

**Einfluss von Cadmium und Kupferoxid-Nanopartikeln auf die
genomische Stabilität:
Identifizierung der Wirkmechanismen auf Basis von
Genexpressionsprofilen mittels *High-Throughput RT-qPCR***

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Bettina Maria Fischer

aus

Weingarten

KIT-Dekan: Prof. Dr. Willem Klopper

Referent: Prof. Dr. Andrea Hartwig

Korreferent: Prof. Dr. Holger Puchta

Tag der mündlichen Prüfung: 22.April 2016

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| INHALTSVERZEICHNIS | I |
| 1. ZUSAMMENFASSUNG | 1 |
| 2. EINLEITUNG | 5 |
| 2.1 Genexpressionsanalysen in der Toxikologie | 5 |
| 2.1.1 Die Biomark TM <i>High-Throughput RT-qPCR</i> Technik | 5 |
| 2.1.2 Die genomische Stabilität | 6 |
| 2.1.3 Redox-Regulation von Signalwegen | 8 |
| 2.2 Cadmium | 9 |
| 2.3 Kupfer und partikuläre Kupferoxidverbindungen..... | 10 |
| 2.3.1 Toxizität..... | 12 |
| 2.3.2 Kupferhomöostase | 13 |
| 2.3.3 Endozytose..... | 14 |
| 3. FRAGESTELLUNG | 17 |
| 4. MATERIAL UND METHODEN | 19 |
| 4.1 Zellkultur | 19 |
| 4.1.1 Zelllinien und Kultivierung..... | 19 |
| 4.1.2 Inkubationen..... | 20 |
| 4.1.2.1 Inkubation mit CdCl ₂ | 20 |
| 4.1.2.2 Inkubation mit CuO NP, CuO MP und CuCl ₂ | 20 |
| 4.1.2.3 Inkubation mit Endozytoseinhibitoren oder Bafilomycin A1 (BafA1) | 21 |
| 4.1.3 Zytotoxizitätsuntersuchungen | 22 |
| 4.2 Genexpressionsanalysen mittels <i>High-Throughput RT-qPCR</i> | 22 |
| 4.2.1.1 Bewertung der Primer-Spezifität..... | 27 |
| 4.2.1.2 Bewertung der Primer-Effizienz..... | 28 |
| 4.3 Zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung mittels GF-AAS..... | 28 |
| 4.4 Bestimmung der Nrf2-Aktivierung | 30 |
| 4.5 Bestimmung des Gesamtglutathiongehaltes | 32 |
| 4.6 Bestimmung der Zellzyklusphasenverteilung und Zelltodinduktion | 34 |
| 4.7 Statistik | 37 |
| 5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION | 38 |
| 5.1 Etablierung und Validierung der <i>High-Throughput RT-qPCR</i> | 38 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.1.1 Auswahl eines Gen-Sets zur Untersuchung der genomischen Stabilität | 38 |
| 5.1.2 Design sequenzspezifischer Primer-Paare für die ausgewählten Gene | 40 |
| 5.1.3 Ermittlung der Spezifität und Effizienz der Primer-Paare | 41 |
| 5.2 Beeinflussung der Genexpression durch CdCl ₂ | 44 |
| 5.2.1 Zytotoxizitätsuntersuchungen | 44 |
| 5.2.2 Einfluss von CdCl ₂ auf Gene der Aufnahme und (oxidativen) Stressantwort..... | 44 |
| 5.2.3 Einfluss von CdCl ₂ auf Gene der Zellzyklusregulation und Proliferation..... | 47 |
| 5.2.4 Einfluss von CdCl ₂ auf Gene der Apoptose | 49 |
| 5.2.5 Einfluss von CdCl ₂ auf Gene der DNA-Schadensantwort und -Reparatur..... | 50 |
| 5.3 Untersuchungen von CuO NP, CuO MP und CuCl ₂ | 53 |
| 5.3.1 Zytotoxizitätsuntersuchungen | 53 |
| 5.3.2 Beeinflussung der Genexpression durch CuO NP, CuO MP und CuCl ₂ | 55 |
| 5.3.2.1 Einfluss auf Gene der Aufnahme und (oxidativen) Stressantwort..... | 55 |
| 5.3.2.2 Einfluss auf Gene der Zellzyklusregulation und Proliferation | 60 |
| 5.3.2.3 Einfluss auf Gene der Apoptose | 61 |
| 5.3.2.4 Einfluss auf Gene der DNA-Schadensantwort und -Reparatur | 62 |
| 5.3.3 Beeinflussung von zellulären Prozessen durch CuO NP, CuO MP und CuCl ₂ | 65 |
| 5.3.3.1 Zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung..... | 65 |
| 5.3.3.2 Untersuchungen zur oxidativen Stressantwort..... | 69 |
| 5.3.3.3 Untersuchungen zur Aktivierung der DNA-Schadensantwort | 71 |
| 5.3.4 Einfluss der Endozytose und lysosomalen Ansäuerung..... | 74 |
| 5.3.4.1 Beeinflussung der zellulären Aufnahme durch Hydroxy-Dynasore und andere Endozytoseinhibitoren | 75 |
| 5.3.4.2 Beeinflussung der zellulären Aufnahme durch Bafilomycin A1 | 78 |
| 5.3.4.3 Einfluss von BafA1 auf die Zytotoxizität von CuO NP, CuO MP und CuCl ₂ und auf die CuO NP-induzierte GSH-Depletion | 80 |
| 5.3.4.4 Beeinflussung der Genexpression durch OH-Dyn | 81 |
| 5.3.4.5 Beeinflussung der Genexpression durch BafA1..... | 84 |
| 6. ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION | 88 |
| 7. LITERATURVERZEICHNIS | 101 |
| 8. ANHANG | 113 |
| 8.1 Abkürzungsverzeichnis | 113 |
| 8.2 Verwendete Chemikalien | 116 |
| 8.3 Antikörper, Lösungen und Puffer..... | 119 |
| 8.3.1 Antikörper | 119 |
| 8.3.2 Lösungen und Puffer | 119 |
| 8.4 Verbrauchsmaterialien | 123 |

| | | |
|-----------|------------------------------------------------------------------------|------------|
| 8.5 | Verwendete Geräte | 124 |
| 8.6 | Ergänzende Daten | 126 |
| 8.6.1 | RNA-Integrität | 126 |
| 8.6.2 | AAS-Analysen | 127 |
| 8.6.2.1 | Ermittlung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze | 127 |
| 8.6.2.2 | Bestimmung der Wiederfindungsrate | 127 |
| 8.6.3 | Nrf2-Aktivierung | 127 |
| 8.6.3.1 | Überprüfung der Funktionalität und Spezifität | 127 |
| 8.6.3.2 | Überprüfung der Kernextraktion mittels SDS-PAGE und Western Blot | 128 |
| 8.6.4 | <i>High-Throughput RT-qPCR</i> | 129 |
| 8.6.4.1 | Namen der kodierten Proteine der ausgewählten Gene | 129 |
| 8.6.4.2 | Primer-Sequenzen | 132 |
| 8.6.4.3 | Gelelektrophorese und Schmelzkurvenanalyse | 137 |
| 8.6.4.4 | Beispielkalibrierung | 138 |
| 8.6.4.5 | Ermittlung der Primer-Effizienz | 139 |
| 8.6.5 | Untersuchungen zu CdCl ₂ | 142 |
| 8.6.5.1 | Zytotoxizitätsuntersuchung | 142 |
| 8.6.5.2 | Ergänzende Genexpressionsdaten | 142 |
| 8.6.6 | Untersuchungen zu CuO NP, CuO MP und CuCl ₂ | 145 |
| 8.6.6.1 | Zytotoxizitätsuntersuchungen | 145 |
| 8.6.6.2 | Ergänzende Genexpressionsdaten | 145 |
| 8.6.6.3 | Ergänzende Gesamtaufnahmeuntersuchungen | 147 |
| 8.6.6.4 | Ergänzende Zellzyklus- und Zelltoduntersuchungen | 148 |
| 8.6.6.5 | Ergänzende Untersuchungen mit Endozytoseinhibitoren und BafA1 | 149 |
| 9. | PUBLIKATIONSLISTE | 153 |

1. ZUSAMMENFASSUNG

Genexpressionsanalysen werden im Rahmen der Risikobewertung von Chemikalien zunehmend als prädiktives Testsystem eingesetzt, um komplexe Wirkmechanismen von potentiell toxischen oder kanzerogenen Substanzen zu identifizieren. In dieser Arbeit wurde eine quantitative *High-Throughput RT-qPCR* Technik etabliert, die *dynamic arrays* der Firma Fluidigm und das BioMark™ HD System nutzt, so dass in einer Analyse die Expressionslevel von 95 Genen in 96 Proben parallel untersucht werden können. Dafür wurde ein Gen-Set erstellt, das wichtige Gene aus zellulären Signalwegen wie der Stressantwort, der DNA-Reparatur, der Zellzyklusregulation, der Proliferation sowie der Apoptose beinhaltet, da diese entscheidend für den Erhalt der genomischen Stabilität sind und eine Beeinflussung somit gezielt untersucht werden kann. Sequenzspezifische Primer-Paare wurden nach definierten Kriterien individuell für jedes Zielgen konzipiert und deren Spezifität über Schmelzkurvenanalysen als Teil der qPCR-Technik sowie Größenverifizierung mittels Gelelektrophorese der resultierenden Amplifikate bewertet. Zudem konnten anhand von Kalibrierungskurven hohe Primer-Effizienzen, gute Korrelationskoeffizienten sowie eine niedrige Intra-Assay-Abweichung im identifizierten linear dynamischen Bereich bestätigt werden.

Die Aussagekraft der etablierten Technik wurde anhand von Genexpressionsanalysen in der humanen Alveolarkarzinomzelllinie A549 und der humanen Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B mit der Modellsubstanz CdCl₂ beurteilt. Konzentrations- und zeitabhängige sowie zelltypspezifische Expressionsmuster konnten nachgewiesen werden, wobei eine Induktion von Genen, die für Metallothionein und Faktoren der oxidativen Stressantwort, der Zellzykluskontrolle sowie Proliferation und Apoptose kodieren, beobachtet wurde. Ein interessanter Aspekt war eine transkriptionelle Erhöhung der Expressionslevel von DNA-Schadenssignalgenen, wohingegen die Transkriptmengen von DNA-Reparaturgenen ausschließlich herunterreguliert wurden. Insgesamt ermöglichten die Untersuchungen einen umfassenden Überblick über Interaktionen von CdCl₂ mit den kritischen Signalwegen, wobei zudem bekannte mechanistische Aspekte der kanzerogenen Wirkung von Cadmium reflektiert wurden.

Weitere *High-Throughput RT-qPCR* Analysen wurden durchgeführt, um mechanistische Wirkungsweisen der Toxizität von Kupferoxid-Nanopartikeln (CuO NP) aufzuklären. CuO NP werden zunehmend in verschiedenen Bereichen eingesetzt, wodurch das Risiko adverser Gesundheitseffekte steigt, was aufgrund einer nachgewiesenen ausgeprägten *in vitro* Zytotoxizität naheliegt. Die systematischen Genexpressionsprofile, die in den Zelllinien A549 und BEAS-2B erstellt wurden, zeigten nach CuO NP Behandlung eine starke Induktion von

Metallothionein-, sowie proinflammatorischen, oxidativen und genotoxischen stresssensitiven Genen, außerdem eine transkriptionelle Erhöhung des Zellzyklusinhibitor-Gens *CDKN1A* und der proapoptischen Gene *PMAIP1* und *TNFRSF10B*, wohingegen die Transkriptmengen von DNA-Reparaturgenen erneut herunterreguliert wurden. Prinzipiell zeigten CuO NP und die Referenzsubstanzen CuO MP (Kupferoxid-Mikropartikel) und CuCl₂ ähnliche Genexpressionsmuster und damit Wirkmechanismen; die Effekte durch CuO NP waren jedoch immer konzentrationsabhängig, zumeist schon in niedrigen Dosen relevant und viel ausgeprägter im Vergleich zu CuO MP und CuCl₂. Die aussagekräftigere und vielfältigere Modulation in den gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) empfindlicheren BEAS-2B-Zellen zeigte zudem eine dominierende Redox-Regulation der Signalprozesse an. Untersuchungen auf funktioneller Ebene in BEAS-2B-Zellen bestätigten eine ausgeprägte Kupferakkumulation bis zu millimolaren Konzentrationen sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern, die Induktion von oxidativem Stress via GSH-Depletion nach zwei Stunden, eine Aktivierung von Nrf2 nach fünf Stunden in der Modellzelllinie HeLa S3 sowie eine Zellzyklusarretierung nach acht Stunden und Induktion der Apoptose nach 48 Stunden. Somit wurde die Beeinflussung auf Transkriptionsebene in hohem Ausmaß reflektiert und eine Zeitabhängigkeit der Effekte beobachtet. Durch geringere Kupfereinträge nach Einsatz des Dynamin-abhängigen Endozytoseinhibitors Hydroxy-Dynasore sowie des lysosomalen „Neutralisators“ Bafilomycin A1 (BafA1) konnte eine Umgehung der homöostatisch regulierten Kupferaufnahme durch CuO NP nachgewiesen werden, wodurch es in Übereinstimmung mit einem postulierten *trojan horse type* Mechanismus nach endozytotischer Aufnahme und einer gesteigerten Löslichkeit der Partikel in sauren Lysosomen zu einer erhöhten Freisetzung reaktiver Kupferionen kommt. Eine reduzierte zytotoxische Wirkung der CuO NP einhergehend mit einer Verhinderung der GSH-Depletion durch BafA1 bestätigte, dass diese Freisetzung und die daraus resultierende gesteigerte ROS-Bildung die entscheidenden Faktoren der CuO NP-vermittelten Toxizität darstellen. Genexpressionsuntersuchungen mit den Inhibitorsubstanzen zeigten, dass die veränderte zelluläre Signaltransduktion nur durch intrazelluläre Prozesse und dabei hauptsächlich redoxreguliert über ROS als *second messenger* beeinflusst wird.

Zusammenfassend erscheint die etablierte *High-Throughput RT-qPCR* als vielversprechende und effektive Methode zur Aufklärung toxischer und genotoxischer Wirkmechanismen. Dementsprechend wurden mit dem System mechanistische Hintergründe der kanzerogenen Wirkung von Cadmium reflektiert. Zudem konnte eine starke Beeinflussung der genomischen Stabilität durch CuO NP in Form einer ausgeprägten Reaktion des gesamten DNA-Schadensantwortsystems auf Transkriptions- und funktioneller Ebene hauptsächlich auf erhöhte intrazelluläre Mengen „freier“ reaktiver Kupferionen und damit verbundenen oxidativen Stress zurückgeführt werden.

ABSTRACT

Gene expression studies can be used as a valuable predictive test system to identify the complex modes of action of potential toxic or carcinogenic substances and are, therefore, increasingly applied for risk assessment of chemicals. In the present study, we established a quantitative *high-throughput RT-qPCR* technique using the Fluidigm dynamic array on the BioMark™ HD System to analyze the expression level of 95 genes and 96 samples in parallel. A gene set was established to investigate important cellular signaling pathways crucial for maintaining genomic stability, including stress response, DNA repair, cell cycle control, apoptosis and mitotic signaling. According to defined criteria sequence specific primer pairs were individually designed for each target gene and their specificity was evaluated by means of the resulting target amplicons via melting curve analysis as part of qPCR and size verification via agarose gel electrophoresis. For each gene, calibration curves approved high efficiencies and correlation coefficients in the identified linear dynamic range as well as low intra-assay variations.

The power of the test system was assessed by gene expression analyses in adenocarcinoma A549 and epithelial bronchial BEAS-2B cells treated with CdCl₂. Treatment of the cells with CdCl₂ led to distinct dose- and time-dependent as well as cell-type specific gene expression patterns revealing the induction of genes coding for metallothionein, the oxidative stress response, cell cycle control, mitotic signaling and apoptosis. Interestingly, while genes coding for the DNA damage response were transcriptionally enhanced, various genes involved in DNA repair were down-regulated at the transcriptional level. Taken together, this approach provided a comprehensive overview on the effect of CdCl₂ on different signaling pathways, also reflecting known molecular modes of action in cadmium-induced carcinogenicity.

Further *high-throughput RT-qPCR* analyses were performed to enlighten mechanistic aspects of the toxicity induced by nanoscale copper oxide particles (CuO NP). Multifunctional applications of CuO NP appear to enhance the risk of adverse health effects in humans which was concluded from reports about a pronounced cytotoxicity *in vitro*. Systematic gene expression profiling in A549 as well as BEAS-2B cells revealed a strong induction of metallothionein, pro-inflammatory, oxidative and genotoxic stress sensitive genes as well as a transcriptional induction of cell cycle inhibitor *CDKN1A* and the proapoptotic *PMAIP1* and *TNFRSF10B* genes, whereas down-regulation of individual DNA repair genes by CuO NP was observed. Basically, CuO NP and the reference compounds CuO MP (copper oxide microparticles) and CuCl₂ displayed similar gene expression patterns indicating equal modes of action. However, compared to CuO MP and CuCl₂, CuO NP induced a stronger gene modulation which was strictly dose-dependent and in most cases already relevant at low

concentrations. Furthermore, a more distinct and diverse pattern in the more ROS-sensitive BEAS-2B cells indicated primarily redox regulated signaling. Investigations on the functional level in BEAS-2B cells displayed a pronounced copper overload up to millimolar concentrations both in the cytoplasm and nucleus, induction of oxidative stress via GSH depletion after two hours, Nrf2 activation in the model cell line HeLa S3 after five hours, the activation of the DNA damage response system via cell cycle arresting after eight hours and finally induction of apoptosis after 48 hours. The observations on the transcriptional level were therefore highly reflected on the functional level. In addition, a time-dependency of effects was observed. A diminished copper content by the use of the dynamin-dependent endocytosis inhibitor hydroxy-dynasore as well as lysosomal “neutralizer” bafilomycin A1 (bafA1) confirmed the bypassing of a controlled homeostatic copper uptake by CuO NP via endocytosis and increased solubility of the particles in acidic lysosomes, resulting in enhanced intracellular release of reactive copper ions according to a *trojan horse type* mechanism. A strongly reduced cytotoxicity of CuO NP combined with inhibited GSH depletion observed after application of bafA1 suggests that the release of copper ions and the resulting ROS generation are the most important factors for CuO NP-mediated toxicity. Gene expression analyses using the two inhibitor substances further indicated that modulation of gene expression is solely affected via intracellular signaling by modulation of the redox regulation, which depends predominantly on ROS as a *secondary messenger*.

Taken together, the established *high-throughput RT-qPCR* method appears to be an effective and promising technique for the identification of toxic and genotoxic modes of action. Consequently, mechanistic aspects involved in cadmium-induced carcinogenicity were highly reflected. Furthermore, a distinct impact on genomic stability by CuO NP as shown by a pronounced reaction of the DNA damage response system both on the transcriptional and functional level could be ascribed to increased intracellular amounts of “free” reactive copper ions and the related induction of oxidative stress.

2. EINLEITUNG

2.1 Genexpressionsanalysen in der Toxikologie

Genexpressionsanalysen haben sich in der Toxikologie zu einer bedeutenden prädiktiven Technik entwickelt, um die molekularen Ursachen der adversen Effekte von potentiell toxischen Substanzen und Kanzerogenen aufzuklären. Dabei sollen die zugrunde liegenden, oft sehr komplexen Wirkmechanismen durch substanzspezifische Transkriptionsveränderungen identifiziert und toxische Verbindungen dadurch charakterisiert werden (Fielden und Zacharewski 2001). Bei der gesamten Kontrolle der Genexpression stellt die Transkription den dominierenden Faktor dar, wobei auch posttranskriptionale Prozesse wie die mRNA-Stabilität, deren Lokalisation, microRNAs und die Translationseffizienz zur Regulation beitragen können (Brown 2007).

In der Praxis werden verschiedene Hochdurchsatztechniken eingesetzt, die die Erstellung von sogenannten Genexpressionsprofilen von Substanzen ermöglichen. Gebräuchliche Methoden sind die Microarray-Technik oder das Next Generation Sequencing, die genomweite Untersuchungen ermöglichen (Nuwaysir et al. 1999; Cunningham et al. 2000; Nie et al. 2006; Gusenleitner et al. 2014). Dabei werden aufgrund der Kosten sowie des Aufwands häufig jedoch nur einzelne Konzentrationen zu einzelnen Zeitpunkten analysiert, obwohl die Risikobewertung und Expositionslimitierung Dosiswirkungsbeziehungen voraussetzen, insbesondere bei kanzerogenen Substanzen. Zudem werden die semi-quantitativen Resultate anschließend zumeist über RT-qPCR (Reverse Transkriptase quantitative PCR) verifiziert. Die RT-qPCR ist sehr zuverlässig, aber zeitaufwendig und war deshalb bisher auf ausgewählte Gene begrenzt. Die Fluidigm Corporation hat jedoch eine Technik entwickelt, die qPCR im Hochdurchsatzformat ermöglicht (Spurgeon et al. 2008). Die Technik wird in dieser Arbeit verwendet und deshalb im Folgenden erläutert.

2.1.1 Die BiomarkTM High-Throughput RT-qPCR Technik

Die Firma Fluidigm hat mikrofluidische *dynamic arrays* entwickelt, die in verschiedenen Designs erhältlich sind und somit für unterschiedliche Fragestellungen angewendet werden können. Dieser Ansatz wurde für Genexpressionsanalysen auf Einzelzellebene z.B. in Tumorgewebe, zur Genotypisierung von Einzelnukleotidpolymorphismen oder für quantitative microRNA-Expressionsanalysen genutzt (Diehn et al. 2009; Wang et al. 2009; Petriv et al. 2010; White et al. 2011; Jang et al. 2011; Citri et al. 2012). In unserer Arbeitsgruppe wurde das System verwendet, um in einer einzigen Analyse parallel die relative Expression von 95 Genen und einer „No Reaction Control“ (NRC) in 96 verschiedenen Proben quantitativ mittels BioMarkTM HD System zu messen. Dafür wird in

jeder der 9216 Reaktionskammern des *dynamic array* eine Probe mit einem spezifischen Primer-Paar für ein Zielgen kombiniert (Abbildung 1). Die im Anschluss folgende qPCR ermöglicht eine Quantifizierung in Echtzeit, da die Fluoreszenzintensität des zugesetzten DNA-interkalierenden Farbstoffes EvaGreen proportional mit der Amplifikatmenge zunimmt. Mit diesem System sind zwar keine genomweiten Analysen möglich, aber es können quantitative zeit- und konzentrationsabhängige Genexpressionsprofile erstellt werden, die keine weitere Verifizierung benötigen. Bei diesen soll der Fokus auf die Untersuchung einer Beeinflussung der genomischen Stabilität gelegt werden.

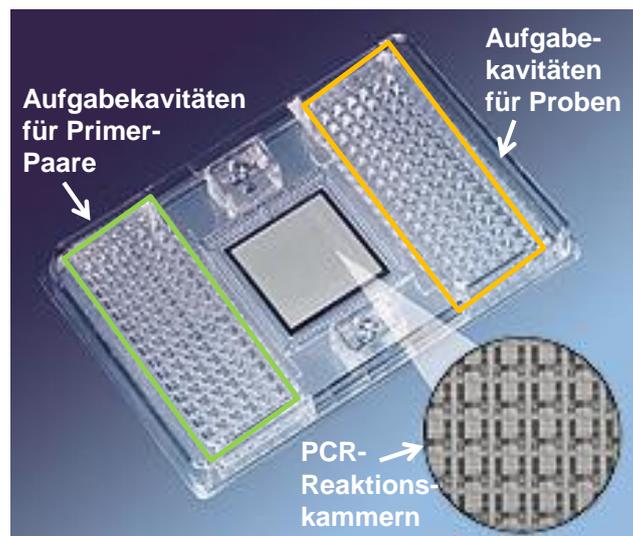


Abbildung 1 **Aufbau eines *dynamic array***. In die Kavitäten auf der rechten Seite werden 96 zu analysierende Proben pipettiert und links die 95 Primer-Paare sowie die No Reaction Control. In jeder der 9216 Reaktionskammern wird eine Probe mit einem Primer-Paar kombiniert (modifiziert nach Fluidigm, 2016).

2.1.2 Die genomische Stabilität

Das Überleben von Organismen ist abhängig von einer korrekten Übertragung der genetischen Information. Ein intaktes Genom wird neben einer korrekten Replikation vor allem durch ein komplexes Netzwerk von Reparaturmechanismen und Signalprozessen gewährleistet. Eine negative Beeinflussung der genomischen Stabilität, die zu Mutationen und auch zu einer erhöhten Tumorentstehung führen kann, ist deshalb nicht nur durch direkte Schädigung der DNA, sondern auch durch eine Beeinträchtigung dieses Netzwerkes möglich. Das DNA-Schadensantwortsystem, dessen Hauptziel die Reparatur der DNA-Schädigung darstellt, beinhaltet die Induktion eines Zellzyklusarrestes, um mehr Zeit für die Reparatur zu haben, die Aktivierung der verschiedenen DNA-Reparaturwege einschließlich der Direktion der Reparaturfaktoren zur DNA-Läsion, eine komplexe Aktivierung der Transkription von Faktoren dieser Signalwege, sowie, bei zu starker Schädigung, die Induktion der Apoptose (Zhou und Elledge 2000). Zusätzlich sind mittlerweile weitere Verbindungen zu eher indirekt beteiligten Prozessen wie dem Insulin-

Signalweg, dem RNA-Spleißen, dem Spindel-Kontrollpunkt, dem Chromatin-Remodelling sowie vielen Transkriptionsfaktoren bekannt, wodurch die Komplexität weiter steigt (Harper und Elledge 2007). Vereinfacht setzt sich das System, wie schematisch in Abbildung 2 gezeigt, aus Sensoren zusammen, die den DNA-Schaden erkennen, gefolgt von Mediatoren, die das Signal weiterleiten, und schließlich aus Effektoren, die ihre jeweilige Funktion innerhalb der Schadensantwort ausüben (Zhou und Elledge 2000). Als Sensoren wurden dabei fünf unabhängige Proteinkomplexe identifiziert, z.B. ATM- und ATR-Komplexe, die jeweils unterschiedliche DNA-Schäden erkennen. Bei den Mediatoren handelt es sich um Proteine, die, den ATM- und ATR-Kinasen nachgeschaltet, weitere Substrate zum Schaden rekrutieren und als Gerüstbestandteile der Komplexe dienen. Bekannte Vertreter der Effektoren sind der Tumorsuppressor p53 sowie das DNA-Reparaturprotein BRCA1 (Harper und Elledge 2007). Die Bedeutung der DNA-Schadensantwort wird anhand der von Hanahan und Weinberg postulierten „Kennzeichen“ der Krebsentstehung deutlich. Dazu zählen anhaltende wachstumsfördernde Signale, ausgeschaltete Antiwachstumsfaktoren, die Resistenz gegenüber Zelltod, eine unbegrenzte Replikationsaktivität, Angiogenese, Gewebsinvasion und Metastasierung sowie ein veränderter Energiemetabolismus und ein Untergang der Immunantwort. Diese Veränderungen des zellulären und systemischen Metabolismus werden maßgeblich von vielen Faktoren der DNA-Schadensantwort beeinflusst, da diese während der Tumorentstehung häufig dereguliert oder inaktiviert werden (zusammengefasst in Hanahan und Weinberg 2000; Hanahan und Weinberg 2011).

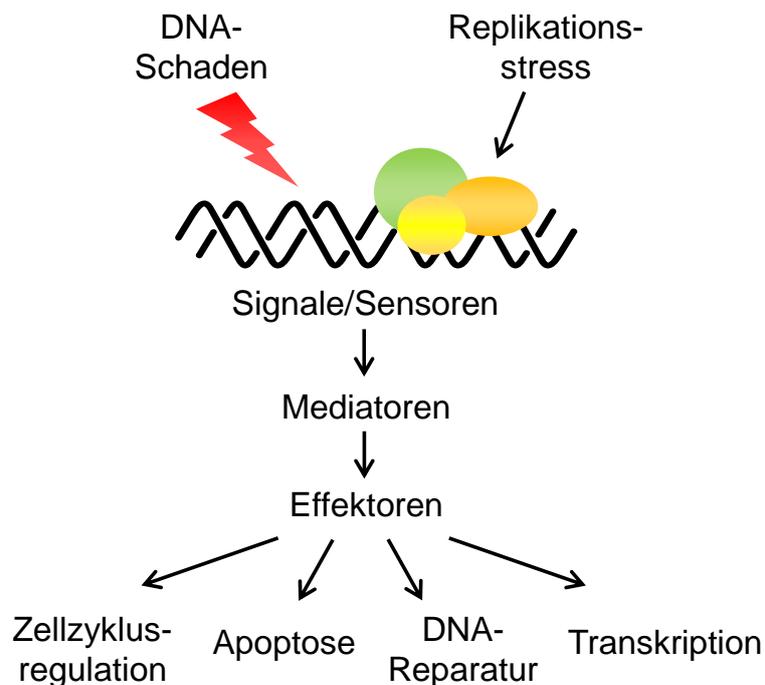


Abbildung 2 **Schematische Darstellung des DNA-Schadensantwortsystems.** Nach DNA-Schädigung wird durch Sensoren, Mediatoren und Effektoren ein komplexes Netzwerk aktiviert, um den Schaden zu beheben (modifiziert nach Zhou und Elledge 2000).

2.1.3 Redox-Regulation von Signalwegen

Neueren Erkenntnissen zufolge unterliegt die Steuerung zellulärer Signaltransduktionsprozesse zu einem wesentlichen Teil einer Redox-Regulation. Dabei haben reaktive Sauerstoffspezies (ROS), denen bisher, verbunden mit der Entstehung von oxidativem Stress und der Schädigung von Zellbestandteilen, hauptsächlich negative Effekte zugeordnet wurden, wichtige Funktionen als sogenannte *second messenger* inne. Insbesondere Peroxide wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) spielen eine wichtige Rolle, da aufgrund einer relativ langen biologischen Halbwertszeit selektive Redoxreaktionen möglich sind. Reaktionen von anderen ROS wie z.B. Hydroxylradikalen ($\text{OH}\cdot$) sind durch eine ausgesprochen hohe Reaktivität meist diffusionslimitiert. Die Signalweiterleitung wird durch Oxidation von redoxsensitiven Cysteinresten vermittelt, wodurch es zur Ausbildung von Disulfiden, zu Konformationsänderungen und einer veränderten Aktivität des Zielproteins kommt. Um eine spezifische Signalweiterleitung zu ermöglichen, muss der Cystein-Redox-Sensor eine gesteigerte Reaktivität gegenüber ROS wie H_2O_2 aufweisen. Dies gelingt durch Modulation des pK_a -Wertes der Thiolgruppe, so dass der Cysteinrest in redoxsensitiven Strukturen unter physiologischen Bedingungen überwiegend deprotoniert vorliegt (Giles 2006). Das kann durch angrenzende Aminosäuren oder durch Zinkkoordination innerhalb von Zinkfingerstrukturen erreicht werden (Ilbert et al. 2006). Eine weitere Spezifität ist die Voraussetzung eines stabilen Zwischenproduktes, das reversibel oxidier- und reduzierbar sein muss. Die proteinogene Aminosäure Selenocystein stellt aufgrund eines niedrigen pK_a -Wertes ebenfalls ein redoxsensitives Ziel für ROS dar (Brigelius-Flohe und Flohe 2011).

Die redoxregulierte Steuerung über reversible Oxidations-Reduktions-Reaktionen konnte bereits für viele zelluläre Signalwege nachgewiesen werden, welche Zellproliferation, Zellüberleben, Differenzierung, Metabolismus, Eisenhomöostase, DNA-Schadensantwort sowie antioxidative und antiinflammatorische Reaktionen beeinflussen (Ray et al. 2012). Die Kontrolle kann über eine veränderte Aktivität eines Kinase-Phosphatase-Paares verlaufen. Dabei können Tyrosin-Phosphatasen durch Oxidation inaktiviert werden, wodurch der häufig über Phosphorylierung gesteuerte Aktivitätszustand von Signalmolekülen verändert wird. Zudem kann die Aktivität von regulierenden Proteinen wie Keap1, Thioredoxin oder Glutathion(GSH)-Peroxidase durch Oxidation verändert werden (Brigelius-Flohe und Flohe 2011). Zinkfingerstrukturen kommen in vielen Transkriptionsfaktoren wie p53, Transkriptionsfaktor IIIA (TFIIIA), NF- κ B und Proteinen des DNA-Reparatursystems wie der PARP1 und XPA vor (Hartwig 2001), wodurch auch für diese eine Redox-Regulation naheliegt. Zusätzlich sind viele weitere Transkriptionsfaktoren wie ASK1, PIK3, Nrf2, AP-1, p53 und HIF-1 α als redoxsensitiv beschrieben, wobei ein genereller Mechanismus deren Aktivierung über den Redoxfaktor Ref-1 steuert. Dieses multifunktionelle Protein, das als AP Endonuklease 1 (Ape1) zusätzlich an der DNA-Reparatur beteiligt ist, reduziert die

Transkriptionsfaktoren und verändert dadurch deren Aktivitätszustand. Ref-1 selbst muss im reduzierten Zustand vorliegen, was durch das Thioredoxin-System vermittelt wird, um kritische Cysteinreste der Transkriptionsfaktoren, die sich vor allem in der DNA-bindenden Domäne befinden, zu reduzieren. Dieser Mechanismus erklärt die einheitliche Beeinflussung so vieler wichtiger stressinduzierbarer Transkriptionsfaktoren. Damit kommt Ref-1 eine Schlüsselrolle bei der Redox-Regulation von Signalwegen zu, welche die genomische Stabilität maßgeblich erhalten (Luo et al. 2010).

Die beschriebene Redox-Regulation stellt ein potentielles Angriffsziel für Metallverbindungen dar, da Veränderungen des zellulären ROS-Levels, eine hohe Thiolaffinität, z.B. zu kritischen Cysteinresten, sowie Interaktionen mit zinkbindenden Strukturen als mechanistische Wirkungsweisen von Metallen bekannt sind (Hartwig 2013b). Allerdings liegen dazu bislang noch keine systematischen Untersuchungen zu potentiell toxischen oder kanzerogenen Metallverbindungen vor.

2.2 Cadmium

Cadmium ist ein nicht essentielles, toxisches Schwermetall der 2. Nebengruppe (12. Gruppe) des Periodensystems. In allen anorganischen wasser- und wasserunlöslichen Verbindungen wie Sulfaten, Chloriden, Sulfiden, Carbonaten und Oxiden sowie in proteingebundener biologischer Form kommt es ausschließlich in der Oxidationsstufe +2 vor. In der Natur existiert das Metall in geringen Mengen ubiquitär in zinkhaltigen Gesteinen und Erzen und fällt bei der Erzaufbereitung sowie der Zinkgewinnung als industriell verwertbares Nebenprodukt an. Die industrielle Anwendung ist jedoch aufgrund des bekannten toxischen Potentials stark rückläufig; es wird aber beispielsweise noch für Nickel/Cadmium-Akkumulatoren verwendet.

Durch natürliche und vor allem anthropogene Prozesse wie die Emission aus Industrie- und Verbrennungsanlagen und Einträge aus der Landwirtschaft (Phosphatdünger, Klärschlämme und kontaminiertes Bodenmaterial) gelangt Cadmium in die Umwelt, wobei vor allem Böden beim Transfer in die ökologische Nahrungsmittelkette eine Rolle spielen. Die inhalative Aufnahme des Schwermetalls aus industriellen Quellen über die Außenluft ist für die Allgemeinbevölkerung weniger relevant, obwohl je nach Verbindung bis zu 90 % über die Atemwege resorbiert werden können. Tabak hingegen enthält hohe Mengen an Cadmium, so dass dieser Expositionsweg bei Rauchern sehr stark zur Belastung beiträgt. Demzufolge haben Raucher im Mittel drei- bis vierfach höhere Cadmiumkonzentrationen im Blut als Nichtraucher. Bei dem nicht-rauchenden Teil der Bevölkerung erfolgt die hauptsächliche Aufnahme über Lebensmittel, wobei Trinkwasser als Quelle generell vernachlässigbar ist. Das Metall ist aufgrund seines ubiquitären Vorkommens im Boden zwangsläufig in allen pflanzlichen Lebensmitteln in unterschiedlichen Mengen enthalten und gelangt über

Futtermittel auch in tierische Lebensmittel (Crößmann und Ewers 2007). Cadmium wird hauptsächlich durch viel verzehrte Lebensmittel mit geringen bis durchschnittlichen Gehalten aufgenommen, wie z.B. Getreide, Gemüse und Obst, wohingegen höher cadmiumbelastete Lebensmittel wie Ölsaaten, Nüsse, Kakao, tierische Leber und Niere sowie Meeresfrüchte aufgrund des selteneren Verzehrs weniger zur Aufnahme beitragen (BfR 2009). Die enterale Resorptionsrate liegt bei ca. 5 %. Im Körper wird Cadmium in der Leber gespeichert und reichert sich daneben vor allem in der Niere an. Diese Akkumulation mit relativ langer Halbwertszeit resultiert durch eine cadmiuminduzierte Neusynthese von Metallothionein (MT), dem Hauptbindungsprotein des Metalls in biologischen Systemen. Anhand der Nierentoxizität, dem empfindlichsten akuten Parameter der Cadmiumtoxizität, leitet die European Food Safety Authority (EFSA) eine tolerierbare wöchentliche Aufnahme (TWI, tolerable weekly intake) von 2,5 µg Cadmium/ kg Körpergewicht ab (EFSA 2009).

Cadmium und seine Verbindungen wurden von der International Agency for Research on Cancer (IARC) als Humankarzinogen eingestuft, da ausreichende Beweise für ein erhöhtes Risiko von Lungenkrebs bei beruflicher Exposition mit Cadmium existieren. Weitere epidemiologische Studien wiesen zudem auf eine Korrelation zwischen der Cadmiumexposition und einem erhöhten Krebsrisiko in Organen wie der Niere, Prostata, Blase, Gebärmutter und Brust hin. Auch in Tierstudien induzierten anorganische Cadmiumverbindungen Tumore in verschiedenen Organen (IARC Monographs 1993; IARC 2012).

Bezüglich der zugrunde liegenden Wirkmechanismen der Cadmiumkanzerogenität steht keine direkte Genotoxizität im Vordergrund; vielmehr sind indirekte Mechanismen wie eine Beeinträchtigung nahezu aller wichtigen DNA-Reparaturwege, die Induktion von oxidativem Stress, eine Deregulation der Zellzyklusregulation und Apoptose, Wechselwirkungen mit wichtigen Tumorsuppressorproteinen und Transkriptionsfaktoren sowie Veränderungen der Signaltransduktion und Genexpression relevant. So war zwar Cadmium in klassischen Testsystemen nicht mutagen, hingegen wurden in Kombination mit DNA-alkylierenden Agenzien und UVC-Strahlung ausgeprägte komutagene Effekte in Bakterien- und Säugerzellen beobachtet. Zudem induzierte Cadmium klastogene Effekte wie Chromosomenaberrationen und Mikronuclei in Säugerzellen, die aufgrund einer Verhinderung durch antioxidative Verbindungen auf erhöhte ROS-Mengen zurückgeführt wurden (zusammengefasst in Beyersmann und Hechtenberg 1997; Waisberg et al. 2003; Hartwig 2010; Hartwig 2013a).

2.3 Kupfer und partikuläre Kupferoxidverbindungen

Kupfer ist ein hellrotes dehnbares Metall der 1. Nebengruppe (11. Gruppe) des Periodensystems. In der Natur kommt es manchmal gediegen in basaltischen Laven,

häufiger jedoch in Form von Erzen als Kupferkies (CuFeS_2) und Kupferglanz (CuS_2) vor. Es kann in den Oxidationsstufen +1 bis +4 auftreten, wobei +1 und +2 die mit Abstand häufigsten sind und Cu^{2+} zudem die stabilste Form darstellt.

Aufgrund einer hohen thermischen und elektrischen Leitfähigkeit wird Kupfer ubiquitär als Gebrauchsmetall zur Herstellung technischer und elektrischer Produkte verwendet. Ferner ist es Bestandteil von Legierungen wie Messing (mit Zink) und Bronze (mit Zinn), die ebenfalls vielseitig verwendet werden, weil sie korrosionsbeständig und gut zu verarbeiten sind (Riedel 2013).

Ernährungsphysiologisch betrachtet handelt es sich bei Kupfer nach Zink und Eisen um das dritthäufigste Spurenelement (Linder 2012). Dabei ist es als katalytischer Kofaktor in mehr als 30 Metalloenzymen wie z.B. Ceruloplasmin, Superoxiddismutase (SOD), Cytochrom-C-Oxidase (COX) oder Dopamin- β -Hydroxylase enthalten und spielt dadurch eine Schlüsselrolle bei wichtigen zellulären Funktionen (Shim und Harris 2003). Kupfer wird dem Körper größtenteils alimentär zugeführt. Neben der Aufnahme über kupferreiche Lebensmittel wie Getreide, Fleisch, bestimmte Obst- und Gemüsesorten und Nüsse stellt die Zufuhr über das Trinkwasser eine weitere wichtige Quelle dar (Biesalski 2002). Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung empfiehlt als Tagesbedarf von Erwachsenen und Jugendlichen 1-1,5 mg Kupfer, für Kinder und Säuglinge lediglich 0,5-1 mg Kupfer (DGE 2016).

Die Eigenschaften, die Kupfer als Gebrauchsmetall sehr wertvoll machen, begründen auch dessen vermehrten Einsatz im nano- und mikroskaligen Größenbereich. Der Oberbegriff Nanomaterialien umfasst alle Materialien, die in einer Dimension kleiner als 100 nm sind ($1 \text{ D} < 100 \text{ nm}$), wobei Nanopartikel diese Charakteristik in allen drei Dimensionen aufweisen müssen ($3 \text{ D} < 100 \text{ nm}$) (DIN27687 2010). Aufgrund veränderter physikochemischer Eigenschaften, unter anderem einer erhöhten Reaktivität durch ein größeres Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis, werden Kupferoxid-Nanopartikel (CuO NP) zunehmend in verschiedenen Bereichen der Industrie, Pharma- und Lebensmittelbranche eingesetzt. Die Exposition geschieht vorrangig über die Luft, jedoch fehlen bislang epidemiologische Daten explizit zu CuO NP . Der mittlere jährliche Kupfergehalt in der Luft aus natürlichen und anthropogenen Prozessen beträgt zwischen $5\text{-}200 \text{ ng/m}^3$, wobei die Konzentration in der Außenluft in räumlicher Nachbarschaft zu kupferverarbeitenden Standorten wie der Erzaufbereitung, Stahlproduktion und durch Verbrennung gesteigert sein kann. In luftgetragenen Partikeln kommt Kupfer elementar oder in Verbindungen mit Sauerstoff oder Schwefel vor. Kupferhaltiger Feinstaub scheint dabei aus Verbrennungsprozessen zu resultieren, wogegen größere Partikel mit windgetragenen Böden und Stäuben assoziiert werden (ATSDR 2004).

Zu den Anwendungen von CuO NP zählen Applikationen als Gassensoren, Katalysatoren, Hochtemperatur-Supraleiter, Additive in Plastik und Metallbeschichtungen sowie antimikrobielle Formulierungen (zusammengefasst in Chang et al. 2012). Kupferoxid-Mikropartikel (CuO MP) werden als Vorstufe in der Pigmentproduktion genutzt (Shah et al. 1977). Die veränderten physikochemischen Eigenschaften, wozu weitere Parameter wie Größe, Form, Oberflächenladung, Reinheit und Zusammensetzung zählen, können auch das toxikologische Potential der Partikel im Vergleich zu chemisch identischen Verbindungen anderer Größe verändern. Die mit dem Begriff „Nanotoxikologie“ bezeichnete Forschung ist daher darauf fokussiert, die physikochemischen Eigenschaften von Nanomaterialien in Korrelation mit deren potentiellen Toxizität und den dabei zugrunde liegenden Mechanismen zu bringen (Oberdörster et al. 2005).

2.3.1 Toxizität

Als essentielles Spurenelement unterliegt Kupfer im Normalfall einer streng regulierten Homöostase (siehe 2.3.2). Jedoch zeigt sich bei zellulärer Überladung oder genetischer Prädisposition eine potentiell toxische Wirkung. Da es sich um ein redoxaktives Metallion handelt, kann es in fentonartigen Reaktionen die Bildung von hochreaktiven Hydroxylradikalen und anderen ROS katalysieren, wodurch es zu einer oxidativen Schädigung an der DNA, an Proteinen und anderen Zellbestandteilen kommt (Jomova et al. 2012). Weitere Angriffsziele sind aufgrund einer hohen Thiolaffinität redoxsensitive Cysteine oder Zinkfingerstrukturen in Proteinen. Dementsprechend konnte eine Beeinträchtigung der DNA-Reparaturproteine hOGG1, PARP1 und XPA durch Kupferionen nachgewiesen werden (Asmuss et al. 2000; Schwerdtle et al. 2007; Hamann et al. 2009).

Für CuO NP berichteten mehrere Forschungsgruppen eine erhöhte zyto- und genotoxische Wirkung sowie eine starke proinflammatorische Reaktion in verschiedenen, meistens mit der Lunge assoziierten Zellkulturmodellen. Dabei wurden CuO NP zum einen in Relation zu anderen metallbasierten Nanopartikeln gesetzt (Karlsson et al. 2008; Fahmy und Cormier 2009; Chusuei et al. 2013) und zum anderen mit chemisch entsprechenden Pendants in identischer Massendosis verglichen (Midander et al. 2009; Karlsson et al. 2009; Cronholm et al. 2013; Semisch et al. 2014). Neben der chemischen Zusammensetzung können die bereits angeführten veränderten physikochemischen Charakteristika zu der erhöhten Toxizität beitragen, wogegen toxische Effekte löslicher Kupferverbindungen strikt auf das Metallion zurückzuführen sind. Diese Eigenschaften beeinflussen Interaktionen der Partikel mit extra- und intrazellulären Bestandteilen, wie z.B. die Bildung einer Protein-Korona, ferner die zelluläre Aufnahme und Bioverfügbarkeit, und können dadurch zu einer Beeinträchtigung zellulärer Prozesse führen. Die extra- und intrazelluläre Löslichkeit der Partikel stellt einen weiteren Faktor dar, wobei z.B. eine erhöhte intrazelluläre Löslichkeit von CuO NP im sauren

Milieu als toxisitätssteigernd beobachtet wurde (Studer et al. 2010). Vor allem aber erhöhte ROS-Level und die Induktion von oxidativem Stress werden als Hauptaspekte der CuO NP-vermittelten Toxizität diskutiert und konnten in Bezug auf Schädigungen von Organellen wie Mitochondrien und Lysosomen sowie der DNA als Ursache nachgewiesen werden (Midander et al. 2009; Ahamed et al. 2010; Wang et al. 2012; Cronholm et al. 2013). Die erhöhte ROS-Generation legt zudem eine redoxregulierte Beeinflussung der zellulären Signaltransduktion nahe; auch sind direkte Wechselwirkungen der Partikel mit Signalmolekülen denkbar (Marano et al. 2011). Systematische Untersuchungen zu einer Beeinflussung der Genexpression durch CuO NP und dem daraus resultierenden Beitrag zu deren toxischen Wirkung fehlen bislang jedoch weitgehend.

2.3.2 Kupferhomöostase

Mit der Nahrung zugeführte Kupfermengen werden im Körper durch eine stabile Homöostase über Absorption im Dünndarm, die biliäre Exkretion und die Leber als Hauptspeicherorgan streng reguliert. Die Resorption in die Mukosazellen im Dünndarm erfolgt vorrangig über den humanen Kupfertransporter hCTR1, aber auch der divalente Metalltransporter 1 (DMT-1) ist an der intestinalen Aufnahme beteiligt, und bei hohen Kupferkonzentrationen kann zudem eine passive Diffusion erfolgen. Aus den Mukosazellen wird Kupfer über die Menkes ATPase (ATP7A) oder Exozytose ins Portalblut abgegeben, an Transportproteine wie Albumin und Transcuprein gebunden und zur Leber transportiert (Biesalski 2002; Linder 2012).

Die zelluläre Kupferhomöostase in Hepatozyten ist schematisch in Abbildung 3 gezeigt. Die Absorption des proteingebundenen Kupfers aus dem Blut erfolgt über hCTR1, wobei eine Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} erfolgt. Bei hohen extrazellulären Kupfergehalten kann der Aufnahme durch einen Abbau von hCTR1 oder dessen intrazellulärer Speicherung in Vesikeln entgegengewirkt werden. Im Zytoplasma wird Kupfer zur Speicherung zunächst lose an GSH oder MT gebunden und anschließend von Chaperonen übernommen, die Kupfer in die jeweiligen Kompartimente zu den Zielenzymen transportieren. Das Chaperon CCS1 baut Kupfer in die SOD1 ein, Cox17 integriert es in die mitochondriale Cytochrom-C-Oxidase (COX) und durch ATOX1 wird es in die Wilson ATPase (ATP7B) eingebaut, die im Normalfall am Trans-Golgi-Netzwerk lokalisiert ist. Von dort wird Kupfer in Ceruloplasmin integriert und so mit dem Blut in die verschiedenen Gewebe verteilt oder in die Galle sezerniert. Bei hohen intrazellulären Spiegeln wird ATP7B in mit Kupfer gefüllte Vesikel verlagert und mit der apikalen Membran fusioniert, um Kupfer über die Galle zu exportieren (zusammengefasst in Lopez de Romana et al. 2011).

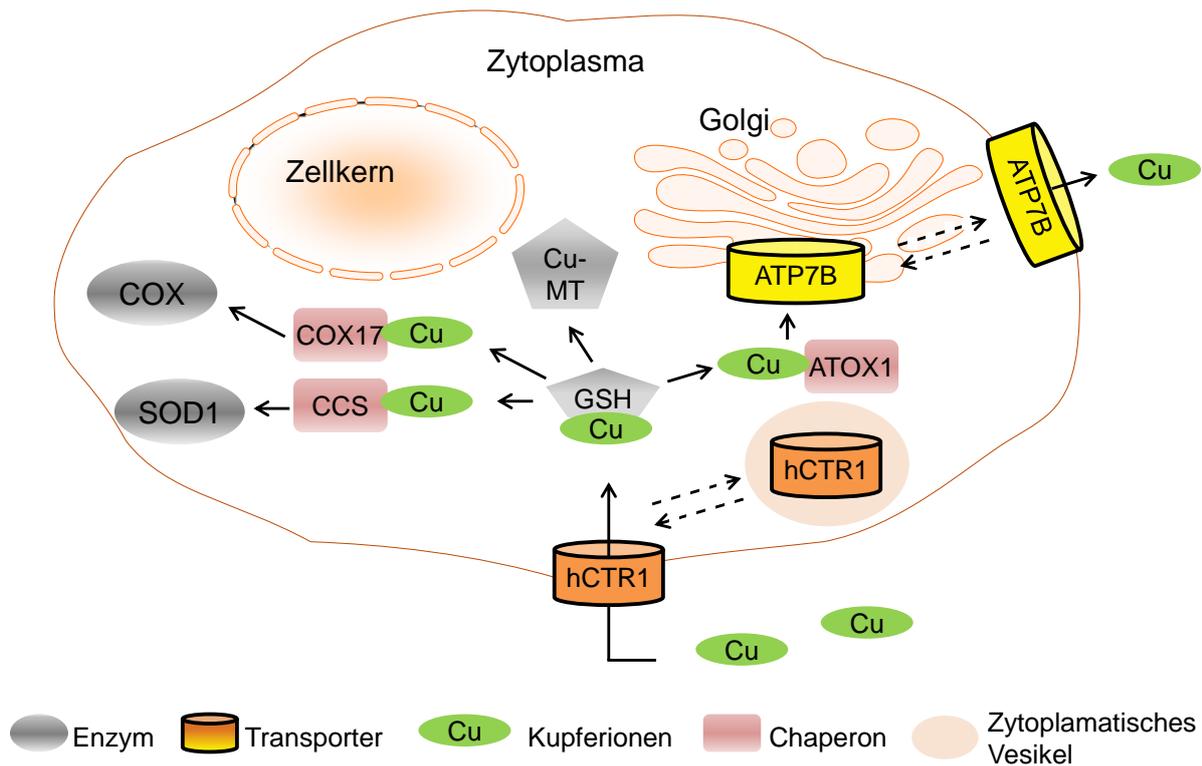


Abbildung 3 **Schematische Darstellung der zellulären Kupferhomöostase in einer Leberzelle.** Kupferionen werden über den Transporter hCTR1, der bei hohen extrazellulären Kupferkonzentrationen intrazellulär in Vesikeln gespeichert werden kann, in die Zellen aufgenommen. Im Zytoplasma wird Kupfer an GSH oder MT gebunden und so gespeichert. Über spezifische Chaperone wird Kupfer in verschiedene Kompartimente zu den kupferabhängigen Enzymen transportiert. CCS transportiert Kupfer zu SOD1, COX 17 zur COX und ATOX1 zu ATP7B. Bei hohen intrazellulären Konzentrationen wird ATP7B zur Zellmembran verlagert und vermittelt so den Export von Kupfer (modifiziert nach Lopez de Romana et al. 2011).

Die gesamte Kupferhomöostase wird auf systemischer und zellulärer Ebene sehr streng durch molekulare Mechanismen für Aufnahme, Speicherung, Verteilung und Export koordiniert, um Mangel oder Überschusssituationen zu vermeiden. Die Kapazität dieses Netzwerkes wird dadurch deutlich, dass eine abnormale Kupferversorgung meist auf Malabsorption, Fehlernährung oder genetische Dispositionen wie Morbus Menkes oder Morbus Wilson zurückzuführen ist. Bei Morbus Menkes handelt es sich um einem Defekt des Proteins ATP7A, der zu einer Kupferüberladung der Enterozyten und zu Kupfermangel in anderen Geweben führt, da Kupfer zwar resorbiert, aber nicht an die Portalvene abgegeben wird. Eine mutierte Form der ATP7B bei Morbus Wilson führt durch eine verminderte biliäre Kupferausscheidung zu einer dauerhaften Kupferakkumulation im Körper (Zietz 2012).

2.3.3 Endozytose

Die Endozytose beschreibt einen Prozess zur Aufnahme von Molekülen und Makromolekülen in die Zelle. Die Funktion ist dabei nicht auf die Nährstoffaufnahme limitiert, sondern spielt auch bei der Regulation von Oberflächenrezeptoren, der Zellmotilität und Mitose sowie bei der Kontrolle der Signalweiterleitung eine wichtige Rolle. Zudem werden

partikuläre Substanzen wie Nanopartikel (NP) über diesen aktiven Prozess aufgenommen (Canton und Battaglia 2012). Verglichen mit der regulierten Aufnahme von Ionen über Transporter läuft die Endozytose vermittelte Aufnahme von NP relativ schnell ab und es können in kurzer Zeit große Mengen an Partikeln aufgenommen werden. Deshalb ist die Untersuchung des Ausmaßes sowie des Mechanismus der endozytotischen Aufnahme, die von Parametern wie Größe, Form, Beschaffenheit und Oberflächentopologie der NP abhängt, für eine toxikologische Bewertung essentiell. Klassisch wird die Endozytose abhängig von der Größe der aufzunehmenden Ladung in zwei Kategorien eingeteilt: die Phagozytose, das „Zellessen“, und die Pinozytose, das „Zelltrinken“. Erstere stellt die Aufnahme größerer Partikel (5-10 μm) dar, wozu allerdings nur spezialisierte Zelltypen wie Makrophagen, Neutrophile, Monozyten und dendritische Zellen in der Lage sind. Es gibt jedoch Hinweise, dass einige weitere Zelltypen wie Fibroblasten, Epithelzellen und Endothelzellen in geringerem Ausmaß Phagozytose betreiben können. Zur Pinozytose, durch die kleinere Vesikel (0,05-5 μm) internalisiert werden, sind dagegen alle Zelltypen fähig. Dieser Prozess wird des Weiteren in einzelne Mechanismen unterteilt, wobei zur Klassifizierung oft die beteiligten Proteine und Lipide herangezogen werden. Als Beispiele gibt es die Dynamin-abhängigen Prozesse, Clathrin-abhängige und Caveolae-vermittelte Endozytose, sowie die Makropinozytose (Sahay et al. 2010). Ein schematischer Überblick der Mechanismen ist in Abbildung 4 gezeigt.

Unabhängig von detaillierten mechanistischen Aspekten läuft der Prozess in vier generellen Schritten ab: Zunächst findet ein spezifischer Bindungsvorgang an der Zelloberfläche statt (I), es kommt zu Kräuselungen und einer Neuordnung der Membran (II), die Partikel werden von der eingestülpten Zellmembran umschlossen (III) und das gebildete Vesikel transportiert die aufgenommene Ladung zu einem subzellulären Kompartiment (IV). Während dieses Transports „reift“ das Vesikel, zu Beginn als frühes Endosom bezeichnet, zu einem späten Endosom und wird letztlich zum Lysosom. Dabei kommt es zu einer pH-Absenkung von 6,2 auf 4,5-5 (Canton und Battaglia 2012). Bei metallbasierten NP kann diese Ansäuerung der Lysosomen deren Löslichkeit beeinflussen und zu einer gesteigerten Freisetzung reaktiver Ionen führen (Limbach et al. 2007). Dieser in der Literatur als *trojan horse type* beschriebene Effekt muss auch für CuO NP in Betracht gezogen werden, da sie im Sauren deutlich stärker löslich sind als im Neutralen (Studer et al. 2010; Semisch et al. 2014) und eine endozytotische Aufnahme bereits nachgewiesen werden konnte (Wang et al. 2012). Tritt eine Degradation der lysosomalen Membran auf, können zusätzlich zu freigesetzten Kupferionen noch intakte NP aus den Lysosomen ins Zytoplasma gelangen.

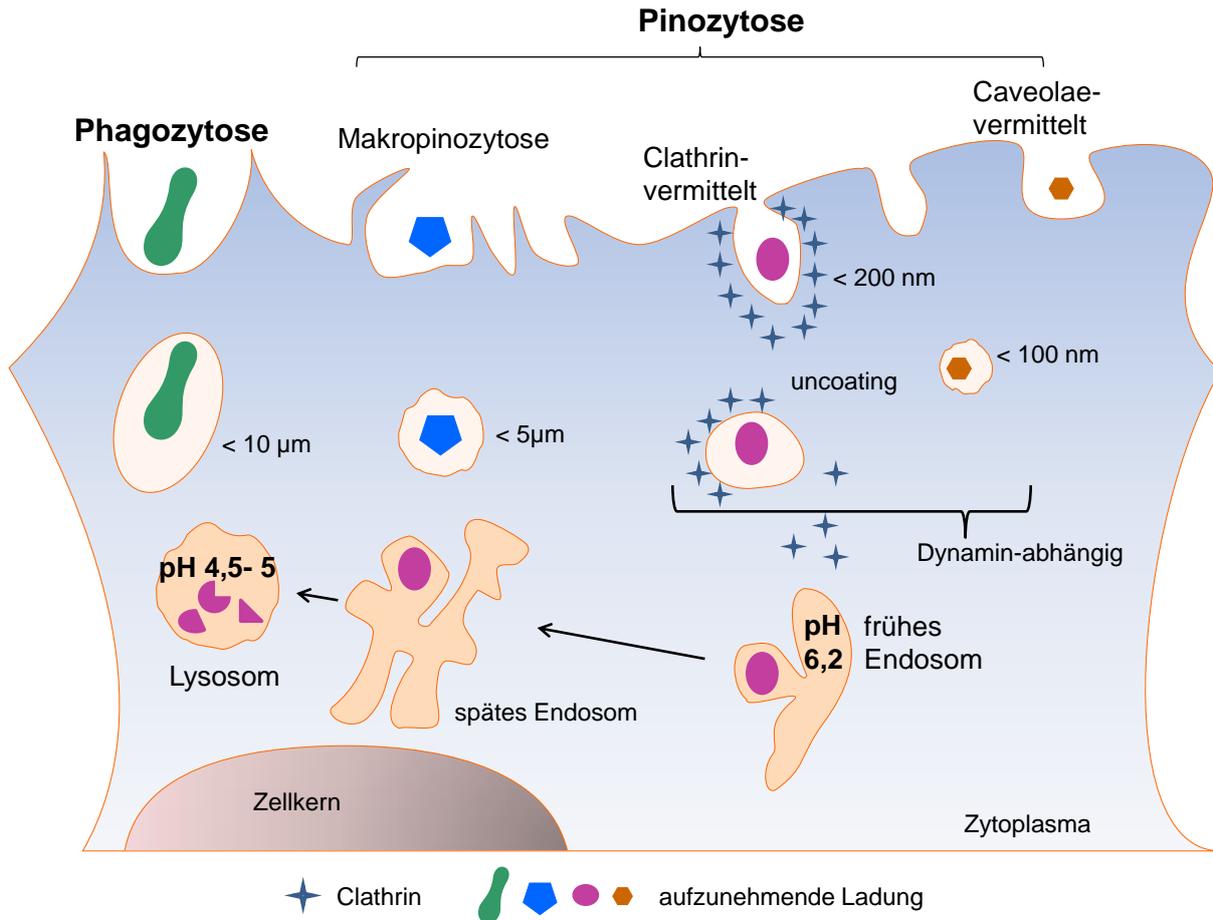


Abbildung 4 **Schematische Darstellung unterschiedlicher Endozytosemechanismen sowie der intrazellulären Prozessierung der hervorgehenden Vesikel.** Die zu transportierende Ladung wird je nach Größe und Zusammensetzung über verschiedene endozytotische Prozesse wie Phagozytose, Makropinozytose oder die Dynamin-abhängige Clathrin- oder Caveolae-abhängige Endozytose in das Zytoplasma internalisiert. Die beladenen Vesikel reifen vom frühen über das späte Endosom bis hin zum Lysosom, wobei der pH-Wert von 6,2 auf 4,5-5 abgesenkt wird (modifiziert nach Canton und Battaglia 2012).

3. FRAGESTELLUNG

Eine adverse Wirkung zahlreicher Metallverbindungen auf den Menschen ist hinreichend bekannt. Dies gilt nicht nur für kanzerogene Metalle wie Cadmium, sondern ebenfalls für essentielle Spurenelemente wie Kupfer im Falle einer Überladung und der damit verbundenen Störung der Homöostase, was z.B. durch nanoskalige Verbindungen ausgelöst werden kann. Die zugrunde liegenden Wirkmechanismen von Metallverbindungen sowie anderer potentiell toxischer Substanzen sind oft sehr komplex und nicht auf einen einzelnen Mechanismus zurückzuführen. Da ausführliche Langzeitstudien oder detaillierte mechanistische Untersuchungen aufwendig und als Ausgangspunkt einer toxikologischen Risikobewertung ungeeignet sind, steigt diesbezüglich die Nachfrage nach prädiktiven Hochdurchsatz-Testsystemen. Ein vielversprechender Ansatz besteht in der Bewertung von Genexpressionsprofilen, da substanzinduzierte Veränderungen der Genexpression einen spezifischen und sensitiven Indikator für deren toxisches Potential darstellen.

Deshalb liegt der erste Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf der Etablierung einer *High-Throughput RT-qPCR* Methode, mit der in einer Analyse Veränderungen in der Transkription von 95 Genen in 96 Proben parallel untersucht werden können. Durch die gezielte Auswahl von Genen, die bei der Erhaltung der genomischen Stabilität eine wichtige Rolle spielen, soll diese Technik ein quantitatives Verfahren darstellen, um die Wirkmechanismen von potentiell toxischen Substanzen aufzuklären. Dazu wird ein schon bestehendes Gen-Set bezüglich der gewünschten Fragestellung optimiert und verändert. Dies erfordert das Design neuer Primer-Paare und die Validierung der Methode, die eine Überprüfung der Primer-Paare hinsichtlich ihrer Spezifität und Effizienz und eine Ermittlung von geeigneten Reaktionsbedingungen für alle 95 Primer-Paare beinhaltet.

Um die Eignung und Aussagekraft der etablierten *High-Throughput RT-qPCR* Methode im Hinblick auf eine Identifizierung von Wechselwirkungen mit kritischen Signalwegen aufzuklären, sollen systematische konzentrations- und zeitabhängige Genexpressionsmuster von CdCl_2 in der humanen Alveolarkarzinomzelllinie A549 und der humanen Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B erstellt werden. Diese Zelllinien des Atmungstraktes werden als Modellsysteme ausgewählt, da die Lunge bei beruflicher Exposition den Hauptexpositionsort darstellt und auch die Allgemeinbevölkerung, dabei vor allem Raucher, über die Luft mit Cadmium exponiert sind. Das kanzerogene Metall wird als Modellsubstanz herangezogen, da sein Wirkmechanismus ausführlich untersucht und weitgehend geklärt erscheint.

Des Weiteren stellen die Genexpressionsanalysen den Ausgangspunkt einer toxikologischen Untersuchung von CuO NP im Vergleich zu den Referenzsubstanzen CuO MP und

wasserlöslichem CuCl_2 in identischer Massendosis dar. CuO NP werden einhergehend mit einem generell steigenden Einsatz von Nanotechnologie in verschiedenen Applikationen verwendet, wodurch die Exposition der Bevölkerung zunimmt. In der Literatur wird CuO NP bereits ein erhöhtes toxikologisches Potential zugesprochen; dieses kann bisher jedoch nicht ausschließlich durch die veränderten physikochemischen Charakteristika oder die intrazelluläre Bioverfügbarkeit erklärt werden. Die systematische Untersuchung der Genexpression bezüglich einer Beeinflussung der genomischen Stabilität soll deshalb zur Aufklärung der Wirkmechanismen beitragen, da eine Modulation der zellulären Signaltransduktion zum einem direkt über Interaktionen der Partikel mit Signalmolekülen und zum anderen indirekt über ROS als *second messenger* naheliegt.

Für die Genexpressionsuntersuchungen, die aufgrund einer hauptsächlich inhalativ auftretenden Exposition von partikulärem Kupfer ebenfalls in A549- und BEAS-2B-Zellen stattfinden sollen, werden CuO NP, CuO MP und CuCl_2 konzentrationsabhängig eingesetzt. Weiterführende Experimente auf funktioneller Ebene werden nur noch in BEAS-2B-Zellen durchgeführt. Dabei sollen Parameter der oxidativen Stressantwort, wozu der zelluläre GSH-Level sowie der Aktivitätszustand des Transkriptionsfaktors Nrf2 zählen, und der DNA-Schadensantwort in Form von Zellzyklusuntersuchungen und Zelltodmechanismen untersucht werden. Zudem soll die Relevanz des intrazellulären Kupfereintrages in der gesamten Zelle sowie separat in Zytoplasma und Zellkern bezüglich der Toxizitätsunterschiede von CuO NP, CuO MP und CuCl_2 ermittelt werden. Der Einsatz von Endozytoseinhibitoren sowie Bafilomycin A1, einer Substanz, die die Ansäuerung von Lysosomen vermindert, dient der Aufklärung des Einflusses einer vermuteten endozytotischen Aufnahme sowie der intrazellulären Prozessierung. Die dazu durchgeführten Aufnahme-, Zytotoxizitäts- sowie Genexpressionsuntersuchungen sollen zudem eine Differenzierung zwischen extra- und intrazellulär vermittelten Effekten sowie zwischen ROS-induzierten und direkten partikelvermittelten Beeinflussungen ermöglichen.

4. MATERIAL UND METHODEN

Die für diese Arbeit verwendeten Lösungen, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte sind tabellarisch im Anhang aufgelistet.

4.1 Zellkultur

4.1.1 Zelllinien und Kultivierung

Die Arbeit mit Zellkulturen erfolgte unter einer Sicherheitswerkbank der Stufe 2 mit vertikalem Luftstrom, die auch als *Laminar Air Flow Box* bezeichnet wird. Alle verwendeten Verbrauchsmaterialien und Chemikalien waren ebenfalls steril. Die Kultivierung der verwendeten Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 100 % und einer CO₂-Konzentration von 5 %. Als Zellmodelle wurden verschiedene adhärente Zelllinien eingesetzt. Die humane Adenokarzinoma-Alveolarepithelzelllinie A549 und die humane Zervix-Adenokarzinomazelllinie HeLa S3 wurden bei *American Type Culture Collection* (ATCC) käuflich erworben (ATCC-Nummern: CCL-185 und CCL-2.2). Dr. Carsten Weiss (KIT, Karlsruhe, Deutschland) stellte freundlicherweise die humane Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B (ATCC CCL-9609) zur Verfügung, die durch Transformation mit 12-SV40-Adenovirus immortalisiert ist. A549-Zellen sowie HeLa S3-Zellen wuchsen als Monolayer in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), das zusätzlich 10 % fetales Kälberserum (FKS), 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin enthielt. BEAS-2B-Zellen wurden als Monolayer in zuvor gecoateten Zellkulturschalen (10 µg/mL humanes Fibronectin, 30 µg/mL Collagen und 10 µg/mL Rinderserumalbumin (BSA) in PBS) in LHC-9 (*Laboratory of Human Carcinogenesis Medium 9*) unter Zusatz von 2,5 µg/mL Amphotericin B kultiviert und für Versuche ausgestreut. Alle Zelllinien wurden für die längerfristige Lagerung in Einfriermedium, bestehend aus 90 % FKS und 10 % DMSO, in flüssigem Stickstoff bei einer Temperatur von -196°C aufbewahrt. Um eine gleichbleibende Stabilität der Zellen für die Versuche zu gewährleisten, wurden A549-Zellen der Passage 11-30, HeLa S3-Zellen der Passage 35-47 und BEAS-2B-Zellen nur in den Passagen 44-60 verwendet. Während der Kultivierung wurden A549- und HeLa S3-Zellen alle 2-3 Tage passagiert. Dabei wurden alle benötigten Lösungen auf 37°C temperiert und der Zustand der Zellen lichtmikroskopisch kontrolliert. Zur Ablösung wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, anschließend mit 0,25 %iger Trypsinlösung behandelt und für 2-3 Minuten im Brutschrank belassen. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium aufgenommen, resuspendiert und vereinzelt. Mithilfe des elektronischen Zellzählgerätes Casy® TTC ließ sich aus dieser Zellsuspension die Zellzahl bestimmen. Ein definierter Anteil wurde im Folgenden in eine neue Zellkulturschale überführt. BEAS-2B-Zellen wurden alle 7 Tage subkultiviert, wobei

nach 4 Tagen ein Mediumwechsel erfolgte. Die Ablösung fand analog zu der für A549- und HeLa S3-Zellen beschriebenen Vorgehensweise statt, jedoch wurde die Trypsinlösung für 4 Minuten bei 37°C auf den Zellen belassen. Danach erfolgte die Aufnahme der Zellen in LHC-9 Medium, dem 0,4 % SBTI-Lösung (Soybean Trypsin Inhibitor) zugesetzt war, um die Trypsinwirkung zu stoppen. Damit das SBTI-haltige Medium abgetrennt werden konnte, folgte ein Zentrifugationsschritt bei 22°C und 250 g für 3 Minuten. Nach dem Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in frischem LHC-9 Medium aufgenommen und vereinzelt. Dann wurde nach der Zellzahlbestimmung mittels Casy® TTC eine definierte Zellzahl in gecoatete Zellkulturgefäße weitergesetzt. Die für die Quantifizierung im Zellzählgerät genutzten Größenbereiche betragen für A549- und HeLa S3-Zellen 12,6-40 µm und für BEAS-2B-Zellen 9,8-30 µm.

4.1.2 Inkubationen

4.1.2.1 Inkubation mit CdCl₂

Für die Inkubation mit CdCl₂ wurde zunächst eine 100 mM Stammlösung mit bidestilliertem (bidest.) Wasser angesetzt und sterilfiltriert. Daraus erfolgte im Anschluss die Herstellung einer 10 mM Arbeitslösung, aus der die entsprechenden Volumina für die jeweiligen Inkubationskonzentrationen (1-50 µM) direkt in das Kulturmedium pipettiert wurden. Die Stamm- und Arbeitslösung wurden bei 4°C aufbewahrt.

4.1.2.2 Inkubation mit CuO NP, CuO MP und CuCl₂

Die Inkubationen mit den partikulären Kupferverbindungen erfolgten für jedes Experiment mit frisch hergestellten Suspensionen. Die Partikel wurden dafür in Massen von 10-100 mg in 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße eingewogen. Um eine benötigte Stammlösung in der Konzentration 1 mg/mL zu erhalten, wurden die eingewogenen Partikel zweimal mit 500 µL Inkubationsmedium quantitativ in ein steriles Schnappdeckelglas überführt, das mit einem sterilen Magnetührstab versehen war und eine definierte Menge an vorgelegtem Medium enthielt. Die Lösung wurde bei 900 U/min auf einem Mehrstellenmagnetrührer gerührt. Anschließend erfolgte die Herstellung der jeweiligen Inkubationskonzentrationen (1-50 µg/mL), indem definierte Mengen der Stammlösung in den entsprechenden Mengen Medium in Schnappdeckelgläsern verdünnt und ebenfalls bei 900 U/min gerührt wurden. Für die Inkubation mit CuCl₂ wurde eine 100 mM Stammlösung mit bidest. Wasser hergestellt und sterilfiltriert. Daraus konnten die jeweiligen Inkubationslösungen (12,6-630 µM) in Zellkulturmedium in sterilen Plastikröhrchen hergestellt werden, die bezogen auf die enthaltene Kupfermenge den eingesetzten Konzentrationen der Partikel-Inkubationslösungen entsprachen. Alle Inkubationen mit den Kupferverbindungen erfolgten unabhängig vom jeweiligen Kulturmedium der Zellen in frischem Inkubationsmedium DMEM/10 % FKS, um vergleichbare Inkubationsbedingungen zu gewährleisten. Für die

Zellkulturexperimente wurden identische Zelldichten von 16600 Zellen pro cm² Wachstumsfläche ausgestreut. Zur besseren Übersicht der Dosisangaben sind die eingesetzten Konzentrationen in Tabelle 1 in Masse pro Inkubationsvolumen (µg/mL), Masse pro Wachstumsfläche (µg/cm²) und molarer Konzentration (µmol/L) angegeben.

Tabelle 1 **Übersicht der Dosisangaben in verschiedenen Umrechnungsarten.**

| CuO [µg/mL] | CuO [µg/cm ²] | Cu ²⁺ [µmol/L] |
|-------------|---------------------------|---------------------------|
| 1 | 0,2 | 12,6 |
| 5 | 1 | 63 |
| 10 | 2 | 126 |
| 20 | 4 | 252 |
| 50 | 10 | 630 |

Eine ausführliche Partikelcharakterisierung für CuO NP und CuO MP erfolgte in unserer Arbeitsgruppe bereits in einer vorangegangenen Arbeit (Semisch et al. 2014). Die Ergebnisse sind in 5.3 zusammengefasst.

4.1.2.3 Inkubation mit Endozytoseinhibitoren oder Bafilomycin A1 (BafA1)

Die Endozytoseinhibitoren oder BafA1 wurden in DMSO gelöst, sodass Stammlösungen von 50 mM Eipa und MDC, 20 mM OH-Dyn, 10 mg/mL CytB und 50 µM BafA1 resultierten. Um eine sofortige Wirkung der Endozytoseinhibitoren bei der Koinkubation mit CuO NP, CuO MP und CuCl₂ zu gewährleisten, wurden die Zellen unterschiedlich lange, orientiert an Vorgaben der Literatur (Gekle et al. 1999; Lunov et al. 2010; McCluskey et al. 2013) mit den Substanzen vorinkubiert (CytB: 90 min, Eipa: 30 min, OH-Dyn: 60 min und MDC: 10 min). Für die gewünschten Inkubationskonzentrationen (CytB: 10 µg/mL, Eipa: 25 µM (BEAS-2B) oder 50 µM (HeLa S3), MDC: 100 µM und OH-Dyn: 100 µM) wurden dafür entsprechende Volumina der Stammlösungen direkt in das Kulturmedium gegeben. Bei der anschließenden Koinkubation, die nach Entfernung des Kulturmediums in frischem Inkubationsmedium erfolgte, wurden die Endozytoseinhibitoren erneut in entsprechenden Volumina zugegeben. BafA1 wurde ohne Vorinkubation in einer Inkubationskonzentration von 100 nM koinkubiert. In vergleichenden Analysen wurde auch den Inkubationen mit CuO NP, CuO MP und CuCl₂ ohne Endozytoseinhibitoren und BafA1 die entsprechende Konzentration DMSO (0,1-0,5 %) zugesetzt, um einen eventuellen Lösungsmiteleinfluss auszuschließen. Zur besseren Übersicht sind in Tabelle 2 die Stamm- und Inkubationskonzentrationen sowie ein eventueller Vorinkubationszeitraum der verwendeten Substanzen dargestellt.

Tabelle 2 **Verwendete Konzentrationen und eventuelle Vorinkubationszeiten der Endozytoseinhibitoren und BafA1.**

| Substanz | Stammkonzentration | Inkubationskonzentration | Vorinkubationszeit |
|----------|--------------------|--------------------------|--------------------|
| BafA1 | 50 μ M | 100 nM | 0 min |
| CytB | 10 mg/mL | 10 μ g/mL | 90 min |
| Eipa | 50 mM | 25 bzw. 50 μ M | 30 min |
| OH-Dyn | 20 mM | 100 μ M | 60 min |
| MDC | 50 mM | 100 μ M | 10 min |

4.1.3 Zytotoxizitätsuntersuchungen

Die Zytotoxizität von CdCl₂ und der Kupferverbindungen in An- und Abwesenheit der Endozytoseinhibitoren oder BafA1 wurde in BEAS-2B-Zellen anhand der Zellzahl untersucht. Dazu wurden je 3,5*10⁵ Zellen in 60 mm Zellkulturschalen ausgestreut und nach einer 48-stündigen Kultivierungsphase mit den jeweiligen Verbindungen für 8 oder 24 Stunden inkubiert. Nach der Behandlung wurden die Zellen trypsiniert und in neuem Medium aufgenommen, worauf eine Zellzahlbestimmung mit dem Casy® TTC Zellzählgerät erfolgte.

4.2 Genexpressionsanalysen mittels *High-Throughput RT-qPCR*

Versuchsansatz

Für die Analysen wurden je 3,5*10⁵ Zellen in 60 mm Zellkulturschalen ausgestreut. A549-Zellen wurden 24 Stunden, BEAS-2B-Zellen 48 Stunden kultiviert. Die Inkubation mit CdCl₂ oder CuO NP, CuO MP und CuCl₂ allein oder in An- und Abwesenheit der Endozytoseinhibitoren oder BafA1 erfolgte für 8 oder 24 Stunden. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen trypsiniert, in kaltem PBS/10 % FKS aufgenommen, durch Zentrifugation pelletiert (1300 rpm, 3 min, 4°C), einmal mit PBS gewaschen, erneut bei den gleichen Bedingungen zentrifugiert und anschließend bei -20°C gelagert.

RNA-Isolation und Quantifizierung

Die RNA-Isolation sowie alle folgenden Prozessschritte erforderten sterile Arbeitsbedingungen, weshalb alle Arbeitsflächen mit Ethanol und speziellen Reinigungslösungen (DNA Away, RNase Away) behandelt wurden. Die Isolation der RNA erfolgte mittels NucleoSpin® RNA Plus Kit nach Herstellervorgaben. Das Pellet wurde in 350 μ L Lysepuffer (LBP) resuspendiert, gevortext und anschließend auf eine gDNA Removal Säule zur Entfernung der genomischen DNA (gDNA) überführt. Nach Zentrifugation (30 s, 11000 g, 4°C) befand sich die RNA im Eluat, wohingegen die gDNA auf der Säule verblieb. Zum Eluat wurden 100 μ L Binding Solution (BS) gegeben und moderat gemischt. Dieses Lysat wurde vollständig auf eine weitere Säule gegeben und erneut zentrifugiert (20 s,

11000 g, 4°C), wodurch die Bindung der RNA an die Säule erfolgte und störende Bestandteile abgetrennt wurden. Es folgten zwei Waschschrirte: Zuerst wurden 200 µL Waschpuffer 1 (WB1) zugegeben, es folgte ein Zentrifugationsschritt (20 s, 11000 g, 4°C) und danach wurde die Säule in ein neues Auffanggefäß gegeben. Dann wurden 600 µL Waschpuffer 2 (WB2) hinzugegeben, erneut wie beschrieben zentrifugiert, nochmals 250 µL WB2 zugefügt und wiederum zentrifugiert. Für die RNA-Elution wurde die Säule in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben und 30 µL DNase-freies Wasser zugesetzt. Durch Zentrifugation für 30 s bei 11000 g und 4°C wurde die RNA in das Eluat überführt. Um die RNA-Ausbeute zu steigern und gleichzeitig eine hohe Konzentration zu erzielen, wurde das RNA-haltige Wasser erneut auf die Säule gegeben und wieder zentrifugiert. Die RNA-Eluate wurden maximal 2 Wochen bei -80°C gelagert. Die Bestimmung des RNA-Gehalts erfolgte photometrisch bei 260 nm mittels NanoDrop Photometer. Eine optimale Reinheit gewährleistete dabei die Ermittlung des Absorptionsquotienten von 260/280 nm, der Werte über 2,0 aufweisen musste.

RNA-Integrität

Die RNA-Integrität von A549- und BEAS-2B-Zellen wurde stichprobenartig untersucht. Dazu erfolgte zum einen eine denaturierende Agarose-Gelelektrophorese mit jeweils 2 µg RNA, bei der ribosomale RNA Spezies (rRNA), welche die größte Fraktion darstellen, als scharfe Banden detektierbar werden. In intakter RNA weist die 28S rRNA Bande ungefähr die doppelte Stärke im Vergleich zur 18S rRNA Bande auf. Dazu wurde ein 1,2 %iges Agarose-Gel (1,2 g Agarose, 5 mL 20x MOPS-Puffer und 83 mL bidest. Wasser) durch Aufkochen gegossen und bei ca. 65°C während des Abkühlens 12 mL Formaldehyd zugegeben. 2 µg RNA wurden mit Formamid-Denaturierungspuffer auf ein Volumen von 15 µL ergänzt und 10 min bei 65°C denaturiert. Abschließend wurden die Proben mit 5 µL 4x Lämmli-Ladepuffer versetzt. Die Elektrophorese fand für 2 h bei 60 V in MOPS-Puffer statt, und die Detektion erfolgte mittels Fluoreszenzmessung am LAS 3000.

Zusätzlich wurde die RNA-Integrität mittels RNA-6000-Nano-LabChip-Kit am Agilent-2100-Bioanalyser überprüft. Dazu wurden RNA-Proben mit Gehalten bis zu 500 ng/µL in die Chip-Kavitäten pipettiert und über Mikrokapillaren elektrophoretisch aufgetrennt. Mithilfe dieser automatisierten Kapillarelektrophorese werden die einzelnen Fraktionen der rRNA der Größe nach aufgetrennt und sowohl in einem Elektropherogramm wie auch als virtuelles Gelbild dargestellt. Dadurch wird eine *RNA Integrity Number* (RIN) generiert, die eine Beurteilung der Integrität ermöglicht. Ein Wert von 1 zeigt einen vollständigen Abbau an, wohingegen 10 eine vollständige Intaktheit garantiert (Becker et al. 2009). Diese Messungen führte in Kooperation Herr Olivier Armant am Institut für Toxikologie und Genetik (ITG) durch.

Beide Analysen, die in Abbildung 32 in Anhang 8.6.1 gezeigt sind, wiesen eine hohe RNA-Integrität nach.

Reverse Transkription

Die Umschreibung der RNA in cDNA (komplementäre DNA) erfolgte in Duplikaten mittels qScript™ cDNA Synthesis Kit nach Herstellervorgaben. Dazu wurde pro Reaktionsansatz 1 µg RNA mit 1 µL iScript Reverse Transkriptase und 4 µL 5x Reaction Mix in Kavitäten von PCR-Stripes versetzt und mit nukleasefreiem Wasser auf ein Endvolumen von 20 µL ergänzt. Nach Durchmischung und Zentrifugation erfolgte die Umschreibung im Thermocycler nach folgendem Temperaturprogramm: 5 min bei 25°C, 30 min bei 42°C, 5 min bei 85°C und einer Endtemperatur von 4°C. Die cDNA-Proben wurden maximal 2 Wochen bei -20°C gelagert.

Präamplifikation (Specific Target Amplification (STA))

Um eine ausreichende *template*-Menge der jeweiligen Zielgene gewährleisten zu können, wurde eine Präamplifikation (STA) durchgeführt. Diese Probenvorbereitung sowie die folgenden Schritte bis zur *High-Throughput qPCR* erfolgten nach Herstellervorgaben. Für die STA wurden alle 95 Primer-Paare (100 µM) gebündelt (gepoolt) und mit DNA Suspensionspuffer auf eine Endkonzentration von 500 nM (Pooled Primer Mix) verdünnt. Diese Stammlösung des Pooled Primer Mix wurde bei -20°C gelagert. Ein 5 µL Reaktionsansatz der STA bestand aus 2,5 µL 2x TaqMan® PreAmp Master Mix, 0,5 µL Pooled Primer Mix, 0,75 µL PCR zertifiziertem Wasser und 1,25 µL cDNA-Probe. Zusätzlich wurden eine Wasser-Kontrolle ohne *template* (NTC-STA) und eine nicht umgeschriebene RNA-Kontrolle (NoRT) mitgeführt. Nach Durchmischung und Zentrifugation erfolgte die STA im Thermocycler nach folgendem Temperaturprogramm: 10 min bei 95°C als initialem Denaturierungsschritt, gefolgt von 12 Zyklen von 15 s bei 95°C und 4 min bei 60°C für Annealing und Elongation und einer Endtemperatur von 4°C. Ein folgender Exonuklease I Verdau ermöglichte eine Entfernung der ungebundenen Primer zur Verhinderung eines Carry-Over-Effekts. Dazu wurden 0,4 µL Exonuklease I (Exo I, 20 units/µL) mit 0,2 µL 10x Exonuklease I Reaktionspuffer und 1,4 µL PCR zertifiziertem Wasser verdünnt, um eine Arbeitskonzentration von 4 units/µL zu erzielen. 2 µL dieses Exonuklease I Reaktionsgemisches wurden zu den STA-Proben gegeben. Nach Durchmischung und Zentrifugation erfolgte der Verdau im Thermocycler nach folgendem Temperaturprogramm: 40 min bei 37°C für den Verdau der ungebundenen Primer und dNTPs, 15 min bei 80°C für eine Inaktivierung der Exo I und einer Endtemperatur von 4°C. Die STA und Exo I behandelten Proben wurden im Anschluss mit TE-Puffer 5-fach verdünnt und bei -20°C maximal 2 Tage aufbewahrt.

Primer- und Probenvorbereitung

Die Verdünnung der 100 µM forward und reverse Primer-Paare auf 5 µM erfolgte, indem zu 2,5 µL jedes Primer-Paares 25 µL 2x Assay Loading Reagent und 22,5 µL DNA Suspensionspuffer hinzugegeben wurden. Analog wurde eine No Reaction Control (NRC) mit PCR zertifiziertem Wasser anstelle eines Primer-Paares hergestellt. Dieser Primer-Reaktionsmix lagerte bei -20°C.

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

96x96 Dynamic Array IFC qPCR Analyse

Die Vorbereitung und Beladung des *dynamic array IFC* (integrated fluidic circuit) erfolgte nach Herstellervorgaben. Dazu wurde in die Akkumulatoren des *dynamic array* zunächst 150 µL Kontrollfluid mittels Spritze eingefüllt und die Schutzfolie am Boden entfernt. Dann wurde der Chip in den IFC Controller HX gestellt und das Prime (136x) Programm gestartet, bei dem das Fluid in alle Kanäle des Chips geleitet wird. Nach dem Primen wurde der Chip innerhalb von 1 h mit Proben und Primer-Paaren befüllt, um einen Druckabfall im Chip zu verhindern. Dazu wurden je 5 µL Proben- und Primer-Reaktionsmix in die entsprechenden Kavitäten pipettiert, wobei eine Luftblasenbildung verhindert werden musste. Die Vermischung der Proben und Primer in den 9216 Reaktionskammern erfolgte erneut im IFC Controller HX mittels Load Mix (136x) Programm. Nach der Beladung waren eventuell an der Oberfläche des Chips haftende Staubpartikel mit Tesafilm zu entfernen. Der Chip wurde in das BioMark™ HD System überführt. Die qPCR sowie die Schmelzkurvenanalyse erfolgten nach folgendem Temperaturprogramm: 2400 s bei 70°C und 30 s bei 60°C für eine thermale Durchmischung, gefolgt von einem „Hot Start“ für 60 s bei 95°C, 30 PCR-Zyklen von 5 s bei 96°C für die Denaturierung und 20 s bei 60°C für Annealing und Elongation, schließlich die Schmelzkurvenanalyse bestehend aus 3 s bei 60°C gefolgt von einer Temperaturerhöhung von 1°C/3 s auf 95°C.

Datenanalyse und Darstellung

Der Datenanalyse und Auswertung eines Datensatzes einer *High-Throughput RT-qPCR* Analyse kam besondere Bedeutung zu, da eine manuelle Analyse schwer durchführbar und zudem sehr fehleranfällig wäre. Deshalb fand die erste Aufarbeitung der Rohdaten mit der Software *Fluidigm Real-Time PCR Analysis* statt. Dabei wurde ein Chip mit Hilfe des passiven Referenz-Farbstoffes ROX zunächst generell auf eine gleichmäßige Beladung aller Reaktionskammern und damit auf eine erfolgreiche Durchführung überprüft. Die C_q-Werte der jeweiligen Zielamplifikate wurden in allen Kammern mit dem DNA-interkalierenden

Normalisierung standen 5 Referenzgene (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *GUSB* und *HPRT1*) zur Verfügung. Um aus diesen die optimale Kombination für eine Analyse ermitteln zu können, wurden zwei integrierte Programme, *geNorm* und *Normfinder*, angewandt. *GeNorm* vergleicht dabei die relative Expression von Genpaaren in verschiedenen Proben und entfernt sukzessive das Gen mit der höchsten Expressionsvariation, wodurch am Ende das am besten für die Normalisierung geeignete Paar übrig bleibt. Die jeweiligen Expressionsvariationen für jedes Referenzgen werden als M-Wert, der mit der Standardabweichung zusammenhängt, dargestellt, wobei ein Grenzwert von $\leq 0,5$ eingehalten werden muss (Vandesompele et al. 2002). *Normfinder* wendet über die Berechnung einer Durchschnittsexpression für alle Gene eine spezielle Varianzanalyse an, bei der diese Expression mit der jeweils individuellen Expression eines Gens verglichen wird, woraus eine Standardabweichung, die zusätzlich verschiedene Behandlungsarten von Proben berücksichtigt, resultiert. Dies ermöglicht die Identifizierung von instabilen oder regulierten Genen, die als Referenzgene ausgeschlossen werden (Andersen et al. 2004). Durch die Anwendung beider Programme wurden individuell für jede Analyse die am besten geeigneten Referenzgene identifiziert; mit diesen erfolgte im Anschluss die Normalisierung. Mithilfe der $\Delta\Delta C_q$ -Methode (siehe Gleichungen 1-3) gelangte man zur finalen Darstellung der relativen Transkriptmengen der Zielgene in den Proben, die in Relation zu einer unbehandelten Kontrollgruppe, deren Expressionswert auf 1 gesetzt wurde, angegeben wurden (Livak und Schmittgen 2001; Pfaffl 2001). Bei einer Veränderung der Genexpression durch die Testsubstanzen um den Faktor 2 wurde von einer deutlichen bzw. relevanten Modulation ausgegangen.

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

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

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

4.2.1.1 Bewertung der Primer-Spezifität

Die Bewertung der Primer-Spezifität erfolgte mittels konventioneller qPCR. Dazu wurde 1 μL jedes Primer-Paares (10 μM) mit 10 μL 2x SYBR Green Supermix, 1 μL kommerziell erworbener humaner Standard cDNA und 8 μL PCR zertifiziertem Wasser vermischt. Für die korrespondierenden No *template* Kontrollen (NTC) wurde die cDNA durch PCR zertifiziertes Wasser ersetzt. Die qPCR-Reaktionen erfolgten im Thermocycler nach folgendem Temperaturprogramm: 60 s bei 95°C, gefolgt von 40 PCR-Zyklen bestehend aus 5 s bei 96°C für die Denaturierung und 20 s bei 60°C für Annealing und Elongation, und einer Schmelzkurvenanalyse beginnend bei 65°C für 3 s gefolgt von einer Temperaturerhöhung von 1°C/5 s auf 95°C. Die Genamplifikate wurden durch Größenanalyse mittels Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Dazu wurden 5 μL jedes qPCR-Produktes mit 1 μL

6x Ladepuffer versetzt und es fand eine Elektrophorese statt in 3 %igem Agarosegel (2,4 g Agarose, 80 mL 1x TAE-Puffer und 8 µL Gel-Red) in 1x TAE-Puffer für 75 min bei 100 V. Die Detektion erfolgte mittels Fluoreszenzmessung am LAS 3000. Diese Analysen wurden teilweise in Zusammenarbeit mit Herrn Daniel Neumann durchgeführt.

4.2.1.2 Bewertung der Primer-Effizienz

Die Primer-Effizienz ließ sich anhand von Kalibrierungskurven mit schrittweisen Verdünnungen der kommerziell erworbenen cDNA und A549-cDNA mittels *High-Throughput qPCR* ermitteln. Dazu wurde die cDNA in Quadruplikaten 1:1, 1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:150 und 1:200 mit PCR zertifiziertem Wasser verdünnt. Ab diesem Schritt erfolgten die Analysen, wie beschrieben, beginnend bei der STA.

4.3 Zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung mittels GF-AAS

Versuchsansatz

Für die Gesamtaufnahmeuntersuchungen wurden je $1 \cdot 10^6$ Zellen in 100 mm Zellkulturschalen und für die separate Kupferaufnahme in Zytoplasma und Zellkern je $2,52 \cdot 10^6$ Zellen in 150 mm Zellkulturschalen ausgestreut und für 48 Stunden (BEAS-2B) oder 24 Stunden (HeLa S3) kultiviert. Die Inkubation mit CuO NP, CuO MP und CuCl₂ allein oder in An- und Abwesenheit der Endozytoseinhibitoren oder BafA1 erfolgte je nach Experiment für 1, 4, 8 oder 24 Stunden. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen trypsiniert, in kaltem PBS/10 % FKS aufgenommen, durch Zentrifugation pelletiert (1250 rpm, 5 min, 4°C), zweimal mit PBS gewaschen und dazwischen erneut bei den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die Ermittlung der Zellzahl sowie des mittleren Zellvolumens erfolgte mittels Casy® TTC Zellzählgerät, bevor die Zellen erneut durch Zentrifugation pelletiert wurden.

Zellaufschluss

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

Die Bestimmung der intrazellulären Verteilung erfolgte nach einer in unserer Arbeitsgruppe etablierten Methode zur Auftrennung in lösliche Zytoplasma- und Zellkernfraktion (Schwerdtle und Hartwig 2006). Dazu wurden die Zellen in 500 µL Zellysepuffer resuspendiert und für 15 min bei 100 U/min auf Eis geschüttelt. Anschließend wurden 25 µL 10 % IGEPAL-630 zugegeben und für 10 s gevortext. Die Pelletierung erfolgte bei 4°C und 4000 rpm für 15 min durch Zentrifugation. Der Überstand, der die lösliche Fraktion des

Zytoplasmas beinhaltetete, wurde für die Kupferbestimmung mittels GF-AAS oder für eine Proteinbestimmung verwendet. Für die anschließende Kernlyse wurde der Rückstand (Kernpellet) zweimal mit 500 µL Zelllysepuffer gewaschen und anschließend in 1,5 mL Zelllysepuffer resuspendiert. Es folgten eine Ermittlung der Kernzahl und des mittleren Kernvolumens mittels Casy® Zellzählgerät (Größenbereich: 3,5-13 µm) und ein Zentrifugationsschritt bei 4°C und 4000 rpm für 5 min. Die Kerne wurden in 400 µL Kernlysepuffer resuspendiert, 30 min bei 100 U/min auf Eis geschüttelt und zentrifugiert (10000 rpm, 30 min, 4°C). Auch hier wurde der Überstand für die Kernkupferbestimmung mittels GF-AAS oder für eine Proteinbestimmung verwendet.

Proteinbestimmung nach Bradford

Die Ermittlung der Proteingehalte der Zellfraktionen erfolgte stichprobenartig mittels Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1976). Diese basiert auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blau G-250 an Proteine, wodurch eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nm zu 595 nm resultiert. Anhand der Zunahme der Absorption bei 595 nm kann der Proteingehalt innerhalb eines linearen Korrelationsbereichs quantifiziert werden.

Für eine externe Kalibrierung wurden Rinderserumalbumin(BSA)-Kalibrierstandards mit den Konzentrationen 0,01 mg/mL, 0,025 mg/mL, 0,05 mg/mL und 0,075 mg/mL hergestellt. Die Messung erfolgte in einer 96-Well-Platte. Je 20 µL Probe/Kalibrierlösung und 180 µL Reagenzmix (140 µL bidest. Wasser + 40 µL Protein Assay Farbstoff-Konzentrat) wurden in ein Well gegeben und 5 min durch Bewegung bei 100 U/min vermischt. Die Messung der Absorption bei 595 nm erfolgte mittels TECAN Infinite®200 PRO.

Graphitrohr-Atomabsorptionsspektroskopie(GF-AAS)-Analyse

Die erhaltenen löslichen Zellfraktionen wurden in einem Heizschüttler bis zur Trockene eingedampft. Dabei wurde bei 65°C und 250 rpm mit dem Erhitzen begonnen und die Temperatur stündlich um 10°C bis zu einer Temperatur von 95°C erhöht. Anschließend wurden 500 µL einer 1:1 Mischung aus 30 % H₂O₂ und 69 % HNO₃ zu den Proben gegeben und durch erneute stufenweise Temperaturerhöhung von 65°C auf 95°C verascht. Der verbleibende Rückstand wurde in 1 mL bidest. Wasser aufgenommen und daraus für die Kupfermessung mittels GF-AAS Verdünnungen in 0,2 % HNO₃ hergestellt.

Für die AAS-Messungen wurden 20 µL der Probelösung mit 5 µL Palladium/Magnesium-Modifizier (1 g/L Pd und 0,6 g/L Mg in 0,2 % HNO₃) mittels Autosampler in das Graphitrohr pipettiert und mit einem kupferspezifischen Temperaturprogramm analysiert (siehe Tabelle 3). Der Matrix-Modifizier diente der Isoformierung der Matrix von Probe- und Bezugslösungen. Für eine externe Kalibrierung wurden Kupferkonzentrationen von 2,5-25 µg/L in 0,2 % HNO₃ mit einer AAS-Kupferstandardlösung mittels Autosampler

hergestellt. Durch Bestimmung der mittleren Zellvolumina konnte die intrazelluläre Konzentration an Kupfer berechnet werden. Als Lichtquelle wurde eine elementspezifische Kupfer-Hohlkathodenlampe mit Emission bei 324,75 nm verwendet.

Tabelle 3 Temperaturprogramm der Kupferbestimmung mittels GF-AAS

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

Für jede durchgeführte Bestimmung wurden Blindwerte der Matrix und externe Standards mitgeführt, um eventuelle Verunreinigungen zu identifizieren und verlässliche Werte zu garantieren. Zusätzlich wurden stichprobenartig interne Wiederfindungen in den verschiedenen Matrices mit definierten Mengen Kupferstandard mitgeführt. Vor Beginn der Analysen wurde zudem die Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze für die Kupferbestimmung mittels GF-AAS nach DIN 32645 ermittelt. Diese Ergebnisse sind in Anhang 8.6.2 dargestellt.

Die Aufnahmeuntersuchungen mit CuO NP, CuO MP und CuCl₂ wurden zum Teil in Zusammenarbeit mit Frau Nicola Winkelbeiner, die Aufnahmeuntersuchungen mit den Endozytoseinhibitoren teilweise in Zusammenarbeit mit Frau Wera Hubele im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeiten durchgeführt.

4.4 Bestimmung der Nrf2-Aktivierung

Die Bestimmung einer möglichen Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 erfolgte mittels *TransAM Nrf2 Assay Kit* der Firma ActiveMotif nach Herstellervorgaben. Bei diesem Testsystem wird die Bindung von im Kern lokalisiertem Nrf2 an die ARE-Konsensussequenz mittels ELISA gemessen. Dazu ist in den Kavitäten einer 96-Well-Platte ein Oligonukleotid, das die ARE-Sequenz enthält, immobilisiert. Ein Primärantikörper erkennt nach der DNA-Bindung ein Nrf2-Epitop und durch Zugabe eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers wird eine photometrische Detektion möglich. Da ausschließlich Kernproteinextrakte für die Analysen einzusetzen waren, erfolgte zuvor eine Fraktionierung in Zytoplasma und Zellkern mittels Kernextraktions-Kit von ActiveMotif nach Herstellervorgaben.

Versuchsansatz

Für die Analysen wurden je $1 \cdot 10^6$ HeLa S3-Zellen in 100 mm Zellkulturschalen ausgestreut und für 24 Stunden kultiviert. Die Inkubation mit CuO NP, CuO MP und CuCl₂ oder 25 μ M Sulforaphan (50 mM Stammlösung in DMSO) erfolgte für 5 Stunden. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen mit kalter PBS/5 % Phosphatase-Inhibitor-Lösung gewaschen, anschließend in PBS/5 % Phosphatase-Inhibitor-Lösung durch Abschaben von der Zellkulturschale abgelöst und durch Zentrifugation pelletiert (200 g, 5 min, 4°C).

Zellaufschluss

Die Zellpellets wurden in 500 μ L hypotonischem Puffer resuspendiert und 15 min auf Eis lysiert. Anschließend wurden 25 μ L Detergens hinzugegeben, 10 s gevortext und 30 s bei 14000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand mit zytosolischer Fraktion wurde verworfen bzw. stichprobenartig zur Überprüfung der Fraktionierung genutzt. Das Kernpellet wurde zunächst zweimal mit hypotonischem Puffer gewaschen und dann in 50 μ L Lysepuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 2,5 μ L Detergens wurde das viskose Pellet 10 s stark gevortext, 30 min bei 150 U/min auf Eis geschüttelt, erneut 10 s stark gevortext und anschließend 10 min bei 14000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand mit der löslichen Kernfraktion ließ sich für die folgende Analyse und eine Proteinbestimmung nach Bradford (siehe 4.3) verwenden.

Überprüfung der Kernextraktion mittels SDS-PAGE und Western Blot

Da aktives Nrf2 nur im Kern lokalisiert ist, wurden für die Untersuchungen ausschließlich Kernproteinextrakte verwendet. Die Vollständigkeit der Fraktionierung von zytoplasmatischer und Kernfraktion wurde stichprobenartig mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese (SDS-PAGE) und anschließendem Western Blot durch Detektion fraktionsspezifischer Proteine überprüft. Dafür wurden 30 μ g Protein der jeweiligen Fraktion mit bidest. Wasser auf 15 μ L ergänzt, mit 5 μ L 4x Ladepuffer versetzt, bei 95°C für 10 min denaturiert und anschließend bei -20°C gelagert. Für die SDS-PAGE wurden ein 15 %iges Trenn- und ein 4%iges Sammelgel verwendet. Die Proben wurden aufgetaut, erneut bei 95°C 10 Minuten denaturiert, in die Geltaschen pipettiert und zusätzlich zweimal 5 μ L Molekulargewichtsstandard in Geltaschen zugefügt. Die Elektrophorese fand in Laufpuffer für 5 min bei 50 V gefolgt von 60 min bei 190 V statt. Danach erfolgte ein Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran. Dazu wurden alle Bestandteile (Gel, Membran, Pads und Whatman-Papiere) zunächst in Blotting-Puffer äquilibriert. Für den Wet-Blot wurde die Membran auf das Gel gelegt und zwischen Whatman-Papieren und Pads so in die Blotting-Kammer eingebaut, dass zuerst das Gel und dann die Membran in Transferrichtung (von Kathode Richtung Anode) lag. Die Kammer wurde mit 4°C temperiertem Blotting-Puffer befüllt; das Blotting erfolgte über Nacht bei 30 V und 4°C unter Rühren. Nach dem Blot wurde die

Membran 1 h bei Raumtemperatur (RT) unter leichtem Schütteln in Blockierlösung (5 % Milchpulver in PBST) geschwenkt. Die Primärantikörper-Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Dafür wurden nacheinander Antikörper gegen GAPDH und α -Tubulin (1:2000 in 5 % Milchpulver in PBST) und Lamin B (1:500 in 5 % Milchpulver in PBST) verwendet. Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal für 10 min bei RT mit PBST gewaschen und für 1 h bei RT mit dem passenden Sekundärantikörper (1:1000 in 5 % Milchpulver in PBST) inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran erneut dreimal für 10 min bei RT mit PBST gewaschen und dann in PBS gegeben. Die Detektion erfolgte am LAS-3000 mittels Chemolumineszenz. Der erhaltene Western Blot ist in Anhang 8.6.3.2 in Abbildung 33 gezeigt.

Nrf2-TransAM ELISA

Die Messung der Nrf2-Bindung an die ARE-Sequenz erfolgte mit 5 μ g Kernprotein. Pro Reaktionsansatz wurden 5 μ g Protein in 10 μ L Lysepuffer und 40 μ L Bindungspuffer in eine Kavität gegeben. Für die Bindung an das immobilisierte Oligonukleotid wurde 1 h unter leichtem Schütteln (100 U/min) bei RT inkubiert und danach pro Kavität dreimal mit je 200 μ L Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden 100 μ L des Nrf2-Primärantikörpers (1:1000 in Antikörper-Bindungspuffer) in jede Kavität gegeben und erneut 1 h ohne Schütteln inkubiert. Es folgte der dreimalige Waschschrift. Dann wurden 100 μ L HRP-gekoppelter Sekundärantikörper (1:1000 in Antikörper-Bindungspuffer) zugegeben und 1 h bei RT inkubiert. Zum Abschluss wurde viermal mit Waschpuffer gewaschen. Für die Detektion wurden zunächst 100 μ L Entwicklungslösung in die Kavitäten gegeben und für rund 10 min im Dunkeln inkubiert, bis sich eine dunkelblaue Färbung entwickelt hatte. Dann erfolgte die Zugabe von 100 μ L Stopplösung, wodurch es zu einer gelben Farbentwicklung kam. Die Messung der Absorption innerhalb von 5 min erfolgte bei 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 655 nm mittels TECAN Infinite®200 PRO.

Zur Überprüfung der Funktionalität wurde Sulforaphan in einer Konzentration von 25 μ M mitgeführt; zusätzlich erfolgten Wettbewerbsversuche mit löslichen Oligonukleotiden (Wildtyp und mutiert), um die Spezifität der Methode gewährleisten zu können. Die Ergebnisse sind in Anhang 8.6.3.1 beschrieben.

4.5 Bestimmung des Gesamtglutathiongehaltes

Die Bestimmung des intrazellulären GSH-Gehaltes von Beas-2B-Zellen erfolgte nach dem Recycling-Assay nach Tietze (Tietze 1969). Dabei wird das sogenannte Ellmans-Reagenz 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) durch GSH zu der gelben 5-Thio-2-nitrobenzoesäure (TNB) reduziert. Bei dieser Reaktion wird GSH zu Glutathion-Disulfid (GSSG) oxidiert und das entstehende GSSG durch Zugabe von Glutathionreduktase unter NADPH-Verbrauch rückreduziert. Dieses Glutathionreduktase-gesteuerte Recycling von

GSSG führt zu einer ständigen Zunahme an TNB, die bei 412 nm photometrisch quantifizierbar ist. Da die Kinetik der Absorptionsänderung direkt proportional zur verfügbaren Menge an GSH ist, kann der GSH-Gehalt dadurch quantitativ bestimmt werden.

Versuchsansatz

Für diese Analysen wurden je $1 \cdot 10^6$ BEAS-2B-Zellen in 100 mm Zellkulturschalen ausgestreut und für 48 Stunden kultiviert. Die Inkubation mit CuO NP allein oder in An- und Abwesenheit von BafA1, CuO MP und CuCl₂ erfolgte für 2 oder 24 Stunden. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen trypsinisiert, in kaltem PBS/10 % FKS aufgenommen und die Zellzahl sowie das mittlere Zellvolumen mittels Casy® Zellzählgerät ermittelt. Anschließend wurde ein definiertes Volumen durch Zentrifugation bei 1800 rpm und 4°C für 6 min pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in einer definierten Menge KP-Puffer aufgenommen, sodass die Zellkonzentration $1 \cdot 10^6$ Zellen/120 µL betrug. Die Zellsuspension in KP-Puffer wurde in 120 µL Aliquots in 1,5 mL Eppendorf-Gefäße überführt und bei -80°C gelagert.

Zellaufschluss

Für den Zellaufschluss wurden die Zellen nach mindestens 24 Stunden bei -80°C auf Eis aufgetaut und 10 Minuten im Ultraschallbad sonifiziert; anschließend erneut für mindestens 24 Stunden bei -80°C eingefroren, wie beschrieben aufgetaut und sonifiziert. Daraufhin erfolgte eine Proteinfällung mit 6,5 % 5-Sulfosalicylsäure (SSA), wofür 120 µL Zellysate in KP-Puffer mit 30 µL SSA versetzt (Endkonzentration: 1,3 % SSA), intensiv vermischt und 10 min auf Eis inkubiert wurden. Abschließend wurde für 20 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert, wodurch das Proteinpräzipitat im Rückstand verblieb. Der Überstand wurde abgenommen und für die folgende GSH-Bestimmung eingesetzt.

Recycling-Assay

Die Messung des GSH-Gehaltes erfolgte in 96-Well-Platten am TECAN Infinite®200 PRO. Dafür wurden je Kavität 10 µL Probelösung mit 50 µL KP-Puffer auf ein Arbeitsvolumen von 60 µL ergänzt und mit 100 µL 2 mM DTNB/0,3 mM NADPH-Reagenz (in KP-Puffer) versetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 40 µL Glutathionreduktase (Aktivität: 4 U/mL, in KP-Puffer) gestartet. Das dabei entstehende TNB wurde bei einer Wellenlänge von 412 nm in 8 Zyklen über eine Reaktionszeit von 4 Minuten gemessen. Die Quantifizierung des GSH-Gehaltes erfolgte über eine externe Kalibrierung mit bei jeder Analyse analog vermessenen Kalibrierstandards von 5-50 µM GSH. Zusätzlich wurde für jede Messung als externe Wiederfindung eine 20 µM GSSG-Lösung mitgeführt.

Für die Auswertung der Messwerte musste ein stetiger Anstieg der Extinktion über 8 Zyklen gegeben sein. Diese Auswertung erfolgte über eine Berechnung der Extinktion nach den

Gleichungen 4 und 5. Durch Bestimmung der mittleren Zellvolumina konnte die intrazelluläre Konzentration an GSH berechnet werden.

$$\Delta E = E (\text{Zyklus 5}) - E (\text{Zyklus 1}) \quad (4)$$

$$E = \Delta E (\text{Probe}) - \Delta E (\text{Blindwert}) \quad (5)$$

Zur Kontrolle, ob die ablaufende Farbreaktion, die auf Redoxreaktionen beruht, durch CuO NP oder lösliches Kupferchlorid gestört wird, erfolgten diesbezüglich Vorversuche. Dafür wurden Konzentrationen von 100 μM , 500 μM , 1 mM und 2 mM CuCl_2 und 5 $\mu\text{g/mL}$ und 20 $\mu\text{g/mL}$ CuO NP in KP-Puffer hergestellt. Es zeigte sich, dass weder CuCl_2 noch CuO NP die ablaufende Farbreaktion oder das Redoxcycling beeinträchtigten, da die Messungen keine Veränderung und somit vertrauenswürdige Ergebnisse zeigten. Bei Messung von Wiederfindungsproben unter Zusatz der zu testenden Lösungen wurden korrekte GSH-Gehalte bestimmt und somit ebenfalls keine Beeinträchtigungen festgestellt (Daten nicht gezeigt).

Diese Untersuchungen wurden zum Teil in Zusammenarbeit mit Frau Nicola Winkelbeiner im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit durchgeführt.

4.6 Bestimmung der Zellzyklusphasenverteilung und Zelltodinduktion

Für die Untersuchung einer Beeinflussung der Zellzyklusphasenverteilung wurde der Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) verwendet. DAPI lagert sich bevorzugt an AT-reiche Regionen der DNA an und hat in dieser Verbindung ein Absorptionsmaximum bei 358 nm und ein Emissionsmaximum bei 416 nm. Die somit vom DNA-Gehalt abhängige DAPI-Fluoreszenzemission ermöglicht eine Zuordnung der Zellen in die jeweiligen Zellzyklusphasen, die als Histogramm dargestellt werden kann (exemplarisch in Abbildung 6A gezeigt). Die Unterscheidung zwischen lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen wurde durch parallele Markierung mit Annexin V als Fluorescein-Isothiocyanat-Konjugat (Annexin V-FITC) und Propidiumiodid (PI) realisiert. Ein Charakteristikum des apoptotischen Vorgangs besteht im Verlust des asymmetrischen Aufbaus der Plasmamembran. Dabei wird Phosphatidylserin (PS), das im Normalfall an der Innenseite lokalisiert ist, auf die Außenseite der Plasmamembran transferiert. Annexin V bindet PS mit hoher Affinität, stellt somit einen sensitiven Marker für die Apoptose dar und kann durch die FITC-Konjugation fluorimetrisch detektiert werden. Da die Plasmamembran bei spätapoptotischen oder nekrotischen Zellen jedoch ihre Integrität verliert, wird PS auch in diesem Fall durch Annexin V-FITC markiert. Für die Unterscheidung benötigt man somit den weiteren Farbstoff PI. PI dringt nur in Zellen mit geschädigter Membran ein und interkaliert folgend in die DNA, wodurch eine Apoptose-Nekrose-Unterscheidung ermöglicht wird. Bei dieser Methode weisen vitale Zellen somit sowohl bei Annexin V als auch PI ein negatives

Signal auf, apoptotische Zellen sind Annexin V positiv, aber PI negativ und nekrotische Zellen bezüglich beider Marker positiv (ein exemplarischer Dotplot ist in Abbildung 6B dargestellt).

Versuchsansatz

Für die Analysen wurden je $3,5 \cdot 10^5$ Zellen BEAS-2B-Zellen in 60 mm Zellkulturschalen ausgestreut und für 48 Stunden kultiviert. Die Inkubation mit CuO NP, CuO MP und CuCl₂ erfolgte für 8, 24 oder 48 Stunden. Nach Ablauf der Inkubation wurden 150 µL des Inkubationsmediums für die Vitalitätsuntersuchungen und das restliche Medium für die Zellzyklusuntersuchung in je ein Durchflusszytometer-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden trypsiniert, in 1 mL frischem Kulturmedium aufgenommen und resuspendiert. Davon konnten analog 150 µL für die Vitalitätsuntersuchungen und das übrige Volumen für die Zellzyklusuntersuchungen verwendet werden.

Probenvorbereitung

Zu den Proben für die Vitalitätsmessung wurden 200 µL eines Mastermixes (50 µg/µL PI und 1 µL Annexin V-FITC in Ringerlösung) gegeben und 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte sofort die Messung am Durchflusszytometer. Während der 30-minütigen Inkubationszeit der Vitalitätsproben wurden die Proben für die Zellzyklusuntersuchungen fixiert. Dazu wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 1300 rpm und 4°C für 3 min pelletiert und anschließend in 1 mL kaltem PBS aufgenommen. Während einer leichten Durchmischung auf dem Vortex wurden langsam 3 mL kaltes 96%iges Ethanol zugegeben. Die Proben wurden bis zur Analyse mindestens 24 h bei -20°C gelagert. Nach der Fixierung wurde einmal mit PBS gewaschen und durch erneute Zentrifugation (2000 rpm, 5 min, 4°C) pelletiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Pellets in 200 µL DAPI-Färbelösung aufgenommen, 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert und anschließend am Durchflusszytometer vermessen.

Durchflusszytometeranalyse

Für die Zellzyklusanalysen wurden je 30000 Zellen und für die Vitalitätsanalysen je 10000 Zellen bei einer Messgeschwindigkeit von maximal 500 Events/s mittels LSR II Fortessa durchflusszytometrisch untersucht. Die Exzitationswellenlänge lag für DAPI bei 405 nm, für PI und Annexin V-FITC bei 488 nm. Die Emissionsdetektion erfolgte für DAPI bei 450/50 nm, für Annexin V-FITC bei 530/30 nm und für PI bei 695/40 nm. Für die Darstellung der Zellzyklusphasen wurde die Anzahl an Counts gegen die DAPI-Intensität aufgetragen und bei den Vitalitätsuntersuchungen das PI- gegen das FITC-Signal dargestellt (siehe Abbildung 6).

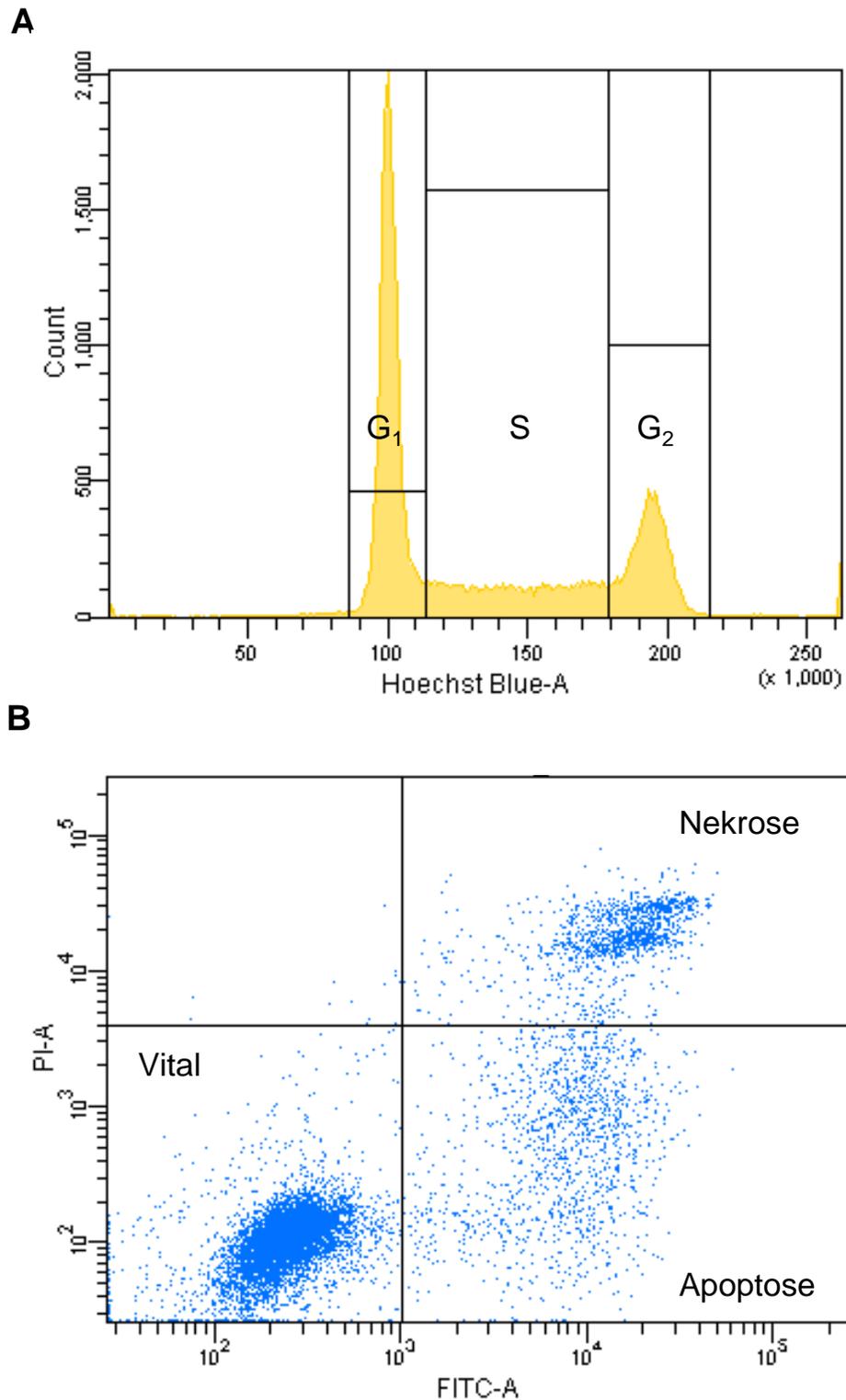


Abbildung 6 Exemplarische Darstellung eines Histogramms zur Zellzyklusphasenverteilung (A) und eines Dotplots zur Unterscheidung von vitalen, apoptotischen und nekrotischen Zellen (B). (A) Anhand der DAPI-Intensität (hier als Hoechst-Signal gezeigt, da gleiche Spektralcharakteristik) können die Zellen in G₁-, S- und G₂-Phase eingeteilt werden. (B) Vitale Zellen sind PI und FITC negativ (Quadrant links unten), apoptotische Zellen PI negativ und FITC positiv (Quadrant rechts unten) und nekrotische Zellen PI und FITC positiv (Quadrant rechts oben).

4.7 Statistik

Zusätzlich zur deskriptiven Statistik wurde bei mehr als zwei unabhängigen Stichproben nach Levene-Statistik zunächst auf Varianzhomogenität getestet. Die Unterschiede zwischen den Mittelwerten konnten durch einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) ermittelt werden. Bei Varianzhomogenität wurde als Post-Hoc-Test Dunnett`s T verwendet, bei Varianzheterogenität Dunnett`s T3. Unterschiede zwischen nur zwei Gruppen wurden im Rahmen der induktiven Statistik mittels T-Test analysiert.

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In der vorgelegten Arbeit wird zu Beginn die vervollständigende Etablierung einer neuartigen *High-Throughput RT-qPCR* Technik beschrieben. Diese Methode wurde im Folgenden zu einer weiteren Aufklärung der bisher in der Literatur beschriebenen mechanistischen Wirkung des Humankanzerogens Cadmium genutzt, wodurch auch die Aussagekraft der Analysetechnik eingeschätzt werden konnte. Im letzten Teil dienten die Genexpressionsanalysen als Ausgangspunkt einer ausführlichen toxikologischen Charakterisierung von CuO NP im Vergleich zu CuO MP und CuCl₂. Auffälligkeiten wurden auf zellulärer Ebene weiterverfolgt, woraufhin der Einfluss der Aufnahme und intrazellulären Prozessierung mit erneutem Einsatz der *High-Throughput RT-qPCR* besonders gezielt untersucht wurde.

5.1 Etablierung und Validierung der *High-Throughput RT-qPCR*

Im ersten Teil wurde die *High-Throughput RT-qPCR* zur gleichzeitigen Quantifizierung der Expression der 95 Gene in 96 Proben anwendungsfähig etabliert. Mit dieser Technik sollen zeit- und konzentrationsabhängige Genexpressionsprofile von potentiell toxischen Substanzen erstellt werden. Die generelle Versuchsdurchführung der *High-Throughput RT-qPCR* beinhaltete eine Probenaufarbeitung, in der die RNA-Isolation sowie die cDNA-Synthese mittels kommerziell verfügbarer und optimierter Kits erfolgten. Auch die weitere Vorgehensweise am BioMark™ HD System war vom Hersteller in Form eines *advanced development protocols* bereits vollständig optimiert sowie etabliert. Zusätzlich waren die Datenauswertung und weitere Prozessierung schon im Vorfeld mittels spezieller Software wie *Fluidigm Real-Time PCR Analysis* sowie *GenEx* realisiert worden. Somit lag der Schwerpunkt auf der Erstellung eines Gen-Sets, dessen Validierung und Überprüfung der Praktikabilität.

5.1.1 Auswahl eines Gen-Sets zur Untersuchung der genomischen Stabilität

Ein bislang bestehendes Gen-Set der Firma Fluidigm wurde zu Beginn optimiert, um die anstehende Fragestellung noch gezielter untersuchen zu können. Dazu wurden die jeweiligen Gene unter Berücksichtigung verschiedener Kriterien wie der eben erwähnten Beteiligung an der Erhaltung der genomischen Stabilität sowie einer Induzierbarkeit durch endo- und exogene Stressfaktoren ausgewählt. Die selektierten Gene wurden in folgende Signalwege oder Gruppierungen, wie in Tabelle 4 dargestellt, eingeteilt: (I) redoxregulierte Transkriptionsfaktoren, (II) Proliferation und Zellzyklusregulation, (III) DNA-Schadensantwort und –Reparatur, (IV) (oxidative) Stressantwort, (V) Apoptose und (VI) Fremdstoffmetabolismus. Die aus den jeweiligen Genen resultierenden Proteine sind in

Tabelle 9 (Anhang 8.6.4.1) aufgelistet. Die Gruppe der redoxregulierten Transkriptionsfaktoren umfasste dabei zum einen Gene der Transkriptionsfaktoren *TP53* (p53), *NFE2L2* (Nrf2), Untergruppen von NF- κ B (*NFKB1*, *NFKB2*, *NFKBIA*) und *JUN* als Teil von AP-1. Zum anderen wurden aber vor allem auch Gene, die für deren Aktivatoren bzw. Inhibitoren kodieren, ausgewählt. Deren Transkription wird, wie in der Literatur beschrieben, oft von den Transkriptionsfaktoren selbst im Zuge eines negativen oder positiven feedback reguliert (zusammengefasst in Angel et al. 1988; Hoffmann et al. 2002a; Kwak et al. 2002; Lustig et al. 2002; Harris und Levine 2005); daher kann durch Expressionsveränderungen dieser Gene eine Aktivierung bzw. Suppression eher angezeigt und identifiziert werden als durch veränderte mRNA-Mengen der Transkriptionsfaktoren selbst. Die zweite Gruppe enthielt proliferationsassoziierte Gene wie *MYC*, *EGFR* und *E2F1* sowie Gene zellzyklus-regulierender Proteine wie verschiedene cyclinabhängige Kinaseinhibitoren (*CDKN1A*, *CDKN1B* und *CDKN2B*). Die dritte Gruppe beinhaltete neben sogenannten DNA-Schadenssignaltransduktoren wie *ATM* und *ATR* und schadensinduzierbarer Faktoren wie *GADD45A* und *DDIT3* verschiedene Gene, die für Proteine aller wichtigen DNA-Reparaturwege wie Nukleotidexzisionsreparatur (NER), Basenexzisionsreparatur (BER), Mismatchreparatur (MMR) und Doppelstrangbruchreparatur (DSBR) kodieren. Um die „(oxidative) Stressantwort“ umfassend untersuchen zu können, wurden Gene von Faktoren der ROS-Detoxifizierung ausgewählt. Dazu zählten Bestandteile des GSH-Systems und andere thiolabhängige Systeme wie Thioredoxin oder Metallothioneine und antioxidative Enzyme. Die Gruppe der Apoptose beinhaltete Gene, die für Faktoren des intrinsischen und extrinsischen Apoptoseweges kodieren. Der Signalweg des Fremdstoffmetabolismus umfasste Gene von Enzymen der Phase-I- und Phase-II-Biotransformation. Die letzte Gruppe bestand aus den potentiellen Referenzgenen *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *GUSB* und *HPRT1*, die für eine Normalisierung der qPCR-Ergebnisse unbedingt benötigt werden.

Das Gen-Set wurde in der aufgeführten Zusammenstellung ausgewählt, da innerhalb der beabsichtigten Fragestellung nach substanzinduzierten negativen Beeinflussungen der genomischen Stabilität nicht nur direkte Interaktionen mit der DNA, sondern vor allem die zelluläre Antwort auf genotoxischen Stress eine Rolle spielen. Dieses komplexe DNA-Schadensantwortsystem beinhaltet neben der DNA-Reparatur auch Faktoren wie die Zellzyklusregulation, eine generelle und oxidative Stressantwort und, bei sehr starker Schädigung, eine Aktivierung der Apoptose. Zudem kann eine Aktivierung von fehleranfälligeren Polymerasen zu einer Manifestation von Mutationen aus DNA-Schäden führen. Alle Signalwege dieses Netzwerkes sind streng auf transkriptioneller Ebene reguliert und werden im Falle von Stress modifiziert (Holbrook und Fornace 1991; Wang 1998; Zhou und Elledge 2000; Harper und Elledge 2007; Waters et al. 2009b). Deren Bedeutung wird

zusätzlich dadurch betont, dass eine permanente Fehlregulation oder Inaktivierung zumeist in Krebszellen gefunden wird (Hanahan und Weinberg 2000; Hanahan und Weinberg 2011).

Tabelle 4 **Einteilung der 95 Gene in die jeweiligen Signalwege/Gruppierungen.**

| Referenz-Gene | Transkriptions-faktoren | DNA-Schadensantwort und -Reparatur | Apoptose | Proliferation und Zellzyklus-regulation | (oxidative) Stress-antwort | Fremdstoff-metabolismus |
|---------------|-------------------------|------------------------------------|------------------|-----------------------------------------|----------------------------|-------------------------|
| <i>ACTB</i> | <i>AXIN2</i> | <i>APEX1</i> | <i>APAF1</i> | <i>CCND1</i> | <i>CAT</i> | <i>ABCB1</i> |
| <i>B2M</i> | <i>BTRC</i> | <i>ATM</i> | <i>BAX</i> | <i>CDKN1A</i> | <i>FTH1</i> | <i>ABCC1</i> |
| <i>GAPDH</i> | <i>JUN</i> | <i>ATR</i> | <i>BBC3</i> | <i>CDKN1B</i> | <i>G6PD</i> | <i>ADH1B</i> |
| <i>GUSB</i> | <i>KEAP1</i> | <i>BRAC1 / BRCA2</i> | <i>BCL2</i> | <i>CDKN2B</i> | <i>GCLC</i> | <i>ALDH1A1</i> |
| <i>HPRT1</i> | <i>MAP3K5</i> | <i>DDB1 / DDB2</i> | <i>BCL2L1</i> | <i>E2F1</i> | <i>GPX1</i> | <i>CYP1A1</i> |
| | <i>MDM2</i> | <i>DDIT3</i> | <i>PMAIP1</i> | <i>EGFR</i> | <i>GPX2</i> | <i>EPHX1</i> |
| | <i>NFE2L2</i> | <i>ERCC1 / ERCC2</i> | <i>TNFRSF10B</i> | <i>IL8</i> | <i>GSR</i> | <i>GSTP1</i> |
| | <i>NFKB1</i> | <i>ERCC4 / ERCC5</i> | <i>XIAP</i> | <i>MYC</i> | <i>HMOX1</i> | <i>NAT1</i> |
| | <i>NFKB2</i> | <i>GADD45A</i> | | <i>PLK3</i> | <i>HSPA1A</i> | <i>NQO1</i> |
| | <i>NFKBIA</i> | <i>LIG1 / LIG3</i> | | <i>PPM1D</i> | <i>MT1X</i> | <i>SULT1A1</i> |
| | <i>TP53</i> | <i>MGMT</i> | | <i>SIRT2</i> | <i>MT2A</i> | <i>UGT1A</i> |
| | <i>SLC30A1</i> | <i>MLH1</i> | | | <i>PRDX1</i> | |
| | <i>VEGFA</i> | <i>MSH2</i> | | | <i>SEPP1</i> | |
| | | <i>OGG1</i> | | | <i>SOD1</i> | |
| | | <i>PARP1</i> | | | <i>SOD2</i> | |
| | | <i>PCNA</i> | | | <i>TFRC</i> | |
| | | <i>POLB</i> | | | <i>TXN1</i> | |
| | | <i>POLD1</i> | | | <i>TXNRD1</i> | |
| | | <i>RAD50 / RAD51</i> | | | | |
| | | <i>RRM2B</i> | | | | |
| | | <i>XPA / XPC</i> | | | | |
| | | <i>XRCC5</i> | | | | |

5.1.2 Design sequenzspezifischer Primer-Paare für die ausgewählten Gene

Die Validierung und Optimierung des bestehenden Primer-Sets erforderte ein neues Design von 53 der 95 Primer-Paare; die übrigen 42 konnten aus dem ursprünglichen Set der Firma Fluidigm übernommen werden. Die entsprechenden Sequenzen der neuen Primer-Paare wurden mit der *Beacon Designer 8* Software konzipiert. Im Vorfeld des Designs wurde dazu jede Sequenz eines Gens mithilfe der Gen-Datenbanken *emsembl* und *NCBI* untersucht, um festzustellen, wie viele aktive Transkriptvarianten jedes Gen enthält und wo die kodierenden Abschnitte lokalisiert sind. Diese Voruntersuchungen gewährleisteten, dass für das Primer-Design meist die Gensequenz der dominantesten Variante aus NCBI importiert wurde (NCBI 2014) und darüber hinaus, dass mit den resultierenden Primer-Paaren alle wichtigen Transkriptvarianten erfasst wurden. Für das Primer-Design wurden folgende Kriterien vorausgesetzt: Die Primer sollten eine Exon-Exon-Grenze umspannen oder das Primer-Paar sollte ein Intron mit einer Minimallänge von 700 Basenpaaren (bp) umschließen. Zudem galt es, Sequenzen zu vermeiden, die Homologien zu anderen Genen (*cross homology*)

aufweisen oder bei der entsprechenden Annealing-Temperatur von 60°C das Potential zur Ausbildung von Sekundärstrukturen besitzen. Weitere Kriterien des Primer-Designs waren eine Schmelztemperatur von 60°C, eine Nukleotidlänge von 18-24 bp, ein GC-Gehalt von 40-60 %, das Vermeiden einer Eigenkomplementarität am 3'-Ende sowie eine definierte Amplikonlänge von 60-250 bp. Da einige RNA-Sequenzen die geforderten Kriterien aufgrund ihres Aufbaus nicht vollständig erfüllen konnten, spannten die Primer-Paare für sechs Gene (*MT1X*, *SLC30A1*, *CDKN2B*, *GPX1*, *HSPA1A* und *JUN*) kein Intron und die Primer-Paare von elf Genen (*BCL2L1*, *MT2A*, *NFKBIA*, *ACTB*, *CDKN1B*, *CYP1A1*, *ERCC2*, *G6PD*, *GSTP1*, *NQO1* und *POLD1*) wiesen ein zu kurzes Intron auf. Die Spezifität dieser Primer-Paare konnte jedoch durch die anschließende Validierung bestätigt werden. Im Anhang 8.6.4.2 in Tabelle 10 sind die Gen-Symbole, die Gen-IDs, die *Reference Sequence Accession* Nummern sowie die Primer-Sequenzen für alle 95 Gene aufgeführt.

5.1.3 Ermittlung der Spezifität und Effizienz der Primer-Paare

Sowohl die neu designten als auch die bestehenden Primer-Paare wurden umfassend auf ihre Spezifität zu dem jeweiligen Zielgen hin überprüft. Dabei erfolgte im ersten Schritt mit jedem Primer-Paar eine konventionelle qPCR unter Verwendung von kommerziell erworbener cDNA, bei der die entstehenden Amplifikate anhand definierter Schmelzkurven und über ihre Schmelzpunkte, die mit dem theoretischen Wert korrelieren mussten, verifiziert wurden. Zusätzlich wurden Negativ-Kontrollen mit Wasser anstelle von cDNA mitgeführt. Diese zeigten in einigen Proben schwache Signale, die aber sehr hohe C_q -Werte (> 35) aufwiesen und sich für jedes Primer-Paar um mindestens 5 C_q -Werte zum entsprechenden Positivwert der qPCR mit cDNA unterschieden. Dadurch konnten die auftretenden Unspezifitäten vernachlässigt werden, da eine Differenz von 5 C_q -Werten zwischen Positiv- und Negativprobe einen Beitrag von weniger als 3 % der Absolutmenge an Gesamt-DNA ausmacht (Bustin et al. 2009). In einem zweiten Schritt erfolgte eine Größenverifizierung der entstehenden Amplifikate mittels Gelelektrophorese und Fluoreszenzdetektion. Auch diese Analyse garantierte eine hohe Spezifität, da die Amplikongrößen mit den theoretischen Größen übereinstimmten und keine Nebenprodukte auftraten. Als Beispiele sind in Abbildung 34A (Anhang 8.6.4.3) die Amplifikate nach gelelektrophoretischer Analyse für *NFKB2*, *OGG1*, *PMAIP1*, *PRDX1* und *RRM2B* gezeigt. In einem nächsten Schritt wurden Spezifität und Effizienz der Primer-Paare in einer *High-Throughput RT-qPCR* Analyse am BioMark™ HD untersucht. Das qPCR-Temperaturprogramm beinhaltet immer eine Schmelzkurvenanalyse für jedes Gen, und zusätzlich werden in einer Analyse diverse Negativkontrollen, eine nicht in cDNA umgeschriebene RNA-Probe (NoRT) sowie eine Probe ohne Nukleotide (No *template* Kontrolle), mitgeführt. Auch diese Analysen, die beispielhaft für die Gene *OGG1*, *PMAIP1* und *RRM2B* in Abbildung 34B (Anhang 8.6.4.3) gezeigt sind, bestätigten anhand definierter Schmelzkurven die Spezifität der Primer-Paare für das

resultierende Amplifikat, und mittels der Negativkontrollen konnten zudem unspezifische Reaktionen wie die Bildung von Primer-Dimeren sowie ein zu hoher genomischer DNA-Hintergrund ausgeschlossen werden.

Die Effizienz der Primer-Paare wurde anhand von Kalibrierungskurven mittels *High-Throughput qPCR* ermittelt. Diese wurden mithilfe von sechs definierten schrittweisen Verdünnungen der kommerziell erworbenen cDNA, die insgesamt eine 200-fache Spanne abdeckten, erstellt. Die Kalibrierungskurven resultierten durch lineare Regression des Logarithmus der relativen *template*-Konzentration auf der x-Achse gegen den jeweiligen resultierenden C_q -Wert auf der y-Achse, und aus deren Steigung wurde, wie in Gleichung 6 angegeben, die Effizienz berechnet:

$$\text{PCR-Effizienz: } 10^{(-1/\text{Steigung})-1} \quad (6)$$

In Abbildung 35 (Anhang 8.6.4.4) sind beispielhaft die resultierenden Kalibrierungskurven der linearen Regression mit Steigung, y-Achsenabschnitt und Korrelationskoeffizienten für die Gene *GAPDH*, *JUN* und *SIRT2* dargestellt. Eine optimale Primer-Effizienz, durch die das *template* in jedem PCR-Zyklus verdoppelt wird, weist einen Wert von 1, also 100 %, auf (Bustin et al. 2009). Die ermittelten Effizienzen wiesen mit Werten zwischen 90 und 103 % ebenso wie die Korrelationskoeffizienten R^2 , die trotz der für PCR-Analysen relativ niedrigen 200-fachen Verdünnungsspanne über dem geforderten Wert von 0,985 lagen (Raymaekers et al. 2009; Kennedy 2011), adäquate Resultate auf. Für 73 der 95 Gene zeigten die Effizienzen mit Ergebnissen zwischen 95-100 % sogar außerordentlich gute Werte. Für die Gene *BRCA1*, *BRCA2*, *CYP1A1*, *GADD45A*, *GPX2*, *PMAIP1* und *RAD51* konnten die Effizienzen aufgrund einer zu niedrigen basalen Expression und einer daraus resultierenden zu geringen Anzahl an Verdünnungsproben mit akzeptablen C_q -Werten jedoch nicht angemessen mit der kommerziellen cDNA bestimmt werden. Da die aufgelisteten Gene in A549-Zellen eine gesteigerte basale Expression besaßen, wurde diese Analyse analog mit cDNA dieser Zelllinie wiederholt. Auf diesem Wege konnte die PCR-Effizienz für *BRCA1*, *BRCA2*, *GPX2*, *PMAIP1* und *RAD51* präzise bestimmt werden. Jedoch zeigten die Korrelationskoeffizienten von *CYP1A1* und *GADD45A* mit 0,971 und 0,917 immer noch eher suboptimale Werte, wodurch das Ausmaß einer veränderten Expression dieser Gene mit dem beschriebenen System nicht absolut quantifizierbar wird, sondern eher als Trend betrachtet werden sollte. Diese Einschränkung für 2 der insgesamt 95 Gene war jedoch zu akzeptieren, da eine große Herausforderung innerhalb der Etablierung dieser Methode darin bestand, dass alle 95 Primer-Paare unter denselben feststehenden Reaktionsbedingungen in Bezug auf Spezifität, Selektivität und Effizienz funktionieren mussten. Durch das beschriebene sorgfältige Design der Primer-Paare konnte diese Prämisse, wie mittels der dargestellten Analysen detailliert gezeigt, erfüllt werden. Die ermittelten Primer-Effizienzen aller 95 Gene sind in Tabelle 11 in Anhang 8.6.4.5 gezeigt.

Zudem konnte ein gemeinsamer linearer Arbeitsbereich für alle Gene identifiziert werden. Für alle mit dem System durchgeführten Analysen wurde ein Grenzwert (*Cut-off*) von $C_q \leq 22$ veranschlagt, da für höhere C_q -Werte keine Reproduzierbarkeit mehr gewährleistet werden kann. Dieser *Cut-off* muss aufgrund einer höheren gegebenen Poissonverteilung, die aus der Miniaturisierung der qPCR-Reaktionen in den Nanoliterbereich und einer damit verbundenen kleineren Ausgangs-*template*-Menge resultiert, angewandt werden (Svec et al. 2013). Als letzter Parameter wurde die Präzision der qPCR-Analysen mittels Intra-Assay-Abweichung aus den Werten der Kalibrierungskurven, die in Vierfachbestimmung durchgeführt worden waren, festgestellt. Dabei wies die Standardabweichung zufriedenstellende Ergebnisse unter 2 % für Verdünnungen bis 1:50 und übereinstimmend mit der These, dass die Standardabweichung mit abnehmender *template*-Menge zunimmt, maximal 4 % für höhere Verdünnungen auf.

5.2 Beeinflussung der Genexpression durch CdCl₂

Die Eignung und Aussagekraft der *High-Throughput RT-qPCR* Methode zur potentiellen Aufklärung der zellulären Wirkmechanismen mittels spezifischer Genexpressionsmuster wurde, wie bereits erwähnt, anhand zeit- und konzentrationsabhängiger Analysen mit CdCl₂ in A549- und BEAS-2B-Zellen beurteilt. Das Humankanzerogen Cadmium wurde als Modellsubstanz gewählt, da die molekularen Wirkmechanismen inklusive der Wirkungen auf zelluläre Signalwege einerseits recht ausführlich erforscht sind, darüber hinaus aber ein noch tiefergehender Einblick in die mechanistischen Wirkweisen gewonnen werden sollte.

5.2.1 Zytotoxizitätsuntersuchungen

Zunächst wurde anhand der zytotoxischen Wirkung ein geeigneter Konzentrationsbereich für die Behandlung mit CdCl₂ in der jeweiligen Zelllinie ermittelt. A549-Zellen wurden mit 10 und 50 µM CdCl₂ behandelt, da eine 24-stündige Inkubation mit 50 µM CdCl₂ in vorangegangenen, in der Arbeitsgruppe durchgeführten Untersuchungen nur eine geringe Zytotoxizität zeigte. Dabei wurde anhand der gemessenen Parameter Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit ein Rückgang auf 70 % der Kontrolle festgestellt (Schwerdtle et al. 2010). Im Gegensatz dazu war die zytotoxische Wirkung von CdCl₂ in BEAS-2B-Zellen deutlich ausgeprägter. Da diese Zelllinie nicht in der Lage ist, Kolonien auszubilden, wurde nur die Zellzahl als Messgröße untersucht. Eine 24-stündige Inkubation verursachte einen Rückgang der Zellzahl auf 85 % für 5 µM und auf 55 % für 10 µM (siehe Abbildung 36, Anhang 8.6.5.1). Diese Konzentrationen, die auch für die Genexpressionsuntersuchungen eingesetzt wurden, zeigten nach 8-stündiger Behandlung noch keine zytotoxischen Effekte.

5.2.2 Einfluss von CdCl₂ auf Gene der Aufnahme und (oxidativen) Stressantwort

Eine ausgeprägte und bereits in den niedrigen Konzentrationen auftretende Induktion der Metallothionein-Gene *MT1X* und *MT2A* wurde in beiden Zelllinien sowohl nach acht als auch nach 24 Stunden in vergleichbarem Ausmaß beobachtet. In Abbildung 7 sind die Ergebnisse der 24-stündigen Inkubation gezeigt. So wurde die Transkription in BEAS-2B-Zellen für *MT1X* auf das 6-fache und für *MT2A* auf das 4-fache gesteigert. In A549-Zellen war die Expression dieser Gene noch stärker aktiviert. *MT1X* wurde um das bis zu 30-fache und *MT2A* um das 18-fache verstärkt exprimiert. Die Induktion dieser Gene zeigte erhöhte intrazelluläre Konzentrationen an Cadmiumionen an, da eine Expression der *MT*-Gene über den Transkriptionsfaktor MTF-1 als zelluläre Reaktion auf den Metallioneneinstrom gesteigert wird (Karin et al. 1984; Murata et al. 1999; Marr et al. 2012; Sims et al. 2012; Gunther et al. 2012). Die ausgeprägtere Induktion der *MT*-Gene in A549-Zellen deutet demzufolge eine stärkere Überladung mit Cadmium an. Metallothioneine sind kleine cysteinreiche Proteine, die effektiv freie Cadmiumionen binden können. Dies stellt auf der einen Seite einen Entgiftungsmechanismus dar, kann aber auf der anderen Seite auch zu

einer negativ zu bewertenden Akkumulation der toxischen Metallionen führen (Klaassen und Liu 1997; Waisberg et al. 2003; Hartwig 2010).

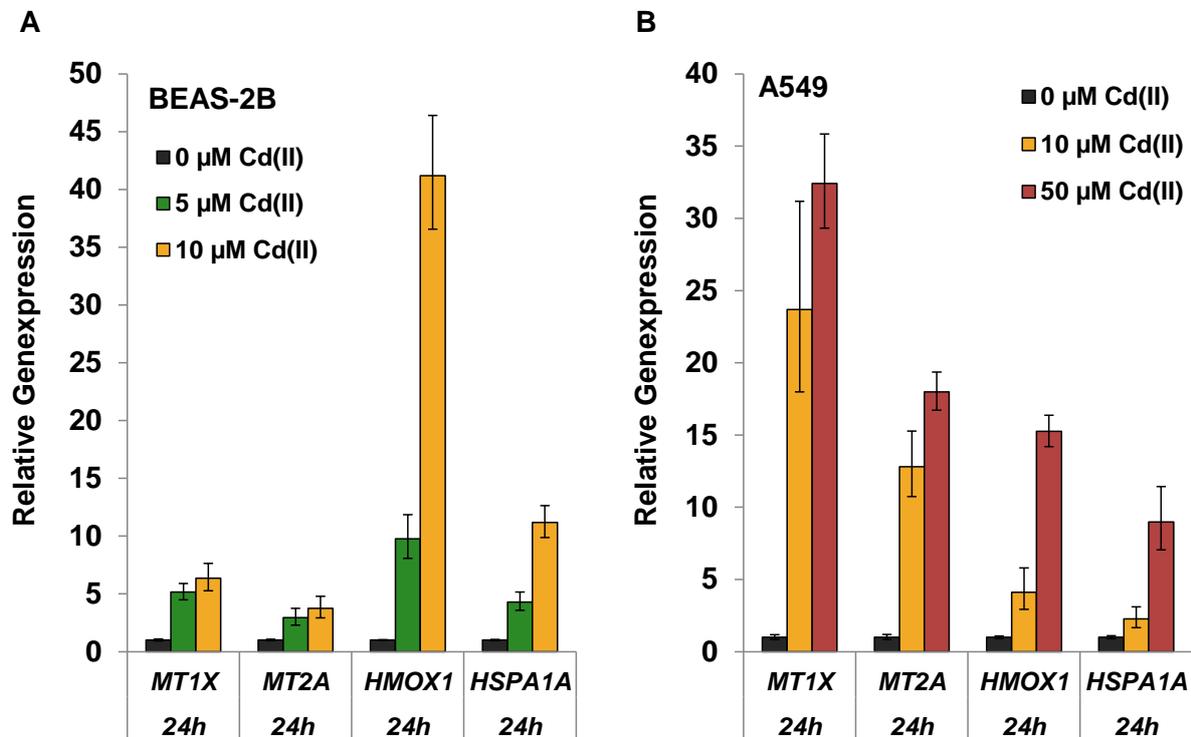


Abbildung 7 Einfluss von CdCl_2 auf die Expression von Genen, die mit der Aufnahme und der oxidativen Stressantwort assoziiert sind. BEAS-2B-Zellen (A) oder A549-Zellen (B) wurden für 24 Stunden mit CdCl_2 inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD von vier Bestimmungen aus zwei unabhängigen Versuchen. Man beachte die unterschiedlichen Skalierungen der y-Achsen.

Eine deutliche, in allen Konzentrationen auftretende Induktion wurde auch für die stress-sensitiven Gene *HMOX1* und *HSPA1A* in beiden Zelllinien festgestellt. Diese Ergebnisse sind für die 24-stündige Inkubation ebenfalls in Abbildung 7 aufgeführt. So kam es in BEAS-2B-Zellen konzentrationsabhängig zu um das bis zu 40-fache erhöhten Transkriptmengen für *HMOX1* und um das bis zu 10-fache für *HSPA1A*. In A549-Zellen konnte eine maximale Induktion bis zu 15-fach bzw. 9-fach festgestellt werden. Die Expression dieser Gene, die als transkriptionelle Marker für oxidativen Stress und Hitzeschock gelten (zusammengefasst in Pirkkala et al. 2001; Ryter und Choi 2005; Gozzelino et al. 2010), war somit in BEAS-2B-Zellen um ein Vielfaches stärker aktiviert. In dieser Zelllinie war die Effektstärke nach 8-stündiger Behandlung sogar noch ausgeprägter, da zu diesem Zeitpunkt die Transkription von *HMOX1* bis zu 120-fach und die von *HSPA1A* bis zu 30-fach erhöht war (siehe Abbildung 37, Anhang 8.6.5.2). Die Induktion dieser Gene durch Cadmium kann dabei indirekt über erhöhte ROS-Mengen vermittelt sein. Jedoch ist für beide Promotorsequenzen der Gene zusätzlich ein cadmiumresponsives Element beschrieben, wodurch die Transkription auch spezifisch durch das Metall vermittelt sein kann (Takeda et al. 1994; Koizumi et al. 2007).

Zusätzlich waren noch Gene der GSH- und Thioredoxin-Abwehrsysteme sowie weiterer antioxidativer Enzyme in ihrer mRNA-Menge gesteigert. Diese Wirkung beschränkte sich jedoch auf BEAS-2B-Zellen (siehe Abbildung 8, Daten für A549-Zellen nicht gezeigt). Die deutlichste Steigerung war dabei für *TXNRD1* (bis zu 6-fach) und *GCLC* (bis zu 3,8-fach) nach acht Stunden zu beobachten. Zu diesem Zeitpunkt konnte weiterhin eine Verdopplung der Transkriptmengen von *GSR* und *SOD2* ab 10 μM CdCl_2 festgestellt werden. Nach 24-stündiger Behandlung konnte nur noch eine Verdopplung bzw. Verdreifachung der mRNA-Gehalte von *PRDX1* und *TXNRD1* festgestellt werden. Jedoch zeigten auch die Transkriptmengen der Gene *FTH1*, *G6PD*, *GSR*, *TFRC* und *TXN* einen Trend der Erhöhung auf das 1,5-2-fache (siehe Abbildung 38, Anhang 8.6.5.2).

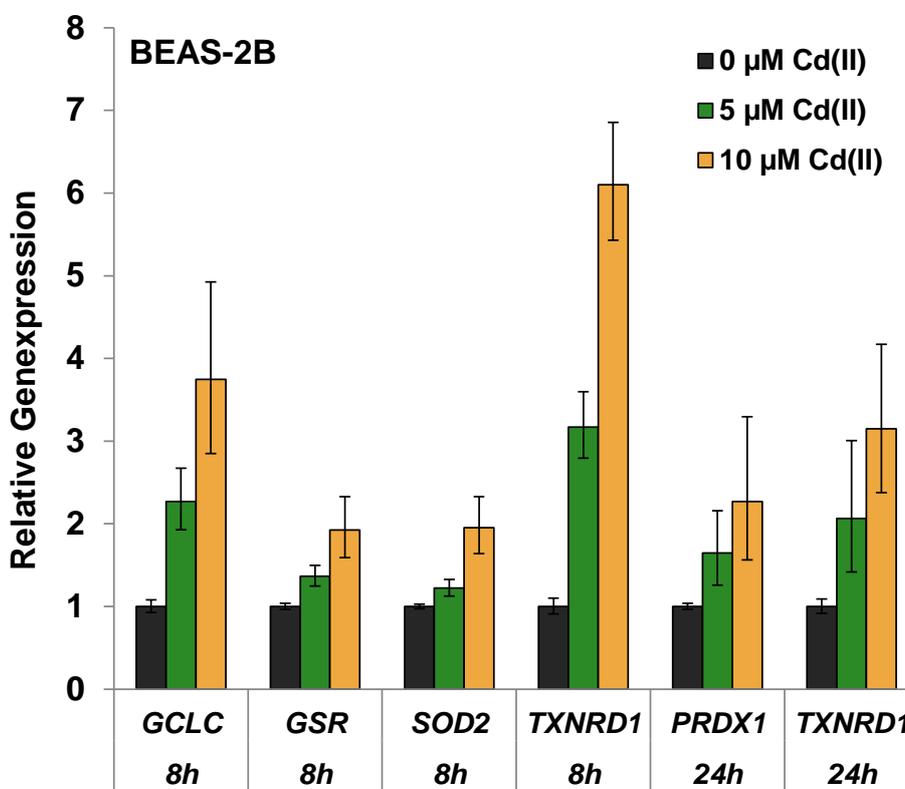


Abbildung 8 Einfluss von CdCl_2 auf die Expression von Genen, die mit der antioxidativen Abwehr assoziiert sind. BEAS-2B-Zellen wurden für acht bzw. 24 Stunden mit CdCl_2 inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD von vier Bestimmungen aus zwei unabhängigen Versuchen.

Insgesamt wurden die mit oxidativem Stress assoziierten Gene deutlich vielfältiger und auch ausgeprägter in BEAS-2B-Zellen induziert. In A549-Zellen waren nur die Transkriptmengen der "Sensorgene" *HMOX1* und *HSPA1A* verändert. Die Transkription dieser Gene wird sehr schnell und stark durch Stresssignale induziert, da die Regulation der Expression hauptsächlich auf transkriptioneller Ebene erfolgt (Pirkkala et al. 2001; Gozzelino et al. 2010). Die Unterschiede zwischen den Zelllinien können zum einen auf niedrigere intrazelluläre GSH-Gehalte in BEAS-2B-Zellen im Vergleich zu A549-Zellen zurückgeführt

werden (Carmichael et al. 1988; Hatcher et al. 1995; Rahman et al. 1996; Pietarinen-Runtti et al. 1998; Lian und Wang 2008). Relativ hohe GSH-Gehalte in A549-Zellen ermöglichen eine effektivere und schnellere Bindung freier Cadmiumionen sowie cadmiuminduzierter ROS. Diese These stützend konnten Hatcher und Kollegen zeigen, dass eine Cadmiumresistenz in A549-Zellen korrelierend mit erhöhten GSH-Mengen auftritt (Hatcher et al. 1995). Dadurch könnte auch die hier beobachtete ausgeprägtere Cadmiumtoleranz von A549-Zellen im Vergleich zu BEAS-2B-Zellen erklärt werden. Als weiteren Grund für die nicht beobachtete Induktion der Gene der antioxidativen Abwehr in A549-Zellen ist eine Nrf2-Deregulation anzuführen. Dieser Transkriptionsfaktor, der die Expression vieler mit antioxidativer Abwehr assoziierter Gene reguliert (Kobayashi und Yamamoto 2005), ist in A549-Zellen aufgrund einer Fehlfunktion seines negativen Regulators Keap1 dauerhaft aktiviert (Singh et al. 2006). Bezüglich des Potentials der Genexpressionsanalysen zur Aufklärung der Wirkmechanismen zeigt die Induktion der Gene der oxidativen Stressantwort erhöhte ROS-Mengen und dadurch verursachten oxidativen Stress an. Eine erhöhte ROS-Generation durch Cadmium kann jedoch nicht direkt erfolgen, weil es als ausschließlich zweiwertig vorkommendes Kation nicht redoxaktiv ist. Die Induktion von oxidativem Stress wird, wie in der Literatur beschrieben, aber indirekt durch verschiedene Mechanismen wie der Freisetzung fentonreaktiver Metallionen z.B. aus Metallothionein (O'Brien und Salacinski 1998), einer Störung der mitochondrialen Atmungskette (Wang et al. 2004), einer Hemmung antioxidativer Enzyme (Waisberg et al. 2003; Valko et al. 2006) und einer GSH-Depletion (L'Hoste et al. 2009) bedingt. Diese mechanistischen Hintergründe für eine Entstehung erhöhter ROS-Mengen werden dabei jedoch nicht durch das System identifiziert und bedürften in Bezug auf unbekannte Substanzen weiterer Untersuchungen.

5.2.3 Einfluss von CdCl₂ auf Gene der Zellzyklusregulation und Proliferation

CdCl₂ induzierte Gene von sowohl wachstumsfördernden als auch zellzyklusregulierenden Faktoren. Dabei traten zu unterschiedlichen Zeitpunkten unterschiedliche Muster vor allem in der Nicht-Krebszelllinie BEAS-2B auf (Abbildung 9). So war nach acht Stunden die Transkriptmenge des Gens *JUN* sehr deutlich auf das 8-fache gesteigert, und auch die Proto-Onkogene *MYC* und *EGFR* sowie das Gen *CCND1*, das für Cyclin D kodiert, wurden verdoppelt exprimiert. Gleichzeitig mit der Induktion dieser proliferationsfördernden Faktoren wurden jedoch auch die Gene *CDKN1A* und *CDKN2B*, die für die Zellzyklusinhibitoren p21 und p15 kodieren, bis zu maximal 3-fach verstärkt abgelesen. Nach 24 Stunden war nur noch die Hochregulation der Gene *CCND1*, *JUN* und *MYC* zu beobachten, wobei die Transkriptmengen maximal 2-fach gesteigert waren. Somit waren nach 24 Stunden ausschließlich erhöhte mRNA-Level proliferationsfördender Faktoren persistent, wodurch ein dauerhafter Wachstumsstimulus angedeutet wurde. Vor allem c-Jun ist als Teil des Transkriptionsfaktors AP-1 ein wichtiger Regulator vieler Gene, die an Zellwachstum und

Proliferation beteiligt sind (Angel und Karin 1991; Shaulian und Karin 2001; Shaulian und Karin 2002). Das Gen *JUN* selbst wird ebenfalls im Zuge einer Autoregulation durch aktives AP-1 verstärkt induziert (Angel et al. 1988). Insgesamt lassen die Genexpressionsmuster in dieser Signalgruppierung in BEAS-2B-Zellen durch eine dauerhafte Hochregulation mitotischer Signale gleichzeitig mit einer nur kurzfristigen Erhöhung von Zellzyklusinhibitor-Genen eine Deregulation des Zellwachstums vermuten, die, wie von Hanahan und Weinberg beschrieben, einen kritischen Faktor bei der Krebsentstehung darstellt (Hanahan und Weinberg 2000). Die cadmiuminduzierte gesteigerte Expression der Proto-Onkogene *JUN* und *MYC* konnte auch schon in anderen Untersuchungen gezeigt werden (zusammengefasst in Beyersmann und Hechtenberg 1997).

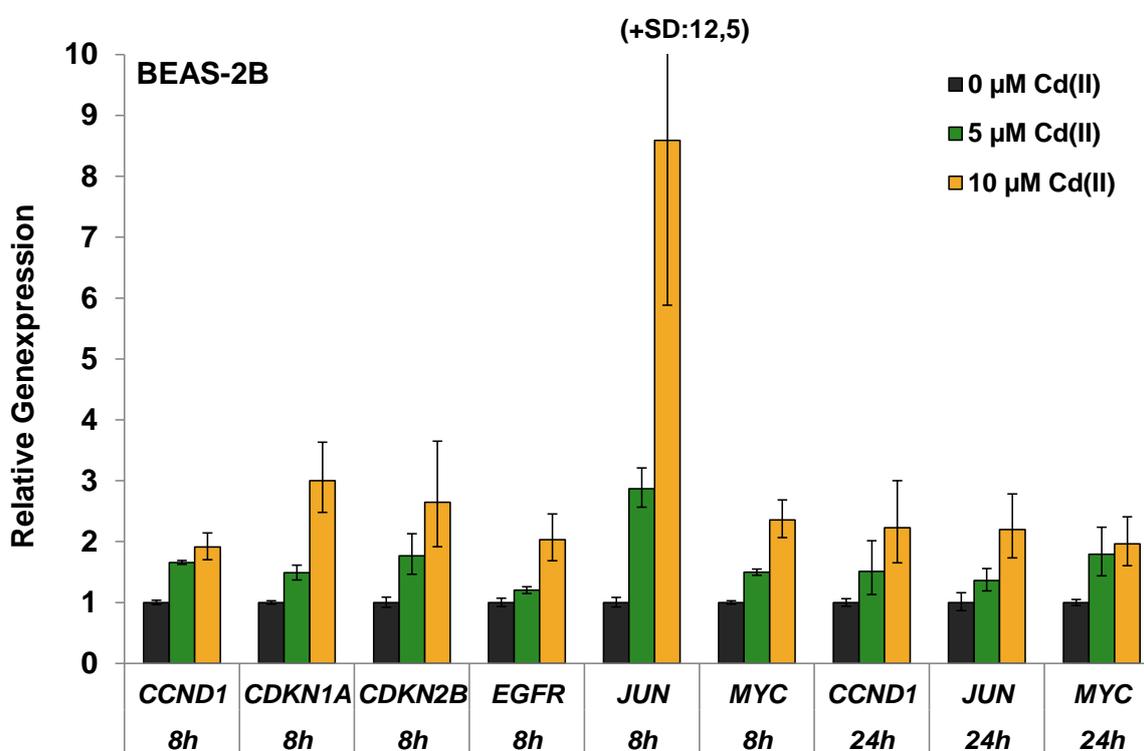


Abbildung 9 Einfluss von CdCl_2 auf die Expression von Genen, die mit Proliferation und Zellzyklusregulation assoziiert sind. BEAS-2B-Zellen wurden für acht bzw. 24 Stunden mit CdCl_2 inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD von vier Bestimmungen aus zwei unabhängigen Versuchen.

Die Veränderungen in dieser Gruppe von Genen waren für A549-Zellen deutlich weniger ausgeprägt und aussagekräftig. Lediglich $50 \mu\text{M}$ CdCl_2 verdoppelte nach 8-stündiger Inkubation die Transkriptmenge von *JUN* und nach 24-stündiger Behandlung die von *CDKN1A* (siehe Abbildung 39, Anhang 8.6.5.2). Dadurch wird verdeutlicht, wie wichtig ein Vergleich verschiedener Zelllinien mit unterschiedlichem Transformationsstatus im Rahmen von Genexpressionsuntersuchungen zur Identifizierung zelltypspezifischer Reaktionen ist.

5.2.4 Einfluss von CdCl₂ auf Gene der Apoptose

In beiden Zelllinien wurden durch CdCl₂ die Gene *BCL2* und *PMAIP1*, die für Faktoren der intrinsischen Kaskade kodieren, in ihrer Expression in proapoptotischem Sinne verändert (Abbildung 10). Das Gen *PMAIP1*, das für das proapoptotische Protein Noxa kodiert, wurde in unterschiedlichem Ausmaß verstärkt exprimiert. So wurde dessen Transkriptmenge in BEAS-2B-Zellen nach 8-stündiger Behandlung nahezu um das 9-fache gesteigert und zum späteren Zeitpunkt noch verdreifacht. In A549-Zellen ließ sich nach acht Stunden ein verdoppelter und nach 24 Stunden ein annähernd um das 3-fache erhöhter mRNA-Gehalt feststellen. Im Gegensatz dazu wurde *BCL2*, das für das antiapoptotische Protein Bcl-2 kodiert, in beiden Zelllinien auf das bis zu 0,5-fache vermindert exprimiert; in A549-Zellen zu beiden Zeitpunkten, in BEAS-2B-Zellen nur nach 24 Stunden.

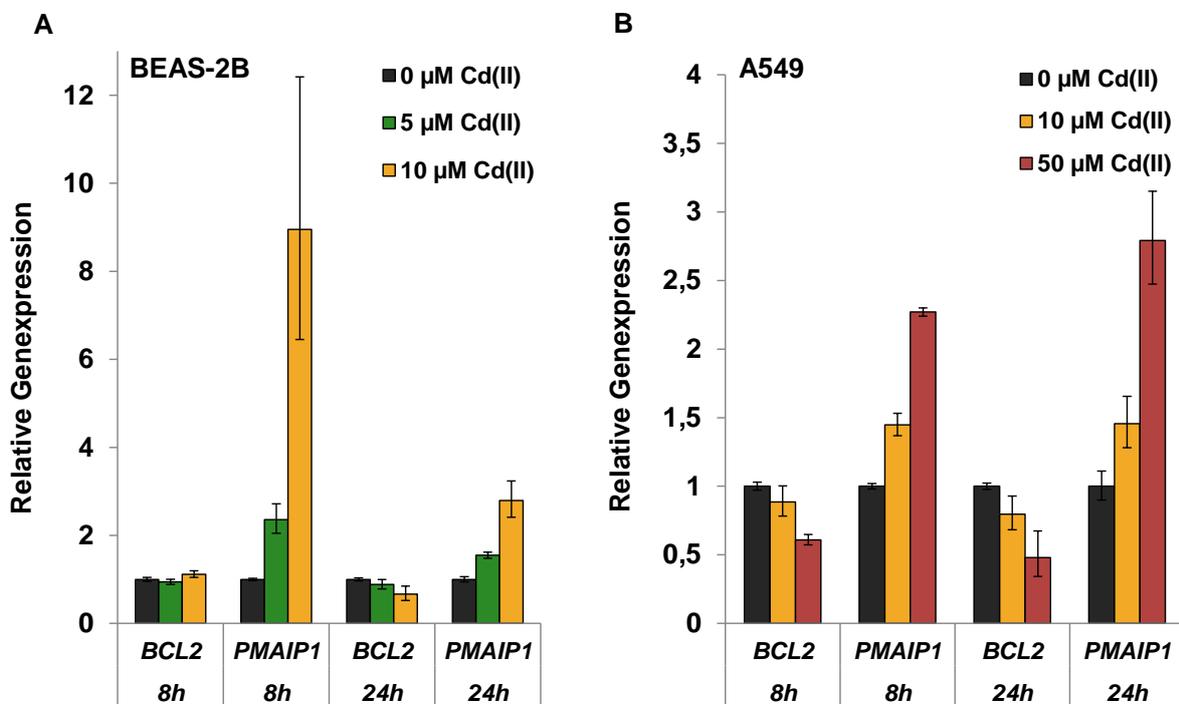


Abbildung 10 **Einfluss von CdCl₂ auf die Expression der Apoptose assoziierten Gene *BCL2* und *PMAIP1*.** BEAS-2B-Zellen (A) oder A549-Zellen (B) wurden für acht bzw. 24 Stunden mit CdCl₂ inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD von vier Bestimmungen aus zwei unabhängigen Versuchen. Man beachte die unterschiedlichen Skalierungen der y-Achsen.

Alle beschriebenen Effekte traten meist erst bei der jeweils höchsten eingesetzten Konzentration auf. Dieser Sachverhalt stützt die These, dass ein Mechanismus wie Apoptose erst bei sehr starker Schädigung von zellulären Bestandteilen als letzte Instanz eingeleitet wird. CdCl₂ modifizierte innerhalb der Gruppe der apoptotischen Gene ausschließlich die Expression von Faktoren, die an der intrinsischen Kaskade beteiligt sind. Diese Beobachtung wird auch in anderen Veröffentlichungen zum Ausdruck gebracht, die eine cadmiuminduzierte apoptotische Wirkung durch eine Schädigung der Mitochondrien und

auch eine maßgebliche Beteiligung von Proteinen der Bcl-2-Familie beschreiben (zusammengefasst in Waisberg et al. 2003; Thevenod und Lee 2013).

5.2.5 Einfluss von CdCl₂ auf Gene der DNA-Schadensantwort und -Reparatur

In der Gruppe der Gene, die mit der DNA-Schadensantwort und -Reparatur assoziiert sind, wurden die Transkriptmengen der Gene *GADD45A* und *DDIT3* in beiden Zelllinien zeit- und konzentrationsabhängig verstärkt exprimiert (Abbildung 11).

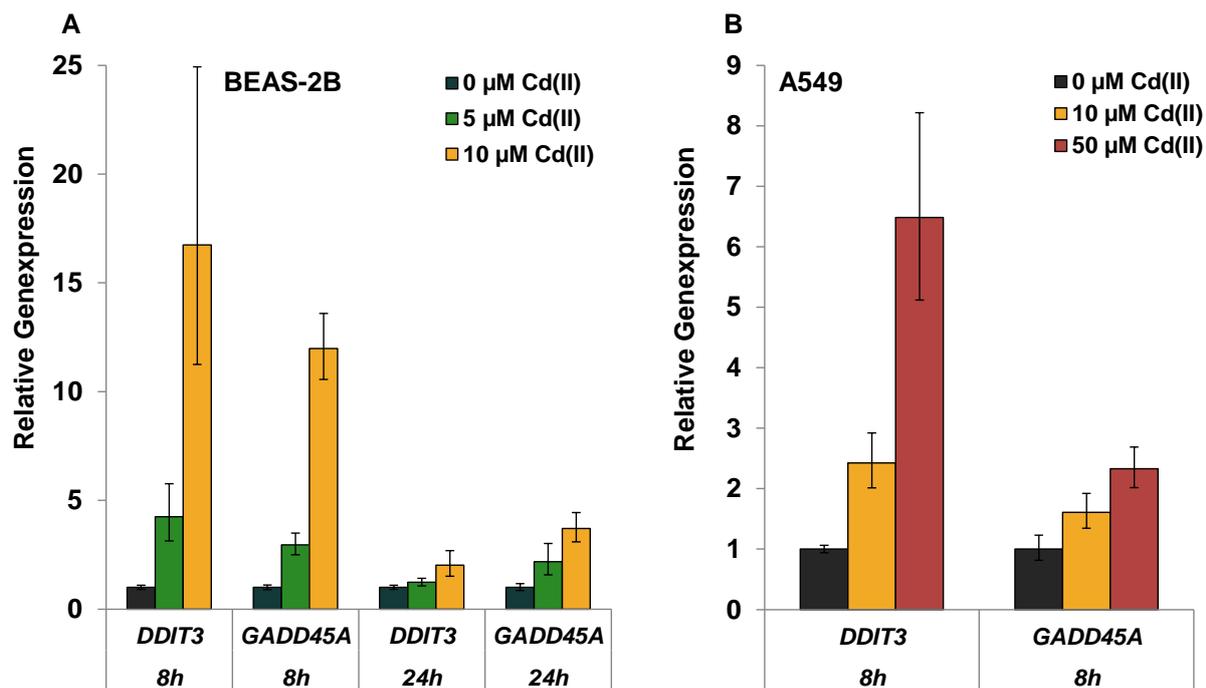


Abbildung 11 **Einfluss von CdCl₂ auf die Expression der DNA-Schadensantwort assoziierten Gene *DDIT3* und *GADD45A*.** BEAS-2B-Zellen (A) oder A549-Zellen (B) wurden für acht bzw. 24 Stunden mit CdCl₂ inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SD von vier Bestimmungen aus zwei unabhängigen Versuchen. Man beachte die unterschiedlichen Skalierungen der y-Achsen.

Die stärkste Induktion war nach 8-stündiger Behandlung in BEAS-2B-Zellen festzustellen; *DDIT3* wurde um das bis zu 17-fache und *GADD45A* ungefähr um das 12-fache gesteigert exprimiert. Der Effekt schwächte sich nach 24 Stunden für *DDIT3* auf einen Faktor 2 und für *GADD45A* auf einen Wert von 4 ab. In A549-Zellen wurde die Expression nach acht Stunden konzentrationsabhängig um das 6-fache für *DDIT3* und um das 2-fache für *GADD45A* erhöht. Die erhöhte Transkription der Gene deutet eine durch CdCl₂ in unterschiedlicher Ausprägung verursachte DNA-Schädigung an, da es sich um Faktoren handelt, die als Indiz und Reaktion der Zelle dosisabhängig auf eine Schädigung der DNA induziert werden (Fornace et al. 1989; Luethy und Holbrook 1992; Zhan 2005). In A549-Zellen wurde die Induktion oxidativer DNA-Schäden mittels Alkalischer Entwindung in unserer Arbeitsgruppe nach 24 Stunden erst in hohen Konzentrationen, signifikant ab 75 µM, beobachtet (Schwerdtle et al. 2010). Diese beschriebene Wirkung deckt sich mit dem Maß der Induktion

der Schadenssignale in A549-Zellen, da *DDIT3* und vor allem *GADD45A* nur mäßig gesteigert transkribiert wurden. In BEAS-2B-Zellen deutet die im Vergleich dazu deutlich erhöhte Induktion der Gene eine umfassendere DNA-Schädigung an, die mit den Beobachtungen der oxidativen Stressantwort korrelierend auf eine ausgeprägtere ROS-Entstehung hinweist. Die Diskrepanz zwischen den Zelllinien lässt sich wiederum durch den hohen basalen GSH-Level in A549-Zellen erklären. Damit übereinstimmend wurde z.B. die Induktion oxidativer DNA-Schäden bereits ab 10 μM CdCl_2 in HeLa S3-Zellen, die im Vergleich zu A549-Zellen ebenfalls einen niedrigeren basalen GSH-Gehalt besitzen (Chao et al. 1992), festgestellt (Schwerdtle 2002).

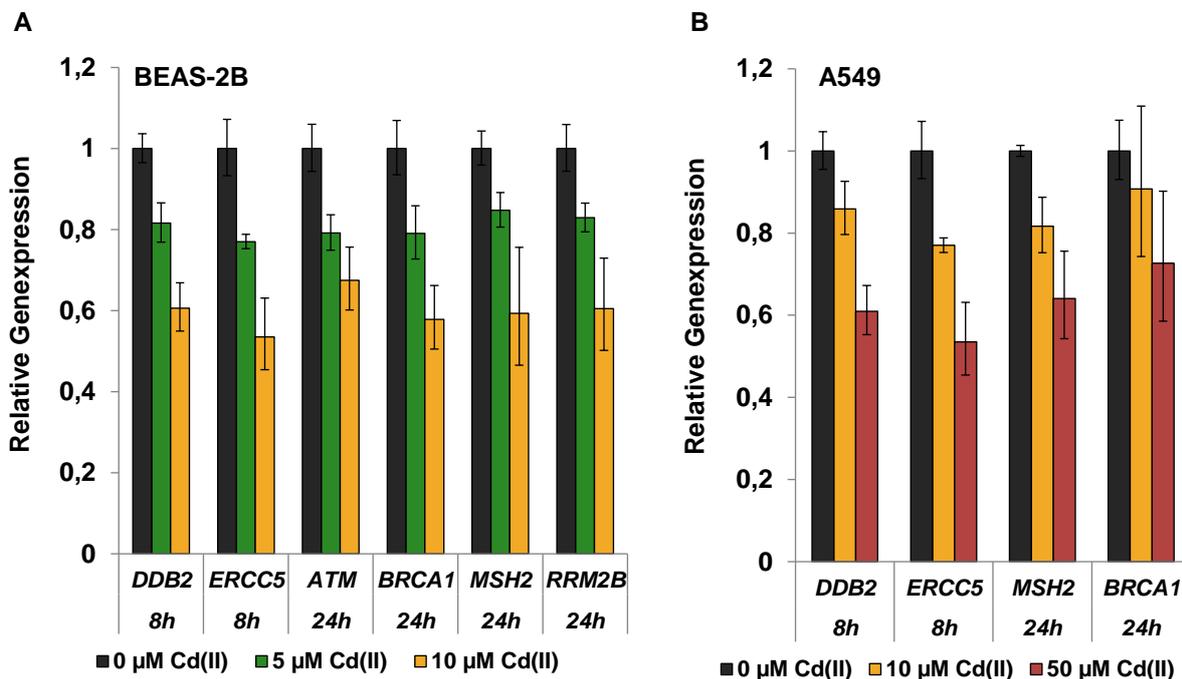


Abbildung 12 **Einfluss von CdCl_2 auf die Expression von Genen, die mit der DNA-Reparatur assoziiert sind.** BEAS-2B-Zellen (A) oder A549-Zellen (B) wurden für acht bzw. 24 Stunden mit CdCl_2 inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD von vier Bestimmungen aus zwei unabhängigen Versuchen.

Im Gegensatz zu den schadensinduzierbaren Genen war die Expression verschiedener Gene, deren kodierte Proteine an der DNA-Schadenssignaltransduktion und -Reparatur beteiligt sind, in beiden Zelllinien vermindert (Abbildung 12). In BEAS-2B-Zellen waren nach acht Stunden die Transkriptmengen der NER-assoziierten Gene *DDB2* und *ERCC5* und nach 24 Stunden die mRNA-Gehalte des Signalüberträgers *ATM* sowie des DSBR-assoziierten *BRCA1*, des MMR-assoziierten *MSH2* und auch von *RRM2B* stark verringert. Auch in A549-Zellen wurde eine Verringerung der Gene *DDB2* und *ERCC5* nach 8-stündiger Inkubation und von *MSH2* und *BRCA1* nach 24 Stunden festgestellt. Die Effekte waren in beiden Zelllinien jedoch zumeist erst in hohen Konzentrationen prägnant. Diese verminderte Expression verschiedener DNA-Reparaturfaktoren zeigt eine basale Schwächung der

Reparaturmechanismen an und ergänzt einen in der Literatur ausführlich beschriebenen Aspekt der indirekt genotoxischen und komutagenen Wirkung von Cadmium: die Inhibition der meisten DNA-Reparaturwege. Dabei konnte eine Beeinflussung der NER auf der Ebene der Schadenserkennung, der BER durch Hemmung der hOGG1 und der PARP1 sowie eine Beeinträchtigung der MMR und der DSBR identifiziert werden (zusammengefasst in Hartwig 2010). Durch die beschriebenen Effekte auf Transkriptionsebene kann jedoch keine definitive Aussage über die Konsequenzen auf Proteinebene getroffen werden. Auch der mechanistische Hintergrund dieser Absenkung muss im Hinblick auf inhibierte Transkriptionsfaktoren oder einer Veränderung der mRNA-Stabilität noch weiter aufgeklärt werden. Ein potentieller Angriffspunkt könnte dabei der einleitend erwähnte Redoxregulator Ref-1 sein, der, selbst redoxkontrolliert, den Aktivitätszustand vieler Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP-1, p53, NF- κ B und HIF-1 α steuert (Luo et al. 2010). Da diese Transkriptionsfaktoren wiederum unter anderem die Genexpression verschiedener DNA-Reparaturfaktoren regulieren, wäre somit eine indirekte Beeinflussung über Inhibierung von Ref-1 möglich.

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen bezüglich des Transkriptionsfaktors p53 sollen in dieser Gengruppierung ebenfalls noch beschrieben werden. Das Tumorsuppressorprotein spielt für die Erhaltung der genomischen Stabilität eine übergeordnete Rolle, da es im Falle einer DNA-Schädigung aktiviert wird und wichtige Kontrollprozesse wie die Induktion eines Zellzyklusarrestes oder der Apoptose maßgeblich steuert (Levine 1997). Um mit dem entwickelten System eine mögliche Aktivierung von p53 identifizieren zu können, war das Gen des negativen p53-Regulators Mdm2 Bestandteil des Sets, da *MDM2* im Zuge eines negativen feedback durch aktives p53 verstärkt exprimiert wird (Harris und Levine 2005). In beiden Zelllinien war die Transkriptmenge von *MDM2* unter allen untersuchten Bedingungen jedoch unverändert (siehe Abbildung 40, Anhang 8.6.5.2). Dadurch kann angenommen werden, dass keine Aktivierung von p53 stattfand. Bei BEAS-2B-Zellen ist diese Beobachtung nicht verwunderlich, da es während der Immortalisierung mit dem SV40-Virus zu einer Inaktivierung des Tumorsuppressors in der Zelllinie kommt (Levine 2009). In den p53-profizienten A549-Zellen würde das Ausbleiben der Aktivierung einen cadmiumvermittelten Wirkmechanismus widerspiegeln. So konnte gezeigt werden, dass das Metall durch Wechselwirkung mit der zinkbindenden Domäne von p53 eine Umfaltung und einen daraus resultierenden Aktivitätsverlust bewirkt (Meplan et al. 1999; Schwerdtle et al. 2010).

5.3 Untersuchungen von CuO NP, CuO MP und CuCl₂

Im Rahmen ausführlicher toxikologischer Untersuchungen sollten CuO NP im Vergleich zu den Referenzverbindungen CuO MP und CuCl₂ auf zugrunde liegende Wirkmechanismen in BEAS-2B- und A549-Zellen untersucht werden. Dazu erfolgten zunächst Genexpressionsanalysen mittels *High-Throughput RT-qPCR* nach 24-stündiger Inkubation und im Anschluss wurden Faktoren wie die zelluläre Aufnahme, Parameter der oxidativen Stress- sowie der DNA-Schadensantwort in BEAS-2B-Zellen mit unterschiedlichen molekularbiologischen Methoden untersucht. Abschließend wurde der Einfluss der Aufnahme sowie der intrazellulären Prozessierung detaillierter betrachtet.

Beide Partikelarten wurden in einer Vorarbeit in unserer Arbeitsgruppe anhand verschiedener Parameter umfassend physikochemisch charakterisiert. Dazu wurden unterschiedliche Analysetechniken wie Rasterelektronenmikroskopie (REM), Brunauer-Emmet-Teller(BET)-Analyse, Röntgendiffraktometrie, Energiedispersive Röntgenspektrometrie (EDS), Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS), Trägergas-Heißextraktion, Dynamische Lichtstreuung (DLS), pH-Wertmessungen und Endotoxintests verwendet. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl CuO NP als auch CuO MP hochrein, identisch zusammengesetzt, kristallin und frei von Endotoxinen waren und außerdem den pH-Wert wässriger Lösungen nicht veränderten. Ferner waren CuO NP annähernd rund, mit 20-200 nm einheitlich groß und besaßen in Modellflüssigkeiten ein ausgeprägtes Agglomerationsverhalten. CuO MP zeigten eine unregelmäßigere Größenverteilung von 500 nm-10 µm. Des Weiteren besaßen CuO NP mit 17,23 m²/g im Vergleich zu CuO MP (0,74 m²/g) eine 23-fach vergrößerte Oberfläche (Semisch et al. 2014).

5.3.1 Zytotoxizitätsuntersuchungen

Die zytotoxische Wirkung der Kupferverbindungen wurde in BEAS-2B-Zellen über eine Veränderung der Lebendzellzahl untersucht. In Abbildung 13 sind die Ergebnisse einer 24-stündigen Inkubation mit CuO NP, CuO MP und CuCl₂ gezeigt. CuO NP bewirkten einen drastischen, konzentrationsabhängigen Rückgang der Zellzahl. Eine Behandlung mit 1 µg/mL bzw. 5 µg/mL führte bereits zu einer Verringerung auf 90 % bzw. 79 % im Vergleich zur Kontrolle und 10 µg/mL führten zu einer Abnahme auf 62 %. Ab 20 µg/mL war eine starke zytotoxische Wirkung anhand eines Rückgangs der Lebendzellzahl auf 30 % zu beobachten; bei 50 µg/mL fiel sie sogar auf unter 10 %. Im Gegensatz dazu wies die Zellzahl im Fall von CuO MP bis 20 µg/mL Werte über 80 % auf; erst ab 50 µg/mL konnte eine deutliche Zytotoxizität anhand eines Rückgangs auf 64 % festgestellt werden. Für wasserlösliches CuCl₂ wurden im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich nur sehr geringfügige Effekte anhand einer maximalen Absenkung der Messgröße auf 81 %

festgestellt. Dabei wurden Konzentrationen eingesetzt, die im Falle kompletter Löslichkeit der Kupfermenge der jeweiligen Konzentration an partikulärem CuO entsprachen.

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurden weiterführende Analysen hauptsächlich mit Konzentrationen bis 20 µg/mL bzw. 252 µM durchgeführt. CuO MP und CuCl₂ wurden jedoch teilweise bis 50 µg/mL bzw. 630 µM analysiert, um die Effekte nicht nur in Bezug auf eine identische Massendosis, sondern auch auf eine äquitoxische Wirkung einordnen zu können. So zeigten z.B. 10 µg/mL CuO NP bezüglich der Abnahme der Zellzahl auf ca. 60 % denselben wie mit 50 µg/mL CuO MP verursachten Wert.

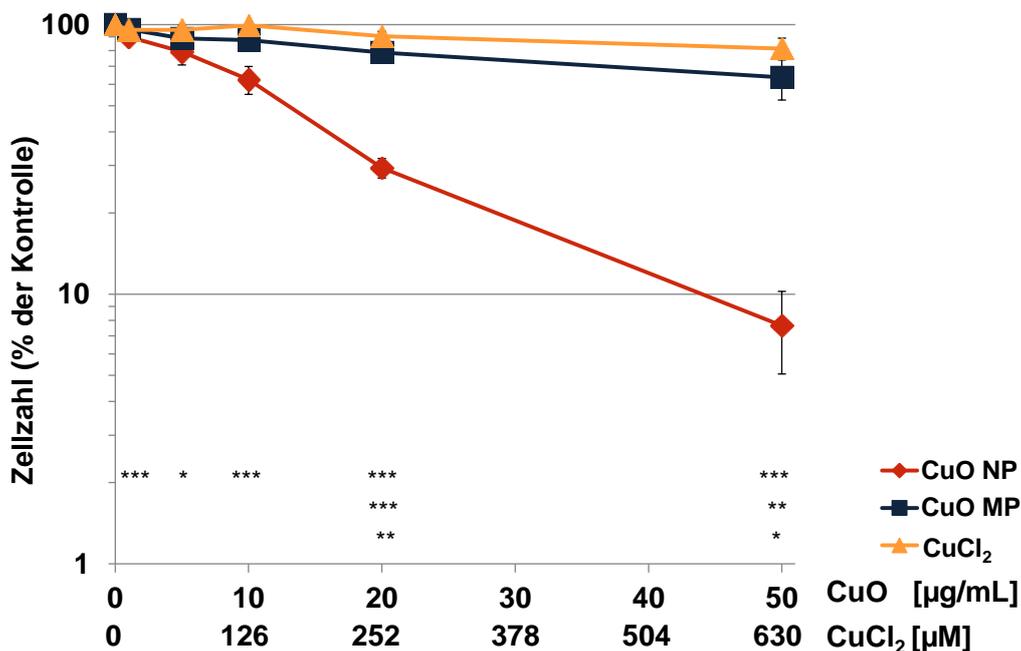


Abbildung 13 **Einfluss von CuO NP, CuO MP und CuCl₂ auf die Zellzahl.** BEAS-2B-Zellen wurden 24 Stunden mit den Kupferverbindungen inkubiert und gezählt. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SD von sechs Bestimmungen aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett's T Post-Hoc-Test: * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001. 50 µg/mL CuO entsprechen 630 µM Cu²⁺ im Falle kompletter Kupferfreisetzung.

In A549-Zellen wurde die zytotoxische Wirkung der Kupferverbindungen bereits in vorangegangenen Analysen in der Arbeitsgruppe anhand der Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit untersucht. Dabei wurde eine konzentrationsabhängige Abnahme beider Parameter beobachtet: Ab 5 µg/mL CuO NP bzw. 63 µM CuCl₂ sank die Koloniebildungsfähigkeit unter 70 % und betrug in den höchsten Konzentrationen (50 µg/mL bzw. 630 µM) weniger als 10 % bzw. 20 % (Semisch et al. 2014).

Die ausgeprägte zytotoxische Wirkung von CuO NP in BEAS-2B-Zellen und auch in anderen Zelllinien wurde übereinstimmend ebenfalls von anderen Forschungsgruppen beobachtet. Zusätzlich wurde dabei auch die stark unterschiedliche Zytotoxizität von CuO NP und

CuO MP bei identischer Massendosis beschrieben (Karlsson et al. 2009; Midander et al. 2009; Berntsen et al. 2010; Cronholm et al. 2013; Chusuei et al. 2013; Semisch et al. 2014).

Bei der Darstellung der Dosiswirkungsbeziehungen von Partikeln wird diskutiert, dass die Oberfläche einen aussagekräftigeren dosimetrischen Parameter darstellen kann als die üblich verwendete Massenkorrelation (Oberdörster et al. 2005; Nel et al. 2006; Aitken et al. 2006; Waters et al. 2009a). Um diese Hypothese im Hinblick auf die Toxizitätsunterschiede zwischen CuO NP und CuO MP zu überprüfen, wurden CuO MP in höheren Konzentrationen für die Zytotoxizitätsuntersuchung eingesetzt. Somit wurden zusätzlich Zellzahlbestimmungen nach 24-stündiger Inkubation mit 115 und 230 µg/mL CuO MP durchgeführt, die in Bezug auf die 23-fach vergrößerte spezifische Oberfläche 5 bzw. 10 µg/mL CuO NP entsprechen. Die Abnahme der Zellzahl war dabei jedoch mit 50 % für 115 µg/mL und 25 % für 230 µg/mL deutlich stärker als für die entsprechende Konzentration CuO NP (siehe Abbildung 41, Anhang 8.6.6.1), wobei die lichtmikroskopische Überprüfung auch eine sichtbare Überladung der Zellen mit CuO MP ergab. Auch der Vergleich der Zellzahlverringering durch 1 µg/mL CuO NP (90 %) und 20 µg/mL CuO MP (79 %) wies eine stärkere Wirkung für die MP nach. Somit scheint die oberflächenbezogene Dosiswirkungsbeziehung im Falle eines Vergleichs von CuO NP und CuO MP nicht besser geeignet und zusätzlich die Oberfläche nicht allein der Grund für die unterschiedliche Reaktivität zu sein.

Für CuCl₂ wurde in A549-Zellen anhand der Messung der Viabilität mittels Trypanblauanalyse eine geringe Zytotoxizität beschrieben (Karlsson et al. 2008), vergleichbar derjenigen in dieser Arbeit in BEAS-2B-Zellen nachgewiesenen, wogegen in unserer Arbeitsgruppe in A549- und in HeLa-S3-Zellen eine stärkere zytotoxische Wirkung festgestellt wurde. Diese war jedoch erst anhand der Koloniebildungsfähigkeit, mit der langfristige Effekte bestimmt werden können, ersichtlich (Semisch et al. 2014).

5.3.2 Beeinflussung der Genexpression durch CuO NP, CuO MP und CuCl₂

5.3.2.1 Einfluss auf Gene der Aufnahme und (oxidativen) Stressantwort

Alle drei Kupferverbindungen führten in beiden Zelllinien, wie in Abbildung 14 gezeigt, zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der Transkriptmengen von *MT1X* und *MT2A*. In BEAS-2B-Zellen war die stärkste Induktion dabei für CuO NP zu beobachten; *MT1X* wurde schon ab 1 µg/mL 9-fach und bei 20 µg/mL 29-fach gesteigert exprimiert. Die Steigerung von *MT2A* fiel geringer aus und betrug maximal den Faktor 8. Im Gegensatz dazu war die Expression im Fall von CuO MP und CuCl₂ maximal ca. 12-fach (*MT1X*) bzw. 3-fach (*MT2A*) erhöht. In A549-Zellen wurde eine deutlich geringere Erhöhung der Transkriptmengen festgestellt. Dabei war die Induktion von *MT1X* durch CuCl₂ mit einem Maximalwert von 11

stärker erhöht als für CuO NP (8-fach) und bezüglich *MT2A* mit 4-facher Steigerung vergleichbar. CuO MP zeigten keine Effekte.

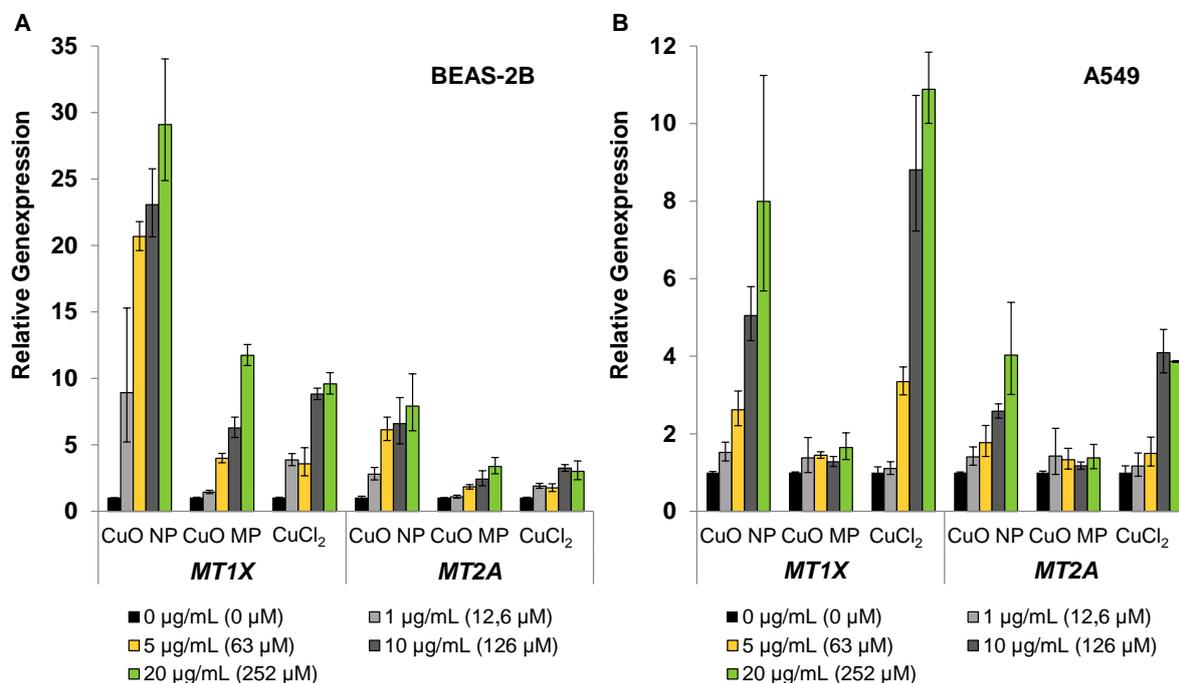


Abbildung 14 **Einfluss von CuO NP, CuO MP und CuCl₂ auf die Expression der mit der intrazellulären Kupferionenfreisetzung assoziierten Gene *MT1X* und *MT2A*.** BEAS-2B-Zellen (A) oder A549-Zellen (B) wurden für 24 Stunden mit den Kupferverbindungen inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD von vier Bestimmungen aus zwei unabhängigen Versuchen. 20 µg/mL CuO entsprechen 252 µM Cu²⁺ im Falle kompletter Kupferfreisetzung. Man beachte die unterschiedlichen Skalierungen der y-Achsen.

Auch hier ist die Induktion, die wie für Cadmium über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors MTF-1 verläuft, als Maß für den intrazellulären Einstrom von reaktiven Kupferionen in die Zelle zu verstehen (Sims et al. 2012; Marr et al. 2012). Demzufolge zeigen die Expressionsanalysen eine deutlichere intrazelluläre Überladung von BEAS-2B-Zellen im Vergleich zu A549-Zellen nach Exposition mit CuO NP an. Diese ist zusätzlich in BEAS-2B-Zellen viel ausgeprägter im Vergleich zu den Referenzverbindungen, in A549-Zellen für CuO NP und CuCl₂ hingegen vergleichbar. Das Ausmaß der Induktion dieser aufnahmeassoziierten Gene reflektiert die unterschiedliche zytotoxische Wirkung der Kupferverbindungen in beiden Zelllinien, weshalb die Kupferaufnahme den entscheidenden Faktor innerhalb der Toxizität darzustellen scheint.

Auch die Transkriptmengen von *HMOX1* und *HSPA1A* wurden am stärksten in BEAS-2B-Zellen und durch die Behandlung mit CuO NP im Vergleich zu CuO MP und CuCl₂ gesteigert (siehe Abbildung 15). Dabei wurde *HMOX1* durch CuO NP konzentrationsabhängig bis zu 53-fach vermehrt exprimiert, wogegen CuO MP und CuCl₂ nur maximal 10-fache Induktionen bewirkten. *HSPA1A* zeigte sich nur durch CuO NP und CuO MP konzentrationsabhängig um Faktor 28 bzw. 8 vermehrt, CuCl₂ wies keinen Effekt auf. In A549-Zellen wurde die

Transkription durch CuO NP maximal auf das 8-fache (*HMOX1*) bzw. 7-fache (*HSPA1A*) gesteigert. Die Referenzverbindungen zeigten außer einer 4-fachen Induktion von *HMOX1* durch CuCl₂ keine Wirkung. Im Gegensatz zu den konzentrationsabhängigen Effekten der partikulären CuO Verbindungen bewirkte die Behandlung mit CuCl₂ oft plateauartige Erhöhungen.

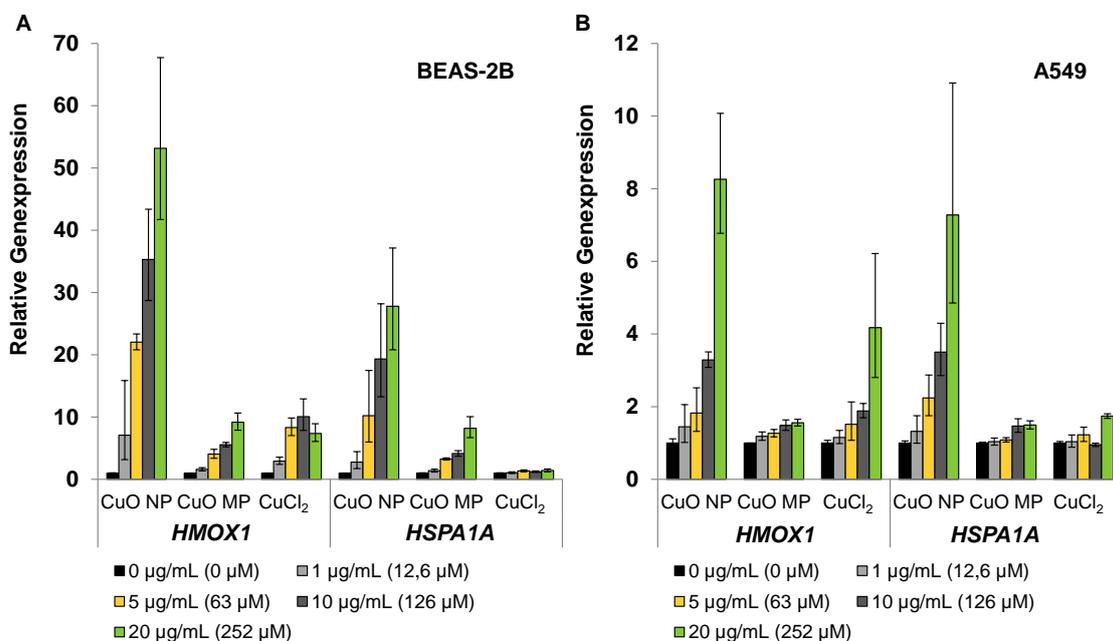


Abbildung 15 Einfluss von CuO NP, CuO MP und CuCl₂ auf die Expression der durch oxidativen Stress induzierbaren Gene *HMOX1* und *HSPA1A*. BEAS-2B-Zellen (A) oder A549-Zellen (B) wurden für 24 Stunden mit den Kupferverbindungen inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD von vier Bestimmungen aus zwei unabhängigen Versuchen. 20 $\mu\text{g/mL}$ CuO entsprechen 252 μM Cu²⁺ im Falle kompletter Kupferfreisetzung. Man beachte die unterschiedlichen Skalierungen der y-Achsen.

Da die Induktion dieser *stress response* Gene durch erhöhte ROS-Mengen über verschiedene redoxsensitive Transkriptionsfaktoren wie Nrf2, AP-1 und HSF-1 reguliert wird (Pirkkala et al. 2001; Ryter und Choi 2005; Gozzelino et al. 2010), kann man auf das Ausmaß einer ROS-Generierung und potentiell aktivierter Transkriptionsfaktoren durch die Kupferverbindungen schließen. Diese Wirkung scheint für CuO NP in BEAS-2B-Zellen sehr markant zu sein, wohingegen die Effekte von CuO NP in A549-Zellen deutlich schwächer und eher mit denen der Referenzverbindungen in BEAS-2B-Zellen vergleichbar sind.

Die Induktion des Inflammationmarker-Gens *IL8* war ebenfalls in BEAS-2B-Zellen deutlich ausgeprägter als in A549-Zellen (Abbildung 16). In BEAS-2B-Zellen wurde durch CuO NP die insgesamt stärkste Induktion innerhalb aller Analysen um mehr als Faktor 100 beobachtet. CuO MP und CuCl₂ führten im Gegensatz dazu nur zu 16-facher bzw. 4-facher Steigerung. In A549 Zellen wurde die Expression hinsichtlich der Größenordnung vergleichbar um das 3-fache (CuO NP), das 4-fache (CuCl₂) oder das 2-fache (CuO MP) erhöht. *IL8* wird als proinflammatorische Reaktion auf Zytokine oder zellulären Stress induziert. Die Transkription wird dabei durch unterschiedliche Faktoren wie die Aktivierung

eines Genpromotors durch die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1, wobei letzterer vor allem das Ausmaß der Induktion bestimmt, und durch mRNA-Stabilisierung über den p38 MAP-Kinase-Signalweg reguliert (Hoffmann et al. 2002b). Verschiedene Studien konnten diese proinflammatorische Reaktion durch CuO NP bestätigen. Dabei wurde z.B. eine stärkere IL8-Freisetzung einhergehend mit einer Aktivierung von NF- κ B und AP-1 im Vergleich zu wasserlöslichen Pendants in A549-Zellen ausgelöst (Cho et al. 2012). Zusätzlich wurde eine IL8-Freisetzung durch CuO NP in A549- und HBEC-Zellen beobachtet, wobei die Exposition über ein realistischeres Air-Liquid-Interface System erfolgte (Jing et al. 2015).

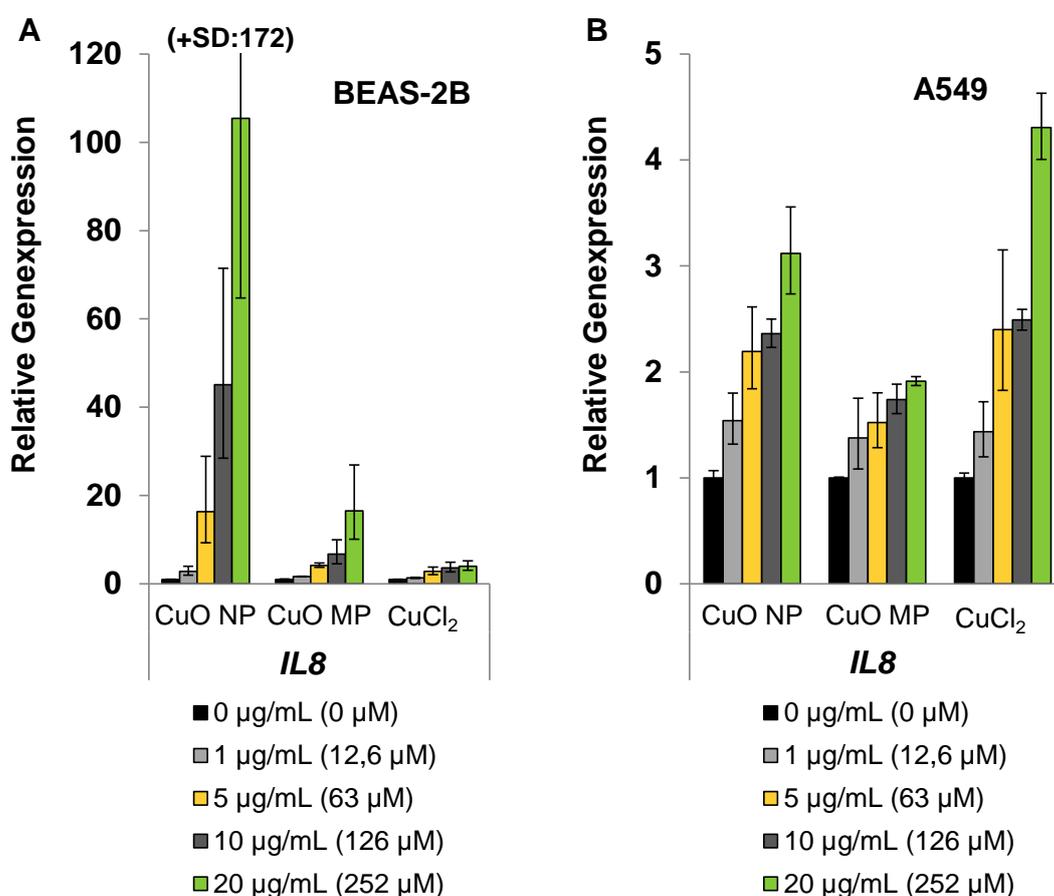


Abbildung 16 **Einfluss von CuO NP, CuO MP und CuCl₂ auf die Expression des Inflammation-marker-Gens *IL8*.** BEAS-2B-Zellen (A) oder A549-Zellen (B) wurden für 24 Stunden mit den Kupferverbindungen inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD von vier Bestimmungen aus zwei unabhängigen Versuchen. 20 μ g/mL CuO entsprechen 252 μ M Cu²⁺ im Falle kompletter Kupferfreisetzung. Man beachte die unterschiedlichen Skalierungen der y-Achsen.

Die Gruppe der Gene, die mit der antioxidativen Abwehr assoziiert sind, zeigten hauptsächlich in BEAS-2B-Zellen deutliche Veränderungen (Tabelle 5). Dabei wurden durch CuO NP innerhalb der Faktoren des GSH-Systems die Gene *GCLC* und *GSR*, *PRDX1* als Teil des Thioredoxin-Systems sowie *SOD1*, dessen korrespondierendes Protein Superoxidanionen in Wasserstoffperoxid umwandelt, konzentrationsabhängig maximal

verdoppelt exprimiert. Eine stärkere Induktion um das 5-fache wurde für *TXNRD1* beobachtet. Zusätzlich wurde die Expression von *FTH1*, das für eine Untereinheit des Eisenspeicherproteins Ferritin kodiert und dessen Veränderung eine Interaktion von Kupfer mit dem Eisenstoffwechsel andeuten könnte, mehr als verdoppelt. Das eigentlich dem Fremdstoffmetabolismus zugehörige Gen *NQO1*, dessen kodiertes Protein innerhalb des Phase-II-Metabolismus Chinone zu Hydrochinonen detoxifiziert, wurde ebenfalls bis zu 2-fach vermehrt exprimiert.

CuCl₂ führte in BEAS-2B-Zellen zu einer vergleichbar gesteigerten Expression von *FTH1*, *GCLC*, *GSR* und *TXNRD1* und sogar zu einer stärkeren Induktion von *NQO1*. *PRDX1* und *SOD1* wurden hingegen nicht erhöht exprimiert. Insgesamt fiel jedoch auf, dass die deutlichsten Effekte durch CuCl₂ zumeist durch die zweithöchste Konzentration von 126 µM auftraten und in der höchsten Dosis von 252 µM wieder abgeschwächt waren (Abbildung 42, Anhang 8.6.6.2). Die Behandlung mit CuO MP hingegen bewirkte keine relevante Veränderung der Transkriptmengen.

Tabelle 5 Einfluss von CuO NP, CuO MP und CuCl₂ auf die Expression von Genen, die mit der antioxidativen Abwehr assoziiert sind. BEAS-2B- und A549-Zellen wurden für 24 Stunden mit den Kupferverbindungen inkubiert. Die Werte stellen die größten Veränderungen der Genexpression + SD von vier Bestimmungen aus zwei unabhängigen Versuchen dar, die hauptsächlich durch die höchste Konzentration (20 µg/mL bzw. 252 µM) ausgelöst wurden. Die mit * markierten Werte wurden nicht durch die jeweils höchste Konzentration, sondern durch 10 µg/mL bzw. 126 µM erreicht. Die Expression von *GPX1* wurde die BEAS-2B-Zellen gemessen und die von *GPX2* in A549-Zellen. Grün = Induktion, Rot = Repression.

| Gen | BEAS-2B (Relative Genexpression) | | | A549 (Relative Genexpression) | | |
|------------------|-------------------------------------|----------|-------------------|----------------------------------|----------|-------------------|
| | CuO NP | CuO MP | CuCl ₂ | CuO NP | CuO MP | CuCl ₂ |
| <i>CAT</i> | 0,7 +0,0 | 0,9 +0,0 | 1,1 +0,0 | 0,7 +0,2 | 1,0 +0,2 | 1,1 +0,2 |
| <i>FTH1</i> | 2,6 +0,5 | 1,1 +0,3 | 2,5* +0,1 | 0,9 +0,3 | 1,1 +0,3 | 1,0 +1,5 |
| <i>GCLC</i> | 2,3 +0,3 | 1,1 +0,2 | 2,4* +0,1 | 0,5 +0,0 | 0,9 +0,1 | 0,5 +0,1 |
| <i>GPX1/GPX2</i> | 0,6 +0,0 | 1,0 +0,1 | 0,8 +0,1 | 0,5 +0,1 | 0,8 +0,1 | 0,8 +0,3 |
| <i>GSR</i> | 1,9 +0,3 | 1,2 +0,1 | 1,9* +0,1 | 0,7 +0,1 | 1,0 +0,0 | 0,8 +0,1 |
| <i>NQO1</i> | 2,2 +0,2 | 1,1 +0,1 | 3,2* +0,4 | 0,7 +0,2 | 1,0 +0,2 | 0,8 +0,1 |
| <i>PRDX1</i> | 2,0 +0,6 | 1,1 +0,1 | 1,4 +0,2 | 1,1 +0,1 | 1,0 +0,1 | 1,1 +0,1 |
| <i>SOD1</i> | 1,8 +0,4 | 1,1 +0,1 | 1,3* +0,1 | 1,0 +0,1 | 1,0 +0,1 | 1,2 +0,0 |
| <i>TXNRD1</i> | 5,2 +1,3 | 1,5 +0,3 | 4,3* +0,2 | 0,6* +0,2 | 1,0 +0,0 | 0,6 +0,0 |

In A549-Zellen wurde die Transkription der mit antioxidativer Abwehr assoziierten Gene gegensätzlich und weniger ausgeprägt beeinflusst (Tabelle 5). Durch CuO NP verringerte

sich die Expression von *GCLC*, *GPX2* und *TXNRD1* und durch CuCl_2 die von *GCLC* und *TXNRD1*.

Insgesamt gelten auch diese Beobachtungen als Maß für die ROS-Generierung durch die Kupferverbindungen und zeigen vor allem die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 an, der maßgeblich an der Regulation der Gene *GCLC*, *GPX1*, *GSR*, *TXNRD1* und *NQO1* beteiligt ist (Kobayashi und Yamamoto 2005). Eine für die Nrf2-Aktivierung relevante Induktion von oxidativem Stress tritt demnach nur in BEAS-2B-Zellen für CuO NP und in abgeschwächter Form für CuCl_2 auf. Die Unterschiede in den Zelllinien können, wie bereits in 5.2.2 erwähnt, auf höhere GSH-Gehalte und eine Daueraktivierung von Nrf2 in A549-Zellen zurückgeführt werden. Da Keap1 in dieser Zelllinie inaktiviert ist, ist die Nrf2-vermittelte Genexpression dauerhaft aktiv und die Transkription kann folglich nicht mehr gesteigert oder induziert werden (Carmichael et al. 1988; Singh et al. 2006). Damit übereinstimmend wurden in dieser Gengruppierung in A549-Zellen nur unveränderte oder geringfügig reprimierte mRNA-Mengen beobachtet und die vermutete Nrf2-Aktivierung in BEAS-2B-Zellen wird umso eindeutiger angezeigt.

5.3.2.2 Einfluss auf Gene der Zellzyklusregulation und Proliferation

In dieser Gruppe wurden durch die Kupferverbindungen Gene von sowohl wachstumsstimulierenden als auch zellzyklusregulierenden Faktoren beeinflusst, wobei zwischen den Zelllinien unterschiedliche Muster beobachtet wurden (Abbildung 17). In BEAS-2B-Zellen wurde *CCND1* durch CuO NP bis 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konzentrationsabhängig bezüglich seiner Transkriptmenge verdoppelt, ab 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ jedoch wieder vermindert exprimiert. CuO MP führten ebenfalls zu einer Verdopplung der mRNA-Menge, wohingegen für CuCl_2 lediglich eine tendenzielle Zunahme bis maximal 1,7 zu beobachten war. Die Transkriptmenge von *CDKN1A*, das für den Zellzyklusinhibitor p21 kodiert, wurde durch CuO NP ab 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ deutlich bis zu einem Maximum von 4,7 für 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ erhöht. Zudem wurde *JUN* durch CuO NP ab 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ verdoppelt. CuO MP und CuCl_2 bewirkten keine veränderten mRNA-Gehalte von *CDKN1A* und *JUN*.

In A549-Zellen wurde *CDKN1A* ebenfalls nur durch CuO NP verdoppelt exprimiert. Außerdem ließ sich eine verminderte Expression des Proto-Onkogens *MYC* durch CuO NP und CuCl_2 feststellen.

In beiden Zelllinien war eine Induktion von *CDKN1A*, wodurch eine zellzyklusarretierende Wirkung und damit eine Aktivierung der DNA-Schadensantwort angezeigt werden, auf CuO NP beschränkt. Deutliche Effekte traten dabei erst ab hohen Konzentrationen auf. In BEAS-2B-Zellen weist die gesteigerte Expression des Proto-Onkogens *JUN* übereinstimmend mit der beobachteten Induktion von *IL8* (Abbildung 16) und *HMOX1* (Abbildung 15) zudem auf die Aktivierung von AP-1 durch CuO NP hin.

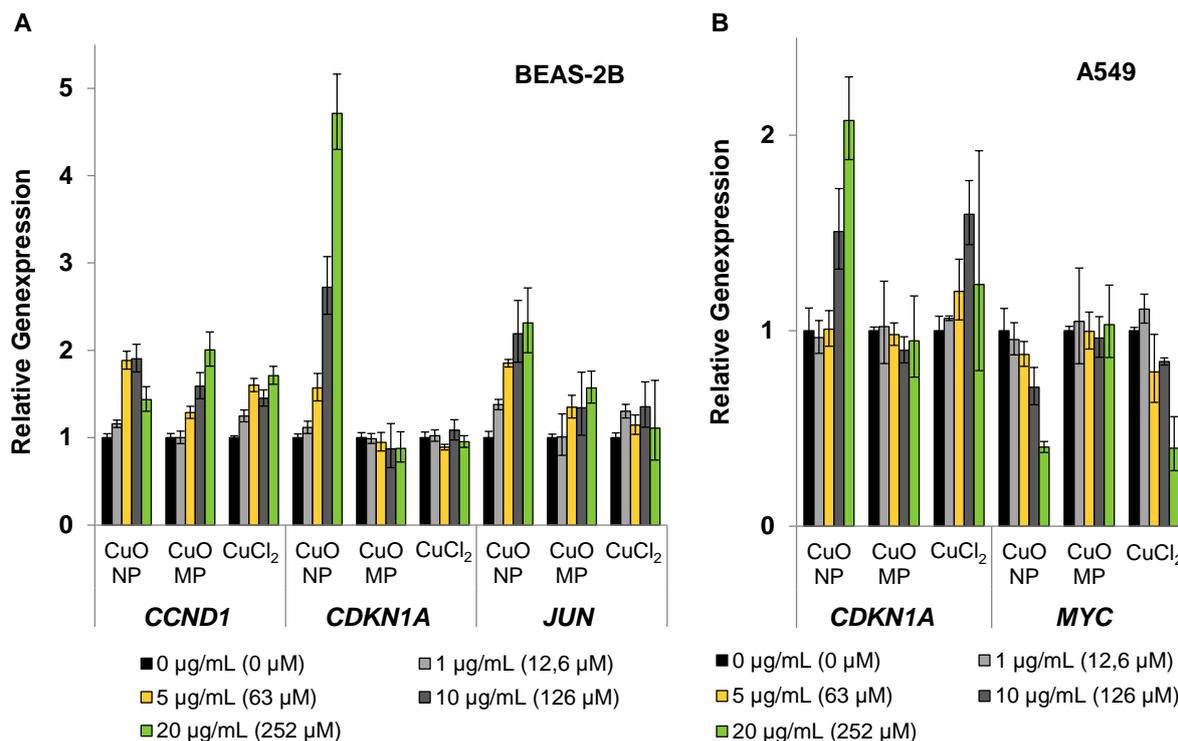


Abbildung 17 **Einfluss von CuO NP, CuO MP und CuCl₂ auf die Expression von Genen, die mit Proliferation und Zellzyklusregulation assoziiert sind.** BEAS-2B-Zellen (A) oder A549-Zellen (B) wurden für 24 Stunden mit den Kupferverbindungen inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD von vier Bestimmungen aus zwei unabhängigen Versuchen. 20 µg/mL CuO entsprechen 252 µM Cu²⁺ im Falle kompletter Kupferfreisetzung. Man beachte die unterschiedlichen Skalierungen der y-Achsen.

5.3.2.3 Einfluss auf Gene der Apoptose

In der Gruppe der Apoptose assoziierten Gene wurden, wie in Abbildung 18 gezeigt, ausschließlich *PMAIP1* und *TNFRSF10B* relevant durch CuO NP in BEAS-2B-Zellen modifiziert. Dabei verdoppelte sich die Expression von *PMAIP1*, das für das proapoptotische Protein Noxa kodiert, durch CuO NP bereits ab 5 µg/mL und wurde bei 20 µg/mL verfünffacht. *TNFRSF10B*, das für den extrinsischen Todesrezeptor DR5 kodiert, wurde durch CuO NP maximal 2-fach erhöht exprimiert. CuO MP und CuCl₂ induzierten keine relevanten Änderungen beider Gene.

In A549-Zellen wurden ausschließlich Tendenzen beobachtet (Abbildung 43, Anhang 8.6.6.2). Dabei zeigte sich der mRNA-Gehalt von *PMAIP1* durch CuO NP und CuCl₂ schwach erhöht, und die antiapoptotischen Gene *BCL2* und *BCL2L1* wurden tendenziell vermindert exprimiert.

In BEAS-2B-Zellen deutet die Induktion von *PMAIP1* und *TNFRSF10B* als proapoptotisches Signal eine Aktivierung der DNA-Schadensantwort in Form der Apoptose nur für CuO NP an. Dabei scheint sowohl die intrinsische als auch die extrinsische Kaskade beeinflusst zu sein. Im Gegensatz dazu wurden in A549-Zellen ausschließlich Gene von Faktoren der intrinsischen Kaskade tendenziell beeinflusst, wodurch erneut eine zelltypspezifische Reaktion angezeigt wird.

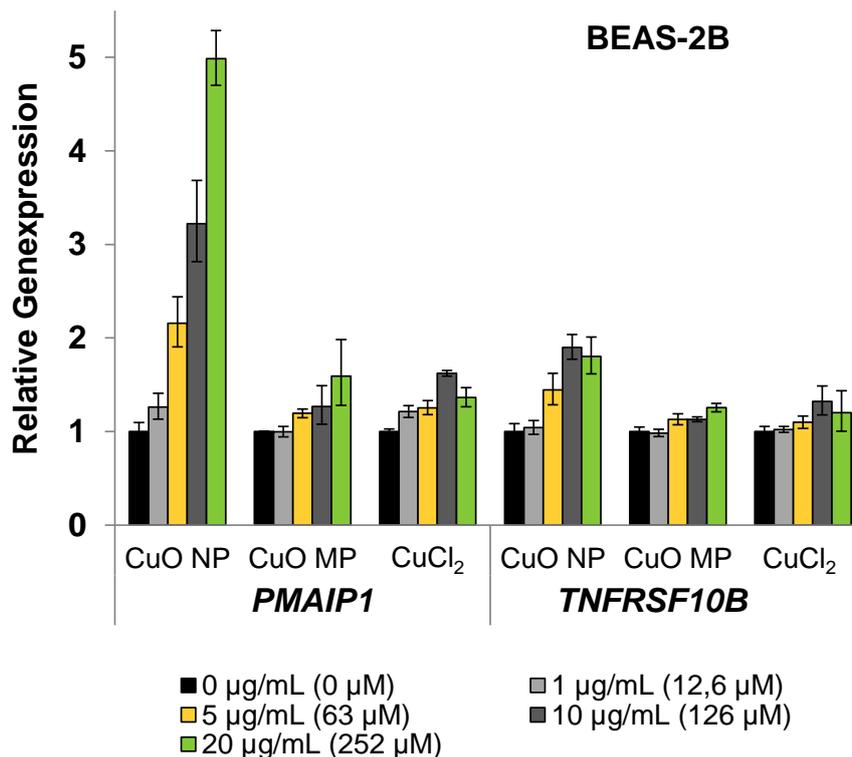


Abbildung 18 **Einfluss von CuO NP, CuO MP und CuCl₂ auf die Expression der Apoptose assoziierten Gene PMAIP1 und TNFRSF10B.** BEAS-2B-Zellen wurden für 24 Stunden mit den Kupferverbindungen inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD von vier Bestimmungen aus zwei unabhängigen Versuchen. 20 µg/mL CuO entsprechen 252 µM Cu²⁺ im Falle kompletter Kupferfreisetzung.

5.3.2.4 Einfluss auf Gene der DNA-Schadensantwort und -Reparatur

Das Muster der Beeinflussung von Genen dieser Signalgruppierung war, wie in Tabelle 6 zusammengefasst, innerhalb der Zelllinien vergleichbar, aber zwischen den Kupferverbindungen und bezüglich der Effektausprägung unterschiedlich. In BEAS-2B-Zellen wurde die Transkriptmenge von *DDIT3* durch CuO NP maximal 3-fach erhöht, durch CuCl₂ 2-fach und durch CuO MP nicht relevant beeinflusst. Die Expression von *GADD45A* wurde durch CuO NP um den Faktor 8 erhöht und durch CuO MP und CuCl₂ lediglich ca. 2-fach. In A549-Zellen wurden durch CuO NP nur *DDIT3* nahezu 3-fach und durch CuCl₂ *GADD45A* 2,4-fach gesteigert abgelesen.

Das Ausmaß einer möglichen DNA-schädigenden Wirkung ist diesen Beobachtungen zufolge durch CuO NP zum einen in BEAS-2B-Zellen deutlich markanter als in A549-Zellen und zum anderen viel stärker im Vergleich zu den Referenzverbindungen. Diese These bestätigend beobachteten Cronholm und Kollegen eine auftretende DNA-Schädigung durch CuO NP anhand des Comet-Assays in BEAS-2B-Zellen, wohingegen der Effekt in A549-Zellen oder durch CuCl₂ in BEAS-2B-Zellen nicht signifikant war (Cronholm et al. 2013). In unserer Arbeitsgruppe wurde die Induktion von DNA-Strangbrüchen mittels Alkalischer Entwindung in HeLa S3-Zellen untersucht, wobei ein genotoxisches Potential nur für

CuO NP festgestellt werden konnte. Unter prooxidativen Bedingungen erhöhten jedoch alle Substanzen die Anzahl an Strangbrüchen mit CuO NP als stärkstem Agens (Semisch et al. 2014). In höheren zytotoxischen Konzentrationen führten CuO NP auch in A549-Zellen hauptsächlich in Form oxidativer Schäden zu DNA-Läsionen (Midander et al. 2009; Karlsson et al. 2009; Wang et al. 2012). Die Induktion von DNA-Strangbrüchen durch wasserlösliche Kupferverbindungen wie CuSO₄ wurde eingeschränkt erst für hohe zytotoxische Konzentrationen über 300 µM beobachtet (Schwerdtle et al. 2007).

Tabelle 6 Einfluss von CuO NP, CuO MP und CuCl₂ auf die Expression von Genen, die mit der DNA-Schadensantwort und -Reparatur assoziiert sind. BEAS-2B- und A549-Zellen wurden für 24 Stunden mit den Kupferverbindungen inkubiert. Die Werte stellen die größten Veränderungen der relativen Genexpression + SD von vier Bestimmungen aus zwei unabhängigen Versuchen dar, die hauptsächlich durch die höchste Konzentration (20 µg/mL bzw. 252 µM) ausgelöst wurden. Die mit * markierten Werte wurden nicht durch die jeweils höchste Konzentration, sondern durch 10 µg/mL bzw. 126 µM erreicht. Grün = Induktion, Rot = Repression, n.b. = nicht bestimmt.

| Gen | BEAS-2B (Relative Genexpression) | | | A549 (Relative Genexpression) | | |
|----------------|-------------------------------------|----------|-------------------|----------------------------------|----------|-------------------|
| | CuO NP | CuO MP | CuCl ₂ | CuO NP | CuO MP | CuCl ₂ |
| <i>DDIT3</i> | 2,9 +2,8 | 1,4 +0,4 | 1,9* +0,2 | 2,7 +0,7 | 1,5 +0,4 | n. b. |
| <i>GADD45A</i> | 8,4 +1,8 | 2,4 +0,7 | 2,3* +0,4 | 1,3 +1,0 | 1,3 +0,6 | 2,4 +2,0 |
| <i>DDB2</i> | 0,4 +0,0 | 0,7 +0,0 | 0,7 +0,1 | 0,9 +0,1 | 0,9 +0,0 | 0,5 +0,2 |
| <i>LIG1</i> | 0,6 +0,1 | 0,9 +0,1 | 0,8 +0,2 | 0,6 +0,0 | 1,0 +0,2 | 0,5 +0,2 |
| <i>MSH2</i> | 0,8 +0,1 | 1,0 +0,0 | 1,2 +0,1 | 0,6 +0,1 | 1,1 +0,2 | 1,3 +0,2 |
| <i>OGG1</i> | 0,6 +0,1 | 0,9 +0,0 | 0,9 +0,2 | 0,8 +0,1 | 1,0 +0,1 | 0,8 +0,1 |
| <i>PARP1</i> | 0,6 +0,1 | 0,9 +0,1 | 1,1 +0,1 | 0,6 +0,2 | 1,1 +0,1 | 0,6 +0,1 |
| <i>PCNA</i> | 0,6 +0,0 | 0,9 +0,1 | 1,0 +0,1 | 0,7 +0,2 | 1,1 +0,1 | 1,5 +0,3 |
| <i>POLD1</i> | 0,7 +0,3 | 0,8 +0,1 | 0,8 +0,3 | 0,5 +0,1 | 1,0 +0,2 | 0,4 +0,3 |
| <i>XPC</i> | 0,6 +0,1 | 0,8 +0,0 | 0,9 +0,1 | 0,7 +0,2 | 1,0 +0,2 | 0,6 +0,1 |

Bezüglich der Gene, die für Proteine der DNA-Reparatur kodieren, wurden ausschließlich reprimierte Transkriptmengen festgestellt (Tabelle 6). In BEAS-2B-Zellen beschränkten sich deutliche Veränderungen auf die Behandlung mit CuO NP. Die BER-assoziierten Gene *LIG1*, *OGG1* und *PARP1*, die NER-assoziierten Gene *DDB2*, *XPC* sowie *PCNA*, dessen korrespondierendes Protein an der Replikation beteiligt ist, wurden vermindert exprimiert. In A549-Zellen wurden durch CuO NP ebenfalls die Transkriptmengen von *LIG1* und *PARP1* und zusätzlich das MMR-assoziierte *MSH2* sowie *POLD1* reprimiert. Im Gegensatz zu BEAS-2B-Zellen wurden in dieser Zelllinie auch durch CuCl₂ Wirkungen beobachtet. Ähnlich

wie durch CuO NP in BEAS-2B-Zellen wurden *DDB2*, *LIG1*, *PARP1* und *XPC* und darüber hinaus auch *POLD1* vermindert exprimiert.

In verschiedenen Studien konnten in Bezug auf DNA-Reparaturfaktoren, die in dieser Arbeit durch die Kupferverbindungen auf Transkriptionsebene beeinflusst wurden, auch Wechselwirkungen auf Proteinebene nachgewiesen werden. Diesbezüglich wurde gezeigt, dass Kupferionen bereits in nicht-zytotoxischen Konzentrationen die BER-Proteine PARP1, Fpg und hOGG1 sowie das NER-assoziierte XPA hemmen (Asmuss et al. 2000; Schwerdtle et al. 2007; Hamann et al. 2009). Neuere Untersuchungen wiesen eine inhibierende Wirkung auf PARP1 auch durch CuO NP und CuO MP nach (Semisch et al. 2014). Die Genexpressionsanalysen ergänzen diese mechanistischen Wirkungen, da es sich bei den beeinflussten Genen hauptsächlich um Faktoren der NER und der BER handelt. Mittels BER werden durch Kupferionen induzierte oxidative Basenschäden repariert und einige reprimierte Gene sind, wie beschrieben, auch auf Proteinebene ein Ziel der Kupfertoxizität. Wie bei CdCl₂ ist die Ursache dieser Repressionen, die durch inhibierte Transkriptionsfaktoren oder eine veränderte mRNA-Stabilität ausgelöst werden können, nicht geklärt. Zudem können keine Aussagen über Wechselwirkungen auf Proteinebene oder über die resultierenden Proteinmengen getroffen werden, da keine direkte Korrelation zwischen Transkription und Translation besteht.

Trotz der hier beschriebenen eindeutigen Aktivierung der DNA-Schadensantwort auf transkriptioneller Ebene zeigten die Analysen keine Aktivierung von p53 an, da keine veränderte Transkriptmenge von *MDM2*, das wie bereits erwähnt im Zuge eines negativen feedback von aktiviertem p53 induziert wird, durch die Kupferverbindungen beobachtet wurde (Abbildung 44, Anhang 8.6.6.2). In BEAS-2B-Zellen war dieser Sachverhalt aufgrund der Inaktivierung des Tumorsuppressors zu erwarten (Levine 2009). Die Induktion anderer, oft durch p53-regulierte Gene wie *GADD45A*, *CDKN1A* oder *PMAIP1* muss in dieser Zelllinie somit über andere Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP-1, BRCA1 oder c-Jun erfolgen, die ebenfalls an der Regulation dieser Gene beteiligt sind (Zhan 2005; Perez-Galan et al. 2006). In A549-Zellen hingegen ist die vermutete fehlende Aktivierung von p53 schwerer zu erklären. Zudem widersprechen diese Ergebnisse den Beobachtungen von Ahamed und Kollegen, die erhöhte Proteingehalte von p53 und Mdm2 nach Behandlung mit CuO NP in A549-Zellen feststellten, sowie denen von Wang und Kollegen, die nach 4-stündiger Behandlung erhöhte Transkriptmengen von *TP53* fanden (Ahamed et al. 2010; Wang et al. 2012). Auf die letzte Studie bezugnehmend muss jedoch betont werden, dass vier Stunden eine sehr kurze Zeitspanne für Veränderungen der Genexpression und mRNA-Neusynthese sind und andere Einflüsse, wie z.B. die Stabilität schon bestehender mRNA, realistischere Gründe darstellen. Hanagata und Kollegen berichteten übereinstimmend mit unseren Beobachtungen innerhalb der Genexpression keine Beeinflussung von p53 durch CuO NP in

A549-Zellen (Hanagata et al. 2011). Zudem wurde in den hier durchgeführten Analysen in dieser Zelllinie nur ein bekanntes Zielgen von p53, *CDKN1A*, transkriptionell induziert, und dieser Effekt kann ebenfalls p53-unabhängig vermittelt sein (Gartel und Tyner 1999).

5.3.3 Beeinflussung von zellulären Prozessen durch CuO NP, CuO MP und CuCl₂

Die Beobachtungen der Genexpressionsanalysen wurden anschließend durch Experimente über die Beeinflussung verschiedener zellulärer Vorgänge auf funktioneller Ebene weiterverfolgt. Da systematische Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe in A549-Zellen bereits stattfanden (Semisch et al. 2014) und die Genexpressionsprofile in BEAS-2B-Zellen insgesamt aussagekräftiger und vielfältiger modifiziert ausfielen, wurden nur BEAS-2B-Zellen als weiterführendes Modellsystem verwendet.

5.3.3.1 Zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung

Zur Ermittlung der zellulären Aufnahme wurden BEAS-2B-Zellen für 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen an CuO NP, CuO MP und CuCl₂ inkubiert und die zellulären Kupfergehalte mittels GF-AAS ermittelt. Da Inkubationen mit Substanzen in partikulärer Form das Problem bergen, dass Partikel nach der Inkubation durch Waschen nur zu gewissen Anteilen von intra- und extrazellulären Membranen entfernt werden können, bestand die Gefahr eines Überbefundes. Um diese potentielle Überbestimmung zu verhindern, wurde für die Aufarbeitung der Zellen eine Methode gewählt, die nur das Kupfer in der löslichen Zellfraktion erfasst, da alle Membranen und somit auch daran gebundene Partikel abgetrennt wurden. Neben der Ermittlung des zellulären Gesamtkupfergehaltes (Abbildung 19A) fanden Untersuchungen zur intrazellulären Verteilung statt, wobei der Kupfergehalt in der löslichen Zytoplasma- und Kernfraktion durch vorangegangene Zellfraktionierung separat bestimmt wurde (Abbildung 19B und C).

Der basale Gesamtkupfergehalt von BEAS-2B-Zellen lag bei 20 µM. Für CuO NP wurde eine ausgeprägte konzentrationsabhängige Akkumulation an intrazellulärem Kupfer beobachtet. Bereits durch 1 µg/mL kam es anhand eines Kupfergehaltes von 330 µM zu einer 18-fachen Zunahme des basalen Wertes. Ab 5 µg/mL wurden millimolare Gehalte festgestellt, wobei der Maximalwert nach Behandlung mit 20 µg/mL 2000 µM betrug. Auch für CuO MP konnte eine konzentrationsabhängige Zunahme des Kupfergehaltes festgestellt werden; diese fiel jedoch deutlich geringer aus. Für 20 µg/mL resultierte eine intrazelluläre Kupferkonzentration von 300 µM und maximal 600 µM bei Behandlung mit 50 µg/mL. Bei identischer Inkubationskonzentration von 20 µg/mL für CuO NP und MP wurde für CuO NP somit eine mehr als 6-fach höhere intrazelluläre Kupferkonzentration ermittelt. Für CuCl₂ zeigte der Kupfergehalt im Konzentrationsbereich von 12,6-252 µM relativ konstante Werte von 250-400 µM und stieg erst bei 630 µM deutlich auf 770 µM an. In den niedrigen

Konzentrationen schien somit eine regulierte Aufnahme über Homöostase zu erfolgen, insgesamt waren die Gehalte mit CuO MP vergleichbar.

Die Untersuchungen zur intrazellulären Verteilung bestätigten die beobachtete Akkumulation von CuO NP. Der zytoplasmatische Zellanteil betrug für BEAS-2B-Zellen etwa 90 % der gesamten Zelle, weshalb die Kupfergehalte im Zytoplasma im Prinzip die der Gesamtaufnahme widerspiegeln sollten. Diese These bestätigend betrug der Gehalt für CuO NP im Zytoplasma für 1 µg/mL 370 µM und stieg konzentrationsabhängig auf maximal rund 1600 µM für 20 µg/mL. Die im Vergleich zur Gesamtaufnahme leicht erniedrigten Werte könnten auf die fehlenden hohen Kernkupferkonzentrationen zurückgeführt werden. Für CuO MP konnte prinzipiell ebenfalls die im Vergleich zu CuO NP deutlich geringer ausfallende konzentrationsabhängige Zunahme an Kupfer bestätigt werden. Jedoch waren die beobachteten Kupfergehalte im Zytoplasma vor allem in den hohen Konzentrationen deutlich höher als die der Gesamtaufnahme. Es kam zu einem Anstieg von 63 µM (1 µg/mL) über 520 µM (5 µg/mL) bis zu 1850 µM (50 µg/mL). Die auftretenden großen Standardabweichungen vor allem ab 20 µg/mL könnten dabei die Diskrepanz der Ergebnisse erklären. Diese resultieren zum einen durch die bei Partikelinkubationen unvermeidbaren starken Abweichungen der Messergebnisse, die vor allem bei den großen MP ins Gewicht fallen. Abhängig davon, wie viele Partikel in die Zelle gelangen, treten schon bei leichten Unterschieden sehr starke Schwankungen auf. Zum anderen könnten auch bei der Aufarbeitung der Zellen Probleme mit Partikeln aufgetreten sein. Die Zentrifugationsbedingungen zur Abtrennung aller membranassoziierten Partikel konnten während der Fraktionierung nicht so hoch gewählt werden wie bei der Gesamtaufnahme, um intakte Kernmembranen zu gewährleisten. Dadurch wäre eine unvollständigere Abtrennung membranassoziierten Partikel denkbar.

Für CuCl₂ zeichnete sich bis 252 µM wieder das Auftreten der homöostatisch regulierten Aufnahme ab. Die zytoplasmatischen Kupfergehalte waren dabei, wie bei CuO NP, mit Werten von 150 µM für 12,6 µM bis 380 µM für 252 µM leicht niedriger als bei der Gesamtaufnahme.

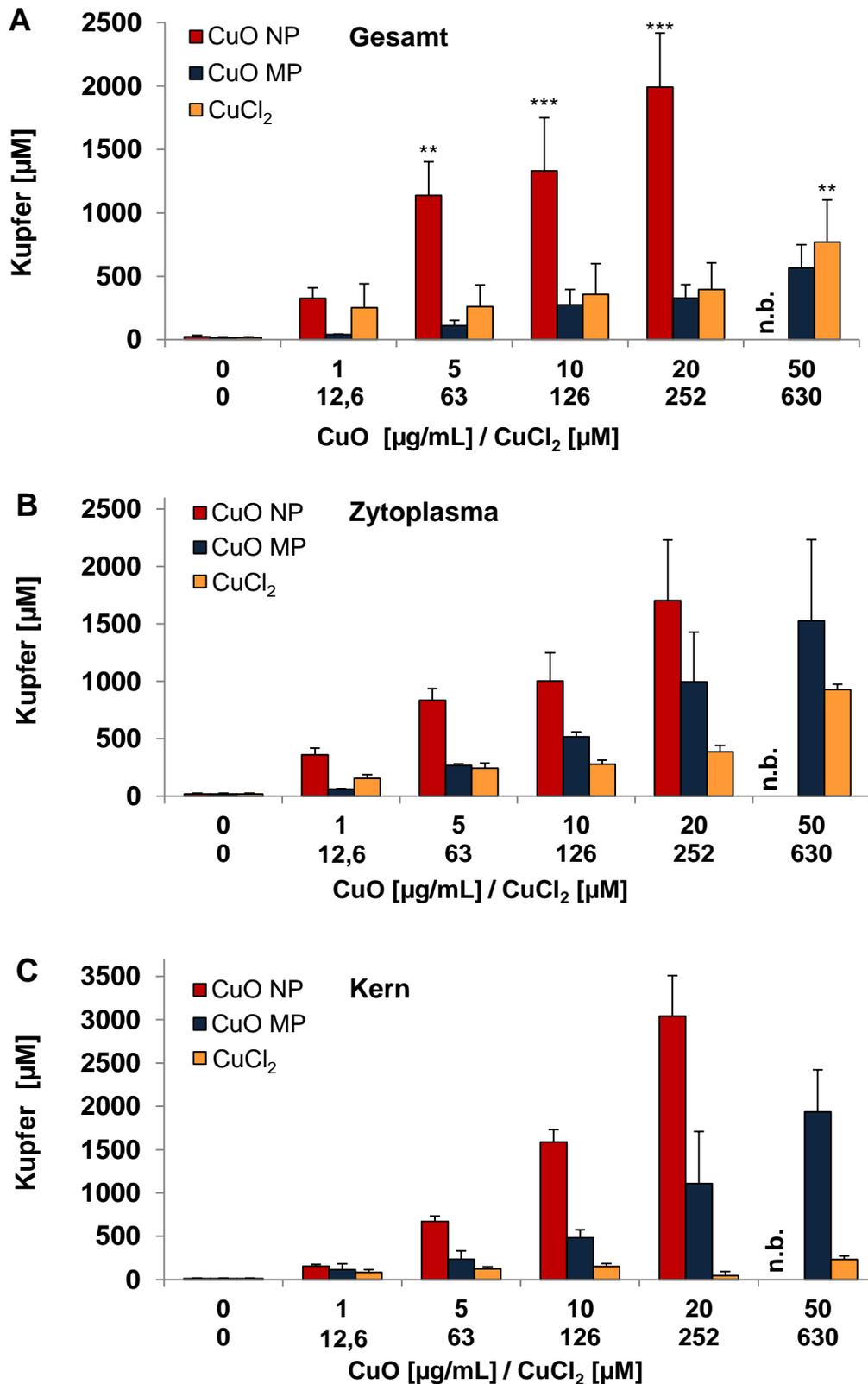


Abbildung 19 Zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung von Kupfer nach Behandlung mit CuO NP, CuO MP und CuCl₂. Der Kupfergehalt in der löslichen Fraktion der gesamten Zelle (A), des Zytoplasmas (B) und des Kerns (C) von BEAS-2B-Zellen wurde nach 24-stündiger Inkubation mit den Kupferverbindungen mittels GF-AAS bestimmt. Gezeigt sind die MW + SD aus drei unabhängigen (A) oder die MW + R/2 aus zwei unabhängigen Versuchen (B, C). Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett's T Post-Hoc-Test (nur A): * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001. 50 µg/mL CuO entsprechen 630 µM Cu²⁺ im Falle kompletter Kupferfreisetzung.

Die lösliche Fraktion des Zellkerns wies unbehandelt einen durchschnittlichen Kupfergehalt von 11 μM auf. CuO NP bewirkten eine drastische Kupferakkumulation im Kern beginnend bei 670 μM für 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bis zu 3 mM für 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, wobei sich zwischen Inkubationskonzentration und resultierendem Gehalt ein linearer Zusammenhang ergab. CuO MP führten zu einem viel niedrigeren Anstieg; bis 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lag die Kernkupferkonzentration unter 500 μM und ein millimolarer Gehalt wurde erst in hohen Konzentrationen ab 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ erreicht. CuCl₂ zeigte übereinstimmend mit der vermuteten homöostatischen Regulation nur einen sehr geringen Anstieg der Kernkupferkonzentration: Für die Inkubationskonzentrationen 12,6-252 μM CuCl₂ schwankte der Kupfergehalt zwischen rund 50-150 μM und stieg für 630 μM auf lediglich 230 μM an.

Zusammenfassend konnte für CuO NP eine sehr starke Akkumulation von Kupfer sowohl im Zytoplasma und vor allem auch im Zellkern nach 24 Stunden festgestellt werden. Diese war um ein Vielfaches ausgeprägter als für die Referenzverbindungen. Während die Kupfergehalte durch CuO MP deutlich geringer, jedoch auch konzentrationsabhängig verliefen, konnte für CuCl₂ eine regulierte Aufnahme beobachtet werden. Diese Ergebnisse werden durch die beschriebene unterschiedliche Induktion der *MT*-Gene (siehe 5.3.2.1), die für CuO NP am deutlichsten und vergleichbar schwächer für CuO MP und CuCl₂ erfolgte, in hohem Maße reflektiert.

Durch zeitabhängige Aufnahmeuntersuchungen mit CuO NP und CuO MP konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die ausgeprägte Kupferakkumulation vor allem nach Behandlung mit CuO NP sehr rasch erfolgte. Bereits nach einer Stunde wurden dabei durch 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CuO NP etwa 500 μM intrazelluläres Kupfer beobachtet, was etwa der Hälfte des maximalen Kupfereintrages nach 24 Stunden entspricht, und nach 8-stündiger Inkubation wurden millimolare Gehalte erreicht. Durch CuO MP kam es zu einer zeitabhängigen, relativ konstanten Zunahme des zellulären Kupfereintrages, wobei bereits nach acht Stunden der maximale Kupferlevel von 24 Stunden erreicht war (siehe Abbildung 45, Anhang 8.6.6.3).

Auch in A549-Zellen konnte in einer vorangegangenen Arbeit eine deutliche Kupferakkumulation von CuO NP in Zytoplasma und Kern beobachtet werden. Mit Maximalwerten von rund 600 μM zytosolischem und etwa 1300 μM Kernkupfer im gleichen Konzentrationsbereich fiel diese im Vergleich zu den hier gezeigten Daten jedoch geringer aus (Semisch et al. 2014). Die höhere Aufnahme von CuO NP in BEAS-2B- im Vergleich zu A549-Zellen wurde ebenfalls von Cronholm und Kollegen beobachtet (Cronholm et al. 2013) und korreliert zudem ebenfalls mit den Ergebnissen der in dieser Arbeit erhobenen Genexpressionsanalysen bezüglich der Gene *MT1X* und *MT2A*.

Die Untersuchungen stützen die These, dass partikuläre und wasserlösliche Kupferverbindungen über unterschiedliche Mechanismen in die Zelle aufgenommen werden.

Die konzentrationsabhängige Akkumulation von CuO NP und CuO MP bekräftigt die vermutete Aufnahme über Endozytose, die neben CuO NP auch für andere Nanopartikel bereits nachgewiesen wurde (Zhang et al. 2009; Sahay et al. 2010; Lunov et al. 2010; Wang et al. 2012; Canton und Battaglia 2012). Die Umgehung der kontrollierten homöostatischen Aufnahme, wie sie z.B. bei CuCl₂ zum Tragen kommt, führt dabei zu der beobachteten Kupferüberladung der Zellen, die sehr wahrscheinlich in erhöhten Mengen von freien reaktiven Kupferionen gemäß des von Limbach und Kollegen diskutierten *trojan horse type* Mechanismus resultiert (Limbach et al. 2007), wodurch prooxidative und potentiell toxische Reaktionen ausgelöst werden können.

5.3.3.2 Untersuchungen zur oxidativen Stressantwort

Die durch die Genexpressionsanalysen angezeigte Induktion von oxidativem Stress und Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 wurden durch Untersuchungen zum intrazellulären GSH-Gehalt in BEAS-2B-Zellen sowie einer möglichen Nrf2-Aktivierung in HeLa S3-Zellen nach Behandlung mit CuO NP, CuO MP und CuCl₂ überprüft.

Eine Aktivierung von Nrf2 wurde unter Nutzung eines TransAM-Nrf2-Assays untersucht, bei dem die Bindungskapazität von ausschließlich im Kern lokalisiertem Nrf2 an die ARE-Konsensussequenz mittels ELISA gemessen wird. Die Untersuchungen wurden in HeLa S3-Zellen durchgeführt, da die nukleären Nrf2-Gehalte innerhalb einer geeigneten Zellmenge in BEAS-2B-Zellen zu gering und A549-Zellen aufgrund der Nrf2-Daueraktivierung ungeeignet waren. Der Einsatz dieser Modellzelllinie erschien geeignet, da der basale GSH-Gehalt wie in BEAS-2B-Zellen niedriger als in A549-Zellen (Chao et al. 1992) und zudem keine Fehlregulation von Nrf2 bekannt ist.

Die Nrf2-Aktivierung wurde nach einer 5-stündigen Inkubationszeit in anhand der Zytotoxizität ausgewählten Konzentrationsbereichen von 5-40 µg/mL oder 63-504 µM untersucht (Abbildung 20). CuO NP führten im gesamten Dosisbereich zu einer deutlichen Aktivierung auf 180-210 %, wohingegen CuO MP keine veränderte Nrf2-Aktivität bewirkten. CuCl₂ führte nur bei 504 µM zu einer Aktivierung; dabei war das Ausmaß jedoch mit den Effekten von CuO NP vergleichbar. Übereinstimmend mit der Induktion der Nrf2-Zielgene *GCLC*, *GSR*, *TXNRD1* und *NQO1*, die für CuO NP und in höheren Konzentrationen auch für CuCl₂ auf eine Aktivierung von Nrf2 hindeuteten, konnte diese somit in HeLa S3-Zellen mechanistisch bestätigt werden.

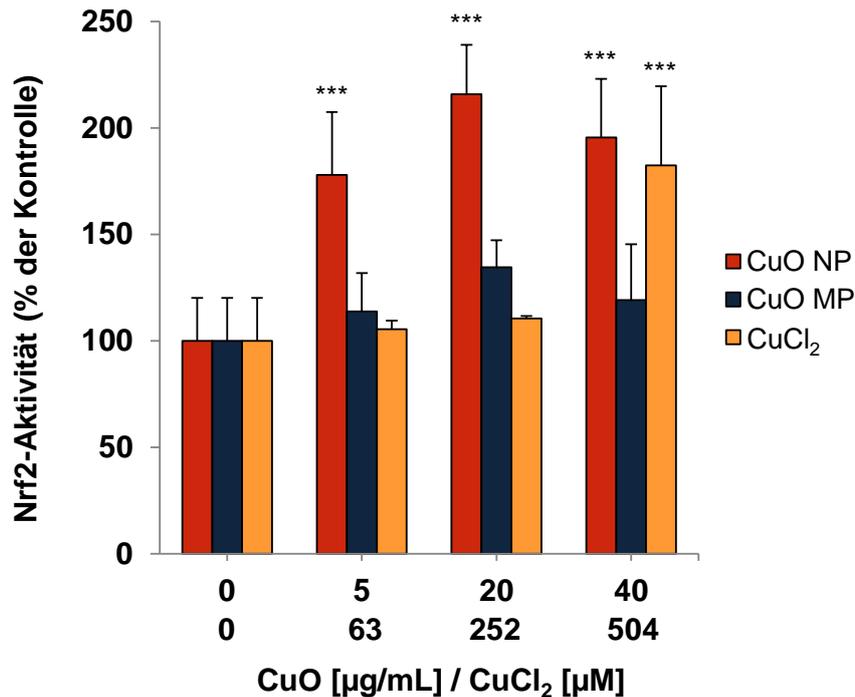


Abbildung 20 **Einfluss von CuO NP, CuO MP und CuCl₂ auf die Nrf2-Aktivierung.** HeLa S3-Zellen wurden für fünf Stunden mit den Kupferverbindungen inkubiert und nach Zellfraktionierung wurde die Bindungsaffinität von nukleärem Nrf2 an die ARE-Konsensussequenz mittels ELISA bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte + SD aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett's T Post-Hoc-Test: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$. 40 µg/mL CuO entsprechen 504 µM Cu²⁺ im Falle kompletter Kupferfreisetzung.

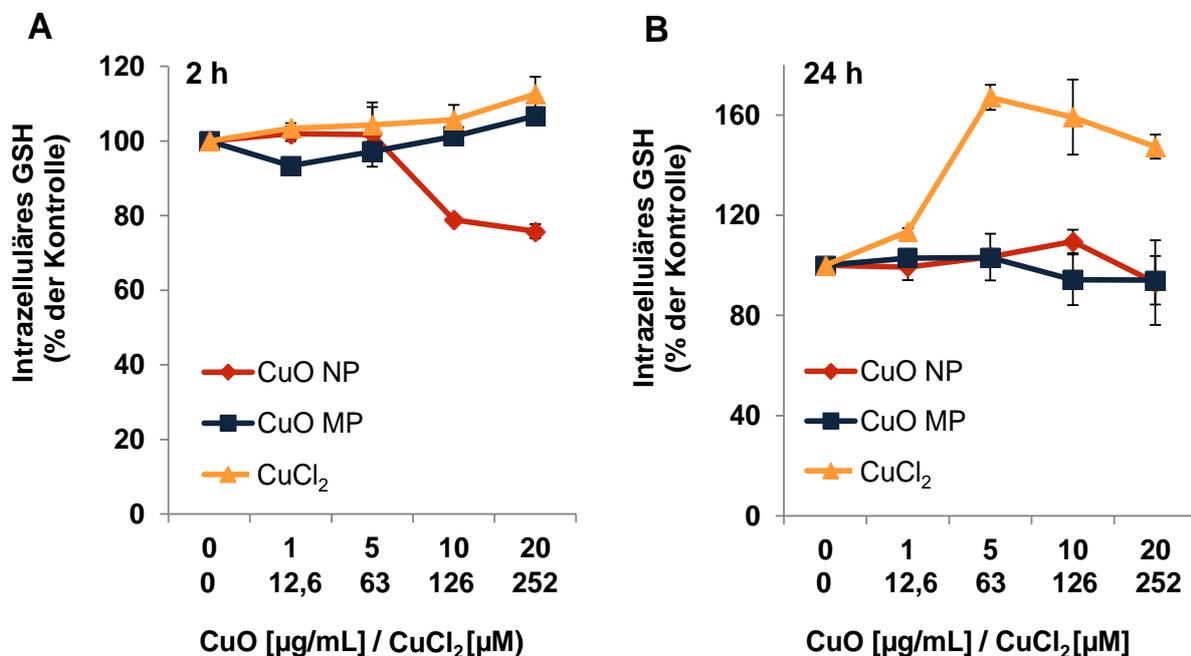


Abbildung 21 **Einfluss von CuO NP, CuO MP und CuCl₂ auf den intrazellulären GSH-Level.** BEAS-2B-Zellen wurden für zwei Stunden (A) oder 24 Stunden (B) mit den Kupferverbindungen inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SD von vier Bestimmungen aus zwei unabhängigen Versuchen.

Eine mögliche Beeinflussung des Gesamt-GSH-Gehaltes durch die Kupferverbindungen in BEAS-2B-Zellen wurde nach 2- und 24-stündiger Inkubation mittels der Recyclingmethode nach Tietze untersucht (Tietze 1969). Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt. Da der intrazelluläre GSH-Gehalt direkt durch oxidativen Stress beeinflusst wird, kann dessen Bestimmung Aufschluss über den vorliegenden oxidativen Stresslevel geben. CuO NP führten nach 2-stündiger Inkubation ab 10 µg/mL zu einer Verringerung des GSH-Gehaltes auf ca. 80 %. Zu diesem Zeitpunkt waren bei CuO MP und CuCl₂ keine Effekte zu verzeichnen. Nach 24 Stunden veränderten weder CuO NP noch CuO MP den intrazellulären GSH-Gehalt, jedoch bewirkte CuCl₂ ab 63 µM eine deutliche Erhöhung auf 150-170 %.

Diese differenten Beobachtungen implizieren, dass die partikulären Verbindungen und lösliches CuCl₂ weder gleich schnell noch im gleichen Ausmaß in die Zelle aufgenommen wurden, weshalb es zu unterschiedlichen Zeitpunkten zur Induktion von oxidativem Stress und resultierenden zellulären Effekten kommt. Die CuO NP-vermittelte GSH-Depletion kann als indirekter Marker für erhöhte ROS-Mengen gesehen werden, da GSH während eines ROS-Abbaus zu GSSG oxidiert wird (Cnubben et al. 2001). Eine erhöhte Generation von ROS durch CuO NP wurde nach vier Stunden mittels DCFH-DA-Methode von Karlsson und Kollegen in A549-Zellen beobachtet (Karlsson et al. 2008). In einer weiteren Untersuchung von A549-Zellen konnte die hier ebenfalls festgestellte frühe Induktion von ROS durch CuO NP bereits nach 1-stündiger Inkubation gezeigt werden. Dabei wurde zusätzlich nach 2,5 Stunden in niedrigen Dosen (24 µg/mL) ein leicht erhöhter Anteil an oxidiertem GSSG beobachtet und erst in hohen Dosen (100 µg/mL) eine drastische GSH-Depletion (Seiffert et al. 2012). Eine weitere Studie bestätigte die Induktion von oxidativem Stress anhand einer GSH-Depletion, Lipidperoxidation sowie erhöhter Aktivitäten der Enzyme Katalase (CAT) und SOD nach 24-stündiger Inkubation (Ahamed et al. 2010). Auch in Hep-2-Zellen wurden erhöhte ROS-Mengen durch CuO NP, aber auch durch SiO₂ und Fe₂O₃ Nanopartikel induziert; darüber hinaus inhibierten aber nur CuO NP, gemessen an erhöhten GSSG-Gehalten und reduzierter CAT- sowie GSH-Reduktase(GR)-Aktivität, das gesamte antioxidative Abwehrsystem (Fahmy und Cormier 2009). Die für CuCl₂ beobachtete Überkompensation wird häufig als längerfristige Reaktion der Zelle auf eine durch erhöhte ROS ausgelöste vorangegangene GSH-Depletion induziert. Diese Verringerung konnte jedoch, da sie nicht nach zwei Stunden auftrat, aufgrund fehlender Untersuchungen zu weiteren Zeitpunkten nicht belegt werden.

5.3.3.3 Untersuchungen zur Aktivierung der DNA-Schadensantwort

Eine Aktivierung des DNA-Schadensantwortsystems wurde auf zellulärer Ebene durch Untersuchungen zur Zellzyklusregulation sowie der Induktion von Apoptose oder Nekrose

nach verschiedenen Zeitpunkten mit unterschiedlichen durchflusszytometrischen Ansätzen weiterverfolgt.

Um den Einfluss der Kupferverbindungen auf den Zellzyklus zu ermitteln, wurde die Verteilung der Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen unter Verwendung des DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gemessen. Dabei lässt sich anhand der Zunahme der DAPI-Intensität auf die DNA-Menge und somit auf die jeweilige Zellzyklusphase rückschließen, da in der G₂/M-Phase nach der Replikation der doppelte DNA-Gehalt verglichen zur G₀/G₁-Phase vorliegt und die in der S-Phase befindlichen Zellen dazwischen liegen.

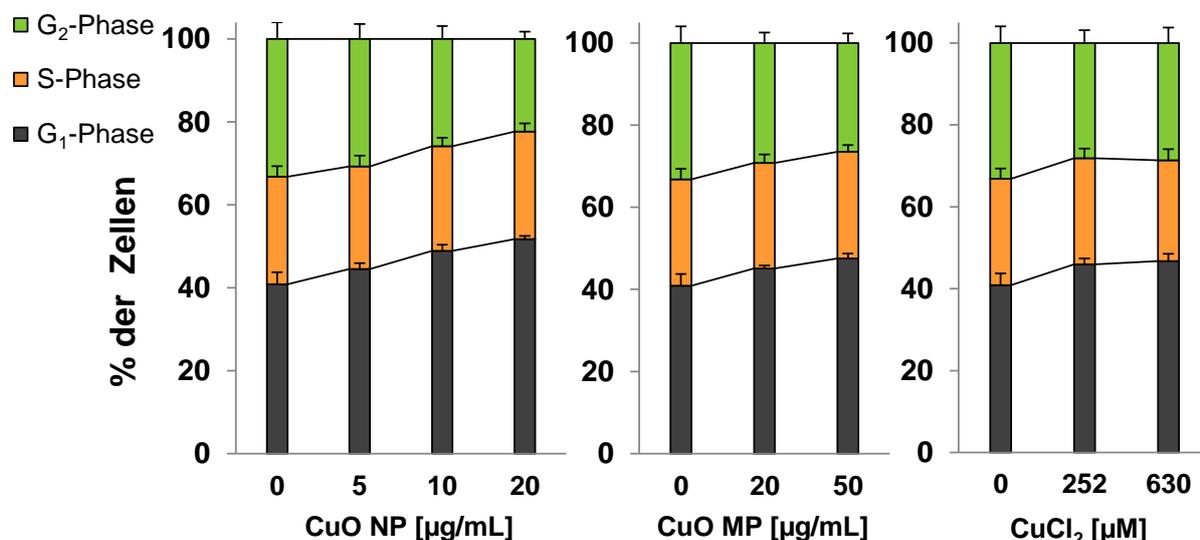


Abbildung 22 **Einfluss von CuO NP, CuO MP und CuCl₂ auf die Zellzyklusphasenverteilung.** BEAS-2B-Zellen wurden für acht Stunden mit den Kupferverbindungen inkubiert und die Verteilung der Zellen in den Zellzyklusphasen wurde mittels DAPI-Färbung bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte + SD von vier Bestimmungen aus zwei unabhängigen Versuchen.

Vor allem nach acht Stunden wurde ein deutlicher Effekt von CuO NP, CuO MP und CuCl₂ auf die Zellzyklusphasenverteilung festgestellt (Abbildung 22). CuO NP bewirkten eine konzentrationsabhängige Zunahme an Zellen in der G₀/G₁-Phase von 40 % im Kontrollansatz auf mehr als 50 % bei 20 µg/mL. Der Zellanteil in der S-Phase blieb unverändert, aber der Anteil an Zellen in der G₂/M-Phase war dementsprechend verringert. Im Gegensatz dazu veränderten CuO MP und CuCl₂ die Zellzyklusphasenverteilung erst in hohen Konzentrationen, wobei der Effekt zudem geringer ausfiel. So wurde der Anteil an Zellen in der G₀/G₁-Phase bei 20 µg/mL oder 252 µM lediglich um 5 % gesteigert und nahm maximal um 7 % (50 µg/mL bzw. 630 µM) zu. Vergleichend zu CuO NP wurde dafür der Gehalt an G₂/M-Phase-Zellen verringert. Nach 24 Stunden war keine Veränderung der Zellzyklusphasenverteilung mehr zu beobachten, wohingegen nach 48-stündiger Inkubation ein S-Phasenarrest, der ebenfalls am deutlichsten durch CuO NP auftrat, festgestellt wurde (Abbildung 46, Anhang 8.6.6.4). In einer Studie mit A549-Zellen wurde ein G₂-Phasenarrest

sowohl durch CuO NP als auch durch Kupferionen aus dem Überstand induziert, jedoch wurde dabei zusätzlich noch ein CuO NP-spezifischer G₁-Phasenarrest beobachtet (Hanagata et al. 2011).

Eine Unterscheidung zwischen lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen erfolgte nach paralleler Färbung der Zellproben mit Annexin V-FITC und Propidiumiodid (PI) mittels Durchflusszytometrie. FITC-markiertes Annexin V wird zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen verwendet, da es aufgrund einer hohen Phospholipidaffinität Phosphatidylserin (PS) in der zytoplasmatischen Membran bindet. Da die Membran bei vitalen Zellen asymmetrisch aufgebaut und PS nur auf der Innenseite lokalisiert ist, werden lebende Zellen durch Annexin V nicht gefärbt. Während der Apoptose verliert die Plasmamembran jedoch diese Asymmetrie und PS wird an die Außenseite externalisiert, wodurch apoptotische Zellen ein positives Annexin V-FITC Signal zeigen. Das gilt jedoch aufgrund einer geschädigten Membran auch für nekrotische Zellen, weshalb für diese weitere Unterscheidung zusätzlich eine PI-Färbung zum Einsatz kommt. PI dringt nur in Zellen mit geschädigter Plasmamembran ein und interkaliert in die DNA, wodurch nur nekrotische und nicht apoptotische Zellen ein positives Signal aufweisen (Munoz et al. 2013).

Die Untersuchungen zeigten nach 24-stündiger Inkubation für alle drei Kupferverbindungen nur schwache Effekte, wobei in der Population der toten Zellen der nekrotische Mechanismus dominierte (Abbildung 47, Anhang 8.6.6.4). Nach 48 Stunden wurden jedoch deutliche Effekte beobachtet (Abbildung 23). Dabei kam es durch CuO NP zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg an apoptotischen Zellen um fast 10 %, wohingegen die Referenzsubstanzen erst bei 50 µg/mL bzw. 630 µM eine schwache Zunahme auf maximal 4 % bewirkten. Der nekrotische Anteil war geringer und betrug maximal 7 % (CuO NP) bzw. 2 % (CuO MP und CuCl₂).

Wie in diesen Vitalitätsuntersuchungen gezeigt, bewirkten nur CuO NP eine deutliche Zunahme an apoptotischen Zellen. Damit werden die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen bestätigt, da bei diesen auch nur CuO NP in höheren Konzentrationen zu einer effektiven Induktion der proapoptotischen Gene *PMAIP1* und *TNFRSF10B* in BEAS-2B-Zellen führten. In A549-Zellen wurden auf Expressionsebene lediglich tendenzielle Veränderungen für CuO NP und CuCl₂ in proapoptotischem Sinne beobachtet, die bezüglich des Ausmaßes für die Verbindungen jedoch vergleichbar waren. Im Gegensatz dazu wurden auf zellulärer Ebene in einer vorangegangenen Arbeit unterschiedliche Ergebnisse für CuO NP und CuCl₂ festgestellt. Nur CuO NP und nicht CuCl₂ führten zu erhöhten Mengen eines SubG1-Peaks, der ebenfalls die Induktion der Apoptose anzeigt, sowie einer schwachen Zunahme der AIF-Kerntranslokation als Indiz für mitochondriale Schäden. Diese Effekte traten jedoch erst ab Konzentrationen über 20 µg/mL

auf (Semisch et al. 2014), die in den hier durchgeführten Genexpressionsanalysen nicht eingesetzt wurden.

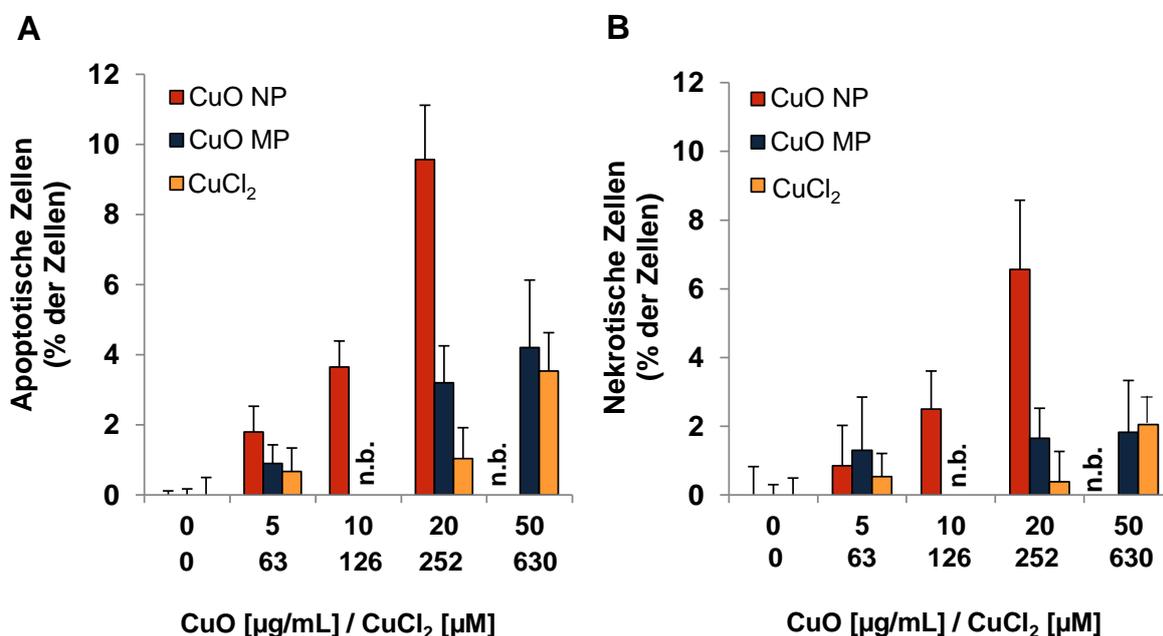


Abbildung 23 **Einfluss von CuO NP, CuO MP und CuCl₂ auf die Apoptose (A) und Nekrose (B).** BEAS-2B-Zellen wurden für 48 Stunden mit den Kupferverbindungen inkubiert und der Anteil an apoptotischen und nekrotischen Zellen mittels Annexin V-FITC und PI-Färbung bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte + SD von vier Bestimmungen aus zwei unabhängigen Versuchen.

Neben der Apoptose wird aktuell auch noch der Prozess der Autophagie als mechanistische Ursache für CuO NP-induzierten Zelltod diskutiert (Ahamed et al. 2015). Da der unter 5.3.1 beschriebene drastische Rückgang der Zellzahl nach 24 Stunden durch CuO NP nicht ausschließlich auf eine Zellzyklusarretierung sowie apoptotische und nekrotische Effekte zurückgeführt werden kann, könnte dieser zusätzliche Zelltodmechanismus ein Grund für diese Diskrepanz sein.

5.3.4 Einfluss der Endozytose und lysosomalen Ansäuerung

Anhand der Ergebnisse der Genexpressionsanalysen und der Beobachtungen auf funktioneller Ebene wurde deutlich, dass die zelluläre Aufnahme sowie die intrazellulär weiterführende Prozessierung entscheidende Faktoren für die ausgeprägte Beeinflussung der genomischen Stabilität durch CuO NP darstellen. Diesbezüglich war jedoch noch der Beweis der endozytotischen Aufnahme zu erbringen und der Einfluss der lysosomalen Ansäuerung aufzuklären. Zusätzlich sollten weitere Genexpressionsuntersuchungen die Unterscheidung zwischen extrazellulären Effekten über Partikel-Membranrezeptor-Wechselwirkungen und intrazellulären Einflüssen durch in die Zelle aufgenommene Partikel ermöglichen. Außerdem war die Frage zu klären, was intrazellulär durch Partikel, durch

reaktive Kupferionen oder durch resultierende ROS, die als *second messenger* eine bedeutende Rolle bei der Redox-Regulation von Signalwegen spielen, geschieht.

5.3.4.1 Beeinflussung der zellulären Aufnahme durch Hydroxy-Dynasore und andere Endozytoseinhibitoren

Um den Einfluss der Endozytose hinsichtlich der Aufnahme der partikulären Kupferverbindungen zu untersuchen, wurden pharmakologisch wirksame Inhibitoren eingesetzt, die unterschiedliche endozytotische Mechanismen hemmen. Cytochalasin B (CytB) wurde als Inhibitor für Phagozytose verwendet (Malawista et al. 1971; Sahay et al. 2010), Hydroxy-Dynasore (OH-Dyn) zur Inhibierung Dynamamin-abhängiger Mechanismen, zu denen sowohl die Clathrin- als auch die Caveolae-vermittelte Endozytose zählen (Macia et al. 2006; McCluskey et al. 2013); 5-(N-ethyl-N-isopropyl)amilorid (EIPA) diente als Hemmstoff für die Makropinozytose (Gekle et al. 1999; Fretz et al. 2006) und Monodansylcadaverin (MDC) als spezifisches Agens für Clathrin-abhängige Prozesse (Nandi et al. 1981; Phonphok und Rosenthal 1991). Die Inhibitorsubstanzen sollten in nicht-zytotoxischen Konzentrationen eingesetzt werden, um die Physiologie der Zellen nicht zu stark zu verändern und unspezifische Nebeneffekte zu verhindern. Die zytotoxische Wirkung war jedoch bis auf OH-Dyn für alle Substanzen in Konzentrationen, die in der Literatur als wirksam beschrieben wurden, zu ausgeprägt. Deshalb wurden CytB, EIPA und MDC in niedrigeren, nicht-zytotoxischen Konzentrationen eingesetzt (Abbildung 48, Anhang 8.6.6.5); zudem waren dadurch nur Untersuchungen nach acht Stunden möglich. Es zeigte sich, dass kein Inhibitor außer OH-Dyn die Aufnahme von CuO NP und CuO MP beeinflusste (Abbildung 49, Anhang 8.6.6.5). Dabei lag nahe, dass die fehlende Inhibierung durch zu geringe, nicht wirksame Konzentrationen resultierte. Somit wurden die Untersuchungen ausschließlich mit OH-Dyn nach 8-stündiger Inkubation durchgeführt, wodurch nur der Einfluss der Dynamamin-abhängigen Clathrin- und Caveolae-vermittelten Endozytose identifiziert werden konnte.

Der Einfluss von OH-Dyn auf den zellulären Kupfergehalt nach Inkubation mit 10 µg/mL CuO NP, 50 µg/mL CuO MP und 630 µM CuCl₂ ist in Abbildung 24 dargestellt. Die Referenzsubstanzen wurden in einer 5-fach höheren Massendosis verwendet, um eindeutige, den CuO NP eher entsprechenden Effekte hinsichtlich des intrazellulären Kupfergehaltes, der Zytotoxizität und später auch der Genexpression zu erzielen. Somit sollten ein besserer Vergleich sowie eine angemessene Beurteilung der Resultate ermöglicht werden. Der basale Kupfergehalt nach acht Stunden betrug 20 µM und durch alleinige Behandlung mit OH-Dyn 11 µM. Dadurch konnte gezeigt werden, dass der Inhibitor den basalen Gehalt nicht wesentlich verändert, da diese Differenzen innerhalb der Standardabweichung und vor allem auch im normalen Schwankungsbereich der GF-AAS-Analysen-Methode lagen. CuO NP bewirkten eine 43-fache Kupferakkumulation auf 950 µM.

Durch die Kobehandlung mit OH-Dyn wurde dieser um 50 % auf 490 μM gesenkt. CuO MP erhöhten den intrazellulären Kupfergehalt auf 560 μM . Dieser wurde durch OH-Dyn sogar um 80 % auf 130 μM reduziert. Die Inkubation mit CuCl_2 resultierte in intrazellulären Kupferkonzentrationen von 360 μM und in Kombination mit OH-Dyn in 450 μM . Durch diese vergleichbaren Resultate für CuCl_2 , die wiederum innerhalb der Standardabweichungen und der Schwankung der Methode lagen, konnte ein unspezifischer Einfluss des Inhibitors auf die homöostatisch kontrollierte Aufnahme wasserlöslicher Kupferverbindungen ausgeschlossen werden. Weiterführende konzentrationsabhängige Analysen mit CuO NP (1-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) und CuO MP (5-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) bestätigten eine relativ konstante inhibitorische Wirkung von OH-Dyn unabhängig von der eingesetzten Partikelmenge sowie der resultierenden intrazellulären Kupferakkumulation, da der Kupfereintrag um 50-75 % im Falle von CuO NP und um 70-80 % bei CuO MP abgesenkt wurde (Abbildung 50, Anhang 8.6.6.5).

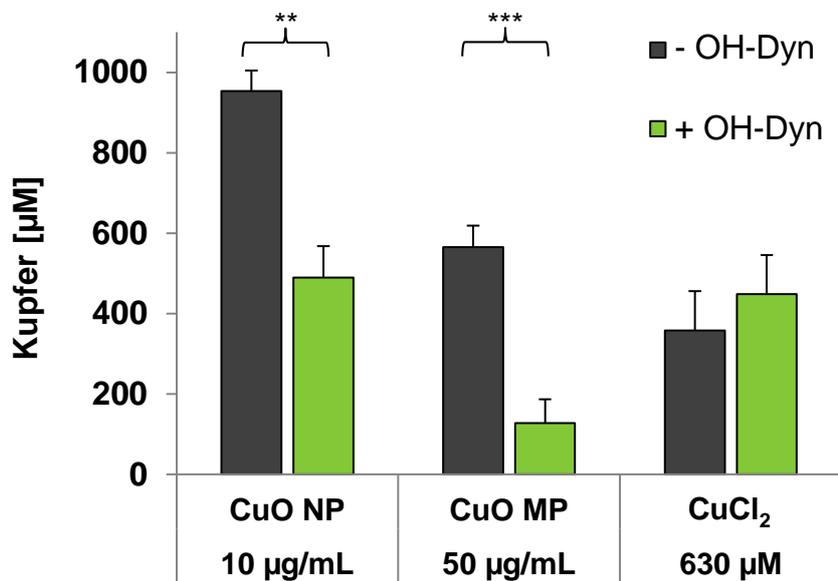


Abbildung 24 **Zelluläre Aufnahme von Kupfer in Abhängigkeit von OH-Dyn nach Behandlung mit CuO NP, CuO MP und CuCl₂.** Der Kupfergehalt in der löslichen Fraktion von BEAS-2B-Zellen wurde nach 8-stündiger Inkubation mit den Kupferverbindungen in An- und Abwesenheit von OH-Dyn (100 μM) mittels GF-AAS bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte + SD aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur jeweiligen Kupferbehandlung mit T-Test: ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$. 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CuO entsprechen 630 μM Cu^{2+} im Falle kompletter Kupferfreisetzung.

Durch den erfolgreichen Einsatz des Dynamin-GTPase-Inhibitors OH-Dyn konnte gezeigt werden, dass die partikulären Kupferverbindungen zu einem wesentlichen Teil über Dynamin-abhängige endozytotische Prozesse in BEAS-2B-Zellen aufgenommen werden, wohingegen diese Vorgänge keinen Einfluss auf die Aufnahme von wasserlöslichem CuCl_2 haben. Somit kann die allgemein formulierte These der Aufnahme von CuO NP über Endozytose, wie auch schon von Wang und Kollegen gezeigt (Wang et al. 2012), bestätigt werden. Die stärkste Absenkung des intrazellulären Kupfergehaltes war bei CuO MP zu

beobachten. Diese durch OH-Dyn stattfindende Hemmung der Aufnahme von CuO MP überraschte, da die gebildeten Vesikel der Dynamin-abhängigen Mechanismen im Normalfall nicht im μm -Größenbereich liegen. So beträgt der Durchmesser eines *clathrin-coated pits* normalerweise weniger als 200 nm und gebildete Caveolae sind Membraneinstülpungen mit einer Größe von 50-100 nm (McMahon und Boucrot 2011; Canton und Battaglia 2012). Gratton und Kollegen fanden dennoch, übereinstimmend mit den vorgestellten Ergebnissen, dass auch die Aufnahme von Partikeln im μm -Bereich durch Dyn und einen weiteren Inhibitor der Clathrin-abhängigen Vorgänge, Chlorpromazin, in HeLa-Zellen gehemmt werden konnte. Dass eine Caveolae-spezifische Aufnahme eine Rolle spielt, wurde durch einen geeigneten Inhibitor hingegen ausgeschlossen (Gratton et al. 2008). Somit scheinen auch größere Partikel unter Umständen über Clathrin-vermittelte Prozesse in die Zelle zu gelangen. Außerdem wird die Wirkung und Effizienz sämtlicher Inhibitorsubstanzen generell sehr stark vom Zelltyp sowie von den physikochemischen Eigenschaften der aufzunehmenden Partikel beeinflusst, und durch die Hemmung allgemeiner zellphysiologischer Prozesse durch Inhibitoren kann eine selektive Spezifität für nur einen Endozytose-Mechanismus nicht immer postuliert werden (Vercauteren et al. 2010). Dementsprechend wird eine Beteiligung von Dynamin außer bei der Clathrin- und Caveolae-vermittelten Endozytose auch bei der Phagozytose, Flotillin-abhängigen Prozessen und weiteren Mechanismen diskutiert (Doherty und McMahon 2009).

Die Abhängigkeit vom Zelltyp konnte in vergleichend durchgeführten Untersuchungen zur Aufnahme der partikulären Kupferverbindungen nach acht Stunden in HeLa S3-Zellen gezeigt werden (Abbildung 51, Anhang 8.6.6.5). Dabei wurde die durch CuO NP resultierende Kupferakkumulation ebenfalls am effektivsten durch OH-Dyn um fast 60 % inhibiert. Die Aufnahme von CuO MP wurde in dieser Zelllinie mit 70 %iger Hemmung jedoch am deutlichsten durch EIPA, den Inhibitor der Makropinozytose, verhindert. Dabei konnte EIPA in einer Konzentration von 50 μM anstelle von 25 μM , wie in BEAS-2B-Zellen, verwendet werden, da die zytotoxische Wirkung in dieser Ziellinie nicht so ausgeprägt war. Die bei der Aufnahme über Makropinozytose gebildeten Vesikel erreichen einen Durchmesser von 0,5-5 μm (Doherty und McMahon 2009), wodurch eine Aufnahme von CuO MP über diesen Mechanismus realistischer erscheint.

Die Verwendung der Endozytoseinhibitoren resultierte weder bei CuO NP noch bei CuO MP in einer vollständigen Aufnahmehemmung, obwohl z.B. OH-Dyn in einer Konzentration von 100 μM eingesetzt wurde, was dem 18-fachen der IC_{50} von 5,7 μM in HeLa S3-Zellen entspricht (McCluskey et al. 2013). Für den verbleibenden Kupfereintrag können mehrere Gründe angeführt werden. Da ein Inhibitor wie OH-Dyn nicht alle endozytotischen Vorgänge hemmt, kann eine Aufnahme auch über andere Mechanismen wie Makropinozytose oder Phagozytose erfolgen. Diese These bestätigend wurde die Aufnahme spezifisch hergestellter

nano- und mikroskaliger PRINT Partikel definierter Größe sowohl über Dynamamin-abhängige Prozesse als auch über die Makropinozytose zu unterschiedlichen Anteilen beobachtet (Gratton et al. 2008). Durch die Verwendung eines Inhibitors könnten andere Endozytosemechanismen zudem im Sinne einer Kompensationsreaktion und anteiligen Verschiebung an Bedeutung gewinnen und verstärkt zur Internalisierung beitragen, da der „normale“ Weg pharmakologisch blockiert ist. Der Einfluss anderer Mechanismen konnte aber, wie bereits erwähnt, aufgrund zu starker zytotoxischer Wirkungen weiterer pharmakologisch wirksamer Hemmstoffe nicht identifiziert werden. Außerdem spielt die Löslichkeit der partikulären Verbindungen im Umgebungsmedium eine Rolle, da freigesetztes Kupfer aus extrazellulär gelösten Partikeln über die klassischen Transportmechanismen von Kupferionen aufgenommen werden kann. Dieser zusätzliche Eintrag spielt vor allem bei CuO NP eine Rolle, da diese eine deutlich stärkere Löslichkeit im verwendeten Medium aufweisen. So betrug die Löslichkeit von CuO NP nach 24 Stunden in DMEM mit 10 % FKS 44 %, die von CuO MP hingegen nur 4 % (Semisch et al. 2014). Bei einem relevanten Kupfereintrag von CuO NP über extrazellulär gelöste Ionen könnte dieser Sachverhalt auch die effektivere Aufnahmeblockierung von CuO MP im Vergleich zu CuO NP in beiden untersuchten Zelllinien erklären.

5.3.4.2 Beeinflussung der zellulären Aufnahme durch Bafilomycin A1

Die ausgeprägte Kupferüberladung der Zellen durch CuO NP könnte, wie in der Literatur postuliert, hauptsächlich über den bereits vorgestellten *trojan horse type* Mechanismus vermittelt sein (Limbach et al. 2007). Dabei kommt es nach endozytotischer Aufnahme zu einer Ansäuerung der resultierenden Vesikel zu sauren Lysosomen und einer damit verbundenen erhöhten Freisetzung reaktiver Ionen. Der Einfluss der lysosomalen Ansäuerung auf den zellulären Kupfereintrag der partikulären Verbindungen wurde durch Einsatz von Bafilomycin A1 (BafA1) untersucht, einem spezifischen Inhibitor der vakuolären H⁺-ATPase, der die pH-Absenkung in Lysosomen vermindert (Bowman et al. 1988; Yoshimori et al. 1991).

Da BafA1 nach 24 Stunden keine relevante Veränderung der Zellzahl bewirkte, konnten die Untersuchungen zu diesem späten Zeitpunkt stattfinden (Abbildung 25). Die Koinkubation führte bei CuO NP zu einem verminderten Kupfereintrag um nahezu 60 % von 1050 μ M auf 640 μ M. Im Gegensatz dazu wurde der intrazelluläre Kupfergehalt von CuO MP und CuCl₂ durch BafA1 nicht beeinflusst: CuO MP bewirkten einen Anstieg an Kupfer auf 400 μ M allein und auf 450 μ M mit BafA1, bei CuCl₂ wurden Kupferkonzentrationen von 770 μ M und 650 μ M mit Unterschieden innerhalb der Standardabweichungen festgestellt. Die Untersuchungen mit CuCl₂ dienten wie bei OH-Dyn der Identifizierung eventueller unspezifischer Nebeneffekte. Auch der basale Kupfergehalt von 20 μ M wurde durch BafA1 (26 μ M) nicht relevant modifiziert.

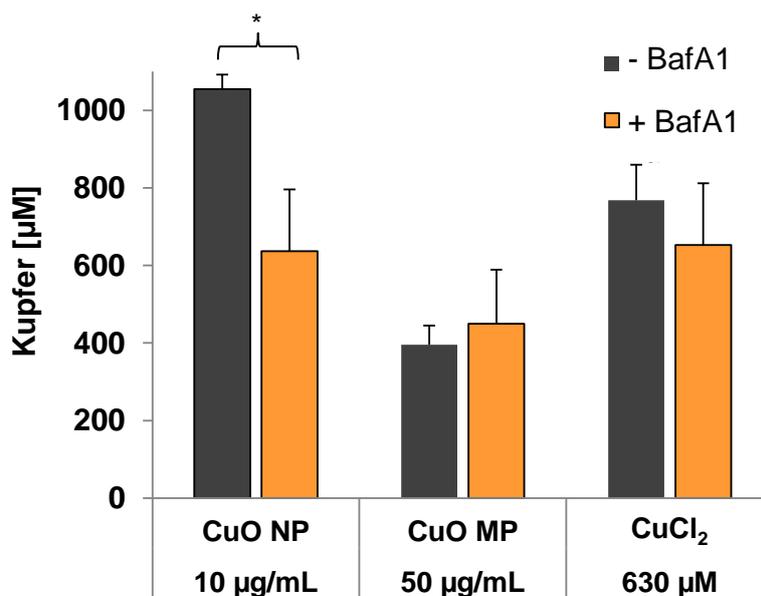


Abbildung 25 **Zelluläre Aufnahme von Kupfer in Abhängigkeit von BafA1 nach Behandlung mit CuO NP, CuO MP und CuCl₂**. Der Kupfergehalt in der löslichen Fraktion von BEAS-2B-Zellen wurde nach 24-stündiger Inkubation mit den Kupferverbindungen in An- und Abwesenheit von BafA1 (100 nM) mittels GF-AAS bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte + SD aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur jeweiligen Kupferbehandlung mit T-Test: * $p \leq 0,05$. 50 µg/mL CuO entsprechen 630 µM Cu²⁺ im Falle kompletter Kupferfreisetzung.

Somit war ein Einfluss des lysosomalen Neutralisators BafA1 auf CuO NP beschränkt. Verschiedene Annahmen führen den verringerten Kupfergehalt auf die verminderte Löslichkeit in „neutralisierten“ Lysosomen zurück. Die zunehmende Ansäuerung der resultierenden Vesikel im Rahmen der endozytotischen Aufnahme reguliert diesen Prozess in hohem Maße. In frühen Endosomen ist die pH-Absenkung z.B. essentiell für ein Recycling der Rezeptoren, die die Aufnahme der Partikel vermitteln, so dass diese wieder zur Plasmamembran translokalisiert werden und eine erneute Aufnahme vermitteln können (Mellman 1992). Wird die Ansäuerung der Lysosomen verhindert, kommt es zu einer Beeinflussung der gesamten Kaskade. Das endozytotische Recycling wichtiger Membranproteine und -lipide kann gestört und die Progression von späten Endosomen zu Lysosomen verhindert werden (van Weert et al. 1995; Maxfield und McGraw 2004). Dadurch kann die endozytotische Aufnahme der CuO NP innerhalb der 24-stündigen Inkubation verringert sein. Außerdem ist es naheliegend, dass aufgenommene Partikel in neutraleren Lysosomen eher verbleiben als in sauren, da die Löslichkeit nicht gesteigert wird und Kupferionen nicht freigesetzt werden können. Unverdauliches Material verbleibt in Lysosomen und es werden sogenannte „Restkörperchen“ gebildet, die durch Exozytose aus der Zelle ausgeschieden werden können (Alberts et al. 2011). Die Theorie zudem bestätigend, konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass CuO NP neben der im Vergleich zu CuO MP erhöhten Löslichkeit im Umgebungsmedium vor allem im sauren Milieu eine deutlich gesteigerte Solubilität aufweisen. Dazu wurde die Löslichkeit in

künstlicher lysosomaler Flüssigkeit (ALF, pH 4,5) untersucht. CuO NP waren bereits nach 30 Minuten zu 68 % und schon nach zwei Stunden nahezu komplett gelöst, wohingegen CuO MP nach vier Stunden erst zu 4 % gelöst vorlagen und nach 24 Stunden zu 40 % (Semisch et al. 2014). BafA1 vermindert demnach eine pH-Absenkung in resultierenden Lysosomen, wodurch CuO NP vermehrt ungelöst verbleiben und es nicht zu der im Normalfall beobachteten extensiven Überladung der Zelle mit reaktiven Kupferionen kommt. Obwohl durch die angewandte GF-AAS Analyse nicht zwischen partikulärem und gelöstem Kupfer unterschieden werden kann, legen diese Untersuchungen somit nahe, dass die Zelle durch CuO NP hauptsächlich mit reaktiven Kupferionen und weniger mit Partikeln selbst überladen wird. Übereinstimmend dazu beobachteten Moschini und Kollegen einen deutlich verminderten intrazellulären Kupferionengehalt durch BafA1 nach Behandlung mit CuO NP in A549-Zellen, wobei mittels Rhodanin explizit Ionen nachgewiesen wurden (Moschini et al. 2013).

5.3.4.3 Einfluss von BafA1 auf die Zytotoxizität von CuO NP, CuO MP und CuCl₂ und auf die CuO NP-induzierte GSH-Depletion

Im Folgenden wurde der Einfluss von BafA1 auf die zytotoxische Wirkung der Kupferverbindungen anhand der Zellzahl nach 24 Stunden untersucht (Abbildung 26A). Dabei wurden die mit BafA1 inkubierten Proben auf eine BafA1-behandelte Kontrolle von 100 % bezogen. BafA1 selbst führte zu einer leichten Verminderung der Zellzahl auf 95 %. Der durch CuO NP resultierende starke Rückgang der Zellzahl auf 56 % wurde durch die Koinkubation mit BafA1 deutlich auf 90 % vermindert. Auch CuO MP zeigten in Kombination mit BafA1 eine leicht verminderte zytotoxische Wirkung, da die Zellzahl von 78 % auf 88 % erhöht wurde. Bei der Behandlung mit CuCl₂ hatte BafA1, wie erwartet, keinen Effekt. Zusätzlich konnte durch den Einsatz von BafA1 nach 2-stündiger Inkubation die durch CuO NP induzierte Verringerung des intrazellulären GSH-Gehaltes auf 80 % vollständig aufgehoben werden und betrug wie bei der Kontrolle 100 % (Abbildung 26B).

Somit stellt die in sauren Lysosomen stattfindende Lösung von CuO NP und daraus resultierende Zellüberladung mit reaktiven Kupferionen den Ergebnissen zufolge den Hauptgrund für die zytotoxische Wirkung von CuO NP dar. Unter den beschriebenen Bedingungen der zellulären Überladung wird die potentielle Toxizität von Kupfer aufgrund seiner Redoxaktivität ersichtlich. Freie Kupferionen können in fentonähnlichen Reaktionen reaktive Hydroxylradikale und andere ROS generieren, die zelluläre Bestandteile wie Proteine, Lipide oder die DNA schädigen können, und wirken somit zytotoxisch (Jomova et al. 2012).

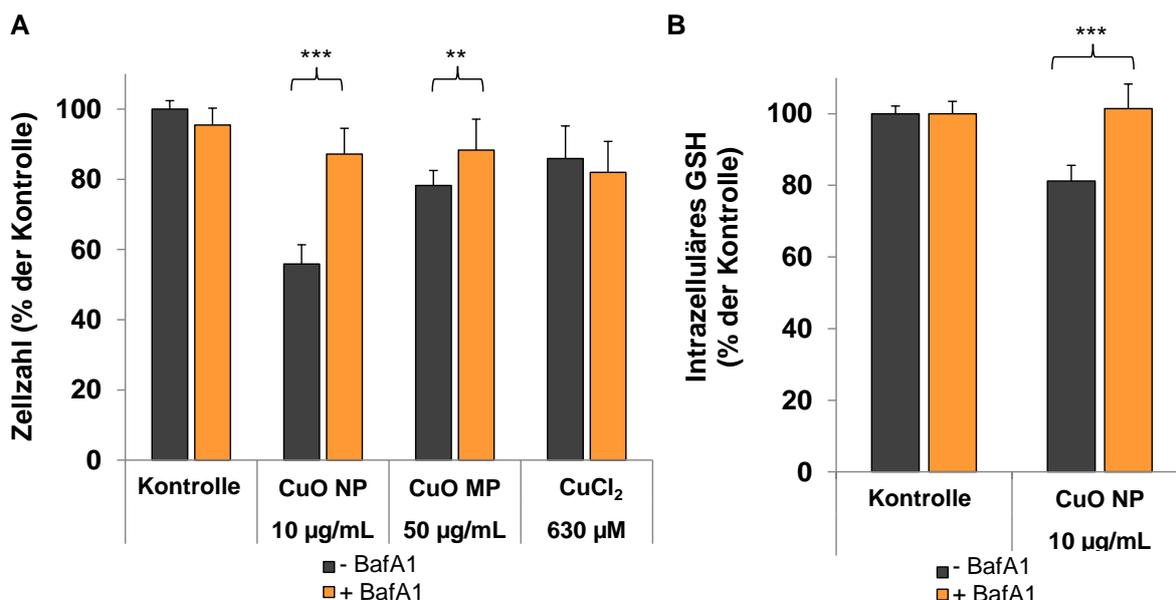


Abbildung 26 **Einfluss von CuO NP, CuO MP und CuCl₂ in Abhängigkeit von BafA1 auf die Zellzahl (A) und den intrazellulären GSH-Level (B, nur CuO NP)**. BEAS-2B-Zellen wurden für 24 Stunden (A) oder zwei Stunden (B) mit den Kupferverbindungen in An- und Anwesenheit von BafA1 (100 nM) inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte + SD von fünf Bestimmungen aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur jeweiligen Kupferbehandlung mit T-Test: ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001. 50 µg/mL CuO entsprechen 630 µM Cu²⁺ im Falle kompletter Kupferfreisetzung.

Da durch BafA1 auch autophagosomale Prozesse inhibiert werden, wird zudem die vermutete Beteiligung einer Induktion des Zelltodes durch CuO NP über diesen Mechanismus bestätigt (Yamamoto et al. 1998; Ahamed et al. 2015). Auch in den Untersuchungen von Moschini und Kollegen wurde die Zellviabilität, bestimmt mittels MTT-Assay, durch den Einsatz von BafA1 in Bezug auf CuO NP drastisch erhöht (Moschini et al. 2013). Die maßgebliche Beteiligung der intrazellulären Löslichkeit für die Zytotoxizität von CuO NP wurde zudem in den Untersuchungen von Studer und Kollegen bestätigt. Dabei wurden unbehandelte CuO NP als stärker toxisch im Vergleich zu kohlenstoffbeschichteten Pendants beschrieben, was auf die erhöhte Löslichkeit der unbeschichteten CuO NP bei pH 5,5 zurückgeführt wurde (Studer et al. 2010). Die beobachtete Verhinderung der GSH-Depletion durch BafA1 bestätigt weiterhin die dominierende Relevanz der erhöhten ROS-Generation für die mechanistische Toxizität von CuO NP.

5.3.4.4 Beeinflussung der Genexpression durch OH-Dyn

Der Einsatz von OH-Dyn als Endozytoseinhibitor diene in weiteren Genexpressionsanalysen mit CuO NP und CuO MP der Differenzierung zwischen intra- und extrazellulär induzierten Effekten der Partikel. Da OH-Dyn, wie bereits diskutiert, jedoch nur zu einem deutlich verringerten Kupfereintrag von CuO NP und CuO MP, aber nicht zu einer vollständig unterbundenen Aufnahme führte, müssen die Effekte auf Transkriptionsebene als Mischeffekte betrachtet werden. Bei Einsatz von OH-Dyn wurde die angegebene relative

Genexpression auf eine Kontrolle, die mit OH-Dyn inkubiert wurde, bezogen, um alleinige Effekte des Inhibitors, die im Folgenden noch thematisiert werden, zu berücksichtigen.

Durch die 8-stündige Inkubation mit den partikulären Kupferverbindungen in An- und Abwesenheit von OH-Dyn wurde die Expression der meisten Gene nicht beeinflusst. Bei einigen *early response* Genen waren jedoch Veränderungen der Transkription zu beobachten, die in Abbildung 27 gezeigt sind. Durch die Behandlung mit CuO NP wurden die stresssensitiven Gene *HMOX1* und *HSPA1A* konzentrationsabhängig bis zu 14-fach bzw. 5-fach induziert. *SLC30A1*, das für den Zinktransporter ZnT-1 kodiert und durch MTF-1 reguliert wird (Gunther et al. 2012), wurde maximal 5-fach transkribiert und die mRNA-Menge von *IL8* wurde konzentrationsabhängig bis 3,4-fach gesteigert. Die Transkription von *GADD45A*, *JUN*, *MT1X* und *TXNRD1* wurde ungefähr verdoppelt. Auch durch CuO MP wurde die Transkription von *HMOX1* und *HSPA1A* am deutlichsten, um Faktor 5 bzw. 4, erhöht und *IL8* und *SLC30A1* wurden verdoppelt exprimiert. Die Transkriptmengen von *GADD45A*, *JUN*, *MT1X* und *TXNRD1* wurden im Gegensatz zu CuO NP jedoch nicht verändert.

Durch die Koinkubation mit OH-Dyn wurden die beobachteten Induktionen im Fall von CuO NP oder CuO MP vollständig aufgehoben, sie unterschieden sich nicht vom Kontrollwert.

Diese Beobachtungen müssen jedoch mit Vorsicht interpretiert werden, da die Expression der beschriebenen Gene zum Teil auch schon allein durch Inkubation mit OH-Dyn im Vergleich zur normalen Kontrolle beeinflusst wurde, wenn man die relative Expression der OH-Dyn Kontrolle auf die der normalen bezog (Abbildung 52A, Anhang 8.6.6.5). Deutliche Induktionen durch OH-Dyn fielen vor allem bei *HMOX1*, *HSPA1A* und *IL8* auf, wobei die Koinkubationen mit den Partikeln diese Effekte nicht weiter beeinflussten. Somit zeigte schon der Inhibitor allein zum Teil starke Effekte bezüglich der Transkription der beschriebenen Gene. Da OH-Dyn als Dynamin-Inhibitor neben der verminderten Aufnahme der Partikel aber auch andere zelluläre Vorgänge beeinflusst und damit maßgeblich in die Zellphysiologie eingreift, ist eine Modulation eines sensitiven Parameters wie der Transkription durch diese pharmakologisch wirksame Substanz sehr naheliegend und kann zudem nicht verhindert werden. Dadurch sind die Effekte von CuO NP und CuO MP jedoch nicht eindeutig abschätzbar und alle aufgeführten Beobachtungen als Mischeffekte zu klassifizieren. Trotzdem wurden die transkriptionellen Veränderungen, die durch die partikulären CuO Verbindungen allein induziert wurden, durch OH-Dyn vollständig unterbunden. Somit wird impliziert, dass die betroffenen Signalkaskaden durch in die Zelle aufgenommene Partikel und daraus freigesetztes Kupfer beeinflusst und keine Effekte extrazellulär durch Wechselwirkungen mit Membranrezeptoren ausgelöst werden. Aufgrund der geringen Anzahl an beeinflussten Genen handelt es sich dabei lediglich um die Wege, die mit der

Aufnahme und der Stressantwort assoziiert sind. Obwohl mit den durchgeführten Analysen keine extrazellulären Prozesse nachgewiesen wurden, können diese aufgrund der Mischeffekte aber nicht absolut ausgeschlossen werden.

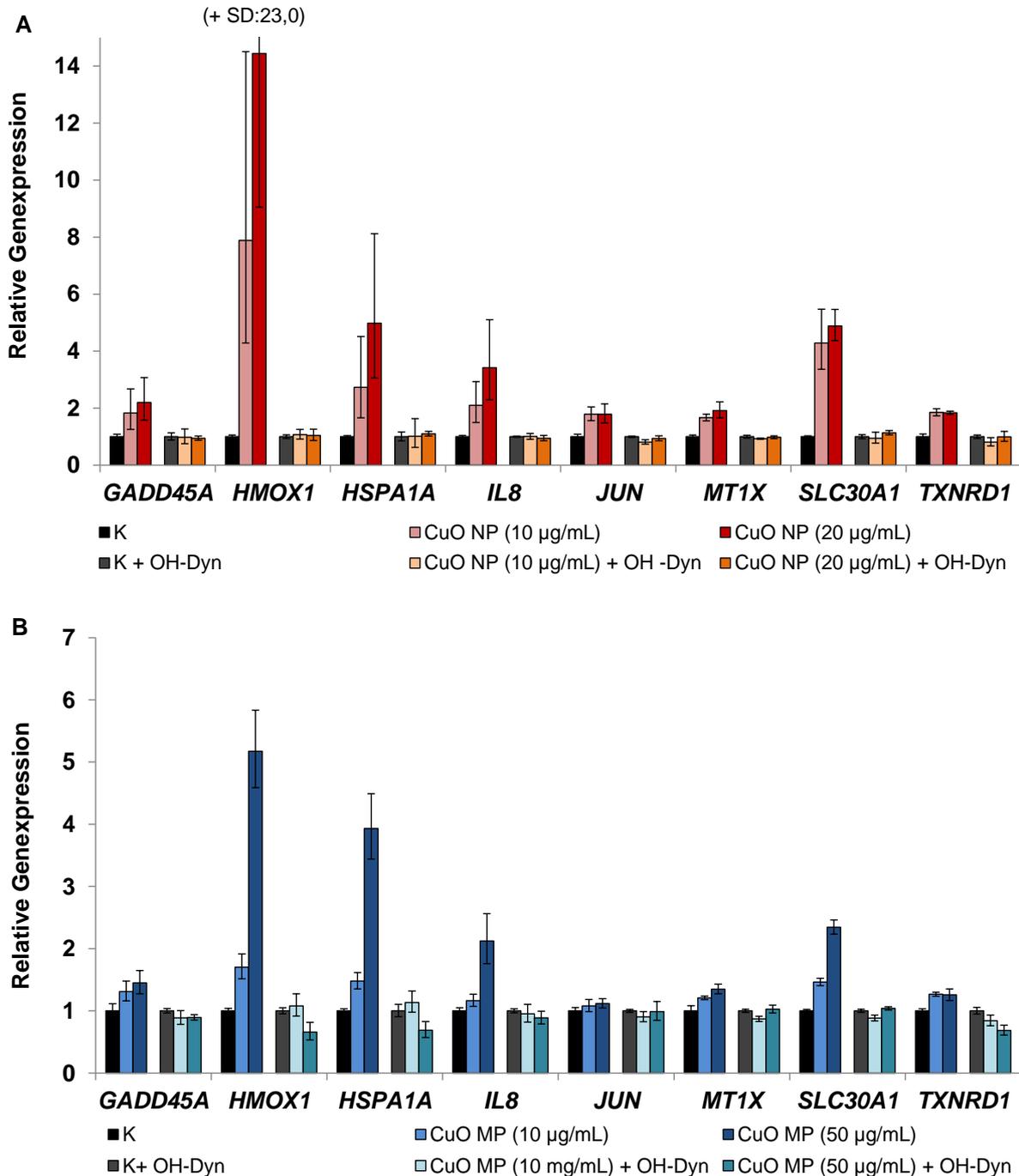


Abbildung 27 Einfluss von CuO NP (A) und CuO MP (B) in Abhängigkeit von OH-Dyn auf die Expression der Gene *GADD45A*, *HMOX1*, *HSPA1A*, *IL8*, *JUN*, *MT1X*, *SLC30A1* und *TXNRD1*. BEAS-2B-Zellen wurden für acht Stunden in An- und Abwesenheit von OH-Dyn (100 µM) mit den Kupferverbindungen inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SD von vier Bestimmungen aus zwei unabhängigen Versuchen. Die jeweiligen Kontrollen wurden auf einen relativen Expressionswert von 1 gesetzt. Man beachte die unterschiedlichen Skalierungen der y-Achsen. K= Kontrolle

5.3.4.5 Beeinflussung der Genexpression durch BafA1

Genexpressionsanalysen unter Einsatz von BafA1 sollten weiterhin den Einfluss des Ausmaßes der intrazellulären Kupferionenfreisetzung, die vor allem bei CuO NP eine wichtige Rolle spielt, aufklären. Da durch BafA1, wie anhand der unterbundenen GSH-Depletion gezeigt (5.3.4.3), die Induktion von oxidativem Stress vermindert wurde, könnte somit speziell die ROS-vermittelte redoxregulierte Signaltransduktion betroffen sein.

Wie schon bei den vorangegangenen Analysen in Anwesenheit von BafA1 wurde ein 24-stündiger Inkubationszeitraum gewählt, wodurch vielfältigere Effekte im Vergleich zur 8-stündigen Behandlung beobachtet werden konnten. Die relative Expression der Gene, die durch 10 µg/mL CuO NP und 50 µg/mL CuO MP in An- und Abwesenheit von BafA1 im Rahmen der Analysen beeinflusst wurden, ist in Abbildung 28 dargestellt. Dabei war vor allem die CuO NP-induzierte Transkription der stresssensitiven und mit einer intrazellulären Kupferionenfreisetzung assoziierten Gene *HMOX1*, *HSPA1A*, *IL8*, *MT1X* und *MT2A* durch BafA1 deutlich verändert (Abbildung 28A). So wurde *HMOX1* in Abwesenheit von BafA1 durch die partikulären Kupferverbindungen in unterschiedlichem Ausmaß, 22-fach durch CuO NP und 12-fach durch CuO MP, induziert. BafA1 verminderte die CuO NP-vermittelte transkriptionelle Erhöhung deutlich auf das 13-fache, wohingegen die mRNA-Gehalte des Gens im Falle von CuO MP durch BafA1 nicht verändert wurden, da immer noch eine Erhöhung um den Faktor 12 zu beobachten war. Durch Inkubation mit BafA1 allein wies die relative Expression einen Wert von 0,7 auf und war somit nahezu unverändert. Die Expression von *HSPA1A* wurde durch BafA1 bei CuO NP erneut deutlich von 14-facher Steigerung auf das 4-fache, bei CuO MP hingegen von 10-fach schwächer auf das 6-fache vermindert. Die Behandlung mit BafA1 ohne die Kupferverbindungen bewirkte erneut keine relevante Veränderung der Expression. Bei *IL8* zeigte BafA1 jedoch einen Einfluss, da die Transkription durch die Substanz allein schon auf das 6-fache erhöht war. CuO NP und CuO MP induzierten eine 23-fach bzw. 14-fach gesteigerte Expression von *IL8*, die durch den Lysosomenneutralisator im Falle von CuO NP auf Faktor 15 verringert, bei CuO MP hingegen bis 18-fach gesteigert wurde; die Effekte waren aufgrund hoher Standardabweichungen jedoch nicht eindeutig. Die Expression von *MT1X* wurde durch CuO NP auf das 36-fache erhöht; CuO MP bewirkten nur eine 15-fache Induktion. Bei CuO NP führte BafA1 erneut zu verminderten mRNA-Gehalten (20-fach), im Falle von CuO MP war keine Beeinflussung zu beobachten (16-fach). Ein vergleichbares Muster ließ sich bei *MT2A* beobachten. Dabei wurde die durch CuO NP 9-fach gesteigerte Expression durch BafA1 auf das 6-fache verringert und CuO MP erhöhten die Transkription unabhängig von BafA1 auf das 5-fache. BafA1 allein zeigte bezüglich der Expression der *MT*-Gene keine relevanten Effekte.

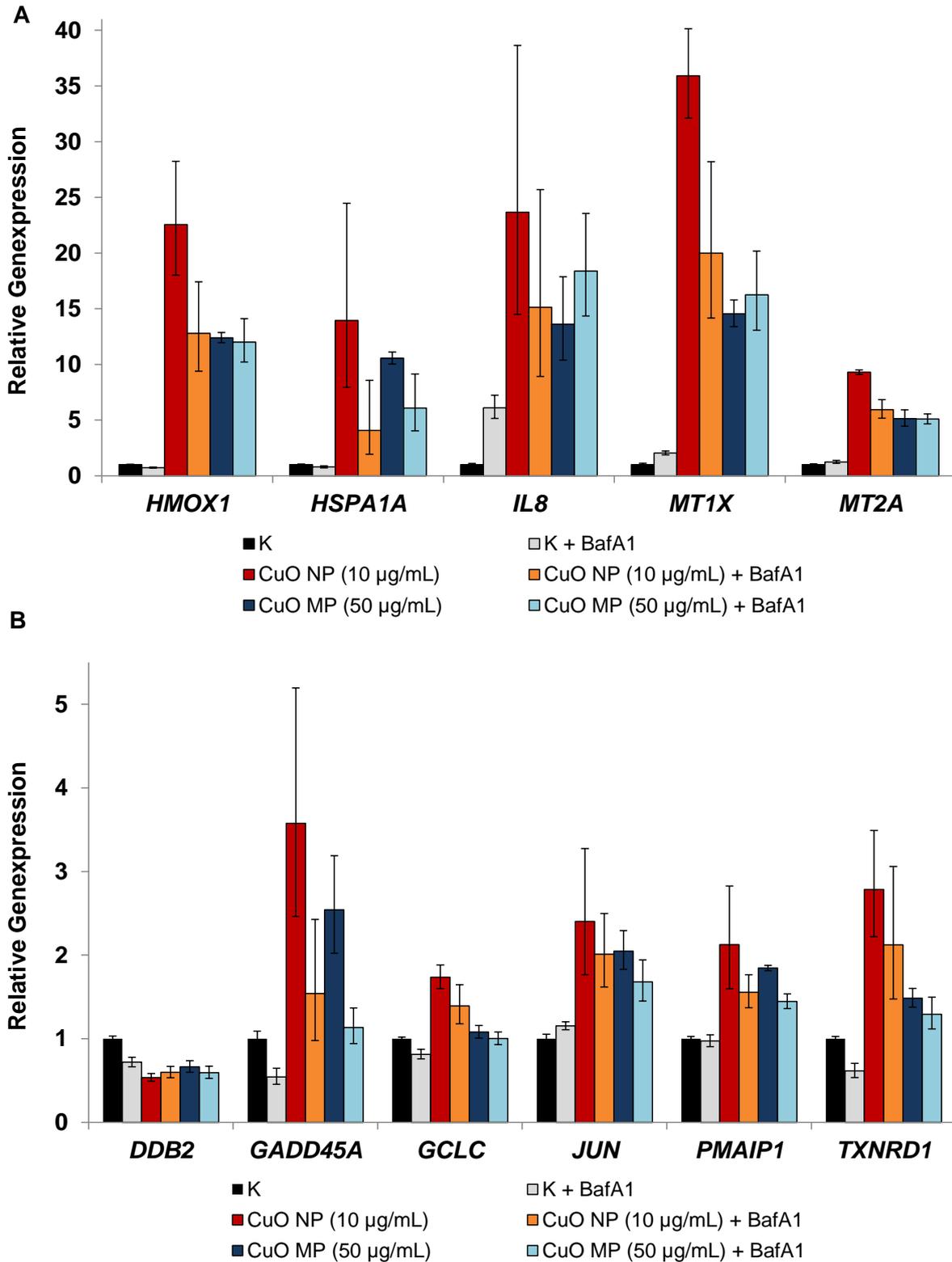


Abbildung 28 Einfluss von CuO NP und CuO MP in Anhängigkeit von BafA1 auf die Expression der Gene *HMOX1*, *HSPA1A*, *IL8*, *MT1X* und *MT2A* (A) sowie *DDB2*, *GADD45A*, *GCLC*, *JUN*, *PMAIP1* und *TXNRD1* (B). BEAS-2B-Zellen wurden für 24 Stunden in An- und Abwesenheit von BafA1 (100 nM) mit den Kupferverbindungen inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD von vier Bestimmungen aus zwei unabhängigen Versuchen. Man beachte die unterschiedlichen Skalierungen der y-Achsen. K= Kontrolle

Weitere, jedoch geringer ausgeprägte, Veränderungen der Genexpression wurden bei den DNA-Schadenssignalgenen *DDB2* und *GADD45A*, den mit antioxidativer Abwehr assoziierten Genen *GCLC* und *TXNRD1* sowie *JUN* und dem proapoptotischen *PMAIP1* beobachtet (Abbildung 28B). Die Transkriptmenge von *DDB2* wurde sowohl durch CuO NP als auch schwächer durch CuO MP verringert. Aber auch durch BafA1 und die partikulären Kupferverbindungen in Anwesenheit des H⁺-ATPase-Inhibitors wurde die Transkription reprimiert. Die in Abwesenheit von BafA1 durch die Kupferverbindungen induzierte Repression war dadurch bei den Koinkubationen nicht mehr zu beobachten, da in diesem Fall schon BafA1 allein die verringerte mRNA-Menge bewirkte. Die Transkriptmenge von *GADD45A* wurde durch CuO NP oder CuO MP 3,6-fach bzw. 2,5-fach erhöht und bei Kobehandlung mit BafA1 in beiden Fällen so stark vermindert, dass kein Effekt mehr ersichtlich war (CuO NP: 1,5-fach, CuO MP: 1,1-fach). Die Expression war durch BafA1 allein jedoch bereits auf die Hälfte abgesenkt, wodurch sich die Verringerung bei den Koinkubationen nicht eindeutig bewerten ließ. Bei den Genen *GCLC* und *TXNRD1* wurde für CuO NP ein vergleichbarer Verlauf beobachtet: Die durch CuO NP-induzierte Steigerung (*GCLC*: 1,7-fach und *TXNRD1*: 2,8-fach) wurde in Anwesenheit von BafA1 geringfügig verringert (*GCLC*: 1,4-fach und *TXNRD1*: 2,1-fach); derselbe Effekt war auch im Falle der Kontrollen ersichtlich und lag vor allem innerhalb der Standardabweichungen. Bezüglich *GCLC* bewirkten CuO NP dabei auch nur eine tendenzielle Induktion. CuO MP ließen die Transkription dieser Gene unverändert. Die mRNA-Gehalte von *JUN* wurden durch die Kupferverbindungen allein, am deutlichsten durch CuO NP auf das 2,4-fache, gesteigert; die Koinkubation mit BafA1 verminderte die Transkription unwesentlich. Die Expression von *PMAIP1* wurde durch CuO NP verdoppelt und in Anwesenheit von BafA1 leicht verringert. Insgesamt wurden somit bei diesen Genen keine eindeutigen Unterschiede zwischen der Behandlung mit CuO NP oder CuO MP in An- und Abwesenheit von BafA1 festgestellt.

Bei Einsatz von BafA1 sollte, vergleichbar wie bei OH-Dyn, davon ausgegangen werden, dass die intrazelluläre Kupferionen- und Partikelfreisetzung zwar zu einem wesentlichen Teil unterbunden, jedoch nicht vollständig gehemmt ist. Somit sind auch die durch BafA1 vermittelten Effekte im Rahmen der Genexpression als Mischeffekte zu betrachten. Zusätzlich wurden die relativen Transkriptmengen von *IL8*, *DDB2*, *GADD45A* und *TXNRD1* bereits durch Behandlung mit BafA1 verändert, weshalb die Effekte der Kupferverbindungen bezüglich dieser Gene nicht eindeutig abschätzbar sind. Bei *IL8* und *DDB2* wurde die Expression durch BafA1 jedoch in dem Sinne modifiziert, dass dadurch die Verringerung des Effektes, die durch Koinkubation der CuO NP mit BafA1 im Vergleich zu den CuO NP allein erreicht wurde, noch ausgeprägter war und der Einfluss der lysosomalen Ansäuerung noch gravierender schien.

Bei den *stress response* und den mit der intrazellulären Kupferionenfreisetzung assoziierten Genen war ein wesentlicher Einfluss von BafA1 auf die CuO NP-vermittelte Genexpression zu beobachten. So wurde die durch CuO NP induzierte Transkriptionssteigerung der Gene *HMOX1*, *HSPA1A*, *IL8*, *MT1X* und *MT2A* durch BafA1 deutlich vermindert, wohingegen dessen Einsatz in Bezug auf CuO MP wenig bis keine Veränderung der Expression zeigte. Da die Stärke der Induktion dieser Gene das Ausmaß der Kupferionenfreisetzung und auch die resultierende ROS-Entstehung anzeigt, bestätigen die nachgewiesenen Veränderungen die bisher beschriebenen Ergebnisse unter Einsatz von BafA1: Sowohl die Freisetzung reaktiver Kupferionen und die Generierung von ROS durch CuO NP wird in weniger sauren Lysosomen zu einem wesentlichen Teil vermindert. Bei CuO MP konnte diese Wirkung nicht festgestellt werden. Bei den Genen *DDB2* und *GADD45A* führte der Einsatz von BafA1 zu verringerten Effekten der CuO NP-vermittelten Expression. Da die Transkription aber auch schon durch die Inkubation mit BafA1 ohne die Kupferverbindungen verändert wurde, können die Effekte nicht eindeutig beurteilt werden; das genotoxische Potential der CuO NP könnte in Anwesenheit von BafA1 jedoch vermindert sein. Bei der Beeinflussung der Expression von *JUN* und *PMAIP1* durch CuO NP führte der Einsatz von BafA1 nur zu geringen Veränderungen und war folglich wenig aussagekräftig. Zudem erschien die Induktion der zumeist via Nrf2-regulierten Gene *GCLC* und *TXNRD1* (Kobayashi und Yamamoto 2005) unabhängig von BafA1. Die Aktivierung von Nrf2 scheint somit schon bei niedrigerem Eintrag an reaktiven Kupferionen zu erfolgen. Diese These stützend, erfolgte die Aktivierung von Nrf2 durch CuO NP schon in niedrigen Konzentrationen und war nicht konzentrationsabhängig (siehe Abbildung 20). Auf jeden Fall ist das Ausmaß der ROS-Entstehung trotz Einsatz von BafA1 ausreichend für eine Induktion dieser Gene via Redox-Regulation.

Insgesamt kann anhand der Analysen die Aussage getroffen werden, dass die durch CuO NP beobachtete Beeinflussung der Genexpression der veränderten Signalwege hauptsächlich über das Ausmaß der Kupferionenfreisetzung und die damit verbundene ROS-Entstehung bestimmt wird. Somit wurden nahezu ausschließlich redoxkontrollierte Prozesse aktiviert und induziert, wohingegen rein partikelvermittelte Effekte nicht nachgewiesen werden konnten.

6. ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION

Ein wichtiger Fokus der toxikologischen Risikobewertung liegt auf der Identifizierung der zugrunde liegenden Wirkmechanismen von potentiell toxischen oder sogar kanzerogenen Substanzen wie z.B. von unterschiedlichen Metallverbindungen. Dabei steigt die Nachfrage nach prädiktiven Hochdurchsatz-Testsystemen, um aufwendige Langzeituntersuchungen oder ausführliche mechanistische Studien, soweit es zulässig ist, zu minimieren (Rowlands et al. 2014). Neben Routineuntersuchungen zur Mutagenität und Genotoxizität von Substanzen steigt der Einsatz des vielversprechenden Ansatzes von Genexpressionsanalysen, da Veränderungen innerhalb der Genexpression einen sensitiven und spezifischen Indikator für das toxische und genotoxische Potential von Substanzen darstellen (Fielden und Zacharewski 2001; Waters et al. 2010).

Deshalb bestand ein Schwerpunkt dieser Arbeit in der Etablierung einer *High-Throughput RT-qPCR* Methode, mit der die Wirkmechanismen von Substanzen anhand einer Beeinflussung der genomischen Stabilität auf transkriptioneller Ebene identifiziert werden sollten. Mit dieser Technik können Veränderungen der Expression von 95 Genen in 96 Proben parallel untersucht werden, wodurch sowohl konzentrations- als auch zeitabhängige quantitative Analysen ermöglicht werden. Dadurch findet eine Abgrenzung zu anderen häufig eingesetzten Techniken wie DNA-Microarray-Analysen oder Next Generation Sequencing statt (Nuwaysir et al. 1999; Cunningham et al. 2000; Nie et al. 2006), bei denen zwar das gesamte Genom betrachtet wird, aufgrund eines enormen Aufwands aber häufig nur eine einzelne Dosis zu einem einzigen Zeitpunkt; zudem sind die Ergebnisse darüber hinaus nur semi-quantitativ und müssen im Anschluss oftmals via PCR bestätigt werden.

Da sowohl die Probenaufarbeitung, Versuchsdurchführung sowie die anschließende Datenanalyse vom Hersteller vorgegeben waren oder bereits im Vorfeld etabliert wurden, lag der Fokus in dieser Arbeit auf der Generierung eines geeigneten Gen-Sets. Dazu wurde ein schon bestehendes Set bezüglich der geforderten Fragestellung nach einer Beeinflussung der genomischen Stabilität in seiner Zusammensetzung optimiert. Die Wirkmechanismen von Substanzen werden diesbezüglich nicht nur durch direkte Läsionen von zellulären Komponenten wie z.B. der DNA charakterisiert, sondern das gesamte DNA-Schadensantwortsystem wird nach einer Schädigung aktiviert. Dieses setzt nach Erkennung eines Schadens neben DNA-Reparatursystemen sowie antioxidativen Abwehrmechanismen auch die Zellzyklusregulation, damit mehr Zeit zur DNA-Reparatur zur Verfügung steht, sowie, im Falle einer zu gravierenden Schädigung, den programmierten Zelltod, die Apoptose, in Gang (Harper und Elledge 2007). Die Signalwege dieses ganzen Systems agieren streng koordiniert und kontrolliert u.a. über p53 und werden als Reaktion

auf zellulären Stress zeitweise aktiviert. Die Tatsache, dass einige dieser Signalwege in Krebszellen häufig dereguliert oder inaktiviert sind, betont weiterhin deren Bedeutung (Hanahan und Weinberg 2000; Hanahan und Weinberg 2011). Deshalb wurden 95 Gene, deren korrespondierende Proteine innerhalb dieses Netzwerkes zur Erhaltung der genomischen Stabilität eine essentielle Rolle spielen, ausgewählt. Somit enthielt das endgültige Set Gene, die mit der Aufnahme von Substanzen und speziell Metallen assoziiert sind, Markergene für oxidativen, inflammatorischen und genotoxischen Stress, Gene, die eine veränderte Aktivität wichtiger redoxsensitiver Transkriptionsfaktoren wie Nrf2, AP-1, p53 und NF- κ B anzeigen, Gene von antioxidativen Enzymen sowie Gene, deren korrespondierende Proteine an der Zellzyklusregulation, der Apoptose, der DNA-Reparatur sowie dem Fremdstoffmetabolismus beteiligt sind. Eine Einteilung des Sets in die Signalwege ist in Abbildung 29 gezeigt.

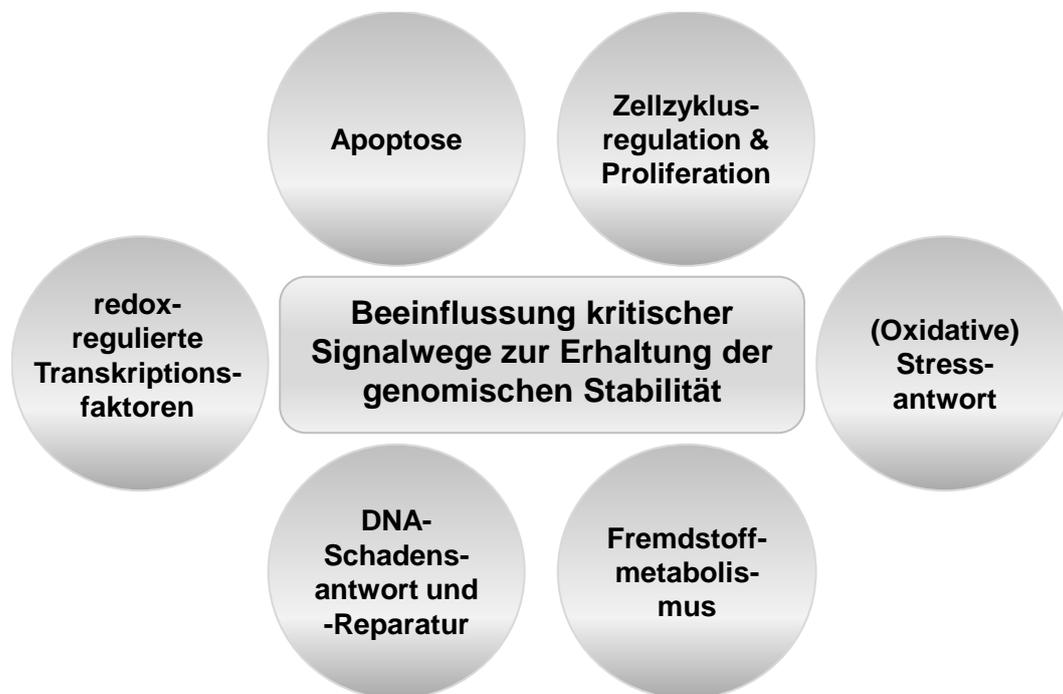


Abbildung 29 **Einteilung des Gen-Sets zur Untersuchung einer Beeinflussung der genomischen Stabilität in unterschiedliche Signalwege/ Gruppierungen.** Die für die Fragestellung ausgewählten Gene können in die Kategorien redoxregulierte Transkriptionsfaktoren, (oxidative) Stressantwort, Zellzyklusregulation und Proliferation, Apoptose, DNA-Schadensantwort und -Reparatur sowie Fremdstoffmetabolismus eingeteilt werden.

Neben der Auswahl der Gene, die eine aussagekräftige Anwendung der Technik ermöglichen sollte, bestand eine weitere große Herausforderung im Design der 95 Primer-Paare, die alle unter gleichen Reaktionsbedingungen optimal und spezifisch funktionieren sollten. Deshalb wurden neben den Primern, die aus dem ursprünglichen Set der Firma Fluidigm übernommen wurden, die Primer-Paare nach genau definierten Vorgaben und Kriterien, beispielsweise unter der Voraussetzung einer zu umspannenden

Exon-Exon-Grenze, mithilfe der Software *Beacon Designer 8* konzipiert. Bei der anschließenden Validierung wurden die Spezifität und Selektivität der Primer-Paare für das jeweilige Zielampikon anhand definierter Schmelzkurven sowie Schmelzpunkten und Größen, die mit bekannten theoretischen Werten korrelieren mussten, mittels konventioneller qPCR, der *High-Throughput RT-qPCR* und gelelektrophoretischer Methoden verifiziert. Dabei konnten unspezifische Nebenprodukte, die Bildung von Primer-Dimeren sowie ein zu hoher genomischer DNA-Hintergrund unter anderem auch durch mitgeführte Negativkontrollen ausgeschlossen werden. Die Primer-Effizienzen und die Korrelationskoeffizienten, die für die Gene innerhalb des Analysenbereichs zwischen 90-103 % bzw. fast ausschließlich über 0,985 lagen, bestätigten das Quantifizierungspotential der Methode; zusätzlich wurde eine gute Intra-Assay-Varianz festgestellt und ein *Cut-off* von $C_q \leq 22$ aufgrund der Miniaturisierung der Reaktionen in den Nanoliterbereich festgelegt.

Im Folgenden wurden Genexpressionsanalysen mit dem Humankanzerogen $CdCl_2$ als Modellsubstanz mit recht detailliert erforschtem Wirkmechanismus durchgeführt, um zum einen die Aussagekraft und Eignung der etablierten *High-Throughput RT-qPCR* zu überprüfen und zum anderen neue Erkenntnisse bezüglich mechanistischer Aspekte zu erhalten. Bei Cadmium zeigen vor allem indirekt genotoxische und komutagene Wirkmechanismen wie z.B. eine Beeinträchtigung verschiedener DNA-Reparaturfaktoren und der entsprechenden Reparaturprozesse, eine negative Beeinflussung der Zellzyklusregulation und Wechselwirkungen mit Transkriptionsfaktoren wie p53 und Signalwegen eine hohe Relevanz. Diese resultieren zum einen aus erhöhten ROS-Mengen und dadurch induzierten oxidativen Schäden sowie ROS-induzierten Signalkaskaden, und zum anderen aus einer Beeinflussung redoxsensitiver Aminosäuren, zinkbindender Strukturen oder von Thiolen (zusammengefasst in Waisberg et al. 2003; Hartwig 2010; Hartwig 2013b; Thevenod und Lee 2013).

Mit den beschriebenen zeit- und konzentrationsabhängigen Genexpressionsanalysen in den Zelllinien A549 und BEAS-2B konnte das bekannte genotoxische und kanzerogene Potential von Cadmium gut widerspiegelt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefasst. So wurden auf Ebene der Transkription erhöhte intrazelluläre Cadmiumkonzentrationen anhand einer Induktion der Gene *MT1X* und *MT2A* angezeigt, was auf der einen Seite einen Entgiftungsmechanismus darstellt, auf der anderen Seite jedoch zur Akkumulation des Metalls in Zellen und Geweben führen kann. Die Induktion von oxidativem Stress wurde durch die stresssensitiven Gene *HMOX1* und *HSPA1A* angezeigt, und zusätzlich waren in BEAS-2B-Zellen, die im Gegensatz zu A549-Zellen über ein funktionsfähiges Nrf2 verfügen, viele Gene antioxidativer Enzyme induziert. Eine transiente Induktion von Zellzykluskontrollgenen wie *CDKN1A* zusammen mit einer längerfristigen

Erhöhung der Transkriptmengen von proliferationsfördernden Faktoren wie *MYC* und *JUN* in der Nicht-Krebszelllinie BEAS-2B deutete zudem eine Deregulation des Zellwachstums an, ein kritischer Faktor innerhalb der Krebsentstehung. In beiden Zelllinien wurde weiterhin die Induktion des intrinsischen Apoptoseweges sowie eine ausbleibende Aktivierung des Tumorsuppressors p53 durch das System angezeigt. Letztere Beobachtung ist in BEAS-2B-Zellen auf die Inaktivierung von p53 während der Immortalisierung dieser Zelllinie zurückzuführen (Levine 2009) und könnte in A549-Zellen einen mechanistischen Aspekt der Cadmiumtoxizität in Form einer inaktivierenden Konformationsänderung des Tumorsuppressors widerspiegeln (Meplan et al. 1999; Schwerdtle et al. 2010). Zusätzlich konnten neue Erkenntnisse bezüglich einer negativen Beeinflussung der verschiedenen DNA-Reparaturwege in Form einer basalen Schwächung durch zahlreich verminderte mRNA-Gehalte vieler DNA-Reparaturgene gewonnen werden, obwohl die Induktion der Gene *GADD45A* und *DDIT3* genotoxischen Stress und damit eine DNA-Schädigung anzeigten. Eine Reparaturhemmung durch Cadmium ist dabei jedoch nicht nur auf die angedeutete verminderte Transkription zurückzuführen, sondern auch auf Proteinebene sind Wechselwirkungen mit wichtigen DNA-Reparaturfaktoren bekannt, die häufig zu einer Inhibierung dieser Proteine führen (zusammengefasst in Hartwig 2010).

Tabelle 7 **Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse der Genexpressionsuntersuchungen mit CdCl₂ nach 8- und 24-stündiger Inkubation.** ↑↑↑=starke Induktion, ↑↑=mittlere Induktion, ↑=schwache Induktion, ↓=schwache Repression, ↓↓=mittlere Repression

| Signalweg/ Gengruppierung | Gen- Klassifizierung und -Assoziation | BEAS-2B | | A549 | |
|-------------------------------------------|---------------------------------------------|---------|------|------|------|
| | | 8 h | 24 h | 8 h | 24 h |
| (oxidative) Stressantwort | Aufnahme | ↑↑ | ↑↑ | ↑↑↑ | ↑↑↑ |
| | Stressantwort | ↑↑↑ | ↑↑↑ | ↑↑ | ↑↑ |
| | Antioxidative Abwehr | ↑↑ | ↑ | | |
| Zellzyklusregulation und Proliferation | Zellzykluskontrolle | ↑↑ | | | ↑ |
| | Mitotische Faktoren | ↑↑ | ↑ | ↑ | |
| Apoptose | Proapoptotisch | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ |
| | Antiapoptotisch | | ↓ | ↓ | ↓ |
| DNA-Schadensantwort | Schadenssignale | ↑↑ | ↑ | ↑ | |
| | DNA-Reparatur | ↓ | ↓↓ | ↓ | ↓ |

Nach 8-stündiger Behandlung wurde anhand einer zumeist stärkeren Induktion vieler Gene bereits zum frühen Zeitpunkt eine akute Reaktion der Zelle auf erhöhte intrazelluläre Cadmiumkonzentrationen und dadurch resultierende erhöhte ROS-Mengen sowie DNA-Schädigungen angezeigt. Der Vorteil zeitabhängiger Untersuchungen wurde jedoch vor

allem innerhalb der Gruppe der proliferations- und zellzyklusregulierenden Gene in BEAS-2B-Zellen deutlich, da dadurch die Deregulation des Zellwachstums angezeigt wurde. Zudem wurden einige Gene wie *HMOX1*, *HSPA1A* und die *MTs* in allen untersuchten Konzentrationen effektiv verändert, wohingegen sich transkriptionelle Veränderungen der Gene der Zellzyklusregulation, Apoptose und der DNA-Reparaturfaktoren zumeist auf die hohen CdCl_2 -Konzentrationen beschränkten, die in den jeweiligen Zelllinien schon leicht bis moderat zytotoxische Wirkungen zeigten. Die beobachteten Veränderungen der Genexpression waren bis auf die Gengruppierungen der Zellzykluskontrolle sowie der antioxidativen Faktoren in beiden Zelllinien vergleichbar, jedoch bezüglich der Stärke der Effekte unterschiedlich ausgeprägt und vielfältig. Der Vergleich der beiden Zelllinien erleichterte jedoch unter Berücksichtigung verschiedener Vor- und Nachteile die Interpretation der erhaltenen Ergebnisse. Wie bereits erläutert, sind BEAS-2B-Zellen keine Tumorzellen, aber durch Virus-Transformation p53-defizient, wogegen A549-Zellen p53-profizient sind, aber als Tumorzelllinie einige Charakteristika der Original-Typ-2-Epithelzelllinie verloren haben und eine Daueraktivierung von Nrf2 aufweisen (Singh et al. 2006; Levine 2009).

Die vorgestellte *High-Throughput RT-qPCR*-Technik weist durch einen hohen Probanddurchsatz sowie quantitative zeit- und konzentrationsabhängige Analysen eine hohe Aussagekraft auf. Genaue mechanistische Hintergründe, wie beispielsweise die cadmiuminduzierte ROS-Generierung oder die Ursachen für reprimierte DNA-Reparaturgenmengen, können im Rahmen der Genexpressionsanalysen jedoch nicht nachgewiesen werden und erfordern weitere Untersuchungen. Auch die Übertragbarkeit der Effekte auf Protein- und zelluläre Ebene muss, falls für die jeweilige Fragestellung erforderlich, anschließend verifiziert werden. Diesbezüglich erhält man durch die große Anzahl untersuchter Gene und die Betrachtung komplexer und zusammenhängender Effekte innerhalb von Signalwegen signifikante Anhaltspunkte, die weiterführende Untersuchungen erleichtern und fokussieren.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden Genexpressionsanalysen mit CuO NP als hauptsächliche Untersuchungstechnik im Rahmen einer umfassenden Ermittlung des toxikologischen Potentials durchgeführt. Nanomaterialien, darunter auch vermehrt CuO NP, werden aufgrund verbesserter physikochemischer Eigenschaften zunehmend in verschiedenen Bereichen wie Industrie, Pharmakologie und der Lebensmittelbranche eingesetzt (Chang et al. 2012). Die damit verbundene erhöhte Exposition von Arbeitnehmern und auch der Bevölkerung insgesamt erfordert eine umfassende Risikobewertung, um möglichen adversen Effekten vorzubeugen.

Verschiedene Arbeitsgruppen, darunter auch unsere, konnten bereits ein starkes zytotoxisches und genotoxisches Potential von CuO NP verglichen mit anderen

metallbasierten Nanopartikeln sowie Pendants derselben chemischen Zusammensetzung in identischer Massendosis in verschiedenen Lungenzellkulturmodellen zeigen (Karlsson et al. 2008; Karlsson et al. 2009; Midander et al. 2009; Fahmy und Cormier 2009; Cronholm et al. 2013; Semisch et al. 2014). Die ausgeprägte Zytotoxizität von CuO NP im Vergleich zu CuO MP und CuCl₂ konnte in dieser Arbeit in BEAS-2B-Zellen bestätigt werden. Die gesteigerte Generation von ROS und dadurch resultierender oxidativer Stress, die der Literatur zufolge einen Hauptaspekt der Toxizität von CuO NP darstellen, legen eine Beeinflussung redoxregulierter Signalwege durch CuO NP nahe. Darüber hinaus sind zudem direkte Wechselwirkungen der Partikel mit Rezeptoren zellulärer Signalkaskaden denkbar. Da systematische Untersuchungen zu diesem Aspekt bezüglich der Aufklärung der zugrunde liegenden Wirkmechanismen bisher weitgehend fehlten, wurden die Genexpressionsuntersuchungen, wie bei CdCl₂ vergleichend in BEAS-2B- und A549-Zellen, als Ausgangspunkt im Rahmen der toxikologischen Charakterisierung gewählt. Um die durch CuO NP hervorgerufenen Effekte vergleichend beurteilen zu können, wurden parallel die Referenzsubstanzen CuO MP und lösliches CuCl₂ untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8 **Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse der Genexpressionsuntersuchungen mit CuO NP, CuO MP und CuCl₂ nach 24-stündiger Inkubation.** Die Richtung der Pfeile zeigt eine Hoch- bzw. Herunterregulation der Expression der jeweiligen Gene an und die Größe der Pfeile dient als Maß für die Stärke der Modulierung. Die Kupferverbindungen und die Zelllinien sind der Effektstärke entsprechend miteinander verglichen.

| Signalweg/ Gengruppierung | Gen- Klassifizierung und -Assoziation | BEAS-2B | A549 |
|------------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|------|
| (oxidative) Stressantwort | Aufnahme | ↑ NP >> MP ≈ CuCl ₂ >> NP ≈ CuCl ₂ >> MP | ↑ |
| | Stressantwort | ↑ NP >> MP > CuCl ₂ >> NP > CuCl ₂ >> MP | ↑ |
| | Antioxidative Abwehr | ↑ NP >> CuCl ₂ >> NP ≈ CuCl ₂ | ↓ |
| Zellzyklus- regulation und Proliferation | Zellzykluskontrolle | ↑ NP > NP | ↑ |
| | Mitotische Faktoren | ↑ NP ≈ NP | ↓ |
| Apoptose | Proapoptotisch | ↑ NP >> NP | ↑ |
| | Antiapoptotisch | (NP ≈ CuCl ₂) | ↓ |
| DNA- Schadensantwort | Schadenssignale | ↑ NP >> CuCl ₂ > MP > NP ≈ CuCl ₂ | ↑ |
| | DNA-Reparatur | ↓ NP >> NP > CuCl ₂ | ↓ |

Die Induktion der mit der Kupferaufnahme assoziierten *MT*-Gene zeigte in beiden Zelllinien für CuO NP die mit Abstand deutlichste Akkumulation an intrazellulärem Kupfer an. In A549-

Zellen führte CuCl_2 qualitativ betrachtet zu einem vergleichbaren Effekt; im Vergleich zu BEAS-2B-Zellen war dieser jedoch deutlich abgeschwächt. Zudem bewirkten CuO NP eine intensive Stressantwort in Form einer erheblich gesteigerten Expression der Gene *HMOX1*, *HSPA1A* und *IL8*; dies war am stärksten in BEAS-2B-Zellen festzustellen. Zusätzlich wurden in dieser Zelllinie Gene des antioxidativen Abwehrsystems durch CuO NP und in geringerem Ausmaß durch CuCl_2 induziert, wogegen sich in A549-Zellen keine Veränderungen oder sogar gegensätzliche Herunterregulierungen dieser Gene feststellen ließen. Die vermutete Aktivierung verschiedener redoxsensitiver Transkriptionsfaktoren wie MTF-1, HSF-1, Nrf2 und AP-1 durch CuO NP dominierte somit hauptsächlich in der Nicht-Krebszelllinie. Bei den proliferationsassoziierten Genen wurde in BEAS-2B-Zellen lediglich *JUN* als weiteres Indiz für eine AP-1 Aktivierung ausschließlich durch CuO NP induziert und in A549-Zellen das Proto-Onkogen *MYC* durch CuO NP und CuCl_2 transkriptionell reprimiert. Außerdem wurde das für den Zellzyklusinhibitor p21 kodierende *CDKN1A* nur durch CuO NP induziert. Auch innerhalb der Apoptose assoziierten Gene wurde die Expression der proapoptotischen Faktoren *PMAIP1* und *TNFRSF10B* ausschließlich durch die Nanopartikel in BEAS-2B-Zellen gesteigert. CuO NP induzierten erneut am deutlichsten in BEAS-2B-Zellen die Schadenssignalgene *GADD45A* und *DDIT3* als Maß für genotoxischen Stress und DNA-schädigendes Potential. Bezüglich der Gene der DNA-Reparatur wurden Faktoren der BER und NER durch CuO NP in BEAS-2B-Zellen und durch CuO NP und CuCl_2 in A549-Zellen ausschließlich herunterreguliert.

Die Kupferverbindungen zeigten im Grundsatz gleiche Expressionsmuster und damit Wirkmechanismen, wobei der Wirkungsgrad von CuO NP mit Abstand am höchsten war. CuO NP bewirkten immer konzentrationsabhängig, meist auch schon in der niedrigsten Konzentration, veränderte Transkriptmengen. Im Gegensatz dazu waren die Effekte von CuCl_2 eindeutig einer homöostatischen Regulation zuzuordnen, da häufig plateauartige Verläufe ersichtlich oder deutliche Veränderungen auf die höchste Konzentration beschränkt waren. Das unterschiedliche Ausmaß der Modulation der Genexpression der untersuchten Signalwege durch die Kupferverbindungen ist zusätzlich in Abbildung 30 anhand der Anzahl der Gene, deren Expression um mehr als Faktor 2 verändert wurde, evaluiert. Dabei waren die Effekte der CuO MP und CuCl_2 weitgehend miteinander vergleichbar, CuCl_2 beeinflusste aber mehr Signalgruppierungen. Im Fall von CuO NP wurden die untersuchten Signalwege im Vergleich dazu jedoch durch eine größere Anzahl an Genen mit veränderter Expression insgesamt vielfältiger beeinflusst.

Im Vergleich der Zelllinien wurden zwar mit Ausnahme der hauptsächlich Nrf2-regulierten Gene antioxidativer Enzyme ebenfalls entsprechende Veränderungen festgestellt; die Effektausprägung war jedoch in BEAS-2B-Zellen generell stärker. Die Differenzen sowie die allgemein höhere Empfindlichkeit von BEAS-2B-Zellen können auf die stärkere ROS-

Sensitivität der Nicht-Krebszelllinie zurückgeführt werden und legen somit die hauptsächlichste Beeinflussung der Genexpression über redoxregulierte Vorgänge durch die Kupferverbindungen nahe. Damit übereinstimmend wurde die generelle und vor allem oxidative Stressantwort beträchtlich durch CuO NP induziert. Die Genexpressionsprofile spiegeln relativ genau die Zytotoxizität der Kupferverbindungen wider: Diese war in BEAS-2B-Zellen für CuO NP mit Abstand am deutlichsten; in A549-Zellen im Vergleich dazu abgeschwächt und eher mit CuCl₂ vergleichbar. Wie bei Cadmium wurden vor allem die transkriptionell sensitiven Gene *HMOX1*, *HSPA1A*, *IL8*, *MT1X* und *MT2A* in allen untersuchten Konzentrationen und durch alle Kupferverbindungen effektiv verändert; Gene der Zellzyklusregulation, der Apoptose und der DNA-Reparaturfaktoren wurden jedoch meist nur durch CuO NP oder in höheren, zytotoxischen Konzentrationen der Kupferverbindungen in ihrer Expression verändert.

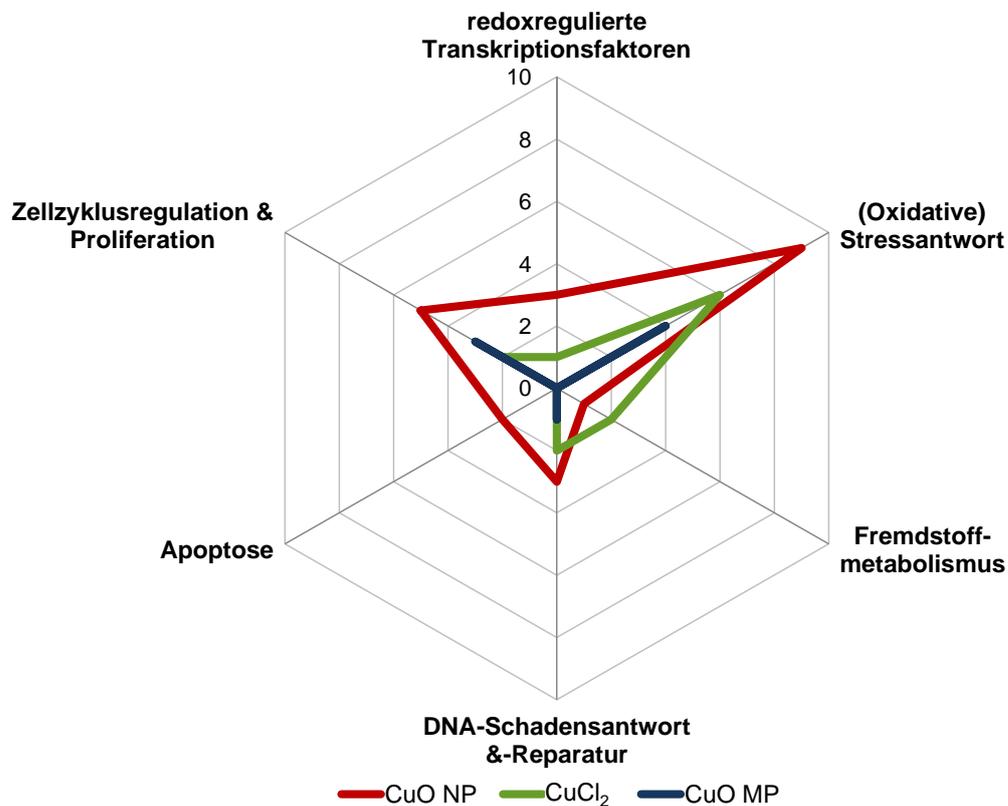


Abbildung 30 **Darstellung des Ausmaßes der Beeinflussung der Genexpression durch CuO NP, CuO MP und CuCl₂.** Die Effekte der jeweils höchsten Konzentrationen (20 µg/mL bzw. 252 µM) der Kupferverbindungen im Rahmen der Genexpressionsanalysen in BEAS-2B-Zellen wurden über die Anzahl an Genen (0-9), deren Expression um mehr als Faktor 2 verändert wurde, in einem Netzdiagramm miteinander verglichen.

Weiterführende Untersuchungen verschiedener Parameter auf zellulärer Ebene in BEAS-2B-Zellen reflektierten die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen. Die Aufnahmeuntersuchungen, die zur Vermeidung von potentiellen Artefakten nur in der jeweils löslichen Zellfraktion durchgeführt wurden, zeigten, dass vor allem CuO NP in hohem Maße

sowohl in das Zytoplasma als auch in den Zellkern aufgenommen werden, wobei schon bei niedrigeren Inkubationskonzentrationen millimolare Kupferkonzentrationen beobachtet wurden. Das starke genotoxische Potential von CuO NP, in dieser Arbeit anhand der Induktion von *GADD45A* und *DDIT3* ersichtlich, kann auf diese hohen Kernkupfergehalte zurückgeführt werden. CuO MP wiesen im Vergleich dazu deutlich geringere intrazelluläre Kupfergehalte auf, wobei jedoch ebenfalls eine Konzentrationsabhängigkeit festgestellt wurde. CuCl₂ wurde in wesentlich geringerem Ausmaß sowie nahezu unabhängig von der eingesetzten Dosis in die Zellkompartimente aufgenommen. Diese Ergebnisse korrelierten in hohem Maße sowohl mit den Effektstärken der Genexpressionsprofile als auch mit der zytotoxischen Wirkung, wodurch der intrazelluläre Kupfergehalt als entscheidender Parameter der Toxizität identifiziert werden konnte. In Folge dieser intrazellulären Überladung mit Kupferionen können die Kontrollmechanismen für das redoxaktive und potentiell toxische Metall überlastet sein, wodurch die Ionen nicht mehr nur proteingebunden und damit reguliert, sondern zusätzlich „frei“ oder unspezifisch gebunden in der Zelle vorliegen. Als Folge können Cu¹⁺-Ionen in fentonartigen Reaktionen die Bildung von reaktiven Hydroxylradikalen katalysieren, wodurch es aufgrund erhöhter ROS-Mengen zur oxidativen Schädigung der DNA, biologischer Membranen und von Proteinen kommen kann. Oxidativer Stress kann ebenfalls durch Depletion des zellulären GSH-Levels aufgrund erhöhter Kupferkonzentrationen induziert werden (Jomova et al. 2012).

Durch die Ergebnisse der Aufnahmeuntersuchungen ließ sich zudem die These der unterschiedlichen Aufnahmemechanismen in die Zelle stützen, wonach die Partikel hauptsächlich über den aktiven Mechanismus der Endozytose in die Zellen internalisiert und lösliche Kupferverbindungen kontrolliert über Transportsysteme wie den hCTR1-Transporter in die Zelle aufgenommen werden (Lopez de Romana et al. 2011; Canton und Battaglia 2012). Bei Untersuchungen von Faktoren der oxidativen Stressantwort wurde die vermutete Aktivierung des redoxsensitiven Transkriptionsfaktors Nrf2 in der Modellzelllinie HeLa S3 untersucht, da BEAS-2B-Zellen bei erreichbaren Zellmengen einen zu geringen Kernproteingehalt aufwiesen und A549-Zellen aufgrund des dauerhaft aktiven Nrf2 ungeeignet waren. Die Aktivierung von Nrf2, die durch Induktion diverser antioxidativer Gene auch für BEAS-2B-Zellen vermutet werden kann, konnte für CuO NP schon bei niedrigen und für CuCl₂ in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden. Die Induktion von oxidativem Stress, allerdings zu unterschiedlichen Zeitpunkten, bestätigte sich zudem durch eine GSH-Depletion für CuO NP nach zwei Stunden und nach 24-stündiger Inkubation für CuCl₂ anhand einer Steigerung des GSH-Levels. Auch eine Aktivierung der DNA-Schadensantwort in Form von Zellzyklusarretierung und Apoptose wurde, wie durch Induktion von *CDKN1A* sowie *PMAIP1* und *TNFRSF10B* naheliegend, auf funktionaler Ebene beobachtet. Dabei ließ sich ein Zellzyklusarrest in der G₀/G₁-Phase feststellen, und bei den Untersuchungen der

Zelltodinduktion dominierte der apoptotische Mechanismus über die Nekrose; beides erneut für CuO NP am markantesten im Vergleich zu den Referenzverbindungen. Bei den Untersuchungen auf funktionaler Ebene konnte insgesamt eine Zeitabhängigkeit der Effekte beobachtet werden (zusammengefasst in Abbildung 31). Eine ausgeprägte Kupferüberladung, nach 24 Stunden vor allem für CuO NP sehr markant, trat, den kinetischen Aufnahmeuntersuchungen zu entnehmen, bereits nach einem 1-stündigen Behandlungszeitraum auf. Nach zwei Stunden kam es durch CuO NP zu erhöhten ROS-Mengen, nach fünf Stunden ließ sich in HeLa S3-Zellen die Kernlokalisierung und ARE-Bindungsaktivität von Nrf2 nachweisen. Nach acht Stunden reagierte dann die DNA-Schadensantwort in Form eines Zellzyklusarrestes, nach 48 Stunden war sie anhand markanter Apoptoseraten erkennbar.

Die vermutete Aufnahme über Endozytose sowie die weiterführende intrazelluläre Prozessierung wurden als kritische Faktoren des toxischen Potentials von CuO NP detaillierter untersucht. In Analysen mit diversen pharmakologisch wirksamen Inhibitoren der Endozytose bestätigte sich die aktive Aufnahme der partikulären Verbindungen. Als wirksame Substanz konnte dabei nur der Dynamin-Inhibitor OH-Dyn eingesetzt werden, da weitere verwendete Inhibitoren in nicht-zytotoxischen Konzentrationen keine Aufnahmehemmung von CuO NP und CuO MP in BEAS-2B-Zellen bewirkten. Mit OH-Dyn wurde der intrazelluläre Kupfereintrag von CuO NP und CuO MP um 50-75 % bzw. 70-80 % nach 8-stündiger Behandlung abgesenkt, weshalb sich Dynamin-abhängige endozytotische Vorgänge als wesentliche Eintragswege der partikulären Verbindungen in dieser Zelllinie identifizieren ließen. Jedoch konnte weder in BEAS-2B-Zellen noch in vergleichenden Untersuchungen in HeLa S3-Zellen eine vollständige Blockierung der zellulären Kupferaufnahme erzielt werden, wobei Faktoren wie die extrazelluläre Löslichkeit oder die Aufnahme über andere Endozytosemechanismen diese Beobachtung erklären können. Untersuchungen mit BafA1, einem spezifischen Inhibitor der vakuolären H⁺-ATPase, der die pH-Absenkung in Lysosomen vermindert (Bowman et al. 1988; Yoshimori et al. 1991), klärten den Einfluss der lysosomalen Ansäuerung auf. BafA1 führte nach 24-stündiger Inkubation nur bei CuO NP zu einer um 60 % geringeren Kupferaufnahme. Diese kann aufgrund verschiedener Theorien auf eine geringere Löslichkeit von CuO NP in neutralisierten Lysosomen zurückgeführt werden. So kann durch die fehlende Ansäuerung eine insgesamt geringere endozytotische Aufnahme durch gestörtes endozytotisches Recycling und eine Hemmung der Lysosomenbildung sowie ein Export der nicht abbaubaren Partikel aus der Zelle über Exozytose innerhalb des Inkubationszeitraumes vermutet werden (Mellman 1992; van Weert et al. 1995; Maxfield und McGraw 2004; Alberts et al. 2011).

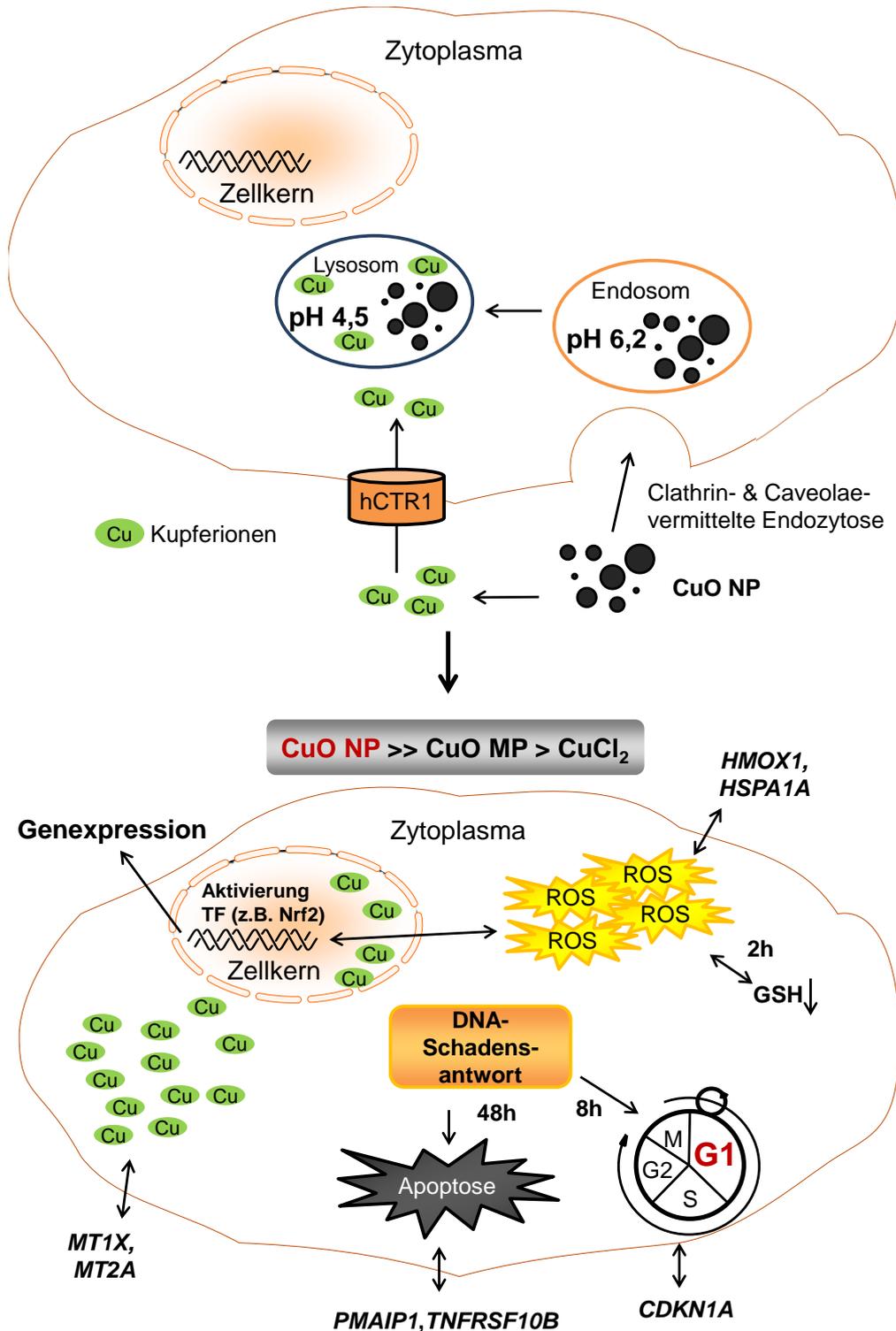


Abbildung 31 **Graphische Zusammenfassung des identifizierten Wirkmechanismus von CuO NP.** CuO NP werden nicht homöostatisch reguliert, sondern über Clathrin- und Caveolae-abhängige Endozytose in die Zelle internalisiert. Zusätzlich werden extrazellulär gelöste Kupferionen über Transporter wie hCTR1 in die Zelle aufgenommen. Während der Prozessierung des resultierenden Endosoms zum Lysosom kommt es durch die pH-Absenkung zu einer gesteigerten Löslichkeit von CuO NP, wodurch vermehrt reaktive Kupferionen in die Zelle freigesetzt werden. Diese sowohl im Zytoplasma als auch im Kern resultierende Kupferüberladung, die viel ausgeprägter als für CuO MP und CuCl₂ verläuft, führt zu einer erhöhten ROS-Bildung und oxidativem Stress, zu einer Aktivierung der DNA-Schadensantwort in Form eines Zellzyklusarrestes und der Apoptose und einer hauptsächlich redoxregulierten Beeinflussung der Genexpression, die wichtig für den Erhalt der genomischen Stabilität ist und anhand derer die zellulären Effekte reflektiert werden.

Mit der Beobachtung korrelierend stellte unsere Arbeitsgruppe in Voruntersuchungen eine deutlich ausgeprägtere Löslichkeit der CuO NP im sauren Milieu im Vergleich zu neutralen Bedingungen fest. Zusätzlich war die Solubilität der CuO NP im Vergleich zu CuO MP im Sauren deutlich stärker (Semisch et al. 2014). Diese Beobachtung bekräftigt erneut, dass die verminderte Löslichkeit den wesentlichen Grund für den verringerten Kupfergehalt nach CuO NP Behandlung darzustellen scheint, da der Einsatz von BafA1 bei CuO MP keinen Effekt bewirkte. Insgesamt konnte somit der allgemein für metallbasierte NP postulierte *trojan horse type* Mechanismus für CuO NP bestätigt werden, bei dem es wegen der verminderten Ansäuerung durch BafA1 zu einer geringeren Löslichkeit von CuO NP in den Lysosomen kommt, wodurch weniger reaktive Kupferionen in die Zelle gelangen (zusammengefasst in Abbildung 31).

In weiteren Untersuchungen wurde durch BafA1 die Zytotoxizität von CuO NP deutlich vermindert und die durch CuO NP beobachtete GSH-Depletion aufgehoben. Folglich kann die Toxizität der CuO NP hauptsächlich auf die Umgehung der kontrollierten homöostatischen Kupferaufnahme und dadurch resultierende Überladung der Zellen mit freien reaktiven Kupferionen, die die Bildung reaktiver ROS katalysieren können, und weniger auf partikelvermittelte Effekte zurückgeführt werden.

Weiterführende Genexpressionsanalysen mit Einsatz von OH-Dyn und BafA1 konnten aufgrund einer unvollständig unterbundenen Aufnahme der Partikel sowie durch eine Beeinflussung der Genexpression bereits durch die Inhibitoren selbst teilweise nicht eindeutig oder nur als Mischeffekte interpretiert werden. Durch den Einsatz von OH-Dyn wurde jedoch keine Beeinflussung der extrazellulär gesteuerten Genexpression durch mögliche Partikel-Rezeptor-Wechselwirkungen nachgewiesen, da bei den Koinkubationen sowohl bei CuO NP als auch bei CuO MP alle allein durch die partikulären Verbindungen induzierten Veränderungen aufgehoben wurden. Der Einsatz von BafA1 führte bezüglich CuO NP bei den stark expressionsveränderten stresssensitiven Genen *HMOX1*, *HSPA1A* und *IL8* sowie bei den mit der intrazellulären Kupferionenfreisetzung assoziierten Genen *MT1X* und *MT2A* ausnahmslos zu deutlich geringeren Induktionen. Diese Beobachtungen bekräftigten ebenfalls die verminderte Freisetzung reaktiver Kupferionen sowie abgeschwächte Generierung von ROS durch CuO NP in weniger sauren Lysosomen. Bei CuO MP bewirkte BafA1 im Gegensatz dazu keine Veränderungen. Die Expression der DNA-Schadenssignalgene *DDB2* und *GADD45A* sowie von *JUN*, *PMAIP1*, *GCLC* und *TXNRD1* erwies sich bezüglich CuO NP als nur gering oder weitgehend unabhängig von BafA1 modifiziert. Dadurch erschien im Hinblick auf die Beeinflussung dieser Gene eine moderate ROS-Entstehung ausreichend.

Somit kann postuliert werden, dass die beobachtete Beeinflussung der Genexpression durch CuO NP ausschließlich über das Ausmaß der ROS-Entstehung und folglich über ROS als

second messenger bei redoxregulierten Prozessen stattfindet, wogegen keine partikelvermittelten Effekte nachgewiesen werden konnten.

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen mit OH-Dyn und BafA1 vervollständigten anhand der dominierenden Redox-Kontrolle der Genexpression den in dieser Arbeit identifizierten Wirkmechanismus der CuO NP (zusammengefasst in Abbildung 31). Dabei kommt es zusätzlich zur extrazellulären Löslichkeit der Partikel hauptsächlich infolge des *trojan horse type* Mechanismus durch Umgehung der homöostatisch regulierten Kupferaufnahme zu einer erheblichen Überladung der Zellen mit freien reaktiven Kupferionen sowohl im Zytoplasma und vor allem auch im Zellkern. Diese Überladung kann durch wasserlösliches CuCl_2 aufgrund der homöostatischen Kontrolle sowie durch größerskalige CuO MP wegen einer abgeschwächten Aufnahme sowie geringeren Löslichkeit im sauren Milieu nicht annähernd erreicht werden. Dadurch resultiert eine erhöhte ROS-Bildung und oxidativer Stress, weshalb es zur Aktivierung des gesamten DNA-Schadensantwortsystems sowie zu einer deutlichen Beeinflussung der Genexpression, die maßgeblich an der Erhaltung der genomischen Stabilität beteiligt ist, kommt.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Ahamed M, Akhtar MJ, Alhadlaq HA, Alrokayan SA** (2015) Assessment of the lung toxicity of copper oxide nanoparticles: current status. *Nanomedicine* 10:2365-2377
- Ahamed M, Siddiqui MA, Akhtar MJ, Ahmad I, Pant AB, Alhadlaq HA** (2010) Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in human lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 396:578-583
- Aitken RJ, Chaudhry MQ, Boxall ABA, Hull M** (2006) Manufacture and use of nanomaterials: current status in the UK and global trends. *Occup Med* 56:300-6
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P** (2011) *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Deutschland
- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF** (2004) Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Res* 64:5245-5250
- Angel P, Hattori K, Smeal T, Karin M** (1988) The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* 55:875-85
- Angel P, Karin M** (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta, Rev Cancer* 1072:129-57
- Asmuss M, Mullenders LHF, Eker A, Hartwig A** (2000) Differential effects of toxic metal compounds on the activities of Fpg and XPA, two zinc finger proteins involved in DNA repair. *Carcinogenesis* 21:2097-2104
- ATSDR** (2004) *Toxicological Profile for Copper (Update)*. Atlanta
- Becker C, Riedmaier I, Pfaffl MW** (2009) RNA-Qualitätskontrolle in der Genexpressionsanalytik. *BIOSpektrum* 5:512-515
- Berntsen P, Park CY, Rothen-Rutishauser B, Tsuda A, Sager TM, Molina RM, Donaghey TC, Alencar AM, Kasahara DI, Ericsson T, Millet EJ, Swenson J, Tschumperlin DJ, Butler JP, Brain JD, Fredberg JJ, Gehr P, Zhou EH** (2010) Biomechanical effects of environmental and engineered particles on human airway smooth muscle cells. *J R Soc Interface* 7:331-340
- Beyersmann D, Hechtenberg S** (1997) Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 144(2):247-261
- BfR** (2009) *Cadmium in Lebensmitteln - Verbraucherinfo*.
- Biesalski HK** (2002) *Vitamine, Spurenelemente und Mineralstoffe: Prävention und Therapie von Mikronährstoffen*. Thieme, Stuttgart, Deutschland

- Bowman EJ, Siebers A, Altendorf K** (1988) Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:7972-6
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54
- Brigelius-Flohe R, Flohe L** (2011) Basic Principles and Emerging Concepts in the Redox Control of Transcription Factors. *Antioxid Redox Signal* 15(8):2335-2381
- Brown TA** (2007) *Genome und Gene - Lehrbuch der molekularen Genetik*. Springer Spektrum, Heidelberg, Deutschland
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT** (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55:611-622
- Canton I, Battaglia G** (2012) Endocytosis at the nanoscale. *Chem Soc Rev* 41:2718-2739
- Carmichael J, Mitchell JB, Friedman N, Gazdar AF, Russo A** (1988) Glutathione and related enzyme activity in human lung cancer cell lines. *Br J Cancer* 58:437-40
- Chang Y-N, Zhang M, Xia L, Zhang J, Xing G** (2012) The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles. *Materials* 5:2850-2871
- Chao CCK, Huang YT, Ma CM, Chou WY, Sue L** (1992) Overexpression of glutathione S-transferase and elevation of thiol pools in a multidrug-resistant human colon cancer cell line. *Mol Pharmacol* 41:69-75
- Cho W-S, Duffin R, Poland CA, Duschl A, Oostingh GJ, MacNee W, Bradley M, Megson IL, Donaldson K** (2012) Differential pro-inflammatory effects of metal oxide nanoparticles and their soluble ions in vitro and in vivo; zinc and copper nanoparticles, but not their ions, recruit eosinophils to the lungs. *Nanotoxicology* 6:22-35
- Chusuei CC, Wu C-H, Mallavarapu S, Hou FYS, Hsu C-M, Winiarz JG, Aronstam RS, Huang Y-W** (2013) Cytotoxicity in the age of nano: The role of fourth period transition metal oxide nanoparticle physicochemical properties. *Chem-Biol Interact* 206:319-326
- Citri A, Pang ZP, Sudhof TC, Wernig M, Malenka RC** (2012) Comprehensive qPCR profiling of gene expression in single neuronal cells. *Nat Protoc* 7:118-127
- Cnubben NH, Rietjens IM, Wortelboer H, van Zanden J, van Bladeren PJ** (2001) The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environ Toxicol Pharmacol* 10(4):141-152

- Cronholm P, Karlsson HL, Hedberg J, Lowe TA, Winnberg L, Elihn K, Wallinder IO, Moeller L** (2013) Intracellular Uptake and Toxicity of Ag and CuO Nanoparticles: A Comparison Between Nanoparticles and their Corresponding Metal Ions. *Small* 9:970-982
- Crößmann G, Ewers U** (2007) Cadmium, In: *Handbuch der Lebensmitteltoxikologie - Belastungen, Wirkungen, Lebensmittelsicherheit, Hygiene*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Deutschland, p 781-802
- Cunningham MJ, Liang S, Fuhrman S, Seilhamer JJ, Somogyi R** (2000) Gene expression microarray data analysis for toxicology profiling. *Ann N Y Acad Sci* 919:52-67
- DGE** (2016) Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. - Referenzwerte für Kupfer, Mangan, Chrom, Molybdän - www.dge.de/wissenschaft/referenzwerte/kupfer-mangan-chrom-molybdaen - besucht im Januar 2016.
- Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, Qian D, Lam JS, Ailles LE, Wong M, Joshua B, Kaplan MJ, Wapnir I, Dirbas F, Somlo G, Garberoglio C, Paz B, Shen J, Lau SK, Quake SR, Brown JM, Weissman IL, Clarke MF** (2009) Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* 458:780-783
- DIN27687** (2010) DIN ISO/TS 27687 Nanotechnologien - Terminologie und Begriffe für Nanoobjekte - Nanopartikel, Nanofaser und Nanoplättchen. Beuth Verlag, Berlin, Deutschland
- Doherty GJ, McMahon HT** (2009) Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* 78:857-902
- EFSA** (2009) Cadmium in food - Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain.
- Fahmy B, Cormier SA** (2009) Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells. *Toxicol in Vitro* 23:1365-1371
- Fielden MR, Zacharewski TR** (2001) Challenges and limitations of gene expression profiling in mechanistic and predictive toxicology. *Toxicol Sci* 60:6-10
- Fornace AJ, Jr., Nebert DW, Hollander MC, Luethy JD, Papathanasiou M, Fargnoli J, Holbrook NJ** (1989) Mammalian genes coordinately regulated by growth arrest signals and DNA-damaging agents. *Mol Cell Biol* 9:4196-203
- Fretz M, Jin J, Conibere R, Penning NA, Al-Taei S, Storm G, Futaki S, Takeuchi T, Nakase I, Jones AT** (2006) Effects of Na⁺/H⁺ exchanger inhibitors on subcellular localization of endocytic organelles and intracellular dynamics of protein transduction domains HIV-TAT peptide and octaarginine. *J Controlled Release* 116:247-254
- Gartel AL, Tyner AL** (1999) Transcriptional regulation of the p21(WAF1/CIP1) gene. *Exp Cell Res* 246:280-289

- Gekle M, Drumm K, Mildenerger S, Freudinger R, Gassner B, Silbernagl S** (1999) Inhibition of Na⁺-H⁺ exchange impairs receptor-mediated albumin endocytosis in renal proximal tubule-derived epithelial cells from opossum. *J Physiol* 520:709-721
- Giles GI** (2006) The redox regulation of thiol dependent signaling pathways in cancer. *Curr Pharm Design* 12(34):4427-4443
- Gozzelino R, Jeney V, Soares MP** (2010) Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50:323-354
- Gratton SEA, Ropp PA, Pohlhaus PD, Luft JC, Madden VJ, Napier ME, DeSimone JM** (2008) The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(33):11613-11618
- Gunther V, Lindert U, Schaffner W** (2012) The taste of heavy metals: Gene regulation by MTF-1. *Biochim Biophys Acta, Mol Cell Res* 1823:1416-1425
- Gusenleitner D, Auerbach SS, Melia T, Gomez HF, Sherr DH, Monti S** (2014) Genomic models of short-term exposure accurately predict long-term chemical carcinogenicity and identify putative mechanisms of action. *PLoS One* 9
- Hamann I, Schwerdtle T, Hartwig A** (2009) Establishment of a non-radioactive cleavage assay to assess the DNA repair capacity towards oxidatively damaged DNA in subcellular and cellular systems and the impact of copper. *Mutat Res, Fundam Mol Mech Mutagen* 669:122-130
- Hanagata N, Zhuang F, Connolly S, Li J, Ogawa N, Xu MS** (2011) Molecular Responses of Human Lung Epithelial Cells to the Toxicity of Copper Oxide Nanoparticles Inferred from Whole Genome Expression Analysis. *ACS Nano* 5(12):9326-9338
- Hanahan D, Weinberg RA** (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70
- Hanahan D, Weinberg RA** (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-674
- Harper JW, Elledge SJ** (2007) The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* 28:739-745
- Harris SL, Levine AJ** (2005) The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 24:2899-2908
- Hartwig A** (2001) Zinc finger proteins as potential targets for toxic metal ions: differential effects on structure and function. *Antioxid Redox Signaling* 3:625-634
- Hartwig A** (2010) Mechanisms in cadmium-induced carcinogenicity: recent insights. *BioMetals* 23:951-960
- Hartwig A** (2013a) Cadmium and cancer. *Met Ions Life Sci* 11:491-507

- Hartwig A** (2013b) Metal interaction with redox regulation: an integrating concept in metal carcinogenesis? *Free Radical Biol Med* 55:63-72
- Hatcher EL, Chen Y, Kang YJ** (1995) Cadmium resistance in A549 cells correlates with elevated glutathione content but not antioxidant enzymic activities. *Free Radical Biol Med* 19:805-12
- Hoffmann A, Levchenko A, Scott ML, Baltimore D** (2002a) The I κ B-NF- κ B Signaling Module: Temporal Control and Selective Gene Activation. *Science* 298:1241-1245
- Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M** (2002b) Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukocyte Biol* 72:847-855
- Holbrook NJ, Fornace AJ, Jr.** (1991) Response to adversity: molecular control of gene activation following genotoxic stress. *New Biol* 3:825-33
- IARC** (2012) Arsenic, metals, fibres, and dusts. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans WHO, IARC 100:11-465
- IARC Monographs** (1993) Cadmium and cadmium compounds. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 58:119-237
- Ilbert M, Graf PCF, Jakob U** (2006) Zinc center as redox switch - new function for an old motif. *Antioxid Redox Signaling* 8:835-846
- Jang JS, Simon VA, Feddersen RM, Rakhshan F, Schultz DA, Zschunke MA, Lingle WL, Kolbert CP, Jen J** (2011) Quantitative miRNA expression analysis using Fluidigm microfluidics dynamic arrays. *BMC Genomics* 12:144
- Jing X, Park JH, Peters TM, Thorne PS** (2015) Toxicity of copper oxide nanoparticles in lung epithelial cells exposed at the air-liquid interface compared with in vivo assessment. *Toxicol in Vitro* 29:502-511
- Jomova K, Baros S, Valko M** (2012) Redox active metal-induced oxidative stress in biological systems. *Transition Met Chem* 37:127-134
- Karin M, Haslinger A, Holtgreve H, Richards RI, Krauter P, Westphal HM, Beato M** (1984) Characterization of DNA sequences through which cadmium and glucocorticoid hormones induce human metallothionein-IIA gene. *Nature* 308:513-19
- Karlsson HL, Cronholm P, Gustafsson J, Moller L** (2008) Copper oxide nanoparticles are highly toxic: A comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem Res Toxicol* 21(9):1726-1732
- Karlsson HL, Gustafsson J, Cronholm P, Moller L** (2009) Size-dependent toxicity of metal oxide particles-A comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol Lett* 188(2):112-118

- Kennedy S** (2011) PCR Troubleshooting and Optimization: The Essential Guide. Caister Academic Press, p 235 pp.
- Klaassen CD, Liu J** (1997) Role of metallothionein in cadmium-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. *Drug Metab Rev* 29:79-102
- Kobayashi M, Yamamoto M** (2005) Molecular Mechanisms Activating the Nrf2-Keap1 Pathway of Antioxidant Gene Regulation. *Antioxid Redox Signaling* 7:385-394
- Koizumi S, Gong P, Suzuki K, Murata M** (2007) Cadmium-responsive Element of the Human Heme Oxygenase-1 Gene Mediates Heat Shock Factor 1-dependent Transcriptional Activation. *J Biol Chem* 282:8715-8723
- Kwak M-K, Itoh K, Yamamoto M, Kensler TW** (2002) Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: Role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. *Mol Cell Biol* 22:2883-2892
- L'Hoste S, Chargui A, Belfodil R, Duranton C, Rubera I, Mograbi B, Poujeol C, Tauc M, Poujeol P** (2009) CFTR mediates cadmium-induced apoptosis through modulation of ROS level in mouse proximal tubule cells. *Free Radical Biol Med* 46:1017-1031
- Levine AJ** (1997) p53, The cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88:323-331
- Levine AJ** (2009) The common mechanisms of transformation by the small DNA tumor viruses: The inactivation of tumor suppressor gene products: p53. *Virology* 384:285-293
- Lian F, Wang X-D** (2008) Enzymatic metabolites of lycopene induce Nrf2-mediated expression of phase II detoxifying/antioxidant enzymes in human bronchial epithelial cells. *Int J Cancer* 123:1262-1268
- Limbach LK, Wick P, Manser P, Grass RN, Bruinink A, Stark WJ** (2007) Exposure of Engineered Nanoparticles to Human Lung Epithelial Cells: Influence of Chemical Composition and Catalytic Activity on Oxidative Stress. *Environ Sci Technol* 41:4158-4163
- Linder MC** (2012) The relationship of copper to DNA damage and damage prevention in humans. *Mutat Res, Fundam Mol Mech Mutagen* 733:83-91
- Livak KJ, Schmittgen TD** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25:402-408
- Lopez de Romana D, Olivares M, Uauy R, Araya M** (2011) Risks and benefits of copper in light of new insights of copper homeostasis. *J Trace Elem Med Biol* 25:3-13
- Luethy JD, Holbrook NJ** (1992) Activation of the gadd153 promoter by genotoxic agents: a rapid and specific response to DNA damage. *Cancer Res* 52:5-10

- Lunov O, Zablotskii V, Syrovets T, Roecker C, Tron K, Nienhaus GU, Simmet T** (2010) Modeling receptor-mediated endocytosis of polymer-functionalized iron oxide nanoparticles by human macrophages. *Biomaterials* 32:547-555
- Luo M, He H, Kelley MR, Georgiadis MM** (2010) Redox regulation of DNA repair: implications for human health and cancer therapeutic development. *Antioxid Redox Signaling* 12:1247-1269
- Lustig B, Jerchow B, Sachs M, Weiler S, Pietsch T, Karsten U, Van de Wetering M, Clevers H, Schlag PM, Birchmeier W, Behrens J** (2002) Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol Cell Biol* 22:1184-1193
- Macia E, Ehrlich M, Massol R, Boucrot E, Brunner C, Kirchhausen T** (2006) Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell* 10:839-850
- Malawista SE, Gee JB, Bensch KG** (1971) Cytochalasin B reversibly inhibits phagocytosis: functional, metabolic, and ultrastructural effects in human blood leukocytes and rabbit alveolar macrophages. *Yale J Biol Med* 44:286-300
- Marano F, Hussain S, Rodrigues-Lima F, Baeza-Squiban A, Boland S** (2011) Nanoparticles: molecular targets and cell signalling. *Arch Toxicol* 85:733-741
- Marr SK, Pennington KL, Marr MT** (2012) Efficient metal-specific transcription activation by *Drosophila* MTF-1 requires conserved cysteine residues in the carboxy-terminal domain. *Biochim Biophys Acta, Gene Regul Mech* 1819:902-912
- Maxfield FR, McGraw TE** (2004) Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:121-132
- McCluskey A, Daniel JA, Hadzic G, Chau N, Clayton EL, Mariana A, Whiting A, Gorgani NN, Lloyd J, Quan A, Moshkanbaryans L, Krishnan S, Perera S, Chircop M, von Kleist L, McGeachie AB, Howes MT, Parton RG, Campbell M, Sakoff JA, Wang X, Sun J-Y, Robertson MJ, Deane FM, Nguyen TH, Meunier FA, Cousin MA, Robinson PJ** (2013) Building a Better Dynasore: The Dyngo Compounds Potently Inhibit Dynamin and Endocytosis. *Traffic* 14:1272-1289
- McMahon HT, Boucrot E** (2011) Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:517-533
- Mellman I** (1992) The importance of being acid: the role of acidification in intracellular membrane traffic. *J Exp Biol* 172:39-45
- Meplan C, Mann K, Hainaut P** (1999) Cadmium induces conformational modifications of wild-type p53 and suppresses p53 response to DNA damage in cultured cells. *J Biol Chem* 274:31663-70
- Midander K, Cronholm P, Karlsson HL, Elihn K, Moeller L, Leygraf C, Wallinder IO** (2009) Surface characteristics, copper release, and toxicity of nano- and micrometer-sized copper and copper(II) oxide particles: a cross-disciplinary study. *Small* 5:389-399

- Moschini E, Gualtieri M, Colombo M, Fascio U, Camatini M, Mantecca P** (2013) The modality of cell-particle interactions drives the toxicity of nanosized CuO and TiO₂ in human alveolar epithelial cells. *Toxicol Lett* 222:102-116
- Munoz LE, Maueroeder C, Chaurio R, Berens C, Herrmann M, Janko C** (2013) Colourful death: Six-parameter classification of cell death by flow cytometry-Dead cells tell tales. *Autoimmunity* 46:336-341
- Murata M, Gong P, Suzuki K, Koizumi S** (1999) Differential metal response and regulation of human heavy metal-inducible genes. *J Cell Physiol* 180:105-113
- Nandi PK, Van Jaarsveld PP, Lippoldt RE, Edelhofer H** (1981) Effect of basic compounds on the polymerization of clathrin. *Biochemistry* 20:6706-10
- NCBI** (2014) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> -besucht im Februar 2014.
- Nel A, Xia T, Maedler L, Li N** (2006) Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science* 311:622-627
- Nie AY, McMillian M, Parker JB, Leone A, Bryant S, Yieh L, Bittner A, Nelson J, Carmen A, Wan J, Lord PG** (2006) Predictive toxicogenomics approaches reveal underlying molecular mechanisms of nongenotoxic carcinogenicity. *Mol Carcinog* 45:914-933
- Nuwaysir EF, Bittner M, Trent J, Barrett JC, Afshari CA** (1999) Microarrays and toxicology: the advent of toxicogenomics. *Mol Carcinog* 24:153-159
- O'Brien P, Salacinski HJ** (1998) Evidence that the reactions of cadmium in the presence of metallothionein can produce hydroxyl radicals. *Arch Toxicol* 72:690-700
- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J** (2005) Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113:823-839
- Perez-Galan P, Roue G, Villamor N, Montserrat E, Campo E, Colomer D** (2006) The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status. *Blood* 107:257-264
- Petriv OI, Kuchenbauer F, Delaney AD, Lecault V, White A, Kent D, Marmolejo L, Heuser M, Berg T, Copley M, Ruschmann J, Sekulovic S, Benz C, Kuroda E, Ho V, Antignano F, Halim T, Giambra V, Krystal G, Takei CJF, Weng AP, Piret J, Eaves C, Marra MA, Humphries RK, Hansen CL** (2010) Comprehensive microRNA expression profiling of the hematopoietic hierarchy. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:15443-15448
- Pfaffl MW** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:45

- Phonphok Y, Rosenthal KS** (1991) Stabilization of clathrin coated vesicles by amantadine, tromantadine and other hydrophobic amines. *FEBS Lett* 281:188-90
- Pietarinen-Runtti P, Raivio KO, Saksela M, Asikainen TM, Kinnula VL** (1998) Antioxidant enzyme regulation and resistance to oxidants of human bronchial epithelial cells cultured under hyperoxic conditions. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19:286-292
- Pirkkala L, Nykanen P, Sistonen L** (2001) Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *Faseb J* 15:1118-1131
- Rahman I, Bel A, Mulier B, Lawson MF, Harrison DJ, MacNee W, Smith CAD** (1996) Transcriptional regulation of γ -glutamylcysteine synthetase-heavy subunit by oxidants in human alveolar epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 229:832-837
- Ray PD, Huang BW, Tsuji Y** (2012) Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* 24(5):981-990
- Raymaekers M, Smets R, Maes B, Cartuyvels R** (2009) Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. *J Clin Lab Anal* 23:145-151
- Riedel E** (2013) *Allgemeine und Anorganische Chemie*. De Gruyter, Berlin, Deutschland
- Rowlands JC, Sander M, Bus JS** (2014) FutureTox: Building the Road for 21st Century Toxicology and Risk Assessment Practices. *Toxicol Sci* 137:269-277
- Ryter SW, Choi AMK** (2005) Heme oxygenase-1: Redox regulation of a stress protein in lung and cell culture models. *Antioxid Redox Signaling* 7:80-91
- Sahay G, Alakhova DY, Kabanov AV** (2010) Endocytosis of nanomedicines. *J Controlled Release* 145:182-195
- Schwerdtle T** (2002) Induktion oxidativer DNA-Schäden und Beeinflussung der Nukleotidexzisionsreparatur durch Arsen-, Cadmium- und Nickelverbindungen. Universität Karlsruhe (TH)
- Schwerdtle T, Ebert F, Thuy C, Richter C, Mullenders LHF, Hartwig A** (2010) Genotoxicity of Soluble and Particulate Cadmium Compounds: Impact on Oxidative DNA Damage and Nucleotide Excision Repair. *Chem Res Toxicol* 23:432-442
- Schwerdtle T, Hamann I, Jahnke G, Walter I, Richter C, Parsons JL, Dianov GL, Hartwig A** (2007) Impact of copper on the induction and repair of oxidative DNA damage, poly(ADP-ribosyl)ation and PARP-1 activity. *Mol Nutr Food Res* 51:201-210
- Schwerdtle T, Hartwig A** (2006) Bioavailability and genotoxicity of soluble and particulate nickel compounds in cultured human lung cells. *Materialwiss Werkstofftech* 37:521-525

- Seiffert JM, Baradez M-O, Nischwitz V, Lekishvili T, Goenaga-Infante H, Marshall D** (2012) Dynamic Monitoring of Metal Oxide Nanoparticle Toxicity by Label Free Impedance Sensing. *Chem Res Toxicol* 25:140-152
- Semisch A, Ohle J, Witt B, Hartwig A** (2014) Cytotoxicity and genotoxicity of nano - and microparticulate copper oxide: role of solubility and intracellular bioavailability. *Part Fibre Toxicol* 11:1-16
- Shah ID, Ruzzi PL, Schluter RB** (1977) Decomposition of cupric oxide using a reducing scavenger. US806116A0,
- Shaulian E, Karin M** (2001) AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 20:2390-2400
- Shaulian E, Karin M** (2002) AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 4:E131-E136
- Shim H, Harris ZL** (2003) Genetic defects in copper metabolism. *J Nutr* 133:1527S-1531S
- Sims HI, Chirn G-W, Marr MT, II** (2012) Single nucleotide in the MTF-1 binding site can determine metal-specific transcription activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:16516-16521
- Singh A, Misra V, Thimmulappa RK, Lee H, Ames S, Hoque MO, Herman JG, Baylin SB, Sidransky D, Gabrielson E, Brock MV, Biswal S** (2006) Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. *PLoS Med* 3:1865-1876
- Spurgeon SL, Jones RC, Ramakrishnan R** (2008) High throughput gene expression measurement with real time PCR in a microfluidic dynamic array. *PLoS One* 3
- Studer AM, Limbach LK, Van DL, Krumeich F, Athanassiou EK, Gerber LC, Moch H, Stark WJ** (2010) Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles. *Toxicol Lett* 197:169-74
- Svec D, Rusnakova V, Korenkova V, Kubista M** (2013) Dye-based high-throughput qPCR in microfluidic platform BioMark. p 323-337.
- Takeda K, Ishizawa S, Sato M, Yoshida T, Shibahara S** (1994) Identification of a cis-acting element that is responsible for cadmium-mediated induction of the human heme oxygenase gene. *J Biol Chem* 269:22858-67
- Thevenod F, Lee W-K** (2013) Toxicology of cadmium and its damage to mammalian organs. *Met Ions Life Sci* 11:415-490
- Tietze F** (1969) Enzymic method for determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 27:502-22

- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M** (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem-Biol Interact* 160(1):1-40
- van Weert AWM, Dunn KW, Geuze HJ, Maxfield FR, Stoorvogel W** (1995) Transport from late endosomes to lysosomes, but not sorting of integral membrane proteins in endosomes, depends on the vacuolar proton pump. *J Cell Biol* 130:821-34
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F** (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *GenomeBiology* 3
- Vercauteren D, Vandenbroucke RE, Jones AT, Rejman J, Demeester J, De Smedt SC, Sanders NN, Braeckmans K** (2010) The Use of Inhibitors to Study Endocytic Pathways of Gene Carriers: Optimization and Pitfalls. *Mol Ther* 18:561-569
- Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D** (2003) Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 192(2-3):95-117
- Wang J, Lin M, Crenshaw A, Hutchinson A, Hicks B, Yeager M, Berndt S, Huang W-Y, Hayes RB, Chanock SJ, Jones RC, Ramakrishnan R** (2009) High-throughput single nucleotide polymorphism genotyping using nanofluidic Dynamic Arrays. *BMC Genomics* 10
- Wang JYJ** (1998) Cellular responses to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol* 10:240-247
- Wang Y, Fang J, Leonard SS, Krishna Rao KM** (2004) Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces Reactive Oxygen Species. *Free Radical Biol Med* 36:1434-1443
- Wang ZY, Li N, Zhao J, White JC, Qu P, Xing BS** (2012) CuO Nanoparticle Interaction with Human Epithelial Cells: Cellular Uptake, Location, Export, and Genotoxicity. *Chem Res Toxicol* 25(7):1512-1521
- Waters KM, Masiello LM, Zangar RC, Tarasevich BJ, Karin NJ, Quesenberry RD, Bandyopadhyay S, Teeguarden JG, Pounds JG, Thrall BD** (2009a) Macrophage Responses to Silica Nanoparticles are Highly Conserved Across Particle Sizes. *Toxicol Sci* 107:553-569
- Waters LS, Minesinger BK, Wiltrot ME, D'Souza S, Woodruff RV, Walker GC** (2009b) Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance. *Microbiol Mol Biol Rev* 73:134-54
- Waters MD, Jackson M, Lea I** (2010) Characterizing and predicting carcinogenicity and mode of action using conventional and toxicogenomics methods. *Mutat Res, Rev Mutat Res* 705:184-200
- White AK, VanInsberghe M, Petriv OI, Hamidi M, Sikorski D, Marra MA, Piret J, Aparicio S, Hansen CL** (2011) High-throughput microfluidic single-cell RT-qPCR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:13999-14004

- Yamamoto A, Tagawa Y, Yoshimori T, Moriyama Y, Masaki R, Tashiro Y** (1998) Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct Funct* 23:33-42
- Yoshimori T, Yamamoto A, Moriyama Y, Futai M, Tashiro Y** (1991) Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J Biol Chem* 266:17707-12
- Zhan Q** (2005) Gadd45a, a p53- and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage. *Mutat Res, Fundam Mol Mech Mutagen* 569:133-143
- Zhang S, Li J, Lykotrafitis G, Bao G, Suresh S** (2009) Size-dependent endocytosis of nanoparticles. *Adv Mater (Weinheim, Ger)* 21:419-424
- Zhou B-BS, Elledge SJ** (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408:433-439
- Zietz B** (2012) Kupfer, In: *Handbuch der Lebensmitteltoxikologie - Belastungen, Wirkungen, Lebensmittelsicherheit, Hygiene*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Deutschland, p 129-168

8. ANHANG

8.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|-------------------------------------------------------|
| µm | Mikrometer |
| Ad12SV40 | Hybrid-Virus aus Adenovirus 12 und Simian Virus-40 |
| ALF | künstliche lysosomale Flüssigkeit |
| ANOVA | <i>Analysis of variance</i> |
| AP-1 | Aktivator Protein 1 |
| ARE | <i>Antioxidant response element</i> |
| ASK1 | <i>Apoptosis signal-regulating kinase 1</i> |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| ATM | <i>Ataxia telangiectasia mutated</i> |
| ATOX1 | <i>Antioxidant copper chaperone 1</i> |
| ATP7A | Menkes-ATPase |
| ATP7B | Wilson-ATPase |
| ATR | <i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i> |
| BafA1 | Bafilomycin A1 |
| BER | Basenexzisionsreparatur |
| bidest. | bidestilliert |
| bp | Basenpaare |
| BRCA1 | <i>Breast cancer 1, early onset</i> |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| CAT | Katalase |
| CCS | <i>Copper chaperone for superoxid dismutase</i> |
| CdCl ₂ | Cadmium(II)chlorid |
| cDNA | komplementäre DNA |
| COX | Cytochrom-C-Oxidase |
| COX17 | <i>Cytochrome c oxidase copper chaperone</i> |
| C _q | <i>Cycle of quantification</i> |
| CuCl ₂ | Kupfer(II)chlorid |
| CuO | Kupfer(II)oxid |
| CytB | Cytochalasin B |
| D | Dimension |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| DMEM | <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> |
| DMT-1 | <i>Divalent metal transporter 1</i> |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |

| | |
|--------------------------------|----------------------------------------------------|
| dNTP | Desoxyribonukleotidtriphosphate |
| DSBR | Doppelstrangbruchreparatur |
| DTNB | 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) |
| EFSA | European Food Safety Authority |
| Eipa | 5-(N-ethyl-N-isopropyl)amilorid |
| ELISA | <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> |
| Exo I | Exonuklease I |
| Fe ₂ O ₃ | Eisen(III)oxid |
| FITC | Fluorescein-Isothiocyanat |
| FKS | Fetales Kälberserum |
| Fpg | Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| GF-AAS | Graphitrohr-Atomabsorptionsspektroskopie |
| GR | Glutathionreduktase |
| GSH | Glutathion |
| GSSG | Glutathiondisulfid |
| h | Stunden |
| hCTR1 | humaner Kupfertransporter 1 |
| HIF-1 α | <i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i> |
| hOGG1 | humane 8-Oxoguanin-DNA-N-Glykosylase 1 |
| HSF-1 | <i>Heat shock transcription factor 1</i> |
| IARC | International Agency for Research on Cancer |
| IFC | <i>Integrated fluidic circuits</i> |
| Il8 | Interleukin 8 |
| Keap1 | <i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i> |
| KP-Puffer | Kaliumphosphat-Puffer |
| LHC-9 | <i>Laboratory of Human Carcinogenesis Medium 9</i> |
| M | Molar |
| MDC | Monodansylcadaverin |
| Mdm2 | <i>Mouse double minute 2 homolog</i> |
| min | Minuten |
| MMR | Mismatchreparatur |
| MP | Mikropartikel |
| mRNA | Messenger RNA |
| MT | Metallothionein |
| MTF-1 | <i>Metal-regulatory transcription factor 1</i> |
| MW | Mittelwert |
| NADPH | <i>Nicotinamidadenindinukleotidphosphat</i> |

| | |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| NER | Nukleotidexzisionsreparatur |
| NF-κB | <i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i> |
| nm | Nanometer |
| NoRT | <i>No Reverse Transcriptase</i> |
| NP | Nanopartikel |
| NRC | <i>No reaction control</i> |
| Nrf2 | <i>Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i> |
| NTC | <i>No template control</i> |
| OH-Dyn | Hydroxy-Dynasore |
| p21 | cyclinabhängiger Kinaseinhibitor 1 |
| PARP1 | Poly (ADP-ribose) polymerase 1 |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung |
| PCR | Polymerase Kettenreaktion |
| PI | Propidiumiodid |
| PIK3 | <i>Phosphoinositid-3-Kinase</i> |
| PS | Phosphatidylserin |
| q | quantitative |
| R/2 | Range halbe |
| Ref-1 | <i>Human apurinic (apyrimidinic) endonuclease/redox-factor 1</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| ROS | reaktive Sauerstoffspezies |
| rpm | <i>Revolutions per minute</i> |
| rRNA | Ribosomale RNA |
| RT | Raumtemperatur |
| RT | reverse Transkriptase |
| s | Sekunden |
| SBTI | Soybean Trypsin Inhibitor |
| SD | Standardabweichung |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese |
| SiO ₂ | Siliciumdioxid |
| SOD | Superoxiddismutase |
| SSA | 5-Sulfosalicylsäure |
| STA | <i>Specific target amplification</i> |
| TNB | 5-Thio-2-nitrobenzoesäure |
| XPA | <i>Xeroderma pigmentosum, complementation group A</i> |

8.2 Verwendete Chemikalien

| | |
|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| 1,4-Dithiothreitol (DTT) | Roth (Karlsruhe) |
| 20X DNA Binding Dye Sample Loading Reagent | Fluidigm (San Francisco) |
| 2-Mercaptoethanol | Roth (Karlsruhe) |
| 2X Assay Loading Reagent | Fluidigm (San Francisco) |
| 2X TaqMan® PreAmp Master Mix | Applied Biosystems (Darmstadt) |
| 3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid (MOPS) | Sigma-Aldrich (Steinheim) |
| 5-(N-Ethyl-N-Isopropyl)-Amilorid | Santa Cruz (Heidelberg) |
| 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, ≥ 99 %) | Roth (Karlsruhe) |
| 5-Sulfosalicylsäure (SSA, ≥ 99 %) | Sigma-Aldrich (Steinheim) |
| AAS-Magnesium-Matrixmodifier | Perkin Elmer (Rodgau) |
| AAS-Palladium-Matrixmodifier | Perkin Elmer (Rodgau) |
| Acrylamid (Rotiphorese® Gel (37,5:1) | Roth (Karlsruhe) |
| Agarose NEEO Ultra-Qualität | Roth (Karlsruhe) |
| Albumin Fraktion V | Merck Millipore (Darmstadt) |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS, ≥ 98 %) | Roth (Karlsruhe) |
| Amphotericin B (250 mg/mL) | Merck Millipore (Darmstadt) |
| Annexin V FITC-konjugiert | Biolegend (London) |
| Bromphenolblau | VWR (Darmstadt) |
| Cadmium(II)chlorid (CdCl ₂ , ≥ 99,0 %) | Sigma-Aldrich (Steinheim) |
| CasyTon® | OLS (Bremen) |
| Collagen | Roche Diagnostics (Mannheim) |
| Cytochalasin B (10 mg/mL in DMSO) | Sigma-Aldrich (Steinheim) |
| DAPI (CyStain® DNA/Protein) | Partec (Münster) |
| Desoxycholsäure Natriumsalz (DOC) | Sigma-Aldrich (Steinheim) |
| di-Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄) | Roth (Karlsruhe) |
| Dimethylsulfoxid (DMSO, ≥ 99,9 %) | Sigma-Aldrich (Steinheim) |
| Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ , ≥ 99 %) | Roth (Karlsruhe) |
| DMEM | Sigma-Aldrich (Steinheim) |
| DNA Away | Roth (Karlsruhe) |
| DNA Suspension Buffer | TEKnova (Kristiansand) |
| ECL-Detektionsreagenz | GE Healthcare (Buckinghamshire) |
| Essigsäure (100 %) | Roth (Karlsruhe) |
| Ethanol (Rotipuran) | Roth (Karlsruhe) |
| Ethanol, vergällt (96 %) | Sigma-Aldrich (Steinheim) |
| Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA, ≥ 99 %) | Roth (Karlsruhe) |
| Exonuklease I (20 U/μl) | New England BioLabs (Frankfurt) |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| Exonuklease Reaktionspuffer | New England BioLabs (Frankfurt) |
| FACS Flow | BD (Heidelberg) |
| Fetales Kälberserum | Invitrogen (Darmstadt) |
| Fibronektin | Biopur (Rheinach) |
| Formaldehyd (37%) | Roth (Karlsruhe) |
| Formamid (≥ 99,5 %) | Roth (Karlsruhe) |
| Gel-Red® | VWR (Darmstadt) |
| Glutathion (GSH, ≥ 98 %) | Sigma-Aldrich (Steinheim) |
| Glutathiondisulfid (GSSG, ≥ 98 %) | Sigma-Aldrich (Steinheim) |
| Glutathionreduktase | Sigma-Aldrich (Steinheim) |
| Glycerin | Sigma-Aldrich (Steinheim) |
| Glycin (≥ 99%) | Roth (Karlsruhe) |
| HEPES | Roth (Karlsruhe) |
| Hydroxy-Dynasore | Sigma-Aldrich (Steinheim) |
| i/qScript cDNA Synthese Kit | BioRad (München) |
| Isopropanol (2-Propanol, ≥ 99,9%) | Roth (Karlsruhe) |
| Kaliumchlorid (KCl, ≥ 99,5 %) | Roth (Karlsruhe) |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄ , ≥ 99 %) | Merck (Darmstadt) |
| Kernextraktionskit (Nuclear Extract Kit) | ActiveMotif (La Hulpe) |
| Kupfer(II)chlorid Dihydrat (CuCl ₂ , ≥ 99,0 %) | Sigma-Aldrich (Steinheim) |
| Kupfer(II)oxid Nanopowder (CuO NP, < 50 nm) | Sigma-Aldrich (Steinheim) |
| Kupfer(II)oxid Pulver (CuO MP, < 5 µm, ≥ 98,0 %) | Sigma-Aldrich (Steinheim) |
| Kupfer-Standard (ROTI®Star 100 mg/L) | Roth (Karlsruhe) |
| Leupeptin | Sigma-Aldrich (Steinheim) |
| LHC-9 | Life Technologies (Darmstadt) |
| Magnesiumchlorid (MgCl ₂ , ≥ 98,5 %, wasserfrei) | Roth (Karlsruhe) |
| Methanol (≥ 99,5 %) | Roth (Karlsruhe) |
| Milchpulver (fettarm) | Roth (Karlsruhe) |
| Monodansylcadaverin | Sigma-Aldrich (Steinheim) |
| Natriumacetat | VWR (Darmstadt) |
| Natriumchlorid (NaCl, ≥ 99,5 %) | Roth (Karlsruhe) |
| Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung (10 %) | AppliChem (Darmstadt) |
| Nicotinamidadenindinucleotidphosphat Tetranatriumsalz (NADPH, ≥ 97 %) | Roth (Karlsruhe) |
| NucleoSpin® RNA Plus Kit | Macherey-Nagel (Düren) |
| <i>PageRuler Prestained Protein Ladder</i> (10 – 170 kDa) | Thermo Scientific (Rockford) |
| PCR Certified Water | TEKnova (Kristiansand) |
| Penicillin/Streptomycin (P: 5.000 U/ mL, S: 5 mg/ L) | Sigma-Aldrich (Steinheim) |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, ≥ 99 %) | Sigma-Aldrich (Steinheim) |

| | |
|------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Primer Eurofins | Eurofins (Ebersberg) |
| Primer Fluidigm | Fluidigm (San Francisco) |
| Propidiumiodid (1mg/mL) | Sigma-Aldrich (Steinheim) |
| Protease Inhibitor Cocktail (cOmplete) | Roche Diagnostics (Mannheim) |
| Protein Assay Farbstoff-Konzentrat (Bradford-Reagenz) | BioRad (München) |
| RNase Away | VWR (Darmstadt) |
| Saccharose (≥ 99,5 %) | Roth (Karlsruhe) |
| Salpetersäure Supra-Qualität (HNO ₃ , 69 %) | Roth (Karlsruhe) |
| SsoFast™ EvaGreen® Supermix with Low ROX | BioRad (München) |
| Sulforaphan (≥ 99,5 %, racemisch) | Enzo Life Science (Lausen) |
| SYBR Green Supermix | VWR (Darmstadt) |
| TE-Puffer | TEKnova (Kristiansand) |
| Tetramethylethylendiamin (TEMED, ≥ 99%) | Roth (Karlsruhe) |
| TransAM® Nrf2 Kit | ActiveMotif (La Hulpe) |
| Tris (Ultra Qualität, ≥ 99,9 %) | Roth (Karlsruhe) |
| Triton X-100 10% Lsg. | Thermo Fisher Scientific (Dreieich) |
| Trypsin inhibitor from <i>Glycine max</i> (soybean) (SBTI) | Sigma-Aldrich (Steinheim) |
| Trypsin, 10-fach | Sigma-Aldrich (Steinheim) |
| Tween®20 | Roth (Karlsruhe) |
| Universal cDNA-Random Primed Human Normal Tissues | BioCat (Heidelberg) |
| Wasserstoffperoxid Suprapur® (30%) | Merck Millipore (Darmstadt) |
| β-Mercaptoethanol | Roth (Karlsruhe) |

8.3 Antikörper, Lösungen und Puffer

8.3.1 Antikörper

| Primärantikörper | Herkunft | Spezifität | Verdünnung |
|---------------------------|-----------|--------------|------------|
| GAPDH mAb#2118 | Kaninchen | monoklonal | 1/2000 |
| Lamin B sc-6216 | Ziege | polyklonal | 1/500 |
| α -Tubulin sc-5286 | Maus | monoklonal | 1/2000 |
| Nrf2 | Kaninchen | Keine Angabe | 1/1000 |

| Sekundärantikörper | Herkunft | Spezifität | Verdünnung |
|--------------------|--------------|----------------|------------|
| IgG HRP | Esel | anti-Kaninchen | 1/1000 |
| IgG HRP | Esel | anti-Ziege | 1/1000 |
| IgG HRP | Ziege | anti-Maus | 1/1000 |
| IgG HRP | Keine Angabe | anti-Kaninchen | 1/1000 |

8.3.2 Lösungen und Puffer

Zellkultur

Alle Lösungen für Zellkulturversuche oder zur Kultivierung wurden mittels Sterilisation autoklaviert.

Coating-Mix
 500 μ L Fibronectin (1 mg/mL in bidest. Wasser)
 500 μ L Collagen (3 mg/mL in 0,2 % Essigsäure)
 500 μ L BSA (1 mg/mL in PBS)

PBS (pH 7,4)
 0,1 M NaCl
 0,0045 M KCl
 0,007 M Na_2HPO_4
 0,003 M KH_2PO_4

PBS-EDTA (pH 7,4) 0,5 mM EDTA in PBS

Trypsin-Lösung 0,25 % Trypsin in PBS-EDTA

RNA-Elektrophorese

MOPS (pH 7) 20x
 400 mM MOPS
 100 mM Na-Acetat
 10 mM EDTA

Anhang

| | |
|-------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Agarosegel | 1,2 g Agarose 83 mL bidest. Wasser 5 mL 20x MOPS 12 mL Formaldehyd |
| Formamid-Denaturierungspuffer | 1 mL Formamid 350 µL Formaldehyd 100 µL 20x MOPS 0,2 µL GelRed® 550 µL bidest. Wasser |
| Lämmli-Ladepuffer 4x | 320 nM Tris 8 % SDS 40 % Glycerin 8 % Mercaptoethanol 0,04 % Bromphenolblau |

DNA-Elektrophorese

| | |
|----------------|--------------------------------------------------------------|
| TAE-Puffer 50x | 2 M Tris 1 M Essigsäure 0,05 M EDTA |
| Agarosegel | 2 g Agarose 100 mL 1x TAE-Puffer 10 µL GelRed® |
| Ladepuffer 6x | 3 mL Glycerin 25 mg Bromphenolblau 7 mL bidest. Wasser |

Aufnahmeuntersuchungen

| | |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| RIPA-Puffer | 10 mM Tris (pH 7,6) 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % TritonX-100 1 % DOC 0,1 % SDS 1 mM PMSF (in Isopropanol) 1x Protease Inhibitor Cocktail |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Anhang

Zellysepuffer
0,01 M HEPES (pH 7,9)
0,01 M KCl
1,5 mM MgCl₂
0,3 M Saccharose
0,5 mM DTT
0,6 mM PMSF
0,0065 mM Leupeptin

Kernlysepuffer
0,01 M HEPES (pH 7,9)
0,4 M KCl
1,5 mM MgCl₂
15 % Glycerin
0,5 mM DTT
0,6 mM PMSF
0,0065 mM Leupeptin

SDS-PAGE und Western Blot

Sammelgel 4 %
0,625 mL Tris (1 M, pH 6,8)
0,5 mL Acrylamid (40 %, 37,5:1)
50 µL SDS (10 %)
3,2 µL TEMED
10 µL APS (40 %)
3,8 mL bidest. Wasser

Trenngel 15 %
2 mL Tris (1,5 M, pH 8,8)
3 mL Acrylamid (40 %, 37,5:1)
80 µL SDS (10 %)
6,4 µL TEMED
20 µL APS (40 %)
2,9 mL bidest. Wasser

Laufpuffer 1x
25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1 % SDS

Ladepuffer 4x
200 mM Tris
8 % SDS
40 % Glycerin
0,1 % Bromphenolblau
4 % Mercaptoethanol

Blotting-Puffer
25 mM Tris
192 mM Glycin
20 % Methanol

PBST
0,05 % Tween in PBS

GSH-Gehalt

KP-Puffer
Lösung 1:
0,1 M K_2HPO_4
1 mM EDTA
Lösung 2:
0,1 M KH_2PO_4
1 mM EDTA
Lösung 1 vorlegen und mit Lösung 2 auf pH 7,4
einstellen

Vitalitätsuntersuchungen

Ringer-Lösung
147 mM NaCl
402 mM KCl
297 mM $CaCl_2$

8.4 Verbrauchsmaterialien

| | |
|---------------------------------------------------|---------------------------------|
| 96-Well-Platten, transparent | TPP (Transadingen) |
| Amersham Nitrocellulose Membran | GE Healthcare (Buckinghamshire) |
| Dynamic Array IFC | Fluidigm (San Francisco) |
| Einmalspritzen, 1 mL | Terumo (Eschborn) |
| Eppendorf-Reaktionsgefäße, 1,5 mL | Sarstedt (Nümbrecht) |
| Eppendorf-Reaktionsgefäße, 2,0 mL | Sarstedt (Nümbrecht) |
| Falcon Tubes 3,5 mL | BD (Heidelberg) |
| Glaspipetten (1,2,5,10 und 20 mL) | Roth (Karlsruhe) |
| Kanüle (0,4 x 20 mm) | Terumo (Eschborn) |
| Kryoröhrchen | Roth (Karlsruhe) |
| Magnetrührstäbe | Roth (Karlsruhe) |
| Mikroplatten-Verschlussfolie | VWR (Darmstadt) |
| Multiply ProGefäße, 0,5 mL | Sarstedt (Nümbrecht) |
| Nano Eppendorf (Multiply-11 Strip 0,2 mL Kette) | Sarstedt (Nümbrecht) |
| Nano Eppendorf Deckelkette für 0,2 mL Kette | Sarstedt (Nümbrecht) |
| Pipettenspitzen LTS 20 µL | Mettler Toledo (Gießen) |
| Pipettenspitzen, 1000-5000 µL | Eppendorf (Hamburg) |
| Pipettenspitzen, 100-1000 µL | Brand (Wertheim) |
| Pipettenspitzen, 1-20 µL | Brand (Wertheim) |
| Pipettenspitzen, 1-200 µL | Sarstedt (Nümbrecht) |
| Plastik-Zentrifugenröhrchen, 15 mL und 50 mL | Sarstedt (Nümbrecht) |
| Rollrandgläser mit Schnappdeckel, 20 mL und 50 mL | Roth (Karlsruhe) |
| Sterilfilter (500 mL), 0,2 µM, PES | VWR (Darmstadt) |
| Sterilindikatorband Autoklav | Roth (Karlsruhe) |
| Vernichtungsbeutel | VWR (Darmstadt) |
| Whatman-Papier, 3 mm | Whatman (Dassel) |
| Zellkulturschalen, (Ø 15 cm, Ø 10 cm, Ø 6 cm) | Sarstedt (Nümbrecht) |
| Zellschaber | VWR (Darmstadt) |
| Zellzählcups | Roche (Mannheim) |

8.5 Verwendete Geräte

| | |
|--------------------------------------------|-----------------------------------|
| Atomabsorptionsspektrometer PinAAcle 900 T | Perkin Elmer (Waltham) |
| Autoklav D-150 | Systemec (Linden) |
| Biofreezer Herafreeze top | Thermo Scientific (Langenselbold) |
| Biofuge pico | Heraeus (Hanau) |
| Biomark | Fluidigm (San Francisco) |
| Blotting Kammer | Peqlab (Erlangen) |
| Brutschrank Heracell 150i | Thermo Scientific (Langenselbold) |
| Casy® TTC Cell Counter & Analyzer System | OLS (Bremen) |
| Centrifuge 5810R | Eppendorf (Hamburg) |
| Elektrophorese Kammer | BioRad (München) |
| Elektrophorese Stromgerät | BioRad (München) |
| Eppendorf Pipetten (verschiedene Volumina) | Eppendorf (Hamburg) |
| Feinwaage BP 61S | Sartorius (Göttingen) |
| Galaxy Mini Centrifuge | VWR (Darmstadt) |
| Heizschüttler MKR 13 | HLC-BioTech (Bovenden) |
| Heizschüttler SH 26 | Cat (Staufen) |
| Heizschüttler TS-100 | Peqlab (Erlangen) |
| IFC Controller HX | Fluidigm (SAN Francisco) |
| Kühl- und Gefrierschränke | Bosch (Gerlingen) |
| Laborspülmaschine Professional G7883 | Miele (Güterloh) |
| LAS 3000 | raytest (Straubenhardt) |
| LSRII Fortessa FACS | BD (Heidelberg) |
| Magnetrührer Variomag® Poly Komet | VWR International (Darmstadt) |
| Megafuge 1.0 | Heraeus (Hanau) |
| MicroCentrifuge | Roth (Karlsruhe) |
| Mikroskop Axiovert 40C | Carl Zeiss AG (Feldbach) |
| Multipette® Pipette Lite XLS 0,5-10 µL | Mettler Toledo (Gießen) |
| NanoQuant Platte | Tecan Group (Crailsheim) |
| PCR Workstation Pro | Peqlab (Erlangen) |
| pH-Meter 3210 | WTW (Weilheim) |
| Reinstwasseranlage Milli-Q | Merck Millipore (Darmstadt) |
| Rotator | Labinco B.V. (Brenda) |
| Software „AA Winlab322“ | Perkin Elmer (Waltham) |
| Software „BD FACSDiva™“ | BD (Heidelberg) |
| Software „Beacon Designer 8“ | Premier Biosoft (Palo Alto) |
| Software „Fluidigm Real Time PCR Analysis“ | Fluidigm (San Francisco) |
| Software „GenEX“ | MultiD Analyses (Göteborg) |

| | |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------|
| Software „IBM SPSS Statistics 22“ | SPSS Statistics (Chicago) |
| Sterilbank HERAsafeKS | Thermo Scientific (Langenselbold) |
| Taumler 3012 | GFL (Burgwedel) |
| Tecan Infinite®200 PRO | Tecan Group (Crailsheim) |
| Thermal Cycler C100 (CFX 96 Real Time System) | BioRad (München) |
| Timer | Roth (Karlsruhe) |
| Tischzentrifuge Reaktionsgefäße | VWR (Darmstadt) |
| Ultrafeinwaage BP 61S | Sartorius (Göttingen) |
| Ultraschallbad Sonorex TK52 | Bandelin (Berlin) |
| Vakuum System BVC21NT | Vakuubrand (Wertheim) |
| Vortex-Genie 2T | Scientific Industries (Bohemia) |
| Waage VWR 1502 | Sartorius (Göttingen) |
| Wasserbad | Memert (Schwabach) |

8.6 Ergänzende Daten

8.6.1 RNA-Integrität

Eine hohe RNA-Integrität konnte sowohl durch eine konventionelle Agarose-Gelelektrophorese als auch über eine automatisierte Kapillarelektrophorese (2100-Bioanalyser) garantiert werden (Abbildung 32).

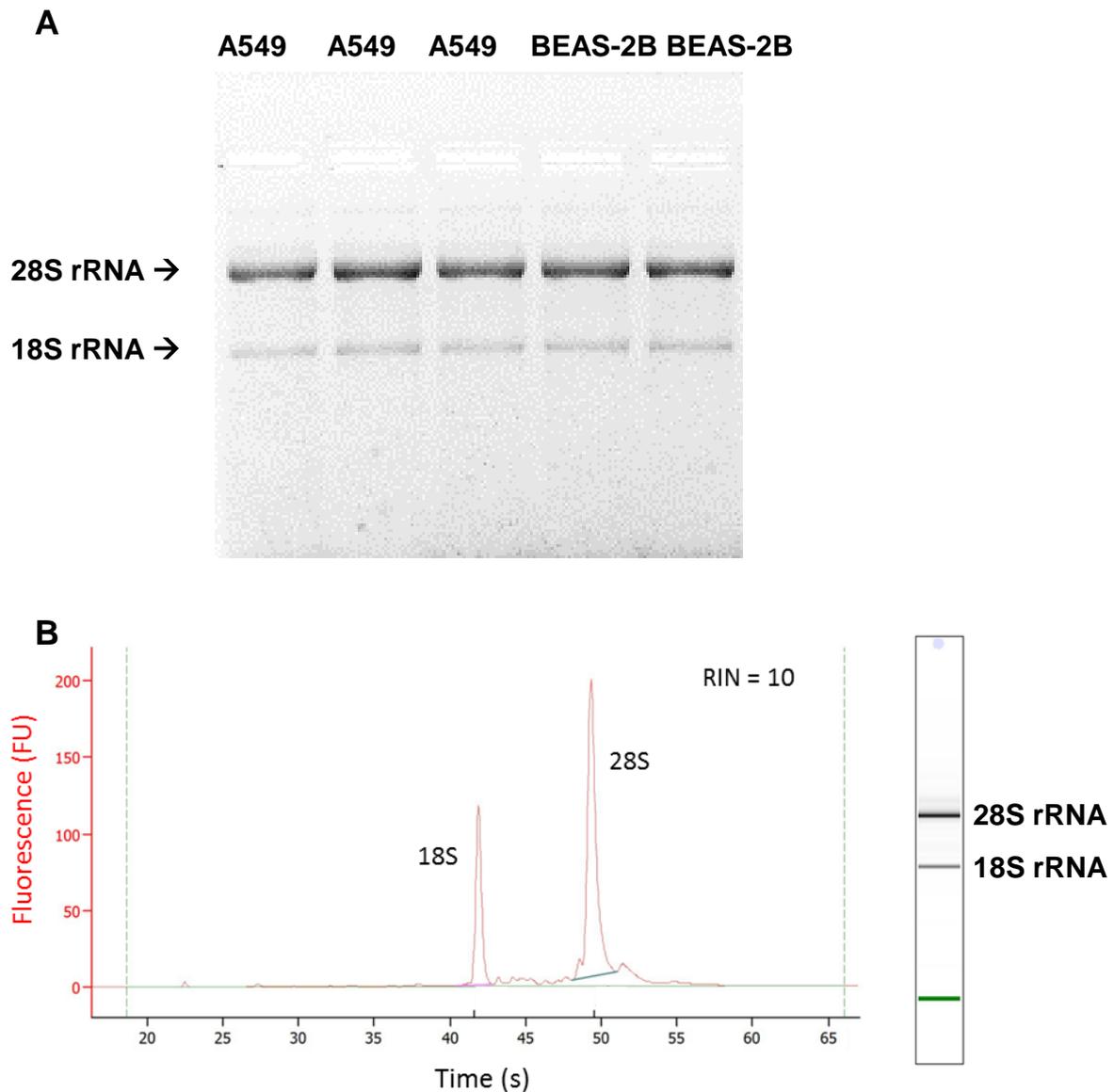


Abbildung 32 **Überprüfung der RNA-Integrität.** (A) Elektrophoretische Auftrennung und Detektion der 28S rRNA und 18S rRNA. Die 28S rRNA Bande weist die doppelte Intensität im Vergleich zur 18S rRNA Bande auf. (B) Elektropherogramm einer automatisierten Elektrophorese mittels RNA-6000-Nano-LabChip-Kit am Agilent-2100-Bioanalyser mit einem optimalen RIN-Wert von 10 (links) sowie einem virtuellen Gelbild von 1 μ g RNA (rechts).

8.6.2 AAS-Analysen

8.6.2.1 Ermittlung der Nachweis-, Erfassung- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweis-, Erfassung- und Bestimmungsgrenze wurden nach der Leerwertmethode der DIN 32645 erfasst. Dazu wurden fünf Blindwerte hergestellt und deren Kupfergehalt jeweils zehnmal bestimmt. Es ergaben sich folgende Grenzwerte:

Nachweisgrenze: 0,14 µg/L Kupfer

Erfassungsgrenze: 0,29 µg/L Kupfer

Bestimmungsgrenze: 0,43 µg/L Kupfer

8.6.2.2 Bestimmung der Wiederfindungsrate

Die Wiederfindungsexperimente wurden durchgeführt, um einen eventuellen Probenverlust während des Eindampf- und Veraschungsschrittes ausschließen zu können. Dafür wurden unbehandelte Proben nach dem Zellaufschluss mit einer definierten Menge Kupferstandard versetzt und zudem externe Standards vermessen. Die Wiederfindungsraten betragen durchschnittlich 101 % für die externen Standards, 99 % für die Gesamtaufnahme, 84 % für die zytoplasmatische Fraktion und 99 % für die Kernfraktion.

8.6.3 Nrf2-Aktivierung

8.6.3.1 Überprüfung der Funktionalität und Spezifität

Als Positivkontrolle für eine mögliche Nrf2-Aktivierung wurde Sulforaphan in einer Konzentration von 25 µM bei allen Analysen mitgeführt. Dabei kam es zu einer Nrf2-Aktivierung von 192 % ± 22 %. Zusätzlich wurden Kompetitionsversuche mit zwei löslichen Oligonukleotidsequenzen vorgenommen, um die Spezifität von Nrf2 an die ARE-Sequenz in dieser Methode nachweisen zu können. Dazu wurden eine Wildtypvariante, die genau der immobilisierten Sequenz entspricht, und eine mutierte Variante mit veränderter Sequenz eingesetzt. Durch Zugabe der Wildtypsequenz wird die Nrf2-Bindung an das immobilisierte Oligonukleotid verhindert, weshalb das nachfolgende Auswaschen des löslichen Nrf2-DNA-Komplexes zu einer Verringerung des Messsignals führen sollte. Die mutierte Form durfte keine Veränderung des Messsignals bewirken, da diese nicht von Nrf2 erkannt wird. In der Praxis wurde zu Reaktionsansätzen, in denen eine Nrf2-Aktivierung nachgewiesen wurde (CuO NP, 504 µM CuCl₂ und 25 µM Sulforaphan), während des 1-stündigen Bindungsvorganges an die immobilisierte Sequenz zusätzlich die lösliche Wildtyp- oder mutierte Oligonukleotidsequenz hinzugefügt. In den Ansätzen mit der Wildtypform verringerte sich die Intensität des Messsignals auf das der Kontrolle, wohingegen in den Ansätzen mit mutierter Form keine veränderte Aktivierung gemessen wurde. Somit konnte die Spezifität der Methode verifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

8.6.3.2 Überprüfung der Kernextraktion mittels SDS-PAGE und Western Blot

Die erfolgreiche Auftrennung in zytoplasmatische und nukleäre Proteinfractionen wurde mittels SDS-PAGE und anschließend Western Blot untersucht. Dazu erfolgte eine Überprüfung beider Fraktionen auf spezifische Proteine hin. α -Tubulin wurde als spezifisch zytoplasmatisches Protein, Lamin B als Kernprotein und GAPDH als ubiquitäre Ladekontrolle ausgewählt. Der in Abbildung 33 dargestellte Western Blot bestätigte eine vollständige Fraktionierung, da die zytoplasmatischen Fraktionen 1-4 lediglich Banden bei α -Tubulin und die Kernfraktionen 5-8 ausschließlich Banden von Lamin B zeigen. GAPDH als Ladekontrolle zeigt bei allen Proben vergleichbare Proteinmengen.



Abbildung 33 **Western Blot von Proteinextrakten aus Zytoplasma und Zellkern von HeLa S3-Zellen.** HeLa S3-Proteinextrakte wurden nach Trennung von Zytoplasma und Zellkern auf das Vorhandensein von GAPDH (37 kDa), α -Tubulin (52 kDa) und Lamin B (67 kDa) als ubiquitäres, spezifisch zytoplasmatisches oder nukleäres Protein untersucht. Die Auftragungen Z1-Z4 stellen Proteinextrakte des Zytoplasmas und K1-K4 Zellkernproteinextrakte dar. Diese Analyse wurde unter Anleitung von Bettina Fischer von Herrn Tobias Günther im Rahmen seiner wissenschaftlichen Abschlussarbeit durchgeführt.

8.6.4 High-Throughput RT-qPCR

8.6.4.1 Namen der kodierten Proteine der ausgewählten Gene

Tabelle 9 Korrespondierende Proteine der 95 Gene sowie gängige Abkürzungen (NCBI 2014).

| Gen | Kodiertes Protein |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| <i>ABCB1</i> | <i>multidrug resistance protein 1 (MDR1)</i> |
| <i>ABCC1</i> | <i>multidrug resistance associated protein 1 (MRP1)</i> |
| <i>ACTB</i> | <i>β-actin (ACTB)</i> |
| <i>ADH1B</i> | <i>alcohol dehydrogenase subunit beta (ADH)</i> |
| <i>ALDH1A1</i> | <i>aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1)</i> |
| <i>APAF1</i> | <i>apoptotic protease activating factor (APAF1)</i> |
| <i>APEX1</i> | <i>apurinic-apyrimidinic endonuclease 1 (APEX1/Ref-1)</i> |
| <i>ATM</i> | <i>ataxia telangiectasia mutated (ATM)</i> |
| <i>ATR</i> | <i>ataxia telangiectasia and Rad3-related protein (ATR)</i> |
| <i>AXIN2</i> | <i>axin 2 (AXIN2)</i> |
| <i>B2M</i> | <i>beta-2-microglobin (B2M)</i> |
| <i>BAX</i> | <i>bcl2-associated x protein (bax)</i> |
| <i>BBC3</i> | <i>p53 up-regulated modulator of apoptosis (PUMA)</i> |
| <i>BCL2</i> | <i>b-cell cll/lymphoma 2 (bcl-2)</i> |
| <i>BCL2L1</i> | <i>bcl2-like 1 (bcl-xL)</i> |
| <i>BRCA1</i> | <i>breast cancer 1, early onset (BRCA1)</i> |
| <i>BRCA2</i> | <i>breast cancer 2, early onset (BRCA2)</i> |
| <i>BTRC</i> | <i>transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase, beta (β-TrCP)</i> |
| <i>CAT</i> | <i>catalase (CAT)</i> |
| <i>CCND1</i> | <i>cyclin D1 (CCND1)</i> |
| <i>CDKN1A</i> | <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21)</i> |
| <i>CDKN1B</i> | <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27)</i> |
| <i>CDKN2B</i> | <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15)</i> |
| <i>CYP1A1</i> | <i>cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1 (CYP1A1)</i> |
| <i>DDB1</i> | <i>damage-specific DNA binding protein 1 (DDB1)</i> |
| <i>DDB2</i> | <i>damage-specific DNA binding protein 2 (DDB2)</i> |
| <i>DDIT3</i> | <i>growth arrest and DNA damage-inducible protein (GADD153)</i> |
| <i>E2F1</i> | <i>E2F transcription factor 1 (E2F1)</i> |
| <i>EGFR</i> | <i>epidermal growth factor receptor (EGFR)</i> |
| <i>EPHX1</i> | <i>epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic) (EPHX1)</i> |

| | |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>ERCC1</i> | <i>excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1)</i> |
| <i>ERCC2</i> | <i>excision repair cross-complementation group 2 (XPD)</i> |
| <i>ERCC4</i> | <i>excision repair cross-complementation group 4 (XPF)</i> |
| <i>ERCC5</i> | <i>excision repair cross-complementation group 5 (XPG)</i> |
| <i>FTH1</i> | <i>ferritin, heavy polypeptide 1 (FTH1)</i> |
| <i>G6PD</i> | <i>glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)</i> |
| <i>GADD45A</i> | <i>growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha (GADD45A)</i> |
| <i>GAPDH</i> | <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)</i> |
| <i>GCLC</i> | <i>glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit (GCL)</i> |
| <i>GPX1</i> | <i>glutathione peroxidase 1 (GPX1)</i> |
| <i>GPX2</i> | <i>glutathione peroxidase 2 (GPX2)</i> |
| <i>GSR</i> | <i>glutathione reductase (GSR)</i> |
| <i>GSTP1</i> | <i>glutathione S-transferase pi 1 (GSTP1)</i> |
| <i>GUSB</i> | <i>glucuronidase, beta (GUSB)</i> |
| <i>HMOX1</i> | <i>heme oxygenase (decycling) 1 (HO1)</i> |
| <i>HPRT1</i> | <i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1)</i> |
| <i>HSPA1A</i> | <i>heat shock 70kDa protein 1A (hsp70)</i> |
| <i>IL8</i> | <i>interleukin 8 (IL8)</i> |
| <i>JUN</i> | <i>jun proto-oncogene (c-jun)</i> |
| <i>KEAP1</i> | <i>kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)</i> |
| <i>LIG1</i> | <i>ligase I, DNA, ATP-dependent (LIG1)</i> |
| <i>LIG3</i> | <i>ligase III, DNA, ATP-dependent (LIG3)</i> |
| <i>MAP3K5</i> | <i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5 (MAP3K5/ASK1)</i> |
| <i>MDM2</i> | <i>Mouse double minute 2 homolog proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase (Mdm2)</i> |
| <i>MGMT</i> | <i>O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)</i> |
| <i>MLH1</i> | <i>mutL homolog 1 (MLH1)</i> |
| <i>MSH2</i> | <i>mutS homolog 2 (MSH2)</i> |
| <i>MT1X</i> | <i>metallothionein 1X (MT1X)</i> |
| <i>MT2A</i> | <i>metallothionein 2A (MT2A)</i> |
| <i>MYC</i> | <i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog (c-myc)</i> |
| <i>NAT1</i> | <i>N-acetyltransferase 1 (arylamine N-acetyltransferase) (NAT1)</i> |
| <i>NFE2L2</i> | <i>nuclear factor, erythroid 2-like 2 (Nrf2)</i> |
| <i>NFKB1</i> | <i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p50/p105)</i> |
| <i>NFKB2</i> | <i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)</i> |
| <i>NFKBIA</i> | <i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha (IKBA)</i> |

| | |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>NQO1</i> | <i>NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1 (NQO1)</i> |
| <i>OGG1</i> | <i>8-oxoguanine DNA glycosylase (hOGG1)</i> |
| <i>PARP1</i> | <i>Poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1)</i> |
| <i>PCNA</i> | <i>proliferating cell nuclear antigen (PCNA)</i> |
| <i>PLK3</i> | <i>polo-like kinase 3 (PLK3)</i> |
| <i>PMAIP1</i> | <i>phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (Noxa)</i> |
| <i>POLB</i> | <i>polymerase (DNA directed), beta (POLB)</i> |
| <i>POLD1</i> | <i>polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit (POLD1)</i> |
| <i>PPM1D</i> | <i>protein phosphatase, mg2+/Mn2+ dependent, 1D (PPM1D)</i> |
| <i>PRDX1</i> | <i>peroxiredoxin 1 (Prx1)</i> |
| <i>RAD50</i> | <i>RAD50 homolog (S. cerevisiae) (RAD50)</i> |
| <i>RAD51</i> | <i>RAD51 recombinase (RAD51)</i> |
| <i>RRM2B</i> | <i>ribonucleotide reductase M2 B (TP53 inducible) (p53R2)</i> |
| <i>SEPP1</i> | <i>selenoprotein P, plasma, 1 (SEPP1)</i> |
| <i>SIRT2</i> | <i>sirtuin 2 (SIRT2)</i> |
| <i>SLC30A1</i> | <i>solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1 (ZnT1)</i> |
| <i>SOD1</i> | <i>superoxide dismutase 1, soluble (SOD1)</i> |
| <i>SOD2</i> | <i>superoxide dismutase 2, mitochondrial (SOD2/MnSOD)</i> |
| <i>SULT1A</i> | <i>sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 1 (SULT1A1)</i> |
| <i>TFRC</i> | <i>transferrin receptor (TFR)</i> |
| <i>TNFRSF10B</i> | <i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b (DR5)</i> |
| <i>TP53</i> | <i>tumor protein p53 (p53)</i> |
| <i>TXN</i> | <i>thioredoxin (Txr)</i> |
| <i>TXNRD1</i> | <i>thioredoxin reductase 1 (TxrR)</i> |
| <i>UGT1A1</i> | <i>UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1 (UGT1A1)</i> |
| <i>VEGFA</i> | <i>vascular endothelial growth factor A (VEGFA)</i> |
| <i>XIAP</i> | <i>X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)</i> |
| <i>XPA</i> | <i>xeroderma pigmentosum, complementation group A (XPA)</i> |
| <i>XPC</i> | <i>xeroderma pigmentosum, complementation group C (XPC)</i> |
| <i>XRCC5</i> | <i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5 (XRCC5)</i> |

8.6.4.2 Primer-Sequenzen

Tabelle 10 **Gen Symbole, Gen IDs, Reference Sequence Accession Nummern (RefSeq) sowie forward (fwd) und reverse (rev) Primer-Sequenzen.** Mit (F) sind diejenigen Gene gekennzeichnet, deren Primer-Paar aus dem ursprünglichen Set der Firma Fluidigm übernommen wurde.

| Gen Symbol | Gen ID | RefSeq | Primer-Sequenz 5' --> 3' |
|------------------|--------|----------------|-------------------------------------------------------------------|
| <i>ADH1B</i> | 125 | NM_000668.5 | fwd: GGTGGACATCAACAAGGACAA rev: CAACATAACAGGGAAGCCATCAT |
| <i>ABCB1 (F)</i> | 5243 | NM_000927.4 | fwd: AACACCACTGGAGCATTGAC rev: ACAGCAAGCCTGGAACCTA |
| <i>ABCC1 (F)</i> | 4363 | NM_004996.3 | fwd: CCTGTTCTCGGAAACCATCC rev: AAGGTGATCCTCGACAGGAA |
| <i>ACTB (F)</i> | 60 | NM_001101.3 | fwd: CCAACCGCGAGAAGATGAC rev: TAGCACAGCCTGGATAGCAA |
| <i>ALDH1A1</i> | 216 | NM_000689.4 | fwd: CTGATGCCGACTTGGACAATG rev: ATACTTCTTAGCCCGCTCAACA |
| <i>APAF1</i> | 317 | NM_181861.1 | fwd: ACCGTCTCCGCATTCTGA rev: TCTGTAACACTCTTGTCTCTGGTT |
| <i>APEX1</i> | 328 | NM_001641.3 | fwd: ACTGTGCCTTCAAGAGACCAAATG rev: TCCTCATCGCCTATGCCGTAA |
| <i>ATM (F)</i> | 472 | NM_000051.3 | fwd: TACCAAGCAGCATGGAGGAA rev: GATTCATGGTAACTGGTTCCTTCTAC |
| <i>ATR (F)</i> | 545 | NM_001184.3 | fwd: CATTCAAAGCGCCACTGAA rev: CGCTGCTCAATGTCAAGAACA |
| <i>AXIN2</i> | 8313 | NM_004655.3 | fwd: TGATAAGGTCCTGGCAACTCA rev: GCGTGGTCTCTGTCTCT |
| <i>B2M</i> | 567 | NM_004048.2 | fwd: AAGATGAGTATGCCTGCCGTGT rev: TCTTCAAACCTCCATGATGCTGCT |
| <i>BAX (F)</i> | 581 | NM_004324.3 | fwd: GGGTTGTCGCCCTTTTCTAC rev: TCTTGGATCCAGCCCAACA |
| <i>BBC3</i> | 27113 | NM_001127240.2 | fwd: ACGACCTCAACGCACAGTA rev: ATGCTACATGGTGCAGAGAAAG |
| <i>BCL2 (F)</i> | 596 | NM_000633.2 | fwd: TGACAGAGGATCATGCTGTACTTA rev: TCCAATTCCTTTCCGATCTTTATTTCA |
| <i>BCL2L1</i> | 598 | NM_138578.1 | fwd: CCTCTCCCGACCTGTGATAC rev: GGCTCAACCAGTCCATTGTC |
| <i>BRCA1</i> | 672 | NM_007294.3 | fwd: GCTTGACACAGGTTTGGAGTATGC rev: GAGAGTTGGACACTGAGACTGGTT |
| <i>BRCA2 (F)</i> | 675 | NM_000059.3 | fwd: ATGCAGCAGACCCAGCTTA rev: TCCATGGCCTTCCTAATTTCCA |
| <i>BTRC</i> | 8945 | NM_033637.3 | fwd: GAGCAGTGGTCAGAGTCAGAT |

| | | | |
|--------------------|------|----------------|------------------------------------------------------------|
| <i>CAT (F)</i> | 847 | NM_001752.3 | rev: ACACAAGTTCAGCAGCACATAG fwd: AGAAGTGCGGAGATTCAACAC |
| <i>CCND1 (F)</i> | 595 | NM_053056.2 | rev: CCTCATTTCAGCACGTTTACA fwd: AGAGGCGGAGGAGAACAAA |
| <i>CDKN1A</i> | 1026 | NM_000389.4 | rev: AGGGCGGATTGGAATGAAC fwd: GCAGACCAGCATGACAGATTTTC |
| <i>CDKN1B (F)</i> | 1027 | NM_004064.4 | rev: ACAAAGTTCAGACTAAGGCAGAAGA fwd: AGGAAGCGACCTGCAACC |
| <i>CDKN2B (F)</i> | 1030 | NM_004936.3 | rev: TTGGGGAACCGTCTGAAACA fwd: TTACGGCCAACGGTGGATTA |
| <i>CYP1A1 (F)</i> | 1543 | NM_000499.3 | rev: GGCATGCCCTTGTCTCC fwd: AAACCAGTGGCAGATCAACC |
| <i>DDB1</i> | 1642 | NM_001923.4 | rev: AGGGGTGAGAAACCGTTCA fwd: GGAGTCAATCACCTATCACAAATGG |
| <i>DDB2</i> | 1643 | NM_000107.2 | rev: GGTATGTCAAGCACTCAGCAAT fwd: TCAAAGGGATTGGAGCTGGAG |
| <i>DDIT3</i> | 1649 | NM_001195053.1 | rev: GTGACCACCATTTCGGCTACTA fwd: TTAAGTCTAAGGCACTGAG |
| <i>E2F1 (F)</i> | 1869 | NM_005225.2 | rev: GGTGTGGTGATGTATGAA fwd: AGCTCATTGCCAAGAAGTCCAA |
| <i>EGFR (F)</i> | 1956 | NM_201282.1 | rev: TCCTGGGTCAACCCCTCAA fwd: GAACCCCGAGGGCAAATACA |
| <i>EPHX1</i> | 2052 | NM_000120.3 | rev: CACGAGCCGTGATCTGTCA fwd: CCACGACTTACACCAGAGGAT |
| <i>ERCC1 (F)</i> | 2067 | NM_202001.2 | rev: AATCTCCACCTGCTTCTTCCA fwd: GCCGACTGCACATTGATCC |
| <i>ERCC2 (F)</i> | 2068 | NM_000400.3 | rev: TCCGCTGGTTTCTGCTCATA fwd: TACCCCGAGCAGTTCTCCTA |
| <i>ERCC4 (F)</i> | 2072 | NM_005236.2 | rev: CTGAGGGCATCTCCAGGAC fwd: CTTCTGGAATCTCTGAGAGCAA |
| <i>ERCC5 (F)</i> | 2073 | NM_000123.3 | rev: GAGGTGCTGGAGTCAAGAAA fwd: TTGATGGGGATGCTCCACTA |
| <i>FTH1</i> | 2495 | NM_002032.2 | rev: TGGAGTCACTGGACGCTAA fwd: TTACCTGTCCATGTCTTAC |
| <i>G6PD (F)</i> | 2539 | NM_000402.4 | rev: CATCACAGTCTGGTTTCT fwd: GCCGTCACCAAGAACATTCA |
| <i>GADD45A (F)</i> | 1647 | NM_001924.3 | rev: CTCCCGAAGGGCTTCTCC fwd: GCTCCTGCTCTTGGAGAC |
| <i>GAPDH (F)</i> | 2597 | NM_002046.5 | rev: CAGGATCCTTCCATTGAGATGAA fwd: ACACCATGGGGAAGGTGAAG |
| <i>GCLC (F)</i> | 2729 | NM_001498.3 | rev: GTGACCAGGCGCCCAATA fwd: TGGATGCCATGGGATTTGGAA |

| | | | |
|-------------------|------|----------------|--------------------------------------------------------------|
| <i>GPX1 (F)</i> | 2876 | NM_201397.1 | rev: CTCAGATATACTGCAGGCTTGAA fwd: CACCCTCTCTTCGCCTTCC |
| <i>GPX2</i> | 2877 | NM_002083.3 | rev: GAGCTTGGGGTCGGTCATAA fwd: GCTTTCATTGCCAAGTCCTTCTAT |
| <i>GSR</i> | 2936 | NM_001195104.1 | rev: TCATTCTGACAGTTCTCCTGATGT fwd: TTGCGTGAATGTTGGATGTGTA |
| <i>GSTP1 (F)</i> | 2950 | NM_000852.3 | rev: ATGGGACTTGGTGAGATTGTTT fwd: CACCCTGTACCAGTCCAATACC |
| <i>GUSB (F)</i> | 2990 | NM_000181.3 | rev: TCCTGCTGGTCCTTCCCATA fwd: CATCGATGACATCACCGTCAC |
| <i>HMOX1 (F)</i> | 3162 | NM_002133.2 | rev: ACAGGTTACTGCCCTTGACA fwd: CAGTCAGGCAGAGGGTGATA |
| <i>HPRT1 (F)</i> | 3251 | NM_000194.2 | rev: GCTCCTGCAACTCCTCAAA fwd: GCTTTCCTTGGTCAGGCAGTA |
| <i>HSPA1A (F)</i> | 3303 | NM_005345.5 | rev: ACTTCGTGGGGTCCTTTTCAC fwd: TCCTGTGTTTGCAATGTTGAA |
| <i>IL8</i> | 3576 | NM_000584.3 | rev: CTGCATGTAGAAACCGGAAAA fwd: TTCAGAGACAGCAGAGCACAC |
| <i>JUN (F)</i> | 3725 | NM_002228.3 | rev: AAGTTCTTTAGCACTCCTTGGCA fwd: AAGAACTCGGACCTCCTCAC |
| <i>KEAP1</i> | 9817 | NM_012289.3 | rev: TGGATTATCAGGCGCTCCA fwd: AACTTCGCTGAGCAGATTGG |
| <i>LIG1 (F)</i> | 3978 | NM_000234.2 | rev: CGTAGAACCGTCGCTGTT fwd: TGGGAAGTACCCGGACATCA |
| <i>LIG3 (F)</i> | 3980 | NM_013975.3 | rev: GCTTCGGTGTCCAGGATGAA fwd: TCCAGGACTTCCTTCGGAAA |
| <i>MAP3K5 (F)</i> | 4217 | NM_005923.3 | rev: CAGCAGCAGCTTCACTGTTA fwd: ATCATTCCGAAGGCGGTACA |
| <i>MDM2 (F)</i> | 4193 | NM_002392.5 | rev: ACTCTCAGATGCAAGGCTGAA fwd: CCATGATCTACAGGAAGTTGGTA |
| <i>MGMT</i> | 4255 | NM_002412.3 | rev: GACACCTGTTCTCACTCAC fwd: TGTGAAATTCGGAGAAGTGA |
| <i>MLH1</i> | 4292 | NM_001167618.1 | rev: GAGGATGGGGACAGGATT fwd: CTTACCCAGACTTTGCTACC |
| <i>MSH2 (F)</i> | 4436 | NM_000251.2 | rev: GGCATAGACCTTATCACTACTTCC fwd: CCAGCAGCAAAGAAGTGCTA |
| <i>MT1X</i> | 4501 | NM_005952.3 | rev: TGTTTCACCTTGGACAGGAAC fwd: ACCACGCTTTTCATCTGTCC |
| <i>MT2A</i> | 4502 | NM_005953.3 | rev: GAGCAGTTGGGGTCCATTTCC fwd: AACCTGTCCCGACTCTAG |
| <i>MYC</i> | 4609 | NM_002467.4 | rev: GAAGTCGCGTTCTTTACA fwd: GCCGCATCCACGAACTTTG |

| | | | |
|------------------|-------|----------------|--------------------------------------------------------------|
| <i>NAT1</i> | 9 | NM_000662.6 | rev: GAGGCTGCTGGTTTTCCACTAC fwd: AGGAAGAAGCAGCAATCTGTCT |
| <i>NFE2L2</i> | 4780 | NM_001145412.2 | rev: TCGGATCTGGTGTGAAGAATGT fwd: CAGTCAGCGACGGAAAGAGTA |
| <i>NFKB1</i> | 4790 | NM_003998.3 | rev: GGGCAACCTGGGAGTAGTT fwd: AGAGTGCTGGAGTTCAGGATAAC |
| <i>NFKB2</i> | 4791 | NM_001077494.3 | rev: TGAAGGTGGATGATTGCTAAGTGT fwd: CCTGACTTTGAGGGACTGTATC |
| <i>NFKBIA</i> | 4792 | NM_020529.2 | rev: GGCTAGATGCAAGGCTGTT fwd: ACTTTCGAGGAAATACCC |
| <i>NQO1 (F)</i> | 1728 | NM_000903.2 | rev: GATAGAGGCTAAGTGTAGAC fwd: TCGGACCTCTATGCCATGAAC |
| <i>OGG1</i> | 4968 | NM_002542.5 | rev: AAAGTTCGCAGGGTCCTTCA fwd: GTGTACTAGCGGATCAAGTATGGA |
| <i>PARP1 (F)</i> | 142 | NM_001618.3 | rev: CAGTCGCACACCTTGAATT fwd: TTCTGGAGGACGACAAGGAA |
| <i>PCNA (F)</i> | 5111 | NM_182649.1 | rev: GTTGCTACCGATCACCGTAC fwd: TCTGAGGGCTTCGACACCTA |
| <i>PLK3</i> | 1263 | NM_004073.2 | rev: CATTGCCGGCGCATTTTAGTA fwd: ACTGTCCAGGTGAACTTC |
| <i>PMAIP1</i> | 5366 | NM_021127.2 | rev: GAAGCGAGGTAAGTACAAG fwd: CAGTTGGAGGCTGAGGTTC |
| <i>POLB</i> | 5423 | NM_002690.2 | rev: TCCTGAGTTGAGTAGCACACT fwd: AAGAAATTGCCTGGAGTAGGAACA |
| <i>POLD1 (F)</i> | 5424 | NM_002691.3 | rev: CAGATGGACCAATGCCACTAACT fwd: AGCTGGTGGAGTCTAAGTACAC |
| <i>PPM1D (F)</i> | 8493 | NM_003620.3 | rev: GACGGAGTCAGTGTCACCATA fwd: AGCCAGAACTTCCCAAGGAAA |
| <i>PRDX1</i> | 5052 | NM_002574.3 | rev: ACTACACGATTCACCCAGAC fwd: GCCTTCCAGTTCACTGACAA |
| <i>RAD50 (F)</i> | 10111 | NM_005732.3 | rev: TTCGGCTGAATCTGAAGTCTTG fwd: TCCCTCCTGGAACCAAAGGAA |
| <i>RAD51 (F)</i> | 5888 | NM_002875.4 | rev: AGACGAATCTGGGCTCTCACA fwd: GGGAAGACCCAGATCTGTCA |
| <i>RRM2B</i> | 50484 | NM_015713.4 | rev: ATGTACATGGCCTTTCCTTCAC fwd: CCTTGCGATGGATAGCAGATAGA |
| <i>SEPP1</i> | 6414 | NM_005410.2 | rev: AGTCCTGGCATAAGACCTCTC fwd: AACTGCTCTCTCACGACTCTC |
| <i>SIRT2</i> | 22933 | NM_001193286.1 | rev: AGGTGCTGATGTCCATGATTGT fwd: TCAAGCCAACCATCTGTCACTA |
| <i>SLC30A1</i> | 7779 | NM_021194.2 | rev: CTCCACCAAGTCCTCCTGTT fwd: AGAAGTGGTGATACAGTGGAAGT |

| | | | |
|-------------------|-------|----------------|-------------------------------------------------------------|
| <i>SOD1</i> | 6647 | NM_000454.4 | rev: GGGTCAGGGAAACATGGATTC fwd: TGATCTCACTCTCAGGAGACCAT |
| <i>SOD2 (F)</i> | 6648 | NM_001024466.1 | rev: ACCACAAGCCAAACGACTTC fwd: AGGATCCACTGCAAGGAACA |
| <i>SULT1A1</i> | 6817 | NM_001055.3 | rev: GTGCTCCCACACATCAATCC fwd: AAGTTCATGGTCGGAGAAGTGT |
| <i>TFRC</i> | 7037 | NM_003234.2 | rev: ACGGTGGTGTAGTTGGTCATAG fwd: CACCATCAAGCTGCTGAATGA |
| <i>TNFRSF10B</i> | 8795 | NM_003842.4 | rev: GCCTTACTATACGCCACATAACC fwd: GCACCACGACCAGAAACAC |
| <i>TP53</i> | 7157 | NM_000546.5 | rev: ACAATCACCGACCTTGACCAT fwd: CGAGATGTTCCGAGAGCTGAAT |
| <i>TXN</i> | 7295 | NM_001244938.1 | rev: TTTATGGCGGGAGGTAGACTGA fwd: TTACAGCCGCTCGTCAGA |
| <i>TXNRD1 (F)</i> | 7296 | NM_003330.3 | rev: CCCACCTTTTGTCCCTTCTT fwd: GCATCCCTGGTGACAAAGAA |
| <i>UGT1A1</i> | 54658 | NM_000463.2 | rev: CCAACAACCAGGGTCTTACC fwd: TCCCAGGAATTTGAAGCCTACAT |
| <i>VEGFA</i> | 7422 | NM_001025366.2 | rev: TCGTGTTGTTGCAAGATTCCG fwd: TACATCTTCAAGCCATCC |
| <i>XIAP</i> | 331 | NM_001167.3 | rev: CTGTAGGAAGCTCATCTC fwd: AGGAGTGTCTGGTAAGAACTACTG |
| <i>XPA (F)</i> | 7507 | NM_000380.3 | rev: GCATACTGTCTTTCTGAGCATTCA fwd: ACATCATTCAATGGGGTGATA |
| <i>XPC (F)</i> | 7508 | NM_004628.4 | rev: ACCCAAACCTTCAAGAGACC fwd: TAAAGGGGTCCATGAGGACACA |
| <i>XRCC5</i> | 7520 | NM_021141.3 | rev: CTGGCTGGCTGCAGATGTTA fwd: TGATTTGCTGGAGGACATTGAAAG |
| | | | rev: AATCGGCTGCTGAGGTCA |

8.6.4.3 Gelelektrophorese und Schmelzkurvenanalyse

Die Primer-Spezifität wurde anhand einer Größenverifizierung der entstehenden Amplifikate mittels Gelelektrophorese sowie anhand der resultierenden Schmelzpunkte der Amplifikate überprüft. In Abbildung 34 sind Beispiele der Analysen gezeigt.

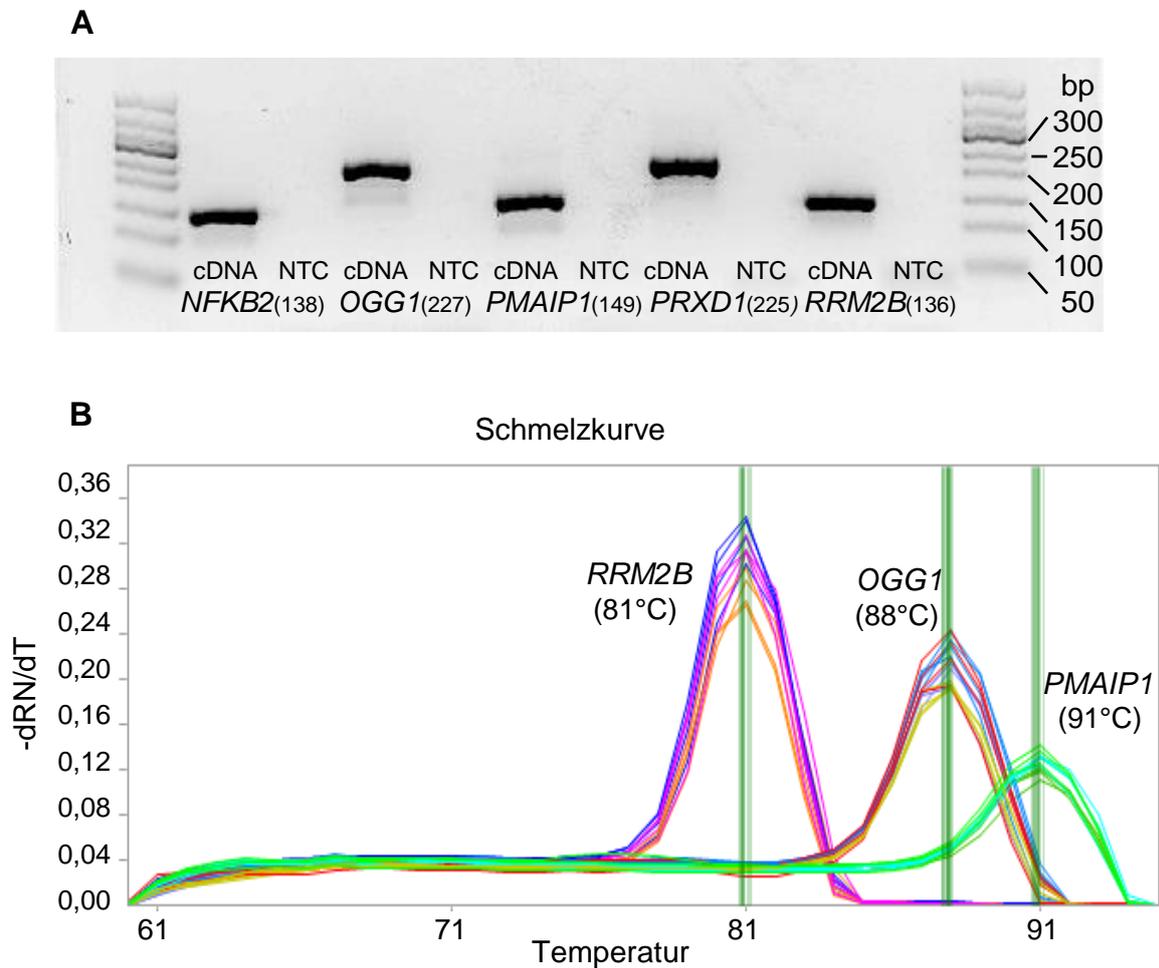


Abbildung 34 **Evaluation der Primer-Spezifität.** (A) Beispiel der gelelektrophoretischen Analyse für die Amplifikate der Gene *NFKB2*, *OGG1*, *PMAIP1*, *PRDX1* und *RRM2B* (mit NTCs) mit den entsprechenden theoretischen Größen der Zielamplifikate in bp in Klammern. (B) Beispiel-Schmelzkurvenanalyse (BioMark™ HD System) für die Gene *OGG1*, *PMAIP1* und *RRM2B* mit entsprechenden theoretischen Schmelztemperaturen der Zielamplifikate in Klammern. NTC = No template Control, RN= normalisiertes Reportersignal

8.6.4.4 Beispielkalibrierung

Die Primer-Effizienzen wurden anhand von Kalibrierungskurven ermittelt. Beispielhaft sind diese Vorgänge für *GAPDH*, *JUN* und *SIRT2* in Abbildung 35 gezeigt.

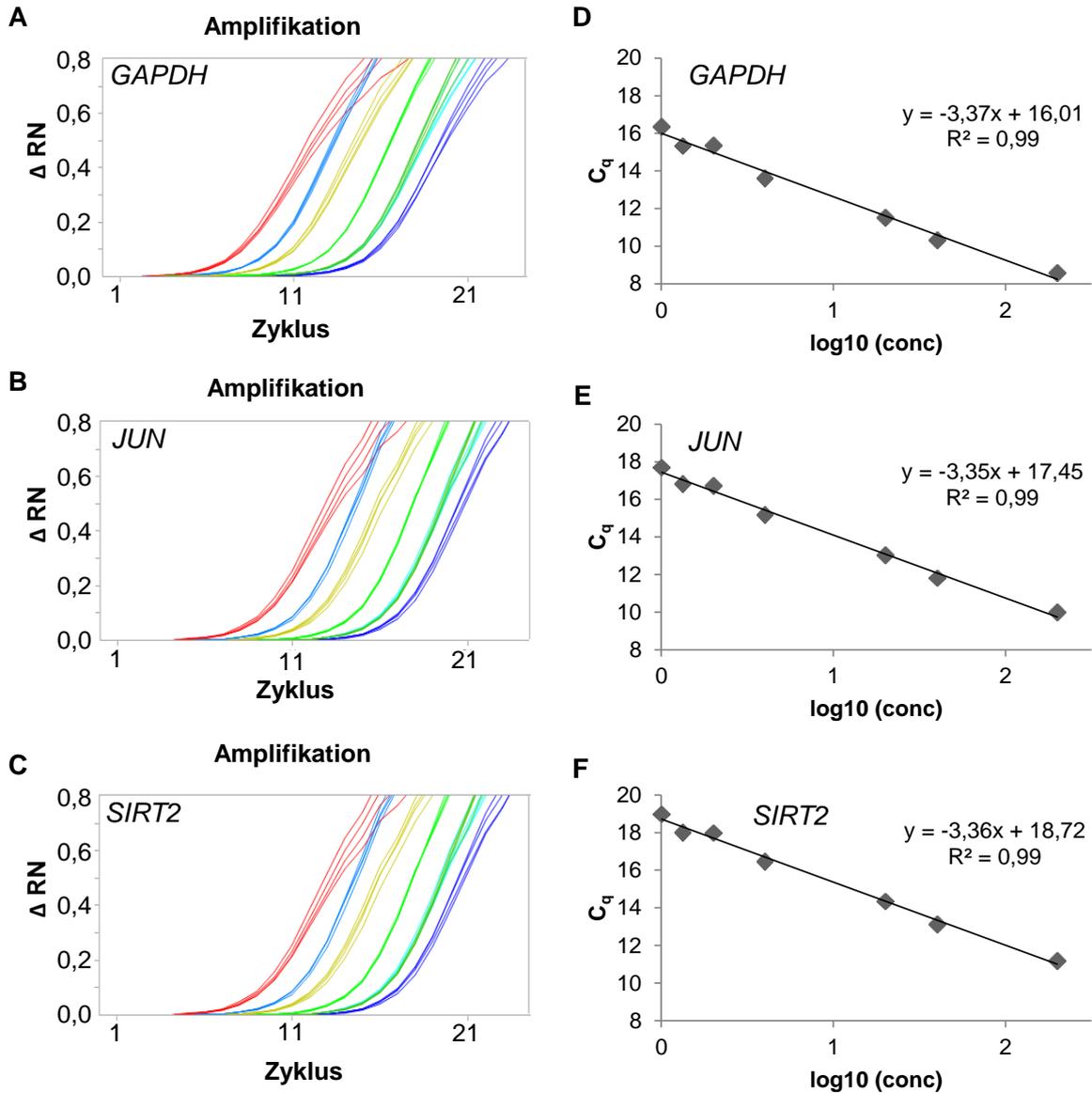


Abbildung 35 **Evaluation der Primer-Effizienz.** Beispiele der Amplifizierungskurven der Kalibrierungen mittels Fluidigm Dynamic Array für (A) *GAPDH*, (B) *JUN* und (C) *SIRT2*. Gezeigt sind sechs serielle Verdünnungen (1-200-fach, Quadruplikate) der Standard-cDNA. Darstellung der Kalibrierungskurven (x-Achse: \log_{10} der relativen *template*-Konzentration, y-Achse: C_q Wert der jeweiligen *template*-Konzentration (conc)) mit linearer Regressions-trendlinie und Korrelationskoeffizient R^2 für (D) *GAPDH*, (E) *JUN* und (F) *SIRT2*. Die Primer-Effizienz kann mithilfe der Steigung der Kalibrierungskurve errechnet werden.

8.6.4.5 Ermittlung der Primer-Effizienz

Tabelle 11 **Evaluation der Primer-Effizienz.** Gezeigt sind die Werte der Steigungen, Korrelationskoeffizienten (R^2), Effizienzen sowie das Konfidenzintervall (CI) der Effizienz aus der linearen Regression der resultierenden Kalibrierungskurven. Die Kalibrierungskurven wurden mit 200-fachen Verdünnungen von kommerziell erworbener cDNA bzw. A549-cDNA (gekennzeichnet mit ^a) erstellt.

| Gen | Steigung | R² | Effizienz | CI |
|---------------------------|-----------------|----------------------|------------------|-----------|
| <i>ABCB1</i> | -3,46 | 0,992 | 94 % | 90-99 % |
| <i>ABCC1</i> | -3,42 | 0,997 | 96 % | 93-99 % |
| <i>ACTB</i> | -3,38 | 0,989 | 97 % | 92-103 % |
| <i>ADH</i> | -3,41 | 0,990 | 97 % | 91-102 % |
| <i>ALDH1A1</i> | -3,42 | 0,991 | 96 % | 91-101 % |
| <i>APAF1</i> | -3,42 | 0,988 | 96 % | 90-103 % |
| <i>APEX1</i> | -3,45 | 0,996 | 95 % | 92-98 % |
| <i>ATM</i> | -3,40 | 0,996 | 97 % | 93-100 % |
| <i>ATR</i> | -3,41 | 0,986 | 96 % | 90-103 % |
| <i>AXIN2</i> | -3,26 | 0,990 | 103 % | 94-111 % |
| <i>B2M</i> | -3,41 | 0,996 | 96 % | 93-100 % |
| <i>BAX</i> | -3,31 | 0,988 | 101 % | 95-107 % |
| <i>BBC3^a</i> | -3,28 | 0,988 | 102 % | 94-110 % |
| <i>BCL2</i> | -3,58 | 0,990 | 90 % | 85-95 % |
| <i>BCL2L1</i> | -3,41 | 0,991 | 96 % | 91-101 % |
| <i>BRCA1^a</i> | -3,64 | 0,990 | 88 % | 84-93 % |
| <i>BRCA2^a</i> | -3,57 | 0,991 | 90 % | 86-95 % |
| <i>BTRC</i> | -3,48 | 0,989 | 94 % | 88-99 % |
| <i>CAT</i> | -3,45 | 0,996 | 95 % | 92-99 % |
| <i>CCND1</i> | -3,38 | 0,996 | 98 % | 94-101 % |
| <i>CDKN1A</i> | -3,42 | 0,994 | 96 % | 92-100 % |
| <i>CDKN1B</i> | -3,44 | 0,995 | 95 % | 92-99 % |
| <i>CDKN2B</i> | -3,41 | 0,985 | 97 % | 89-104 % |
| <i>CYP1A1^a</i> | -3,58 | 0,971 | 90 % | 92-99 % |
| <i>DDB1</i> | -3,41 | 0,997 | 95 % | 89-104 % |
| <i>DDB2</i> | -3,37 | 0,993 | 98 % | 94-103 % |
| <i>DDIT3</i> | -3,29 | 0,989 | 101 % | 95-107 % |
| <i>E2F1</i> | -3,30 | 0,989 | 101 % | 95-107 % |
| <i>EGFR</i> | -3,41 | 0,990 | 96 % | 91-102 % |

Anhang

| | | | | |
|----------------------------|-------|-------|-------|----------|
| <i>EPHX1</i> | -3,43 | 0,997 | 96 % | 93-99 % |
| <i>ERCC1</i> | -3,37 | 0,994 | 98 % | 94-102 % |
| <i>ERCC2</i> | -3,37 | 0,995 | 98 % | 94-102 % |
| <i>ERCC4</i> | -3,44 | 0,994 | 95 % | 91-99 % |
| <i>ERCC5</i> | -3,47 | 0,996 | 94 % | 91-97 % |
| <i>FTH1</i> | -3,37 | 0,989 | 98 % | 92-104 % |
| <i>G6PD</i> | -3,44 | 0,996 | 95 % | 92-99 % |
| <i>GADD45A^a</i> | -3,78 | 0,917 | 84 % | 70-97 % |
| <i>GAPDH</i> | -3,37 | 0,987 | 98 % | 92-104 % |
| <i>GCLC</i> | -3,39 | 0,989 | 97 % | 91-103 % |
| <i>GPX1</i> | -3,35 | 0,993 | 99 % | 94-104 % |
| <i>GPX2^a</i> | -3,50 | 0,992 | 93 % | 89-98 % |
| <i>GSR</i> | -3,46 | 0,991 | 95 % | 90-99 % |
| <i>GSTP1</i> | -3,40 | 0,993 | 97 % | 92-102 % |
| <i>GUSB</i> | -3,41 | 0,996 | 96 % | 93-100 % |
| <i>HMOX1</i> | -3,48 | 0,996 | 94 % | 90-97 % |
| <i>HPRT1</i> | -3,47 | 0,992 | 94 % | 90-99 % |
| <i>HSPA1A</i> | -3,44 | 0,996 | 95 % | 92-99 % |
| <i>IL8</i> | -3,32 | 0,985 | 100 % | 92-108 % |
| <i>JUN</i> | -3,35 | 0,991 | 99 % | 93-104 % |
| <i>KEAP1</i> | -3,46 | 0,993 | 94 % | 90-99 % |
| <i>LIG1</i> | -3,41 | 0,988 | 97 % | 91-103 % |
| <i>LIG3</i> | -3,48 | 0,985 | 94 % | 87-100 % |
| <i>MAP3K5</i> | -3,41 | 0,994 | 97 % | 93-101 % |
| <i>MDM2</i> | -3,42 | 0,996 | 96 % | 93-99 % |
| <i>MGMT</i> | -3,36 | 0,995 | 98 % | 94-102 % |
| <i>MLH1</i> | -3,39 | 0,989 | 97 % | 92-103 % |
| <i>MSH2</i> | -3,39 | 0,994 | 97 % | 93-101 % |
| <i>MT1X</i> | -3,40 | 0,988 | 97 % | 91-103 % |
| <i>MT2A</i> | -3,38 | 0,990 | 98 % | 92-103 % |
| <i>MYC</i> | -3,37 | 0,994 | 98 % | 94-103 % |
| <i>NAT1</i> | -3,45 | 0,989 | 95 % | 89-100 % |
| <i>NFEL2L</i> | -3,43 | 0,995 | 96 % | 92-99 % |
| <i>NFKB1</i> | -3,45 | 0,998 | 95 % | 93-97 % |
| <i>NFKB2</i> | -3,43 | 0,997 | 96 % | 93-99 % |

Anhang

| | | | | |
|---------------------------|-------|-------|-------|----------|
| <i>NFKBIA</i> | -3,36 | 0,990 | 99 % | 93-104 % |
| <i>NQO1</i> | -3,40 | 0,996 | 97 % | 93-100 % |
| <i>OGG1</i> | -3,36 | 0,991 | 98 % | 93-104 % |
| <i>PARP1</i> | -3,43 | 0,996 | 96 % | 92-99 % |
| <i>PCNA</i> | -3,43 | 0,998 | 96 % | 93-98 % |
| <i>PLK3</i> | -3,41 | 0,987 | 96 % | 90-103 % |
| <i>PMAIP1^a</i> | -3,45 | 0,993 | 95 % | 91-99 % |
| <i>POLB</i> | -3,45 | 0,996 | 95 % | 91-98 % |
| <i>POLD1</i> | -3,35 | 0,986 | 99 % | 91-106 % |
| <i>PPM1D</i> | -3,34 | 0,989 | 99 % | 93-105 % |
| <i>PRDX1</i> | -3,43 | 0,996 | 96 % | 93-99 % |
| <i>RAD50</i> | -3,35 | 0,988 | 99 % | 93-105 % |
| <i>RAD51^a</i> | -3,57 | 0,990 | 91 % | 85-96 % |
| <i>RRM2B</i> | -3,39 | 0,996 | 97 % | 94-100 % |
| <i>SEPP1</i> | -3,33 | 0,994 | 100 % | 96-104 % |
| <i>SIRT2</i> | -3,36 | 0,992 | 98 % | 93-104 % |
| <i>SLC30A1</i> | -3,51 | 0,988 | 93 % | 87-98 % |
| <i>SOD1</i> | -3,45 | 0,992 | 95 % | 90-100 % |
| <i>SOD2</i> | -3,44 | 0,995 | 95 % | 92-99 % |
| <i>SULT1A1</i> | -3,43 | 0,993 | 96 % | 91-100 % |
| <i>TFRC</i> | -3,51 | 0,994 | 93 % | 89-97 % |
| <i>TFRSF10B</i> | -3,35 | 0,995 | 99 % | 95-103 % |
| <i>TP53</i> | -3,39 | 0,997 | 97 % | 94-100 % |
| <i>TXN</i> | -3,38 | 0,996 | 97 % | 94-101 % |
| <i>TXNRD1</i> | -3,35 | 0,986 | 99 % | 92-105 % |
| <i>UGT1A1</i> | -3,44 | 0,991 | 95 % | 90-100 % |
| <i>VEGFA</i> | -3,31 | 0,987 | 101 % | 94-107 % |
| <i>XIAP</i> | -3,47 | 0,988 | 94 % | 88-100 % |
| <i>XPA</i> | -3,39 | 0,996 | 97 % | 94-101 % |
| <i>XPC</i> | -3,40 | 0,995 | 97 % | 93-101 % |
| <i>XRCC5</i> | -3,40 | 0,995 | 97 % | 93-101 % |

8.6.5 Untersuchungen zu CdCl₂

8.6.5.1 Zytotoxizitätsuntersuchung

Die Zytotoxizität von CdCl₂ in BEAS-2B Zellen wurde anhand der Zellzahl nach 24 Stunden untersucht. Dabei kam es ab 5 µM zu einer Absenkung auf 80 %, bei 10 µM betrug die Zellzahl noch 55 % und verringerte sich bei 15 µM noch weiter auf 17 % (Abbildung 36).

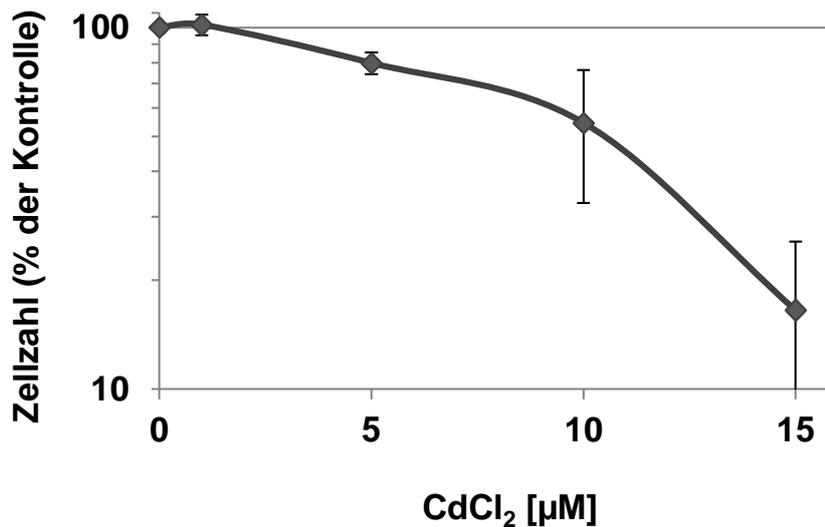


Abbildung 36 **Einfluss von CdCl₂ auf die Zellzahl.** BEAS-2B-Zellen wurden 24 Stunden mit CdCl₂ inkubiert und gezählt. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SD von sechs Bestimmungen aus drei unabhängigen Versuchen.

8.6.5.2 Ergänzende Genexpressionsdaten

Nach 8 h wurden die Transkriptmengen von *HMOX1* und *HSPA1A* konzentrationsabhängig auf das 130-fache bzw. 33-fache durch CdCl₂ in BEAS-2B-Zellen erhöht (Abbildung 37).

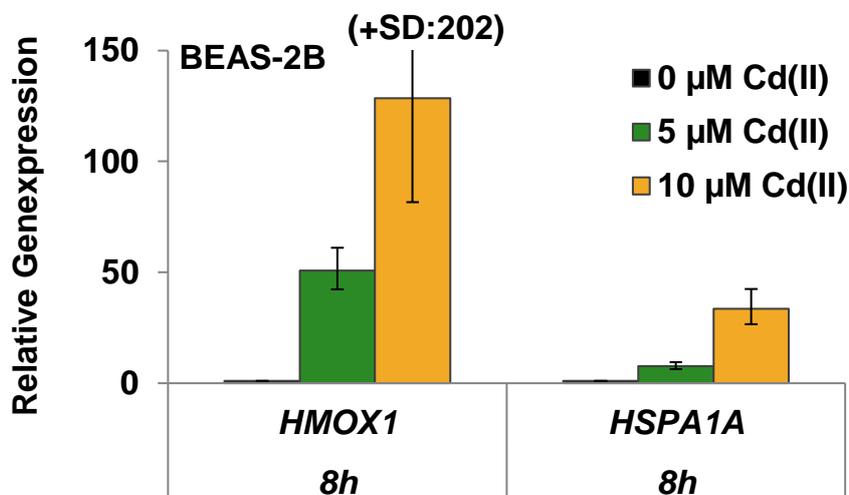


Abbildung 37 **Einfluss von CdCl₂ auf die Expression der Gene *HMOX1* und *HSPA1A*.** BEAS-2B-Zellen wurden für acht Stunden mit CdCl₂ inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SD von vier Bestimmungen aus zwei unabhängigen Versuchen.

Nach 24 h waren die Transkriptmengen der mit der antioxidativen Stressantwort assoziierten Gene *FTH1*, *G6PD*, *GSR*, *TFRC* und *TXN* tendenziell um das 1,5-2-fache in BEAS-2B-Zellen gesteigert (Abbildung 38).

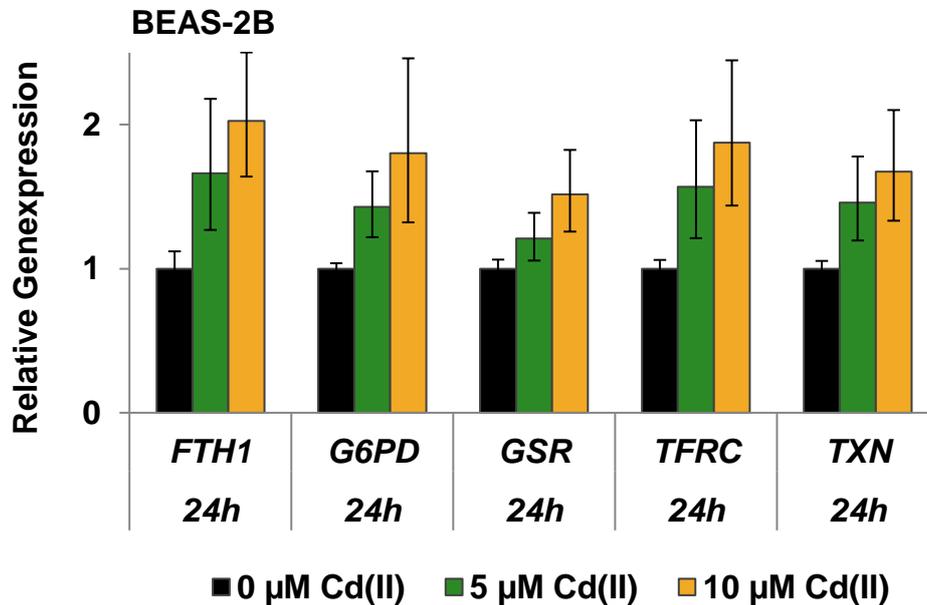


Abbildung 38 Einfluss von CdCl_2 auf die Expression von Genen, die mit der antioxidativen Abwehr assoziiert sind. BEAS-2B-Zellen wurden 24 Stunden mit CdCl_2 inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD von vier Bestimmungen aus zwei unabhängigen Versuchen.

Innerhalb der Gruppe der Gene, die mit Zellzyklusregulation und Proliferation assoziiert sind, wurden in A549-Zellen ausschließlich die Transkriptmengen von *JUN* (8 h) und *CDKN1A* (24 h) konzentrationsabhängig verdoppelt (Abbildung 39).

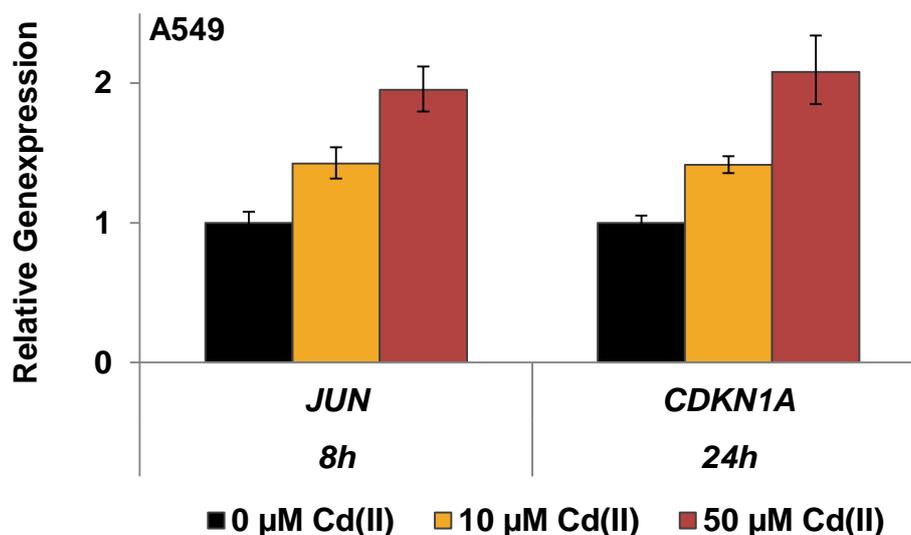


Abbildung 39 Einfluss von CdCl_2 auf die Expression der Gene *JUN* und *CDKN1A*. A549-Zellen wurden für acht bzw. 24 Stunden mit CdCl_2 inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD von vier Bestimmungen aus zwei unabhängigen Versuchen.

Die Transkriptmengen des Gens *MDM2*, das im Zuge eines negativen feedback durch aktives p53 induziert wird, veränderten sich durch CdCl_2 weder in BEAS-2B- noch in A549-Zellen (Abbildung 40).

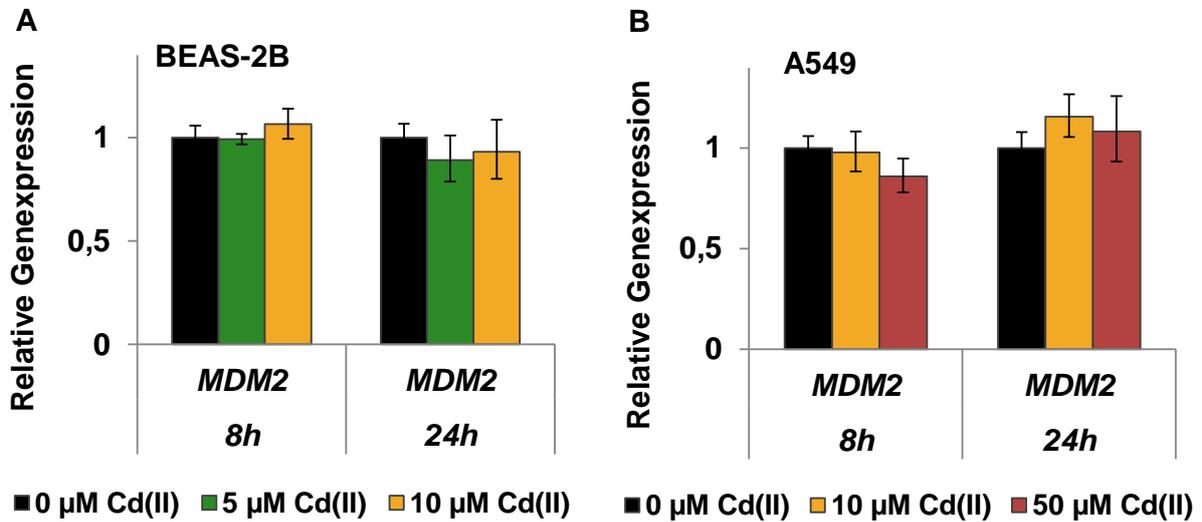


Abbildung 40 **Einfluss von CdCl_2 auf die Expression des Gens *MDM2***. BEAS-2B-Zellen (A) oder A549-Zellen (B) wurden für acht bzw. 24 Stunden mit CdCl_2 inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD von vier Bestimmungen aus zwei unabhängigen Versuchen.

8.6.6 Untersuchungen zu CuO NP, CuO MP und CuCl₂

8.6.6.1 Zytotoxizitätsuntersuchungen

Die Zytotoxizität von CuO MP wurde zusätzlich anhand der Zellzahl in höheren Dosen untersucht, um eine eventuelle Oberflächenkorrelation mit den erhaltenen Effekten von CuO NP zu erreichen. In den hohen Konzentrationen waren CuO MP aber mit 50 % bei 115 µg/mL (\pm 5 µg/mL CuO NP) und 25 % Zellzahl bei 230 µg/mL (\pm 10 µg/mL CuO NP) deutlich zytotoxischer (Abbildung 41).

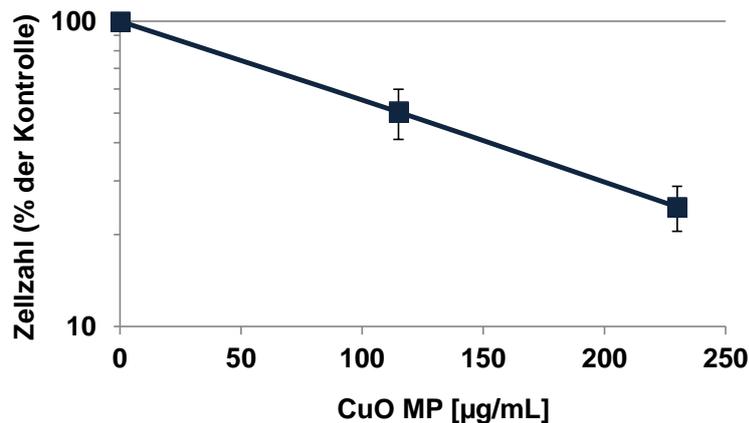


Abbildung 41 **Einfluss von CuO MP auf die Zellzahl.** BEAS-2B-Zellen wurden 24 Stunden mit CuO MP inkubiert und gezählt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängigen Versuchen.

8.6.6.2 Ergänzende Genexpressionsdaten

Die Gene, die für Faktoren der antioxidativen Abwehr kodieren, waren durch CuCl₂ zumeist durch die zweithöchste Konzentration von 126 µM und nicht durch die höchste Dosis von 252 µM in ihrer Expression am stärksten verändert (Abbildung 42).

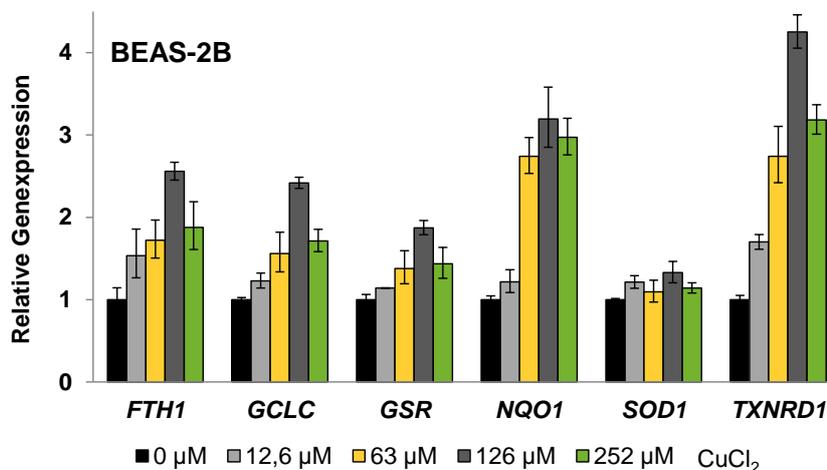


Abbildung 42 **Einfluss von CuCl₂ auf die Expression der mit der antioxidativen Abwehr assoziierten Gene FTH1, GCLC, GSR, NQO1, SOD1 und TXNRD1.** BEAS-2B-Zellen wurden für 24 Stunden mit CuCl₂ inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD von vier Bestimmungen aus zwei unabhängigen Versuchen.

In A549-Zellen veränderte sich die Transkriptmenge von Genen, deren kodierte Proteine proapoptotisch wirken, nur tendenziell durch CuO NP und CuCl₂. Dabei verminderten sich die mRNA-Mengen der antiapoptotischen Gene *BCL2* und *BCL2L1* tendenziell, während *PMAIP1* transkriptionell leicht erhöht wurde (Abbildung 43).

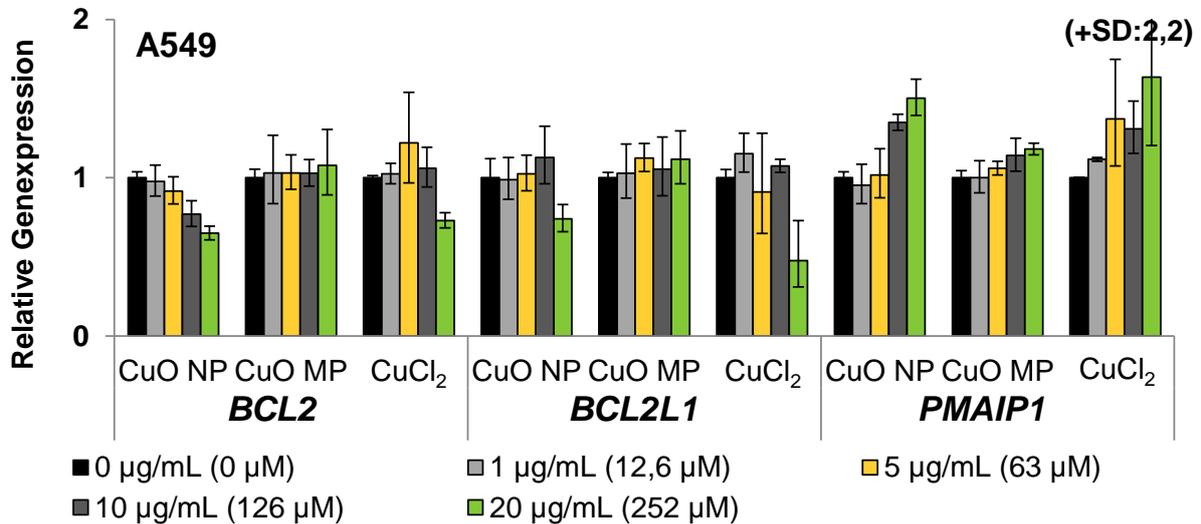


Abbildung 43 **Einfluss von CuO NP, CuO MP und CuCl₂ auf die Expression der mit Apoptose assoziierten Gene *BCL2*, *BCL2L1* und *PMAIP1*.** A549-Zellen wurden für 24 Stunden mit den Kupferverbindungen inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD von vier Bestimmungen aus zwei unabhängigen Versuchen. 20 µg/mL CuO entsprechen 252 µM Cu²⁺ im Falle kompletter Kupferfreisetzung.

Die Transkriptmengen des Gens *MDM2*, das im Zuge eines negativen feedback durch aktives p53 induziert wird, veränderten sich durch die Kupferverbindungen weder in BEAS-2B- noch in A549-Zellen (Abbildung 44).

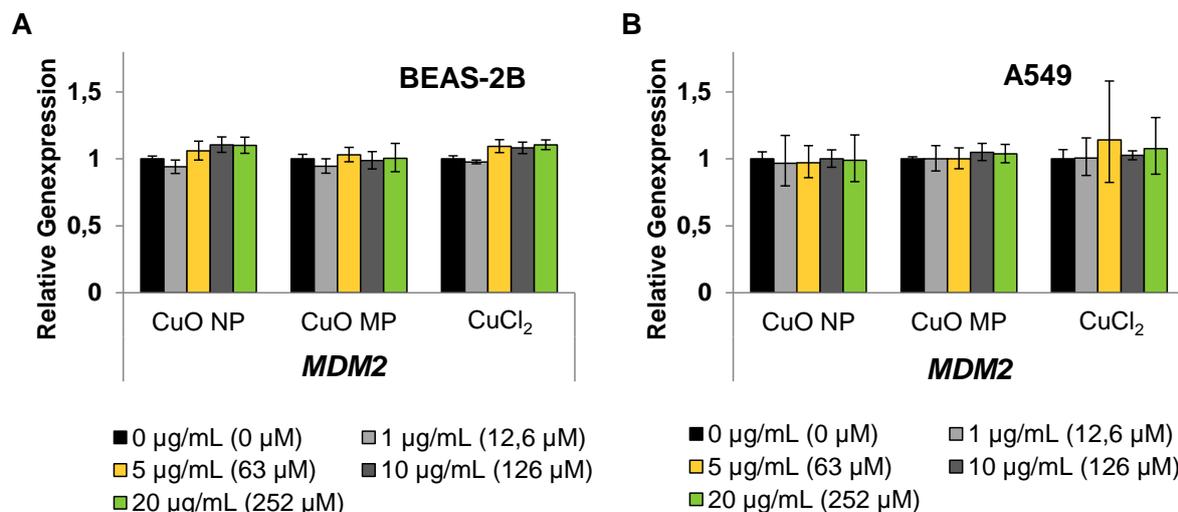


Abbildung 44 **Einfluss von CuO NP, CuO MP und CuCl₂ auf die Expression des Gens *MDM2*.** BEAS-2B-Zellen (A) oder A549-Zellen (B) wurden für 24 Stunden mit den Kupferverbindungen inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD von vier Bestimmungen aus zwei unabhängigen Versuchen. 20 µg/mL CuO entsprechen 252 µM Cu²⁺ im Falle kompletter Kupferfreisetzung.

8.6.6.3 Ergänzende Gesamtaufnahmeuntersuchungen

In einer zeitabhängigen Untersuchung wurde die Kinetik der Kupferaufnahme nach Behandlung mit 10 µg/mL CuO NP und 50 µg/mL CuO MP ermittelt. CuO NP führten dabei sehr rasch zu einer deutlichen Zunahme der intrazellulären Kupferkonzentration. Nach einer und vier Stunden waren dabei um die 500 µM zelluläres Kupfer zu beobachten, nach acht Stunden nahezu 900 µM und nach 24 Stunden der Maximalwert von etwa 1100 µM. CuO MP zeigten ebenfalls eine zeitabhängige Zunahme des Kupfergehaltes, der aber maximal Werte von 600 µM annahm.

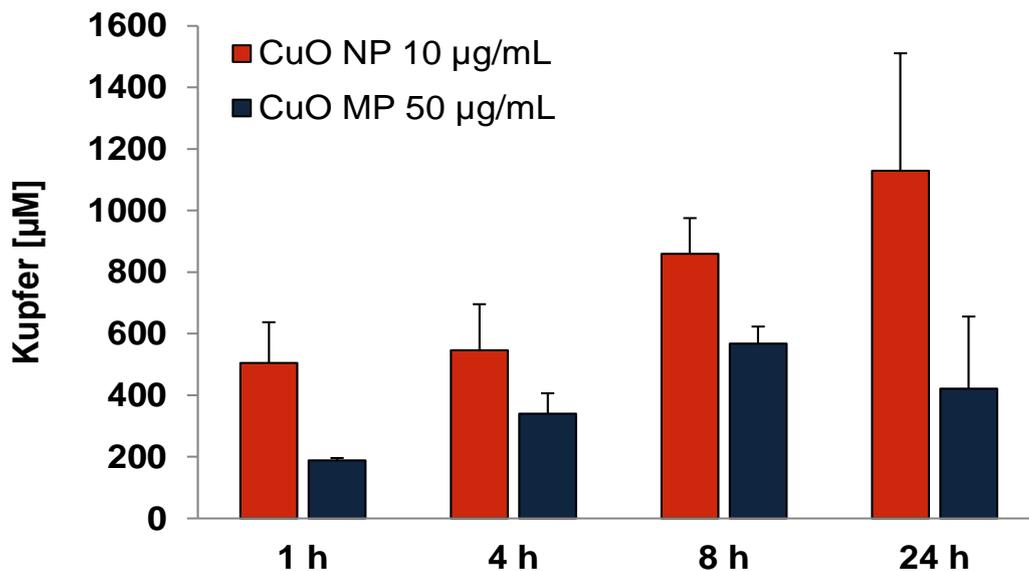


Abbildung 45 **Zeitabhängige zelluläre Aufnahme von Kupfer nach Behandlung mit CuO NP und CuO MP.** Der Kupfergehalt in der löslichen Fraktion der gesamten Zelle von BEAS-2B-Zellen wurde nach 1-, 4-, 8- und 24-stündiger Inkubation mit den Kupferverbindungen mittels GF-AAS bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte + R/2 aus zwei unabhängigen Versuchen.

8.6.6.4 Ergänzende Zellzyklus- und Zelltoduntersuchungen

Die weiterführenden Untersuchungen zur Zellzyklusphasenverteilung zeigten nach 24 h keinen Einfluss der Kupferverbindungen, nach 48 h aber eine Zunahme an Zellen in der S-Phase durch CuO NP und CuCl₂ (Abbildung 46).

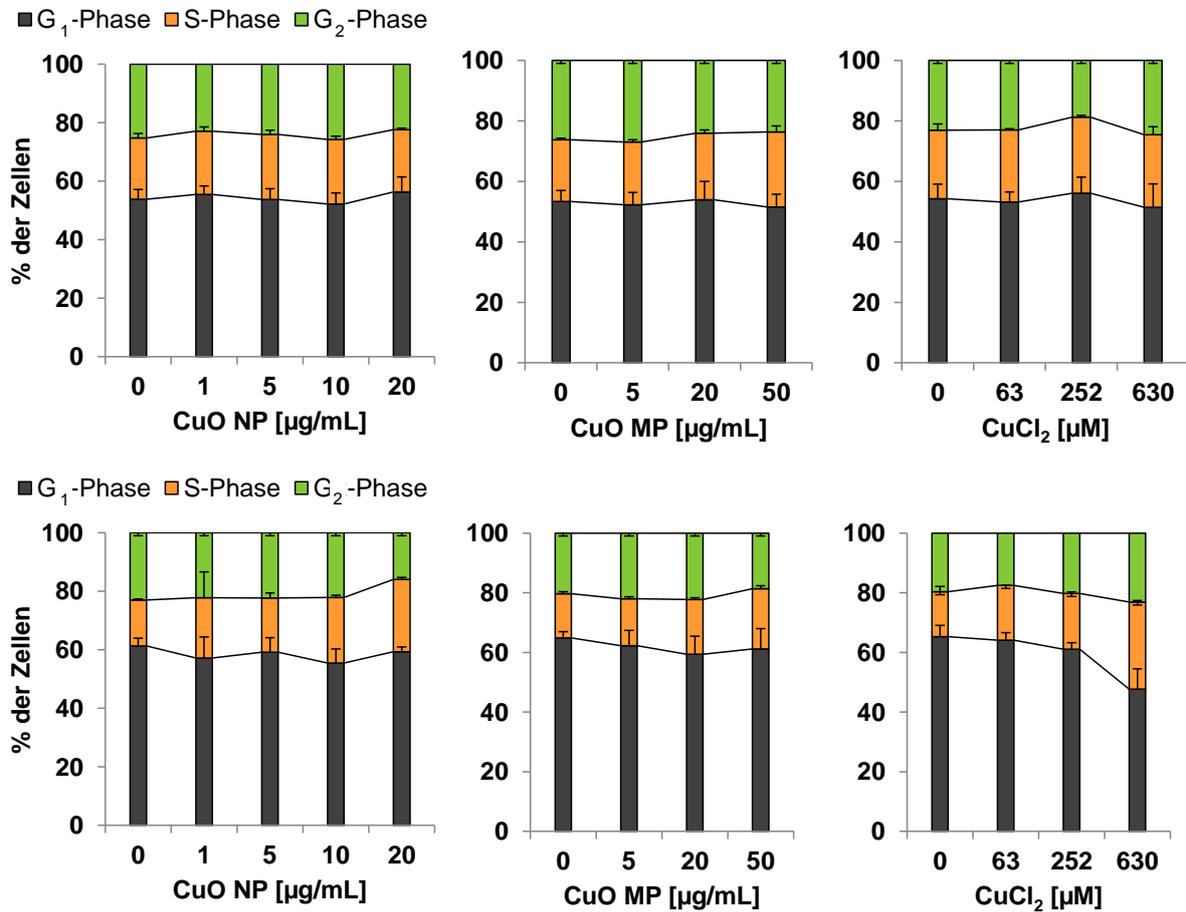


Abbildung 46 Einfluss von CuO NP, CuO MP und CuCl₂ auf die Zellzyklusphasenverteilung. BEAS-2B-Zellen wurden für 24 bzw. 48 h mit den Kupferverbindungen inkubiert, die Verteilung der Zellen in den Zellzyklusphasen wurde mittels DAPI-Färbung bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte + SD von vier Bestimmungen aus zwei unabhängigen Versuchen. 50 µg/mL CuO entsprechen 630 µM Cu²⁺ im Falle kompletter Kupferfreisetzung.

Nach 24 h erhöhte sich der Anteil an apoptotischen Zellen durch die Kupferverbindungen lediglich marginal, wohingegen vor allem CuO NP eine konzentrationsabhängige Zunahme nekrotischer Zellen über 10 % bewirkten (Abbildung 47).

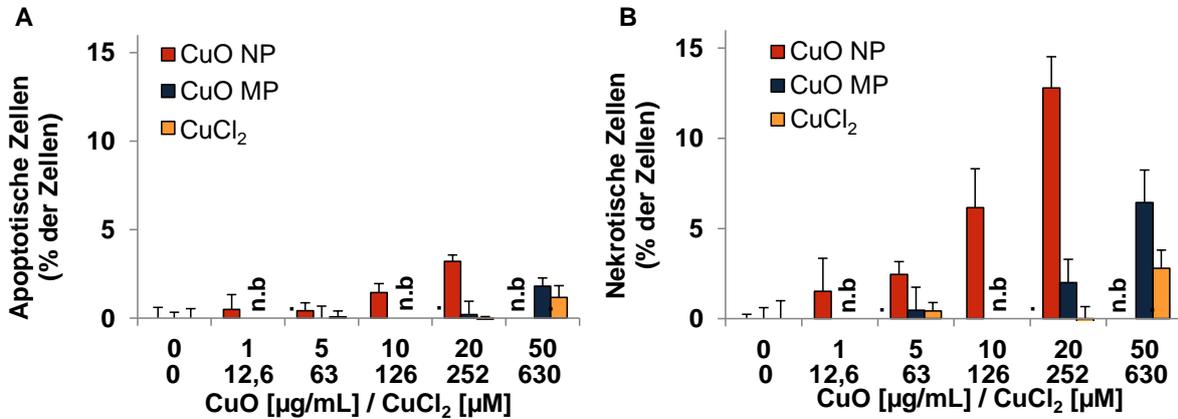


Abbildung 47 **Einfluss von CuO NP, CuO MP und CuCl₂ auf die Apoptose (A) und Nekrose (B).** BEAS-2B-Zellen wurden für 24 h mit den Kupferverbindungen inkubiert und der Anteil an apoptotischen und nekrotischen Zellen mittels Annexin V-FITC und PI-Färbung bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte + SD von vier Bestimmungen aus zwei unabhängigen Versuchen. 50 µg/mL CuO entsprechen 630 µM Cu²⁺ im Falle kompletter Kupferfreisetzung.

8.6.6.5 Ergänzende Untersuchungen mit Endozytoseinhibitoren und BafA1

Die verschiedenen Endozytoseinhibitoren sollten in nicht-zytotoxischen Konzentrationen eingesetzt werden. Anhand von Zellzahluntersuchungen nach acht Stunden wurden folgende Maximalkonzentrationen festgelegt: OH-Dyn 100 µM, EIPA 25 µM, CytB 10 µg/mL und MDC 100 µM. Durch diese kam es nicht zu Zellzahlen unter 80 %, auch nicht bei den Koinkubationen mit den Kupferverbindungen (Abbildung 48).

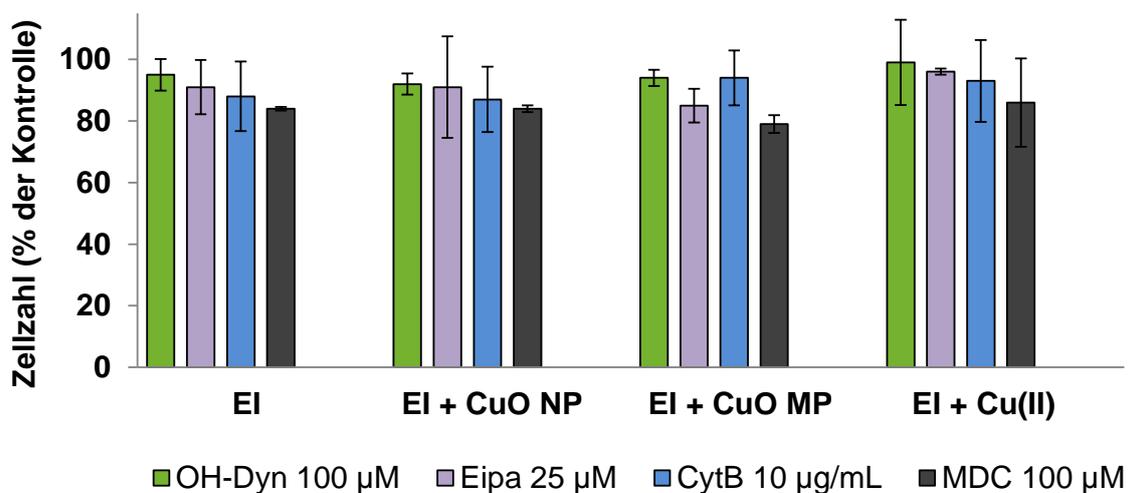


Abbildung 48 **Einfluss der Endozytoseinhibitoren in An- und Abwesenheit der Kupferverbindungen auf die Zellzahl.** BEAS-2B-Zellen wurden acht Stunden mit OH-Dyn, EIPA, CytB und MDC mit und ohne CuO NP, CuO MP und CuCl₂ inkubiert und gezählt. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SD von vier Bestimmungen aus zwei unabhängigen Versuchen.

Der intrazelluläre Kupfergehalt konnte 8 h nach Behandlung mit CuO NP durch die eingesetzten nicht-zytotoxischen Konzentrationen Eipa, CytB und MDC nicht verringert werden (Abbildung 49).

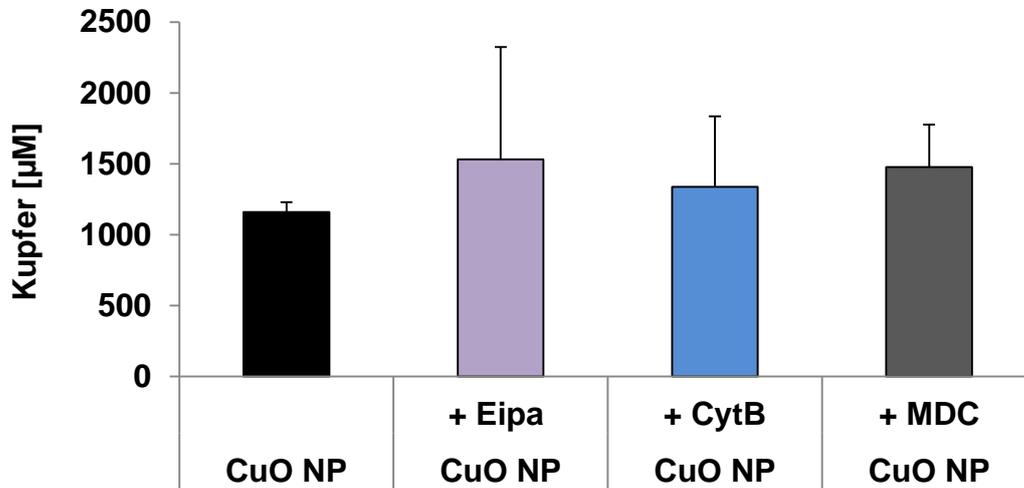


Abbildung 49 **Zelluläre Aufnahme von Kupfer in Abhängigkeit von Eipa, CytB oder MDC nach Behandlung mit CuO NP.** Der Kupfergehalt in der löslichen Fraktion von BEAS-2B-Zellen wurde nach 8-stündiger Inkubation mit CuO NP in An- und Abwesenheit von Eipa (25 μM), CytB (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) oder MDC (100 μM) mittels GF-AAS bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte + R/2 aus zwei unabhängigen Versuchen.

Konzentrationsabhängige Untersuchungen mit CuO NP und CuO MP zeigten für OH-Dyn eine relativ konstante inhibitorische Wirkung. Dabei verringerte sich der Kupfergehalt im Falle von CuO NP um 50-75 % und bei CuO MP um 70-80 % (Abbildung 50).

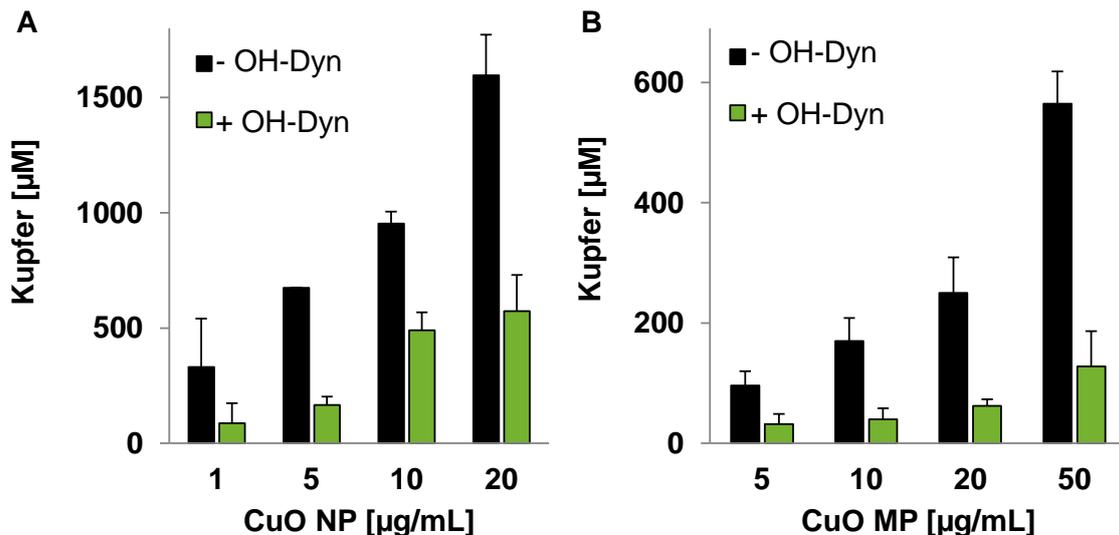


Abbildung 50 **Zelluläre Aufnahme von Kupfer in Abhängigkeit von OH-Dyn nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von CuO NP (A) oder CuO MP (B).** Der Kupfergehalt in der löslichen Fraktion von BEAS-2B-Zellen wurde nach 8-stündiger Inkubation mit CuO NP (1-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (A) oder CuO MP (5-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (B) in An- und Abwesenheit von OH-Dyn (100 μM) mittels GF-AAS bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte + R/2 aus zwei unabhängigen Versuchen.

In HeLa S3-Zellen verminderte sich der Kupfereintrag nach Inkubation mit CuO NP wie in BEAS-2B-Zellen am effektivsten durch OH-Dyn von ca. 1600 μM auf 1000 μM . Der durch CuO MP resultierende intrazelluläre Kupfergehalt verringerte sich in HeLa S3-Zellen am deutlichsten von über 1000 μM auf ca. 350 μM durch Eipa und nicht wie in BEAS-2B-Zellen durch OH-Dyn. Eipa konnte in dieser Ziellinie mit 50 μM jedoch in einer höheren Konzentration eingesetzt werden (Abbildung 51).

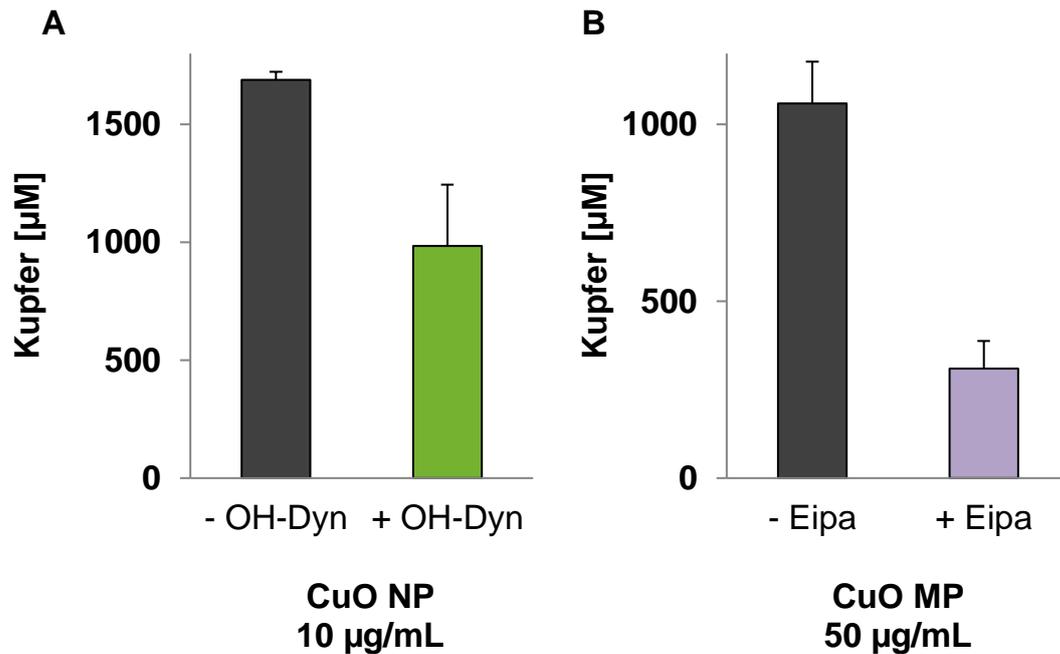


Abbildung 51 **Zelluläre Aufnahme von Kupfer in Abhängigkeit von OH-Dyn oder Eipa nach Behandlung mit CuO NP (A) oder CuO MP (B).** Der Kupfergehalt in der löslichen Fraktion von BEAS-2B-Zellen wurde nach 8-stündiger Inkubation mit CuO NP in An- und Abwesenheit von OH-Dyn (100 μM) oder mit CuO MP in An- und Abwesenheit von Eipa (50 μM) mittels GF-AAS bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte + R/2 aus zwei unabhängigen Versuchen.

Die pharmakologisch wirksame Substanz OH-Dyn beeinflusste die Genexpression der untersuchten Gene schon allein im Vergleich zur normalen Kontrolle (Abbildung 52).

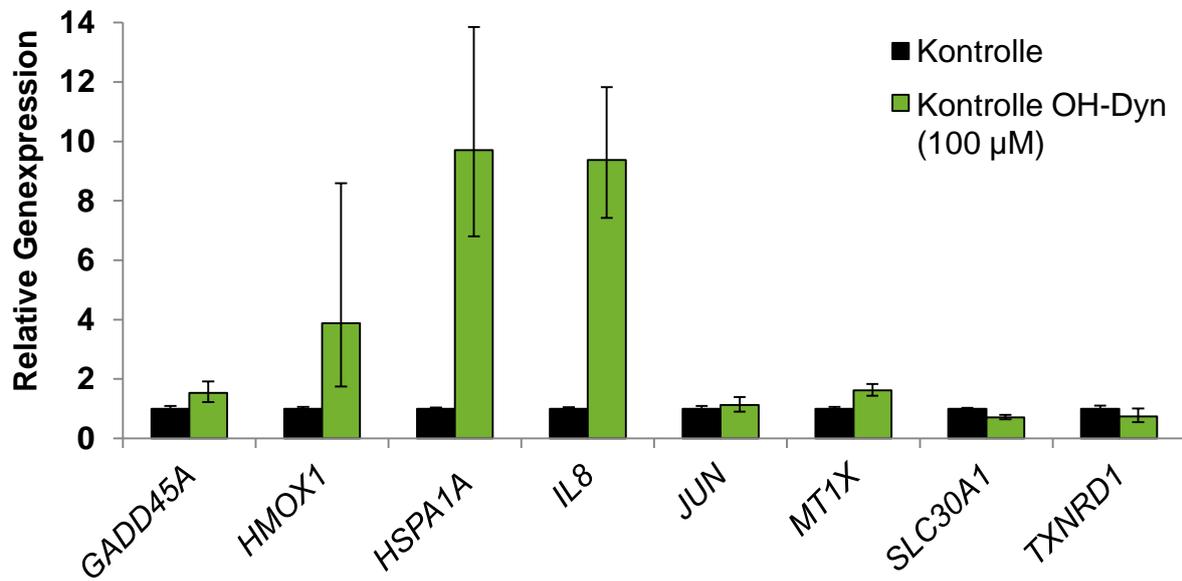


Abbildung 52 **Einfluss von OH-Dyn auf die Expression der Gene, deren Expression durch die Kupferverbindungen beeinflusst wurde, in Relation zur unbehandelten Kontrolle.** BEAS-2B-Zellen wurden mit OH-Dyn für 8 h inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD von vier Bestimmungen aus zwei unabhängigen Versuchen.

9. PUBLIKATIONSLISTE

Publikationen

- B.M. Fischer, D. Neumann, A.L. Piberger, S.F. Risnes, B. Köberle, A. Hartwig (2015) „*Use of high-throughput RT-qPCR to assess modulations of gene expression profiles related to genomic stability and interactions by cadmium*“ Archives of Toxicology 1-17 doi:10.1007/s00204-015-1621-7
- B.M. Fischer, A. Hartwig (2015) „*Toxikologische Bewertung auf Basis von Genexpressionsprofilen – Etablierung und Einsatz einer neuen high throughput RT-qPCR Technik*“ chrom+food FORUM (9): 5-6
- C.T. Krüger, B.M. Fischer, O. Armant, V. Morath, U. Strähle, A. Hartwig (2016) „*The in vitro PIG-A gene mutation assay: glycosylphosphatidylinositol (GPI)-related genotype to phenotype relationship in TK6 cells*“ Archives of Toxicology 1-8 doi:10.1007/s00204-016-1707-x

Publikationen in Vorbereitung

- B.M. Fischer, R.K. Schilling, N.L. Winkelbeiner, A. Hartwig „*Impact of copper oxide nanoparticles on gene expression involved in maintaining genomic stability and related cellular processes: a comparison between nano- and micrometer size and copper ions*“
- B.M. Fischer, W. Hubele, A. Hartwig „*Impact of endocytosis and lysosomal acidification on mechanistic toxicity of copper oxide nanoparticles: modulation of gene expression related to genomic stability and cellular uptake*“
- B. Köberle*, B.Koch, B.M. Fischer, A. Hartwig “*Single Nucleotide Polymorphisms in DNA repair genes and putative cancer risk*“

Vorträge auf Fachtagungen

- 44. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Karlsruhe 14.-16. September 2015
Lebensmittelchemische Gesellschaft, Fachgruppe der GDCh
„Bedeutung der zellulären Kupferhomöostase für das toxische Potential von Kupferoxid-Nanopartikeln“
B.M. Fischer, A. Semisch, N. Winkelbeiner, W. Hubele, A. Hartwig
- 3. Workshop der Gesellschaft für Umweltmutationsforschung, Potsdam 7. Juli 2015
Gesellschaft für Umweltmutationsforschung (GUM)
“Impact of nanoscale CuO particles on genomic stability and stress response in comparison to microscale CuO particles and water-soluble CuCl₂”
B.M. Fischer, N. Winkelbeiner, W. Hubele, A. Hartwig
- 28. Tagung der Gesellschaft für Umweltmutationsforschung, Düsseldorf 4.-6. März 2015
Gesellschaft für Umweltmutationsforschung (GUM)
„Erstellung von Genexpressionsprofilen zur Aufklärung der Wirkmechanismen von chemischen Kanzerogenen“
B.M. Fischer, R. Schilling, A. Hartwig
- 43. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Gießen 22.-24. September 2014
Lebensmittelchemische Gesellschaft, Fachgruppe der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh)
„Einsatz von Genexpressionsprofilen zur Identifizierung der Wirkmechanismen von Cadmium“
B.M. Fischer, A. Hartwig
- 13th Biennial Meeting of the German Society for DNA repair, Mainz 8.-12. September 2014
Deutsche Gesellschaft für DNA-Reparaturforschung (DGDR)
„Modulation of cellular signaling pathways involved in genomic stability by nanoscale CuO particles in comparison to microscale CuO particles and water-soluble CuCl₂”
B.M. Fischer, A. Hartwig

Poster auf Fachtagungen

- ToxNet-BW Symposium 2012, Karlsruhe 23. November 2012
BWTOX.NET – Toxikologie-Netzwerk Baden-Württemberg
“Impact of tumor suppressor protein p53 on Indole-3-Carbinol-induced gene expression”
B.M. Fischer, D. Neumann, A. Hartwig

Preise und Auszeichnungen

- Vortragspreis des 3. Workshops der Gesellschaft für Umweltmutationsforschung, Potsdam 7. Juli 2015
Gesellschaft für Umweltmutationsforschung (GUM)
“Impact of nanoscale CuO particles on genomic stability and stress response in comparison to microscale CuO particles and water-soluble CuCl₂”
B.M. Fischer, N. Winkelbeiner, W. Hubele, A. Hartwig
- Stipendium der Landesgraduiertenförderung Baden-Württemberg (LGF), Karlsruhe
1. Januar 2013 - 31. Dezember 2014
- Procter & Gamble Förderpreis für hervorragende Studienleistungen 2012/2013,
Karlsruhe 13. Juli 2013