 2011). Darüber hinaus bietet der PPP auch eine schnelle Möglichkeit NADPH zu bilden, welches ein limitierendes Substrat bei der Synthese anti-oxidativ wirksamer Substanzen, wie z.B. GSH ist (Riganti et al. 2012). Um G6P hingegen der Glykolyse zuzuführen wird es zunächst in Fructose-6-Phosphat konvertiert. Der darauffolgende Schritt, die Bildung von Fructose-1,6-biphosphat ist irreversibel und bedingt zwingend den glykolytischen Abbau. PFKP, eine Isoform der Phosphofruktokinase, katalysiert diese Reaktion und war durch die Holzrauchbehandlung induziert, genauso wie Transkripte von Genen der nachfolgenden Glykolysereaktionen: ALDOA, GAPDH, PDHB und LDHB. ALDOA (Aldolase A) spaltet Fructose-1,6-biphosphat in zwei Triosen und ist z.B. durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  induzierbar (Semenza et al. 1994). GAPDH (Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase) ist ein für Protein- und Genexpressionsanalysen häufig als Housekeeping-Gen verwendetes Enzym. Tatsächlich kann GAPDH aber durch Transkriptionsfaktoren wie p53, HIF-1 $\alpha$  und AP-1 induziert werden, was die Induzierung dieses Transkripts nach der Behandlung mit dem Holzrauchaerosol erklären könnte (Colell et al. 2009). PDHB und LDHB kodieren Untereinheiten der Pyruvat- und Laktatdehydrogenase, die den Eintrag von Pyruvat in den TCA, respektive den anaeroben Abbau von Pyruvat, katalysieren. Im Gegensatz zur Induzierung von PDHB, steht die Reprimierung von Untereinheiten der Pyruvatdehydrogenasephosphatase (PDP2, PDPR), deren Phosphataseaktivität aktivierend auf PDH wirkt (Sugden und Holness 2006). Insgesamt weist die Genexpression der mit der Glykolyse-assozierten Gene auf einen gesteigerten Glucosemeta-



bolismus hin, der durch eine erhöhte Verwertung im PPP und möglicherweise durch erhöhten anaeroben oder oxidativen Pyruvatabbau gekennzeichnet ist.

Die oxidative Phosphorylierung ist unter anderem von toxikologischer Relevanz, da sie die Hauptquelle physiologisch generierter ROS darstellt (Ott et al. 2007). Über den Zusammenhang zwischen einer zellulären Stressantwort und der transkriptionellen Regulation der oxidativen Phosphorylierung ist wenig bekannt. Die Behandlung von A549 und BEAS-2B Zellen mit dem Holzrauch aerosol führte aber zu einer Veränderung von einigen Transkripten mit hoher Spezifität für die oxidative Phosphorylierung. NDUFB4, NDUFA1, NDUFS7 und ND6 kodieren Untereinheiten von Komplex I (NADH Dehydrogenase), die bis auf ND6 alle durch die Behandlung stärker exprimiert waren. Auch Transkripte von Komplex II (SDHB) und V (ATP5G2, ATP5E, ATP5D) waren induziert. PPARGC1A (PGC-1 $\alpha$ ) ist ein Koaktivator verschiedener Transkriptionsfaktoren der Energiehomöostase und induziert auf diese Weise die Expression von Enzymen der oxidativen Phosphorylierung (Lin et al. 2005). PGC-1 $\alpha$  war nach der Holzrauchbehandlung allerdings reprimiert. Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass die Anreicherung der GO-Terme der Glykolyse und oxidativen Phosphorylierung beide auf der differentiellen Regulierung von weitgehend spezifischen Genen dieser Prozesse beruhen. Die Enzyme des Stoffwechsels werden aber auch stark allosterisch reguliert und die Transkriptmengen allein sind nicht indikativ für die Enzymaktivität (Kuile und Westerhoff 2001). Um zu überprüfen ob und wie sich die Änderungen auf Transkriptebene in einer Änderung der metabolischen Flüsse äußern, wurde im nächsten Kapitel eine Quantifizierung der Metaboliten des KH-Stoffwechsels mittels GC-MS durchgeführt).

#### **3.3.5.6. Die Holzrauchbehandlung induziert Gensignaturen der epithelialen-mesenchymalen-Transition**

Unabhängig von den angereicherten Termen der GO-Analyse wurde bei manueller Betrachtung der Liste mit den am stärksten regulierten Transkripten (Tabelle A.7 und A.8) festgestellt, dass dort Markergene für die epitheliale-mesenchymale-Transition (EMT) zu finden sind. EMT bezeichnet die Veränderung von Epithelzellen hin zu Zellen mit mesenchymalem Charakter, das heißt der Verlust des Kontakts zu Nachbarzellen, der apikalen und basalen Polarität sowie der Zunahme der Zellmotilität (Willis und Borok 2007). EMT ist von pathophysiologischem Interesse, weil sie zur Tumormetastasierung und der Entstehung von Fibrose beiträgt (Kim et al. 2006; Willis und Borok 2007). Abbildung 3.22 zeigt die differentielle Regulation verschiedener mit EMT assoziierter Transkripte. Besonders auffallend ist die starke Induzierung von SNAI1 (Snail), einer der zentralen Transkriptionsfaktoren der EMT, dessen Überexpression *in vitro* bereits ausreichend sein kann um die EMT auszulösen (Cano et al. 2000; Thiery und Sleeman 2006). Der SNAI1 Inhibitor GSK3B (Glycogen synthase kinase 3 beta) (Thiery und Sleeman 2006) war in den Versuchen reprimiert, was zusätzlich für die Induzierung von EMT Genen nach Holzrauchbehandlung spricht. Ebenfalls waren die mesenchymalen Marker VIM (Vimentin) und CTGF (connective tissue growth factor) in beiden Zelllinien erhöht, während die epithelialen Marker TJP1 (Tight junction protein 1, auch bekannt als Zonula occludens-1) und DSP (Desmoplakin) reprimiert waren (Thiery und Sleeman



**Abbildung 3.22.:** Das Holzverbrennungsaerosol induziert Markergene der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT). Gezeigt ist die log2-fache Genregulierung, hervorgerufen durch 4 h Behandlung von A549 und BEAS-2B Zellen mit Holzrauchaerosol und -gasphase in Form des Zahlenwerts und einer Farbkodierung. Die abgebildeten Gene wurden manuell ausgewählt.

2006; Willis und Borok 2007). Die Induktion mehrerer Vertreter der HES und HEY Proteinfamilie zeigt eine Aktivierung des NOTCH Signalwegs an, ein weiteres EMT Charakteristikum (Espinoza und Miele 2013). Mit ZEB2 wurde durch die Behandlung allerdings auch ein EMT Faktor durch die Behandlung reprimiert (Vandewalle et al. 2005). Insgesamt überzeugt die Genexpressionsanalyse von einer EMT begünstigenden Aktivität der Gasphasenkomponenten aus der Holzverbrennung. EMT wurde in den vergangenen Jahren *in vitro* mehrfach mit Zigarettenrauchextrakt assoziiert (Hu et al. 2009; Shaykhiev et al. 2011; Veljkovic et al. 2011; Zhang et al. 2012) und konnte auch durch Holzrauch, nach chronischer Exposition von Ratten, bereits festgestellt werden. Die Ergebnisse unterstreichen die Relevanz von Verbrennungsprodukten bei der Entstehung von Fibrose und Tumormetastasen. Aus diesem Grund sollten die Ursachen von EMT begünstigenden Effekten von Holzrauch genauer untersucht werden, was allerdings nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit war.

### 3.3.6. Verifizierung ausgewählter Wirkmechanismen

Die Detailanalyse einzelner Gene der mRNA-Sequenzierung bestätigte die Ergebnisse der GO-Term Analyse. Trotzdem reicht die Kenntnis der Genexpression oftmals nicht aus, um Rückschlüsse auf die tatsächliche biologische Konsequenz zu ziehen. Zum Beispiel ist der kinetische und quantitative Zusammenhang zwischen Genexpression und Proteinaktivität oft unklar und für viele Prozesse sind posttranslationale Modifizierungen ausschlaggebender als die transkriptionelle Regulierung. Aus diesen Gründen wurde als nächstes überprüft, ob verschiedene, auf Transkriptionsebene beeinträchtigte, zelluläre Prozesse sich auf anderen biologischen Ebenen bestätigen lassen.

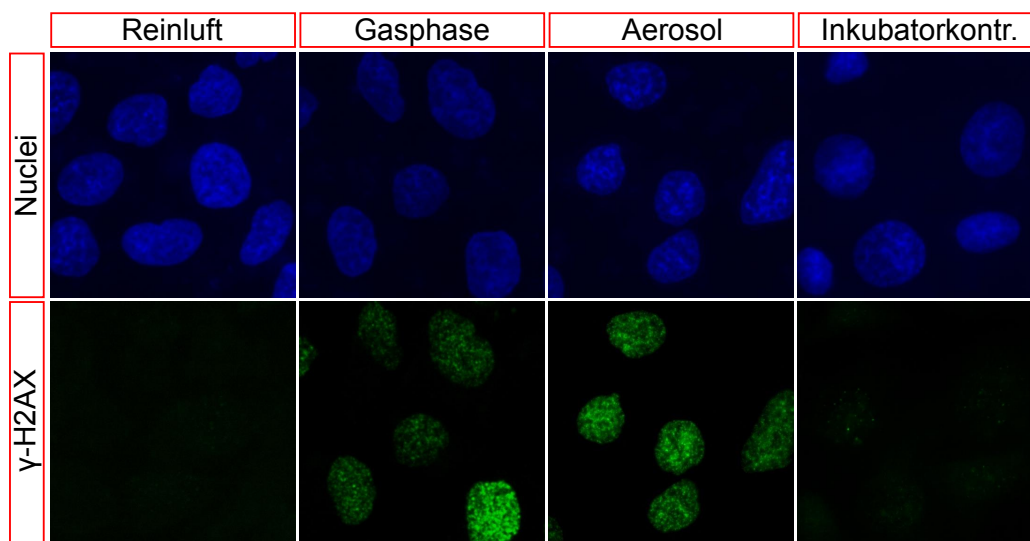
#### 3.3.6.1. Gentoxische Wirkung des Holzraucherosols

Die mRNA-Sequenzierungsanalyse identifizierte eine Reihe von differentiell regulierten Genen der DNA-Schadensantwort und auch die veränderten Gene der anderen angereicherten GO-Terme sprechen für eine gentoxische Wirkung des Holzraucherosols. Da sowohl Gene der DSB-Reparatur als auch der SSB-Reparatur betroffen waren, wurden beide Typen von DNA-Schäden mittels spezifischeren Assays untersucht. Die Signaltransduktion der DSB-Erkennung wurde anhand der Phosphorylierung des Histonproteins H2AX ( $\gamma$ -H2AX) auf Proteinebene untersucht. Die Häufigkeit von SSB wurde mittels alkalischer Entwindung auf DNA-Ebene verifiziert. Die meisten in diesem Abschnitt vorgestellten Ergebnisse beruhen auf den Arbeiten von Larissa Ramme, die ihre Diplomarbeit in gemeinsamer Betreuung durch Elena Maser aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andrea Hartwig und mir angefertigt hat.

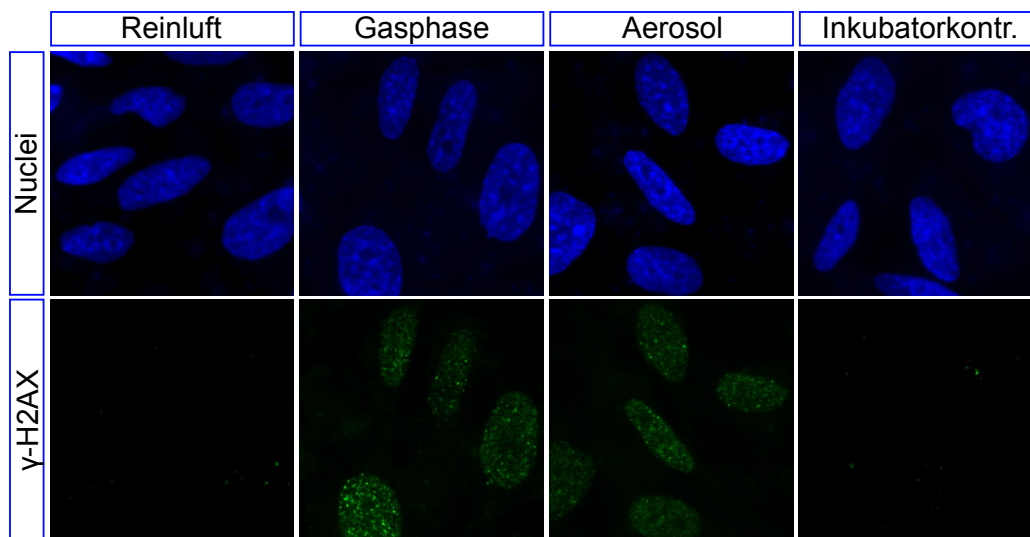
#### Phosphorylierung von H2AX

Die Phosphorylierung des Histons 2AX (H2AX) ist ein häufig verwendeter Marker für DSB. H2AX wird klassisch durch die Kinasen ATM, ATR und DNA-PK (DNA-abhängige Proteinkinase) in Folge von erkannten DSB phosphoryliert. Binnen weniger Minuten werden dabei für jeden DSB hunderte bis tausende H2AX in Nachbarschaft des DSB phosphoryliert, die mit Antikörpern als fokales Signal detektiert werden können (Kuo und Yang 2008; Rogakou et al. 1998). Neben DSB kann  $\gamma$ -H2AX aber auch bei der Reparatur von Einzelstrangläsionen und bei behinderten Replikationsgabeln, zum Beispiel durch DNA-Protein Verknüpfungen, induziert werden (Kinner et al. 2008; Nakano et al. 2009; Zeman und Cimprich 2014). Die Bildung von  $\gamma$ -H2AX Foci in Folge der Behandlung mit Holzraucherosol im Expositionssystem wurde in A549 und BEAS-2B Zellen mikroskopisch mittels der Immunfluoreszenz untersucht. In A549 Zellen führte die vierstündige Behandlung mit dem verdünnten Holzrauch zu einer stark erhöhten Phosphorylierung von H2AX (Abb. 3.23).

Zwischen der Gasphase und dem kompletten Aerosol war kein Unterschied zu erkennen, weshalb für diese Wirkung Komponenten der Gasphase ausschlaggebend sein müssen. Die meisten Zellen mit Kontakt zu den Verbrennungsgasen wiesen deutliche fokale  $\gamma$ -H2AX Signale auf. Allerdings waren in manchen Zellen, die sich möglicherweise in der S-Phase befanden (Marti et al. 2006), erheblich mehr  $\gamma$ -H2AX Foci zu sehen als im Mittel aller Zellen. In Zellen die im ALI-System mit Reinluft begast worden sind, oder während der Expositionszeit im Inkubator verblieben (Inkubator-

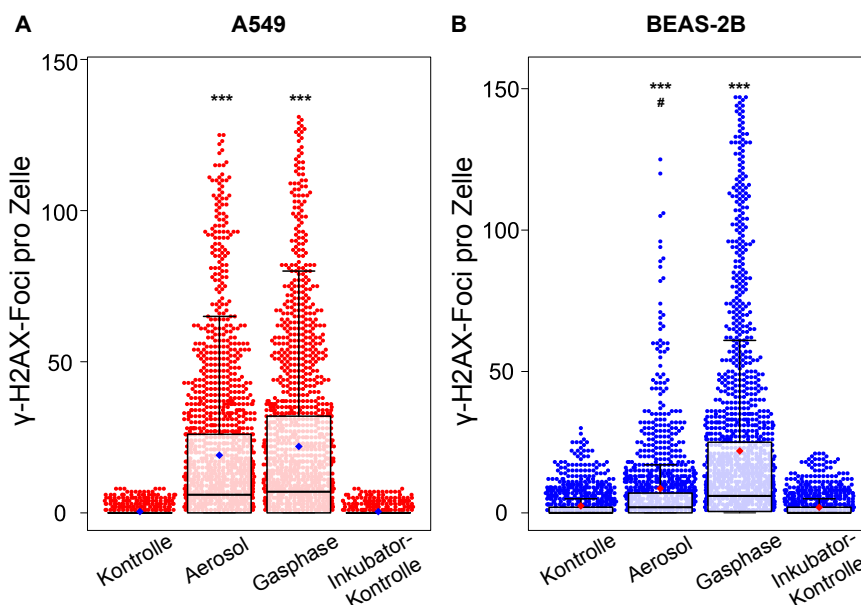


**Abbildung 3.23.: Repräsentative Aufnahmen der H2AX-Phosphorylierung in A549 Zellen nach Behandlung mit Holzrauchaerosol.** A549 wurden 4 h mit Reinluft, komplettem Holzverbrennungsaerosol (Aerosol) und partikelgefiltertem Aerosol (Gasphase) behandelt, zusätzlich wurden Zellen untersucht, die während dieser Zeit im Inkubator verblieben (Inkubatorkontrolle). Gezeigt sind repräsentative Ausschnitte der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen für die quantitative  $\gamma$ -H2AX Foci Analyse in Abb. 3.25A. Dieser Versuch wurde, als Teil ihrer Diplomarbeit, von Larissa Ramme durchgeführt.



**Abbildung 3.24.: Repräsentative Aufnahmen der H2AX-Phosphorylierung in BEAS-2B Zellen nach Behandlung mit Holzrauchaerosol.** BEAS-2B Zellen wurden 4 h mit Reinluft, komplettem Holzverbrennungsaerosol (Aerosol) und partikelgefiltertem Aerosol (Gasphase) behandelt, zusätzlich wurden Zellen untersucht, die während dieser Zeit im Inkubator verblieben (Inkubatorkontrolle). Gezeigt sind repräsentative Ausschnitte der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen für die quantitative  $\gamma$ -H2AX Foci Analyse in Abb. 3.25B. Dieser Versuch wurde, als Teil ihrer Diplomarbeit, von Larissa Ramme durchgeführt.

kontrolle), treten nur vereinzelt Zellen mit einem fokalen  $\gamma$ -H2AX Signal auf. Die Behandlung der BEAS-2B Zellen führte zum gleichen Ergebnis. Allerdings scheinen die Foci etwas schwächer und stärker abgegrenzt, als in den A549 Zellen (Abb. 3.24). Die  $\gamma$ -H2AX Foci wurden mit einer Analyse-Software für die Hochdurchsatzmikroskopie (ScanR, Olympus) quantifiziert (für eine Erklärung der automatischen Analyse siehe Abbildung A1 und Abschnitt 2.6.1).



**Abbildung 3.25.: Flüchtige Verbindungen aus der Holzverbrennung führen zu starker H2AX-Phosphorylierung.** A549 und BEAS-2B Zellen wurden 4 h mit Reinluft, komplettem Holzverbrennungsaerosol (Aerosol) und partikelgefiltertem Aerosol (Gasphase) behandelt, zusätzlich wurden Zellen untersucht, die während dieser Zeit im Inkubator verblieben (Inkubator-Kontrolle). Danach wurde mittels Immunfluoreszenz softwaregestützt die Anzahl der  $\gamma$ -H2AX Foci quantifiziert. Abgebildet sind die kumulativen  $\gamma$ -H2AX Foci pro Zelle aus 3 (A549 Inkubator-Kontrolle: 2) unabhängigen Versuchen mit je 2 Transwell-Replikaten. Je Replikat wurden mindestens 20 Bilder von unterschiedlichen Stellen der Transwellmembran aufgenommen. Insgesamt wurden mindestens 1300 Zellen je Bedingung analysiert. Aus Gründen der Darstellbarkeit wurden pro Bedingung maximal 25 Zellen je Y-Achsen-einheit abgebildet und Werte über dem 99% Quantil supprimiert. Die Boxplots zeigen den Mittelwert (farbige Raute), Median (dicke Linie), das 1. bis 3. Quartil (Box) und den entsprechenden 1.5-fachen IQR (Whisker). Signifikante Erhöhungen zur Reinluftkontrolle gekennzeichnet mit \*\*\* =  $p < 0.001$  nach Kruskal-Wallis mit Dunn's post-hoc Test.

In Abbildung 3.25 sind für jede untersuchte Bedingung die gezählten Foci pro Zelle abgebildet. Wie bereits in den exemplarischen Aufnahmen zu erkennen war, führte die Behandlung von A549 Zellen zu einer deutlichen Zunahme der  $\gamma$ -H2AX Foci (Abb. 3.25A). Zwischen der Behandlung mit dem kompletten Aerosol und der Gasphase gab es keine signifikanten Unterschiede, beide Bedingungen führten durchschnittlich zu rund 20 Foci pro Zelle. Der Median lag mit knapp unter 10 Foci pro Zelle deutlich darunter. Dies bedeutet, dass viele Zellen mit außergewöhnlich hoher Foci Häufigkeit detektiert wurden. In den Kontrollzellen im ALI-System und Inkubator wurden nur sehr wenige Zellen mit Foci detektiert, der Mittelwert und Median lag nahe bzw. bei null. Dass sich die beiden Kontrollen nicht unterscheiden ist ein wichtiges Ergebnis, denn es bedeutet, dass der Expositionsprozess im ALI-System per sé zu keiner höheren Aktivierung des

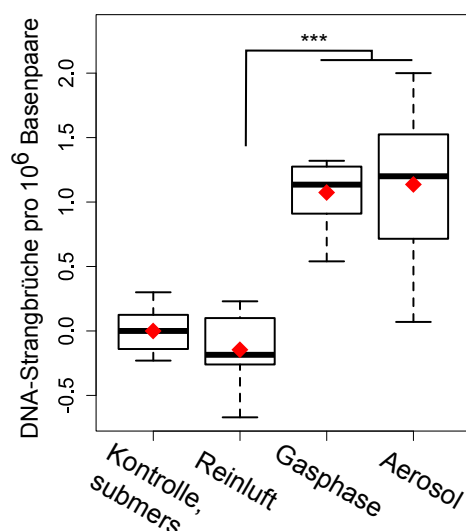
Signalweges führt, als in Zellen die unter ALI-Bedingungen im Zellkulturlabor verbleiben. Die Anzahl gebildeter  $\gamma$ -H2AX Foci in BEAS-2B Zellen nach Behandlung mit der Gasphase unterschied sich nicht vom Ergebnis der Untersuchung mit A549 Zellen (Abb. 3.25B). Interessanterweise wurden in aerosolbehandelten BEAS-2B Zellen aber reproduzierbar weniger Foci detektiert. Möglicherweise bewirkt die zusätzliche Exposition gegenüber Partikeln in BEAS-2B eine Beeinträchtigung der  $\gamma$ -H2AX Signalkaskade. Die Kontrollen der BEAS-2B Zellen unterschieden sich nicht voneinander, die Anzahl der detektierten Foci lag aber geringfügig über den Kontrollbehandlungen in A549 Zellen.

Diese Ergebnisse wurden im Western Blot bestätigt (Abb. A10). Auch hier führten die Verbrennungsgase, unabhängig von der partikulären Phase, in beiden Zelllinien zu einer Induktion von  $\gamma$ -H2AX. Im Gegensatz zur mikroskopischen Auswertung mit Quantifizierung der Foci ist aber bereits in Kontrollzellen ein klar detektierbares  $\gamma$ -H2AX Signal vorhanden. Dieses Hintergrundsignal kommt bei einer Zählung diskreter Foci nicht zum Tragen, weshalb die mikroskopische Untersuchung mit Quantifizierung der Foci die sensitivere Methode darstellt. Im Vergleich zur häufig angewandten visuellen Analyse der Mikroskopbilder, wirkt sich die softwaregestützte Bildanalyse zusätzlich positiv auf die Qualität der Daten aus. So kann eine erheblich höhere Anzahl an Zellen analysiert werden, was eine bessere statistische Grundlage bildet und eine subjektive Auswahl der analysierten Zellen vermeidet. Ebenso erfolgt die Erkennung der Foci nach reproduzierbaren und objektiven Kriterien und Schwellenwerten. Letztere können aber auch dazu führen, dass relativ geringe Änderungen der Foci-Charakteristika, wie Größe oder Intensität in der Nähe der Schwellenwerte zu deutlicheren Unterschieden im Analysenergebnis führen. Der Unterschied zwischen Aerosol und Gasphasenbehandlung in BEAS-2B Zellen scheint beispielsweise mit dem Auge weniger prägnant als mit der Bildanalyse durch die Software. Die Induktion von  $\gamma$ -H2AX durch die Verbrennungsgase war in beiden Zelllinien höchst signifikant und fiel überraschend stark aus. Die Ausbildung der  $\gamma$ -H2AX Foci war dabei vergleichbar mit einer Behandlung der Zellen mit 20  $\mu$ M Etoposid, einem Zytostatikum, das durch Inhibierung von Topoisomerase II zu DSB führt (Wu et al. 2011) (Abb. A11). Die Phosphorylierung von H2AX wurde ebenfalls nach 20-stündiger Nachinkubation untersucht. Interessanterweise war das  $\gamma$ -H2AX Signal selbst zu diesem Zeitpunkt unverändert stark (Abb. A12). Werden Zellen hingegen ionisierender Strahlung ausgesetzt um DSB zu induzieren, geht die Zahl der  $\gamma$ -H2AX Foci während dieses Zeitraums nahezu auf das Niveau der Kontrolle zurück (Banath 2004). Noxen, die stattdessen indirekt zu DSB führen können, zeigen eine andere Kinetik. Cisplatin und UV-C induzierte  $\gamma$ -H2AX Foci persistieren zum Beispiel noch lange nach Ende der Behandlung (Marti et al. 2006; Olive und Banath 2009). Diese Noxen führen zu DNA-Strangverknüpfungen, die bei Replikation in einem Zusammenbruch der Replikationsgabel, und somit in der Bildung von DSB, resultieren (Kaina 2003). Auch viele weitere Arten von Gentoxinen, wie alkylierende Substanzen, ROS oder DNA-Adduktbildner, können auf diese Weise replikationsabhängig zu DSB führen (Kaina 2003). Bei der Holzverbrennung entstehen PAKs, die nach metabolischer Aktivierung DNA-Addukte bilden können und deshalb für die beobachteten Effekte in Frage kommen. Die PAKs liegen aufgrund ihrer niedrigen Volatilität

allerdings fast ausschließlich partikelgebunden vor, können eine gasphasenvermittelte  $\gamma$ -H2AX Induktion daher nicht erklären. Aber auch volatile Aromaten, wie zum Beispiel Benzol, sind im Stande DNA-Addukte zu bilden und werden bei der Verbrennung gebildet. Auch Benzol benötigt eine metabolische Aktivierung zur Bildung von DNA-Addukten, weshalb auch hier fraglich ist, ob es ein guter Kandidat für die bereits nach 4 h sehr starken Effekte ist. Dass nach 4 h bereits der überwiegende Teil der untersuchten Zellen Foci aufwies (Abb. 3.23), spricht ferner dafür, dass es sich nicht ausschließlich um eine replikationsabhängige Schadensantwort handeln kann.

Marti et al. (2006) beobachteten nach UV-C Bestrahlung ebenfalls eine H2AX Phosphorylierung in G1-Phase Zellen und konnten zeigen, dass diese von den NER Reparaturfaktoren XPA und XPC abhängig ist. Auch für hohe Konzentrationen alkylierender Substanzen wurde bereits eine replikationsunabhängige H2AX Phosphorylierung beobachtet (Staszewski et al. 2008).

Das Tumorsuppressorprotein p53 ist ein zentraler Regulator der zellulären Stressantwort, speziell nach DNA-Schädigung. p53 hat unter normalen Bedingungen eine kurze Halbwertszeit, wird nach Stressinduktion aber durch posttranslationale Modifikationen stabilisiert und aktiviert. ATM und ATR phosphorylieren p53 nach DNA-Schäden, können zur p53 Stabilisierung aber auch durch Inhibition seines negativen Regulators MDM2 beitragen (Khosravi et al. 1999). Die Transkriptmenge von MDM2 war nach der Gasphasenbehandlung stark reprimiert (Abb. A8). Aus diesen Gründen wurden die Proteingehalte von p53 im Western Blot untersucht. Nach der vierstündigen Holzrauchbehandlung konnte aber in beiden Zelllinien keine Stabilisierung von p53 nachgewiesen werden (Abb. A13). Zur Beurteilung dieses Ergebnisses muss die Funktionalität des p53 Signalweges berücksichtigt werden, da tumorogene Zelllinien oft nicht über funktionales p53 verfügen. A549 Zellen gelten allerdings als p53 profizient (Lu et al. 2001). BEAS-2B sind keine Krebszellen und verfügen prinzipiell über funktionales p53. Die Transformation mit dem SV-40 Virus führt allerdings zu einem Verlust der p53 Funktion, da das große SV-40 T Antigen die DNA bindende Sequenz von p53 blockiert (Gazdar et al. 2002; Lehman et al. 1993). Diese Interaktion führt aber nicht nur zu einem Defekt der p53-abhängigen Genregulation, sondern auch zu einer erhöhten p53 Stabilität, weshalb die p53 Stabilisierung in SV-40 transformierten Zellen nach Behandlung mit Genotoxinen weniger stark ausfällt (Tibbetts et al. 1999). Das Ausbleiben einer Stabilisierung von p53 in beiden Zelllinien deutet somit auf einen p53-unabhängigen Wirkmechanismus des Holzrauchs hin. Aufgrund der vielen Substanzen, die in der Gasphase des Holzverbrennungsaerosoles vorhanden sind, ist es kaum möglich Kandidaten zu identifizieren, die die H2AX Phosphorylierung bedingen. Die bereits nach 4 h feststellbare starke  $\gamma$ -H2AX Bildung in den meisten Zellen spricht aber für eine Beteiligung eines replikationsunabhängigen Mechanismus. Zur weiteren Einschränkung der möglichen Gasphasenkomponenten wurde eine systembiologische Analyse, basierend auf dem Wirkprofil aus der mRNA-Seq Analyse durchgeführt, die im nächsten Kapitel beschrieben wird (S. 61).



**Abbildung 3.26.: Die Behandlung mit der Gasphase aus der Holzverbrennung führt zu einer erhöhten DNA-Strangbruchrate in A549 Zellen.** A549 Zellen wurden 4 h mit Reinluft, komplettem Holzverbrennungsaerosol (Aerosol) und partikelgefiltertem Aerosol (Gasphase) behandelt. Nach alkalischer Entwindung wurde der relative Anteil doppelsträngiger DNA ermittelt und mittels einer externen Kalibrierung die DNA-Strangbruchrate pro  $10^6$  Basenpaare berechnet. Abgebildet ist der Mittelwert (rote Raute), Median (dicke Linie), das 1. bis 3. Quartil (Box) und der entsprechende 1.5-fache IQR. Statistisch signifikant unterschiedlich zu Reinluftkontrolle mit \*\*\* =  $p < 0.001$  (Tukey's HSD post-hoc Test für ANOVA). Dieser Versuch wurde, als Teil ihrer Diplomarbeit, von Larissa Ramme durchgeführt.

### Bildung von DNA Einzelstrangbrüchen

Die Bildung von DNA-Einzelstrangbrüchen wurde mit der Methode der alkalischen Entwindung durchgeführt (Hartwig 1996). Auch diese Analyse bestätigte die DNA-schädigende Wirkung von Holzrauch (Abb. 3.26). Die Behandlung mit dem Holzrauchaerosol erhöht die Einzelstrangbruchrate gegenüber der Kontrolle um knapp 1.1 bis 1.2 Brüche pro  $10^6$  Basenpaare. Wieder wurde kein Unterschied zwischen dem kompletten Aerosol und der partikelgefilterten Gasphase festgestellt, die Einzelstrangbrüche werden also ebenfalls durch Gasphasenkomponenten induziert. Auch zwischen den Reinluftkontrollen im ALI-System und den Kontrollen im Inkubator bestand kein signifikanter Unterschied, was bedeutet, dass das ALI-Expositionsverfahren selbst nicht zu einer erhöhten SSB-Rate führt. Die DNA schädigende Wirkung von Holzverbrennungsemissionen wurde bisher nur in Submersstudien mit gesammelten Partikeln untersucht. Dabei konnte die Induktion von Strangbrüchen und oxidativen Basenschäden gezeigt werden, was sich gut durch die in Kapitel 3.1 untersuchten toxischen Komponenten der Partikelfraktion erklären lässt. Tatsächlich scheint bei einer Holzverbrennung aber die Gasphase bereits eine so starke gentoxische Wirkung aufzuweisen, dass der Effekt der Partikel vernachlässigbar ist. Untersuchungen, die zwischen der gentoxischen Wirkung von Gas und Partikelphase differenzierten, wurden bisher nicht veröffentlicht. Durch das am besten untersuchte Verbrennungsaerosol, Zigarettenrauch, ist aber experimentell belegt, dass Aerosole aus der Biomasseverbrennung im Stande sind, *in vitro* DNA-Schäden hervorzurufen (Thorne et al. 2009).

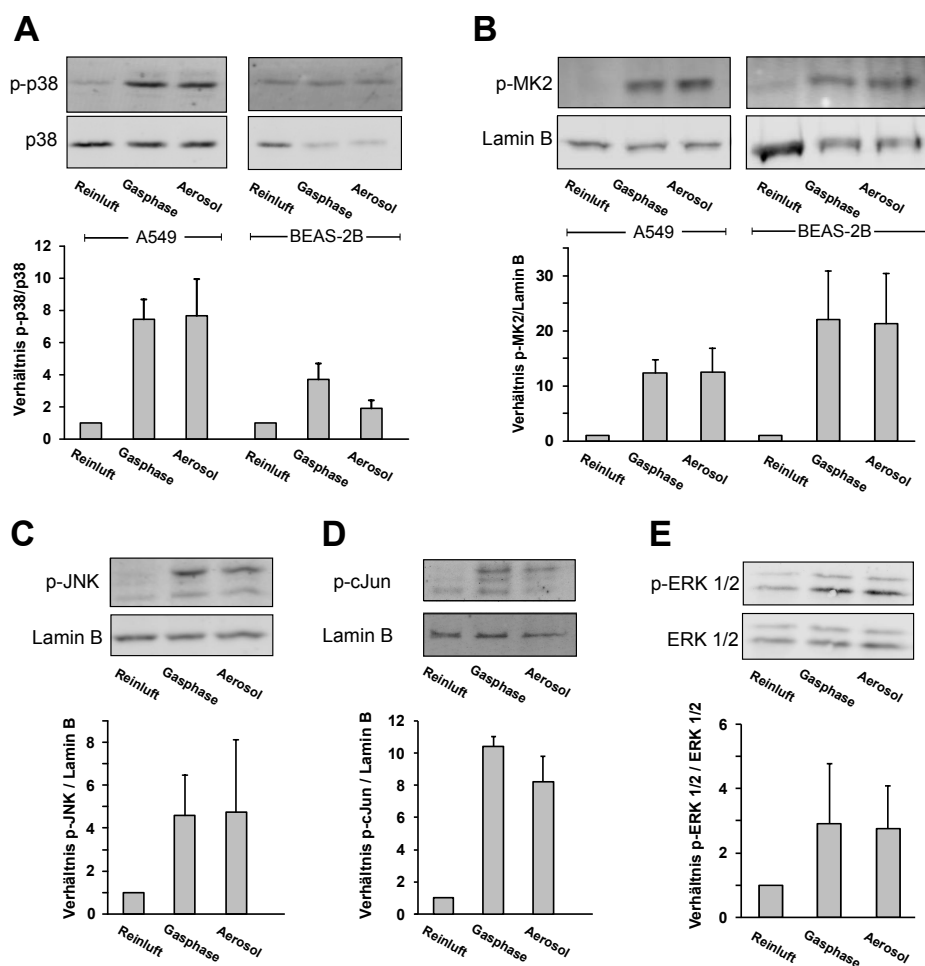


Die alkalische Entwindung detektiert prinzipiell sowohl SSB als auch DSB, da aber bereits das zelluläre SSB Grundlevel die induzierbaren DSB-Raten deutlich übersteigt (Vilenchik und Knudson 2003), kann davon ausgegangen werden, dass der Beitrag der DSB zum Analyseergebnis vernachlässigbar ist und die erhöhte Strangbruchrate auf SSB zurückzuführen ist. Obwohl die  $\gamma$ -H2AX Analyse primär zur Analyse von DSB verwendet wird, könnten aber auch Noxen, die letztlich SSB induzieren, die  $\gamma$ -H2AX Signaltransduktion erklären (siehe S. 83). Die möglichen Kandidaten für die SSB-Induktion werden zusammen mit den Ergebnissen der systembiologischen Analyse erörtert.

### 3.3.6.2. Volatile Bestandteile des Holzraucheraerosols aktivieren die MAP Kinasekaskade

Die mRNA-Seq Analyse identifizierte mehrere induzierte Zielgene der MAP Kinasen (MAPK). Um die Aktivierung dieser Signalkaskade auf Proteinebene zu verifizieren, wurde die Phosphorylierung der MAPK p38, JNK1/2 und ERK1/2 im Western Blot überprüft. Die Phosphorylierung von p38 und MK2, einem Substrat von p38, war in A549 und BEAS-2B Zellen gasphasenbedingt erhöht (Abb. 3.27A,B). In A549 Zellen war dieser Effekt deutlicher feststellbar als in BEAS-2B Zellen. Dort wird die Interpretation des p-p38 Signals aufgrund einer Abnahme der p38 Proteinmenge, die als Ladekontrolle dient, erschwert. In der Quantifizierung der Westernblot Ergebnisse wurde das Signal des Zielproteins auf das Signal der Ladekontrolle normiert, weshalb trotz des absolut etwa gleichbleibenden p-p38 Signals in BEAS-2B, auch hier die Behandlung zu einer relativen Erhöhung von p-p38 führte. Auch Lamin B, dessen Detektion als Ladekontrolle bei der Überprüfung von p-MK2 diente, war in behandelten Zellen erniedrigt, hier ist die Erhöhung des p-MK2 Gehaltes aber trotzdem noch direkt bei Betrachtung des p-MK2 Signals ersichtlich. PCNA, ein weiteres Referenzprotein, nahm in BEAS-2B Lysaten nach Quantifizierung geringfügig ab. Für die Western Blot Analysen wurden stets gleiche Probenvolumina aufgetragen, weshalb die Abnahme der Ladekontrollen für eine niedrigere Proteinkonzentration in den Zelllysaten spricht. Ein möglicher Grund hierfür könnte ein Proteinverlust aufgrund von Zelltod zum Zeitpunkt der Zellyse sein. Die Bestimmung der Zytotoxizität nach 4 h Behandlung ergab bei Überprüfung der BEAS-2B Zellen allerdings nur eine vernachlässigbare Toxizität (Abb. 3.13). Die transkriptionellen Veränderungen der Translationsregulierung könnten bedeuten, dass ein Translationsblock vorliegt. Ob dieser die Abnahme des Proteingehaltes nach bereits 4 h erklären kann, muss in zusätzlichen Untersuchungen überprüft werden. Theoretisch könnte es sich hierbei auch um spezifische Effekte auf die Gehalte von p38, Lamin B und PCNA handeln. Aus diesen Gründen konnte letztlich nicht geklärt werden, wie es zur Abnahme dieser Proteine in den BEAS-2B Zelllysaten kam.

Die Aktivierung von JNK1/2, dessen Substrat c-Jun, sowie ERK1/2 wurde nur in A549 Zellen überprüft. Auch hier war an in allen Fällen eine durch die Gasphasenkomponenten bedingte Aktivierung detektierbar, die für JNK stärker ausfiel als für ERK1/2 (Abb. 3.27C-E). Insgesamt konnte nach 4 h Behandlung mit dem 1:10 verdünnten Buchenverbrennungsaerosol die Aktivierung der drei MAPK p38, JNK und ERK auf Proteinebene klar gezeigt werden. Mit MK2 und c-Jun waren ebenfalls Substrate von p38 bzw. JNK aktiviert. In allen Fällen waren keine nennenswerten Unterschiede

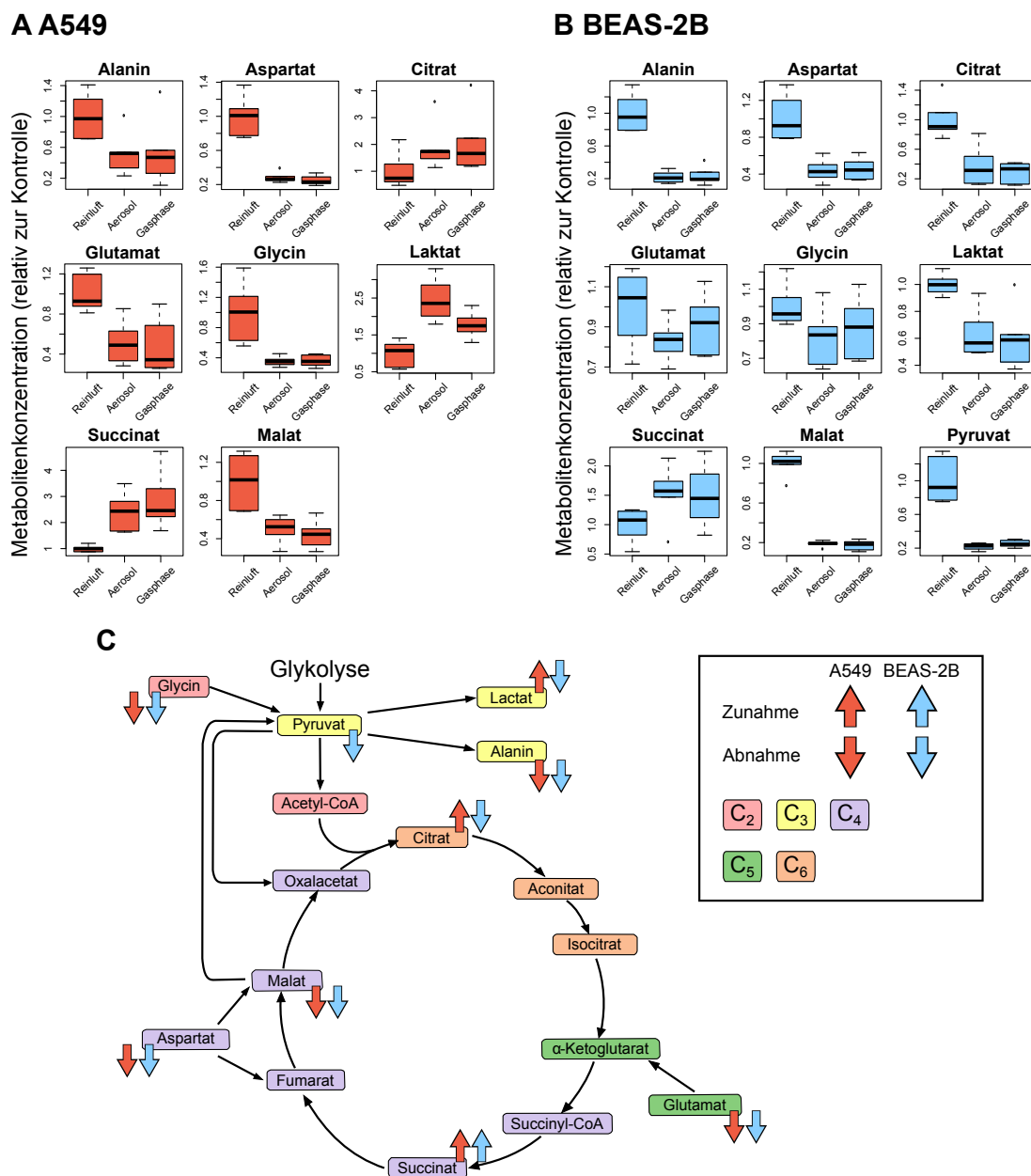


**Abbildung 3.27.: Die Gasphase des Holzrauchs aktiviert die MAP-Kinasen Kaskade.** A549 und BEAS-2B Zellen wurden 4 h mit Reinluft, komplettem Holzverbrennungsaerosol (Aerosol) und partikelgefiltertem Aerosol (Gasphase) behandelt. Aus Gesamtzelllysaten wurde mit SDS-PAGE und Western Blotting die Phosphorylierung verschiedener Proteine der MAP-Kinasen Kaskade untersucht. Dargestellt sind repräsentative Blots und die zugehörige Quantifizierung relativ zur Reinluftkontrolle nach Normierung auf die Ladekontrolle (unphosphorylierte Form des Proteins oder Lamin B) der Aktivierung von p38 (A), MK2 (B), JNK (C), c-Jun (D) und ERK1/2 (E). Die Quantifizierung zeigt den Mittelwert der Blots von 3 (MK2, c-Jun: 2) unabhängigen Versuchen mit je einer Probe pro Bedingung, erhalten durch Vereinigung der Gesamtzelllysate von mindestens 2 Replikaten sowie die Standardabweichung bzw. R/2 bei nur 2 Werten.

zwischen Gasphasen- und Aerosolbehandlung sichtbar, das heißt auch für diesen Endpunkt sind die Gasphasenkomponenten der entscheidende Faktor. MAPK können durch verschiedene Stressstimuli aktiviert werden (Chang und Karin 2001). Die Beteiligung der MAPK bei der toxischen Wirkung von Partikeln aus Verbrennungsprozessen wurde bereits häufig gezeigt und zum Beispiel mit ROS, Metallen oder PAKs in Verbindung gebracht (Corsini et al. 2013; Fritsch-Decker et al. 2011; Jarvis et al. 2014). Die Regulierung von MAPK durch gasförmige Verbrennungsemissionen wurde hingegen bislang nicht untersucht. Möglicherweise spielen auch hier ROS eine Rolle, wie am Beispiel von Styren und Benzol gezeigt wurde (Mögel et al. 2011), beides volatile Aromaten, die auch bei der Holzverbrennung entstehen (McDonald et al. 2000). Gegen ROS als Verursacher der MAPK-Aktivierung spricht allerdings, dass in der mRNA-Seq Analyse auf anderen Signalwegen keine Hinweise auf eine anti-oxidative Stressantwort aufgefallen waren. In präliminären Experimenten zur Untersuchung der ROS-Bildung mit H<sub>2</sub>DCF konnte ebenfalls keine ROS Induzierung durch den Holzrauch festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Auch verschiedenste Arten von DNA-Schäden führen zur Aktivierung der MAPK (Herrlich et al. 2008; Kharbanda et al. 2000; Schreck et al. 2015), was angesichts der deutlichen DNA-Schadensantwort eine plausible Erklärung darstellt. Zur weiteren Eingrenzung der möglichen Verursacher der MAPK-Aktivierung sei an dieser Stelle auf den systembiologischen Ansatz im Abschnitt 3.3.7.1 verwiesen, der sich das breite Spektrum der mRNA-Sequenzierung zu Nutze macht, um die Wirkungen der Holzrauchgasphase mit bekannten Wirkmechanismen abzugleichen.

#### 3.3.6.3. Beeinflussung metabolischer Flüsse

Die Verifizierung der Veränderungen im Energiestoffwechsel erfolgte in Kooperation mit Projektpartnern (Sean C. Sapcariu, Arbeitsgruppe Karsten Hiller, Universität Luxemburg) durch eine unvoreingenommene Analyse des Metaboloms mittels GC-MS. Die verwendete Methode erfasst polare, kurzkettige Metabolite, die durch Silylierung derivatisierbar und in detektierbarer Menge vorhanden sind. Dies sind vor allem Intermediate aus dem TCA sowie Aminosäuren. Neben den Veränderungen in der Konzentration der Metabolite wurden auch Veränderungen der metabolischen Flüsse untersucht, das heißt über welchen metabolischen Weg es zur Zu- oder Abnahme der quantifizierten Metabolite kommt. Dies wird erzielt durch die Verwendung von <sup>13</sup>C-markierter Glucose und Glutamin, deren metabolisches Schicksal massenspektrometrisch quantitativ verfolgt wird (Buescher et al. 2015). In Abbildung 3.28 sind zunächst die auf die Kontrolle normierten Konzentrationsverhältnisse der Metaboliten, ungeachtet ihrer Isotopenzusammensetzung, in A549 und BEAS-2B abgebildet, nachdem sie 4 h mit komplettem und partikelgefiltertem Holzrauch aerosol behandelt wurden. Wie bereits in den meisten anderen analysierten Endpunkten waren die Effekte auch hier wieder auf Verbindungen in der Gasphase zurückzuführen. Allerdings traten hier in den gemessenen Metabolitkonzentrationen teilweise Unterschiede zwischen A549 und BEAS-2B Zellen auf, obwohl sich die Genexpression des Energiemetabolismus in beiden Zelllinien gleich verhielt. In A549 nahm der Gehalt an Citrat und Lactat zu, was zunächst auf einen erhöhten Pyruvatabbau, sowohl anaerob zu Lactat, als auch durch Einfluss über Acetyl-CoA in den TCA deutet. Glycin und

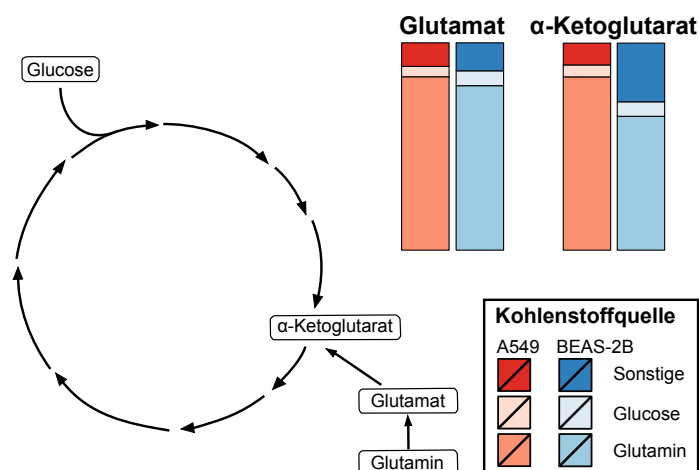


**Abbildung 3.28.: Gasphasenbestandteile aus der Holzverbrennung verändern die Konzentration der Metaboliten des Citratzyklus.** A549 (A) und BEAS-2B Zellen (B) wurden 4 h mit Reinluft, komplettem Holzverbrennungsaerosol (Aerosol) und partikelgefiltertem Aerosol (Gasphase) behandelt. Danach wurden die polaren Metabolite extrahiert und mittels GC-MS anhand charakteristischer Fragmente im SIM quantifiziert. Die Boxplots zeigen den Median (dicke Linie), das 1. bis 3. Quartil (Box) und den entsprechenden 1.5-fachen IQR (Whisker) der Mittelwerte aus 6 Experimenten mit je 3 Replikaten. (C) Übersicht der Metaboliten des TCA mit den qualitativen Änderungen in Folge der Behandlung mit Aerosol oder Gasphase aus (A) und (B). Der Farbcode entspricht der Anzahl der Kohlenstoff-Atome. Dieser Versuch wurde in Kooperation mit Sean C. Săpcariu (Universität Luxemburg) durchgeführt.

Alanin nahmen beide ab. Auch dies könnte im Zusammenhang mit einer veränderten Glykolyse bzw. Pyruvateinfluss in den TCA stehen. In BEAS-2B Zellen hingegen nahmen Citrat, Alanin, Lactat und Glycin allesamt ab. Auf die möglichen Gründe wird weiter unten eingegangen. Ebenfalls war Pyruvat erniedrigt, welches in A549 Zellen aufgrund der zum Analysenzeitpunkt verwendeten GC-MS Methode nicht quantifiziert werden konnte. Da in BEAS-2B Zellen alle erfassten Reaktionsprodukte von Pyruvat erniedrigt waren, stellt sich die Frage, ob in dieser Zelllinie die gesamte Glykolyse gehemmt war. In beiden Zelllinien nahm ferner der Glutamatgehalt ab und gleichzeitig Succinat zu, was für einen verstärkten Eintrag von Glutamat in den TCA spricht, dessen weitere Umsetzung aber bei der Succinatmetabolisierung geblockt scheint, da die Malatkonzentration abnimmt.

Insgesamt zeigt die Quantifizierung der Metabolitkonzentrationen, dass die Behandlung mit dem Holzraucherosol zu deutlichen Veränderungen der Intermediate des Energiemetabolismus führt. Allein auf Basis dieser Daten ist es aber kaum möglich, die Gründe für die festgestellten Veränderungen zu benennen, da für jede Konzentrationsänderung eines Metaboliten verschiedene Erklärungen in Frage kommen. Zum Beispiel kann in den meisten Fällen nicht abgeleitet werden, ob es veränderte Zu- oder Abflüsse sind, die die Konzentrationsänderungen bewirken. Eine weitere Hürde bei der Interpretation der Daten ist, dass auch die Sekretion von Metaboliten ins Zellkulturmedium berücksichtigt werden muss, welche durch eine Behandlung der Zellen ebenfalls verändert sein könnte. Da es durch das hohe Volumen des Zellkulturmediums im ALI-System zu einer starken Verdünnung der eventuell sekretierten Metaboliten kommt, konnten diese nicht bestimmt werden. Aus diesem Grund ist die isotopengestützte Flussanalyse sehr wertvoll bei der Interpretation von Metabolitenveränderungen, denn sie liefert weitere Hinweise über den Stoffwechselweg, über den die Änderungen zustande kommen. Da hierbei nur Isotopenverhältnisse bestimmt werden, ist die Flussanalyse zudem unempfindlich gegenüber Verlusten während der Probenaufarbeitung oder Ungewissheiten durch in das Medium abgegebene Metaboliten.

Für die Analyse der metabolischen Flüsse wurden Versuche mit isotopenmarkierter Glucose und Glutamin durchgeführt. In getrennten Versuchen wurde entweder Glucose oder Glutamin im Zellkulturmedium ausschließlich in Form der vollständig  $^{13}\text{C}$ -markierten Form angeboten (Glucose- $^{13}\text{C}_6$  bzw. Glutamin- $^{13}\text{C}_5$ ). Durch Kombination der Ergebnisse aus beiden Versuchen kann ermittelt werden, zu welchem Anteil ein Metabolit aus Glucose- bzw. Glutaminquellen gebildet wurde. Abbildung 3.29 zeigt zur Verdeutlichung des Prinzips die anteiligen Kohlenstoffquellen von Glutamat und  $\alpha$ -Ketoglutarat in A549 (rot) und BEAS-2B Zellen (blau) nach Reinluftbehandlung. Die Zellen wurden für 24 h in den isotopenmarkierten Medien kultiviert, damit sich für die Metaboliten des TCA ein Gleichgewicht der Isotopenverteilung einstellt. Es zeigt sich, dass Glutamat in beiden Zelllinien zum größten Teil aus Glutamin hervorgeht.  $\alpha$ -Ketoglutarat wird in A549 Zellen zu gleichen Anteilen aus Glutaminquellen gebildet wie Glutamat. In BEAS-2B Zellen ist der Beitrag von Glutamin zu  $\alpha$ -Ketoglutarat dagegen deutlich geringer, die  $\alpha$ -Ketoglutarat-Vorläufer stammen daher vermehrt aus dem TCA und werden dort aus nicht-Glucose Quellen gebildet. An  $\alpha$ -Ketoglutarat kann also abgelesen werden, dass A549 Zellen Glutamin zu größeren Anteilen in den TCA schleusen

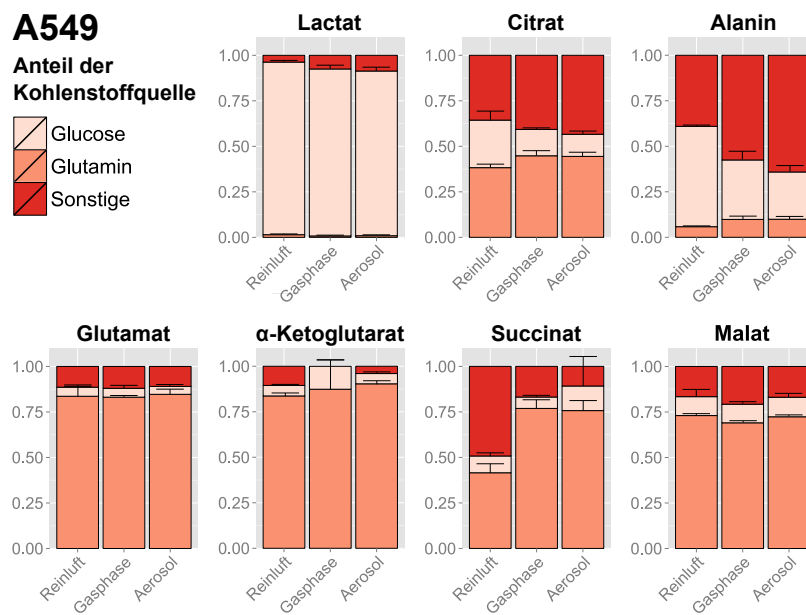


**Abbildung 3.29.: Prinzip der Stabilisotopenanalyse metabolischer Flüsse** A549 und BEAS-2B Zellen wurden in separaten Experimenten entweder mit Glucose- $^{13}\text{C}_6$  oder Glutamin- $^{13}\text{C}_5$  markiert und 4 h mit Reinluft behandelt. Danach wurden die polaren Metabolite extrahiert und mittels GC-MS anhand charakteristischer Fragmente quantifiziert. Die Menge des Kohlenstoffs, der aus der markierten Glucose bzw. Glutamin stammt und in  $\alpha$ -Ketoglutarat eingebaut wurde, sowie der Anteil der aus nicht-markierten Quellen (sonstige) stammt, ist anteilig dargestellt.

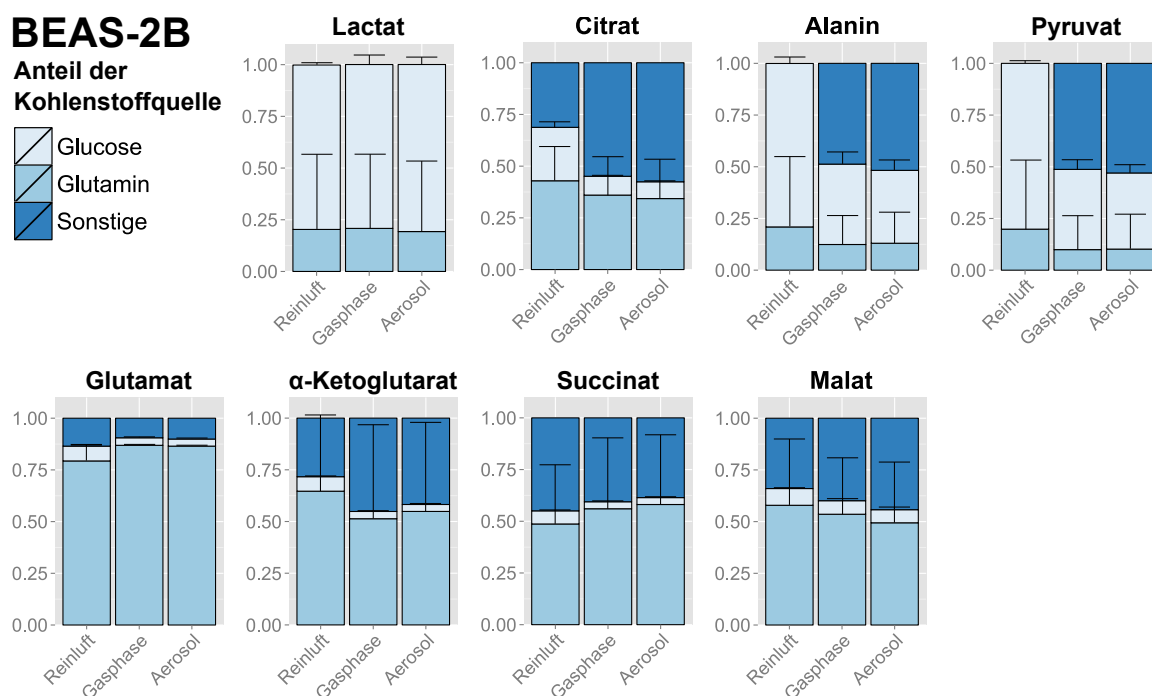
als BEAS-2B Zellen. Dieses Ergebnis war erwartet, da Tumorzellen zu größeren Teilen auf die Glutaminverstoffwechslung zurückgreifen als die immortalisierten Zellen (Vander Heiden et al. 2009).

Nach diesem Prinzip wurde analysiert, welche Veränderungen die Behandlung mit dem kompletten und gefilterten Holzrauchaerosol auf die Umsetzung der angebotenen Kohlenstoffquellen zu ausgewählten Metaboliten bewirkte (Abb. 3.30). Die Metabolitenveränderungen in A549 legten nahe, dass die Aerosolbehandlung die Bildung von Citrat und Lactat aus Pyruvat erhöhte (Abb. 3.28). Lactat wird unabhängig von der Behandlung fast ausschließlich aus Glucoseprodukten gebildet, weshalb die Konzentrationszunahme von Lactat durch verstärkten anaeroben Abbau von Pyruvat oder einer erniedrigten Lactatsekretion ins Medium zustande kommt. Der anteilige Pyruvateinbau in Citrat geht nach der Aerosolbehandlung allerdings zurück, da weniger markierte Glucose zu Citrat umgesetzt wird. Die trotzdem erhöhten Citratkonzentrationen gehen somit auf einen erhöhten Einbau von Kohlenstoff aus Glutamin- und sonstigen Quellen zurück.

Ebenfalls war die Aufteilung der Kohlenstoffquellen von Glutamat unverändert, weshalb die Abnahme der Glutamatkonzentration (Abb. 3.28) vermutlich nicht durch eine geringere Desaminierung von Glutamin bewirkt wird.  $\alpha$ -Ketoglutarat wird vermutlich einzig durch Transaminierung von Glutamat gebildet, denn die Verteilung der Kohlenstoffherkunft der beiden Metabolite ist deckungsgleich. Succinat, das Reaktionsprodukt von  $\alpha$ -Ketoglutarat im TCA war nach Behandlung in deutlich höheren Konzentrationen vorhanden (Abb. 3.28). Interessanterweise unterscheidet sich die Kohlenstoffherkunft von Succinat unter Kontrollbedingungen aber deutlich von  $\alpha$ -Ketoglutarat. Hier wird rund die Hälfte des zellulären Succinats nicht aus Glucose oder Glutamin, sondern aus anderen Kohlenstoffquellen gebildet. Da diese anderen Quellen jedoch nicht wesentlich zur Bildung von Malat beitragen, trägt eine vom TCA unabhängige, vermutlich im Cytosol kompartimentierte,



**Abbildung 3.30.: Veränderung der metabolischen Flüsse in A549 Zellen nach Behandlung mit dem Holzrauch aerosol.** A549 Zellen wurden in separaten Experimenten entweder mit Glucose- $^{13}\text{C}_6$  oder Glutamin- $^{13}\text{C}_5$  markiert und 4 h mit Reinluft, komplettem Holzverbrennungsaerosol (Aerosol) und partikelgefiltertem Aerosol (Gasphase) behandelt. Danach wurden die polaren Metabolite extrahiert und mittels GC-MS anhand charakteristischer Fragmente quantifiziert. Die Menge des Kohlenstoffs, der aus der markierten Glucose bzw. Glutamin stammt wurde ermittelt und der Anteil berechnet, der aus sonstigen Quellen stammt (Differenz zu 1). Dargestellt sind die anteiligen Fraktionen aus den Mittelwerten + SEM von 3 Experimenten pro Isotopenmarkierung mit je 3 Replikaten. Dieser Versuch wurde in Kooperation mit Sean C. Sapcariu (Universität Luxemburg) durchgeführt.



**Abbildung 3.31.: Veränderung der metabolischen Flüsse in BEAS2-2B Zellen nach Behandlung mit dem Holzrauch aerosol.** BEAS-2B Zellen wurden in separaten Experimenten entweder mit Glucose- $^{13}\text{C}_6$  oder Glutamin- $^{13}\text{C}_5$  markiert und 4 h mit Reinluft, komplettem Holzverbrennungsaerosol (Aerosol) und partikelgefiltertem Aerosol (Gasphase) behandelt. Danach wurden die polaren Metabolite extrahiert und mittels GC-MS anhand charakteristischer Fragmente quantifiziert. Die Menge des Kohlenstoffs, der aus der markierten Glucose bzw. Glutamin stammt wurde ermittelt und der Anteil berechnet, der aus sonstigen Quellen stammt (Differenz zu 1). Dargestellt sind die anteiligen Fraktionen aus den Mittelwerten + SEM von 3 Experimenten pro Isotopenmarkierung mit je 3 Replikaten. Dieser Versuch wurde in Kooperation mit Sean C. Sapcaru (Universität Luxemburg) durchgeführt.

Succinatquelle zur totalen Menge an Succinat bei. Somit scheint Holzrauch die TCA-unabhängige Synthese von Succinat zu inhibieren, und im TCA die Metabolisierung von Succinat zu Malat zu blockieren.

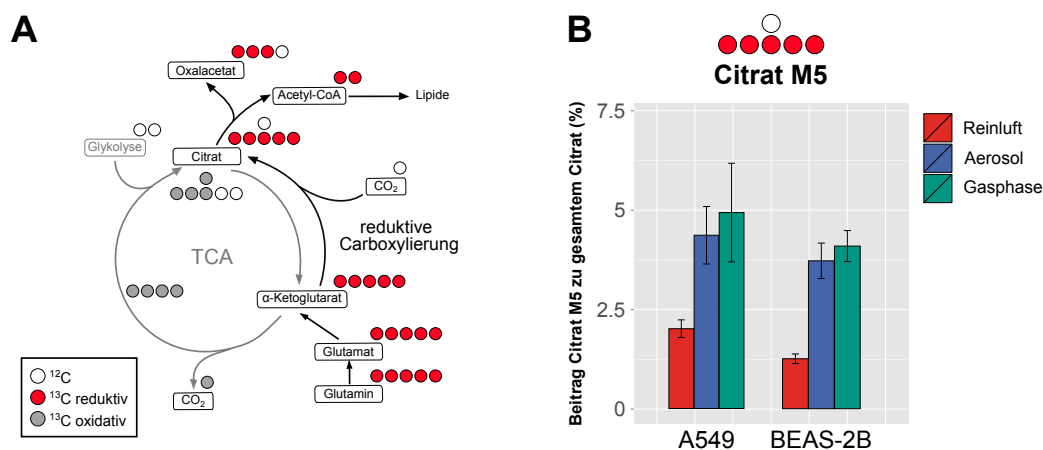
In BEAS-2B Zellen sehen die Veränderungen der metabolischen Flüsse sehr ähnlich wie in A549 aus, selbst bei den Metaboliten bei denen sich die Konzentrationsveränderungen unterschieden (Abb. 3.31). Lactat bestand zum größten Teil aus Kohlenstoffatomen, die über die Glykolyse bereitgestellt wurden. Ihr relativer Anteil nahm nach der Behandlung noch ein wenig zu. Rund ein Fünftel des Lactats stammt aber auch von Glutamin, ein Stoffwechselweg der in A549 nicht zu beobachten war. Alanin erfährt eine drastische Zunahme von Kohlenstoff der weder aus Glucose, noch aus Glutamin stammt. Da die Alaninkonzentration mit der Behandlung deutlich abnahm, ist diese Veränderung vor allem auf einen Rückgang der Bildung von Alanin aus Pyruvat zurückzuführen. Der gleiche Vorgang war weniger deutlich auch in A549 zu beobachten. Pyruvat erfuhr einen deutlichen Rückgang des Anteils aus Glucose, was die Vermutung aus der Analyse der Metabolitenkonzentrationen bestätigt, dass die Glykolyse in BEAS-2B gehemmt wurde. In A549 konnte Pyruvat nicht zweifelsfrei quantifiziert werden.



Auch die Verteilung der Kohlenstoffquellen von Citrat zeigt, wie bereits bei A549 Zellen, einen Rückgang des oxidativen Abbaus von Glucose über den TCA. Gleichzeitig war die Gesamtkonzentration von Citrat erniedrigt. In BEAS-2B Zellen reagiert ein großer Teil des Citrats im TCA weiter zu  $\alpha$ -Ketoglutarat, im Gegensatz zur Situation in A549, wo  $\alpha$ -Ketoglutarat zum größten Teil aus Glutamat hervorgeht. Im Fall von BEAS-2B nimmt die Citratverwertung im TCA mit der Holzrauchbehandlung leicht zu, was aufgrund der verminderten Nachbildung von Citrat möglicherweise die Abnahme der Citratkonzentrationen in BEAS-2B Zellen erklärt. Der Grund der Zunahme des Citrats in A549 Zellen liegt auf Basis der ermittelten Daten am wahrscheinlichsten nicht an einer veränderten Verwertung im TCA, sondern ist in einer Citrat bildenden Reaktion außerhalb des TCA zu suchen.

Detailliertere Einblicke in die Veränderungen der metabolischen Flüsse sind durch Betrachtung der Verteilung der Metabolit-Isotopomeren möglich (Buescher et al. 2015). So lässt sich feststellen, dass Holzrauch in beiden Zelllinien zu einer drastischen Erhöhung des M5 Isotopomers von Citrat bei Markierung der Zellen mit Glutamin- $^{13}\text{C}_5$  führt. Bei diesem M5 Isotopomer stammen 5 der 6 Kohlenstoffatome des Citrats von Glutamin (Abb. 3.32B). Es entsteht durch reduktive Carboxylierung von  $\alpha$ -Ketoglutarat (Metallo et al. 2011) (Kohlenstoff dargestellt in Rot, Abb. 3.32 A). Der übliche oxidative Abbau von Glutamin- $^{13}\text{C}_5$  über den TCA führt hingegen nach  $\text{CO}_2$ -Abspaltung lediglich zum M4- und, zu geringeren Anteilen, zum M2-Isotopomer von Citrat (Kohlenstoff dargestellt in Grau, Abb. 3.32 A). Die reduktive Carboxylierung wird von Zellen zur Bereitstellung von Acetyl-CoA für die Lipidsynthese genutzt, falls dieses aufgrund einer gesteigerten anaeroben Reduktion von Pyruvat zu Lactat nicht aus der Glykolyse zur Verfügung steht (Metallo et al. 2011). Somit führt Holzrauch durch geringeren Einbau von Pyruvat in den TCA zu einer Limitierung des zur Verfügung stehenden Acetyl-CoA und die Zellen kompensieren dies durch reduktive Carboxylierung. Dies ist ein Ergebnis, das mit Verwendung von konventionellen Metabolitenanalysen nicht möglich gewesen wäre.

Zusammenfassend konnte mit der Metabolomanalyse gezeigt werden, dass die metabolischen Gleichgewichte durch die Gasphase deutlich beeinflusst wurden. Die deutlichsten Änderungen im Kohlenhydratstoffwechsel nach 4 h waren die Abnahme der oxidativen Verstoffwechslung von Pyruvat durch den TCA, die Akkumulation von Succinat und die erhöhte reduktive Carboxylierung von  $\alpha$ -Ketoglutarat. Ein Umschalten des oxidativen Metabolismus, hin zu anaerober Glykolyse, ist eine mögliche Reaktion auf zelluläre ROS. Da die mitochondriale Atmungskette die Hauptquelle endogener ROS darstellt, wirkt die Umstellung des Metabolismus der weiteren ROS Akkumulation entgegen (Ott et al. 2007). Aus der Erforschung des Warburg-Effekts ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor HIF-1 eine maßgebliche Rolle bei der transienten Erniedrigung der oxidativen Pyruvatverstoffwechslung zugunsten der anaeroben Glykolyse hat. ROS können z.B. durch Inhibierung der HIF-Prolylhydroxylase (PHD) zu einer HIF-1 $\alpha$  Stabilisierung führen (Selak et al. 2005). PHD benötigt  $\text{Fe}^{2+}$  als Kofaktor, das durch ROS vermehrt zu  $\text{Fe}^{3+}$  oxidiert wird (Mills und O'Neill 2014). Eine echte Hypoxie als Ursache einer möglichen HIF-1 $\alpha$  Stabilisierung ist hingegen unwahrscheinlich. Durch die 10-fache Verdünnung des Verbrennungsaerosols mit Umgebungsluft ist der



**Abbildung 3.32.: Behandlung mit Holzrauchaerosol induziert den reduktiven Glutaminmetabolismus in A549 und BEAS-2B Zellen.** (A) Der reduktive Metabolismus von Glutamin- $^{13}\text{C}_5$  führt zu Citrat- $^{13}\text{C}_5$  (M5), der oxidative hingegen zu Citrat- $^{13}\text{C}_4$  (M4), zur Erläuterung siehe Text. (B) A549 und BEAS-2B Zellen wurden mit Glutamin- $^{13}\text{C}_5$  markiert und 4 h mit Reinluft, komplettem Holzverbrennungsaerosol (Aerosol) und partikelgefiltertem Aerosol (Gasphase) behandelt. Danach wurden die polaren Metabolite extrahiert und mittels GC-MS anhand charakteristischer Fragmente der prozentuale Anteil von Citrat M5 vom gesamten Citrat bestimmt. Abgebildet ist der Mittelwert + SEM von je 3 unabhängigen Experimenten mit je 3 Replikaten. Dieser Versuch wurde in Kooperation mit Sean C. Sapcaru (Universität Luxemburg) durchgeführt.

Sauerstoffgehalt des Aerosols nahezu gleich wie in der reinen Umgebungsluft, die als Referenz verwendet wurde. Eventuell ist auch das im Holzrauch vorkommende NO in der Lage, die HIF-1 $\alpha$  Signaltransduktion zu aktivieren (Semenza 2001). Auch eine Erhöhung der zellulären Succinatkonzentration, wie in beiden Zelllinien festgestellt wurde, hemmt die HIF-Prolylhydroxylase (PHD) durch Produkthemmung (Selak et al. 2005). Eine Succinatakkumulation in Succinatdehydrogenase-defizienten Zellen wurde als neuer Kanzerogenese-Mechanismus identifiziert (King et al. 2006), was eine interessante Verbindung zwischen den Wirkungen von Holzrauch und pathogenen Vorgängen darstellt. Da HIF-1 $\alpha$  in den Verschiebungen der Stoffwechselgleichgewichte eine zentrale Rolle spielt, sollte die HIF-1 $\alpha$  Regulierung nach Holzrauchbehandlung in zukünftigen Experimenten genauer untersucht werden.

### 3.3.7. Identifizierung toxischer Gasphasenkomponenten

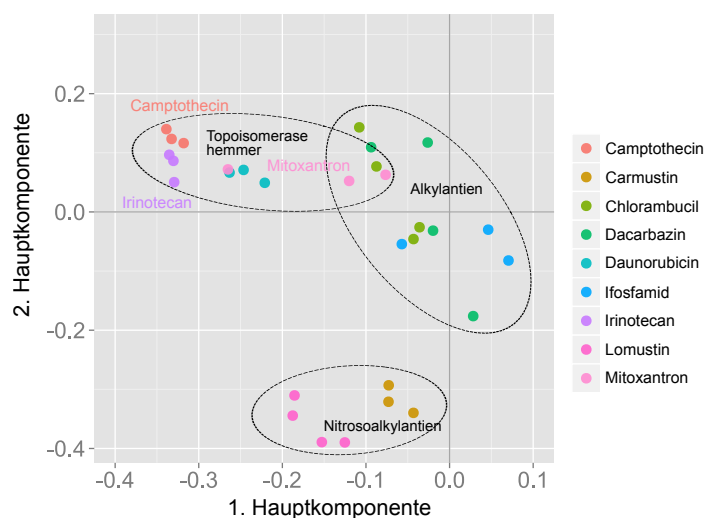
#### 3.3.7.1. Systembiologischer Ansatz

Eines der Hauptziele dieser Dissertation war es, die für die toxikologischen Wirkungen verantwortlichen Komponenten im Holzrauch zu identifizieren. Anhand der Transkriptomanalyse und den Validierungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass Komponenten der Gasphase für die beobachteten Wirkungen verantwortlich sind. Diese Substanzen in der Gasphase zu identifizieren ist kein leichtes Unterfangen, denn die Vielzahl der volatilen Verbindungen im Verbrennungsaerosol und deren teilweise nur spärlich vorhandene toxikologische Charakterisierung erschwert es, sinnvoll einzelne Kandidaten zu selektieren und experimentelle Daten abzugleichen. Die hohe Informationstiefe der Transkriptomanalyse bietet jedoch Möglichkeiten, die Kandidatenauswahl einzuschränken. Die Genexpressionsdaten der Holzrauchexperimente können mit Datenbanken verglichen werden, in denen die durch verschiedenste Substanzen induzierten Genexpressionsprofile hinterlegt sind. Wenn ein Eintrag in einer Datenbank eine hohe Ähnlichkeit zum Genexpressionsprofil von Holzrauch aufweist, wirkt die Substanz aus der Datenbank womöglich über ähnliche Mechanismen wie die gesuchten Komponenten im Holzrauch. Mit einem solchen „systembiologischen“ Ansatz wurde versucht, die verantwortlichen Gasphasenkomponenten einzugrenzen oder gar zu identifizieren. Die „Connectivity Map“ ([www.broadinstitute.org/cmap/](http://www.broadinstitute.org/cmap/)) ist ein häufig

**Tabelle 3.4.:** Die besten 5 Treffer der Connectivity Map Analyse, durchgeführt mit den 100 signifikantesten induzierten und reprimierten Transkripten in A549 und BEAS-2B Zellen nach Behandlung mit Holzverbrennungsaerosol. Die Konnektivität ist ein Maß für die Ähnlichkeit mit dem Genexpressionsprofil der Holzrauchbehandlung (Erklärung im Text). Topoisomerasehemmer sind hervorgehoben.

A549		BEAS-2B	
Substanz	Konnektivität zu Holzrauch	Substanz	Konnektivität zu Holzrauch
<b>Camptothecin</b>	0.922	<b>Camptothecin</b>	0.925
<b>Irinotecan</b>	0.857	Azacitidin	0.776
Phenoxybenzamin	0.623	<b>Mitoxantron</b>	0.705
Viomycin	-0.613	Dienestrol	0.697
Azacitidin	0.523	<b>Irinotecan</b>	0.687

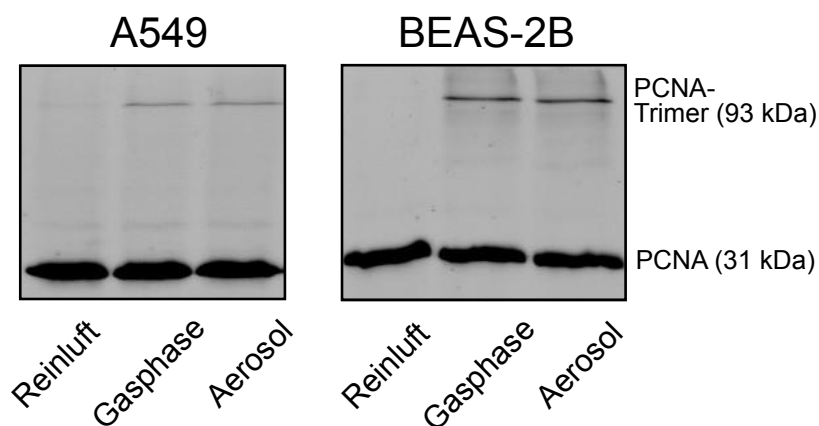
verwendetes Werkzeug für den Vergleich des Genexpressionsprofils von Noxen mit einem bislang unbekanntem Wirkmechanismus mit den Profilen von Einzelsubstanzen, deren Wirkmechanismen bereits bekannt sind. Sie beruht auf 6100 Genexpressionsdatensätzen aus Experimenten mit 1309 verschiedenen Substanzen. Für jeden Datensatz wird aus allen analysierten Genen, gemäß der Stärke ihrer Regulation, eine Rangfolge gebildet. Mit diesen Rangfolgen werden die differentiell exprimierten Gene des eigenen Experiments verglichen und so ein Maß für die Übereinstimmung ermittelt, der Konnektivitätswert (Lamb et al. 2006). Die Konnektivitätsanalyse unter Verwendung der je 100 signifikantesten induzierten und reprimierten Gene durch die Verbrennungsgasphase ergab eine auffällig hohe Konnektivität zu mehreren Gentoxinen (Tabelle 3.4). Die Topoisomerasehemmer Camptothecin (CPT) und Irinotecan (ITCN) waren in beiden Zelllinien unter den besten Treffern, Mitoxantron (MTX) zusätzlich in BEAS-2B Zellen. Topoisomerase ist ein wichti-



**Abbildung 3.33.: Das Ergebnis der Connectivity Map Analyse ist spezifisch für Topoisomerase-hemmer.** Für verschiedene Gentoxine wurde mit den je 100 signifikantesten hoch- und herunter regulierten Transkripten in A549 Zellen nach Behandlung mit der Holzverbrennungsgasphase eine Hauptkomponentenanalyse basierend auf den Expressionsdaten des Connectivity Map Datensatzes durchgeführt. Topoisomerasehemmer werden durch die ersten beiden Hauptkomponenten deutlich von anderen Gentoxinen getrennt. Die individuellen Datenpunkte stellen unterschiedliche Experimente der gleichen Konzentration, aber in bis zu 3 verschiedenen Zelllinien dar.

ges Enzym bei der Transkription und Replikation. Seine Funktion ist es, die Superspiralisierung der DNA zu entspannen und so für die Zugänglichkeit des DNA Stranges zu sorgen. Die Gaspasenkomponenten zeigten in beiden Zelllinien ebenfalls ein vergleichbares Wirkprofil wie Azacitidin, ein Methyltransferasehemmer (Stresemann und Lyko 2008). Die hohe Konnektivität zu den Topoisomerasehemmern muss nicht durch eine spezifische Genregulation in Folge von Topoisomerasehemmung zustande kommen, sondern könnte auch das Ergebnis einer allgemeineren Genregulation in Folge von DNA-Schädigung sein. Deshalb wurde das Genexpressionsprofil weiterer Gentoxine, die nicht die Topoisomerase hemmen, mit den durch Holzrauch induzierten Veränderungen verglichen. Hierzu wurde die Hauptkomponentenanalyse (PCA, principle component analysis) verwendet. Die PCA ist ein mathematisches Verfahren, mit dem Datensätze mit vielen Variablen (hier die regulierten Gene) durch neu berechnete Variablen (den Hauptkomponenten), die sich aus den unterschiedlich stark gewichteten Ausgangsvariablen zusammensetzen, vereinfacht dargestellt werden können. Die Hauptkomponenten werden sequentiell so berechnet, dass jede hinzukommende Hauptkomponente den maximalen zusätzlichen Informationsgehalt des Datensatzes wiedergibt, der nicht bereits durch die vorangegangenen Hauptkomponenten beschrieben wurde. So reichen üblicherweise bereits die ersten 2-3 Hauptkomponenten aus, um die Unterschiede zwischen den Daten eines Datensatzes ausreichend zu beschreiben (Jolliffe 2002). Aus der Hauptkomponentenanalyse ist ersichtlich, dass Topoisomerasehemmer und alkylierende Gentoxine zu unterscheidbaren Genexpressionsmustern führen (Abb. 3.33). Dies bedeutet, dass die Connectivity Map die Wirkprofile von Gentoxinen verschiedener Wirkmechanismen voneinander differenzieren kann. Daher ist es wahrscheinlich, dass ein großer Teil der regulierten

Gene in den Holzrauchexperimenten durch Substanzen erklärt werden kann, die ebenfalls die Topoisomerasen beeinträchtigen, bzw. die gleichen Signalwege aktivieren wie CPT, ITCN und MTX. Der Wirkmechanismus von CPT und ITCN, einem CPT Derivat, beruht auf der Bildung von DNA-Protein-Verknüpfungen (DNA-protein crosslinks, DPCs) durch permanente Stabilisierung von normalerweise transienten kovalenten DNA-Topoisomerase I Intermediaten (Hsiang et al. 1989; Kawato et al. 1991). Mitoxantron, ein Doxorubicin-Analogen, führt auf die gleiche Weise zur Bildung von Topoisomerase II DPCs (Fox und Smith 1990). Auch die hohe Konnektivität der Gasphase zu Azacitidin beruht auf einem ähnlichen Mechanismus. Azacitidin ist ein synthetisches Nukleosid, das nach metabolischer Aktivierung als Aza-Desoxycytosin anstelle von Cytosin in die DNA eingebaut werden kann und dann als Inhibitor von Methyltransferasen fungiert. Die Inhibierung der Methyltransferasen beruht auf der Ausbildung einer kovalenten Bindung von Aza-Desoxycytosin mit dem aktiven Zentrum des Enzyms (Stresemann und Lyko 2008). Azacitidin führt somit, wie bereits die Topoisomerasehemmer, zur Bildung von DPCs. Es gibt daher Grund zur Annahme, dass die Ähnlichkeit der Gensignatur zwischen Zellen nach Gasphasenbehandlung und Zellen die mit den eben diskutierten Substanzen behandelt wurden, auf der Bildung von DPCs beruht. Diese These wird durch die Bildung von kovalenten Protein-Protein Verknüpfungen bekräftigt, die häufig parallel zu DPCs durch quervernetzende Substanzen induziert werden (Abb. 3.34). Bei der Western Blot Detektion von PCNA (proliferating cell nuclear antigen) fiel auf, dass in beiden untersuchten Zelllinien reproduzierbar eine Bande mit der dreifachen Proteingröße beobachtet wurde. Montaner et al. (2007) beschrieben diese Bande als kovalent verknüpftes PCNA-Trimer. Die Autoren konnten die PCNA-Trimere unter anderem durch eine Behandlung mit Formaldehyd (FA) hervorrufen.



**Abbildung 3.34.: Die Gasphase des Holzverbrennungsaerosols führt in Lungeneithelzellen zu kovalenten Quervernetzungen des Kernproteins PCNA.** A549 und BEAS-2B Zellen wurden 4 h mit Reinluft, komplettem Holzverbrennungsaerosol (Aerosol) und partikelgefiltertem Aerosol (Gasphase) behandelt. Aus Gesamtzelllysaten wurde mit SDS-PAGE und Western Blot die Anwesenheit von PCNA-Multimeren untersucht. Die Holzrauchbehandlung führt in beiden Zelllinien zu einer PCNA Bande mit der dreifachen Proteingröße (93 kDa) wie das PCNA-Monomer (31 kDa). Um die Bande bei 93 kDa deutlicher sichtbar zu machen wurde bei erhöhter Sensitivität gescannt und eine Pixelsättigung der 31 kDa Bande in Kauf genommen. Abgebildet ist je ein repräsentatives Experiment von 3 unabhängigen Versuchen. Dieses Experiment wurde von Larissa Ramme während ihrer Diplomarbeit durchgeführt.

**Tabelle 3.5.:** Quantifizierung der Carbonyle in der 1:10 verdünnten Gasphase des Holzverbrennungsaerosols. Die Probenahme erfolgte mittels DNPH-Kartuschen innerhalb des Expositionssystems anstelle der Zellkulturen. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der Messwerte von je 8 Proben aus je 2 unabhängigen Holzverbrennungen. Die Quantifizierung erfolgte mittels GC-MS durch Ahmed Reda (HMGU München).

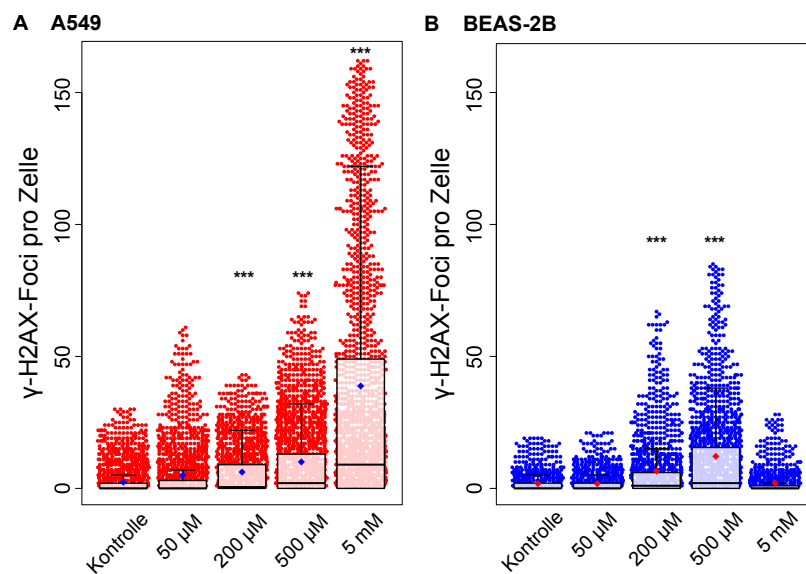
Analyt [ $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ]	Gasphase $\pm$ SD	Raumluft $\pm$ SD
Formaldehyd	2239 $\pm$ 877	62 $\pm$ 21
Acetaldehyd	1064 $\pm$ 475	33 $\pm$ 10
Propanal	52 $\pm$ 11	4.3 $\pm$ 1.2
Aceton	503 $\pm$ 109	59 $\pm$ 21
Isobutanal	12 $\pm$ 1	<LOD
Acrolein	61 $\pm$ 8	<LOD
Butanal	41 $\pm$ 14	2.4 $\pm$ 1.0
2-Butanon	50 $\pm$ 11	3.5 $\pm$ 0.6
Methacrolein	47 $\pm$ 13	<LOD
Isopentanal	<LOD	<LOD
Pentanal	32 $\pm$ 10	<LOD
Crotonaldehyd	37 $\pm$ 22	6.1 $\pm$ 2.6
Hexanal	<LOD	<LOD

Aldehyde können mit freien Aminogruppen von Proteinen und DNA-Basen reagieren und diese miteinander verknüpfen (Kawanishi et al. 2014; Kennedy-Darling und Smith 2014; Stinglele und Jentsch 2015). Da Aldehyde, vor allem FA und Acetaldehyd (AA), in relevanten Mengen im untersuchten Verbrennungsaerosol vorkamen (Tabelle 3.5), stellt die Bildung von DPCs durch Aldehyde in der Gasphase des Holzrauchs eine plausible Erklärung für die beobachteten Veränderungen im Transkriptom dar. Dennoch muss beachtet werden, dass auch oxidative Schädigungen zur Bildung von kovalenten PCNA Verknüpfungen (Montaner et al. 2007) und DPCs (Barker et al. 2005) führen können. Daher wurde als nächstes versucht, Aldehyde als Auslöser der beobachteten Effekte experimentell zu bestätigen.

### 3.3.7.2. Aldehyde in der Gasphase als Verursacher der toxischen Effekte

Zunächst wurde überprüft, ob in A549 Zellen auch nach submerser Behandlung mit FA die Bildung von PCNA-Trimeren im Western Blot beobachtet werden kann. Wie erwartet, führte bereits eine kurze Behandlungszeit von zwei Stunden zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der PCNA-Trimere in A549 Zellen (Abb. A14). Auch die von Montaner et al. (2007) ebenfalls beschriebenen Hexamere wurden detektiert.

Mittels der Immunfluoreszenzmikroskopie wurde überprüft, ob Aldehyde auch die durch die Gasphase induzierte Phosphorylierung von H2AX (Abb. 3.25) erklären können. Tatsächlich führte die submerse Behandlung von A549 und BEAS-2B Zellen mit FA zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der  $\gamma$ -H2AX Foci (Abb. 3.35 und repräsentative Aufnahmen in Abb. A15 und A16). Die  $\gamma$ -H2AX Foci Häufigkeit in den unbehandelten Zellen fiel höher aus, als bei Zellen die im ALI-System mit Reinluft begast wurden (Abb. 3.25). Da im Submersversuch keine Trennung des Luftraums über den Zellkulturen vorhanden war, wurden die Kontrollproben möglicherweise mit ausgasstem FA



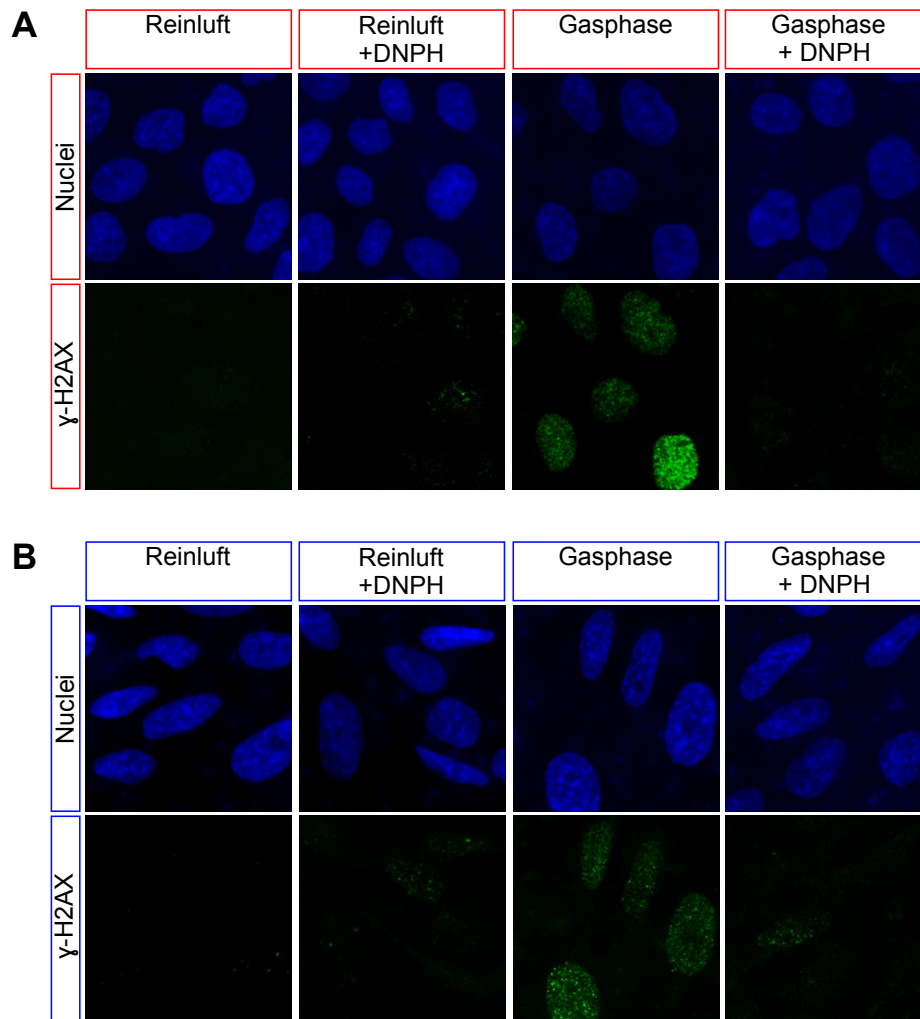
**Abbildung 3.35.: Die Submersbehandlung mit Formaldehyd ist ausreichend für eine  $\gamma$ -H2AX Foci Bildung wie sie nach Exposition gegenüber Holzrauch beobachtet wurde.** A549 und BEAS-2B Zellen wurden 2 h mit 0, 50, 200, 500  $\mu$ M und 5 mM Formaldehyd (FA) in FKS-freiem Zellkulturmedium behandelt. Anschliessend wurde mittels Immunfluoreszenz softwaregestützt die Anzahl der  $\gamma$ -H2AX Foci quantifiziert. Abgebildet sind die kumulativen  $\gamma$ -H2AX Foci pro Zelle aus mindestens 1300 analysierten Zellen aus 3 unabhängigen Versuchen mit 1-2 Replikaten. Je Replikat wurden mindestens 20 Bilder von unterschiedlichen Stellen des Zellrasens aufgenommen. Aus Gründen der Darstellbarkeit wurden pro Bedingung maximal 25 Zellen je Y-Achsenheit abgebildet und Werte über dem 99% Quantil supprimiert. Die Boxplots zeigen den Mittelwert (farbige Raute), Median (dicke Linie), das 1. bis 3. Quartil (Box) und den entsprechenden 1.5-fachen IQR (Whisker). Signifikant unterschiedliche Mittelwerte zur Reinluftkontrolle gekennzeichnet mit \*\*\* =  $p < 0.001$  nach Kruskal-Wallis mit Dunn's post-hoc Test.

aus den höher konzentrierten Proben kontaminiert. Trotzdem wurde in den mit FA behandelten Zellen eine deutlich höhere  $\gamma$ -H2AX Foci Rate detektiert als in den Kontrollen. Auffälligerweise zeigt die höchste getestete FA Konzentration in BEAS-2B Zellen aber eine Abnahme der  $\gamma$ -H2AX Foci Häufigkeit, obwohl ein deutliches  $\gamma$ -H2AX Signal vorhanden war (Abb. A16). Dies ist auf die automatische Analyse zurückzuführen. Das fokale  $\gamma$ -H2AX Signal war bei dieser Konzentration weniger diskret abgegrenzt, weshalb die Foci durch die Analysesoftware schlechter erkannt werden konnten. Möglicherweise spielt hier auch zusätzlich die Kinetik eine Rolle. Die Verbrennungsgase wirken während eines ALI-Expositionsversuchs nicht wie bei Submersversuchen gleich zu Beginn als Bolus auf die Zellen. Stattdessen akkumulieren wasserlösliche Substanzen, wie die Aldehyde, kontinuierlich während der vierstündigen Expositionsdauer. Aus diesem Grund wurde für die submerse Inkubation mit FA bewusst eine kürzere Inkubationszeit von 2 h gewählt. Bei längerer Inkubation mit FA nimmt die Anzahl der  $\gamma$ -H2AX Foci noch weiter zu, wie exemplarisch in Abb. A17 gezeigt.

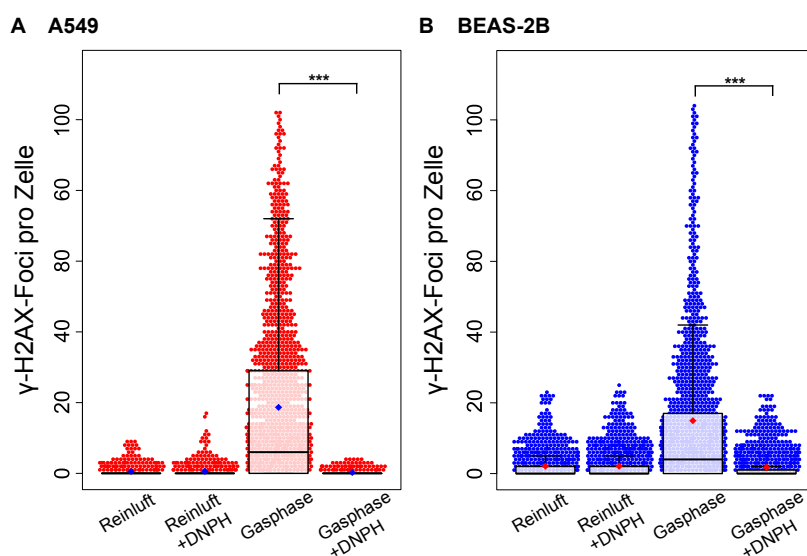
Die FA bedingte Phosphorylierung von H2AX ist auf die Bildung von DPCs zurückzuführen. Bei der Replikation führen DPCs auf dem Leitstrang zu einer Blockierung der Helicase, was zu Replikationsstress und Phosphorylierung von H2AX führt (Stingele und Jentsch 2015; Zeman und Cimprich 2014). In Hefe und Extrakten von *Xenopus* Eiern wurde jüngst ein replikationsabhängiger, DPC spezifischer Reparaturmechanismus beobachtet, der auf der Proteolyse von DPCs bei blockierten Replikationsgabeln beruht (Duxin et al. 2014; Stingele et al. 2014). Ebenfalls führt die Inhibierung des Proteasoms bei Behandlung humaner Zellen mit FA zu einer stärkeren Phosphorylierung von H2AX (Ortega-Atienza et al. 2015). In Hefe ist die Protease Wss1 für die Proteolyse von DPCs zuständig (Stingele et al. 2014), ihr Homolog SPRTN/DVC1 übernimmt diese Funktion vermutlich im Säuger, dies wurde bislang aber noch nicht nachgewiesen (Stingele und Jentsch 2015). Wss1 hinterlässt ein kurzes Peptidaddukt an der DNA, welches von Helicasen toleriert wird, zum Vorschreiten der Replikation aber eine Polymerase mit Fähigkeit zur Transläsionssynthese benötigt. Die verbleibenden Peptidaddukte können über NER repariert werden (Stingele und Jentsch 2015), was eine gute Erklärung für die mit der alkalischen Entwindung festgestellte erhöhte Einzelstrangbruchrate nach Behandlung mit der Gaspase der Holzverbrennung darstellt. DPCs mit kleinen Proteinen können unabhängig von der DPC-Reparatur auch direkt und replikationsunabhängig mit NER behoben werden (Stingele und Jentsch 2015). Inwiefern die globale Genregulation nach Holzrauchbehandlung bzw. das Ergebnis der Connectivity Map Analyse durch die Bildung von DPCs erklärbar ist, wird in der zusammenfassenden Diskussion unter Punkt 4.3 diskutiert.

Um zu zeigen, dass Aldehyde aus der Gaspase des Verbrennungsaerosols tatsächlich für die Bildung von  $\gamma$ -H2AX Foci verantwortlich sind, wurden die Carbonyle aus der Gaspase entfernt und im ALI-System die Bestimmung der  $\gamma$ -H2AX Foci Bildung wiederholt. Zur Entfernung der Carbonyle wurden Kartuschen mit DNPH (2,4-Dinitrophenylhydrazin) verwendet. Diese Kartuschen sind Mittel der Wahl bei der Probenahme von flüchtigen Carbonylen und wurden auch für die Carbonylanalytik in Tabelle 3.5 verwendet. Das DNPH ist auf einem Trägermaterial aus feinkörnigem Silikagel aufgebracht und in ein Glasröhrchen gepackt. Carbonyle, die durch das Röhrchen





**Abbildung 3.36.: Die Entfernung reaktiver Carbonyle aus der Verbrennungsgasphase verhindert die Bildung von  $\gamma$ -H2AX Foci.** A549 und BEAS-2B Zellen wurden 4 h mit Reinluft und partikelgefiltertem Aerosol (Gasphase) behandelt, die zur Entfernung von Carbonylen über DNPH gefüllte Kartuschen oder direkt auf die Zellen geleitet wurden. Gezeigt sind repräsentative Ausschnitte der für die quantitative  $\gamma$ -H2AX Foci Analyse in Abb. 3.37 verwendeten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von A549 (A) und BEAS-2B Zellen (B).



**Abbildung 3.37.: Die Entfernung reaktiver Carbonyle aus der Verbrennungsgasphase verhindert die Bildung von  $\gamma$ -H2AX Foci.** A549 und BEAS-2B Zellen wurden 4 h mit Reinluft und partikelgefiltertem Aerosol (Gasphase) behandelt, die zur Entfernung von Carbonylen über DNPH gefüllte Kartuschen oder direkt auf die Zellen geleitet wurden. Danach wurde mit mittels Immunfluoreszenz softwaregestützt die Anzahl der  $\gamma$ -H2AX Foci quantifiziert. Abgebildet sind die kumulativen  $\gamma$ -H2AX Foci pro Zelle aus 2 unabhängigen Versuche mit je 2 Transwell-Replikaten. Je Replikat wurden mindestens 20 Bilder von unterschiedlichen Stellen der Transwellmembran aufgenommen. Insgesamt wurden mindestens 1100 Zellen je Bedingung analysiert. Aus Gründen der Darstellbarkeit wurden pro Bedingung maximal 25 Zellen je Y-Achseneinheit abgebildet und Werte über dem 99% Quantil supprimiert. Die Boxplots zeigen den Mittelwert (farbige Raute), Median (dicke Linie), das 1. bis 3. Quartil (Box) und den entsprechenden 1.5-fachen IQR (Whisker). Signifikant erhöht zur Reinluftkontrolle gekennzeichnet mit \*\*\* =  $p < 0.001$  nach Kruskal-Wallis mit Dunn's post-hoc Test.

geleitet werden, gehen eine spezifische Derivatisierung mit dem DNPH ein und werden so auf dem Trägermaterial zurückgehalten. Die Kartuschen wurden im ALI-Expositionssystem verwendet um einzelne Positionen mit carbonylfreier Gasphase zu exponieren und die  $\gamma$ -H2AX Foci Bildung mit der unveränderten Gasphase zu vergleichen. Tatsächlich blieb nach Exposition von A549 und BEAS-2B Zellen mit der DNPH-gereinigten Gasphase die Phosphorylierung von H2AX aus (Abb. 3.36). Die Quantifizierung bestätigte die Abnahme der  $\gamma$ -H2AX Foci auf das Niveau der Reinluftkontrolle (Abb. 3.37). Es kann aber nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass auch andere Stoffe aus der Gasphase unspezifisch an das Trägermaterial adsorbierten. Um diese Zweifel auszuräumen, könnte das Trägermaterial auf andere adsorbierte Substanzklassen untersucht werden oder eine umfassendere Gasphasenanalytik zu betreiben, z.B. mit SPI-/REMPI-TOFMS (Mühlberger et al. 2002; Zimmermann et al. 1997). Darüberhinaus wäre es sinnvoll, ein Experiment mit einer künstlich hergestellten Gasphase, die lediglich die Carbonyle enthält, durchzuführen. Der plausible Wirkmechanismus der Aldehyde, sowie die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus den ALI-Experimenten durch submerse Anwendung von Formaldehyd, deuten jedoch klar daraufhin, dass mit reaktiven Aldehyden in der Gasphase des Holzraucheraerosols, vor allem Formaldehyd und Acetaldehyd, die Substanzen identifiziert wurden, die für die genotoxischen Wirkungen *in vitro* verantwortlich sind. Auf die Bedeutung dieses Ergebnisses, auch in Bezug auf die anderen festgestellten Effekte, wird im folgenden Kapitel eingegangen.



## 4. Zusammenfassende Diskussion

### 4.1. Die Weiterentwicklung des Air-Liquid-Interface Expositionssystems erlaubt eine bessere Untersuchung von Verbrennungsaerosolen

Ein zentrales Element dieser Arbeit ist die Verwendung der ALI-Exposition zur toxikologischen Charakterisierung von Holzverbrennungsemissionen. Bislang ist die *de facto* Standardmethode zum Testen der Toxizität von Aerosolen *in vitro* die submerse Applizierung von gesammelten Partikeln. Das ALI-Expositionsverfahren hat aber eine Reihe von Vorteilen gegenüber der Submersexposition. Bei der Untersuchung von Verbrennungsemissionen ist dies in erster Linie die Möglichkeit die gasförmigen Komponenten des Aerosols zu untersuchen. Am Institut für Technische Chemie wurde in den vergangenen Jahren ein System für die ALI-Exposition von kultivierten Zellen entwickelt. Dieses System wurde während dieser Promotion für den Einsatz mit Verbrennungsaerosolen weiterentwickelt. So wurde die Möglichkeit geschaffen, Zellen neben dem Verbrennungsaerosol während des selben Versuchs auch mit gefilterter Raumluft zu behandeln. Bislang konnten diese Referenzexperimente nur durch separate Experimente oder Behandlung der Zellen mit Reinluft außerhalb des ALI-Systems in einem Inkubator durchgeführt werden. Dies hatte zur Folge, dass Ergebnisse, die unter verschiedenen biologischen und technischen Bedingungen erhalten wurden, verglichen werden müssen und daher nur eingeschränkt aussagekräftig waren. Deshalb stellt die in dieser Arbeit beschriebene Weiterentwicklung einen wichtigen Fortschritt für die Qualität der Untersuchungsergebnisse dar.

Außerdem wurde die biologische Verträglichkeit der Verwendung eines elektrischen Feldes zur Erhöhung der Partikeldosis gezeigt. Durch die elektrostatische Deposition konnte die partikuläre Dosis des Holzraucherosols um den Faktor 3.9 erhöht werden, was z.B. die Beobachtung akut zytotoxischer Effekte durch die Partikel ermöglichte. Von dieser Möglichkeit wurde in den meisten Experimenten allerdings kein Gebrauch gemacht, um sekundäre unspezifische Effekte, hervorgerufen durch den induzierten Zelltod, zu vermeiden. Die mit der Hochspannung erzielte Partikeldosis und ihre Relevanz wird im Abschnitt 4.4 diskutiert. Die elektrostatische Deposition ermöglicht ferner auch die Untersuchung von Dosis-Wirkungsbeziehungen der abgeschiedenen Partikel durch Verwendung unterschiedlicher Feldstärken. Für gasförmige Komponenten ist die Modulierung der Dosis innerhalb eines Experimentes technisch bislang nicht möglich. Denkbar wäre in der Probeleitung für individuelle Expositionskammern unterschiedlich große Anteile Umgebungsluft mit der Gasphase zu mischen. Eine Verringerung der Partikeldosis lässt sich auf diese Weise aber nur

unter Einschränkungen erzielen, da aufgrund der größenabhängigen Aerodynamik von Partikeln keine repräsentative Verdünnung gewährleistet werden kann (siehe Punkt 1.2.2 zur isokinetischen Probenahme).

Das ALI-System verfügt über die Möglichkeit, mittels einer Quarzkristallmikrowaage (QCM) die deponierte Partikeldosis direkt gravimetrisch zu bestimmen (Mülhopt et al. 2009). Die Partikeldosis des untersuchten Aerosols war aber geringfügig zu niedrig, um sie mit der QCM bestimmen zu können. Mit der elektrostatischen Partikelabscheidung ist die QCM nicht kompatibel. Die Partikeldosis wurde daher indirekt mit zwei unterschiedlichen Methoden abgeschätzt: 1.) dem Vergleich mit einem Modellaerosol aus fluoreszierenden Partikeln und 2.) der Bildanalyse von TEM-Aufnahmen. Mit beiden Methoden wurde eine vergleichbare Partikeldosis ermittelt. Trotzdem haben beide Methoden Limitierungen. Die Bestimmung anhand des Modellaerosols ist nur dann repräsentativ, wenn die Partikelgrößenverteilung der verglichenen Aerosole identisch ist. Dies ist bei einem dynamischen Verbrennungsprozeß nur eingeschränkt umsetzbar. Außerdem scheinen sich die Fluorescein-Natrium Partikel im elektrischen Feld anders zu verhalten als die Verbrennungspartikel. Die TEM Analyse hingegen ist sehr zeitaufwändig und kann bei überlagerten Agglomeraten die Partikelzahl nicht korrekt bestimmen. Daher sollte in zukünftigen Untersuchungen versucht werden, die deponierte Partikelmasse über direktere Methoden zu bestimmen. Vielversprechend ist hierfür die Analyse von Levoglucosan, welches bei der unvollständigen Verbrennung in relativ hohen Mengen gebildet wird. Mit Kenntnis des Levoglucosangehaltes in der partikulären Phase und der Quantifizierung des abgeschiedenen Levoglucosans könnte möglicherweise eine noch präzisere Bestimmung der Partikeldosis als bisher erfolgen. Die technischen Verbesserungen im weiterentwickelten ALI-System, sowie deren biologische Etablierung führten zu einer hohen Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der Messergebnisse, die aufwändige und sensitive Omics-Analysen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, erst ermöglichen. Darüberhinaus wurde das neue System erfolgreich auf mehreren Messkampagnen des virtuellen Helmholtz Instituts HICE ([www.hice-vi.eu](http://www.hice-vi.eu)) eingesetzt, auf denen weitere Verbrennungsaerosole untersucht wurden, wie zum Beispiel die Emissionen eines Schiffsdieselmotors (Oeder et al. 2015; Sapcaru et al. 2016).

## 4.2. Die Gasphase ist maßgeblich für die toxikologischen Wirkungen von Holzverbrennungsemissionen *in vitro*

Mit dem ALI-Expositionssystem wurden die Wirkungen von Emissionen einer Buchenholzverbrennung untersucht. Das Abgas dieser Buchenholzverbrennung in einem haushaltsüblichen Kaminofen wurde 1:10 mit gefilterter Umgebungsluft verdünnt und für 4 h auf A549 und BEAS-2B Zellen geleitet. Um einen Überblick über die Wirkungen des Holzrauchs zu erhalten, wurde eine globale mRNA-Sequenzierung nach Behandlung mit dem kompletten Aerosol und der Gasphase im Vergleich zur Behandlung mit gefilterter Umgebungsluft, durchgeführt. Zur großen Überraschung fiel dabei auf, dass der weitaus größte Teil der differentiellen Genregulation durch die Gasphase bestimmt wurde. Die gesundheitlichen Wirkungen von Aerosolen wurden bislang fast

ausschließlich anhand der partikulären Phase beurteilt. Dies mag hauptsächlich an der eingeschränkten Verfügbarkeit und dem erhöhten technischen Aufwand des ALI-Expositionsverfahrens liegen. Bemerkenswerterweise differenzieren aber selbst Studien die mit anderen Expositionssystem durchgeführt wurden in der Regel nicht zwischen Effekten des kompletten Aerosols und der partikelfreien Gasphase. So kann auch bei den beiden einzigen bisher veröffentlichten Arbeiten zur Wirkung von Holzrauch aerosolen der Beitrag der Gasphase nicht beurteilt werden (Hawley und Volckens 2013; Künzi et al. 2013). Interessanterweise führte eine jüngst veröffentlichte Studie die *in vitro*-Toxizität von Zigarettenrauch, in Form einer verminderten metabolischen Aktivität, aber zu 90% auf dampf- oder gasförmige Bestandteile zurück (Azzopardi et al. 2015).

Der hier diskutierte dominierende Effekt des Gasphase bedeutet nicht, dass die bei der Holzverbrennung entstehenden Partikel keine biologische Aktivität aufweisen. In den Mengenverhältnissen, in denen Partikel und flüchtige Verbindungen bei der Holzverbrennung gebildet werden, sind die flüchtigen Verbindungen hinsichtlich der globalen Genregulation aber offensichtlich um ein vielfaches potenter. Die Mengenverhältnisse von Partikeln und Gasphase zum Zeitpunkt der Emission müssen aber nicht mit den regionalen Mengenverhältnissen in der Lunge nach Inhalation von Aerosolen übereinstimmen (siehe Diskussion zur Relevanz ab S. 114). In diesem Zusammenhang ist es von großem Interesse Experimente durchzuführen, in denen die Gasphase von den Partikeln abgetrennt wird und die reinen Partikel auf die Zellkulturen geleitet werden, wie sie zum Beispiel von Holder et al. (2007) mit Dieselabgasen durchgeführt wurden, wobei sie einen Teil der akuten Toxizität und Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen auf die Gasphase zurückführen konnten.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis der hier vorgestellten Arbeit war, dass die Veränderung der Genregulation, wie auch alle zur Verifizierung durchgeführten Untersuchungen, nur geringe Unterschiede zwischen A549 und BEAS-2B Zellen zeigte. Diese Ergebnisse waren ebenso überraschend, denn aufgrund der unterschiedlichen Herkunft der Zellen (Alveolen und Broncheolen) und der Tatsache, dass es sich bei A549, im Gegensatz zu BEAS-2B Zellen, um Krebszellen handelt, wurden stärkere Unterschiede erwartet. Zu den wenigen Ausnahmen hiervon zählte die Antwort auf PAKs, die in A549 deutlich durch die Partikel induziert war, in BEAS-2B hingegen nicht. In BEAS-2B wiederum war die Regulation inflammatorischer Gene stärker ausgeprägt.

Zur Identifizierung der durch die Gasphase beeinträchtigten Signalwege, wurde anhand der differentiell regulierten Transkripte eine GO-Term Analyse durchgeführt. Hierbei wurde festgestellt, dass unter anderem die DNA-Schadensantwort, Zellzykluskontrolle, Aktivierung von MAP-Kinasen, Apoptose und der Energiestoffwechsel besonders stark auf Transkriptionsebene verändert waren. Die GO-Term Analyse beruht auf einer rein qualitativen Zuordnung von Genen zu biologischen Prozessen (Huang et al. 2009; Yon Rhee et al. 2008). Daher können auch regulierte Gene, die nur eine untergeordnete Funktion in einem Prozess haben, in ausreichender Zahl dazu führen, dass dieser in der GO-Analyse als signifikant verändert erkannt wird. Ebenso wird nicht differenziert ob ein zugeordnetes Gen induziert oder reprimiert war und somit den entsprechenden GO-Term positiv oder negativ beeinflusst. Das Ergebnis der GO-Analyse wurde daher durch individuelle Kontrolle der

beteiligten Gene auf Plausibilität überprüft. In jedem Fall waren klassische Markergene involviert, die die Aktivierung der jeweiligen Signalwege bestätigen.

Mit Western Blots wurde die durch die Transkriptomanalyse vorhergesagte Aktivierung der MAPK durch Gasphasenkomponenten bestätigt. Sowohl p38, JNK und ihre Substrate MK-2 und c-Jun, als auch ERK1/2 waren nach Exposition gegenüber flüchtigen Verbrennungsprodukten aktiviert. MAPK sind Sensoren für verschiedene Formen von zellulärem Stress (Chang und Karin 2001). Die Aktivierung der MAPK ist ein häufig untersuchter Parameter für die Wirkung von Partikeln aus der Verbrennung und wurde zum Beispiel mit ROS, Metallen oder PAKs in Verbindung gebracht (Corsini et al. 2013; Fritsch-Decker et al. 2011; Jarvis et al. 2014). In den submers durchgeführten Untersuchungen von Holzpartikelproben wurde zwar die ROS-Generierung auch in dieser Arbeit nachgewiesen, für die Aktivierung der MAPK nach ALI-Exposition war aber allein die Gasphase verantwortlich. Flüchtige Aromaten wie Styrol und Benzol werden bei der Holzverbrennung gebildet und können ebenfalls über Generierung von ROS die MAPK Signalkaskade aktivieren (McDonald et al. 2000; Mögel et al. 2011). In den hier analysierten Veränderungen des Transkriptoms waren allerdings keine deutlichen Anzeichen für eine ROS Generierung durch die Gasphase zu erkennen. Darüber hinaus zeigten präliminäre Untersuchungen mit dem DCF-Test keine erhöhte ROS Generierung nach Exposition gegenüber Holzrauch an.

Stattdessen wurde im Transkriptom eine deutliche und spezifische Antwort auf DNA-Schäden festgestellt, die ebenfalls zur Aktivierung der MAPK führen kann (Herrlich et al. 2008; Kharbanda et al. 2000; Schreck et al. 2015). Die DNA-schädigende Wirkung der Gasphasenkomponenten wurde mittels der Immunfluoreszenzfärbung von  $\gamma$ -H2AX und der alkalischen Entwindung bestätigt. Auch hier waren Gasphasenkomponenten für die beobachteten Wirkungen verantwortlich. Als Ursache der  $\gamma$ -H2AX Bildung konnten später reaktive Aldehyde, vor allem FA und AA, identifiziert werden. Die gentoxische Wirkung von Aldehyden stellt ebenfalls eine plausible, aber nicht die einzige Erklärung, für die mit der alkalischen Entwindung beobachtete erhöhte Einzelstrangbruchrate dar (siehe nächster Abschnitt).

Wie durch die Veränderungen der Genexpression vorausgesagt, lagen nach Einfluß der gasförmigen Verbrennungsabgase zahlreiche Intermediate des TCA in veränderten Konzentrationen vor. Mittels  $^{13}\text{C}$ -markierter Glucose und Glutamin wurden auch mehrere Veränderungen im Gleichgewicht der metabolischen Flüsse festgestellt. Am markantesten waren die Akkumulation von Succinat nach verstärkter Inkorporation von Glutamat, die Abnahme der oxidativen Verstoffwechslung von Pyruvat durch den TCA und die erhöhte reduktive Carboxylierung von  $\alpha$ -Ketoglutarat. Erhöhte Succinatgehalte führen zur Akkumulation von HIF-1 $\alpha$  (Selak et al. 2005). Die durch HIF-1 induzierten PDK Isoformen sind im Stande, die oxidative Pyruvatverstoffwechslung zu Gunsten der anaeroben Glykolyse zu verschieben (Koh et al. 2008). Die anaerobe Glykolyse kann wiederum die reduktive  $\alpha$ -Ketoglutarat-Carboxylierung begünstigen (Fendt et al. 2013). Daher sollte die Regulation von HIF-1 $\alpha$  durch Holzrauch in weiteren Studien näher untersucht werden. Inwiefern die Änderungen im Metabolismus auch mit der MAPK-Aktivierung und DNA-Schädigung durch



die Gasphasenkomponenten zusammenhängen könnten und ob auch hier reaktive Aldehyde eine Rolle spielen, wird im nächsten Abschnitt diskutiert.

Darüber hinaus beeinflusste die Gasphase die Expression von Genen, die den Vorgang der EMT steuern oder anzeigen. Die EMT ist von pathophysiologischem Interesse, da sie zur Entstehung von Fibrose und der Tumormetastasierung beiträgt (Kim et al. 2006; Willis und Borok 2007). Die Induktion von EMT durch Gasphasenkomponenten des Holzrauch-aerosols wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Ebenso konnten auch keine publizierten Arbeiten gefunden werden, die EMT in Zusammenhang mit Holzverbrennungsemissionen untersuchten. Zigarettenrauch wurde hingegen bereits *in vivo* und *in vitro* mit der Induzierung von EMT in Verbindung gebracht (Eurlings et al. 2014; Milara et al. 2013). Die hier gezeigte Erhöhung vieler transkriptioneller Marker eines Prozesses mit bekannten pathologischen Konsequenzen nach bereits vierstündiger Behandlung ist zusätzlich Anlass genug, der EMT durch Inhalation von Verbrennungsemissionen zukünftig mehr Aufmerksamkeit zu schenken.

### 4.3. Reaktive Aldehyde als Hauptverursacher der toxischen Wirkungen von Holzrauch

Die systembiologische Connectivity Map-Analyse ermittelte eine hohe Ähnlichkeit des Transkriptom von Zellen, die mit der Gasphase des Holzrauchs behandelt worden sind, mit dem transkriptionellen Wirkprofil von Substanzen, die die Bildung von DPCs fördern. Bei der Holzverbrennung entstehen reaktive Aldehyde in toxikologisch relevanten Mengen, deren Fähigkeit DPCs auszubilden gut untersucht ist (Stingele und Jentsch 2015). In dieser Arbeit konnte für A549 Zellen gezeigt werden, dass die Behandlung mit FA unter submersen Bedingungen zu einer vergleichbaren Bildung von  $\gamma$ -H2AX Foci und Proteinquervernetzung führt, wie die Verbrennungsgasphase. Das Entfernen von Carbonylen aus der Gasphase durch die Verwendung von DNPH-Kartuschen führte zum vollständigen Rückgang der  $\gamma$ -H2AX Foci Bildung auf das Niveau der Reinluftkontrolle. Zusammengefasst belegen diese Ergebnisse, dass die  $\gamma$ -H2AX Foci Bildung durch das untersuchte Holzrauch-aerosol auf die DPC-Bildung durch reaktive Aldehyde in der Gasphase, hauptsächlich FA und AA, zurückgeht.

Es stellt sich die Frage, ob auch die anderen Wirkungen des Holzrauch-aerosols auf Aldehyde zurückzuführen sind. Die Auswirkung der Entfernung der Carbonyle aus der Gasphase wurde nur durch Quantifizierung der  $\gamma$ -H2AX Foci überprüft, weshalb letztlich die Rolle von Aldehyden bei keinem der anderen Endpunkte experimentell belegt ist. Es gibt aber Gründe die dafür sprechen, dass auch viele der anderen Wirkungen der Gasphase durch diese Stoffgruppe hervorgerufen wurden. Die Connectivity Map-Analyse beruht nicht auf der Expression von Genen einzelner Signalwege, sondern auf den genomweit am signifikantesten regulierten Genen. Obwohl diese Gene an unterschiedlichsten Prozessen beteiligt sein könnten, handelte es sich bei drei (A549) bzw. vier (BEAS-2B) der besten fünf Übereinstimmungen um Substanzen die ebenfalls DPCs ausbilden. Bei der Diskussion möglicher anderer Ursachen für die Gasphaseneffekte wurde bei

mehreren Endpunkten auch festgestellt, dass z.B. auch ROS die Beobachtungen erklären könnten. Wenn ROS eine prominente Rolle gespielt hätten, wären vermutlich aber höhere Konnektivitäten zu ROS generierenden Substanzen, bzw. negative Konnektivitäten zu anti-oxidativ wirksamen Verbindungen aus der Datenbank der Connectivity Map erhalten worden.

Veröffentlichte Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bringen außerdem DPCs bzw. andere Wirkungen von Aldehyden mit den weiteren untersuchten Endpunkten in Verbindung. Formaldehyd führt zur Bildung von SSB, was das Ergebnis der alkalischen Entwindung erklärt (Grafstrom et al. 1984). Die Bildung von SSB nach Formaldehydbehandlung ist zumindest teilweise auf eine NER-abhängige Reparatur zurückzuführen, denn Zellen mit defekter NER zeigten eine erniedrigte SSB Rate (Grafstrom et al. 1984). Auch hierbei handelt es sich vermutlich um die Folgen von DPCs. DPCs mit mehr als etwa 11 kDa können zwar durch NER nicht mehr repariert werden, die DPC-spezifische Reparatur hinterlässt aber nach Proteolyse von großen DPCs kurze Peptidaddukte, die mit NER effizient repariert werden können (Reardon et al. 2006; Stingle und Jentsch 2015). Die NER-abhängige Reparatur der Peptidaddukte könnte auch erklären warum in der Transkriptomanalyse NER Gene induziert waren. Dennoch können andere Ursachen für eine Bildung von Strangbrüchen durch Gasphasenbestandteile nicht ausgeschlossen werden. Die Alkalische Entwindung kann durch Verwendung schadensspezifischer Glykosylasen auch zur Quantifizierung anderer DNA-Schäden benutzt werden. So könnte zum Beispiel überprüft werden, ob oxidative Schädigungen durch die Gasphase im Holzrauch zur erhöhten SSB-Rate beitragen (Hartwig 1996).

Reaktive Aldehyde sind ebenfalls im Stande die MAPK-Kaskade zu aktivieren. Submerse Behandlung mit FA führt in A549 Zellen zur Phosphorylierung von p38 und JNK (Lim et al. 2010; Yoshida und Ibuki 2014). Die MAPK Aktivierung durch FA führt zur Aktivierung der AP-1 Zielgene c-Jun und c-Fos auf transkriptioneller Ebene (Yoshida und Ibuki 2014), die auch nach Holzrauchbehandlung deutlich induziert waren. Wie genau Aldehyde die MAPK aktivieren ist nicht bekannt. MAPK können aber durch verschiedene Arten von DNA-Schädigungen aktiviert werden (Kharbanda et al. 2000; Schreck et al. 2015). Die submerse Behandlung mit FA involviert ebenfalls die Bildung von ROS (Yoshida und Ibuki 2014). ROS selbst sind gut untersuchte Aktivatoren der MAPK (Ray et al. 2012). Aufgrund der oben diskutierten Gründe spielen sie in den zellulären Antworten auf die Gasphasenbehandlung vermutlich keine entscheidende Rolle, können als Ursache der MAPK-Aktivierung aber nicht ausgeschlossen werden.

Ob Aldehyde auch die Veränderungen im TCA erklären können ist deutlich schwieriger zu beurteilen. Es existieren noch sehr wenige Forschungsarbeiten zu Veränderungen der metabolischen Flüsse durch toxische Substanzen. Zum Beispiel sind keine Arbeiten zu Veränderung im TCA durch Exposition gegenüber Aldehyden oder DPCs verfügbar. Es ist hingegen bekannt, dass die Inhibierung von  $\alpha$ -Ketoglutarat abhängigen Histon-Demethylasen (KDM), was durch die Akkumulation von Succinat und Fumarat bewirkt wird, die Regulation des TCA mit der DNA-Schadensantwort verknüpft (Xiao et al. 2012). So konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung von KDM durch Fumarat wiederum zur Akkumulation von DNA-PK an DSB führen kann, wodurch die NHEJ begünstigt wird. Interessanterweise war dabei die Akkumulation von Fumarat selbst Teil einer

positiven Rückkopplung in Folge von DSB mit einhergehender Aktivierung von DNA-PK. DNA-PK reguliert die lokalen Fumaratgehalte an der Schadensstelle durch Inaktivierung von Fumarase (Xiao et al. 2012). Erhöhte Fumaratgehalte könnten also die Folge von der DSB induzierten Signalinduktion sein (Jiang et al. 2015). Eine Akkumulation von Succinat nach dem gleichen Mechanismus wurde allerdings noch nicht gezeigt. Für SIRT4, ein Mitglied der Sirtuin-Proteinfamilie, ist bekannt, dass es nach DNA-Schädigung den Eintritt von Glutamin in den TCA limitiert um die Proliferation zu Gunsten der DNA-Reparatur zu verlangsamen (Jeong et al. 2013). Dies steht allerdings im Gegensatz zur Wirkung des Holzraucherosols, das die Verstoffwechslung von Glutamin sogar begünstigte. Auch MAP-Kinasen wurden bereits mit der Beeinflussung des Energiestoffwechsels in Verbindung gebracht. JNK kann beispielsweise in Neuronen die Pyruvatdehydrogenaseaktivität erniedrigen, was sich in einem erniedrigten oxidativen Pyruvatmetabolismus und stattdessen einer verstärkten anaeroben Glykolyse äußert (Zhou et al. 2008). Diese Veränderungen wurden auch nach Holzrauchbehandlung beobachtet und passen gut zur festgestellten Aktivierung von JNK. Letztlich ist die Regulation der metabolischen Flüsse sehr komplex und bisher zu wenig erforscht um abschließend beurteilen zu können, ob die beobachteten Veränderungen auf reaktive Aldehyde zurückzuführen sind.

Auch wenn experimentell nur für die  $\gamma$ -H2AX Foci Bildung Aldehyde als Ursache bestätigt wurden, geben die Ergebnisse insgesamt Grund zur Annahme, dass Aldehyde im Abgas der Holzverbrennung für die meisten akuten Effekte nach 4 h Expositionszeit maßgeblich verantwortlich sind. Um diese Hypothese zu bestätigen, wäre auch hier eine Analyse des Transkriptom und Metaboloms nach Exposition gegenüber reinen Aldehyden oder definierten Mischungen möglich.

#### 4.4. Wirkung partikulärer Holzrauchemissionen

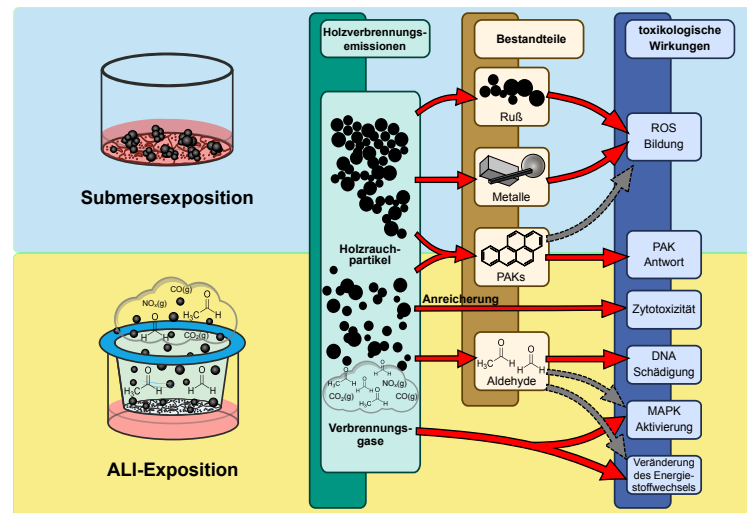
In den Untersuchungen mit dem frisch generierten Verbrennungsaerosol an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht waren die Wirkungen der Gasphase klar dominierend. Dies bedeutet aber nicht, dass die bei der Verbrennung entstehenden Partikel ohne toxikologische Relevanz sind. Im Gegensatz zu Gasen können Partikel nach Inhalation in der Lunge verbleiben und akkumulieren (Oberdörster et al. 2005), weshalb der Partikelfraktion für langfristige Effekte eine große Bedeutung zukommt. Überraschenderweise wurde in den ALI-Untersuchungen bezüglich der akuten Toxizität eine deutlich höhere Potenz der Partikel festgestellt als in Submersuntersuchungen. Nach ALI-Exposition führte bereits eine Partikeldosis von 1.2 - 1.3  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  zu einer erhöhten LDH-Freisetzung, während unter submersen Bedingungen selbst die höchste getestete Dosis von 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  keinen Zelltod auslöste. Die Diskrepanz der Ergebnisse erklärt sich vermutlich durch zwei Dinge. Zum einen können Zellen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht empfindlicher auf Behandlungen reagieren als submers kultivierte Zellen, möglicherweise wegen des unterschiedlichen Sauerstoff-Partialdrucks (Ghio et al. 2013). Zum anderen führt das Suspendieren der Partikel im Medium zu Partikelagglomeraten mit veränderten Eigenschaften, die möglicherweise weniger toxisch sind als deponierte Partikel unter ALI-Bedingungen. Zum Beispiel könnten adsorbierte Substanzen im Medium verteilt,

und somit verdünnt werden oder eine zusätzliche Agglomeration könnte die effektive Oberfläche verringern. Die Ursache des Verlusts der Membranintegrität nach 4 h Exposition konnte nicht abschließend geklärt werden. Bei einer angenommenen vollständigen Aufnahme der Partikel in die Zellen könnten toxische Metallkonzentrationen von  $Zn^{2+}$  oder  $Fe^{2+}$  erreicht werden. Auch extrazellulär könnten Metalle toxisch wirken. Wenn sich Metallsalze aus Partikeln lösen, könnten unter ALI-Bedingungen an der Zelloberfläche lokal hochkonzentrierte Metallionen entstehen. Metalle können extrazellulär die Zellmembran schädigen, zum Beispiel durch lokale ROS Generierung, die zur Oxidation der Membranlipide oder Thiolgruppen in Membranständigen Proteinen führt (Stohs und Bagchi 1995). Andere toxische Substanzen, die auf der Partikeloberfläche adsorbiert sind, könnten auf ähnliche Weise ebenfalls in hohen Konzentrationen auf die Zellen wirken, während sie in Submersexperimenten im Zellkulturmedium stark verdünnt werden. Letztendlich zeigt der Vergleich der akuten Toxizität zwischen ALI- und Submersexpositionen die Limitierungen des konventionellen Ansatzes an: bei Verwendung der ALI-Exposition wurden bereits bei niedrigen Konzentrationen toxische Effekte beobachtet, die unter submersen Bedingungen selbst bei irrelevant hohen Konzentrationen nicht eintraten. Deshalb könnten Submersstudien das Risiko von Verbrennungspartikeln unterschätzen.

In den Submersstudien konnte ferner gezeigt werden, dass WSP zur Bildung von ROS führen. Die ROS führten allerdings nicht zu einer adaptiven anti-oxidativen Zellantwort, wie anhand der Genexpression und Proteingehalte von HO-1 überprüft wurde. Durch separates Testen von repräsentativen Substanzen der Hauptbestandteile von WSP, wurde versucht die ROS induzierende Wirkung der WSP nachzustellen. So führten vor allem CB14 NP, repräsentativ für den Rußanteil, zur Bildung von ROS. Aber auch die Verwendung eines Metallchelators führte zu einer Reduktion der ROS Bildung, weshalb ebenfalls Metalle zur ROS Bildung beitragen. Zn, das durch Inaktivierung von detoxifizierenden Enzymen die ROS Akkumulation begünstigen kann und Fe, das zusätzlich auch mittels Fenton-Reaktionen ROS generieren kann, kommen für diese Wirkung in Frage (Limbach et al. 2007; Nel et al. 2006; Oberdörster et al. 2005). Die Metallbelastung in den Submersstudien war allerdings irrelevant hoch, daher sollte an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht untersucht werden, ob eisen- und zinkhaltige Partikel (Torvela et al. 2014a), aber auch Ruß, in relevanten Konzentrationen ROS generieren und eventuell auch für die Toxizität verantwortlich sind.

Sowohl in den ALI-Versuchen, als auch bei Submersexposition, wurde die deutliche Induktion von CYP1A1 durch die WSP festgestellt. In den Submersuntersuchungen konnte die Induktion von CYP1A1 durch WSP mit dem Modell-PAK Benzo[a]pyren nachgestellt werden. Auffallend war hier, dass die partikelgebundenen PAKs der WSP sowohl auf Transkript-, als auch auf Enzymebene, eine deutlichere Zellantwort induzierten als das dispergierte B[a]P. Vermutlich ist hierfür eine höhere Bioverfügbarkeit von partikelgetragenen PAKs verantwortlich, da die Partikel z.B. als Carrier die Aufnahme in die Zelle begünstigen könnten. Auch könnten die Partikel durch Absinken auf die Zellen die lokal an der Zellmembran angebotene PAK-Menge gegenüber dispergierten PAKs erhöhen. Die metabolische Aktivierung von PAKs ist kritisch für ihren Beitrag zur Mutagenese

und Kanzerogenese, daher sollte die hohe Potenz der partikelgebundenen PAKs metabolisierende Enzyme zu induzieren in künftigen Studien genauer untersucht werden.



**Abbildung 4.1.: Zusammenfassung der Ergebnisse aus Submer- und ALI-Exposition der Holzverbrennungsemissionen.** In Submersexperimenten wurde unter hohen Dosen eine Induktion der ROS Bildung und der PAK-Antwort festgestellt. Diese konnten durch die drei Hauptkomponenten Ruß, Metalle und PAKs erklärt werden. Bei der ALI-Exposition waren die Wirkungen (DNA-Schädigung, MAPK Aktivierung und Veränderung des Energiestoffwechsels) hingegen hauptsächlich der Gasphase zuzuschreiben. Hierbei wurden Aldehyde als Verursacher der DNA-Schädigung identifiziert, kommen aber auch für die anderen Wirkungen in Frage. Die Partikel im Holzrauch induzierten eine PAK-Antwort. Nach Anreicherung, aber trotzdem deutlich geringeren Konzentrationen als in Submersversuchen, lösten die Partikel auch Zytotoxizität aus. Weitere Erläuterungen in Abschnitt 4.3 und 4.4.

In Abbildung 4.1 sind die Ergebnisse aus den Submer- und ALI-Untersuchungen zusammengefasst. In Submersexperimenten wurde unter hohen Dosen eine Induktion der ROS Bildung und der PAK-Antwort in Form der Induktion von CYP1A1 festgestellt. Diese konnten durch die drei Hauptkomponenten Ruß, Metalle und PAKs erklärt werden. Die Submersexposition hat aber eine Reihe von Nachteilen. Zu den wichtigsten gehören der Verlust der Gasphase beim Sammeln der Partikel und die Veränderung der Partikeleigenschaften durch Dispergierung im Medium. Deshalb wurden die Wirkungen von Holzrauch auch mit der ALI-Exposition untersucht. Diese Methode ist der Submersexposition in vielen Punkten überlegen, in erster Linie wird hierbei die Exposition gegenüber dem unveränderten Aerosol ermöglicht. Durch die Verwendung eines neuentwickelten ALI-Systems war es möglich die Wirkungen des Holzrauchs durch eine globale Transkriptomanalyse zu untersuchen. Überraschenderweise waren die Wirkungen dabei hauptsächlich der Gasphase zuzuschreiben. Die Gasphase führte konkret zur DNA-Schädigung, MAPK Aktivierung und Veränderung des Energiestoffwechsels. Mittels eines systembiologischen Ansatzes konnten Aldehyde als Verursacher der DNA-Schädigung identifiziert werden. Möglicherweise sind die Aldehyde auch maßgeblich an den anderen Wirkungen beteiligt. Die Partikel im Holzrauch induzierten die Expression von CYP1A1, stellvertretend für die Bioverfügbarkeit von PAKs. Nach Anreicherung der Partikeldosis durch Verwendung eines elektrischen Felds lösten die Partikel auch Zytotoxi-

zität aus. Die hierfür notwendige Dosis lag zwar über der real erreichbaren Partikeldosis in der humanen Lunge, war aber noch weit unter den Konzentrationen die in Submersstudien verwendet werden. Somit waren deutliche Unterschiede zwischen der ALI- und Submersexposition vorhanden und die Verwendung der Submersmethode zur Beurteilung der gesundheitlichen Wirkungen von Verbrennungsaerosolen muss in Frage gestellt werden.

### 4.5. Relevanz der Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden verschiedene bei der Holzverbrennung entstehende gasförmige und partikelgebundene toxische Komponenten identifiziert. Eine bessere Kenntnis der toxischen Komponenten könnte langfristig zur Verbesserung von Präventionsmaßnahmen bei Exposition gegenüber Verbrennungsemissionen dienen. Für die Identifizierung der toxischen Komponenten wurden *in vitro* Testmethoden angewandt, die die Wirkung der Emissionen in der Lunge simulieren. Mittels eines ALI-Expositionssystems wurden die Gas- und Partikelphase des frisch generierten Verbrennungsaerosols 1:10 verdünnt über Zellkulturen geleitet. Zur Beurteilung der Relevanz der Ergebnisse muss berücksichtigt werden, inwieweit diese Testbedingungen mit der realen Inhalation von Verbrennungsemissionen vergleichbar sind.

Die Partikelkonzentration des auf die Zellen geleiteten Aerosols betrug rund  $1.1 \text{ mg/m}^3$ . Dieser Wert wird in wirtschaftlich hoch entwickelten Ländern in Außen- und Innenräumen normalerweise nicht erreicht. In diesen Ländern liegen in Haushalten mit Holzverbrennung typische Tagesmittelkonzentrationen bei  $5\text{-}15 \text{ }\mu\text{g/m}^3$  (Allen et al. 2011; Molnar et al. 2005; Wheeler et al. 2014). Bei der Verwendung von schlecht belüfteten Kaminen können aber auch Konzentrationen von mehreren Hundert  $\mu\text{g/m}^3$  erreicht werden (Traynor et al. 1987). So ist es nicht verwunderlich, dass in Entwicklungsländern, wenn in Küchen über offenem Feuer gekocht wird, Partikelkonzentrationen von mehreren Hundert  $\mu\text{g/m}^3$  üblich sind und vereinzelt bis zu  $2 \text{ mg/m}^3$  gemessen werden können (Albalak et al. 2001; Balakrishnan et al. 2002; McCracken et al. 2007; Riojas-Rodríguez et al. 2001). Die im ALI-System getesteten Konzentrationen bewegen sich somit in realistischen Bereichen, insbesondere wenn man berücksichtigt, dass viele Personen in Entwicklungsländern diesen Emissionen nicht nur kurzzeitig, sondern tagtäglich ausgesetzt sind.

Im Menschen werden rund 35 % der inhalierten Verbrennungspartikel im Respirationstrakt abgeschieden (Muala et al. 2015b). Das HPLD-Modell (Ferron et al. 1993) ermittelt mit der Partikelgrößenverteilung der hier diskutierten Versuche im menschlichen Respirationstrakt eine vergleichbare Depositionseffizienz von 40%, wovon 33% auf den Alveolar- und 7% auf den Broncheolarraum entfallen (Weblink und verwendete Parameter in Tabelle A.10). Unter Verwendung dieses Modells entspricht eine vierstündige Inhalation des Verbrennungsaerosols aus den ALI-Experimenten einer Abscheidung von etwa  $150 \text{ }\mu\text{g}$  im Respirationstrakt. Bei einer Lungenoberfläche von  $80\text{-}150 \text{ m}^2$  (Gehr et al. 1978) entspricht dies einer Oberflächendosis von rund  $1 \times 10^{-4}$  bis  $1.8 \times 10^{-4} \text{ }\mu\text{g/cm}^2$ , welche gut mit der von Paur et al. (2011) ermittelten Dosis unter realistischen Umweltkonzentrationen von  $1.2 \times 10^{-4} \text{ }\mu\text{g/cm}^2$  übereinstimmt. Damit liegt eine realistische Oberflächendosis

etwa einen Faktor  $1 \times 10^4$  geringer als die in den ALI-Experimenten erzielten  $0.30 - 1.33 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Um mit einer realistischen Partikelinhalation die ALI-Dosis zu erreichen, müsste daher etwa 3000 - 10 000 mal länger exponiert werden, also 1.5 bis 5 Jahre. Die in Submersstudien eingesetzten Dosen liegen noch einen Faktor von 10 - 100 darüber, sind real also niemals zu erreichen. Zudem unterscheiden sich Bolus Effekte von extrapolierten kumulativen Dosen, wodurch insgesamt die akut toxische Wirkung sehr kritisch zu betrachten ist und auch chronische Effekte schwierig zu beurteilen sind. Allerdings gibt es in der Lunge an Bifurkationen auch Stellen mit lokal erheblich höheren Partikelbelastungen, die derzeit aufgrund ihrer Rolle bei der Kanzerogenese viel diskutiert werden (Phalen 2006). In zukünftigen Studien sollte daher die Wirkung von relativ niedrigen Dosen nach chronischer Exposition im ALI-System untersucht werden um die reale Expositionssituation noch besser zu simulieren.

Die in den ALI-Experimenten festgestellte Wirkung war größtenteils aber nicht der partikulären Fraktion zuzuschreiben, sondern Komponenten der Gasphase, wobei reaktive Aldehyde als die gentoxischen Substanzen identifiziert werden konnten. Mit hoher Wahrscheinlichkeit sind Aldehyde auch maßgeblich für die anderen Wirkungen der Gasphase. Ein Beitrag anderer gasförmiger Substanzen kann aber nicht völlig ausgeschlossen werden. Die mengenmäßig wichtigsten Aldehyde im Holzaerosol waren FA und AA. Als wichtigste inhalationstoxische Wirkung der Aldehyde wird die Reizung der Atemwege verstanden (Nielsen et al. 2013). Darüber hinaus klassifiziert die Internationale Agentur für Krebsforschung (IARC) FA als Humankarzinogen der Klasse I (Baan et al. 2009). Inhalativ aufgenommenes AA ist in Gruppe 2B eingestuft (IARC 1999). Die Einstufung von FA wird aber nicht von allen Experten geteilt. In Versuchstieren ist jedoch unbestritten, dass FA die Entstehung von Nasenhöhlemlentumoren fördert. Die epidemiologischen Studien, die diese Krebsentstehung auch im Menschen mit FA in Verbindung bringen, werden allerdings aufgrund methodischer Mängel kritisiert (Nielsen et al. 2013). Ebenfalls wird der epidemiologisch begründete Zusammenhang zwischen der Inhalation von FA und Leukämieerkrankung kontrovers diskutiert, da experimentell in manchen Studien kein Übergang von inhaliertem FA ins Blut nachgewiesen werden konnte (Nielsen et al. 2013). Untersuchungen von AA beschäftigen sich aufgrund der Entstehung bei der Verstoffwechslung von Ethanol hauptsächlich mit seiner Rolle als gastrointestinales Karzinogen. Inhalationsuntersuchungen legen aber, gemäß der chemisch vergleichbaren Reaktivität, eine analoge Wirkung zu FA nahe (Morris 1997).

Von besonderer Bedeutung für die Versuche an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht ist, dass FA aufgrund seiner hohen Wasserlöslichkeit nach Eintritt in den Atemtrakt schnell resorbiert wird und abreagiert. Zum Beispiel erreicht FA im Affen nur in hohen inhalierten Konzentrationen die oberen Bronchien. In die Bronchiolen und Alveolen gelangen, selbst bei höheren Konzentrationen als im hier getesteten Holzraucheraerosol, keine nachweisbaren Mengen FA (Casanova et al. 1991). Mit abnehmender Wasserlöslichkeit der Aldehyde nimmt aber die Penetration der oberen Atemwege zu, und somit auch die Resorption in Bronchiolen und Alveolen. AA und Acrolein verfügen ebenfalls noch über eine relativ hohe Wasserlöslichkeit, können aber bereits die untersten Atemwege erreichen (Asgharian et al. 2012; Bein und Leikauf 2011). Weniger lipophile Aldehyde,

wie Propanal, kommen im Holzrauch in deutlich geringeren Mengen vor als FA und AA. Es ist aber davon auszugehen, dass diese Verbindungen in den tieferen Atemwegen eine umso größere Rolle spielen. Die Inhalationstoxizität der weniger lipophilen Aldehyde ist nicht ausreichend bekannt um beurteilen zu können, ob die im Holzrauch vorkommenden Konzentrationen auch *in vivo* zu ähnlichen zellulären Wirkungen wie in den hier besprochenen Ergebnissen führen und somit zu den bekannten gesundheitsschädlichen Wirkungen von Holzrauch beitragen. Um dies besser beurteilen zu können sind weitere Untersuchungen zur Toxikokinetik einzelner Gasphasenkomponenten, speziell verschiedener Aldehyde, als auch ihrer toxischen Wirkungen, wie z.B. die Bildung von DPCs *in vivo* notwendig.

Zusammengefasst lagen die Partikel im Aerosol in einer Konzentration vor, die in Entwicklungsländern im Alltag in Innenräumen erreicht werden kann. Daraus kann indirekt vermutet werden, dass es in diesen Ländern, in schlecht belüfteten Räumen, auch zu einer vergleichbaren Gasphasenbelastung kommen kann, wobei für diesen Schluss belastbare Zahlen fehlen. Obwohl *in vitro* die Gasphaseneffekte dominierten, haben partikuläre Emissionen aufgrund der Akkumulation in der Lunge *in vivo* dennoch eine hohe Relevanz. Bei der Holzverbrennung entstehen kanzerogene PAKs, die adsorbiert auf Partikeln über eine hohe Bioverfügbarkeit in den unteren Atemwegen verfügen. Darüber hinaus spielt die Bildung von ROS durch Ruß und Metalle eine Rolle. Die toxischen Wirkungen der Gasphase sind *in vitro* überwiegend auf Aldehyde zurückzuführen, aber ein Beitrag von weiteren, nicht näher untersuchten, gasförmigen Substanzen kann nicht ausgeschlossen werden. Inwiefern die in der ALI-Exposition durch Aldehyde ausgelösten Wirkungen auch *in vivo* relevant ist, ist bisher unbekannt. Die Inhalation von Aldehyden ist aber toxisch für den Menschen. Sie führen zu Reizungen der Atemwege und FA und AA gelten als kanzerogen, respektive möglicherweise kanzerogen. Die genotoxische Wirkung von FA ist *in vivo* auf die obersten Atemwege beschränkt. AA und weitere weniger lipophile Aldehyde können hingegen tiefer in die Lunge vordringen und über die Bildung von DPC möglicherweise zur Kanzerogenität von Holzverbrennungsemissionen beitragen. Die *in vitro* an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht festgestellten Wirkungen des Holzrauchs sind wahrscheinlich größtenteils den Aldehyden, vor allem FA, zuzuschreiben.

Die hier erstmals *in vitro* beschriebenen Wirkungen des Holzrauchs, wie die DNA-Schädigung und die Induktion der DNA-Schadensantwort, aber auch Inflammation und Beeinflussung der EMT, stehen in zentralem Zusammenhang mit den wichtigsten Lungenpathologien wie Kanzerogenese, COPD und Fibrose. Daher stellen die hier dargestellten Befunde eine Grundlage für weitergehende Studien zum besseren Verständnis der molekularen Wirkmechanismen von durch gesundheitsschädliche Aerosole verursachten Lungenkrankheiten. Da Formaldehyd in den oberen Atemwegen absorbiert wird, ist es von Interesse, zu untersuchen ob Holzrauch zu Erkrankungen des oberen Atemtrakts, wie z.B. Tumore beiträgt. In der Lunge selbst ist die Wirkung von Formaldehyd weniger von Belang. Speziell Aldehyde, die tiefer in die Lunge vordringen, sind in diesem Zusammenhang von besonderer Relevanz, daher sollte der Wirkung von tiefer penetrierenden Substanzen in zukünftigen Untersuchungen höhere Aufmerksamkeit geschenkt werden.



# Literatur

- Aam, B. B. und F Fonnum (2007). Carbon black particles increase reactive oxygen species formation in rat alveolar macrophages in vitro. *Arch. Toxicol.* 81(6): 441–6. DOI: 10.1007/s00204-006-0164-3.
- Albalak, R., N. Bruce, J. P. McCracken, K. R. Smith und T. De Gallardo (2001). Indoor respirable particulate matter concentrations from an open fire, improved cookstove, and LPG/open fire combination in a rural guatemalan community. *Environ. Sci. Technol.* 35(13): 2650–2655. DOI: 10.1021/es001940m.
- Allen, R. W., C. Carlsten, B. Karlen, S. Leckie, S. Van Eeden, S. Vedal, I. Wong und M. Brauer (2011). An air filter intervention study of endothelial function among healthy adults in a woodsmoke-impacted community. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183(9): 1222–1230. DOI: 10.1164/rccm.201010-15720C.
- Anders, S., D. J. McCarthy, Y. Chen, M. Okoniewski, G. K. Smyth, W. Huber und M. D. Robinson (2013). Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor. *Nat. Protoc.* 8(9): 1765–86. DOI: 10.1038/nprot.2013.099.
- Arias-Lopez, C., I. Lazaro-Trueba, P. Kerr, C. J. Lord, T. Dexter, M. Iravani, A. Ashworth und A. Silva (2006). p53 modulates homologous recombination by transcriptional regulation of the RAD51 gene. *EMBO Rep.* 7(2): 219–224. DOI: 10.1038/sj.embor.7400587.
- Asgharian, B., O. T. Price, J. D. Schroeter, J. S. Kimbell und M. Singal (2012). A lung dosimetry model of vapor uptake and tissue disposition. *Inhal. Toxicol.* 24(3): 182–193. DOI: 10.3109/08958378.2012.654857.
- Aufderheide, M., B. Halter, N. Möhle und D. Hochrainer (2013). The CULTEX RFS: a comprehensive technical approach for the in vitro exposure of airway epithelial cells to the particulate matter at the air-liquid interface. *Biomed Res. Int.* 2013(1): 734137. DOI: 10.1155/2013/734137.
- Azzopardi, D., L. E. Haswell, G. Foss-Smith, K. Hewitt, N. Asquith, S. Corke und G. Phillips (2015). Evaluation of an air-liquid interface cell culture model for studies on the inflammatory and cytotoxic responses to tobacco smoke aerosols. *Toxicol. Vitro.* 29(7): 1720–1728. DOI: 10.1016/j.tiv.2015.06.016.
- Baan, R., Y. Grosse, K. Straif, B. Secretan, F. El Ghissassi, V. Bouvard, L. Benbrahim-Tallaa, N. Guha, C. Freeman, L. Galichet und V. Coglianò (2009). A review of human carcinogens—Part F: Chemical agents and related occupations. *Lancet Oncol.* 10(12): 1143–1144. DOI: 10.1016/S1470-2045(09)70358-4.
- Baird, W. M., L. A. Hooven und B. Mahadevan (2005). Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ. Mol. Mutagen.* 45(2-3): 106–14. DOI: 10.1002/em.20095.
- Balakrishnan, K., J. Parikh, S. Sankar, R. Padmavathi, K. Srividya, V. Venugopal, S. Prasad und V. L. Pandey (2002). Daily average exposures to respirable particulate matter from combustion of biomass fuels in rural households of Southern India. *Environ. Health Perspect.* 110(11): 1069–1075. DOI: 10.1289/ehp.021101069.
- Banath, J. P. (2004). Radiation Sensitivity, H2AX Phosphorylation, and Kinetics of Repair of DNA Strand Breaks in Irradiated Cervical Cancer Cell Lines. *Cancer Res.* 64(19): 7144–7149. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1433.

- Barker, S., M. Weinfeld und D. Murray (2005). DNA-protein crosslinks: Their induction, repair, and biological consequences. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* 589(2): 111–135. DOI: 10.1016/j.mrrev.2004.11.003.
- Barregard, L., G Sällsten, L Andersson, a C Almstrand, P Gustafson, M Andersson und a C Olin (2008). Experimental exposure to wood smoke: effects on airway inflammation and oxidative stress. *Occup. Environ. Med.* 65(5): 319–24. DOI: 10.1136/oem.2006.032458.
- Barregard, L., G. Sällsten, P. Gustafson, L. Andersson, L. Johansson, S. Basu und L. Stigendal (2006). Experimental Exposure to Wood-Smoke Particles in Healthy Humans: Effects on Markers of Inflammation, Coagulation, and Lipid Peroxidation. *Inhal. Toxicol.* 18(11): 845–853. DOI: 10.1080/08958370600685798.
- Bein, K. und G. D. Leikauf (2011). Acrolein - a pulmonary hazard. *Mol. Nutr. Food Res.* 55(9): 1342–1360. DOI: 10.1002/mnfr.201100279.
- Belis, C., F. Karagulian, B. Larsen und P. Hopke (2013). Critical review and meta-analysis of ambient particulate matter source apportionment using receptor models in Europe. *Atmos. Environ.* 69 94–108. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2012.11.009.
- Beyersmann, D. und A. Hartwig (2008). Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch. Toxicol.* 82(8): 493–512. DOI: 10.1007/s00204-008-0313-y.
- Bhattacharyya, S. S., S. Paul, A. De, D. Das, A. Samadder, N. Boujedaini und A. R. Khuda-Bukhsh (2011). Poly (lactide-co-glycolide) acid nanoencapsulation of a synthetic coumarin: Cytotoxicity and bio-distribution in mice, in cancer cell line and interaction with calf thymus DNA as target. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* DOI: 10.1016/j.taap.2011.04.010.
- Bitterle, E, E Karg, A Schroepel, W. Kreyling, A Tippe, G. Ferron, O Schmid, J Heyder, K. Maier und T Hofer (2006). Dose-controlled exposure of A549 epithelial cells at the air-liquid interface to airborne ultrafine carbonaceous particles. *Chemosphere* 65(10): 1784–1790. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2006.04.035.
- Boersma, V., N. Moatti, S. Segura-Bayona, M. H. Peuscher, J. van der Torre, B. A. Wevers, A. Orthwein, D. Durocher und J. J. L. Jacobs (2015). MAD2L2 controls DNA repair at telomeres and DNA breaks by inhibiting 5 end resection. *Nature* 521(7553): 537–540. DOI: 10.1038/nature14216.
- Bølling, A. K., A. I. Totlandsdal, G. Sallsten, A. Braun, R. Westerholm, C. Bergvall, J. Boman, H. J. Dahlman, M. Sehlstedt, F. Cassee, T. Sandstrom, P. E. Schwarze und J. I. Herseth (2012). Wood smoke particles from different combustion phases induce similar pro-inflammatory effects in a co-culture of monocyte and pneumocyte cell lines. *Part. Fibre Toxicol.* 9 45. DOI: 10.1186/1743-8977-9-45.
- Bonjour, S., H. Adair-Rohani, J. Wolf, N. G. Bruce, S. Mehta, A. Prüss-Ustün, M. Lahiff, E. A. Rehfuss, V. Mishra und K. R. Smith (2013). Solid fuel use for household cooking: country and regional estimates for 1980-2010. *Environ. Health Perspect.* 121(7): 784–90. DOI: 10.1289/ehp.1205987.
- Bønløkke, J. H., I. S. Riddervold, T. K. Grønborg, K. Skogstrand, D. M. Hougaard, L. Barregard und T. Sigsgaard (2014). Systemic effects of wood smoke in a short-term experimental exposure study of atopic volunteers. *J. Occup. Environ. Med.* 56(2): 177–83. DOI: 10.1097/JOM.000000000000067.
- Borm, P. J. A., G. Cakmak, E. Jermann, C. Weishaupt, P. Kempers, F. J. van Schooten, G. Oberdörster und R. P. F. Schins (2005). Formation of PAH-DNA adducts after in vivo and vitro exposure of rats and lung cells to different commercial carbon blacks. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 205(2): 157–67. DOI: 10.1016/j.taap.2004.10.020.
- Briedé, J. J., R. W. L. Godschalk, M. T. G. Emans, T. M. C. M. De Kok, E. Van Aagen, J. Van Maanen, F.-J. Van Schooten und J. C. S. Kleinjans (2004). In vitro and in vivo studies on oxygen free radical and DNA adduct formation in rat lung and liver during benzo[a]pyrene metabolism. *Free Radic. Res.* 38(9): 995–1002. DOI: 10.1080/10715760400000976.

- Broßell, D., S. Tröller, N. Dziurawitz, S. Plitzko, G. Linsel, C. Asbach, N. Azong-Wara, H. Fissan und A. Schmidt-Ott (2013). A thermal precipitator for the deposition of airborne nanoparticles onto living cells—Rationale and development. *J. Aerosol Sci.* 63 75–86. DOI: 10.1016/j.jaerosci.2013.04.012.
- Bruijne, K. de, S. Ebersviller, K. G. Sexton, S. Lake, D. Leith, R. Goodman, J. Jetters, G. W. Walters, M. Doyle-Eisele, R. Woodside, H. E. Jeffries und I. Jaspers (2009). Design and Testing of Electrostatic Aerosol In Vitro Exposure System (EAVES): An Alternative Exposure System for Particles. EN.
- Buescher, J. M., M. R. Antoniewicz, L. G. Boros, S. C. Burgess, H. Brunengraber, C. B. Clish, R. J. DeBerardinis, O. Feron, C. Frezza, B. Ghesquiere, E. Gottlieb, K. Hiller, R. G. Jones, J. J. Kamphorst, R. G. Kibbey, A. C. Kimmelman, J. W. Locasale, S. Y. Lunt, O. D. Maddocks, C. Malloy, C. M. Metallo, E. J. Meuillet, J. Munger, K. Nöh, J. D. Rabinowitz, M. Ralser, U. Sauer, G. Stephanopoulos, J. St-Pierre, D. A. Tennant, C. Wittmann, M. G. Vander Heiden, A. Vazquez, K. Vousden, J. D. Young, N. Zamboni und S.-m. Fendt (2015). A roadmap for interpreting <sup>13</sup>C metabolite labeling patterns from cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* 34 189–201. DOI: 10.1016/j.copbio.2015.02.003.
- Caiment, F., M. Tsamou, D. Jennen und J. Kleinjans (2014). Assessing compound carcinogenicity in vitro using connectivity mapping. *Carcinogenesis* 35(1): 201–207. DOI: 10.1093/carcin/bgt278.
- Cano, A, M. A. Pérez-Moreno, I Rodrigo, A Locascio, M. J. Blanco, M. G. del Barrio, F Portillo und M. A. Nieto (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell Biol.* 2(2): 76–83. DOI: 10.1038/35000025.
- Casanova, M., K. T. Morgan, W. H. Steinhagen, J. I. Everitt, J. A. Popp und H. D. A. Heck (1991). Covalent Binding of Inhaled Formaldehyde to DNA in the Respiratory Tract of Rhesus Monkeys : Pharmacokinetics , Rat-to-Monkey Interspecies Scaling , and Extrapolation to Man. *Fundam. Appl. Toxicol.* 17 409–428.
- Chang, J.-Y., M.-F. Chiang, S.-R. Lin, M.-H. Lee, H He, P.-Y. Chou, S.-J. Chen, Y.-A. Chen, L.-Y. Yang, F.-J. Lai, C.-C. Hsieh, T.-H. Hsieh, H.-M. Sheu, C.-I. Sze und N.-S. Chang (2012). TIAF1 self-aggregation in peritumor capsule formation, spontaneous activation of SMAD-responsive promoter in p53-deficient environment, and cell death. *Cell Death Dis.* 3(4): 302. DOI: 10.1038/cddis.2012.36.
- Chang, L und M Karin (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410(6824): 37–40. DOI: 10.1038/35065000.
- Chapman, J. R., M. R. G. Taylor und S. J. Boulton (2012). Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol. Cell* 47(4): 497–510. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.07.029.
- Choi, A. M. und J Alam (1996). Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *en. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 15(1): 9–19. DOI: 10.1165/ajrcmb.15.1.8679227.
- Christmann, M. und B. Kaina (2013). Transcriptional regulation of human DNA repair genes following genotoxic stress: trigger mechanisms, inducible responses and genotoxic adaptation. *Nucleic Acids Res.* 41(18): 8403–8420. DOI: 10.1093/nar/gkt635.
- Chuang, H.-C., T. P. Jones, S.-C. C. Lung und K. a. Bérubé (2011). Soot-driven reactive oxygen species formation from incense burning. *Sci. Total Environ.* 409(22): 4781–7. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2011.07.041.
- Colell, A, D. R. Green und J.-E. Ricci (2009). Novel roles for GAPDH in cell death and carcinogenesis. *Cell Death Differ.* 16(12): 1573–1581. DOI: 10.1038/cdd.2009.137.
- Commins, S., J. W. Steinke und L. Borish (2008). The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121(5): 1108–1111. DOI: 10.1016/j.jaci.2008.02.026.

- Cooney, D. J. und A. J. Hickey (2011). Cellular response to the deposition of diesel exhaust particle aerosols onto human lung cells grown at the air-liquid interface by inertial impaction. *Toxicol. In Vitro* 25(8): 1953–65. DOI: 10.1016/j.tiv.2011.06.019.
- Corsini, E., S. Budello, L. Marabini, V. Galbiati, A. Piazzalunga, P. Barbieri, S. Cozzutto, M. Marinovich, D. Pitea und C. L. Galli (2013). Comparison of wood smoke PM2.5 obtained from the combustion of FIR and beech pellets on inflammation and DNA damage in A549 and THP-1 human cell lines. *Arch. Toxicol.* DOI: 10.1007/s00204-013-1071-z.
- Cosentino, C., D. Grieco und V. Costanzo (2011). ATM activates the pentose phosphate pathway promoting anti-oxidant defence and DNA repair. *EMBO J.* 30(3): 546–55. DOI: 10.1038/emboj.2010.330.
- Danielsen, P. H., S. Loft, A. Kocbach, P. E. Schwarze und P. Møller (2009). Oxidative damage to DNA and repair induced by Norwegian wood smoke particles in human A549 and THP-1 cell lines. *Mutat. Res.* 674(1-2): 116–22. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2008.10.014.
- Danielsen, P. H., P. Møller, K. A. Jensen, A. K. Sharma, H. Wallin, R. Bossi, H. Atrup, L. Møllhave, J.-L. Ravanat, J. J. Briedé, T. M. de Kok und S. Loft (2011). Oxidative stress, DNA damage, and inflammation induced by ambient air and wood smoke particulate matter in human A549 and THP-1 cell lines. *Chem. Res. Toxicol.* 24(2): 168–84. DOI: dx.doi.org/10.1021/tx100407m.
- Davey, G. M., W. R. Heath und R. Starr (2006). SOCS1: a potent and multifaceted regulator of cytokines and cell-mediated inflammation. *Tissue Antigens* 67(1): 1–9. DOI: 10.1111/j.1399-0039.2005.00532.x.
- Davies, C. N. (1985). Absorption of gases in the respiratory tract. *Ann. Occup. Hyg.* 29(1): 13–25.
- Depaepe, V., N. Suarez-Gonzalez, A. Dufour, L. Passante, J. A. Gorski, K. R. Jones, C. Ledent und P. Vanderhaeghen (2005). Ephrin signalling controls brain size by regulating apoptosis of neural progenitors. *Nature* 435(7046): 1244–1250. DOI: 10.1038/nature03651.
- Diabaté, S., S. Mülhopt, H.-R. Paur und H. F. Krug (2008). The response of a co-culture lung model to fine and ultrafine particles of incinerator fly ash at the air-liquid interface. *Altern. Lab. Anim.* 36(3): 285–98.
- Diabaté, S., B. Bergfeldt, D. Plaumann, C. Uebel und C. Weiss (2011). Anti-oxidative and inflammatory responses induced by fly ash particles and carbon black in lung epithelial cells. *Anal. Bioanal. Chem.* 401(10): 3197–212. DOI: 10.1007/s00216-011-5102-4.
- Dilger, M., J. Orasche, R. Zimmermann, H.-R. Paur, S. Diabaté und C. Weiss (2016). Toxicity of wood smoke particles in human A549 lung epithelial cells: the role of PAHs, soot and zinc. *Arch. Toxicol.* 90(12): 3029–3044. DOI: 10.1007/s00204-016-1659-1.
- Dockery, D. W. und C. A. Pope (1994). Acute respiratory effects of particulate air pollution. *Annu. Rev. Public Health* 15(1): 107–132. DOI: 10.1146/annurev.pu.15.050194.000543.
- Donaldson, K., L. Tran, L. Jimenez, R. Duffin, D. E. Newby, N. Mills, W. MacNee und V. Stone (2005). No Title. *Part. Fibre Toxicol.* 2(1): 10. DOI: 10.1186/1743-8977-2-10.
- Donauer, J., I. Schreck, U. Liebel und C. Weiss (2012). Role and interaction of p53, BAX and the stress-activated protein kinases p38 and JNK in benzo(a)pyrene-diolepoxide induced apoptosis in human colon carcinoma cells. *Arch. Toxicol.* 86(2): 329–337. DOI: 10.1007/s00204-011-0757-3.
- Durinck, S., P. T. Spellman, E. Birney und W. Huber (2009). Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nat. Protoc.* 4(8): 1184–1191. DOI: 10.1038/nprot.2009.97.
- Duxin, J. P., J. M. Dewar, H. Yardimci und J. C. Walter (2014). Repair of a DNA-Protein Crosslink by Replication-Coupled Proteolysis. *Cell* 159(2): 346–357. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.024.

- Edelstein, A. D., M. A. Tsuchida, N. Amodaj, H. Pinkard, R. D. Vale und N. Stuurman (2014). Advanced methods of microscope control using  $\mu$ Manager software. *J. Biol. Methods* 1(2): 10. DOI: 10.14440/jbm.2014.36.
- Eichbaum, K., M. Brinkmann, S. Buchinger, G. Reifferscheid, M. Hecker, J. P. Giesy, M. Engwall, B. van Bavel und H. Hollert (2014). In vitro bioassays for detecting dioxin-like activity – Application potentials and limits of detection, a review. *Sci. Total Environ.* 487(1): 37–48. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.03.057.
- Elihn, K., P. Cronholm, H. L. Karlsson, K. Midander, I. Odnevall Wallinder und L. Möller (2013). Cellular dose of partly soluble cu particle aerosols at the air-liquid interface using an in vitro lung cell exposure system. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 26(2): 84–93. DOI: 10.1089/jamp.2012.0972.
- Endes, C., O. Schmid, C. Kinnear, S. Mueller, S. Camarero-Espinosa, D. Vanhecke, E. J. Foster, A. Petri-Fink, B. Rothen-Rutishauser, C. Weder und M. J. Clift (2014). An in vitro testing strategy towards mimicking the inhalation of high aspect ratio nanoparticles. *Part. Fibre Toxicol.* 11(1): 40. DOI: 10.1186/s12989-014-0040-x.
- Espinoza, I. und L. Miele (2013). Deadly crosstalk: Notch signaling at the intersection of EMT and cancer stem cells. *Cancer Lett.* 341(1): 41–45. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.08.027.
- Eurlings, I. M. J., N. L. Reynaert, T. van den Beucken, H. R. Gosker, C. C. de Theije, F. M. Verhamme, K. R. Bracke, E. F. M. Wouters und M. A. Dentener (2014). Cigarette Smoke Extract Induces a Phenotypic Shift in Epithelial Cells; Involvement of HIF1 $\alpha$  in Mesenchymal Transition. *PLoS One* 9(10). Hrsg. von O. Eickelberg: e107757. DOI: 10.1371/journal.pone.0107757.
- Ezzati, M., H. Saleh und D. M. Kammen (2000). The Contributions of Emissions and Spatial Micro-environments to Exposure to Indoor Air Pollution from Biomass Combustion in Kenya. *Environ. Health Perspect.* 108(9): 833–839. DOI: 10.1289/ehp.00108833.
- Fendt, S.-m., E. L. Bell, M. A. Keibler, B. A. Olenchock, J. R. Mayers, T. M. Wasylenko, N. I. Vokes, L. Guarente, M. G. V. Heiden und G. Stephanopoulos (2013). Reductive glutamine metabolism is a function of the  $\alpha$ -ketoglutarate to citrate ratio in cells. *Nat. Commun.* 4 1–11. DOI: 10.1038/ncomms3236.
- Feng, S., S. Cong, X. Zhang, X. Bao, W. Wang, H. Li, Z. Wang, G. Wang, J. Xu, B. Du, D. Qu, W. Xiong, M. Yin, X. Ren, F. Wang, J. He und B. Zhang (2011). MicroRNA-192 targeting retinoblastoma 1 inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis in lung cancer cells. *Nucleic Acids Res.* 39(15): 6669–6678. DOI: 10.1093/nar/gkr232.
- Ferron, G., E. Karg und J. Peter (1993). Estimation of deposition of polydisperse hygroscopic aerosols in the human respiratory tract. *J. Aerosol Sci.* 24(5): 655–670. DOI: 10.1016/0021-8502(93)90022-2.
- Fine, P. M., G. R. Cass und B. R. Simoneit (2004). Chemical Characterization of Fine Particle Emissions from the Wood Stove Combustion of Prevalent United States Tree Species. en. *Environ. Eng. Sci.* 21(6): 705–721. DOI: 10.1089/ees.2004.21.705.
- Forchhammer, L., P. Möller, I. S. Riddervold, J. Bønløkke, A. Massling, T. Sigsgaard und S. Loft (2012). Controlled human wood smoke exposure: oxidative stress, inflammation and microvascular function. *Part. Fibre Toxicol.* 9(1): 7. DOI: 10.1186/1743-8977-9-7.
- Fox, M. E. und P. J. Smith (1990). Long-term inhibition of DNA synthesis and the persistence of trapped topoisomerase II complexes in determining the toxicity of the antitumor DNA intercalators mAMSA and mitoxantrone. *Cancer Res* 50(18): 5813–5818.
- Fritsch-Decker, S., T. Both, S. Mühlhopt, H.-r. Paur, C. Weiss und S. Diabaté (2011). Regulation of the arachidonic acid mobilization in macrophages by combustion-derived particles. *Part. Fibre Toxicol.* 8(1): 23. DOI: 10.1186/1743-8977-8-23.

- Fukano, Y., M. Ogura, K. Eguchi, M. Shibagaki und M. Suzuki (2004). Modified procedure of a direct in vitro exposure system for mammalian cells to whole cigarette smoke. *Exp. Toxicol. Pathol.* 55(5): 317–23. DOI: 10.1078/0940-2993-00341.
- Fukano, Y., H. Yoshimura und T. Yoshida (2006). Heme oxygenase-1 gene expression in human alveolar epithelial cells (A549) following exposure to whole cigarette smoke on a direct in vitro exposure system. *Exp. Toxicol. Pathol.* 57(5-6): 411–8. DOI: 10.1016/j.etp.2005.12.001.
- Garcia-Canton, C., E. Minet, A. Anadon und C. Meredith (2013). Metabolic characterization of cell systems used in in vitro toxicology testing: lung cell system BEAS-2B as a working example. *Toxicol. Vitro.* 27(6): 1719–27. DOI: 10.1016/j.tiv.2013.05.001.
- Garza, K. M., K. F. Soto und L. E. Murr (2008). Cytotoxicity and reactive oxygen species generation from aggregated carbon and carbonaceous nanoparticulate materials. *Int. J. Nanomedicine* 3(1): 83–94.
- Gauggel, S., C. Derreza-Greeven, J. Wimmer, M. Wingfield, B. van der Burg und D. R. Dietrich (2012). Characterization of biologically available wood combustion particles in cell culture medium. *ALTEX* 29(2): 183–200.
- Gauggel-Lewandowski, S., A. H. Heussner, P. Steinberg, B. Pieterse, B. van der Burg und D. R. Dietrich (2013). Bioavailability and potential carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons from wood combustion particulate matter in vitro. *Chem. Biol. Interact.* 206(2): 411–422. DOI: 10.1016/j.cbi.2013.05.015.
- Gazdar, A. F., J. S. Butel und M. Carbone (2002). SV40 and human tumours: myth, association or causality? *Nat. Rev. Cancer* 2(12): 957–964. DOI: 10.1038/nrc947.
- Gebel, T., H. Foth, G. Damm, A. Freyberger, P.-J. Kramer, W. Lilienblum, C. Röhl, T. Schupp, C. Weiss, K.-M. Wollin und J. G. Hengstler (2014). Manufactured nanomaterials: categorization and approaches to hazard assessment. *Arch. Toxicol.* 88(12): 2191–2211. DOI: 10.1007/s00204-014-1383-7.
- Gehr, P., M. Bachofen und E. Weibel (1978). The normal human lung: Ultrastructure and morphometric estimation of diffusion capacity. *Respir. Physiol.* 32(1): 121–140.
- Ghio, A. J., J. M. Soukup, M. Case, L. A. Dailey, J. Richards, J. Berntsen, R. B. Devlin, S. Stone und A. Rappold (2012). Exposure to wood smoke particles produces inflammation in healthy volunteers. *Occup. Environ. Med.* 69(3): 170–5. DOI: 10.1136/oem.2011.065276.
- Ghio, A. J., L. a. Dailey, J. M. Soukup, J. Stonehuerner, J. H. Richards und R. B. Devlin (2013). Growth of human bronchial epithelial cells at an air-liquid interface alters the response to particle exposure. *Part. Fibre Toxicol.* 10(1): 25. DOI: 10.1186/1743-8977-10-25.
- Giard, D. J., S. A. Aaronson, G. J. Todaro, P. Arnstein, J. H. Kersey, H. Dosik und W. P. Parks (1973). In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived From a Series of Solid Tumors. *J Natl Cancer Inst* 51(5): 1417–1423. DOI: 10.1093/jnci/51.5.1417.
- Grafstrom, R. C., A. Fornace und C. C. Harris (1984). Repair of DNA Damage Caused by Formaldehyde in Human Cells Repair of DMA Damage Caused by Formaldehyde in Human Cells. *Cancer Res.* 44(10): 4323–4327.
- Greven, F. E., E. J. Krop, J. J. Spithoven, N. Burger, J. M. Rooyackers, H. A. Kerstjens, S. van der Heide und D. J. Heederik (2012). Acute respiratory effects in firefighters. *Am. J. Ind. Med.* 55(1): 54–62. DOI: 10.1002/ajim.21012.
- Gualtieri, M., T. Skuland, T.-G. Iversen, M. Låg, P. Schwarze, D. Bilaničová, G. Pojana und M. Refsnes (2011). Importance of agglomeration state and exposure conditions for uptake and pro-inflammatory responses to amorphous silica nanoparticles in bronchial epithelial cells. *Nanotoxicology* (July): 1–13. DOI: 10.3109/17435390.2011.604441.
- Happo, M. S., O. Uski, P. I. Jalava, J. Kelz, T. Brunner, P. Hakulinen, J. Mäki-Paakkanen, V.-M. Kosma, J. Jokiniemi, I. Obernberger und M.-R. Hirvonen (2013). Pulmonary inflammation and tissue

- damage in the mouse lung after exposure to PM samples from biomass heating appliances of old and modern technologies. *Sci. Total Environ.* 443(1): 256–266. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2012.11.004.
- Hartwig, A, H Klyszcz-Nasko, R Schlegel and D Beyersmann (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): 107–12.
- Hartwig, A. (1996). Sensitive analysis of oxidative DNA damage in mammalian cells: use of the bacterial Fpg protein in combination with alkaline unwinding. *Toxicol. Lett.* 88(1-3): 85–90. DOI: 10.1016/0378-4274(96)03722-8.
- Hawley, B und J Volckens (2013). Proinflammatory effects of cookstove emissions on human bronchial epithelial cells. *Indoor Air* 23(1): 4–13. DOI: 10.1111/j.1600-0668.2012.00790.x.
- Hawley, B., D. McKenna, A. Marchese und J. Volckens (2014). Time course of bronchial cell inflammation following exposure to diesel particulate matter using a modified EAVES. *Toxicol. Vitro* 28(5): 829–837. DOI: 10.1016/j.tiv.2014.03.001.
- Heinrich, P. C., I. Behrmann, S. Haan, H. M. Hermanns, G. Müller-Newen und F. Schaper (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.* 374(1): 1–20. DOI: 10.1042/BJ20030407.
- Herrlich, P., M. Karin und C. Weiss (2008). Supreme EnLIGHTenment: Damage Recognition and Signaling in the Mammalian UV Response. *Mol. Cell* 29(3): 279–290. DOI: 10.1016/j.molcel.2008.01.001.
- Herseth, J. I., A. I. Totlandsdal, S. Bytingsvik, J. Kaur, M. Noer und A. K. Bølling (2013). The challenge of obtaining correct data for cellular release of inflammatory mediators after in vitro exposure to particulate matter. *Toxicol. Lett.* 221(2): 110–117. DOI: 10.1016/j.toxlet.2013.06.209.
- Hiller, K., J. Hangebrauk, C. Jäger, J. Spura, K. Schreiber und D. Schomburg (2009). MetaboliteDetector: Comprehensive Analysis Tool for Targeted and Nontargeted GC/MS Based Metabolome Analysis. *Anal. Chem.* 81(9): 3429–3439. DOI: 10.1021/ac802689c.
- Hinds, W. C. (2012). Charge limits. In: *Aerosol Technol. Prop. Behav. Meas. airborne Part.* John Wiley & Sons, 333.
- Holder, A. L., D. Lucas, R. Goth-Goldstein und C. P. Koshland (2007). Inflammatory response of lung cells exposed to whole, filtered, and hydrocarbon denuded diesel exhaust. *Chemosphere* 70(1): 13–9. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2007.07.036.
- (2008). Cellular response to diesel exhaust particles strongly depends on the exposure method. *Toxicol. Sci.* 103(1): 108–15. DOI: 10.1093/toxsci/kfn014.
- Hsiang, Y. H., M. G. Lihou und L. F. Liu (1989). Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer Res.* 49(18): 5077–5082.
- Hu, Y.-C., Z.-H. Yang, K.-J. Zhong, L.-J. Niu, X.-J. Pan, D.-C. Wu, X.-J. Sun, P.-K. Zhou, M.-X. Zhu und Y.-Y. Huo (2009). Alteration of transcriptional profile in human bronchial epithelial cells induced by cigarette smoke condensate. *Toxicol. Lett.* 190(1): 23–31. DOI: 10.1016/j.toxlet.2009.06.860.
- Huang, D. W., B. T. Sherman und R. A. Lempicki (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* 4(1): 44–57. DOI: 10.1038/nprot.2008.211.
- Hukkanen, J., O. Pelkonen, J. Hakkola und H. Raunio (2002). Expression and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 (CYP) enzymes in human lung. *Crit. Rev. Toxicol.* 32(5): 391–411. DOI: 10.1080/20024091064273.
- IARC (1999). Re-evaluation of Some Organic Chemicals, Hydrazine and Hydrogen Peroxide: Acetaldehyde. In: *IARC Monogr. Eval. Carcinog. risks to humans. Vol. 71*, 319–335.

- Iba, M. M., J. Fung, L. Chung, J. Zhao, B. Winnik, B. T. Buckley, L. C. Chen, J. T. Zelikoff und Y. R. Kou (2006). Differential inducibility of rat pulmonary CYP1A1 by cigarette smoke and wood smoke. *Mutat. Res.* 606(1-2): 1–11. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2006.02.007.
- Janssen, N. A., M. E. Gerlofs-Nijland, T. Lanki, R. O. Salonen, F. Cassee, G. Hoek, P. Fischer, B. Brunekreef und M. Krzyzanowski (2012). *Health effects of black carbon*.
- Jarvis, I. W. H., C. Bergvall, D. A. Morales, F. Kummrow, G. A. Umbuzeiro, R. Westerholm, U. Stenius und K. Dreij (2014). Nanomolar levels of PAHs in extracts from urban air induce MAPK signaling in HepG2 cells. *Toxicol. Lett.* 229(1): 25–32. DOI: 10.1016/j.toxlet.2014.06.013.
- Jensen, A., D. G. Karotki, J. M. Christensen, J. H. Bønløkke, T. Sigsgaard, M. Glasius, S. Loft und P. Møller (2014). Biomarkers of oxidative stress and inflammation after wood smoke exposure in a reconstructed Viking Age house. *Environ. Mol. Mutagen.* 55(8): 652–61. DOI: 10.1002/em.21877.
- Jeong, S., C. Xiao, L. Finley, T. Lahusen, A. Souza, K. Pierce, Y.-H. Li, X. Wang, G. Laurent, N. German, X. Xu, C. Li, R.-H. Wang, J. Lee, A. Csibi, R. Cerione, J. Blenis, C. Clish, A. Kimmelman, C.-X. Deng und M. Haigis (2013). SIRT4 Has Tumor-Suppressive Activity and Regulates the Cellular Metabolic Response to DNA Damage by Inhibiting Mitochondrial Glutamine Metabolism. *Cancer Cell* 23(4): 450–463. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.02.024.
- Jiang, Y., X. Qian, J. Shen, Y. Wang, X. Li, R. Liu, Y. Xia, Q. Chen, G. Peng, S.-Y. Lin und Z. Lu (2015). Local generation of fumarate promotes DNA repair through inhibition of histone H3 demethylation. *Nat. Cell Biol.* 17(9): 1158–1168. DOI: 10.1038/ncb3209.
- Johnston, F. H., S. B. Henderson, Y. Chen, J. T. Randerson, M. Marlier, R. S. Defries, P. Kinney, D. M. J. S. Bowman und M. Brauer (2012). Estimated global mortality attributable to smoke from landscape fires. *Environ. Health Perspect.* 120(5): 695–701. DOI: 10.1289/ehp.1104422.
- Jolliffe, I. (2002). *Principal Component Analysis*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Kaina, B. (2003). DNA damage-triggered apoptosis: Critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling. *Biochem. Pharmacol.* 66(8): 1547–1554. DOI: 10.1016/S0006-2952(03)00510-0.
- Karin, M. (1995). The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 270(28): 16483–16486. DOI: 10.1098/rstb.1996.0008.
- Karlsson, H. L., P. Cronholm, J. Gustafsson und L. Möller (2008). Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem. Res. Toxicol.* 21(9): 1726–32. DOI: 10.1021/tx800064j.
- Kato, M., D. Loomis, L. M. Brooks, G. F. Gattas, L. Gomes, A. B. Carvalho, M. A. Rego und D. M. DeMarini (2004). Urinary Biomarkers in Charcoal Workers Exposed to Wood Smoke in Bahia State, Brazil. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13(6): 1005–1012.
- Kawanishi, M., T. Matsuda und T. Yagi (2014). Genotoxicity of formaldehyde: molecular basis of DNA damage and mutation. *Front. Environ. Sci.* 2(September): 1–8. DOI: 10.3389/fenvs.2014.00036.
- Kawato, Y., M. Aonuma, Y. Hirota, H. Kuga und K. Sato (1991). Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. *Cancer Res.* 51(16): 4187–4191.
- Ke, S., A. B. Rabson, J. F. Germino, M. A. Gallo und Y. Tian (2001). Mechanism of suppression of cytochrome P-450 1A1 expression by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 276(43): 39638–39644. DOI: 10.1074/jbc.M106286200.
- Kennedy-Darling, J. und L. M. Smith (2014). Measuring the formaldehyde protein-DNA cross-link reversal rate. *Anal. Chem.* 86(12): 5678–5681. DOI: 10.1021/ac501354y.
- Kharbanda, S., S. Saxena, K. Yoshida, P. Pandey, M. Kaneki, Q. Wang, K. Cheng, Y.-N. Chen, A. Campbell, T. Sudha, Z.-M. Yuan, J. Narula, R. Weichselbaum, C. Nalin und D. Kufe (2000). Translocation of SAPK/JNK to Mitochondria and Interaction with Bcl-xL in Response to DNA Damage. *J. Biol. Chem.* 275(1): 322–327. DOI: 10.1074/jbc.275.1.322.



- Khosravi, R, R Maya, T Gottlieb, M Oren, Y Shiloh und D Shkedy (1999). Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96(26): 14973–14977. DOI: 10.1073/pnas.96.26.14973.
- Kim, J. S., T. M. Peters, P. T. O’Shaughnessy, A. Adamcakova-Dodd und P. S. Thorne (2013). Validation of an in vitro exposure system for toxicity assessment of air-delivered nanomaterials. *Toxicol. Vitro.* 27(1): 164–73. DOI: 10.1016/j.tiv.2012.08.030.
- Kim, K. K., M. C. Kugler, P. J. Wolters, L. Robillard, M. G. Galvez, A. N. Brumwell, D. Sheppard und H. A. Chapman (2006). Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103(35): 13180–13185. DOI: 10.1073/pnas.0605669103.
- King, A, M. A. Selak und E Gottlieb (2006). Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene* 25(34): 4675–4682. DOI: 10.1038/sj.onc.1209594.
- Kinner, A., W. Wu, C. Staudt und G. Iliakis (2008). Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res.* 36(17): 5678–5694. DOI: 10.1093/nar/gkn550.
- Knebel, J. W., D Ritter und M Aufderheide (2002). Exposure of human lung cells to native diesel motor exhaust—development of an optimized in vitro test strategy. *Toxicol. Vitro.* 16(2): 185–92.
- Kobach, A, A. I. Totlandsdal, M Låg, M Refsnes und P. E. Schwarze (2008a). Differential binding of cytokines to environmentally relevant particles: a possible source for misinterpretation of in vitro results? *Toxicol. Lett.* 176(2): 131–7. DOI: 10.1016/j.toxlet.2007.10.014.
- Kobach, A., J. I. Herseth, M. Låg, M. Refsnes und P. E. Schwarze (2008b). Particles from wood smoke and traffic induce differential pro-inflammatory response patterns in co-cultures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 232(2): 317–26. DOI: 10.1016/j.taap.2008.07.002.
- Kobach Bølling, A., J. Pagels, K. E. Yttri, L. Barregard, G. Sallsten, P. E. Schwarze und C. Boman (2009). Health effects of residential wood smoke particles: the importance of combustion conditions and physicochemical particle properties. *Part. Fibre Toxicol.* 6(1): 29. DOI: 10.1186/1743-8977-6-29.
- Koh, M. Y., T. R. Spivak-Kroizman und G. Powis (2008). HIF-1 regulation: not so easy come, easy go. *Trends Biochem. Sci.* 33(11): 526–534. DOI: 10.1016/j.tibs.2008.08.002.
- Kool, J., M. Hamdi, P. Cornelissen-Steijger, A. J. van der Eb, C. Terleth und H. van Dam (2003). Induction of ATF3 by ionizing radiation is mediated via a signaling pathway that includes ATM, Nibrin1, stress-induced MAPkinases and ATF-2. *Oncogene* 22 4235–4242. DOI: 10.1038/sj.onc.1206611.
- Krokan, H. E. und M. Bjoras (2013). Base Excision Repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5(4): a012583–a012583. DOI: 10.1101/cshperspect.a012583.
- Kuile, B. H. ter und H. V. Westerhoff (2001). Transcriptome meets metabolome: hierarchical and metabolic regulation of the glycolytic pathway. *FEBS Lett.* 500(3): 169–171. DOI: 10.1016/S0014-5793(01)02613-8.
- Künzi, L., P. Mertes, S. Schneider, N. Jeannet, C. Menzi, J. Dommen, U. Baltensperger, A. S. Prévôt, M. Salathe, M. Kalberer und M. Geiser (2013). Responses of lung cells to realistic exposure of primary and aged carbonaceous aerosols. *Atmos. Environ.* 68(1): 143–150. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2012.11.055.
- Kuo, L. und L. Yang (2008).  $\gamma$ -H2AX – A Novel Biomarker for DNA Double-strand Breaks. *In Vivo (Brooklyn)*. 22(1): 305–309.
- Kusy, R. P. und J. Q. Whitley (2005). Degradation of plastic polyoxymethylene brackets and the subsequent release of toxic formaldehyde. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 127(4): 420–7. DOI: 10.1016/j.ajodo.2004.01.023.

- LaLuppa, J. a., T. a. McAdams, E. T. Papoutsakis und W. M. Miller (1997). Culture materials affect ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells. *J. Biomed. Mater. Res.* 36(3): 347–59.
- Lamb, J., E. D. Crawford, D. Peck, J. W. Modell, I. C. Blat, M. J. Wrobel, J. Lerner, J.-p. Brunet, A. Subramanian, K. N. Ross, M. Reich, H. Hieronymus, G. Wei, S. a. Armstrong, S. J. Haggarty, P. a. Clemons, R. Wei, S. a. Carr, E. S. Lander und T. R. Golub (2006). The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *Science* (80- ). 313(5795): 1929–1935. DOI: 10.1126/science.1132939.
- Lamberg, H., K. Nuutinen, J. Tissari, J. Ruusunen, P. Yli-Pirilä, O. Sippula, M. Tapanainen, P. Jalava, U. Makkonen, K. Teinilä, K. Saarnio, R. Hillamo, M.-R. Hirvonen und J. Jokiniemi (2011). Physicochemical characterization of fine particles from small-scale wood combustion. *Atmos. Environ.* 45(40): 7635–7643. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2011.02.072.
- Lanzerstorfer, C. (2015). Chemical composition and physical properties of filter fly ashes from eight grate-fired biomass combustion plants. *J. Environ. Sci.* 30 191–197. DOI: 10.1016/j.jes.2014.08.021.
- Lee, M.-H. und H.-Y. Yang (2001). Negative regulators of cyclin-dependent kinases and their roles in cancers. *Cell. Mol. Life Sci.* 58(12): 1907–1922. DOI: 10.1007/PL00000826.
- Lee, M.-h., I. Reynisdottir und J. Massague (1995). Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev.* 9(6): 639–649.
- Lehman, T. a., R. Modali, P. Boukamp, J. Stanek, W. P. Bennett, J. a. Welsh, R. a. Metcalf, M. R. Stampfer, N. Fusenig und E. M. Rogan (1993). P53 Mutations in Human Immortalized Epithelial Cell Lines. *Carcinogenesis* 14(5): 833–9.
- Lenz, A. G., E. Karg, B. Lentner, V. Dittrich, C. Brandenberger, B. Rothen-Rutishauser, H. Schulz, G. a. Ferron und O. Schmid (2009). A dose-controlled system for air-liquid interface cell exposure and application to zinc oxide nanoparticles. *Part. Fibre Toxicol.* 6 32. DOI: 10.1186/1743-8977-6-32.
- Lenz, A.-G., E. Karg, E. Brendel, H. Hinze-Heyn, K. L. Maier, O. Eickelberg, T. Stoeger und O. Schmid (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 Res. Int.* 2013 652632. DOI: 10.1155/2013/652632.
- Lenz, A.-G., T. Stoeger, D. Cei, M. Schmidmeir, N. Semren, G. Burgstaller, B. Lentner, O. Eickelberg, S. Meiners und O. Schmid (2014). Efficient Bioactive Delivery of Aerosolized Drugs to Human Pulmonary Epithelial Cells Cultured in Air–Liquid Interface Conditions. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 51(4): 526–535. DOI: 10.1165/rcmb.2013-04790C.
- Lenzen, S. (2014). A Fresh View of Glycolysis and Glucokinase Regulation: History and Current Status. *J. Biol. Chem.* 289(18): 12189–12194. DOI: 10.1074/jbc.R114.557314.
- Li, S., T. Miao, M. Sebastian, P. Bhullar, E. Ghaffari, M. Liu, A. L. Symonds und P. Wang (2012). The Transcription Factors Egr2 and Egr3 Are Essential for the Control of Inflammation and Antigen-Induced Proliferation of B and T Cells. *Immunity* 37(4): 685–696. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.08.001.
- Lichtveld, K., S. M. Ebersviller, K. G. Sexton, W. Vizuete, I. Jaspers und H. Jeffries (2012). In Vitro Exposures in Diesel Exhaust Atmospheres: Resuspension of PM from Filters Verses Direct Deposition of PM from Air. *Environ. Sci. Technol.* DOI: 10.1021/es301431s.
- Liebermann, D. A. und B. Hoffman (2008). Gadd45 in stress signaling. *J. Mol. Signal.* 3(1): 15. DOI: 10.1186/1750-2187-3-15.
- Lim, S. K., J. C. Kim, C. J. Moon, G. Y. Kim, H. J. Han und S. H. Park (2010). Formaldehyde induces apoptosis through decreased Prx 2 via p38 MAPK in lung epithelial cells. *Toxicology* 271(3): 100–6. DOI: 10.1016/j.tox.2010.03.011.
- Limbach, L. K., P. Wick, P. Manser, R. N. Grass, A. Bruinink und W. J. Stark (2007). Exposure of Engineered Nanoparticles to Human Lung Epithelial Cells: Influence of Chemical Composition

- and Catalytic Activity on Oxidative Stress. *Environ. Sci. Technol.* 41(11): 4158–4163. DOI: 10.1021/es062629t.
- Lin, J., C. Handschin und B. M. Spiegelman (2005). Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab.* 1(6): 361–370. DOI: 10.1016/j.cmet.2005.05.004.
- Liston, P, N Roy, K Tamai, C Lefebvre, S Baird, G Cherton-Horvat, R Farahani, M McLean, J. E. Ikeda, A MacKenzie und R. G. Korneluk (1996). Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 379(6563): 349–353. DOI: 10.1038/379349a0.
- Lu, X., J. Errington, N. J. Curtin, J. Lunec und D. R. Newell (2001). The impact of p53 status on cellular sensitivity to antifolate drugs. *Clin. Cancer Res.* 7(7): 2114–2123.
- Marti, T. M., E. Hefner, L. Feeney, V. Natale und J. E. Cleaver (2006). H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103(26): 9891–9896. DOI: 10.1073/pnas.0603779103.
- McCracken, J. P., K. R. Smith, A. Díaz, M. A. Mittleman und J. Schwartz (2007). Chimney stove intervention to reduce long-term wood smoke exposure lowers blood pressure among Guatemalan women. *Environ. Health Perspect.* 115(7): 996–1001. DOI: 10.1289/ehp.9888.
- McDonald, J. D., B. Zielinska, E. M. Fujita, J. C. Sagebiel, J. C. Chow und J. G. Watson (2000). Fine Particle and Gaseous Emission Rates from Residential Wood Combustion. *Environ. Sci. Technol.* 34(11): 2080–2091. DOI: 10.1021/es9909632.
- Mertes, P., A. P. Praplan, L. Künzi, J. Dommen, U. Baltensperger, M. Geiser, E. Weingartner, J. Ricka, M. Fierz und M. Kalberer (2013). A compact and portable deposition chamber to study nanoparticles in air-exposed tissue. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 26(4): 228–35. DOI: 10.1089/jamp.2012.0985.
- Metallo, C. M., P. A. Gameiro, E. L. Bell, K. R. Mattaini, J. Yang, K. Hiller, C. M. Jewell, Z. R. Johnson, D. J. Irvine, L. Guarente, J. K. Kelleher, M. G. Vander Heiden, O. Iliopoulos und G. Stephanopoulos (2011). Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature.* DOI: 10.1038/nature10602.
- Meyerson, M und E Harlow (1994). Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol. Cell. Biol.* 14(3): 2077–86. DOI: 10.1128/MCB.14.3.2077.
- Migliaccio, C. T., M. A. Bergauff, C. P. Palmer, F. Jessop, C. W. Noonan und T. J. Ward (2009). Urinary Levoglucosan as a Biomarker of Wood Smoke Exposure: Observations in a Mouse Model and in Children. *Environ. Health Perspect.* 117(1): 74–79. DOI: 10.1289/ehp.11378.
- Milara, J., T. Peiro, A. Serrano und J. Cortijo (2013). Epithelial to mesenchymal transition is increased in patients with COPD and induced by cigarette smoke. *Thorax* 68(5): 410–420. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2012-201761.
- Mills, E. und L. A. O'Neill (2014). Succinate: a metabolic signal in inflammation. *Trends Cell Biol.* 24(5): 313–320. DOI: 10.1016/j.tcb.2013.11.008.
- Milo, R., P. Jorgensen, U. Moran, G. Weber und M. Springer (2010). BioNumbers—the database of key numbers in molecular and cell biology. *Nucleic Acids Res.* 38(Datenbankeintrag): D750–D753. DOI: 10.1093/nar/gkp889.
- Mögel, I., S. Baumann, A. Böhme, T. Kohajda, M. Von Bergen, J. C. Simon und I. Lehmann (2011). The aromatic volatile organic compounds toluene, benzene and styrene induce COX-2 and prostaglandins in human lung epithelial cells via oxidative stress and p38 MAPK activation. *Toxicology* 289(1): 28–37. DOI: 10.1016/j.tox.2011.07.006.
- Molnar, P, P Gustafson, S Johanesson, J Boman, L Barregard und G Sallsten (2005). Domestic wood burning and PM trace elements: Personal exposures, indoor and outdoor levels. *Atmos. Environ.* 39(14): 2643–2653. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2005.01.016.

- Montaner, B., P. O'Donovan, O. Reelfs, C. M. Perrett, X. Zhang, Y.-Z. Xu, X. Ren, P. Macpherson, D. Frith und P. Karran (2007). Reactive oxygen-mediated damage to a human DNA replication and repair protein. *EMBO Rep.* 8(11): 1074–1079. DOI: 10.1038/sj.embor.7401084.
- Monteiller, C., L. Tran, W. MacNee, S. Faux, A. Jones, B. Miller und K. Donaldson (2007). The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: the role of surface area. *Occup. Environ. Med.* 64(9): 609–15. DOI: 10.1136/oem.2005.024802.
- Moriguchi, T., H. Motohashi, T. Hosoya, O. Nakajima, S. Takahashi, S. Ohsako, Y. Aoki, N. Nishimura, C. Tohyama, Y. Fujii-Kuriyama und M. Yamamoto (2003). Distinct response to dioxin in an arylhydrocarbon receptor (AHR)-humanized mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100(10): 5652–7. DOI: 10.1073/pnas.1037886100.
- Morimoto, R. I. (1998). Regulation of the heat-shock transcriptional response: cross talk between a family of heat-shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* 12 3788–3796. DOI: 10.1101/gad.12.24.3788.
- Morris, J. B. (1997). Dosimetry, toxicity and carcinogenicity of inspired acetaldehyde in the rat. *Mutat. Res.* 380(1-2): 113–24.
- Muala, A., G. Rankin, M. Sehlstedt, J. Unosson, J. A. Bosson, A. Behndig, J. Pourazar, R. Nyström, E. Pettersson, C. Bergvall, R. Westerholm, P. I. Jalava, M. S. Happo, O. Uski, M.-R. Hirvonen, F. J. Kelly, I. S. Mudway, A. Blomberg, C. Boman und T. Sandström (2015a). Acute exposure to wood smoke from incomplete combustion - indications of cytotoxicity. *Part. Fibre Toxicol.* 12(1): 33. DOI: 10.1186/s12989-015-0111-7.
- Muala, A., H. Nicklasson, C. Boman, E. Swietlicki, R. Nyström, E. Pettersson, J. A. Bosson, J. Rissler, A. Blomberg, T. Sandström und J. Löndahl (2015b). Respiratory Tract Deposition of Inhaled Wood Smoke Particles in Healthy Volunteers. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 28(4): 237–246. DOI: 10.1089/jamp.2014.1122.
- Mühlberger, F., J. Wieser, A. Ulrich und R. Zimmermann (2002). Single Photon Ionization (SPI) via Incoherent VUV-Excimer Light: Robust and Compact Time-of-Flight Mass Spectrometer for On-Line, Real-Time Process Gas Analysis. *Anal. Chem.* 74(15): 3790–3801. DOI: 10.1021/ac0200825.
- Mülhopt, S., S. Diabaté, T. Krebs, C. Weiss und H.-R. Paur (2009). Lung toxicity determination by in vitro exposure at the air liquid interface with an integrated online dose measurement. *J. Phys. Conf. Ser.* 170 012008. DOI: 10.1088/1742-6596/170/1/012008.
- Mülhopt, S., M. Dilger, S. Diabaté, C. Schlager, T. Krebs, R. Zimmermann, J. Buters, S. Oeder, T. Wäscher, C. Weiss und H.-R. Paur (2016). Toxicity testing of combustion aerosols at the air-liquid interface with a self-contained and easy-to-use exposure system. *J. Aerosol Sci.* 96 38–55. DOI: 10.1016/j.jaerosci.2016.02.005.
- Naeher, L. P., M. Brauer, M. Lipsett, J. T. Zelikoff, C. D. Simpson, J. Q. Koenig und K. R. Smith (2007). Woodsmoke health effects: a review. *Inhal. Toxicol.* 19(1): 67–106. DOI: 10.1080/08958370600985875.
- Nakano, T., A. Katafuchi, M. Matsubara, H. Terato, T. Tsuboi, T. Masuda, T. Tatsumoto, S. Pil Pack, K. Makino, D. L. Croteau, B. Van Houten, K. Iijima, H. Tauchi und H. Ide (2009). Homologous recombination but not nucleotide excision repair plays a pivotal role in tolerance of DNA-protein cross-links in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 284(40): 27065–27076. DOI: 10.1074/jbc.M109.019174.
- Nara, H., Y. Fukano, T. Nishino und M. Aufderheide (2013). Detection of the cytotoxicity of water-insoluble fraction of cigarette smoke by direct exposure to cultured cells at an air-liquid interface. *Exp. Toxicol. Pathol.* 65(5): 683–8. DOI: 10.1016/j.etp.2012.08.004.
- Nebert, D. W. und T. P. Dalton (2006). The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 6(12): 947–60. DOI: 10.1038/nrc2015.

- Neitzel, R, L. P. Naehrer, M Paulsen, K Dunn, a Stock und C. D. Simpson (2009). Biological monitoring of smoke exposure among wildland firefighters: a pilot study comparing urinary methoxyphenols with personal exposures to carbon monoxide, particulate matter, and levoglucosan. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 19(4): 349–58. DOI: 10.1038/jes.2008.21.
- Nel, A., T. Xia, L. Mädler und N. Li (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311(5761): 622–7. DOI: 10.1126/science.1114397.
- Nielsen, G. D., S. T. Larsen und P. Wolkoff (2013). Recent trend in risk assessment of formaldehyde exposures from indoor air. *Arch. Toxicol.* 87(1): 73–98. DOI: 10.1007/s00204-012-0975-3.
- Nisbet, I. C. und P. K. LaGoy (1992). Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 16(3): 290–300. DOI: 10.1016/0273-2300(92)90009-X.
- Noonan, C. W., T. J. Ward, W. Navidi und L. Sheppard (2012). A rural community intervention targeting biomass combustion sources: effects on air quality and reporting of children's respiratory outcomes. *Occup. Environ. Med.* 69(5): 354–60. DOI: 10.1136/oemed-2011-100394.
- Nussbaumer, T. (2003). Combustion and Co-combustion of Biomass: Fundamentals, Technologies, and Primary Measures for Emission Reduction. *Energy and Fuels* 17(6): 1510–1521. DOI: 10.1021/ef030031q.
- Oberdörster, G., E. Oberdörster und J. Oberdörster (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 113(7): 823–39.
- O'Brien, J, I Wilson, T Orton und F Pognan (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 267(17): 5421–6.
- Oeder, S., T. Kanashova, O. Sippula et al. (2015). Particulate Matter from Both Heavy Fuel Oil and Diesel Fuel Shipping Emissions Show Strong Biological Effects on Human Lung Cells at Realistic and Comparable In Vitro Exposure Conditions. *PLoS One* 10(6): e0126536. DOI: 10.1371/journal.pone.0126536.
- Oh, S.-Y., J.-G. Son, O.-T. Lim und P. C. Chiu (2012). The role of black carbon as a catalyst for environmental redox transformation. *Environ. Geochem. Health* 34(1): 105–13. DOI: 10.1007/s10653-011-9416-0.
- Okuwa, K., M. Tanaka, Y. Fukano, H. Nara, Y. Nishijima und T. Nishino (2010). In vitro micronucleus assay for cigarette smoke using a whole smoke exposure system: a comparison of smoking regimens. *Exp. Toxicol. Pathol.* 62(4): 433–40. DOI: 10.1016/j.etp.2009.06.002.
- Olive, P. L. und J. P. Banàth (2009). Kinetics of H2AX phosphorylation after exposure to cisplatin. *Cytom. Part B - Clin. Cytom.* 76(2): 79–90. DOI: 10.1002/cyto.b.20450.
- Orasche, J., J. Schnelle-Kreis, G. Abbaszade und R. Zimmermann (2011). Technical Note: In-situ derivatization thermal desorption GC-TOFMS for direct analysis of particle-bound non-polar and polar organic species. *Atmos. Chem. Phys.* 11(2007): 8977–8993. DOI: 10.5194/acp-11-8977-2011.
- Orasche, J., T. Seidel, H. Hartmann, J. Schnelle-Kreis, J. C. Chow, H. Ruppert und R. Zimmermann (2012). Comparison of Emissions from Wood Combustion. Part 1: Emission Factors and Characteristics from Different Small-Scale Residential Heating Appliances Considering Particulate Matter and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH)-Related Toxicological Potential. *Energy & Fuels*: 121017163608008. DOI: 10.1021/ef301295k.
- Orasche, J., J. Schnelle-Kreis, C. Schön, H. Hartmann, H. Ruppert, J. M. Arteaga-Salas und R. Zimmermann (2013). Comparison of emissions from wood combustion. Part 2: Impact of combustion conditions on emission factors and characteristics of particle-bound organic species and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-related toxicological potential. *Energy & Fuels* 27 1482–1491. DOI: 10.1021/ef301506h.

- Ortega-Atienza, S., S. E. Green und A. Zhitkovich (2015). Proteasome activity is important for replication recovery, CHK1 phosphorylation and prevention of G2 arrest after low-dose formaldehyde. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 286(2): 135–141. DOI: 10.1016/j.taap.2015.03.018.
- Ott, M., V. Gogvadze, S. Orrenius und B. Zhivotovsky (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 12(5): 913–922. DOI: 10.1007/s10495-007-0756-2.
- Owens, D. M. und S. M. Keyse (2007). Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene* 26(22): 3203–3213. DOI: 10.1038/sj.onc.1210412.
- Panas, A, C Marquardt, O Nalcaci, H Bockhorn, W Baumann, H.-R. Paur, S Mühlhopt, S Diabaté und C Weiss (2013). Screening of different metal oxide nanoparticles reveals selective toxicity and inflammatory potential of silica nanoparticles in lung epithelial cells and macrophages. *Nanotoxicology* 7(3): 259–73. DOI: 10.3109/17435390.2011.652206.
- Panas, A., A. Comouth, H. Saathoff, T. Leisner, M. Al-Rawi, M. Simon, G. Seemann, O. Dössel, S. Mühlhopt, H.-R. Paur, S. Fritsch-Decker, C. Weiss und S. Diabaté (2014). Silica nanoparticles are less toxic to human lung cells when deposited at the air–liquid interface compared to conventional submerged exposure. *Beilstein J. Nanotechnol.* 5 1590–1602. DOI: 10.3762/bjnano.5.171.
- Park, J.-H., D. Mangal, K. A. Tacka, A. M. Quinn, R. G. Harvey, I. A. Blair und T. M. Penning (2008). Evidence for the aldo-keto reductase pathway of polycyclic aromatic trans-dihydrodiol activation in human lung A549 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105(19): 6846–51. DOI: 10.1073/pnas.0802776105.
- Paur, H.-R., S. Mühlhopt, C. Weiss und S. Diabaté (2008). In vitro exposure systems and bioassays for the assessment of toxicity of nanoparticles to the human lung. *J. Consum. Prot. food Saf.* 3 319–329.
- Paur, H.-R., F. R. Cassee, J. Teeguarden, H. Fissan, S. Diabate, M. Aufderheide, W. G. Kreyling, O. Hänninen, G. Kasper, M. Riediker, B. Rothen-Rutishauser und O. Schmid (2011). In-vitro cell exposure studies for the assessment of nanoparticle toxicity in the lung-A dialog between aerosol science and biology. *J. Aerosol Sci.* 42(10): 668–692. DOI: 10.1016/j.jaerosci.2011.06.005.
- Peifer, M., L. Fernández-Cuesta, M. L. Sos et al. (2012). Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer. *Nat. Genet.* 44(10): 1104–1110. DOI: 10.1038/ng.2396.
- Peng, G., C. Chun-Jen Lin, W. Mo, H. Dai, Y.-Y. Park, S. M. Kim, Y. Peng, Q. Mo, S. Siwko, R. Hu, J.-S. Lee, B. Hennessy, S. Hanash, G. B. Mills und S.-Y. Lin (2014). Genome-wide transcriptome profiling of homologous recombination DNA repair. *Nat. Commun.* 5 3361. DOI: 10.1038/ncomms4361. arXiv: NIHMS150003.
- Persinger, R. L., M. E. Poynter, K. Ckless und Y. M. W. Janssen-Heininger (2002). Molecular mechanisms of nitrogen dioxide induced epithelial injury in the lung. *Mol. Cell. Biochem.* 234-235(2): 71–80. DOI: 10.1023/A:1015973530559.
- Pfleger, C. M., A. Salic, E. Lee und M. W. Kirschner (2001). Inhibition of Cdh1-APC by the MAD2-related protein MAD2L2: A novel mechanism for regulating Cdh1. *Genes Dev.* 15(617): 1759–1764. DOI: 10.1101/gad.897901.
- Phalen, R. F. (2006). Tracheobronchial Particle Dose Considerations for In Vitro Toxicology Studies. *Toxicol. Sci.* 92(1): 126–132. DOI: 10.1093/toxsci/kfj182.
- Pulskamp, K., S. Diabaté und H. F. Krug (2007). Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. *Toxicol. Lett.* 168(1): 58–74. DOI: 10.1016/j.toxlet.2006.11.001.
- Rach, J., B. Halter und M. Aufderheide (2013). Importance of material evaluation prior to the construction of devices for in vitro techniques. *Exp. Toxicol. Pathol.* 1–6. DOI: 10.1016/j.etp.2013.01.011.

- Raemy, D. O., R. N. Grass, W. J. Stark, C. M. Schumacher, M. J. D. Clift, P. Gehr und B. Rothen-Rutishauser (2012). Effects of flame made zinc oxide particles in human lung cells - a comparison of aerosol and suspension exposures. *Part. Fibre Toxicol.* 9(1): 33. DOI: 10.1186/1743-8977-9-33.
- Ray, P. D., B.-W. Huang und Y. Tsuji (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.* 24(5): 981–990. DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.01.008.
- Reardon, J. T., Y. Cheng und A. Sancar (2006). Repair of DNA–Protein Cross-links in Mammalian Cells. *Cell Cycle* 5(13): 1366–1370. DOI: 10.4161/cc.5.13.2892.
- Reda, A. A., H. Czech, J. Schnelle-Kreis, O. Sippula, J. Orasche, B. Weggler, G. Abbaszade, J. M. Arteaga-Salas, M. Kortelainen, J. Tissari, J. Jokiniemi, T. Streibel und R. Zimmermann (2015). Analysis of Gas-Phase Carbonyl Compounds in Emissions from Modern Wood Combustion Appliances: Influence of Wood Type and Combustion Appliance. *Energy & Fuels* 29(6): 3897–3907. DOI: 10.1021/ef502877c.
- Reddel, R. R., Y. Ke, B. I. Gerwin, M. G. McMenamin, J. F. Lechner, R. T. Su, D. E. Brash, J. B. Park, J. S. Rhim und C. C. Harris (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 Res.* 48(7): 1904–1909.
- Riddervold, I. S., J. H. Bønløkke, A.-C. Olin, T. K. Grønborg, V. Schlünssen, K. Skogstrand, D. Hougaard, A. Massling und T. Sigsgaard (2012). Effects of wood smoke particles from wood-burning stoves on the respiratory health of atopic humans. *Part. Fibre Toxicol.* 9(1): 12. DOI: 10.1186/1743-8977-9-12.
- Riganti, C., E. Gazzano, M. Polimeni, E. Aldieri und D. Ghigo (2012). The pentose phosphate pathway: An antioxidant defense and a crossroad in tumor cell fate. *Free Radic. Biol. Med.* 53(3): 421–436. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.006.
- Riojas-Rodríguez, H., P. Romano-Riquer, C. Santos-Burgoa und K. R. Smith (2001). Household Firewood Use and the Health of Children and Women of Indian Communities in Chiapas, Mexico. *Int. J. Occup. Environ. Health* 7(1): 44–53. DOI: 10.1179/107735201800339650.
- Rogakou, E. P., D. R. Pilch, A. H. Orr, V. S. Ivanova und W. M. Bonner (1998). DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. *J. Biol. Chem.* 273(10): 5858–5868. DOI: 10.1074/jbc.273.10.5858.
- Saber, A. T., K. A. Jensen, N. R. Jacobsen, R. Birkedal, L. Mikkelsen, P. Møller, S. Loft, H. Wallin und U. Vogel (2012). Inflammatory and genotoxic effects of nanoparticles designed for inclusion in paints and lacquers. *Nanotoxicology* 6(5): 453–71. DOI: 10.3109/17435390.2011.587900.
- Sanhueza, P. A., M. A. Torreblanca, L. A. Diaz-Robles, L. N. Schiappacasse, M. P. Silva und T. D. Astete (2009). Particulate Air Pollution and Health Effects for Cardiovascular and Respiratory Causes in Temuco, Chile: A Wood-Smoke-Polluted Urban Area. *J. Air Waste Manage. Assoc.* 59(12): 1481–1488. DOI: 10.3155/1047-3289.59.12.1481.
- Sapcariu, S., T. Kanashova, M. Dilger, S. Diabaté, S. Oeder, J. Passig, C. Radischat, J. Buters, O. Sippula, T. Streibel, H.-R. Paur, C. Schlager, S. Mülhopt, B. Stengel, R. Rabe, H. Harndorf, T. Krebs, E. Karg, T. Gröger, C. Weiss, G. Dittmar, K. Hiller und R. Zimmermann (2016). Metabolic profiling as well as stable isotope assisted metabolic and proteomic analysis of RAW 264.7 macrophages exposed to ship engine aerosol emissions: Different effects of heavy fuel oil and refined diesel fuel. *PLoS One* 11(6). DOI: 10.1371/journal.pone.0157964.
- Sapcariu, S. C., T. Kanashova, D. Weindl, J. Ghelfi, G. Dittmar und K. Hiller (2014). Simultaneous extraction of proteins and metabolites from cells in culture. *MethodsX* 1(1): 74–80. DOI: 10.1016/j.mex.2014.07.002.

- Savi, M., M. Kalberer, D. Lang, M. Ryser, M. Fierz, A. Gaschen, J. Ricka und M. Geiser (2008). A novel exposure system for the efficient and controlled deposition of aerosol particles onto cell cultures. *Environ. Sci. Technol.* 42(15): 5667–74.
- Scarola, M., S. Schoeftner, C. Schneider und R. Benetti (2010). miR-335 Directly Targets Rb1 (pRb/p105) in a Proximal Connection to p53-Dependent Stress Response. *Cancer Res.* 70(17): 6925–6933. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0141.
- Schmidl, C., I. L. Marr, A. Caseiro, P. Kotianová, A. Berner, H. Bauer, A. Kasper-Giebl und H. Puxbaum (2008). Chemical characterisation of fine particle emissions from wood stove combustion of common woods growing in mid-European Alpine regions. *Atmos. Environ.* 42(1): 126–141. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2007.09.028.
- Schmidl, C., M. Luisser, E. Padouvas, L. Lasselsberger, M. Rzaca, C. Ramirez-Santa Cruz, M. Handler, G. Peng, H. Bauer und H. Puxbaum (2011). Particulate and gaseous emissions from manually and automatically fired small scale combustion systems. *Atmos. Environ.* 45(39): 7443–7454. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2011.05.006.
- Schmittgen, T. D. und K. J. Livak (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 3(6): 1101–1108. DOI: 10.1038/nprot.2008.73.
- Schreck, I, N Grico, I Hansjosten, C Marquardt, S Bormann, A Seidel, D. L. Kvietkova, D Pieniazek, D Segerbäck, S Diabaté, G. T. J. van der Horst, B Oesch-Bartlomowicz, F Oesch und C Weiss (2015). The nucleotide excision repair protein XPC is essential for bulky DNA adducts to promote interleukin-6 expression via the activation of p38-SAPK. *Oncogene.* DOI: 10.1038/onc.2015.145.
- Schreck, I., D. Chudziak, S. Schneider, A. Seidel, K. L. Platt, F. Oesch und C. Weiss (2009). Influence of aryl hydrocarbon- (Ah) receptor and genotoxins on DNA repair gene expression and cell survival of mouse hepatoma cells. *Toxicology* 259(3): 91–6. DOI: 10.1016/j.tox.2009.02.006.
- Seagrave, J., S. Dunaway, J. D. McDonald, J. L. Mauderly, P. Hayden und C. Stidley (2007). Responses of differentiated primary human lung epithelial cells to exposure to diesel exhaust at an air-liquid interface. *Exp. Lung Res.* 33(1): 27–51. DOI: 10.1080/01902140601113088.
- Sehlstedt, M., R. Dove, C. Boman, J. Pagels, E. Swietlicki, J. Löndahl, R. Westerholm, J. Bosson, S. Barath, A. F. Behndig, J. Pourazar, T. Sandström, I. S. Mudway und A. Blomberg (2010). Antioxidant airway responses following experimental exposure to wood smoke in man. *Part. Fibre Toxicol.* 7(1): 21. DOI: 10.1186/1743-8977-7-21.
- Selak, M. A., S. M. Armour, E. D. MacKenzie, H. Boulahbel, D. G. Watson, K. D. Mansfield, Y. Pan, M. Simon, C. B. Thompson und E. Gottlieb (2005). Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- $\alpha$  prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* 7(1): 77–85. DOI: 10.1016/j.ccr.2004.11.022.
- Semenza, G. L., P. H. Roth, H. M. Fang und G. L. Wang (1994). Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 269(38): 23757–63.
- Semenza, G. L. (2001). HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13(2): 167–171. DOI: 10.1016/S0955-0674(00)00194-0.
- Semisch, A., J. Ohle, B. Witt und A. Hartwig (2014). Cytotoxicity and genotoxicity of nano- and microparticulate copper oxide: role of solubility and intracellular bioavailability. *Part. Fibre Toxicol.* 11(1): 10. DOI: 10.1186/1743-8977-11-10.
- Sharma, G., V. Kodali, M. Gaffrey, W. Wang, K. R. Minard, N. J. Karin, J. G. Teeguarden und B. D. Thrall (2014). Iron oxide nanoparticle agglomeration influences dose rates and modulates oxidative stress-mediated dose-response profiles in vitro. *Nanotoxicology* 8(6): 663–75. DOI: 10.3109/17435390.2013.822115.
- Shaykhiev, R., F. Otaki, P. Bonsu, D. T. Dang, M. Teater, Y. Strulovici-Barel, J. Salit, B.-G. Harvey und R. G. Crystal (2011). Cigarette smoking reprograms apical junctional complex molecular



- architecture in the human airway epithelium in vivo. *Cell. Mol. life Sci.* 68(5): 877–92. DOI: 10.1007/s00018-010-0500-x. arXiv: NIHMS150003.
- Sigsgaard, T., B. Forsberg, I. Annesi-Maesano, A. Blomberg, A. Bølling, C. Boman, J. Bønløkke, M. Brauer, N. Bruce, M.-E. Héroux, M.-R. Hirvonen, F. Kelly, N. Künzli, B. Lundbäck, H. Moshhammer, C. Noonan, J. Pagels, G. Sallsten, J.-P. Sculier und B. Brunekreef (2015). Health impacts of anthropogenic biomass burning in the developed world. *Eur. Respir. J.* 46(6): 1577–1588. DOI: 10.1183/13993003.01865-2014.
- Sillanpää, M., M. D. Geller, H. C. Phuleria und C. Sioutas (2008). High collection efficiency electrostatic precipitator for in vitro cell exposure to concentrated ambient particulate matter (PM). *J. Aerosol Sci.* 39(4): 335–347. DOI: 10.1016/j.jaerosci.2007.12.001.
- Simoneit, B., J. Schauer, C. Nolte, D. Oros, V. Elias, M. Fraser, W. Rogge und G. Cass (1999). Levoglucosan, a tracer for cellulose in biomass burning and atmospheric particles. *Atmos. Environ.* 33(2): 173–182. DOI: 10.1016/S1352-2310(98)00145-9.
- Singh, A., V. Misra, R. K. Thimmulappa, H. Lee, S. Ames, M. O. Hoque, J. G. Herman, S. B. Baylin, D. Sidransky, E. Gabrielson, M. V. Brock und S. Biswal (2006). Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. *PLoS Med.* 3(10): e420. DOI: 10.1371/journal.pmed.0030420.
- Sippula, O., T. Lind und J. Jokiniemi (2008). Effects of chlorine and sulphur on particle formation in wood combustion performed in a laboratory scale reactor. *Fuel* 87(12): 2425–2436. DOI: 10.1016/j.fuel.2008.02.004.
- Snyder, R., G. Witz und B. D. Goldstein (1993). The toxicology of benzene. *Environ. Health Perspect.* 100 293–306. DOI: 10.1289/ehp.93100293.
- Staszewski, O., T. Nikolova und B. Kaina (2008). Kinetics of  $\gamma$ -H2AX focus formation upon treatment of cells with UV light and alkylating agents. *Environ. Mol. Mutagen.* 49(9): 734–740. DOI: 10.1002/em.20430.
- Stingele, J. und S. Jentsch (2015). DNA–protein crosslink repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16(8): 455–460. DOI: 10.1038/nrm4015.
- Stingele, J., M. S. Schwarz, N. Bloemeke, P. G. Wolf und S. Jentsch (2014). A DNA-Dependent Protease Involved in DNA-Protein Crosslink Repair. *Cell* 158(2): 327–338. DOI: 10.1016/j.cell.2014.04.053.
- Stockfelt, L., G. Sallsten, A.-C. Olin, P. Almerud, L. Samuelsson, S. Johannesson, P. Molnar, B. Strandberg, A.-C. Almstrand, K. Bergemalm-Rynell und L. Barregard (2012). Effects on airways of short-term exposure to two kinds of wood smoke in a chamber study of healthy humans. *Inhal. Toxicol.* 24(1): 47–59. DOI: 10.3109/08958378.2011.633281.
- Stockfelt, L., G. Sallsten, P. Almerud, S. Basu und L. Barregard (2013). Short-term chamber exposure to low doses of two kinds of wood smoke does not induce systemic inflammation, coagulation or oxidative stress in healthy humans. *Inhal. Toxicol.* 25(8): 417–25. DOI: 10.3109/08958378.2013.798387.
- Stoeger, T., S. Takenaka, B. Frankenberger, B. Ritter, E. Karg, K. Maier, H. Schulz und O. Schmid (2009). Deducing in vivo toxicity of combustion-derived nanoparticles from a cell-free oxidative potency assay and metabolic activation of organic compounds. *Environ. Health Perspect.* 117(1): 54–60. DOI: 10.1289/ehp.11370.
- Stohs, S. und D. Bagchi (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 18(2): 321–336.
- Straif, K., A. Cohen und J. Samet (2013). Air Pollution and Cancer. In: *IARC Sci. Publ. No. 161*.
- Stresemann, C. und F. Lyko (2008). Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int. J. Cancer* 123(1): 8–13. DOI: 10.1002/ijc.23607.

- Sugden, M. C. und M. J. Holness (2006). Mechanisms underlying regulation of the expression and activities of the mammalian pyruvate dehydrogenase kinases. *Arch. Physiol. Biochem.* 112(3): 139–49. DOI: 10.1080/13813450600935263.
- Supek, F., M. Bošnjak, N. Škunca und T. Šmuc (2011). REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. *PLoS One* 6(7). Hrsg. von C. Gibas: 21800. DOI: 10.1371/journal.pone.0021800.
- Swiston, J. R., W Davidson, S Attridge, G. T. Li, M Brauer und S. F. van Eeden (2008). Wood smoke exposure induces a pulmonary and systemic inflammatory response in firefighters. *Eur. Respir. J.* 32(1): 129–138. DOI: 10.1183/09031936.00097707.
- Tapanainen, M., P. I. Jalava, J. Mäki-Paakkanen, P. Hakulinen, M. S. Happo, H. Lamberg, J. Ruusunen, J. Tissari, K. Nuutinen, P. Yli-Pirilä, R. Hillamo, R. O. Salonen, J. Jokiniemi und M.-R. Hirvonen (2011). In vitro immunotoxic and genotoxic activities of particles emitted from two different small-scale wood combustion appliances. *Atmos. Environ.* 45(40): 7546–7554. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2011.03.065.
- Tavaria, M, T Gabriele, I Kola und R. L. Anderson (1996). A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress Chaperones* 1(1): 23–28.
- Thiery, J. P. und J. P. Sleeman (2006). Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7(2): 131–142. DOI: 10.1038/nrm1835.
- Thompson, L. H. (2012). Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: The molecular choreography. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 751(2): 158–246. DOI: 10.1016/j.mrrev.2012.06.002.
- Thorne, D., J. Wilson, T. S. Kumaravel, E. D. Massey und M. McEwan (2009). Measurement of oxidative DNA damage induced by mainstream cigarette smoke in cultured NCI-H292 human pulmonary carcinoma cells. *Mutat. Res.* 673(1): 3–8. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2008.11.008.
- Thurston, G. D., K. Ito und R. Lall (2011). A Source Apportionment of U.S. Fine Particulate Matter Air Pollution. *Atmos. Environ.* 45(24): 3924–3936. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2011.04.070.
- Tibbetts, R. S., K. M. Brumbaugh, J. M. Williams, J. N. Sarkaria, W. a. Cliby, S. Y. Shieh, Y. Taya, C. Prives und R. T. Abraham (1999). A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev.* 13(2): 152–157. DOI: 10.1101/gad.13.2.152.
- Tippe, A, U Heinzmann und C Roth (2002). Deposition of fine and ultrafine aerosol particles during exposure at the air-cell interface. *J. Aerosol Sci.* 33 207–218.
- Torvela, T., J. Tissari, O. Sippula, T. Kaivosoja, J. Leskinen, a. Virén, a. Lähde und J. Jokiniemi (2014a). Effect of wood combustion conditions on the morphology of freshly emitted fine particles. *Atmos. Environ.* 87 65–76. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2014.01.028.
- Torvela, T., O. Uski, T. Karhunen, A. Lähde, P. Jalava, O. Sippula, J. Tissari, M.-R. Hirvonen und J. Jokiniemi (2014b). Reference particles for toxicological studies of wood combustion: formation, characteristics, and toxicity compared to those of real wood combustion particulate mass. *Chem. Res. Toxicol.* 27(9): 1516–27. DOI: 10.1021/tx500142f.
- Totlandsdal, A. I., M. Låg, E. Lilleaas, F. Cassee und P. Schwarze (2015). Differential proinflammatory responses induced by diesel exhaust particles with contrasting PAH and metal content. *Environ. Toxicol.* 30(2): 188–196. DOI: 10.1002/tox.21884.
- Trapnell, C., A. Roberts, L. Goff, G. Pertea, D. Kim, D. R. Kelley, H. Pimentel, S. L. Salzberg, J. L. Rinn und L. Pachter (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat. Protoc.* 7(3): 562–78. DOI: 10.1038/nprot.2012.016.
- Traynor, G. W., M. G. Apte, A. R. Carruthers, J. F. Dillworth, D. T. Grimsrud und L. a. Gundel (1987). Indoor air pollution due to emissions from wood-burning stoves. *Environ. Sci. Technol.* 21(7): 691–697. DOI: 10.1021/es00161a010.

- Tsvetkov, L. M., K. H. Yeh, S. J. Lee, H Sun und H Zhang (1999). p27(Kip1) ubiquitination and degradation is regulated by the SCF(Skp2) complex through phosphorylated Thr187 in p27. *Curr. Biol.* 9(12): 661–4. DOI: 10.1016/S0960-9822(99)80290-5.
- Unfried, K., C. Albrecht, L.-O. Klotz, A. Von Mikecz, S. Grether-Beck und R. P. Schins (2007). Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms. *Nanotoxicology* 1(1): 52–71. DOI: 10.1080/00222930701314932.
- Unosson, J., A. Blomberg, T. Sandström, A. Muala, C. Boman, R. Nyström, R. Westerholm, N. L. Mills, D. E. Newby, J. P. Langrish und J. a. Bosson (2013). Exposure to wood smoke increases arterial stiffness and decreases heart rate variability in humans. *Part. Fibre Toxicol.* 10(1): 20. DOI: 10.1186/1743-8977-10-20.
- Uski, O., P. Jalava, M. Happonen, J. Leskinen, O. Sippula, J. Tissari, J. Mäki-Paakkanen, J. Jokiniemi und M.-R. Hirvonen (2014). Different toxic mechanisms are activated by emission PM depending on combustion efficiency. *Atmos. Environ.* 89(1): 623–632. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2014.02.036.
- Uski, O., P. Jalava, M. Happonen, T. Torvela, J. Leskinen, J. Mäki-Paakkanen, J. Tissari, O. Sippula, H. Lamberg, J. Jokiniemi und M.-R. Hirvonen (2015). Effect of fuel zinc content on toxicological responses of particulate matter from pellet combustion in vitro. *Sci. Total Environ.* 511 331–340. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.12.061.
- Val, S., V. Stéphanie, L. Martinon, M. Laurent, H. Cachier, C. Hélène, A. Yahyaoui, Y. Abderrazak, H. Marfaing, M. Hélène, A. Baeza-Squiban und B.-S. Armelle (2011). Role of size and composition of traffic and agricultural aerosols in the molecular responses triggered in airway epithelial cells. *EN. Inhal. Toxicol.* 23(11): 627–40. DOI: 10.3109/08958378.2011.599445.
- Vander Heiden, M. G., L. C. Cantley und C. B. Thompson (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science (80- )*. 324(5930): 1029–1033. DOI: 10.1126/science.1160809.
- Vandewalle, C., J. Comijn, B. De Craene, P. Vermassen, E. Bruyneel, H. Andersen, E. Tulchinsky, F. Van Roy und G. Berx (2005). SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Res.* 33(20): 6566–78. DOI: 10.1093/nar/gki965.
- Veljkovic, E., J. Jiricny, M. Menigatti, H. Rehrauer und W. Han (2011). Chronic exposure to cigarette smoke condensate in vitro induces epithelial to mesenchymal transition-like changes in human bronchial epithelial cells, BEAS-2B. *Toxicol. Vitro.* 25(2): 446–453. DOI: 10.1016/j.tiv.2010.11.011.
- Vilenchik, M. M. und A. G. Knudson (2003). Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100(22): 12871–12876. DOI: 10.1073/pnas.2135498100.
- Wang, Z., M. Gerstein und M. Snyder (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 10(1): 57–63. DOI: 10.1038/nrg2484. arXiv: NIHMS150003.
- Wegner, A., S. C. Sapcaru, D. Weindl und K. Hiller (2013). Isotope cluster-based compound matching in gas chromatography/mass spectrometry for non-targeted metabolomics. *Anal. Chem.* 85(8): 4030–7. DOI: 10.1021/ac303774z.
- Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81(3): 323–330. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90385-2.
- Weinberger, B, D. L. Laskin, D. E. Heck und J. D. Laskin (2001). The toxicology of inhaled nitric oxide. *Toxicol. Sci.* 59(1): 5–16. DOI: 10.1093/toxsci/59.1.5.
- Wheeler, A. J., M. D. Gibson, M. MacNeill, T. J. Ward, L. A. Wallace, J. Kuchta, M. Seaboyer, E. Dabek-Zlotorzynska, J. R. Guernsey und D. M. Stieb (2014). Impacts of air cleaners on indoor air quality in residences impacted by wood smoke. *Environ. Sci. Technol.* 48(20): 12157–63. DOI: 10.1021/es503144h.

- Whitmarsh, A. J. und R. J. Davis (1996). Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J. Mol. Med.* 74 589–607.
- Wick, P., P. Manser, L. K. Limbach, U. Dettlaff-Weglikowska, F. Krumeich, S. Roth, W. J. Stark und A. Bruinink (2007). The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. *Toxicol. Lett.* 168(2): 121–31. DOI: 10.1016/j.toxlet.2006.08.019.
- Willis, B. C. und Z. Borok (2007). TGF- beta -induced EMT : mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am. J. Physiol.* 293(3): 525–34. DOI: 10.1152/ajplung.00163.2007.
- Wood, R. D. und M. K. K. Shivji (1997). Which DNA polymerases are used for DNA-repair in eukaryotes? *Carcinogenesis* 18(4): 605–610. DOI: 10.1093/carcin/18.4.605.
- Wu, C.-C., T.-K. Li, L. Farh, L.-Y. Lin, T.-S. Lin, Y.-J. Yu, T.-J. Yen, C.-W. Chiang und N.-L. Chan (2011). Structural Basis of Type II Topoisomerase Inhibition by the Anticancer Drug Etoposide. *Science (80- )*. 333(6041): 459–462. DOI: 10.1126/science.1204117.
- Xiao, M., H. Yang, W. Xu, S. Ma, H. Lin, H. Zhu, L. Liu, Y. Liu, C. Yang, Y. Xu, S. Zhao, D. Ye, Y. Xiong und K.-L. Guan (2012). Inhibition of -KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors. *Genes Dev.* 26(12): 1326–1338. DOI: 10.1101/gad.191056.112.
- Yeh, H.-C. und G. Schum (1980). Models of human lung airways and their application to inhaled particle deposition. *Bull. Math. Biol.* 42(3): 461–480.
- Yon Rhee, S., V. Wood, K. Dolinski und S. Draghici (2008). Use and misuse of the gene ontology annotations. *Nat. Rev. Genet.* 9(7): 509–515. DOI: 10.1038/nrg2363.
- Yoo, J., M. Ghiassi, L. Jirmanova, A. G. Balliet, B. Hoffman, A. J. Fornace, D. A. Liebermann, E. P. Bottinger und A. B. Roberts (2003). Transforming Growth Factor- -induced Apoptosis Is Mediated by Smad-dependent Expression of GADD45b through p38 Activation. *J. Biol. Chem.* 278(44): 43001–43007. DOI: 10.1074/jbc.M307869200.
- Yoshida, I. und Y. Ibuki (2014). Formaldehyde-induced histone H3 phosphorylation via JNK and the expression of proto-oncogenes. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 770 9–18. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2014.09.003.
- Yoshida, K. und Y. Miki (2004). Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci.* 95(11): 866–871. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2004.tb02195.x.
- Youle, R. J. und A. Strasser (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9(1): 47–59. DOI: 10.1038/nrm2308.
- Zavala, J., K. Lichtveld, S. Ebersviller, J. L. Carson, G. W. Walters, I. Jaspers, H. E. Jeffries, K. G. Sexton und W. Vizuete (2014). The Gillings Sampler - An electrostatic air sampler as an alternative method for aerosol in vitro exposure studies. *Chem. Biol. Interact.* 220C 158–168. DOI: 10.1016/j.cbi.2014.06.026.
- Zeman, M. K. und K. A. Cimprich (2014). Causes and consequences of replication stress. *Nat. Cell Biol.* 16(1): 2–9. DOI: 10.1038/ncb2897.
- Zhan, Q. (2005). Gadd45a, a p53- and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 569(1-2): 133–143. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2004.06.055.
- Zhang, H., H. Liu, Z. Borok, K. J. Davies, F. Ursini und H. J. Forman (2012). Cigarette smoke extract stimulates epithelial–mesenchymal transition through Src activation. *Free Radic. Biol. Med.* 52(8): 1437–1442. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.024.
- Zhou, L., A. Azfer, J. Niu, S. Graham, M. Choudhury, F. M. Adamski, C. Younce, P. F. Binkley und P. E. Kolattukudy (2006). Monocyte Chemoattractant Protein-1 Induces a Novel Transcription Factor That Causes Cardiac Myocyte Apoptosis and Ventricular Dysfunction. *Circ. Res.* 98(9): 1177–1185. DOI: 10.1161/01.RES.0000220106.64661.71.

- 
- Zhou, Q., P. Y. Lam, D. Han und E. Cadenas (2008). c-Jun N-terminal kinase regulates mitochondrial bioenergetics by modulating pyruvate dehydrogenase activity in primary cortical neurons. *J. Neurochem.* 104(2): 325–335. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2007.04957.x.
- Zimmermann, R., U. Boesl, H.-J. Heger, E. R. Rohwer, E. K. Orthner, E. W. Schlag und A. Kettrup (1997). Hyphenation of gas chromatography and resonance-enhanced laser mass spectrometry (REMPI-TOFMS): A multidimensional analytical technique. *J. High Resolut. Chromatogr.* 20(9): 461–470. DOI: 10.1002/jhrc.1240200902.
- Zou, Y., S. Li, W. Zou, G. Hu, Y. Zhou, G. Peng, F. He, B. Li und P. Ran (2014). Upregulation of Gelatinases and Epithelial–Mesenchymal Transition in Small Airway Remodeling Associated with Chronic Exposure to Wood Smoke. *PLoS One* 9(5). Hrsg. von O. Eickelberg: e96708. DOI: 10.1371/journal.pone.0096708.



# Abkürzungsverzeichnis

B[a]P .....	Benzo[a]pyren
CB14 .....	Carbon Black Nanopartikel
CDK .....	Cyclin abhängige Kinase
DSB .....	Doppelstrangbruch
EC .....	elementarer Kohlenstoff
EMT .....	Epitheliale-mesenchymale-Transition
FA .....	Formaldehyd
FKS .....	Fetales Kälberserum
IQR .....	Interquartilsabstand
KH .....	Kohlenhydrat
LDH .....	Laktatdehydrogenase
LOD .....	Limit of detection
OC .....	organisch gebundener Kohlenstoff
PAK .....	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PCA .....	Hauptkomponentenanalyse
PPP .....	Pentosephosphatweg, -pathway
QCM .....	Quartzkristallmikrowaage, quartz crystal microbalance
Quarzmikrowaage .....	QCM
r.F. ....	relative Feuchte
RNA-Seq .....	Next Generation Sequencing Transkriptomanalyse
SD .....	Standardabweichung
SEM .....	Standardfehler, Standard error of the mean
SIM .....	single ion monitoring
SMPS .....	Scanning mobility particle sizer
SSB .....	Einzelstrangbruch
TC .....	gesamter Kohlenstoff
TCA .....	Zitratzyklus, Tricarboxylic acid cycle
TEM .....	Transmissionselektronenmikroskop
WSP .....	Holzverbrennungspartikel
ZnO .....	Zink Oxid Nanopartikel





# A. Anhang

## A.1. Material und Methoden

### Puffer und Lösungen

#### Alkalische Entwindung

##### Lösungen

0,5 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	70,98 g/L
0,5 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68,995 g/L
0,5 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	87,09 g/L
0,5 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68,05 g/L
0,1 M EDTA, pH 8	18,612 g/500 mL
0,1 M Tris, pH 8	6,057 g/500 mL

##### Alkalische Lösung, pH 12,3 (A549)

0,03 M NaOH
0,01 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0,9 M NaCl

##### Alkalische Lösung, pH 11,8 (BEAS-2B)

0,014 M NaOH
0,01 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0,9 M NaCl

##### 0,01 M Natriumphosphatpuffer, pH 6,9

0,0051 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,0049 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

##### 0,15 M Kaliumphosphatpuffer, pH 6,9

0,0765 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,0735 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

##### 0,35 M Kaliumphosphatpuffer, pH 6,9

0,1785 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,1715 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

##### 0,5 M Kaliumphosphatpuffer, pH 6,9

0,255 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,245 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

## Western Blot

### Sammelgel (5 %)

5 % Acrylamid (Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1))  
0,1 % SDS  
125 mM Tris-HCl, pH 6,8  
0,1 % APS  
0,01 % TEMED

### Trenngel (10 % – 15 %)

10 - 15 % Acrylamid (Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1))  
0,1 % SDS  
375 mM Tris-HCl, pH 8,8  
0,1 % APS  
0,01 % TEMED

### Laufpuffer

25 mM Tris  
1,2 mM Glycin  
1 % SDS (w/v)

### Blotpuffer

25 mM Tris  
192 mM Glycin  
10 % Methanol (v/v)

### TBS (pH 7,4)

20 mM Tris-HCl  
120 mM NaCl

### TBS-T

20 mM Tris-HCl  
120 mM NaCl  
0,1 % (v/v) Tween-20

## Tabellen

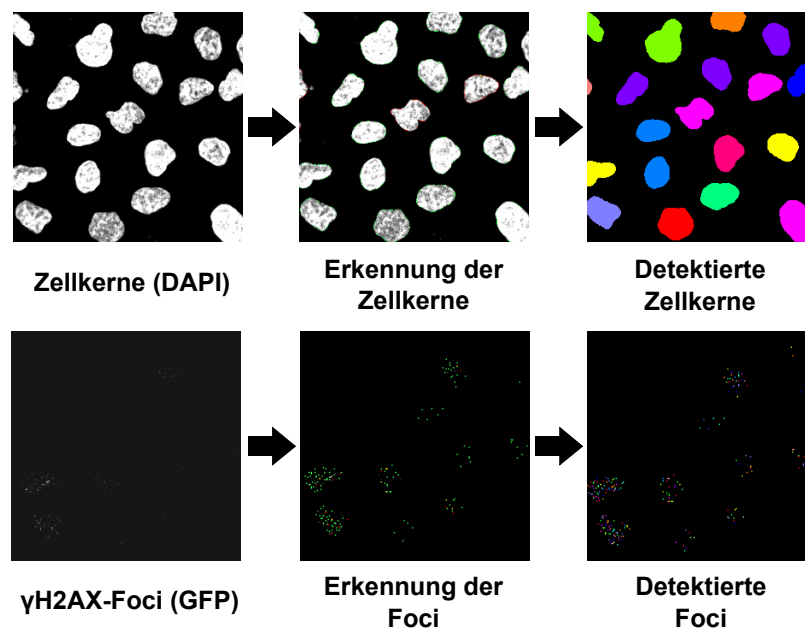
**Tabelle A.1.:** Inkubationsvolumina und verwendete Zelldichte in den verschiedenen Zellkulturgefäßen. IF=Immunfluoreszenz, WB=Western Blot, DCF=ROS Bestimmung, Zytotox=metabolische Aktivität, LDH Freisetzung

Kulturgefäß	Versuchstyp	Fläche [cm <sup>2</sup> ]	Zellzahl	Volumen [mL]
<b>A549</b>				
6-Well	WB	9.6	825000	3
12-Well	IF, PCR	3.9	335000	1.22
24-Well	Zytotox, ELISA	1.9	170000	0.6
96-Well	DCF	0.34	30000	0.1
Transwell (6-Well)	alle ALI-Experimente	4.67	400000	1
<b>BEAS-2B</b>				
12-Well	IF	3.9	420000	1.22
Transwell (6-Well)	alle ALI-Experimente	4.67	500000	1

**Tabelle A.2.:** Verwendete Antikörper und die eingesetzten Verdünnungen. IF=Immunfluoreszenz, WB=Western Blot. Die IRDye Sekundärantikörper für die Odyssey Detektion, wurden so gewählt, dass bei gleichzeitiger Detektion von mehreren Proteinen unterschiedlicher Spezies bei verschiedenen Wellenlängen detektiert werden konnte

Antikörper	Hersteller	Artikelnummer	Epitop	Herkunft	Verdünnung
<b>Primäre AK:</b>					
p53 (DO-1)	Santa Cruz	SC-126	-	mouse monoclonal	1:1000
p-p53	Cell Signaling	#9284S	Ser15	rabbit polyclonal	1:1000
HO-1 (H-105)	Santa Cruz	SC-10789	-	rabbit polyclonal	1:1000
Lamin B (M-20)	Santa Cruz	SC-6217	-	goat polyclonal	1:2000
PCNA (PC-10)	Santa Cruz	SC-56	-	mouse monoclonal	1:500
p38 $\alpha$ (C-20)	Santa Cruz	SC-535	-	rabbit polyclonal	1:1000
p-p38	Cell Signaling	#9211S	Thr180/Tyr182	rabbit polyclonal	1:1000
p-MK2 (27B7)	Cell Signaling	#3007S	Thr334	rabbit monoclonal	1:1000
p-JNK	Cell Signaling	#9251S	Thr183/Tyr185	rabbit polyclonal	1:1000
p-cJun	Cell Signaling	#9261S	Ser63	rabbit polyclonal	1:1000
ERK1/2 (K-23)	Santa Cruz	SC-94	-	rabbit polyclonal	1:1000
p-ERK1/2	Cell Signaling	#9101S	Thr202/Tyr204	rabbit polyclonal	1:1000
p-H2AX (JBW301)	Merck Millipore	05-636	Ser139	mouse monoclonal	1:500
<b>Sekundäre AK:</b>					
Anti-mouse Alexa Fluor 488 (IF)	Thermo Fisher	A28175	-	goat oligoclonal	1:500
Anti-mouse, rabbit, goat	Biomol				1:2000
IRDye-700 (WB)					- 1:5000
Anti-mouse, rabbit, goat	Biomol				1:2000
IRDye-800 (WB)					- 1:5000

## ergänzende Abbildungen



**Abbildung A1.: Prinzip der automatischen Quantifizierung von  $\gamma$ -H2AX Foci mit der Software ScanR.** Im DAPI Kanal werden Objektkanten durch sprunghafte Anstiege der Signalintensität detektiert. Aus den erkannten Objekten werden die Zellkerne selektiert und eine Kernmaske generiert. Innerhalb der Kernmaske wird im GFP Signal nach fokalen Objekten gesucht. Die Objekte, die die Kriterien für  $\gamma$ -H2AX Foci erfüllen, werden auf Einzelzellebene quantifiziert. Die Auswahlkriterien werden für jeden Versuch manuell angepasst, so dass möglichst alle Zellkerne und Foci erkannt und gezählt werden.

## A.2. Verwendete Formeln

$$P = \frac{c_{\text{Transwell}} * A_{\text{Transwell}}}{c_{\text{Aerosol}} * V_{\text{Transwell}}} \quad (\text{A.1})$$

$P$  = Depositionseffizienz

$c_{\text{SMPS/TEM}}$  = Partikelkonzentration auf den Transwells, ermittelt über die SMPS oder TEM Methode  
[0.30 - 1.18  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , siehe Kapitel 3.3.1]

$A_{\text{Transwell}}$  = Transwellfläche [4.69  $\text{cm}^2$ ]

$c_{\text{Aerosol}}$  = Partikelkonzentration im Aerosol [ $1.16 * 10^{-6}$   $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ ]

$V_{\text{Transwell}}$  = Volumenstrom pro Transwell in 4 h [ $2.4 * 10^4$   $\text{cm}^3$ ]

$$N_{\text{Zelle}} = \frac{P * c_{\text{N, Aerosol}} * V_{\text{Transwell}}}{\text{Zellen pro Transwell}} \quad (\text{A.2})$$

$N_{\text{Zelle}}$  = Anzahl der abgeschiedenen Partikel pro Zelle

$P$  = Depositionseffizienz aus Formel A.1

$c_{\text{N, Aerosol}}$  = Partikelanzahlkonzentration im Aerosol [ $3.4 * 10^5$ ]

$V_{\text{Transwell}}$  = Volumenstrom pro Transwell in 4 h [ $2.4 * 10^4$   $\text{cm}^3$ ]

Zellen pro Transwell = A549:  $4 * 10^5$ , BEAS-2B:  $5 * 10^5$

$$c_{\text{Transwell}} = \frac{c_{\text{Substanz}} * P * V_{\text{Transwell}}}{A_{\text{Transwell}}} \quad (\text{A.3})$$

$c_{\text{Transwell}}$  = Deponierte Substanzmasse pro Transwellfläche [ $\text{ng}/\text{cm}^2$ ]

$c_{\text{Substanz}}$  = Konzentration der Substanz im Aerosol [ $\text{ng}/\text{cm}^3$ ]

$P$  = Depositionseffizienz aus Formel A.1

$V_{\text{Transwell}}$  = Volumenstrom pro Transwell in 4 h [ $2.4 * 10^4$   $\text{cm}^3$ ]

$A_{\text{Transwell}}$  = Transwellfläche [4.69  $\text{cm}^2$ ]

$$M_{\text{Substanz}} = \frac{c_{\text{Transwell}} * A_{\text{Transwell}}}{\text{Zellen pro Transwell} * \text{mittleres Zellvolumen} * MW_{\text{Substanz}}} \quad (\text{A.4})$$

$M_{\text{Substanz}}$  = Maximal annehmbare intrazelluläre Molarität der Substanz [nM]

$c_{\text{Transwell}}$  = Deponierte Substanzmasse pro Transwellfläche aus Formel A.3 [ $\text{ng}/\text{cm}^2$ ]

$A_{\text{Transwell}}$  = Transwellfläche [4.69  $\text{cm}^2$ ]

Zellen pro Transwell = A549:  $4 * 10^5$ , BEAS-2B:  $5 * 10^5$

$MW_{\text{Substanz}}$  = Molekulargewicht der Substanz [ng/nmol]

mittleres Zellvolumen =  $1 * 10^{-12}$  L (BNID 100434 in Milo et al. (2010))

## A.3. Toxikologische Untersuchung gesammelter Partikel aus der Holzverbrennung

**Tabelle A.3.:** Konzentrationen der analysierten organischen Verbindungen in WSP, CB14 und ZnO NP (Jürgen Orasche, HMGU München). RSD = relative Standardabweichung

	CB14 [mg/kg]	ZnO [mg/kg]	WSP [mg/kg]	Interner Standard	RSD [%]
<b>PAKs</b>					
2,2'-Binaphthalen	n. d.	<0.008	4.92	Chrysen d12	0.035
Acenaphthen	0.867	<0.038	<0.037	Acenaphthylen d8	0.021
Acenaphthylen	0.1	<0.049	2.59	Acenaphthen d10	0.021
Acephenanthrylen	<0.005	<0.005	8.85	Fluoranthen d10	0.017
Anthanthren	n. d.	<0.008	0.223	Dibenz[ah]anthracen d14	0.016
Anthracen	<0.024	<0.024	6.3	Anthracen d10	0.045
Benz[a]anthracen	n. d.	<0.007	23.3	Benz[a]anthracen d12	0.018
Benz[a]pyren	n. d.	<0.006	18.6	Benz[a]pyren d12	0.018
Benz[e]pyren	n. d.	<0.002	23.9	Benz[e]pyren d12	0.014
Benzo[c]phenanthren	n. d.	<0.002	9.51	Benz[a]anthracen d12	0.022
Benzo[ghi]fluoranthen	n. d.	<0.007	24.2	Benz[a]anthracen d12	0.018
Benzo[ghi]perylen	n. d.	<0.005	17	Benzo[ghi]perylen d12	0.023
Biphenyl	0.116	<0.005	0.277	Naphthalen d8	0.044
Chrysen	n. d.	<0.007	42.3	Chrysen d12	0.016
Coronen	n. d.	<0.01	6.75	Coronen d12	0.056
Cyclopenta[cd]pyren	n. d.	<0.002	<0.002	Benz[a]anthracen d12	0.022
Dibenz[ah]anthracen	n. d.	<0.008	1.4	Dibenz[ah]anthracen d14	0.016
Fluoranthen	<0.005	<0.005	103	Fluoranthen d10	0.017
Fuoren	<0.072	<0.072	0.929	Fuoren d10	0.012
Indeno[1,2,3-cd]pyren	n. d.	<0.01	11	Indeno[1,2,3-cd]pyren d12	0.024
Naphthalen	2.75	0.01	0.715	Naphthalen d8	0.052
Perylen	n. d.	<0.002	3.02	Perylen d12	0.014
Phenanthren	<0.018	<0.018	52.1	Phenanthren d10	0.011
Pyren	<0.02	<0.02	109	Pyren d10	0.015
Summe Benzo[b],[k]fluoranthen	n. d.	<0.005	52.2	sum Benzo[b,k]fluoranthen d12	0.026
Summe PAKs MW 302	n. d.	<0.01	12.37	Coronen d12	0.056
Dibenzo[a,e]pyren	n. d.	<0.01	2.65	Coronen d12	0.056
Dibenzo[a,h]pyren	n. d.	<0.01	0.315	Coronen d12	0.056
Dibenzo[a,i]pyren	n. d.	<0.01	0.655	Coronen d12	0.056
Dibenzo[a,l]pyren	n. d.	<0.01	2.24	Coronen d12	0.056
<b>alkylierte PAKs</b>					
Summe Methyl-PAK MW 192	<0.011	<0.011	17.1	Phenanthren d10	0.022
Summe Dimethyl-PAK MW 206	<0.008	<0.008	4.33	Phenanthren d10	0.019
Summe Methyl-PAK MW 216	<0.014	<0.014	21.7	Pyren d10	0.027
4-Methylpyren	<0.014	<0.014	1.88	Pyren d10	0.027
2-Methylpyren	<0.014	<0.014	4.19	Pyren d10	0.027
1-Methylpyren	<0.014	<0.014	5.08	Pyren d10	0.027
Summe Methyl-PAK MW 242	n. d.	<0.005	15	Benz[a]anthracen d12	0.015
Summe Dimethyl-PAK MW 256	n. d.	<0.002	9.32	Benz[a]anthracen d12	0.023
Reten	<0.005	<0.005	31.5	Phenanthren d10	0.016
<b>o-PAK</b>					
1,5-Dihydroxynaphthalen	n. d.	<0.024	<0.023	Cholesterol d6	0.033

Fortsetzung auf nächster Seite

Tabelle A.3 – Fortsetzung

	CB14 [mg/kg]	ZnO [mg/kg]	WSP [mg/kg]	Interner Standard	RSD [%]
1,8-Dihydroxynaphthalen	n. d.	<0.024	<0.023	Cholesterol d6	0.033
1,8-Naphthalsäureanhydrid	<0.017	<0.017	31.1	Fluoren d10	0.141
11H-Benzo[a]fluoren-11-on	<0.004	<0.004	15	Fluoranthren d10	0.059
11H-Benzo[b]fluoren-11-on	<0.003	<0.003	20	Fluoranthren d10	0.067
1H-Phenalen-1-on	<0.136	<0.136	39.3	Fluoren d10	0.029
1-Hydroxynaphthalen	n. d.	<0.024	<0.023	Cholesterol d6	0.033
1-Hydroxypyren	n. d.	<0.985	<0.947	Cholesterol d6	0.043
2,3-5,6-Dibenzoxalen	<0.004	<0.004	7.17	Fluoranthren d10	0.059
2-Hydroxynaphthalen	n. d.	<0.028	<0.027	Cholesterol d6	0.042
3-Hydroxyphenanthren	n. d.	<0.024	14.7	Cholesterol d6	0.033
4-Hydroxyphenanthren	n. d.	<0.131	<0.126	Cholesterol d6	0.064
4-Oxapyren-5-on	<0.004	<0.004	6.98	Fluoranthren d10	0.059
5,12-Naphthacendion	n. d.	<0.208	1.3	Benz[a]anthracen-7,12-dion d10	0.048
6H-Benzo[cd]pyren-6-on	n. d.	<0.286	31.6	Benz[a]anthracen-7,12-dion d10	0.036
7H-Benz[de]anthracen-7-on	<0.003	<0.003	24	Fluoranthren d10	0.067
7H-Benzo[c]fluoren-7-on	<0.004	<0.004	6.6	Fluoranthren d10	0.059
9,10-Anthracendion	<0.002	<0.002	29.6	Phenanthren d10	0.041
9H-Fluoren-9-on	<0.136	<0.136	18.4	Fluoren d10	0.029
9-Hydroxyphenanthren	n. d.	<0.048	<0.046	Cholesterol d6	0.082
Benz[a]anthracen-7,12-dion	n. d.	<0.286	4.49	Benz[a]anthracen-7,12-dion d10	0.036
Benzo[b]naphtho[1,2-d]furan	<0.021	<0.021	13	Phenanthren d10	0.039
Benzo[b]naphtho[2,3-d]furan	<0.025	<0.025	5.54	Phenanthren d10	0.040
Benzo[k]xanthen	<0.136	<0.136	5.29	Fluoren d10	0.029
Cyclopenta[def]phenanthrenon	<0.006	<0.006	21.9	Phenanthren d10	0.043
Naphtho[2,1,8,7-klmn]xanthen	n. d.	<1.25	3.5	Benz[a]anthracen-7,12-dion d10	0.042
Phenanthro[3,4-c]furan-1,3-dion	n. d.	<0.286	2.61	Benz[a]anthracen-7,12-dion d10	0.036
Xanthon	<0.008	<0.008	12.5	Fluoren d10	0.054
<b>Harzsäuren</b>					
6-Dehydrodehydroabietinsäure	n. d.	<0.001	1660	Levogluconan 13C6	0.058
6-Dehydrodehydroabietinsäure-Methylester	<0.02	<0.02	<0.02	Pyren d10	0.015
7-Oxo-Dehydroabietinsäure	n. d.	<0.001	896	Levogluconan 13C6	0.058
7-Oxo-Dehydroabietinsäure-Methylester	n. d.	<0.001	<0.001	Pyren d10	0.015
Abietinsäure	n. d.	<0.001	<0.001	Levogluconan 13C6	0.058
Dehydroabietinsäure	n. d.	<0.001	11350	Levogluconan 13C6	0.058
Dehydroabietinsäure-Methylester	<0.02	<0.02	16.8	Pyren d10	0.015
Isopimarinsäure	n. d.	<0.02	50.8	Levogluconan 13C6	0.055
Pimarsäure	n. d.	<0.02	<0.019	Levogluconan 13C6	0.055
<b>Alkane</b>					
Dodecan	98.3	<0.02	<0.026	Hexadecan d34	0.031
Tridecan	24.3	<0.02	<0.019	Hexadecan d34	0.030
Tetradecan	81.4	3.79	5.11	Hexadecan d34	0.036
Pentadecan	8.56	<0.02	<0.019	Hexadecan d34	0.028
Hexadecan	33.8	<0.025	<0.024	Hexadecan d34	0.035
Heptadecan	10.6	<0.023	5.99	Hexadecan d34	0.032
Octadecan	21.6	<0.025	<0.024	Octadecan d38	0.035
Nonadecan	2.34	<0.021	<0.02	Octadecan d38	0.030
Eicosan	<0.027	<0.027	<0.027	Octadecan d38	0.034
Henicosan	<0.027	<0.027	<0.027	Octadecan d38	0.041

Fortsetzung auf nächster Seite



### A.3. Toxikologische Untersuchung gesammelter Partikel aus der Holzverbrennung

Tabelle A.3 – Fortsetzung

	CB14 [mg/kg]	ZnO [mg/kg]	WSP [mg/kg]	Interner Standard	RSD [%]
Docosan	<0.027	<0.027	<0.027	Docosan d46	0.032
Tricosan	<0.027	<0.027	<0.027	Docosan d46	0.030
Tetracosan	5.71	1.05	8.36	Tetracosan d50	0.028
Pentacosan	0.765	<0.027	6.7	Tetracosan d50	0.031
Hexacosan	2.18	<0.027	6.09	Tetracosan d50	0.029
Heptacosan	0.17	<0.027	7.64	Tetracosan d50	0.029
Octacosan	1.45	0.898	7.31	Tetracosan d50	0.031
Nonacosan	0.471	0.106	7.09	Tetracosan d50	0.031
Triacontan	2.63	0.085	5.12	Triacontan d62	0.040
Hentriacontan	1.1	0.255	5.45	Triacontan d62	0.047
Dotriacontan	0.774	<0.036	2.82	Triacontan d62	0.047
Tritriacontan	0.432	<0.036	2.82	Triacontan d62	0.055
Tettriacontan	<0.036	<0.036	2.27	Triacontan d62	0.061
Pentatriacontan	<0.031	<0.031	<0.029	Triacontan d62	0.064
Hexatriacontan	<0.026	<0.026	<0.025	Triacontan d62	0.065
Octatriacontan	<0.022	<0.022	<0.021	Triacontan d62	0.077
Heptatriacontan	<0.012	<0.012	<0.012	Triacontan d62	0.060
Nonatriacontan	<0.01	<0.01	<0.009	Triacontan d62	0.072
Tetracontan	<0.008	<0.008	<0.008	Triacontan d62	0.079
<b>Anhydrozucker</b>					
Galactosan	n. d.	<0.183	338	Levoglucosan 13C6	0.025
Mannosan	n. d.	<0.223	1030	Levoglucosan 13C6	0.034
Levoglucosan	n. d.	<1.23	7880	Levoglucosan 13C6	0.088
<b>Nitro-Aromaten</b>					
2,6-Dimethoxy-4-nitrophenol	n. d.	n. d.	570	Vanillin 13C6	0.045
4-Nitrocatechol	n. d.	n. d.	<0.034	Vanillin 13C6	0.045
4-Nitrophenol	n. d.	n. d.	26.4	Vanillin 13C6	0.045
Nitrocatechol	n. d.	n. d.	60.7	Vanillin 13C6	0.045
<b>Lignin-Zerfallsprodukte</b>					
3-Guaiacylpropionsäure	n. d.	<0.011	6.93	Levoglucosan 13C6	0.048
3-Guaiacylpropanol	n. d.	<0.011	52.2	Levoglucosan 13C6	0.048
3-Syringylpropionsäure	n. d.	<0.011	2.08	Levoglucosan 13C6	0.048
4-Guaiacylbuttersäure	n. d.	<0.011	6.29	Levoglucosan 13C6	0.048
4-Methylcatechol	n. d.	n. d.	21	Vanillin 13C6	0.045
4-Methylsyringol	n. d.	n. d.	56.2	Vanillin 13C6	0.045
Acetosyringon	n. d.	<0.002	293	Levoglucosan 13C6	0.047
Homosyringensäure	n. d.	<0.011	5.58	Levoglucosan 13C6	0.048
Homovanillinsäure	n. d.	<0.011	3.82	Levoglucosan 13C6	0.048
Methylvanillat	n. d.	<0.008	19.9	Levoglucosan 13C6	0.031
m-Hydroxybenzoesäure	n. d.	<0.011	85.8	Levoglucosan 13C6	0.048
p-Hydroxybenzoesäure	n. d.	<0.011	89.6	Levoglucosan 13C6	0.048
Propionylguaiacol	n. d.	<0.002	24	Levoglucosan 13C6	0.047
Salicylsäure	n. d.	<0.011	28.6	Levoglucosan 13C6	0.048
Sinapylalkohol	n. d.	<0.005	1.77	Levoglucosan 13C6	0.066
Sinapylaldehyd	n. d.	<0.005	13.6	Levoglucosan 13C6	0.066
Syringaldehyd	n. d.	<0	3350	Levoglucosan 13C6	0.049
Syringensäure	n. d.	<0.005	251	Levoglucosan 13C6	0.066
Syringensäure-Methylester	n. d.	<0.008	33	Levoglucosan 13C6	0.031
Syringylaceton	n. d.	<0.005	9.6	Levoglucosan 13C6	0.066

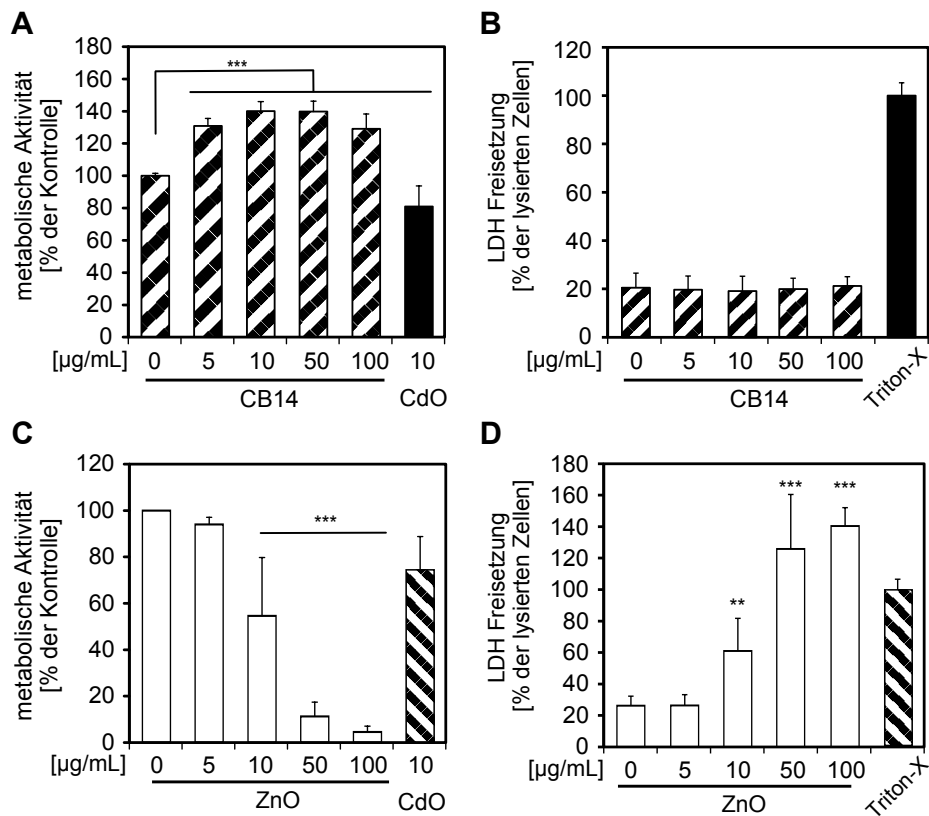
Fortsetzung auf nächster Seite

Tabelle A.3 – Fortsetzung

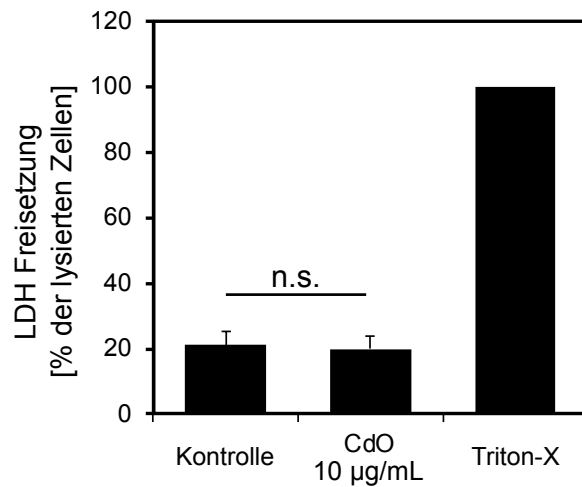
	CB14 [mg/kg]	ZnO [mg/kg]	WSP [mg/kg]	Interner Standard	RSD [%]
Syringylpropen	n. d.	<0.008	12.8	Levoglucosan 13C6	0.031
Vanillinsäure	n. d.	<0.011	179	Levoglucosan 13C6	0.048
Vanillin	n. d.	n. d.	323	Vanillin 13C6	0.045
3,3',5,5'-Tetramethoxy-4,4'- dihydroxystilben	n. d.	<0.028	<0.027	Cholesterol d6	0.042
3,3',5-Trimethoxy-4,4'-dihydroxystilben	n. d.	<0.028	<0.027	Cholesterol d6	0.042
3,3'-Dimethoxy-4,4'-dihydroxystilben	n. d.	<0.028	<0.027	Cholesterol d6	0.042
3,5-Dimethoxy-4,4'-dihydroxystilben	n. d.	<0.028	47.4	Cholesterol d6	0.042
Disyringyl	n. d.	<0.002	142	Levoglucosan 13C6	0.047
Disyringylmethan	n. d.	<0.028	11.4	Cholesterol d6	0.042
Disyringylpropan	n. d.	<0.002	<0.002	Levoglucosan 13C6	0.047
Divanillyl	n. d.	<0.008	133	Levoglucosan 13C6	0.031
Guaiacylsyringylmethan	n. d.	<0.028	<0.027	Cholesterol d6	0.042
Matairesinol	n. d.	<0.028	<0.027	Cholesterol d6	0.042
Shonanin	n. d.	<0.028	138	Cholesterol d6	0.042
Vanillinmandelsäure	n. d.	<0.011	<0.011	Levoglucosan 13C6	0.048
Vanillylsyringyl	n. d.	<0.002	52	Levoglucosan 13C6	0.047
<b>Fettsäuren</b>					
Tridecansäure	n. d.	<73.1	<70.3	Palmitic acid d31	0.076
Tetradecansäure	n. d.	<73.1	<70.3	Palmitic acid d31	0.076
n-Pentadecansäure	n. d.	<73.1	<70.3	Palmitic acid d31	0.076
Palmitinsäure	n. d.	3680	29	Palmitic acid d31	0.076
Ölsäure	n. d.	<73.1	<70.3	Palmitic acid d31	0.076
Stearinsäure	n. d.	1920	<233	Palmitic acid d31	0.023

**Tabelle A.4.:** Analysendaten der WSP aus bereits veröffentlichten Arbeiten (Gauggel et al. 2012; Gauggel-Lewandowski et al. 2013)

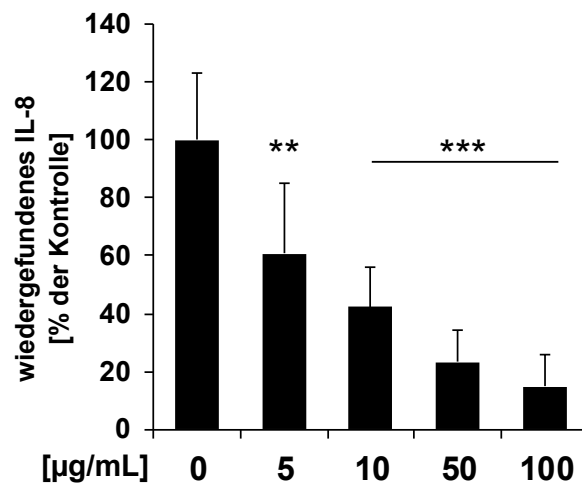
EC/OC	Konzentration [%]
Elementarer Kohlenstoff (EC)	18.0
Organischer Kohlenstoff (OC)	6.7
<hr/>	
Metalle	Konzentration [mg/kg]
K	69363.5
As	0.0037
Cd	87.2
Cr	3.4
Cu	4.1
Ni	0.5
Pb	1462.6
Mn	2138
Zn	4178.8
Al	n.a.
Fe	114917.4
<hr/>	
Anionen	Konzentration [mg/kg]
Fluorid	0.96
Chlorid	42.4
Nitrit	0.004
Nitrat	1.08
Phosphat	0.004
Sulfat	151.6



**Abbildung A2.:** Nanopartikel aus Zinkoxid, nicht aber Carbon Black, sind stark toxisch für A549 Zellen. Die Zellen wurden mit CB14 (A,B) und ZnO NP (C,D) in den Konzentrationen 0, 5, 10, 50, 100 µg/mL und 10 µg/mL CdO (A,C) für 24 h lang behandelt. Die metabolische Aktivität wurde mit AlamarBlue® ermittelt (A,C) und auf die Kontrolle bezogen (100%). Die Membranintegrität wurde anhand der Freisetzung von LDH ins Kulturmedium ermittelt (B,D) und auf die LDH Menge, die durch vollständige Lyse von unbehandelten Zellen mit 0.1% Triton X-100 freigesetzt wurde, bezogen (100%). Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung von 9 Proben aus 3 unabhängigen Versuchen (CB14) bzw. 6 Proben aus 2 unabhängigen Versuchen (ZnO). (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  zu den entsprechenden Kontrollen).

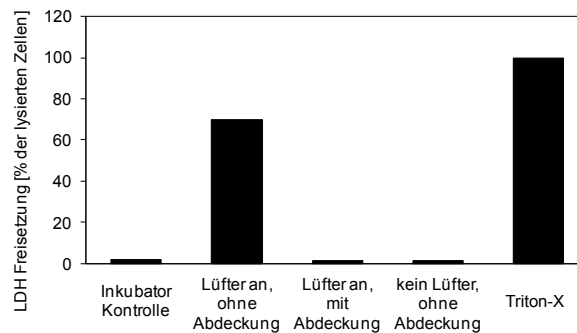


**Abbildung A3.:** Die als Positivkontrolle verwendete CdO Konzentration führt nicht zu einer erhöhten LDH Freisetzung. A549 Zellen wurden mit 10 µg/mL CdO in Zellkulturmedium ohne FKS bzw. partikelfreiem Medium für 24 h behandelt. Die freigesetzte LDH-Menge wurde ermittelt und ist relativ zur Positivkontrolle (1% Triton-X) angegeben. Die Ergebnisse sind die Mittelwerte + Standardabweichung aus 6 unabhängigen Experimenten mit je 3 Replikaten.



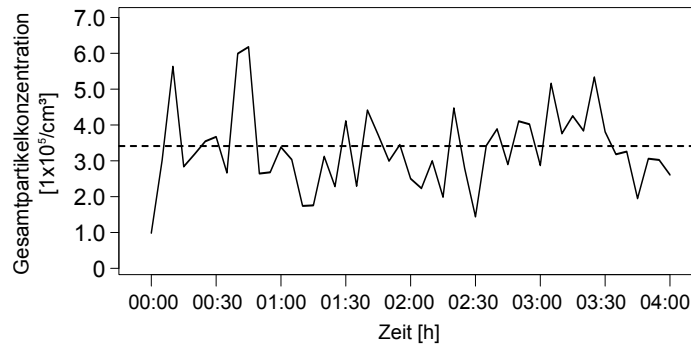
**Abbildung A4.:** Die Adsorption von IL-8 an WSP vermindert die mit dem ELISA detektierbare IL-8 Menge. Rekombinantes IL-8 in der Endkonzentration 200 pg/mL wurde mit WSP der Endkonzentration 0, 5, 10, 50 und 100 µg/mL gemischt, beides in Zellkulturmedium ohne FKS. Nach 24 h wurden die Proben zentrifugiert und mit ELISA das IL-8 im Überstand detektiert. Die gezeigten Ergebnisse sind die Mittelwerte + Standardabweichung von 6 Proben aus 2 Versuchen mit separat hergestellten Partikelsuspensionen, mit Ausnahme der höchsten WSP Konzentration, wo lediglich 3 Proben innerhalb des Detektionslimit lagen. (\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 im Vergleich zum Medium ohne Partikel)

## A.4. Etablierung eines Air-Liquid-Interface Expositionssystems

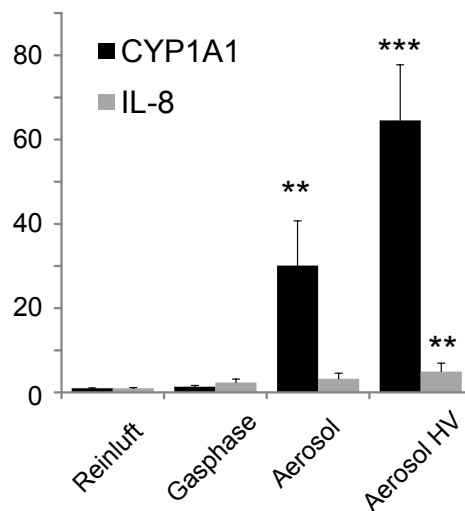


**Abbildung A5.: Bereits kurzzeitige Begasung mit unbefeuchteter Luft führt zu starkem Zelltod.** Im Gehäuse des Expositionssystems befindet sich ein Lüfter zur besseren Temperaturregelung. Wenn beim Einsetzen der Zellen in das System der Ventilator unbeabsichtigt eingeschaltet bleibt, wird unbefeuchtete Luft auf die Zellen geblasen, was sich in deutlichem Zelltod äußerte (Lüfter an, ohne Abdeckung). Wenn die Zellen durch eine Abdeckung vom Luftstrom geschützt waren (Lüfter an, mit Abdeckung), oder die Zellen weit entfernt vom Lüfter in das System eingesetzt wurden (kein Lüfter, ohne Abdeckung), wurde kein Zelltod beobachtet. Nach dem vollständigen Einsetzen in das System, wurden alle Zellen für 4 h mit befeuchteter, HEPA-gefilterter Umgebungsluft begast und anschliessend die LDH Freisetzung analysiert. Die Kontrollzellen verblieben während dieser Zeit in einem Inkubator (Inkubatorkontrollen). Zellen, die mit 0.2% Triton-X 100 lysiert wurden, dienten als Referenz für die maximal freisetzbare LDH Menge. Dargestellt sind Einzelwerte aus einem einzelnen Experiment.

## A.5. Untersuchung von Holzrauchemissionen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht



**Abbildung A6.: Verlauf der Partikelkonzentration während eines typischen 4 h Experiments.** Die mit dem SMPS erfassten Partikelanzahlkonzentrationen aller Größenbereiche wurden aufsummiert und der Verlauf über die Versuchszeit von 4 h dargestellt. Die gestrichelte Linie zeigt die mittlere Partikelkonzentration während des gesamten Experimentes ( $3.4 \cdot 10^5$  Partikel/ $\text{cm}^3$ ). Gezeigt sind die Daten des exemplarischen Experiments aus Abb. 3.12A).



**Abbildung A7.: Partikelbedingte Induktion von CYP1A1** A549 Zellen wurden 4h mit HEPA gefilterter Umgebungsluft (Reinluft) oder mit partikelgefiltertem (Gasphase) oder ungefiltertem (Aerosol) Holzrauch-aerosol (1:10 verdünnt) behandelt. Zusätzlich wurde durch Verwendung des elektrostatischen Felds die Partikeldosis des ungefilterten Aerosols erhöht (Aerosol HV). Mittels quantitativer RT-PCR wurden die relativen Gehalte an CYP1A1 und IL-8 mRNA analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung von mindestens 9 Proben aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen. Signifikant unterschiedlich zur Kontrolle mit \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$  (ANOVA mit Dunnetts's post-hoc Test).

**Tabelle A.5.:** GC-MS Analyse organischer Substanzen von gesammelten Partikel aus Filterproben (Jürgen Orasche, HMGU München). Die angegebenen Konzentrationen sind die Mittelwerte und SD aus 8 verschiedenen Verbrennungsexperimenten und beziehen sich auf das 1:10 verdünnte Aerosol. <LOD = unterhalb der Bestimmungsgrenze.

	Konzentration [ng/m <sup>3</sup> ]	SD [ng/m <sup>3</sup> ]
Pyrene	764	309
Fluoranthren	400	110
Benz[a]anthracen	76	24
Chrysen	206	55
Benzo[b,k,j]fluoranthren	213	58
Benz[e]pyren	67	21
Benz[a]pyren	76	42
Perylen	15	5
Indeno[1,2,3-cd]pyren	92	37
Benzo[ghi]perylen	70	31
Coronen	35	25
TEQ / ng m-3	115	51
1-Hydroxynaphthalen	217	158
2-Hydroxynaphthalen	444	331
9H-Fluoren-9-on	323	159
9,10-Anthracenedion	510	80
1,8-Naphthalsäureanhydrid	364	150
Cyclopenta[def]phenanthrenon	205	67
11H-Benzo[a]fluoren-11-on	158	108
Bezo[c]fluoren-11-on	62	34
Benzo[b]fluoren-11-on	140	94
7H-Benz[de]anthracen-7-on	58	38
Galactosan	2276	1388
Mannosan	2700	1613
Levoglucosan	24655	11223
Salicylsäure	85	85
Vanillin	1531	1022
Syringaldehyd	93	88
Vanillinsäure	441	200
Acetosyringon	249	113
Syringylaceton	408	239
Coniferaldehyd	12	6
Syringasäure	371	187
Sinapinsäure	0.6	0.4
Divanillyl	73	57

**Tabelle A.6.:** Abschätzung der abgeschiedenen Dosis von Metallen und B[a]P-Äquivalenten und der daraus maximal erreichbaren zellulären Konzentration

Substanz	Konzentration auf Transwell [ng/cm <sup>2</sup> ]				Maximale intrazelluläre Konzentration [µM]			
	SMPS		TEM		SMPS		TEM	
	0V	HV	0V	HV	0V	HV	0V	HV
Al	4.14	16.28	4.69	18.34	1438.51	5658.13	1630.31	6377.38
Cd	0.15	0.59	0.17	0.67	12.52	49.23	14.19	55.49
Cr	0.39	1.53	0.44	1.72	69.98	275.26	79.31	310.25
Cu	0.34	1.32	0.38	1.49	49.63	195.20	56.24	220.01
Fe	2.04	8.04	2.32	9.06	343.17	1349.80	388.93	1521.39
Ni	0.34	1.32	0.38	1.49	53.73	211.34	60.89	238.21
Pb	0.65	2.54	0.73	2.87	29.27	115.13	33.17	129.76
Zn	2.26	8.88	2.56	10.01	323.92	1274.08	367.11	1436.04
TEQ(B[a]P)	0.03	0.12	0.03	0.13	1.10	4.34	1.25	4.90



**Tabelle A.7.:** Liste der 100 stärksten induzierten und reprimierten Transkripte nach Aerosol und Gasphasenbehandlung in A549 Zellen. Sortiert wurde nach der stärksten Änderung der Genexpression mit  $p < 0.05$  durch entweder Aerosol- oder Gasphasenbehandlung. Die Genbezeichnungen entsprechen der Ensembl Gen ID (GRCh37) und dem WikiGenes Gensymbol, sofern vorhanden.

Gensymbol	Ensembl Gen ID	Aerosol		Gasphase	
		log2 Änderung	p-Wert	log2 Änderung	p-Wert
<b>Induzierte Gene</b>					
RFPL4A	ENSG00000223638	5.55	9.0e-05	6.47	3.5e-07
EGR3	ENSG00000179388	5.90	3.8e-11	6.32	9.3e-13
EGR2	ENSG00000122877	5.64	2.3e-11	6.25	1.4e-13
HSPA6	ENSG00000173110	5.84	3.6e-10	6.13	3.0e-11
DUSP2	ENSG00000158050	4.92	3.0e-05	5.80	4.3e-07
HSPA7	ENSG00000225217	4.35	1.3e-01	5.29	3.8e-02
POU3F1	ENSG00000185668	4.98	1.7e-05	5.17	5.5e-06
RGS16	ENSG00000143333	4.70	1.8e-16	5.12	5.0e-20
C11orf96	ENSG00000187479	4.29	2.1e-02	5.05	4.8e-03
ARC	ENSG00000198576	4.05	2.4e-05	4.92	2.4e-07
GADD45G	ENSG00000130222	3.95	3.6e-12	4.90	2.6e-22
MIR663A	ENSG00000227195	3.99	1.4e-08	4.89	7.9e-13
SOCS1	ENSG00000185338	4.09	9.0e-07	4.65	2.0e-08
MIR3648	ENSG00000264462	3.70	1.2e-02	4.63	4.2e-04
GCK	ENSG00000106633	4.11	1.1e-01	4.60	3.1e-02
SCARNA21	ENSG00000252835	4.36	9.6e-02	4.59	4.9e-02
NRARP	ENSG00000198435	3.82	7.6e-09	4.42	1.1e-11
RASD1	ENSG00000108551	3.24	1.4e-40	4.16	7.6e-69
HES1	ENSG00000114315	3.62	1.6e-08	3.96	5.9e-10
CXCR4	ENSG00000121966	3.45	1.6e-08	3.93	1.1e-10
MAFB	ENSG00000204103	2.88	8.2e-09	3.75	3.8e-17
ID4	ENSG00000172201	3.49	3.6e-13	3.71	1.1e-15
FOS	ENSG00000170345	3.39	1.0e-07	3.68	6.1e-09
DLX2	ENSG00000115844	2.63	1.7e-02	3.58	5.4e-04
SNAI1	ENSG00000124216	2.97	9.3e-08	3.53	1.6e-10
PHLDA2	ENSG00000181649	2.92	9.4e-09	3.47	4.6e-12
	ENSG00000272449	2.63	2.0e-02	3.46	2.4e-04
ANKRD37	ENSG00000186352	2.66	9.8e-03	3.43	5.6e-04
	ENSG00000223461	2.45	2.7e-02	3.39	1.1e-04
LINC01003	ENSG00000261455	3.39	3.0e-22	3.34	2.4e-21
	ENSG00000253295	3.36	1.6e-02	3.26	2.8e-02
FZD9	ENSG00000188763	3.02	2.9e-06	3.34	4.2e-08
SNORD3A	ENSG00000263934	3.08	3.7e-13	3.32	6.8e-16
	ENSG00000228407	3.27	4.6e-02	3.20	8.7e-02
	ENSG00000213386	2.40	1.8e-02	3.25	6.7e-05
ZNF296	ENSG00000170684	2.86	1.7e-11	3.23	3.3e-15
	ENSG00000235586	2.44	1.5e-01	3.22	9.9e-03
HES7	ENSG00000179111	2.42	1.7e-05	3.21	1.6e-10
DOCK9-AS2	ENSG00000260992	2.52	6.4e-04	3.17	1.6e-06
TERC	ENSG00000270141	2.99	5.1e-02	3.14	2.9e-02
	ENSG00000261526	3.14	5.0e-08	2.86	1.3e-06
	ENSG00000239470	1.32	7.9e-01	3.10	3.2e-02
	ENSG00000263823	2.38	6.4e-03	3.05	9.3e-05
ADRB2	ENSG00000169252	2.59	1.2e-02	3.04	2.5e-03
HIST1H3I	ENSG00000196532	2.74	6.5e-04	3.03	4.2e-05

Fortsetzung auf nächster Seite

A. Anhang

Tabelle A.7 – Fortsetzung

Gensymbol	Ensembl Gen ID	Aerosol		Gasphase	
		log2 Änderung	p-Wert	log2 Änderung	p-Wert
ID2	ENSG00000115738	2.64	1.7e-15	3.02	8.9e-20
	ENSG00000204775	3.02	3.0e-02	2.51	1.4e-01
CDKN1C	ENSG00000129757	2.50	3.8e-03	3.01	1.9e-04
	ENSG00000260805	1.93	9.9e-02	2.97	9.2e-04
SERTAD1	ENSG00000197019	2.52	2.6e-04	2.92	1.7e-05
HES6	ENSG00000144485	2.22	1.0e-12	2.92	5.6e-22
HES4	ENSG00000188290	2.14	3.2e-12	2.91	5.9e-25
GPR3	ENSG00000181773	2.91	6.3e-08	2.83	2.0e-07
GADD45B	ENSG00000099860	2.37	2.9e-06	2.86	1.4e-08
JUN	ENSG00000177606	2.49	4.1e-06	2.86	6.4e-08
HIST1H3I	ENSG00000198366	2.41	6.0e-02	2.81	1.6e-02
	ENSG00000233421	2.23	1.4e-01	2.80	2.2e-02
RNU4-2	ENSG00000202538	1.37	7.2e-01	2.80	1.0e-02
LOC101927811	ENSG00000271133	2.07	2.5e-01	2.76	1.5e-02
HBEGF	ENSG00000113070	2.65	1.8e-11	2.75	1.8e-12
	ENSG00000235852	2.74	1.8e-02	2.61	2.3e-02
CYP1A1	ENSG00000140465	2.74	1.0e-05	-1.26	2.6e-01
PPP1R15A	ENSG00000087074	2.57	2.7e-06	2.68	6.8e-07
ST7-AS1	ENSG00000227199	2.67	3.4e-03	2.58	7.2e-03
	ENSG00000260708	2.11	1.3e-16	2.66	8.9e-27
MESP1	ENSG00000166823	1.87	7.9e-06	2.63	7.5e-12
CITED1	ENSG00000125931	1.90	1.0e-01	2.61	3.7e-03
HIST1H2BL	ENSG00000185130	2.24	8.1e-03	2.61	1.1e-03
SOCS3	ENSG00000184557	2.10	2.9e-03	2.55	1.7e-04
ENDOG	ENSG00000167136	1.81	3.7e-05	2.51	2.3e-11
HEY1	ENSG00000164683	2.04	8.6e-03	2.49	5.7e-04
ZFP36	ENSG00000128016	2.07	1.1e-06	2.44	2.2e-09
TMEM52	ENSG00000178821	2.44	2.2e-03	2.42	2.4e-03
PCAT6	ENSG00000228288	2.44	7.1e-05	2.40	5.8e-05
	ENSG00000273008	2.43	1.1e-04	2.43	7.5e-05
CCDC85B	ENSG00000175602	1.98	1.1e-04	2.43	4.7e-07
GPR89B	ENSG00000188092	2.34	3.1e-05	2.41	2.0e-05
THAP7-AS1	ENSG00000230513	2.00	2.3e-02	2.40	1.4e-03
ATF3	ENSG00000162772	2.39	3.3e-03	2.34	3.9e-03
	ENSG00000229891	1.64	2.7e-01	2.39	3.8e-02
	ENSG00000273010	2.38	3.6e-03	2.35	6.5e-03
	ENSG00000260727	1.28	3.0e-01	2.38	1.5e-03
HPDL	ENSG00000186603	2.13	1.0e-02	2.36	1.1e-03
PPFIA3	ENSG00000177380	1.84	6.2e-14	2.36	6.1e-24
LOC101927044	ENSG00000265399	2.00	1.5e-01	2.36	4.6e-02
ADM	ENSG00000148926	2.12	9.1e-06	2.36	5.8e-07
MRPL12	ENSG00000262814	1.50	2.7e-05	2.33	1.3e-13
IER2	ENSG00000160888	2.01	8.6e-08	2.32	4.2e-10
	ENSG00000260081	1.14	2.9e-01	2.32	8.6e-04
C4orf48	ENSG00000243449	1.59	2.6e-04	2.30	5.8e-10
	ENSG00000234779	1.87	1.1e-02	2.29	9.1e-04
NOG	ENSG00000183691	2.28	2.0e-02	1.46	2.7e-01
LOC100653049	ENSG00000131737	2.12	6.2e-02	2.28	4.4e-02
EVA1B	ENSG00000142694	1.65	5.5e-04	2.28	4.7e-08
	ENSG00000222043	1.96	6.9e-02	2.27	2.6e-02
MNX1-AS1	ENSG00000243479	2.16	4.4e-07	2.27	1.4e-08
IER5	ENSG00000162783	1.99	1.1e-04	2.27	5.8e-06

Fortsetzung auf nächster Seite

## A.5. Untersuchung von Holzrauchemissionen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht

Tabelle A.7 – Fortsetzung

Gensymbol	Ensembl Gen ID	Aerosol		Gasphase	
		log2 Änderung	p-Wert	log2 Änderung	p-Wert
DDIT3	ENSG00000175197	1.89	1.7e-04	2.26	6.5e-06
SNORA78	ENSG00000255198	1.65	2.6e-15	2.26	1.0e-29
C19orf26	ENSG00000099625	1.59	1.0e-01	2.26	5.0e-03
<b>Reprimierte Gene</b>					
SLC1A2	ENSG00000110436	-5.05	1.6e-03	-3.61	7.2e-03
	ENSG00000269843	-3.82	4.7e-02	-4.89	2.4e-02
LOC101929399	ENSG00000232545	-2.69	1.0e-02	-4.51	2.6e-04
EBLN2	ENSG00000255423	-3.16	2.2e-05	-4.48	1.1e-06
FLG2	ENSG00000143520	-4.11	6.1e-03	-4.42	8.3e-03
RP11-374P20.4	ENSG00000235138	-4.16	2.6e-06	-4.31	1.4e-06
	ENSG00000258959	-3.85	4.5e-03	-4.22	1.9e-03
SCN3A	ENSG00000153253	-2.90	7.3e-07	-4.16	9.2e-09
CMYA5	ENSG00000164309	-0.89	7.4e-01	-4.16	1.8e-02
	ENSG00000266926	-4.15	3.6e-02	-2.07	2.2e-01
	ENSG00000236337	-3.06	4.9e-02	-4.13	2.3e-02
LOC285638	ENSG00000249476	-1.55	4.4e-01	-4.11	3.7e-02
PHACTR1	ENSG00000112137	-2.72	1.6e-06	-4.11	5.4e-10
	ENSG00000260618	-1.84	1.2e-01	-4.09	3.1e-03
	ENSG00000268912	-1.73	2.8e-02	-4.03	2.7e-06
	ENSG00000267096	-1.65	2.4e-01	-4.00	5.3e-03
SH3RF3	ENSG00000172985	-1.05	6.2e-01	-3.97	3.2e-02
ZNF157	ENSG00000147117	-1.58	5.5e-01	-3.95	4.1e-02
MIR1254-1	ENSG00000221184	-2.11	1.0e-01	-3.89	1.0e-02
	ENSG00000231125	-0.17	1.0e+00	-3.89	4.2e-02
	ENSG00000251196	-3.88	4.6e-09	-3.62	1.6e-08
	ENSG00000271755	-1.72	2.5e-01	-3.88	9.9e-03
	ENSG00000260279	-3.87	4.6e-06	-2.25	2.4e-03
TAS2R5	ENSG00000127366	-3.85	6.3e-03	-1.88	2.4e-01
	ENSG00000271828	-3.84	8.5e-04	-3.04	4.1e-03
	ENSG00000256304	-3.17	1.1e-06	-3.84	1.5e-08
	ENSG00000241481	-3.79	2.0e-02	-2.52	1.4e-01
	ENSG00000268218	-3.72	9.3e-06	-1.99	5.3e-03
	ENSG00000254428	-0.97	7.7e-01	-3.72	2.8e-02
LOC101060794	ENSG00000233327	-3.68	1.2e-02	-2.88	4.0e-02
CD160	ENSG00000117281	-2.21	3.6e-03	-3.68	2.2e-05
TBC1D3	ENSG00000234972	-3.68	2.9e-03	-3.53	4.4e-03
	ENSG00000269427	-3.67	3.2e-02	-1.76	3.3e-01
HAL	ENSG00000084110	-3.62	1.5e-02	-2.08	9.6e-02
CLEC18B	ENSG00000140839	-3.56	4.8e-02	-1.75	4.2e-01
	ENSG00000267759	-0.92	6.6e-01	-3.49	3.7e-02
	ENSG00000267025	-1.51	2.0e-02	-3.49	3.0e-05
BSN	ENSG00000164061	-1.97	3.6e-05	-3.45	1.5e-09
	ENSG00000273449	-1.11	5.8e-01	-3.45	2.5e-02
	ENSG00000261326	-2.03	1.5e-01	-3.45	9.1e-03
CHRM1	ENSG00000168539	-3.34	2.8e-02	-3.41	3.7e-02
	ENSG00000265728	-1.67	1.8e-01	-3.38	6.2e-03
NOXRED1	ENSG00000165555	-2.04	1.9e-03	-3.38	1.3e-05
	ENSG00000237719	-2.40	9.4e-02	-3.37	3.2e-02
PCDHGA6	ENSG00000253731	-1.30	3.6e-01	-3.37	1.8e-02
KCNB1	ENSG00000158445	-3.33	3.4e-03	-2.31	3.8e-02
	ENSG00000227775	-1.88	2.8e-03	-3.33	1.4e-06

Fortsetzung auf nächster Seite

A. Anhang

Tabelle A.7 – Fortsetzung

Gensymbol	Ensembl Gen ID	Aerosol		Gasphase	
		log2 Änderung	p-Wert	log2 Änderung	p-Wert
ABCA6	ENSG00000177725	-1.84	1.9e-01	-3.30	1.1e-02
	ENSG00000154262	-1.95	1.2e-01	-3.30	1.1e-02
	ENSG00000228492	-1.75	2.7e-04	-3.27	6.5e-09
ZFH3	ENSG00000238018	-2.86	3.0e-06	-3.25	1.6e-06
	ENSG00000140836	-2.95	5.2e-38	-3.24	2.5e-43
	ENSG00000256885	-0.46	9.4e-01	-3.23	9.3e-03
NFAT5	ENSG00000102908	-2.63	3.9e-09	-3.22	9.8e-13
ALPK3	ENSG00000136383	-1.54	5.3e-02	-3.22	2.4e-05
	ENSG00000267249	-3.21	4.2e-03	-1.36	2.1e-01
	ENSG00000254198	-2.27	2.1e-06	-3.20	5.3e-09
	ENSG00000261770	-2.95	5.8e-07	-3.19	5.0e-08
LDHAL6A	ENSG00000248213	-3.19	1.9e-03	-2.71	7.7e-03
	ENSG00000267632	-2.16	4.3e-03	-3.18	8.9e-05
	ENSG00000166800	-2.18	3.2e-02	-3.17	1.5e-03
RBM20	ENSG00000234290	-3.17	3.6e-02	-3.00	4.6e-02
	ENSG00000203867	-3.03	2.2e-04	-3.16	8.1e-05
SRGAP1	ENSG00000273448	-1.90	4.3e-02	-3.14	1.3e-03
ABCA1	ENSG00000196935	-2.99	2.7e-49	-3.14	3.6e-53
	ENSG00000165029	-2.61	1.2e-01	-3.14	4.1e-02
	ENSG00000259366	-3.13	2.0e-05	-2.84	1.3e-04
MEGF9	ENSG00000260686	-1.72	2.2e-03	-3.11	3.0e-06
	ENSG00000106780	-2.60	1.8e-45	-3.10	6.3e-61
	ENSG00000267163	-1.98	2.8e-02	-3.10	2.5e-03
MFAP4	ENSG00000271997	-1.81	4.3e-03	-3.09	3.6e-05
	ENSG00000262848	-1.30	4.3e-01	-3.08	2.6e-02
	ENSG00000166482	-1.53	6.3e-03	-3.08	1.3e-06
	ENSG00000176761	-0.46	1.0e+00	-3.08	2.1e-02
IRAK3	ENSG00000260141	-0.83	4.6e-01	-3.08	8.2e-04
	ENSG00000254909	-1.43	6.0e-02	-3.07	4.7e-04
	ENSG00000090376	-3.06	4.6e-02	-1.75	2.4e-01
MIR138-1	ENSG00000260671	-3.04	4.9e-02	-2.24	1.3e-01
	ENSG00000207954	-3.04	3.1e-02	-2.29	8.6e-02
KLKB1	ENSG00000164344	-3.04	5.0e-02	-2.78	1.1e-01
LOC101928670	ENSG00000241860	-3.03	5.1e-03	-2.90	7.9e-03
	ENSG00000223519	-3.03	4.0e-03	-2.27	3.0e-02
	ENSG00000268885	-1.83	2.8e-02	-3.02	3.0e-04
	ENSG00000170092	-2.05	7.4e-03	-3.02	6.9e-04
	ENSG00000205918	-1.79	9.0e-07	-3.02	3.7e-13
RGL1	ENSG00000270589	-2.27	4.5e-02	-2.99	1.2e-02
	ENSG00000143344	-2.64	2.5e-16	-2.99	4.9e-19
	ENSG00000164049	-1.36	2.7e-01	-2.99	1.8e-02
FBXW12	ENSG00000164171	-2.40	3.4e-11	-2.98	4.8e-16
ITGA2	ENSG00000111961	-2.42	7.6e-16	-2.98	5.9e-22
SASH1	ENSG00000196648	-1.87	7.1e-02	-2.97	3.2e-03
GOLGA6L20	ENSG00000184956	-2.15	8.5e-04	-2.96	1.0e-04
MUC6	ENSG00000168939	-2.14	4.0e-05	-2.95	3.2e-07
SPRY3	ENSG00000225614	-2.73	9.3e-26	-2.93	2.2e-28
ZNF469	ENSG00000232063	-2.08	4.6e-07	-2.92	3.8e-10
RP11-307E17.8	ENSG00000105810	-2.46	1.8e-45	-2.92	1.6e-60
CDK6	ENSG00000205041	-1.98	7.1e-06	-2.91	4.4e-09
	ENSG00000204909	-2.26	1.8e-02	-2.91	7.3e-03
SPINK9	ENSG00000196159	-1.80	3.2e-05	-2.89	2.8e-10
FAT4					

Fortsetzung auf nächster Seite

## A.5. Untersuchung von Holzrauchemissionen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht

---

Tabelle A.7 – Fortsetzung

Gensymbol	Ensembl Gen ID	Aerosol		Gasphase	
		log2 Änderung	p-Wert	log2 Änderung	p-Wert
LOC101928379	ENSG00000235373	-1.33	1.7e-01	-2.87	4.4e-03

**Tabelle A.8.:** Liste der 100 stärksten induzierten und reprimierten Transkripte nach Aerosol und Gasphasenbehandlung in BEAS-2B Zellen. Sortiert wurde nach der stärksten Änderung der Genexpression mit  $p < 0.05$  durch entweder Aerosol- oder Gasphasenbehandlung. Die Genbezeichnungen entsprechen der Ensembl Gen ID (GRCh37) und dem WikiGenes Gensymbol, sofern vorhanden.

Gensymbol	Ensembl Gen ID	Aerosol		Gasphase	
		log2 Änderung	p-Wert	log2 Änderung	p-Wert
<b>Induzierte Gene</b>					
MIR663A	ENSG00000227195	3.40	9.8e-11	4.72	9.7e-20
MIR3648	ENSG00000264462	2.55	5.2e-05	4.04	1.3e-10
RASD1	ENSG00000108551	3.54	7.4e-17	3.72	8.6e-19
RGS2	ENSG00000116741	3.09	6.0e-15	3.59	6.9e-20
DUSP2	ENSG00000158050	3.48	1.4e-13	3.16	3.4e-11
	ENSG00000239776	2.17	2.4e-05	3.36	9.9e-11
IL6	ENSG00000136244	3.27	9.4e-13	2.66	1.4e-08
SNAI1	ENSG00000124216	2.91	5.0e-12	3.25	1.7e-14
TERC	ENSG00000270141	3.24	2.1e-11	3.14	1.3e-10
DUSP23	ENSG00000158716	3.15	8.3e-12	2.62	2.9e-08
ID2	ENSG00000115738	3.11	2.3e-22	3.15	5.1e-23
	ENSG00000251705	1.56	7.1e-03	3.01	2.1e-07
HES4	ENSG00000188290	2.98	7.0e-13	2.89	5.6e-12
IL24	ENSG00000162892	2.97	7.0e-19	2.63	1.1e-14
BCL2A1	ENSG00000140379	2.96	1.2e-09	2.63	1.4e-07
	ENSG00000241781	1.92	2.6e-04	2.93	4.2e-08
SNORD3A	ENSG00000263934	2.55	4.9e-07	2.92	1.6e-08
RELB	ENSG00000104856	2.90	1.4e-13	2.25	2.1e-08
CCL2	ENSG00000108691	2.88	1.0e-10	1.81	9.2e-05
LIN7B	ENSG00000104863	2.87	8.2e-11	2.39	1.4e-07
EGR2	ENSG00000122877	2.85	2.5e-09	2.79	1.0e-08
HIST1H3H	ENSG00000124693	2.51	4.0e-12	2.84	2.2e-15
HPDL	ENSG00000186603	2.84	1.0e-12	2.32	1.2e-08
DUSP6	ENSG00000139318	2.76	4.0e-13	2.81	2.3e-13
RPS17L	ENSG00000184779	2.81	3.7e-11	2.46	1.2e-08
FOS	ENSG00000170345	2.69	1.5e-04	2.78	1.5e-04
RMRP	ENSG00000269900	2.22	8.1e-05	2.78	1.4e-06
C11orf96	ENSG00000187479	2.26	1.9e-05	2.77	2.1e-07
	ENSG00000223461	2.55	1.1e-07	2.75	1.3e-08
ID1	ENSG00000125968	2.74	6.6e-12	2.12	2.2e-07
SNHG8	ENSG00000269893	2.73	4.1e-10	2.20	9.0e-07
PPP1R35	ENSG00000160813	2.71	1.6e-13	2.24	2.3e-09
CXCL3	ENSG00000163734	2.70	2.1e-07	2.25	2.9e-05
G0S2	ENSG00000123689	2.67	5.4e-09	1.95	3.7e-05
SERTAD4-AS1	ENSG00000203706	2.67	1.0e-06	1.87	1.0e-03
PHLDA2	ENSG00000181649	2.67	2.0e-12	2.53	4.0e-11
PFDN2	ENSG00000143256	2.64	6.7e-10	2.16	8.2e-07
EGR4	ENSG00000135625	2.23	2.0e-03	2.63	3.6e-04
GADD45A	ENSG00000116717	2.37	1.2e-15	2.62	4.2e-19
	ENSG00000226958	1.93	6.0e-04	2.62	4.7e-06
ARC	ENSG00000198576	2.17	6.9e-05	2.61	2.4e-06
HSPA7	ENSG00000225217	2.40	2.8e-04	2.59	1.3e-04
RNU6-1	ENSG00000202337	2.59	2.3e-08	2.39	4.9e-07
RNU4-2	ENSG00000202538	1.44	5.2e-03	2.59	5.2e-07
ID3	ENSG00000117318	2.58	4.0e-12	1.88	9.4e-07

Fortsetzung auf nächster Seite

A.5. Untersuchung von Holzrauchemissionen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht

Tabelle A.8 – Fortsetzung

Gensymbol	Ensembl Gen ID	Aerosol		Gasphase	
		log2 Änderung	p-Wert	log2 Änderung	p-Wert
ATF3	ENSG00000162772	2.00	1.3e-06	2.58	6.0e-10
	ENSG00000260025	2.57	1.4e-08	2.13	4.8e-06
UFSP1	ENSG00000176125	2.56	2.4e-07	1.91	2.1e-04
LOC100130938	ENSG00000267279	2.56	6.8e-09	2.08	4.7e-06
	ENSG00000236058	2.55	1.8e-08	2.30	7.1e-07
RANGRF	ENSG00000108961	2.53	9.0e-10	2.10	7.5e-07
MESP1	ENSG00000166823	2.53	5.1e-08	1.91	7.0e-05
ANGPTL4	ENSG00000167772	2.52	1.7e-06	2.28	2.8e-05
IL8	ENSG00000169429	2.52	6.1e-11	1.85	3.0e-06
IAH1	ENSG00000134330	2.52	1.0e-15	2.17	9.9e-12
FAM195A	ENSG00000172366	2.51	1.1e-07	1.91	9.1e-05
	ENSG00000232533	2.50	3.0e-08	1.74	2.0e-04
SCARNA21	ENSG00000252835	2.50	2.6e-04	2.09	3.4e-03
C6orf1	ENSG00000186577	2.49	6.6e-07	1.79	5.8e-04
MIR4435-1HG	ENSG00000222041	2.49	1.4e-09	1.92	5.9e-06
PLK3	ENSG00000173846	2.33	3.2e-12	2.47	2.0e-13
BATF3	ENSG00000123685	2.47	6.9e-08	1.92	4.9e-05
SPRY4	ENSG00000187678	2.13	3.6e-07	2.47	4.6e-09
	ENSG00000235852	1.73	2.0e-02	2.47	1.0e-03
C16orf74	ENSG00000154102	2.46	3.2e-08	1.89	3.9e-05
	ENSG00000236439	2.45	2.6e-07	1.82	2.3e-04
	ENSG00000256268	2.45	1.1e-11	2.17	3.4e-09
SNORA76	ENSG00000266402	2.44	8.2e-07	1.87	2.6e-04
CCDC61	ENSG00000104983	2.43	1.4e-10	1.91	9.3e-07
HIST1H3I	ENSG00000196532	2.33	3.3e-10	2.42	7.0e-11
	ENSG00000228929	2.42	1.2e-08	2.00	4.7e-06
	ENSG00000272449	2.41	9.5e-05	1.61	1.5e-02
CYSTM1	ENSG00000120306	2.41	2.6e-07	1.74	3.5e-04
RPPH1	ENSG00000259001	1.88	1.2e-03	2.41	5.4e-05
	ENSG00000229891	2.40	9.5e-04	1.50	5.2e-02
GALE	ENSG00000117308	2.40	2.0e-10	2.06	9.3e-08
LINC01003	ENSG00000261455	2.05	2.3e-05	2.40	9.6e-07
AC058791.1	ENSG00000226380	2.31	1.2e-11	2.40	2.5e-12
SLC39A4	ENSG00000147804	2.39	1.3e-07	1.93	3.5e-05
RPL39	ENSG00000198918	2.39	1.0e-10	1.99	1.4e-07
LOC150051	ENSG00000237594	2.38	2.7e-07	1.76	2.6e-04
EPB41L4A-AS1	ENSG00000224032	2.38	2.0e-11	2.09	7.3e-09
RPS29	ENSG00000213741	2.37	5.1e-08	1.93	1.8e-05
ENDOG	ENSG00000167136	2.27	6.7e-07	2.37	3.8e-07
JUNB	ENSG00000171223	2.37	2.6e-10	2.31	1.1e-09
PSMG4	ENSG00000180822	2.36	1.3e-09	1.85	3.9e-06
SNORD74	ENSG00000234741	2.36	1.2e-14	2.04	4.7e-11
MRPL36	ENSG00000171421	2.35	8.7e-08	1.62	3.6e-04
PRR7	ENSG00000131188	2.35	1.5e-07	1.96	2.2e-05
GADD45B	ENSG00000099860	2.35	1.8e-08	2.25	1.4e-07
RPS27	ENSG00000177954	2.34	2.4e-10	1.96	2.3e-07
IER5L	ENSG00000188483	1.93	2.6e-05	2.34	6.3e-07
SLC25A6	ENSG00000169100	2.34	1.4e-11	1.98	2.1e-08
TMEM223	ENSG00000168569	2.33	7.8e-09	1.74	3.0e-05
RPL39L	ENSG00000163923	2.33	5.2e-09	1.77	1.7e-05
	ENSG00000126749	2.32	1.6e-10	1.87	5.5e-07
RN7SK	ENSG00000202198	1.74	2.3e-03	2.32	6.8e-05

Fortsetzung auf nächster Seite

Tabelle A.8 – Fortsetzung

Gensymbol	Ensembl Gen ID	Aerosol		Gasphase	
		log2 Änderung	p-Wert	log2 Änderung	p-Wert
CD70	ENSG00000125726	2.31	4.7e-07	1.63	6.5e-04
SNORA78	ENSG00000255198	2.31	1.6e-05	1.68	2.7e-03
LINC00116	ENSG00000175701	2.31	1.0e-05	1.57	4.1e-03
<b>Reprimierte Gene</b>					
BMF	ENSG00000104081	-4.17	3.0e-44	-4.38	1.3e-49
	ENSG00000273237	-3.96	2.1e-16	-3.61	2.2e-15
LOC101928882	ENSG00000145075	-3.95	3.9e-13	-3.67	3.4e-12
SLC8A2	ENSG00000118160	-3.94	5.8e-09	-3.49	1.6e-07
	ENSG00000271529	-3.92	1.3e-12	-2.56	1.7e-06
LOC101930127	ENSG00000230724	-3.81	1.6e-09	-1.52	9.3e-03
	ENSG00000261786	-3.70	8.5e-40	-3.53	1.0e-36
STOX2	ENSG00000173320	-3.55	2.3e-10	-2.37	4.9e-06
	ENSG00000267194	-3.53	4.0e-07	-3.42	1.2e-06
IL3RA	ENSG00000185291	-3.47	3.8e-08	-2.18	2.0e-04
	ENSG00000255050	-3.44	5.6e-09	-2.26	4.3e-05
CNTF	ENSG00000242689	-3.33	4.0e-09	-2.34	2.1e-05
	ENSG00000258959	-3.33	1.6e-06	-2.72	9.5e-05
	ENSG00000250397	-3.30	4.0e-08	-2.56	1.6e-05
CCDC180	ENSG00000197816	-3.29	1.6e-09	-2.88	3.2e-08
	ENSG00000257151	-3.26	8.4e-09	-2.42	5.3e-06
	ENSG00000272005	-3.12	1.0e-11	-3.22	1.0e-12
	ENSG00000228492	-3.20	6.4e-07	-2.47	9.0e-05
	ENSG00000259806	-3.20	4.4e-08	-2.52	7.6e-06
S100A1	ENSG00000160678	-3.19	1.1e-12	-2.48	2.9e-09
LINC00641	ENSG00000258441	-3.16	3.6e-15	-2.46	8.0e-10
RADIL	ENSG00000157927	-3.13	2.8e-06	-1.93	3.1e-03
TLR6	ENSG00000174130	-3.12	2.3e-09	-2.21	5.0e-06
	ENSG00000251196	-3.11	1.4e-07	-2.58	1.6e-05
BCL9L	ENSG00000186174	-3.09	1.1e-09	-2.07	7.5e-05
EPHA7	ENSG00000135333	-3.07	2.6e-06	-2.36	2.1e-04
	ENSG00000238018	-3.06	6.9e-06	-2.79	5.2e-05
LOC101928723	ENSG00000116254	-3.06	7.5e-08	-2.43	5.9e-06
TIAF1	ENSG00000221995	-2.75	9.1e-06	-3.04	1.5e-06
	ENSG00000271862	-3.04	2.7e-12	-1.92	1.8e-06
ASMTL-AS1	ENSG00000236017	-3.02	6.0e-08	-2.47	5.9e-06
	ENSG00000215022	-3.02	3.2e-06	-1.09	7.6e-02
GPR75	ENSG00000119737	-3.01	3.3e-06	-2.21	7.7e-04
SSC5D	ENSG00000179954	-3.00	6.0e-08	-2.71	3.8e-07
LTB4R2	ENSG00000272658	-2.99	1.0e-05	-2.01	3.7e-03
	ENSG00000261326	-2.99	5.0e-13	-2.85	9.6e-13
	ENSG00000261799	-2.97	1.7e-11	-2.50	2.2e-09
	ENSG00000271430	-2.95	1.3e-11	-2.82	4.1e-11
MC1R	ENSG00000258839	-2.95	2.4e-10	-2.19	1.5e-06
PIK3C2B	ENSG00000133056	-2.93	1.2e-08	-2.79	5.9e-08
SLC47A2	ENSG00000180638	-2.91	6.9e-06	-2.82	1.5e-05
UCP3	ENSG00000175564	-2.71	8.3e-10	-2.90	4.9e-11
SCN8A	ENSG00000196876	-2.90	2.2e-05	-1.18	8.4e-02
	ENSG00000271971	-2.55	1.6e-04	-2.89	3.3e-05
TGFBR3	ENSG00000069702	-2.88	5.9e-13	-2.88	7.4e-13
ZNF117	ENSG00000152926	-2.88	8.6e-10	-2.50	9.0e-08
	ENSG00000271533	-2.72	2.2e-06	-2.87	9.1e-07

Fortsetzung auf nächster Seite



## A.5. Untersuchung von Holzrauchemissionen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht

Tabelle A.8 – Fortsetzung

Gensymbol	Ensembl Gen ID	Aerosol		Gasphase	
		log2 Änderung	p-Wert	log2 Änderung	p-Wert
	ENSG00000273018	-2.87	1.3e-05	-1.95	3.5e-03
LINC00176	ENSG00000196421	-2.36	2.5e-07	-2.85	9.1e-10
LRRC58	ENSG00000163428	-2.85	1.5e-12	-2.66	5.4e-11
RAB27B	ENSG00000041353	-2.66	1.6e-10	-2.84	1.1e-11
	ENSG00000272604	-2.52	2.6e-07	-2.84	1.0e-08
	ENSG00000264098	-2.83	1.3e-05	-2.37	2.3e-04
MIR138-1	ENSG00000207954	-1.92	1.9e-03	-2.83	9.6e-06
	ENSG00000228302	-2.83	9.2e-06	-2.11	6.7e-04
	ENSG00000272345	-2.14	1.4e-03	-2.81	4.9e-05
	ENSG00000213713	-2.81	3.2e-08	-1.77	2.7e-04
	ENSG00000268279	-2.80	3.2e-05	-1.45	3.0e-02
	ENSG00000272216	-2.80	4.6e-05	-1.90	6.3e-03
C11orf42	ENSG00000180878	-2.80	8.7e-05	-2.36	1.4e-03
	ENSG00000254428	-2.80	3.8e-05	-1.63	1.9e-02
	ENSG00000248213	-2.79	8.8e-05	-2.48	7.6e-04
MXRA8	ENSG00000162576	-2.79	1.6e-08	-2.17	5.4e-06
	ENSG00000205041	-2.66	1.6e-04	-2.79	1.2e-04
MN1	ENSG00000169184	-2.54	1.6e-08	-2.78	8.2e-10
NCOA2	ENSG00000140396	-2.77	1.4e-09	-2.24	1.5e-06
	ENSG00000260841	-2.56	8.1e-10	-2.77	3.2e-11
	ENSG00000238334	-2.76	5.0e-06	-2.38	8.3e-05
LCOR	ENSG00000196233	-2.76	1.8e-10	-2.09	1.9e-06
RAB39B	ENSG00000155961	-2.75	3.2e-05	-2.54	1.4e-04
LPPR3	ENSG00000129951	-2.75	7.2e-05	-1.97	5.0e-03
PROX2	ENSG00000119608	-2.75	9.3e-06	-1.84	2.0e-03
FLRT2	ENSG00000185070	-2.74	6.3e-21	-2.62	1.9e-19
	ENSG00000253636	-2.73	2.3e-05	-2.65	4.7e-05
PLIN4	ENSG00000167676	-2.57	8.4e-06	-2.72	3.1e-06
CLEC18B	ENSG00000140839	-2.36	1.0e-03	-2.72	2.4e-04
WDR52	ENSG00000206530	-2.72	3.8e-17	-2.24	1.8e-12
TRIM73	ENSG00000178809	-2.72	3.2e-06	-1.74	1.6e-03
YJEFN3	ENSG00000250067	-2.71	2.5e-10	-2.06	1.3e-06
COL11A2	ENSG00000204248	-2.71	2.2e-12	-2.70	1.6e-12
EBLN2	ENSG00000255423	-2.71	7.1e-05	-2.41	5.2e-04
AKAP5	ENSG00000179841	-2.71	8.1e-11	-2.55	4.1e-10
CCDC183-AS1	ENSG00000228544	-2.70	3.6e-07	-1.70	7.9e-04
	ENSG00000272016	-2.36	2.2e-11	-2.70	2.7e-14
CARD14	ENSG00000141527	-2.70	1.6e-05	-1.69	5.4e-03
LHX4	ENSG00000121454	-2.70	3.0e-06	-2.56	1.2e-05
RAPGEF6	ENSG00000158987	-2.31	6.5e-09	-2.70	1.8e-11
TRIM66	ENSG00000166436	-2.69	9.0e-10	-2.38	6.3e-08
KCNB1	ENSG00000158445	-2.02	9.3e-04	-2.69	1.8e-05
TPPP	ENSG00000171368	-2.69	1.3e-07	-1.70	6.8e-04
	ENSG00000260482	-2.68	3.9e-06	-1.97	1.0e-03
TSSK4	ENSG00000139908	-2.67	7.6e-06	-1.80	2.7e-03
RFX7	ENSG00000181827	-2.67	3.1e-08	-2.33	2.0e-06
DOCK8	ENSG00000107099	-2.66	9.3e-10	-1.53	4.6e-04
NRG4	ENSG00000169752	-2.66	1.6e-08	-2.28	5.4e-07
APC	ENSG00000134982	-2.65	6.8e-10	-2.19	6.2e-07
RPL23AP64	ENSG00000240970	-2.65	1.5e-04	-1.43	5.2e-02
	ENSG00000236871	-2.65	1.1e-05	-2.16	3.2e-04
LOC149134	ENSG00000227953	-2.30	1.3e-04	-2.65	2.1e-05

Fortsetzung auf nächster Seite

## A. Anhang

---

Tabelle A.8 – Fortsetzung

Gensymbol	Ensembl Gen ID	Aerosol		Gasphase	
		log2 Änderung	p-Wert	log2 Änderung	p-Wert
	ENSG00000221625	-2.59	1.7e-06	-2.64	1.4e-06

**Tabelle A.9.:** Liste der angereicherten GO Terme basierend auf den differentiell regulierten Genen des Vergleichs Gasphase gegen Reinluft in A549 und BEAS-2B. Mit dem REVIGO-Tool (Supek et al. 2011) wurden redundante GO-Terme mit großer Überlappung entfernt. Aufgeführt ist die Bezeichnung des GO-Terms, der Signifikanzwert der Anreicherung, die Anzahl modulierter Gene des GO-Terms und der prozentuale Anteil der modulierten Gene von allen detektierten Genen des angereicherten Terms.

GO-Term	p-Wert	Anzahl Transkripte	Prozentualer Anteil
A549			
translational elongation	8.6e-45	85	84.2
translation	2.2e-38	166	50.2
generation of precursor metabolites and energy	5.5e-17	122	39.
cell cycle	2.2e-15	235	30.3
oxidative phosphorylation	2.5e-14	53	54.1
chromatin modification	6.7e-12	100	36.5
phosphorus metabolic process	7.9e-12	267	27.4
cellular macromolecule catabolic process	9.9e-12	210	29.
negative regulation of macromolecule metabolic process	1.9e-11	211	28.7
cell cycle process	2.4e-11	171	30.3
ribonucleoprotein complex biogenesis	2.4e-11	73	40.6
DNA metabolic process	6.2e-10	152	30.
negative regulation of ligase activity	7.4e-10	36	53.7
regulation of cellular protein metabolic process	3.0e-09	142	30.
regulation of ligase activity	7.2e-09	39	48.1
ncRNA processing	9.8e-09	69	36.9
respiratory electron transport chain	1.6e-08	33	51.6
RNA processing	1.9e-08	156	28.5
protein modification by small protein conjugation or removal	3.3e-07	58	36.2
cellular response to stress	3.5e-07	155	27.4
ncRNA metabolic process	7.0e-07	75	32.6
transcription initiation	7.2e-07	36	43.4
response to DNA damage stimulus	9.1e-07	109	29.2
DNA replication	3.2e-06	63	33.2
transcription initiation from RNA polymerase II promoter	4.8e-06	30	44.1
cell cycle phase	1.1e-05	114	27.5
RNA elongation	1.5e-05	24	47.1
negative regulation of molecular function	1.6e-05	95	28.4
RNA elongation from RNA polymerase II promoter	1.7e-05	23	47.9
transcription from RNA polymerase II promoter	2.3e-05	71	30.3
cofactor metabolic process	3.5e-05	61	31.3
mitochondrial respiratory chain complex assembly	3.6e-05	10	83.3
DNA repair	3.7e-05	82	28.9
M phase	4.5e-05	92	28.
hexose metabolic process	8.2e-05	59	30.7
protein amino acid autophosphorylation	9.2e-05	32	37.6
M phase of mitotic cell cycle	1.2e-04	66	29.5
cell division	1.5e-04	82	27.8
steroid hormone receptor signaling pathway	1.7e-04	24	41.4
cofactor catabolic process	1.8e-04	16	51.6
nuclear division	2.3e-04	64	29.1
intracellular transport	2.4e-04	160	24.4
intracellular receptor-mediated signaling pathway	3.3e-04	28	37.3
regulation of cell death	3.7e-04	192	23.6

Fortsetzung auf nächster Seite

Tabelle A.9 – Fortsetzung

GO-Term	p-Wert	Anzahl Transkripte	Prozentualer Anteil
deoxyribonucleotide metabolic process	5.0e-04	14	51.9
death	5.1e-04	172	23.8
2'-deoxyribonucleotide metabolic process	5.5e-04	12	57.1
regulation of apoptosis	6.4e-04	188	23.4
regulation of cell cycle	6.9e-04	87	26.3
chordate embryonic development	6.9e-04	87	26.3
apoptosis	7.8e-04	145	24.1
oxidation reduction	1.0e-03	152	23.8
biopolymer methylation	1.2e-03	25	36.2
acetyl-CoA catabolic process	1.5e-03	12	52.2
tricarboxylic acid cycle	1.5e-03	12	52.2
alcohol biosynthetic process	1.7e-03	18	40.9
heart development	1.9e-03	59	27.4
Ras protein signal transduction	2.6e-03	33	31.4
regulation of gene expression, epigenetic	2.9e-03	26	33.8
protein neddylation	3.5e-03	6	85.7
hydrogen transport	4.2e-03	22	34.9
deoxyribonucleoside triphosphate metabolic process	4.6e-03	7	70.0
stem cell development	4.8e-03	12	46.2
methylation	5.1e-03	25	32.9
nucleoside metabolic process	5.2e-03	22	34.4
purine deoxyribonucleoside triphosphate metabolic process	5.3e-03	5	100.0
long-term strengthening of neuromuscular junction	5.3e-03	5	100.0
posttranscriptional regulation of gene expression	5.4e-03	56	26.5
nucleotide-excision repair, DNA gap filling	7.4e-03	9	52.9
polyamine metabolic process	8.5e-03	7	63.6
glutathione metabolic process	9.3e-03	12	42.9
glycolysis	9.4e-03	17	36.2
nucleotide-excision repair	9.6e-03	19	34.5
centrosome organization	1.0e-02	13	40.6
stem cell differentiation	1.0e-02	13	40.6
protein folding	1.1e-02	47	26.6
protein amino acid acylation	1.2e-02	20	33.3
mRNA metabolic process	1.3e-02	88	23.8
liver development	1.4e-02	18	34.0
insulin-like growth factor receptor signaling pathway	1.5e-02	6	66.7
nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid transport	1.5e-02	32	28.3
response to oxidative stress	1.8e-02	43	26.2
cell redox homeostasis	2.0e-02	20	31.7
protein amino acid alkylation	2.2e-02	14	35.9
histone H4 acetylation	2.3e-02	9	45.0
one-carbon metabolic process	2.3e-02	31	27.7
ubiquitin cycle	2.5e-02	10	41.7
Notch signaling pathway	2.6e-02	17	32.7
regulation of mitochondrial depolarization	2.7e-02	5	71.4
fructose 6-phosphate metabolic process	2.7e-02	5	71.4
nucleoside diphosphate biosynthetic process	2.7e-02	5	71.4
cell cycle checkpoint	2.7e-02	26	28.6
response to insulin stimulus	2.8e-02	28	28.0
pigment metabolic process	3.2e-02	15	33.3
response to organic substance	3.3e-02	156	21.6
MAPKKK cascade	3.3e-02	46	25.0

Fortsetzung auf nächster Seite

## A.5. Untersuchung von Holzrauchemissionen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht

Tabelle A.9 – Fortsetzung

GO-Term	p-Wert	Anzahl Transkripte	Prozentualer Anteil
proteolysis	3.3e-02	222	21.1
cell aging	3.4e-02	12	36.4
regulation of mesenchymal cell proliferation	3.8e-02	8	44.4
microtubule-based process	4.0e-02	60	23.7
initiation of viral infection	4.0e-02	9	40.9
response to peptide hormone stimulus	4.1e-02	39	25.3
activation of JUN kinase activity	4.2e-02	10	38.5
protein import	4.2e-02	34	26.0
cellular response to reactive oxygen species	4.2e-02	11	36.7
cellular metabolic compound salvage	4.6e-02	5	62.5
regulation of JUN kinase activity	7.3e-02	12	32.4
BEAS-2B			
translational elongation	8.9e-38	73	72.3
translation	1.6e-37	145	43.8
generation of precursor metabolites and energy	1.4e-08	85	27.2
oxidative phosphorylation	1.6e-08	38	38.8
ribonucleoprotein complex biogenesis	4.4e-08	56	31.1
chromosome organization	1.3e-07	115	23.7
ncRNA metabolic process	9.1e-07	63	27.4
ncRNA processing	1.1e-06	54	28.9
response to DNA damage stimulus	1.6e-06	90	24.1
respiratory electron transport chain	6.1e-06	25	39.1
cell cycle	1.9e-05	157	20.2
RNA processing	2.1e-05	117	21.4
DNA metabolic process	4.9e-05	108	21.3
cellular response to stress	6.2e-05	118	20.8
phosphorus metabolic process	6.5e-05	187	19.2
DNA repair	1.5e-04	66	23.2
transcription initiation	2.6e-04	26	31.3
cell cycle process	3.3e-04	114	20.2
regulation of apoptosis	3.7e-04	154	19.2
transcription initiation from RNA polymerase II promoter	5.4e-04	22	32.4
regulation of DNA binding	5.4e-04	33	27.3
apoptosis	5.5e-04	119	19.8
protein localization in mitochondrion	6.6e-04	14	41.2
regulation of binding	6.6e-04	39	25.5
regulation of cell death	6.7e-04	154	18.9
DNA catabolic process	7.0e-04	20	33.3
in utero embryonic development	8.6e-04	43	24.4
regulation of cellular protein metabolic process	8.9e-04	96	20.3
aerobic respiration	9.1e-04	14	40.0
NADH dehydrogenase complex assembly	1.2e-03	7	70.0
nucleotide-excision repair	1.8e-03	18	32.7
death	1.8e-03	136	18.8
cell death	1.9e-03	135	18.8
negative regulation of macromolecule metabolic process	3.1e-03	136	18.5
androgen receptor signaling pathway	4.1e-03	13	36.1
mitochondrial transport	4.2e-03	20	29.0
positive regulation of JUN kinase activity	4.5e-03	12	37.5
cell division	5.2e-03	61	20.7
ubiquinone biosynthetic process	5.2e-03	6	66.7

*Fortsetzung auf nächster Seite*

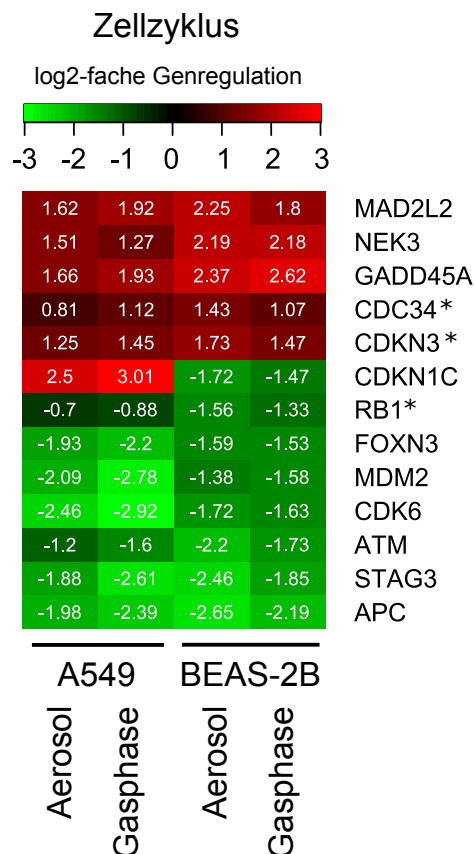
Tabelle A.9 – Fortsetzung

GO-Term	p-Wert	Anzahl Transkripte	Prozentualer Anteil
transcription from RNA polymerase II promoter	6.2e-03	50	21.4
double-strand break repair	6.9e-03	18	29.0
cell cycle arrest	7.0e-03	26	25.2
protein amino acid lipidation	8.0e-03	16	30.2
protein import	8.2e-03	31	23.7
heart development	8.5e-03	46	21.4
response to insulin stimulus	9.4e-03	25	25.0
deoxyribonucleotide catabolic process	1.0e-02	7	50.0
lipoprotein metabolic process	1.1e-02	21	26.2
intracellular receptor-mediated signaling pathway	1.1e-02	20	26.7
regulation of JUN kinase activity	1.5e-02	12	32.4
negative regulation of cell death	1.7e-02	69	19.2
microtubule-based process	1.7e-02	51	20.2
nucleobase, nucleoside and nucleotide catabolic process	1.9e-02	16	27.6
RNA elongation from RNA polymerase II promoter	1.9e-02	14	29.2
regulation of hormone metabolic process	2.2e-02	6	50.0
cell cycle phase	2.3e-02	77	18.6
respiratory system development	2.4e-02	25	23.1
response to ionizing radiation	2.5e-02	16	26.7
positive regulation of transcription factor activity	2.5e-02	16	26.7
polyprenol metabolic process	2.5e-02	4	80.0
lung development	2.9e-02	23	23.2
RNA elongation	3.1e-02	14	27.5
insulin-like growth factor receptor signaling pathway	3.2e-02	5	55.6
deoxyribonucleotide metabolic process	3.6e-02	9	33.3
hydrogen transport	3.8e-02	16	25.4
neutrophil chemotaxis	3.9e-02	7	38.9
M phase of mitotic cell cycle	3.9e-02	44	19.6
protein folding	4.0e-02	36	20.3
mRNA metabolic process	4.0e-02	68	18.4
regulation of osteoblast differentiation	4.4e-02	12	27.9
nucleotide-excision repair, DNA incision	4.5e-02	4	66.7
regulation of cyclin-dependent protein kinase activity	4.7e-02	14	25.9
T-helper 1 type immune response	4.7e-02	5	50.0
ribonucleoside diphosphate metabolic process	4.7e-02	5	50.0
cranial nerve development	5.0e-02	7	36.8
recombinational repair	5.0e-02	7	36.8
transcription from RNA polymerase III promoter	5.0e-02	7	36.8
double-strand break repair via homologous recombination	5.0e-02	7	36.8
protein amino acid acylation	5.1e-02	15	25.0
regulation of gene expression, epigenetic	5.4e-02	18	23.4
regulation of mammary gland epithelial cell proliferation	5.9e-02	3	100.0
nucleotide-excision repair, DNA incision, 5'-to lesion	5.9e-02	3	100.0
M phase	6.0e-02	60	18.2
regulation of cell adhesion	6.7e-02	28	20.4
positive regulation of gene expression, epigenetic	7.1e-02	4	57.1
fructose 6-phosphate metabolic process	7.1e-02	4	57.1
positive regulation of T cell mediated cytotoxicity	7.1e-02	4	57.1
phosphoinositide 3-kinase cascade	7.1e-02	4	57.1
copper ion transport	7.4e-02	6	37.5
biopolymer methylation	7.5e-02	16	23.2
activation of JUN kinase activity	7.7e-02	8	30.8

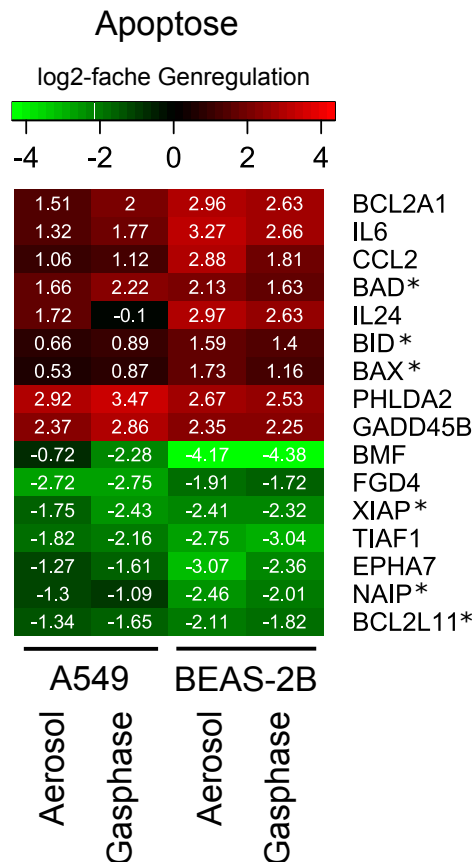
Fortsetzung auf nächster Seite

Tabelle A.9 – Fortsetzung

GO-Term	p-Wert	Anzahl Transkripte	Prozentualer Anteil
stem cell development	7.7e-02	8	30.8
apoptotic nuclear changes	7.7e-02	8	30.8
hindlimb morphogenesis	7.7e-02	8	30.8
regulation of ligase activity	8.0e-02	18	22.2
oxidation reduction	8.3e-02	108	16.9
response to oxidative stress	8.4e-02	32	19.5
small GTPase mediated signal transduction	8.4e-02	55	18.0
Ras protein signal transduction	8.6e-02	22	21.0
stem cell differentiation	8.8e-02	9	28.1
regulation of MAP kinase activity	8.9e-02	28	19.9
mitotic cell cycle checkpoint	9.2e-02	11	25.6
peptidyl-lysine modification	9.3e-02	6	35.3
nucleotide-excision repair, DNA damage removal	9.3e-02	7	31.8
glucose homeostasis	9.7e-02	12	24.5
induction of programmed cell death	9.8e-02	57	17.8



**Abbildung A8.: Detailanalyse regulierter Gene der Zellzykluskontrolle.** Gezeigt ist die log2-fache Genregulierung, hervorgerufen durch Behandlung von A549 und BEAS-2B Zellen mit Holzrauchaerosol und -gasphase in Form des Zahlenwerts und einer Farbkodierung. Die Auswahl der Gene basierte auf den 10 stärksten regulierten Genen der GO Terme „Zellzyklusphase“ (GO:0022403) und „M-Phase des mitotischen Zellzyklus-(GO:0000087), ergänzt durch manuell hinzugefügte Gene (markiert mit „\*“).

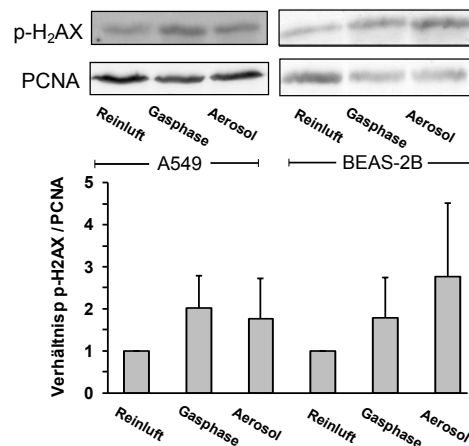


**Abbildung A9.: Detailanalyse regulierter Gene im Zusammenhang mit Apoptose.** Gezeigt ist die log2-fache Genregulierung, hervorgerufen durch Behandlung von A549 und BEAS-2B Zellen mit Holzrauch-aerosol und -gasphase in Form des Zahlenwerts und einer Farbkodierung. Die Auswahl der Gene basierte auf den 10 stärksten regulierten Genen der GO Terme „Regulierung des Zelltods“ (GO:0010941) und „Apoptose“ (GO:0006915), ergänzt durch manuell hinzugefügte Gene (markiert mit „\*“).

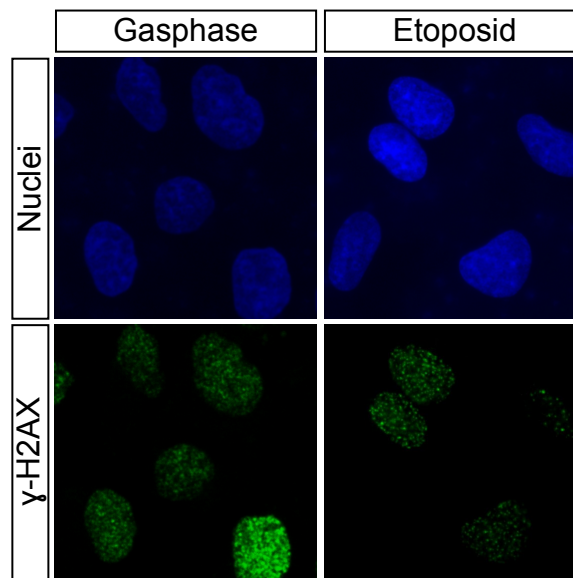
**Tabelle A.10.:** Verwendete Parameter zur Abschätzung der regionalen Deposition des untersuchten Aerosols im menschlichen Atemtrakt mit dem HPLD-Modell aus Ferron et al. (1993), abrufbar unter <https://www.helmholtz-muenchen.de/en/neu-cma/research/facilities/lung-deposition-model/index.html>

Parameter	Wert
Partikeldurchmesser	0.120 µm
Geometrische Standardabweichung	1.5
Äquivalent Durchmesser	„mobility“
Hygroskopie	„non-hygr“
Substanz	„Munich atmospheric aerosol“
restliche Einstellungen	Standardwerte

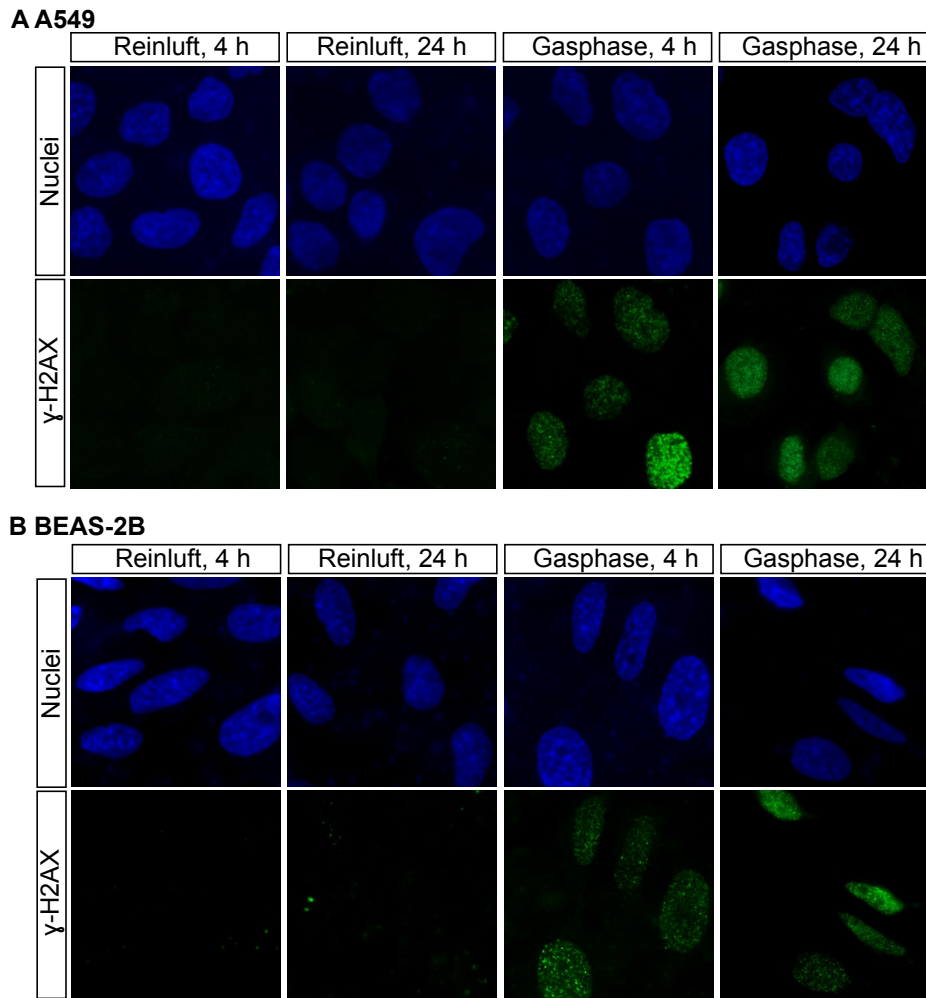




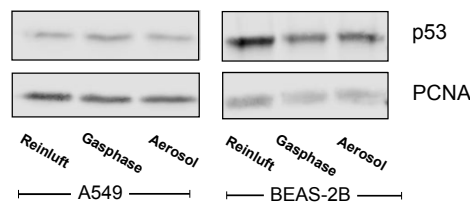
**Abbildung A10.: Bestätigung der Phosphorylierung von H2AX durch die Gasphase des Holzrauchs aus Gesamtzelllysaten.** A549 und BEAS-2B Zellen wurden 4h mit Reinluft, komplettem Holzverbrennungsaerosol (Aerosol) und partikelgefiltertem Aerosol (Gasphase) behandelt. Aus Gesamtzelllysaten wurde mit SDS-PAGE und Western Blotting die Phosphorylierung von H2AX untersucht. Dargestellt sind repräsentative Blots aus beiden Zelllinien und die zugehörige Quantifizierung (relativ zur Reinluftkontrolle nach Normierung auf die Ladekontrolle PCNA). Die Quantifizierung zeigt den Mittelwert der Blots von 3 unabhängigen Versuchen mit je einer Probe pro Bedingung, erhalten durch Vereinigung der Gesamtzelllysate von mindestens 2 Replikaten sowie die Standardabweichung. Die Immunoblots wurden von Larissa Ramme während ihrer Diplomarbeit durchgeführt.



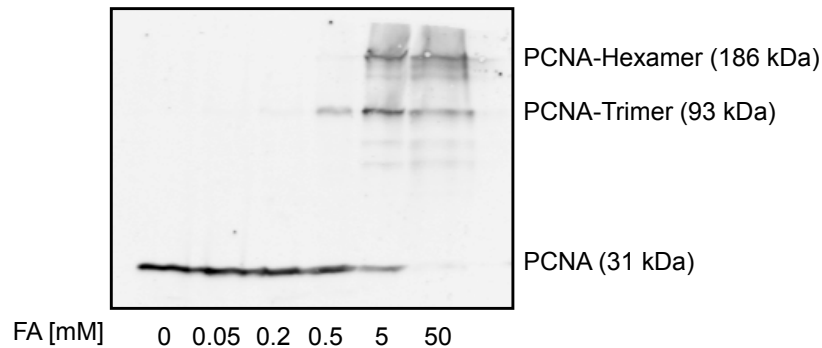
**Abbildung A11.: Die Behandlung mit Holzrauch induziert eine vergleichbare Intensität an  $\gamma$ -H2AX als ein klassisches Zytostatikum.** Repräsentative Aufnahmen der H2AX-Phosphorylierung in A549 Zellen nach 4 h Behandlung mit der Gasphase des Holzverbrennungsaerosols und nach 4 h Behandlung mit 20  $\mu$ M Etoposid auf Transwells unter submersen Bedingungen. Dieser Versuch wurde von Larissa Ramme während ihrer Diplomarbeit durchgeführt.



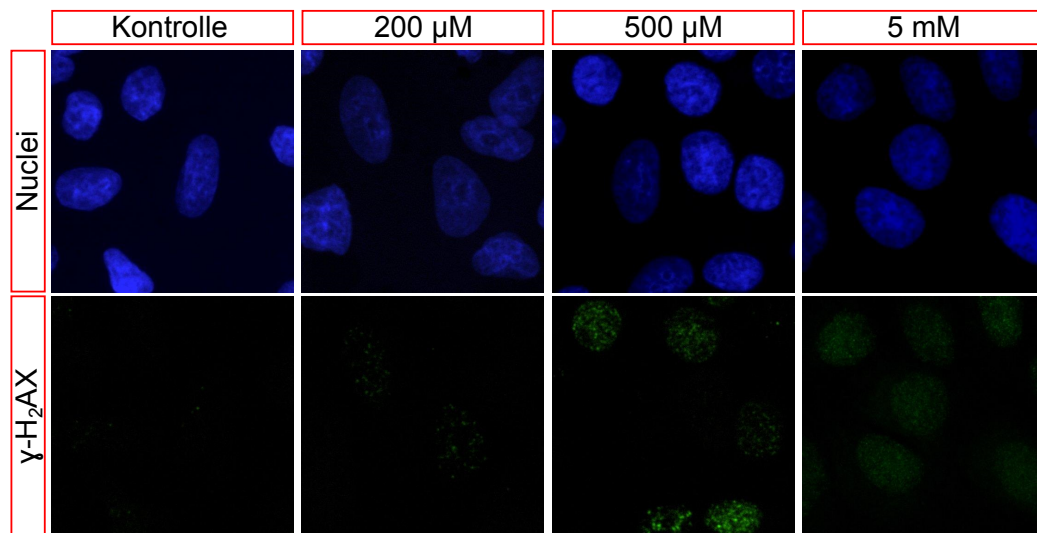
**Abbildung A12.: Die  $\gamma$ -H2AX Foci persistieren selbst nach 20 h Reparaturzeit.** A549 und BEAS-2B Zellen wurden 4h mit Reinluft und partikelgefiltertem Aerosol (Gasphase) behandelt. Die Zellen wurden direkt nach Ende der Behandlung für die Immunofluoreszenzfärbung fixiert oder zunächst unter submersen Bedingungen mit frischem RPMI Medium ohne HEPES oder FKS für 20 h weiterkultiviert. Danach wurden die Zellkerne (DAPI, blau) und  $\gamma$ -H2AX Foci (Alexa-Fluor 488, grün) detektiert. Abgebildet sind repräsentative Aufnahmen von 3 unabhängigen Versuchen. Dieser Versuch wurde von Larissa Ramme während ihrer Diplomarbeit durchgeführt.



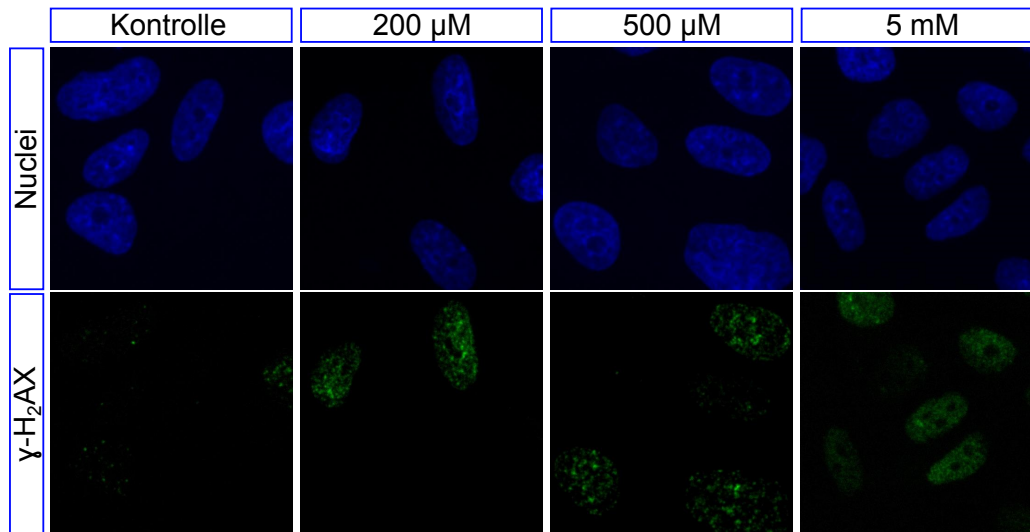
**Abbildung A13.: Die DNA Schadensantwort nach Behandlung mit Holzrauchaerosol führt nicht zu einer detektierbaren Stabilisierung von p53.** A549 und BEAS-2B Zellen wurden 4h mit Reinluft, komplettem Holzverbrennungsaerosol (Aerosol) und partikelgefiltertem Aerosol (Gasphase) behandelt. Aus Gesamtzelllysaten wurde mit SDS-PAGE und Western Blotting die p53 Gehalte untersucht. Dargestellt sind repräsentative Blots von 3 unabhängigen Versuchen je Zelllinie. PCNA diente als Ladekontrolle.



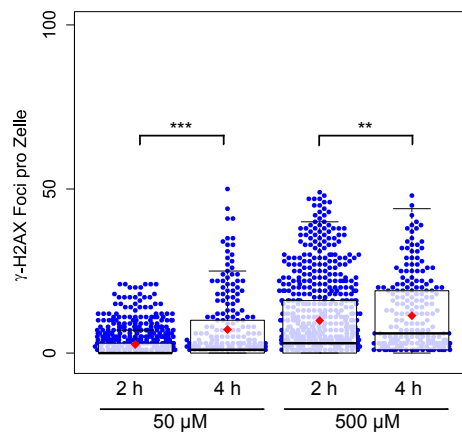
**Abbildung A14.: Behandlung mit Formaldehyd führt zu kovalenten Quervernetzungen des Kernproteins PCNA.** A549 Zellen wurden 2 h mit 0, 50, 200, 500  $\mu$ M, 5 und 50 mM FA in FKS-freiem Zellkulturmedium behandelt. Aus Gesamtzelllysaten wurde mit SDS-PAGE und Western Blot die Anwesenheit von PCNA Multimeren untersucht. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis aus 2 unabhängigen Versuchen.



**Abbildung A15.: Repräsentative Aufnahmen der H2AX-Phosphorylierung in A549 Zellen nach Submersbehandlung mit verschiedenen FA Konzentrationen.** Gezeigt sind repräsentative Ausschnitte der für die quantitative  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX Foci Analyse in Abb. 3.35B verwendeten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nach 2h Behandlung mit 0, 200, 500  $\mu$ M und 5 mM FA.



**Abbildung A16.: Repräsentative Aufnahmen der H2AX-Phosphorylierung in BEAS-2B Zellen nach Submersbehandlung mit verschiedenen FA Konzentrationen.** Gezeigt sind repräsentative Ausschnitte der für die quantitative  $\gamma$ -H2AX Foci Analyse in Abb. 3.35B verwendeten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nach 2h Behandlung mit 0, 200, 500  $\mu$ M und 5 mM FA.



**Abbildung A17.: Die Anzahl der  $\gamma$ -H2AX Foci bei submerser Behandlung mit Formaldehyd nimmt 2 h nach Start der Behandlung noch weiter zu.** BEAS-2B Zellen wurden 2 h und 4 h mit 50 und 500  $\mu$ M Formaldehyd (FA) in FKS-freiem Zellkulturmedium behandelt. Anschließend wurde mittels Immunfluoreszenz softwaregestützt die Anzahl der  $\gamma$ -H2AX Foci quantifiziert. Abgebildet sind die  $\gamma$ -H2AX Foci pro Zelle aus mindestens 210 (4 h) bzw 640 (2 h) Zellen je Bedingung aus einem Versuch. Aus Gründen der Darstellbarkeit wurden pro Bedingung maximal 25 Zellen je Y-Achseneneinheit abgebildet und Werte über dem 99% Quantil supprimiert. Die Boxplots zeigen den Mittelwert (farbige Raute), Median (dicke Linie), das 1. bis 3. Quartil (Box) und den entsprechenden 1.5-fachen IQR (Whisker). Signifikant unterschiedliche Mittelwerte zur Reinluftkontrolle gekennzeichnet mit \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$  nach Kruskal-Wallis mit Dunn's post-hoc Test.

## Publikationsliste

### Publikationen

- Dilger, M., Orasche, J., Zimmermann, R., Paur, H.-R., Diabaté, S., Weiss, C. (2016). **Toxicity of wood smoke particles in human A549 lung epithelial cells: the role of PAHs, soot and zinc.** *Archives of Toxicology* 90.12 (2016): 3029-3044.
- Oeder\*, S., Kanashova\*, T., Sippula\*, O., Sapcariu\*, S.C., Streibel\*, T., Arteaga-Salas\*, J.M., Passig\*, J., Dilger, M., Paur, H.-R., Schlager, C., Mühlhopt, S., Diabaté, S., Weiss, C., Stengel, B., Rabe, R., Harndorf, H., Torvela, T., Jokiniemi, J.K., Hirvonen, M.-R., Schmidt-Weber, C., Traidl-Hoffmann, C., Bérubé, K.A., Wlodarczyk, A.J., Prytherch, Z., Michalke, B., Krebs, T., Prévôt, A.S.H., Kelbg, M., Tiggesbäumker, J., Karg, E., Jakobi, G., Scholtes, S., Schnelle-Kreis, J., Lintelmann, J., Matuschek, G., Sklorz, M., Klingbeil, S., Orasche, J., Richthammer, P., Müller, L., Elsasser, M., Reda, A., Gröger, T., Weggler, B., Schwemer, T., Czech, H., Rüger, C.P., Abbaszade, G., Radischat, C., Hiller, K., Buters, J.T.M., Dittmar, G., Zimmermann, R. (2015). **Particulate Matter from Both Heavy Fuel Oil and Diesel Fuel Shipping Emissions Show Strong Biological Effects on Human Lung Cells at Realistic and Comparable In Vitro Exposure Conditions.** *PLoS ONE* 10(6): e0126536. \*geteilte Erstautorenschaft
- Mühlhopt\*, S., Dilger\*, M., Diabaté, S., Schlager, C., Krebs, T., Zimmermann, R., Buters, J., Öder, S., Wäscher, T., Weiss, C., Paur, H.-R. (2016). **Toxicity testing of combustion aerosols at the air-liquid interface with a self-contained and easy-to-use exposure system.** *Journal of Aerosol Science* 96 (2016): 38-55. \*geteilte Erstautorenschaft
- Sapcariu, S.C., Kanashova, T., Dilger, M., Diabaté, S., Öder, S., Passig, J., Radischat, C., Buters, J., Sippula, O., Streibel, T., Paur, H.-R., Schlager, C., Mühlhopt, S., Stengel, B., Rabe, R., Harndorf, H., Krebs, T., Karg, E., Gröger, T., Weiss, C., Dittmar, G., Hiller, K., Zimmermann, R. (2016). **Metabolic Profiling as Well as Stable Isotope Assisted Metabolic and Proteomic Analysis of RAW 264.7 Macrophages Exposed to Ship Engine Aerosol Emissions: Different Effects of Heavy Fuel Oil and Refined Diesel Fuel.** *PLoS ONE* 11(6): e0157964.

### Vorträge auf öffentlichen Tagungen

- Dilger, M., Sapcariu, S., Mühlhopt, S., Schlager, C., Schaaf, S., Mackert, M., Kanashova, T., Oeder, S., Krebs, T., Buters, J.T.M., Dittmar, G., Hiller, K., Paur, H.-R., Diabaté, S., Weiss, C., Zimmermann, R. **Start-up of the Vitrocell Automated Exposure Station 2.0 for emissions from combustion processes.** Vitrocell User Group Meeting, Rust, D, Mai 20, 2015.
- Dilger, M., Mühlhopt, S., Schlager, C., Zimmermann, R., Orasche, J., Diabate, S., Weiss, C., Krebs, T., Paur, H.-R. **Air-liquid interface (ALI) exposure system for in vitro toxicological studies of combustion aerosols in the HICE project.** Ultrafine Particles: Sources, Effects, Risks and Mitigation Strategies, EFCA International Symposium, Brüssel, B, Mai 16 - 17, 2013. Veröffentlicht unter ISBN 978-3-923704-81-1.
- Dilger, M. **Air-liquid-interface exposure. Why, what and how?** Summer School des virtuellen Helmholtz Institutes HICE, Prag, CZ, August 30, 2013.
- Mühlhopt, S., Diabate, S., Schlager, C., Murugadoss, S., Dilger, M., Weiss, C., Krebs, T., Paur, H.R. **A lab scale measurement technique for the air-liquid-interface exposure of human lung**

- cell cultures towards airborne particles.** European Aerosol Conference (EAC 2015) Mailand, I, September 6 - 11, 2015.
- Zimmermann, R., Dittmar, T.G., Kanashova, T., Buters, J., Öder, S., Paur, H.-R., Schlager, C., Mühlhopt, S., Dilger, M., Weiss, C., Diabate, S., Harndorf, H., Stengel, B., Rabe, R., Hiller, K., Sapccariu, S.C., BeruBe, K.A., Wlodarczyk, A.J., Michalke, B., Krebs, T., Kelbg, M., Tiggesbäum, J., Streibel, T., Karg, E., Scholtes, S., Schnelle-Kreis, J., Lintelmann, J., Sklorz, M., Arteaga Salas, M., Klingbeil, S., Orasche, J., Richthammer, P., Müller, L., Rheda, A., Passig, J., Gröger, T., Abbaszade, G., Radischat, C., Smita, S., Torvela, T., Tiitta, P., Yli-Pirilä, P., Kortelainen, M., Leskinen, J., Lamberg, H., Grigonyte, J., Tissari, J., Leskinen, A., Kuuspalo, K., Hao, L., Kasurinen, S., Jalava, P., Lehtinen, K., Virtanen, A., Hirvonen, M.-R., Kasurinen, S., Jalava, P., Sippula, O., Jokiniemi, J. **Biological effects of combustion aerosols on human lung cells exposed at the air liquid interface: Comparison of the molecular biological effects of log wood and pellet combustion aerosols with the effects of ship engine emissions.** European Aerosol Conference (EAC 2015) Mailand, I, September 6 - 11, 2015.
  - Armand, L., Biola-Clier, M., Dilger, M., Mühlhopt, S., Schlager, C., Paur, H.-R., Collin-Faure, V., Diabate, S., Weiss, C., Herlin-Biome, N., Rabilloud, T., Carriere, M. **Titanium dioxide nanoparticles toxicology: Towards more physiological in vitro exposure models?** 4<sup>th</sup> International Conference on Safe Production and Use of Nanomaterials (NANOSAFE), Grenoble, F, November 18 - 20, 2014.
  - Mühlhopt, S., Dilger, M., Schlager, C., Zimmermann, R., Diabate, S., Weiss, C., Paur, H.-R. **Air-liquid interface exposure system for in vitro toxicological studies of combustion derived ultrafine aerosols.** Conference on Aerosol Technology, Karlsruhe, June 16 - 18, 2014.
  - Schnelle-Kreis, J., Dittmar, T.G., Kanashova, T., Buters, J., Öder, S., Paur, H.-R., Schlager, C., Mühlhopt, S., Dilger, M., Weiß, C., Diabate, S., Harndorf, H., Stengel, B., Rabe, R., Hirvonen, M.R., Jokiniemi, J., Torvela, T., Hiller, K., Sapccariu, S.C., BeruBe, K.A., Wlodarczyk, A.J., Sippula, O., Michalke, B., Krebs, T., Kelbg, M., Tiggesbäumker, J., Streibel, T., Karg, E., Scholtes, S., Lintelmann, J., Matuschek, G., Sklorz, M., Arteaga Salas, M., Klingbeil, S., Orasche, J., Richthammer, P., Müller, L., Elsasser, M., Rheda, A., Passig, J., Gröger, T., Abbaszade, G., Radischat, C., Zimmermann, R. **A Comprehensive Study on the Composition of Aerosol Emissions from Ship-Diesel Engines Operated with Diesel Fuel or Heavy Fuel Oil.** International Aerosol Conference (IAC 2014), Busan, Korea, August 28 - September 2, 2014.
  - Mühlhopt, S., Dilger, M., Schlager, C., Zimmermann, R., Diabate, S., Weiss, C., Paur, H.-R. **Air-liquid interface exposure system for in vitro toxicological studies of wood combustion aerosols.** European Aerosol Conference (EAC 2013), Prag, CZ, September 1 - 6, 2013.
  - Orasche, J., Dittmar, T.G., Kanashova, T., Buters, J., Öder, S., Paur, H.-R., Schlager, C., Mühlhopt, S., Dilger, M., Weiss, C., Diabate, S., Harndorf, H., Stengel, B., Rabe, R., Hiller, K., Sapccariu, S.C., BeruBe, K.A., Wlodarczyk, A.J., Sippula, O., Jokiniemi, J., Hirvonen, M.-R., Michalke, B., Krebs, T., Kelbg, M., Tiggesbäumker, J., Streibel, T., Karg, E., Abbaszade, G., Scholtes, S., Schnelle-Kreis, J., Lintelmann, J., Sklorz, M., Arteaga Salas, M., Klingbeil, S., Richthammer, P., Müller, L., Elsasser, M., Rheda, A., Werner, B., Passig, J., Gröger, T., Radischat, C., Zimmermann, R. **Health relevant compounds in wood combustion and ship diesel aerosols: Evaluation of the toxicity due to polycyclic aromatic hydrocarbons.** European Aerosol Conference (EAC 2013), Prag, CZ, September 1 - 6, 2013.

- Paur, H.-R., Müllhopt, S., Dilger, M., Schlager, C., Krebs, T., Zimmermann, R., Diabate, S., Weiss, C. **Air-liquid interface exposure systems for the assessment of toxicity of combustion aerosols.** European Aerosol Conference (EAC 2013), Prag, CZ, September 1-6, 2013.
- Zimmermann, R., Dittmar, T.G., Kanashova, T., Buters, J., Öder, S., Paur, H.-R., Schlager, S., Müllhopt, S., Dilger, M., Weiss, C., Diabate, S., Harndorf, H., Stengel, B., Rabe, R., Hirvonen, M.R., Jokiniemi, J., Torvela, T., Hiller, K., Sapcariu, S.C., BeruBe, A., Wlodarczyk, A.J., Sippula, O., Michalke, B., Krebs, T., Kelbg, M., Tigesbäumker, J., Streibel, T., Karg, E., Scholtes, S., Schnelle-Kreis, J., Lintemann, J., Sklorz, M., Arteaga Salas, M., Klingbeil, S., Orasche, J., Richthammer, P., Müller, L., Elsasser, M., Rheda, A., Werner, B., Passig, J., Gröger, T., Abbaszade, G., Radischat, C. **Studying the causes of health effects of combustion-derived aerosol in the framework of the HICE-Virtual Helmholtz Institute: First results on ship diesel and wood combustion aerosols.** European Aerosol Conference (EAC 2013), Prag, CZ, September 1 - 6, 2013.

#### Posterbeiträge auf Tagungen

- Dilger\*, M., Müllhopt, S., Schlager, C., Orasche, J., Radischat, C., Karg, E., Zimmermann, R., Paur, H.-R., Diabate, S., Weiss, C. **Toxicity profiling of wood combustion and ship diesel engine exhausts by air-liquid interface exposure.** Aerosol Emissions from Fossil Fuel and Biomass Combustion: Chemical Properties, Transformation and Health Effects. Workshop der Gesellschaft für Aerosolforschung, Prag, CZ, August 31 - September 1, 2013. \*Best Poster Award
- Müllhopt, S., Diabaté, S., Schlager, C., Dilger, M., Krebs, T., Weiss, C., Paur, H.-R. **Automatisierte und definierte Deposition von Aerosolen auf Zellkulturen für eine Bewertung der biologischen Wirksamkeit von Feinstäuben.** VDI-Fachtagung, Düsseldorf, D, Oktober 20 - 21, 2015.
- Müllhopt, S., Dilger, M., Diabaté, S., Schlager, C., Krebs, T., Weiss, C., Paur, H.-R. **A lab scale measurement technique for the air-liquid interface exposure of human lung cell cultures towards airborne nanoparticles.** 7<sup>th</sup> EuroNanoForum, Riga, LVA, Juni 10 - 12, 2015.
- Müllhopt, S., Dilger, M., Diabaté, S., Schlager, C., Krebs, T., Weiss, C., Paur, H.-R. **A lab scale measurement device for the air-liquid interface exposure cultured lung cells towards wood burning emissions.** Energy, Science and Technology (EST 2015), Karlsruhe, D, Mai 20 - 22, 2015. (URN: Nbn:de:swb:90-442903)
- Müllhopt, S., Dilger, M., Schlager, C., Diabate, S., Braakhuis, H., Weiss, C., Paur, H.-R. **Air-liquid interface exposure system for in vitro toxicological studies of airborne nanoparticles.** 7<sup>th</sup> International Nanotoxicology Congress (NanoTox 2014), Antalya, TR, April 23 - 26, 2014.
- Maser, E., Dilger, M., Diabaté, S., Weiss, C., Hartwig, A. **Toxicological effects of nickel and nickel oxide nanoparticles in human lung epithelial cells.** 42<sup>nd</sup> Annual EEMS Meeting, Warschau, PL, 2012.