

Lehrstuhl für Hydrogeologie, Hydrochemie und Umweltanalytik der TU München,  
Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie  
und GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, Neuherberg,  
Arbeitsgruppe Durchflusszytometrie

**Biochemische und physiologische Reaktionen von  
inflammatorischen Zellen auf feine/ultrafeine Teilchen**

**Thomas Meindl**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen  
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. R. Nießner  
2. apl. Prof. Dr. J. Heyder,  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 06.02.2003 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 15.05.2003 angenommen.

<b>I. Einleitung und Zielsetzung</b>	<b>4</b>
1. Einleitung	4
2. Zielsetzung	9
<b>II. Theoretische Grundlagen</b>	<b>11</b>
1. Partikel	11
1.1. Partikelarten	11
1.2. Partikelgröße	11
1.3. Herkunft, Lebensdauer und Konzentration von Partikel in der Atemluft	12
2. Wirkungen von partikulären Noxen auf den Organismus	14
2.1. Deposition von Partikel im Organismus	14
2.2. Untersuchungen der Wirksamkeit von partikulären Noxen auf zellulärer Ebene	15
2.2.1. Bindung und Aufnahme von Partikel	15
2.2.2. Intrazellulärer Calciumgehalt	20
2.2.3. Respiratory Burst	23
2.2.4. Apoptose	25
2.2.5. Mitochondrien-Membranpotential	29
2.2.6. Prostaglandin E <sub>2</sub>	31
<b>III. Methodische Grundlagen</b>	<b>34</b>
1. Fluoreszenzmessungen	34
1.1. Prinzip der Fluoreszenz	34
1.2. Fluoreszenzfarbstoffe	35
1.2.1. Calciummessung mit der Indo-1-AM-Methode	35
1.2.2. Populationsanalyse mit Indo-1-AM/SSC	37
1.2.3. Nachweis des Respiratory Burst mit DHR123 und DCFH	38
1.2.4. Messung apoptotischer Zellen mit der Annexin-V-Fluos-Technik	39
1.2.5. Messung des Mitochondrien-Membranpotentials mit JC-1	41
1.3. Durchflusszytometrie	43
1.3.1. Prinzip der Durchflusszytometrie	43
1.3.2. Aufbau und Funktionsweise eines Durchflusszytometers	44
1.4. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)	49
2. Lipidmediatoren-Messung	51
2.1. Grundlagen der immunologischen Methoden	51
2.2. Wirkungsprinzip des verwendeten Enzym-Immunoassays zur Detektion von Prostaglandin E <sub>2</sub>	52
3. Zellmodelle	54
3.1. Jurkat-Zellen	54
3.2. J774.A1-Zelllinie	55
3.3. Humane Leukozyten	55
4. Verwendete Partikel	57
4.1. TiO <sub>2</sub> -Partikel	57
4.2. EC-Partikel	58
4.3. Printex-Partikel	58
4.4. Standard Reference Material 1650 (Dieselstaub)	58
4.5. Staphylococcus aureus	59
5. Verwendete Stimulantien	59
5.1. TBT	59
5.2. fMLP	60
5.3. Thapsigargin	60

<b>IV. Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>62</b>
<b>1. Entwicklung und Optimierung von Methoden</b>	<b>62</b>
1.1. Zellkultur	62
1.1.1. Kultivierung und Verwendung der J774.A1-Zelllinie	62
1.1.2. Kultivierung und Verwendung von humanen Leukozyten	65
1.1.3. Diskussion der Zellmodelle und Schlussfolgerung	67
1.2. Analysetechniken	68
1.2.1. Vergleich von durchflusszytometrischen Populationsanalysemethoden	68
1.2.2. Mitochondrien-Membranpotential-Messung mit JC-1	69
<b>2. Charakterisierung partikulärer Noxen</b>	<b>78</b>
2.1. Lichtmikroskopische Aufnahmen der Teilchenagglomerate	78
2.2. Eigenfluoreszenz der Partikel und Reaktion der verwendeten Farbstoffe mit Teilchen	79
2.3. Analyse der Volumenspektren der Teilchenagglomerate	79
<b>3. Phagozytose</b>	<b>89</b>
<b>4. Modulation zellphysiologischer Parameter durch Partikel     und Stimulantien</b>	<b>90</b>
4.1. Modulation der plasmatischen Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ in Leukozyten	90
4.1.1. Modulation von $[Ca^{2+}]_i$ durch fMLP und Thapsigargin	91
4.1.2. Modulation von $[Ca^{2+}]_i$ durch Partikel und Thapsigargin	94
4.2. Respiratory Burst in Granulozyten und Monozyten	103
4.2.1. Stimulation des Respiratory Burst durch fMLP	104
4.2.2. Modulation des Respiratory Burst durch verschiedene Partikelarten	105
4.3. Apoptose in inflammatorischen Zellen	108
4.3.1. Apoptose ohne Einwirkung von Modulatoren	109
4.3.2. Modulation der Apoptoserate durch verschiedene Partikelarten	110
4.4. Freisetzung von Prostaglandin $E_2$ in Granulozyten	116
<b>5. Wirkung von SRM-Partikel: Adsorption von Farbstoffen und Synergismus     mit Stimulantien</b>	<b>120</b>
5.1. Adsorption von JC-1 an SRM-Partikel	121
5.1.1. Untersuchungen der Adsorption von JC-1 an SRM-Partikel im Fluoreszenzspektrometer	121
5.1.2. Untersuchungen der Beladungskinetiken von JC-1 in Leukozyten im Durchflusszytometer	124
5.2. Direkte Wirkung von SRM-Partikel auf mit JC-1 gefärbte Zellen	128
5.3. Einfluss von SRM-Partikel auf die Wirkung von Stimulantien	135
<b>6. Allgemeine Diskussion</b>	<b>139</b>
6.1. Übersicht der untersuchten Parameter und ihre gegenseitige Beeinflussung	139
6.2. Wirkung der untersuchten Partikel in Abhängigkeit von Oberfläche und Oberflächenbeladung	143
6.3. Bezug der in-vitro-Reaktionen von Partikel zu systemischen Wirkungen	148
<b>V. Zusammenfassung</b>	<b>150</b>
<b>VI. Ausblick</b>	<b>155</b>

<b>VII. Experimenteller Teil</b>	<b>157</b>
<b>1. Material</b>	<b>157</b>
1.1. Reagenzien	157
1.2. Medien und Lösungen	158
1.3. Verbrauchsmaterialien	158
1.4. Partikel	159
1.5. Geräte	159
<b>2. Zellkultur</b>	<b>160</b>
2.1. Vitalitätstest	160
2.2. Jurkat-Zellen	160
2.3. J774.A1-Zelllinie	160
2.4. Leukozytenisolation aus Vollblut	161
2.5. Filtration und Lagerung der Zellen für die Verwendung im Durchflusszytometer	162
<b>3. Partikel und Stimulantien</b>	<b>162</b>
3.1. Partikel	162
3.1.1. Präparation der Partikel	163
3.1.2. Konzentration und Expositionszeiten der Partikel	163
3.2. Stimulantien	164
3.2.1. TBT	164
3.2.2. fMLP	164
3.2.3. Thapsigargin	164
<b>4. Fluoreszenzfärbungen</b>	<b>164</b>
4.1. Arbeitsprotokoll zur Indo-1-AM-Methode	164
4.2. Arbeitsprotokoll für die Färbung mit DHR123	165
4.3. Arbeitsprotokoll für den Phagozytosenachweis mit FcOxyBurst™	166
4.4. Arbeitsprotokoll zum Annexin-V-Fluos-Assay	166
4.5. Arbeitsprotokoll für die JC-1-Färbemethode	167
<b>5. Nachweis von PGE<sub>2</sub></b>	<b>167</b>
5.1. Vorbereitung der Zellen	167
5.2. Durchführung des Enzym-Immunoassays	168
5.3. Auswertung der ermittelten Daten	169
<b>6. Geräte</b>	<b>169</b>
6.1. Durchflusszytometrie	169
6.2. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	172
6.3. Spektrofluorometrie	172
<b>7. Statistik</b>	<b>172</b>
<b>VIII. Abkürzungen</b>	<b>173</b>
<b>IX. Literatur</b>	<b>175</b>
<b>Danksagung</b>	



### I. Einleitung und Zielsetzung

#### 1. Einleitung

Im Jahre 1307 ließ König Edward I. von England in einem Erlass verkünden, dass die Verbrennung von „carbone marino“, einer an der englischen Küste gewonnenen, qualitativ minderwertigen Braunkohlenart, aufgrund der durch diese Kohle verursachten hohen Rauch- und Geruchsbelästigung im Raum London bei Leibesstrafe verboten sei [1]. Die Luftverschmutzung durch den Menschen ist also kein so modernes Problem, wie man auf den ersten Blick vermuten könnte. Jedoch erfolgte erst ab dem Eintritt in das Industriezeitalter ein großflächiger Anstieg der anthropogenen Schadstoffbelastung der Luft. Diese Luftverschmutzung nahm in Ballungszentren teilweise dramatische Ausmaße an und führte zu so katastrophalen Episoden wie der in London im Dezember 1952 [2]. In der Folge wurden, wie zum Beispiel im Clean Air Act in England (1956), nationale Grenzwerte festgelegt, um die Belastung durch Luftschadstoffe einzudämmen. Seit den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts wurde eine Abnahme der anthropogenen Partikelemission in den Industrienationen verzeichnet [3], was vor allem verbesserten Verbrennungs- und effizienteren Filtertechniken zuzuschreiben ist. So hat z.B. die Emission von Schwebstaub in Deutschland in den Jahren von 1990 bis 1994 von 2,02 Millionen Tonnen auf 755 Tausend Tonnen abgenommen [3]. Allerdings wird, der aktuellen Gesetzgebung entsprechend, gerade im Bereich der Motorentechnik mehr an einer Reduzierung der Gesamtmasse, als an der Verringerung der Gesamtanzahl der ausgestoßenen Partikel gearbeitet. Das heißt, dass durch eine Optimierung der im Motor ablaufenden Verbrennungsprozesse eine Ausstoßreduzierung durch Verkleinerung der Durchmesser der erzeugten Partikel erreicht wird. Die Anzahl der Partikel wird aber nicht verringert, sondern es kann im Gegenteil zu einem Anstieg des Prozentsatzes der Partikel in den Teilchenfraktionen kommen, die aufgrund ihrer geringeren Größe mit höherer Wahrscheinlichkeit bis in den alveolaren Bereich der Lunge vordringen können.

Epidemiologische und tierexperimentelle Studien belegen Zusammenhänge zwischen Partikel und der Auslösung von inflammatorischen Reaktionen im Körper. Einige Arbeiten der letzten Jahre weisen auf eine besondere Wirksamkeit von ultrafeinen Teilchen hin.

## I. Einleitung und Zielsetzung

---

Im Folgenden sollen epidemiologische Arbeiten aufgeführt werden, die eine Schadenswirkung von partikulären Noxen dokumentieren.

In der Epidemiologie werden Kurzeffekte, die akute Folgen nach einer zeitlich eng begrenzten Exposition mit hohen Konzentrationen von Partikel darstellen, und Langzeiteffekte, die sich bei dauerhaften Belastungen mit Umweltteilchen zeigen, unterschieden.

Kurzeffekte treten nach Episoden mit besonders hohen Partikelbelastungen, wie sie bei dem bereits erwähnten Vorfall 1952 in London [2] oder auch 1930 im belgischen Maastal [4, 5] aufgetreten sind, insbesondere in Form von deutlich erhöhten akuten Mortalitäts- und Morbiditätsraten zu Tage.

Auch aus arbeitsmedizinischen Untersuchungen sind Krankheitsbilder bekannt, bei denen sich akute Symptome zeigen. Als Beispiel sei hier das Polymerenrauchfieber genannt, das nach Exposition mit hohen Konzentrationen von Polytetrafluorethylenrauch auftreten kann [6].

Selbst bei einem Anstieg der  $PM_{10}$ -Konzentrationen um  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  im Tagesmittel konnte ein kurzzeitiger Anstieg der Mortalität von bis zu 1,6 % nachgewiesen werden [7, 8]. Eine Steigerung der Morbidität nach erhöhten  $PM_{10}$ -Konzentrationen wurde anhand von Krankenhaus-einweisungen wegen Atemwegserkrankungen erfasst [9, 10]. Hier fand man vor allem bei älteren Patienten und Personen, die bereits an Atemwegssymptomen litten, ein erhöhtes Risiko [11]. Zudem konnte ein Anstieg der Teilchenkonzentration mit einem gesteigerten Auftreten von Herzkreislauferkrankungen korreliert werden [12, 13].

In einer prospektiven Langzeitstudie wurden in den Jahren 1974 – 1991 8111 Erwachsene in sechs amerikanischen Städten untersucht [14]. Hierbei zeigte sich, dass zwischen der am wenigsten belasteten Stadt (Portage mit einem  $PM_{10}$ -Jahresmittel von  $18 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) und der Stadt mit der höchsten  $PM_{10}$ -Konzentration (Steubenville mit einem  $PM_{10}$ -Mittelwert von  $46 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) ein Gesamt-Mortalitätsunterschied von 26 % zu verzeichnen war.

Auch hier scheint die Zunahme der Todesfälle, die auf Pneumonie und COPD (Chronic obstructive pulmonary disease) zurückzuführen sind, besonders bei älteren Personen (über 65 Jahre) deutlich zu Tage zu treten. COPD ist ein Krankheitsbild, das chronische Bronchitis bei gleichzeitigen emphysematischen Veränderungen beinhaltet. (Unter Emphysema versteht man den vermehrten Luftgehalt in Geweben. In der Lunge kann es in den Alveolen auftreten, wenn aufgrund einer Bronchialverengung der expiratorische Strömungswiderstand zunimmt.

Diese Überlastung kann zur Verödung von Lungenkapillaren und damit zu einer nachhaltigen Störung des Gasaustausches in der Lunge führen.)

## I. Einleitung und Zielsetzung

---

In einigen Arbeiten wurden auch die Auswirkungen der  $PM_{2,5}$ -Teilchenfraktion berücksichtigt [11, 15] und eine besonders hohe Korrelation mit der Mortalitätsrate nachgewiesen. So beobachteten Pope et al. im Jahre 1995 eine Mortalitätszunahme von 17 % bei einer  $PM_{2,5}$ -Erhöhung von  $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ .

Im Bezug auf die Morbidität konnten in Gebieten mit erhöhter Schadstoffbelastung ein Anstieg von Bronchitis [16] und Atemwegsinfekten [17] festgestellt werden. In einer in der Schweiz angefertigten Studie über den Zusammenhang zwischen Luftverschmutzung und Atemwegserkrankungen bei Erwachsenen (SAPALDIA) wurde bei Nicht-Rauchern eine durchschnittliche Zunahme von Atemwegbeschwerden, um 41 % für Atemnot ohne Anstrengung und um 31 % für Husten und Auswurf, bei einer Erhöhung der  $PM_{10}$ -Konzentration um  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  im Jahresmittel [18], festgestellt. In der gleichen Studie konnte auch gezeigt werden, dass sich die Tage ohne Bronchitis-Symptome um durchschnittlich 19 % verringerten [19].

Für ultrafeine Teilchen gibt es wenig Anhaltspunkte bezüglich ihrer Auswirkung auf die Morbidität. Peters et al. [20] konnten bei erwachsenen Asthmatikern im Raum Erfurt feststellen, dass der Abfall des sog. Peakflows (bei der Peakflow-Untersuchung wird der maximale Atemstoß [l/sec] gemessen) besser mit der Anzahlkonzentration der ultrafeinen Teilchen als mit der Masse der feinen Partikel korreliert.

Generelle Probleme der epidemiologischen Studien sind die Spezifizierung der einwirkenden Noxen und die Schaffung von international gültigen Standards, die einen Vergleich der Untersuchungen untereinander erlauben.

Mit der Definition der  $PM_{10}$ -Teilchenfraktion hat die „Environmental Protection Agency“ (EPA) 1987 erstmals ein Standardmaß geschaffen, das der Wahrscheinlichkeit des Eindringens einer Teilchennoxen in den Bronchoalveolartrakt teilweise Rechnung trägt.

Dieser Standardwert ist jedoch auf geometrische Abmessungen beschränkt und nicht ausgelegt, die variierende Zusammensetzung von unterschiedlichen  $PM_{10}$ -Stäuben zu berücksichtigen.

Auch Wechselwirkungen, die zwischen verschiedenen  $PM_{10}$ -Bestandteilen entstehen können, werden nicht berücksichtigt. Daher ist der Vergleich von Ergebnissen einzelner Studien kritisch zu bewerten. Sie unterscheiden sich oft sowohl in Anzahl und Art der untersuchten Luftbestandteile, als auch in deren Einwirkdauer.

## I. Einleitung und Zielsetzung

---

Die Epidemiologie kann Hinweise auf die generellen Wirkungen von komplexen Umweltnoxen geben und leistet einen notwendigen Beitrag zur Festlegung von Grenzwerten. Zum genaueren Verständnis der zugrundeliegenden Wirkmechanismen sind jedoch zusätzlich experimentelle Untersuchungen erforderlich, wie sie im Folgenden beschrieben werden sollen und auch Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind.

Die experimentellen Untersuchungen können in zwei Hauptkategorien aufgeteilt werden: Expositionsexperimente, bei denen Probanden oder Tiere bestimmten vordefinierten Partikelbelastungen ausgesetzt werden und *in-vitro*-Experimente, die sich mit der Untersuchung der Reaktionen von Zellen auf partikuläre Noxen beschäftigen.

Bisher gibt es nur wenige Daten aus Expositionsversuchen an Menschen. Im Jahre 1991 wurden von Utell und Kollegen Expositionsstudien mit sauren Aerosolen an gesunden Probanden und an Asthmatikern durchgeführt [21, 22], die aber keine einheitlichen Ergebnisse lieferten. Ghio und Mitarbeiter [23] setzten gesunde Erwachsene einer Atmosphäre mit aufkonzentrierten Umgebungspartikel aus. Sie fanden als Ergebnis, dass unmittelbar nach der Exposition keine pulmonalen Symptome verzeichnet werden konnten. Allerdings konnte 18 Stunden nach der Behandlung ein verstärkter Einstrom von neutrophilen Granulozyten in die Lunge festgestellt werden.

Die meisten Daten aus kontrollierten Expositionsversuchen stammen aus Tierexperimenten. Tierexperimentelle Expositionsstudien können auf zwei Arten vorgenommen werden: Die Tiere werden entweder in Expositions-kammern gut definierten Partikelatmosphären ausgesetzt und nehmen so die Partikel über die Atemwege auf oder die Teilchen werden in wässriger Suspension intratracheal instilliert.

Eine Reihe von Arbeiten belegt eine inflammatorische Wirkung von feinen Teilchen. Stellvertretend seien hier einige Arbeiten genannt. So wiesen z.B. in einer Arbeit aus dem Jahre 1984 Bowden und Adamson [24] die Ausbildung von Lungenfibrose in Mäusen nach, nachdem den Tieren 2 mg Quarzstaub (Partikel-Durchmesser: 300 nm) in die Lungen instilliert worden war. Beim Krankheitsbild der Fibrose kommt es zu einem verstärktem Einstrom von neutrophilen Granulozyten in die Lunge und zu einem chronisch entzündlichen Prozess, der mit starken Gewebeschädigungen und Funktionseinschränkungen des Atmungsorgans einhergeht.

## I. Einleitung und Zielsetzung

---

Eine weitere Wirkung von Quarzstäuben stellten Antonini et al. [25] in Ratten fest. Es zeigte sich, dass die Lungen der Tiere eine erhöhte Clearance-Rate im Bezug auf instillierte Bakterien aufwiesen, nachdem die Tiere über längere Zeit Quarzstäuben ausgesetzt waren. Die Erhöhung der Clearance-Rate war korreliert mit der Dauer der Exposition. Weitere wichtige Ergebnisse über synergistische und inflammatorische Wirkungen von feinen Partikel lieferten die Studien von Godleski et al. [26]. Sie zeigten, dass Ratten, die bereits an Bronchitis oder Lungenentzündung litten, ein erhöhtes Mortalitätsrisiko aufwiesen, wenn sie über drei Tage einer Atmosphäre von aufkonzentrierter Außenluft (Partikelkonzentration: 230 bis 290  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) ausgesetzt waren. In weiteren Untersuchungen mit Asbest-Fasern, Quarzstäuben und Flugaschestäuben ergeben sich Hinweise auf eine inflammatorische Wirkung dieser Partikelarten [27, 28, 29].

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Arbeiten veröffentlicht, die eine besondere inflammatorische Wirkung von ultrafeinen Teilchen postulieren.

Besonders erwähnenswert sind hier einige tierexperimentelle Studien von Oberdörster und Kollegen, die auf eine besondere Toxizität von ultrafeinen Teilchen hinweisen. So zeigte sich z.B. in einem mehrwöchigen Expositionsversuch an Ratten mit feinen (Durchmesser: 250 nm, Konzentration: 22,3  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) und ultrafeinen  $\text{TiO}_2$ -Partikel (Durchmesser: 20 nm, Konzentration: 23,5  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ), dass die ultrafeinen Teilchen eine deutlichere inflammatorische Reaktion als die feinen Teilchen auslösten [30]. Besonders gravierend fielen die Ergebnisse einer Expositionsreihe aus, bei der Ratten nur kurzzeitig (20-30 min) einer Atmosphäre mit ultrafeinen Teflonteilchen (Durchmesser: 26 nm, Anzahlkonzentration:  $0,7 - 1,0 \times 10^6$  Partikel pro  $\text{m}^3$ ) ausgesetzt waren. Innerhalb von vier Stunden starben alle Tiere an Lungenödemem und Herzversagen.

Diese Symptome wurden von einem massiven Einstrom von neutrophilen Granulozyten in die Lunge begleitet. Neuere Analysen dieser Beobachtungen liefern als Ursache für diese drastischen Wirkungen die Bildung von Flusssäure auf den Teflonteilchenoberflächen [31]. Dies ist ein wichtiger Hinweis darauf, dass neben der Teilchengröße auch die chemische Oberflächenbeladung ein ausschlaggebender Faktor für die inflammatorische Wirkung der Teilchen sein kann.

## **I. Einleitung und Zielsetzung**

---

Untersuchungen mit ultrafeinen  $\text{CuCO}_2$ -Teilchen an Hamstern [33] bzw. mit ultrafeinen Kohlenstoffteilchen an Meerschweinchen [34] untermauern die Aussage über eine signifikante inflammatorische Wirkung von ultrafeinen Teilchen. Diese Arbeiten unterstützen die These, dass weniger die Masse der Teilchen für eine inflammatorische Wirkung ausschlaggebend ist, sondern vielmehr deren Oberfläche. Auch wegen der Ergebnisse dieser Studien sollen in der vorliegenden Arbeit die Wirkungen von ultrafeinen Teilchen näher untersucht werden. Über die zugrundeliegenden molekularen und zellulären Mechanismen ist bisher wenig bekannt.

### **2. Zielsetzung**

Die in der Einleitung beschriebenen epidemiologischen und tierexperimentellen Studien belegen Zusammenhänge zwischen Partikeln und der Auslösung von inflammatorischen Reaktionen im Körper. Über die zugrundeliegenden molekularen und zellulären Mechanismen ist bisher wenig bekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die Reaktionen von relevanten Abwehrzellen auf partikuläre Noxen in unterschiedlichen physiologischen Ebenen zu analysieren.

In der vorliegenden Arbeit sollten die Signaltransduktion im Rahmen einer inflammatorischen Response auf partikuläre Noxen (Erzeugung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten, Freisetzung von Prostaglandin  $\text{E}_2$ ), die mitochondrielle Integrität (mitochondrielles Membranpotential) und, mit dem Respiratory Burst und der Apoptose, funktionelle Endpunkte der Inflammation (während und nach der Exposition) mit partikulären Noxen gemessen werden.

Als Zellmodell wurden aus peripherem Blut isolierte humane Leukozyten herangezogen. Für die Untersuchungen waren die Monozyten als Vorläuferzellen der Makrophagen und neutrophile Granulozyten von besonderem Interesse. Beide Zellarten sind Zellen der unspezifischen Immunabwehr.

Makrophagen sind als Alveolarmakrophagen ständig in der Lunge präsent und halten durch Phagozytose und Respiratory Burst den Alveolarraum steril. Des Weiteren steuern sie durch die Ausschüttung von proinflammatorischen bzw. regulatorischen Metaboliten inflammatorische Prozesse und beseitigen durch Phagozytose apoptotische inflammatorische Zellen, die bei akut entzündlichen Reaktionen zahlreich im Gewebe vorhanden sein können.

## I. Einleitung und Zielsetzung

---

Neutrophile Granulozyten treten bei etablierten Entzündungsprozessen auf und verfügen über ein großes Spektrum von zytotoxischen Substanzen (Oxidantien und Proteasen), die auch körpereigenes Gewebe schädigen können (z.B. emphysematische Veränderungen).

Als dritte Zellfraktion wurden Lymphozyten mit in die Untersuchungen aufgenommen. Diese Zellen der spezifischen Abwehr sind nicht an der Beseitigung der eingedrungenen Staubpartikel beteiligt. Sie können jedoch potentiell durch Teilchen beeinflusst und in ihrer Funktion gestört werden.

Um unterschiedlichen Fragestellungen gerecht zu werden, sollte eine Auswahl von verschiedenartigen Teilchen untersucht werden.

Als chemisch inerte Modellpartikel wurden feine und ultrafeine  $\text{TiO}_2$ -Partikel verwendet. Durch die Nutzung von zwei unterschiedlichen Größenfraktionen des gleichen Materials sollte insbesondere die Rolle der Oberfläche bei der biologischen Wirkung von ultrafeinen Teilchen erforscht werden. Als umweltrelevante Partikel wurden folgende Teilchensorten verwendet: a) Elementarer ultrafeiner Kohlenstoff (EC90), b) Printex 90 (P90), ein ultrafeiner Kohlenstoff, der als Toner in Laserdruckern verwendet wird und c) SRM 1650, ein Dieselruß, der unter Standardbedingungen am National Institute of Standards and Technology, USA, hergestellt und charakterisiert wurde. Mit dieser Auswahl von Teilchen sollte ein Bogen gespannt werden von einfach gebauten, chemisch weitgehend inerten Teilchen, mit denen die exklusive Partikelwirkung erforscht werden sollte, bis hin zu komplex zusammengesetzten Rußpartikel, durch deren Verwendung Aufschlüsse über die Auswirkung von Beladungen auf der Partikeloberfläche gewonnen werden sollten.

Zusätzlich zu diesen abiotischen Partikel wurde das inaktivierte Bakterium *Staphylococcus aureus* als biotisches Kontrollpartikel mit in die Untersuchungen aufgenommen.

Die Untersuchungen erfolgten im Rahmen des Querschnittsthemas „Mechanismen der Stressreaktionen“ am Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit (GSF) und sollen einen Beitrag zur Abschätzung des von Umweltpartikel ausgehenden Gefahrenpotentials leisten.

## II. Theoretische Grundlagen

### 1. Partikel

#### 1.1. Partikelarten

Die in der vorliegenden Arbeit synonym verwendeten Begriffe „Partikel“ und „Teilchen“ beinhalten eine große Bandbreite verschiedener Luftbestandteile, die in fester oder flüssiger Form vorliegen und einen Durchmesser von 1 nm bis zu 100 µm aufweisen können. Die Gesamtheit von Partikeln und der Gase, in denen sie suspendiert sind, wird als Aerosol bezeichnet. Flüssigkeitströpfchen in Nebeln werden als flüssige Partikel definiert.

Durch die Reaktion von Gasen wie Ammoniak ( $\text{NH}_3$ ), Schwefeldioxid ( $\text{SO}_2$ ) oder Stickoxiden ( $\text{NO}_x$ ) zu Säuren oder Salzen entstehen sogenannte sekundäre Partikel.

Natürlich kommen neben anorganischen Materialien, wie sie z.B. aus Bodenerosion, Vulkanausbrüchen und Bränden resultieren, auch biogene Teilchen vor.

Beispiele hierfür sind Pollen, Pilzsporen und Bakterien. Diese natürliche Teilchenpalette wurde durch die Nutzung von fossilen Brennstoffen und die Einführung neuer Fertigungsmethoden durch den Menschen mit zusätzlichen Komponenten erweitert.

Hier sind es vor allem Rußpartikel, die durch Verbrennungsprozesse freigesetzt werden.

#### 1.2. Partikelgröße

Der Hauptparameter für die Fähigkeit der Partikel, in die Lunge und die anschließenden Gefäßsysteme vorzudringen, ist der Teilchendurchmesser. Daher wird das gesamte Teilchenspektrum anhand der Teilchendurchmesser in unterschiedliche Messbereiche aufgeteilt:

- Als TSP („total suspended particles“) wird der Gesamtschwebstaub und damit alle luftgetragenen Partikel bis zu einem Durchmesser von 100 µm bezeichnet.
- $\text{PM}_{10}$  („particulate matter“) wird der Schwebstaub mit einem Durchmesser von kleiner als 10 µm genannt (bei soliden Teilchen). Dieser Standard wurde 1987 von der amerikanischen „Environmental Protection Agency“ (EPA) festgelegt, um gezielt die Masse der inhalierbaren Teilchen zu erfassen, die ihren Weg bis in die oberen Atemwege und die Lunge finden [35].
- $\text{PM}_{2,5}$  charakterisiert den Messbereich des lungengängigen Schwebstaubs mit einer Teilchengröße von  $< 2,5$  µm, bei 50 % der Teilchen.

## II. Theoretische Grundlagen

---

- NC („number concentration“) bezeichnet weitgehend die „ultrafeinen“ Partikel und damit alle Teilchen, die einen Durchmesser von kleiner als 100 nm aufweisen.

Der Größenbereich von 0,1  $\mu\text{m}$  bis zu 2,5  $\mu\text{m}$  wird im deutschen Sprachgebrauch als „feine“ Teilchen bezeichnet. Partikel mit einem Durchmesser größer als 2,5  $\mu\text{m}$  werden „grobe“ Partikel genannt.

Während TSP,  $\text{PM}_{10}$  und  $\text{PM}_{2,5}$  als Massenkonzentrationen (mg bzw.  $\mu\text{g pro m}^3$ ) gemessen werden, quantifiziert man die NC-Teilchenfraktion als Anzahlkonzentration ( $[\text{cm}^{-3}]$ ).

### 1.3. Herkunft, Lebensdauer und Konzentration der Partikel in der Atemluft

#### Herkunft

Wie bereits erwähnt, kann man zwischen einer natürlichen Partikelemission in Form von mineralischen und organischen Stäuben, und einer anthropogenen Partikelemission, die vor allem aus Verbrennungsprozessen resultiert, unterscheiden. In einer Arbeit von Olmez et al. [36] wurde die Zusammensetzung der Aerosole in Philadelphia gemessen und festgestellt, dass über 90 % der vorhandenen TSP-Konzentration aus natürlich vorkommenden Erdstaub-Partikel stammten. Interessanterweise trugen diese nur zu ca. 50 % an der gemessenen  $\text{PM}_{10}$ -Teilchenfraktion bei. Watson et al. [37] fanden anhand chemischer Analysen von Teilchenfiltraten heraus, dass in Südkalifornien 40 % der  $\text{PM}_{10}$ -Partikel aus Primär- oder photochemischen Sekundärprodukten in Folge der Verbrennung fossiler Brennstoffe herrührten. Außer Hausbrand und Industrieabluft sind es vor allem die Abgase des Verkehrs, die zur Freisetzung von Partikel beitragen. So emittieren, laut einer Studie von Ayers et al. [38], Dieselfahrzeuge mit einem Prozentsatz von 39 % einen großen Teil der in Großbritannien freigesetzten Partikelmenge.

#### Lebensdauer

Die Größe der Teilchen ist der ausschlaggebende Parameter für ihre Sedimentationsgeschwindigkeit in der Luft und damit für ihre Fähigkeit, sich auszubreiten. Vor allem die ultrafeinen Partikel verfügen aufgrund ihres geringen Durchmessers über eine hohe diffusive Beweglichkeit. Dies bedingt auch, dass es zur schnellen Ausbildung von Koagulaten kommt. Daher existieren die ultrafeinen Partikel im singulären Zustand nur während einer kurzen Bestandszeit von Sekunden bis wenigen Stunden.

Das heißt, dass eine Exposition mit diesen sehr kleinen Teilchen nur lokal (z.B. in der unmittelbaren Nähe einer Straße) wahrscheinlich ist. Bedeutend langlebiger sind die Teilchen, die einen Durchmesser zwischen 0,1 und 1  $\mu\text{m}$  aufweisen. Diese Teilfraktion der feinen Teilchen wird auch als „Akkumulationsmode“ bezeichnet. Partikel dieser Größe können sich mehrere Wochen in der Atmosphäre aufhalten und durch Luftströmungen über weite Strecken transportiert werden. Über diesen Größenbereich hinaus nimmt die Sedimentationsgeschwindigkeit der Teilchen weiter zu, so dass sich grobe Teilchen nur bis wenige Stunden luftgetragen fortbewegen können.

### Konzentration

Durchschnittliche  $\text{PM}_{10}$ -Konzentrationen liegen laut der in den Wintermonaten 1993/94 in Europa durchgeführten PEACE-Studie [39] zwischen 20  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (Skandinavien) und 99  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (Athen). Bei ungünstigen Bedingungen, wie z.B. Inversionswetterlagen, können allerdings wesentlich höhere Belastungen auftreten. So wurden bei einer sich 1952 in London ereignenden mehrtägigen Smogepisode TSP-Konzentrationen von bis zu 2500  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  gemessen [2].

Bei der Bewertung der Partikelkonzentrationen muss man zwischen geschlossenen Räumen und der Außenluft unterscheiden. Eine Schweizer Dissertation besagt, dass in Neubauten nur noch ein geringer Luftwechsel (ca. 1/10 des durchschnittlichen Raumvolumens) eintritt [40]. Da Erwachsene im Mittel nur noch 2–3 Stunden pro Tag im Freien verbringen [41], ist eine Analyse der Innenraumbelastung sinnvoll. Laut einer Studie von Clayton und Kollegen [42] ist die Konzentration der feinen Partikel in Innenräumen maximal zwei mal so hoch wie in der Außenluft. Grobe Partikel sind dagegen eher in geringeren Konzentrationen im Innenraum zu finden. Durchschnittlich betragen die Werte etwa 60 % des Außenwertes.

Die Innenraumbelastungen hängen auch stark von den Lebensgewohnheiten ab. So erhöht sich die Partikelkonzentration beim Kochen um 10–20  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ . Einen großen Beitrag an der Innenraumbelastung liefert das Rauchen. So kann man pro gerauchte Zigarette 2-5  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  oder kumuliert bis zu 45  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  Partikel zusätzlich in der Luft registrieren.

### 2. Wirkung von partikulären Noxen auf den Organismus

#### 2.1. Deposition von Partikel im Organismus

Die Wahrscheinlichkeit, ob und wo ein Partikel im Körper deponiert wird, richtet sich sowohl nach den physikalischen Eigenschaften des Teilchens, als auch nach dem Zustand des Atmenden und der Art des Atmens. So treten z.B. in durch Atemwegsobstruktion geschädigten Lungen andere Luftströmungsverhältnisse auf als in einem entsprechenden gesunden Organ. Dies kann zu einer erhöhten Partikeldeposition führen.

Allgemein kann man sagen: Je kleiner die eingeatmeten Partikel sind, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit eines tiefen Eindringens in den respiratorischen Trakt und in die anschließenden Gefäßsysteme.

Bei gesunden Individuen werden bei Nasenatmung alle Partikel, die größer als 1  $\mu\text{m}$  sind, ausgefiltert, wohingegen bei Mundatmung Teilchen mit einem Durchmesser von bis zu 5  $\mu\text{m}$  bis in die Bronchien gelangen können [43]. Kleinere Teilchen können weiter in die respiratorischen Bronchien und Alveolen vordringen.

Aus den oberen Atemwegen werden Partikel bis zu einer Größe von ca. 1  $\mu\text{m}$  mit Hilfe des mukoziliären Apparates innerhalb weniger Tage entfernt. Die Beseitigung von noch kleineren Teilchen aus dem Alveolarraum bewerkstelligen die Alveolarmakrophagen, die die Partikel phagozytieren und nach einer Migration bewirken, dass die Partikel über das lymphatische System des Körpers oder über den mukoziliären Apparat ausgeschieden werden. Die Beseitigung der Teilchen durch Phagozytose seitens der Alveolarmakrophagen scheint jedoch bei den ultrafeinen Teilchen an ihre Grenzen zu stoßen. Ferin und Kollegen [44] stellten bei Expositionsversuchen an Ratten fest, dass die Elimination von ultrafeinen  $\text{TiO}_2$ -Teilchen (Durchmesser ca. 21 nm) aus der Lunge mit durchschnittlich 501 Tagen deutlich längere Zeit in Anspruch nahm, als die Entfernung von feinen  $\text{TiO}_2$ -Teilchen (Durchmesser 250 nm) mit durchschnittlich 174 Tagen. Auch zeigte sich, dass die ultrafeinen Teilchen nicht vollständig von den Makrophagen aufgenommen werden konnten und zu einem großen Teil in Alveolar-Epithelzellen vom Typ I und im Interstitium wiedergefunden wurden. Gleichzeitig zur Translokation der Partikel ins Interstitium wurde ein Einstrom von neutrophilen Granulozyten in die Lunge und, damit verbunden, eine akute inflammatorische Reaktion beobachtet.

### 2.2.. Untersuchungen der Wirksamkeit von partikulären Noxen auf zellulärer Ebene

#### 2.2.1. Bindung und Aufnahme von Partikel

##### Aufnahme über Rezeptoren und Diffusion

Partikuläre Noxen stellen einen potentiellen Stimulus für inflammatorische Zellen im Broncho-Alveolartrakt dar.

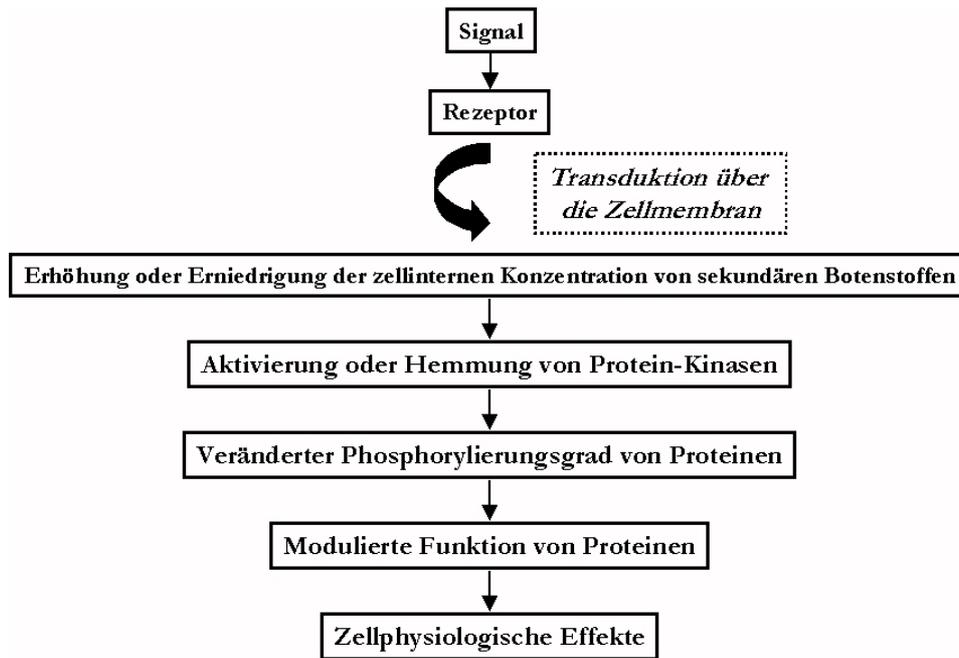
Dieser Stimulus kann zelluläre Reaktionen auslösen oder auch ihre Funktion modulieren.. Dabei kann die Wechselwirkung von Partikel mit den Zellen rezeptorunabhängig oder über Rezeptoren erfolgen.

Rezeptorunabhängige Wechselwirkungen zwischen Partikel und Zellen sind:

- Eine Adsorption von Botenstoffen an Teilchen in der unmittelbaren Umgebung der Zellen, verbunden mit einer Beeinträchtigung der interzellulären Kommunikation.
- Eine Störung von an der Membran ablaufenden Prozessen durch unspezifische Anlagerung von Partikel an die Zellmembran (kompetitive Wirkung).
- Die Ausübung von osmotischem Stress auf die Zellen bei hohen Teilchenkonzentrationen. Diese Möglichkeit sollte v.a. in Experimenten berücksichtigt werden, in denen hohe Teilchenkonzentrationen eingesetzt werden.
- Die passive Eindiffusion von Partikel in die Zellen über die Zellmembran, gefolgt von einer möglichen, direkten Beeinflussung von intrazellulären Prozessen.

Rezeptorabhängige Wechselwirkungen laufen nach einem grundlegenden Muster ab:

Liganden (z.B. Partikel), die sich an Rezeptoren anlagern, lösen eine Prozesskaskade aus, die über die Plasmamembran in das Zellinnere vermittelt wird und letztendlich in einer physiologischen Reaktion endet. Der Signalweg, der von der ersten Ligand/Rezeptor-Wechselwirkung zu zellulären Endpunkten, wie z.B. die Apoptose, führen kann und der durch die Partikel direkt oder indirekt an unterschiedlicher Stelle moduliert werden könnte, soll in Abbildung 1 skizziert werden:



**Abb. 1:** *Ablauf einer Prozesskaskade nach einem externen Stimulus*

Der erste Schritt einer solchen Prozesskaskade ist die Bindung des externen Stimulus, eines sogenannten Liganden, an einen spezifischen Rezeptor. Rezeptoren sind zum großen Teil Transmembranproteine, die meist der Gruppe der Glycoproteine angehören. Allgemein können die Rezeptoren in drei Domänen aufgeteilt werden:

- 1) Eine extrazelluläre Domäne, welche die Ligandenbindungsstelle enthält und den Hauptteil des Proteins bildet. Die extrazelluläre Domäne bestimmt die Ligandenspezifität des Rezeptors.
- 2) Eine trans-Membran-Domäne, die relativ kurz ist (meist ca. 20 Aminosäuren). Rezeptoren können mehrere trans-Membran-Domänen aufweisen.
- 3) Eine zytoplasmatische Domäne, die in ihrer Länge in Abhängigkeit vom Rezeptortyp stark variiert. An der zytoplasmatischen Domäne findet die Signaltransduktion durch Phosphorylierung statt, und intrinsische Proteinkinase-Aktivität kann hier lokalisiert sein.

Die Anlagerung eines Signalträgers an Rezeptoren vermittelt ein intrazelluläres Signal durch die Produktion oder Freisetzung weiterer Botenstoffe. Diese Mediatoren nennt man „second messenger“ oder auch sekundäre Botenstoffe. Die Liganden werden, wenn es sich um physiologische Signalmoleküle ( wie z.B. Hormone) handelt, als „first messenger“ oder auch primäre Botenstoffe bezeichnet. Beispiele für sekundäre Botenstoffe sind zyklisches AMP (cAMP), Diacylglycerol, Inositoltrisphosphat oder auch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen.

## II. Theoretische Grundlagen

---

Die Übertragung des Signals durch die Rezeptoren kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. So können die Rezeptoren selbst Liganden-abhängige Poren in der Zellmembran sein, welche sich nach einem spezifischen Stimulus öffnen und den Einstrom von zellexternen Botenstoffen erlauben.

Eine andere wichtige Art der Signalweiterleitung nach der Bindung eines Liganden an ein Rezeptorprotein ist, dass ein nachgeschaltetes Transducer-Molekül (G-Protein) eine Konformationsveränderung erfährt. Dadurch können diese G-Proteine in Folge weitere Enzyme aktivieren: Die aktivierte Adenylat-Cyclase kann aus ATP zyklisches AMP (cAMP) synthetisieren; die aktivierte Phospholipase C katalysiert die Entstehung von Diacylglycerol und/oder Inositoltrisphosphat. cAMP und Diacylglycerol aktivieren weitere Proteinkinasen, während Inositoltrisphosphat die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären Sequestorkompartimenten bewirkt [45]. Die aktivierten Proteinkinasen verändern den Phosphorylierungsgrad weiterer Proteine. So kann die Prozesskaskade, wie in Abb. 1 beschrieben, ablaufen und letztendlich zu einem zellphysiologischen Effekt führen.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Ebenen einer solchen Prozesskaskade untersucht: Die Signaltransduktion durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen als second messenger, die mitochondrielle Integrität, beurteilt durch Quantifizierung des mitochondriellen Membranpotentials und physiologische Endpunkte, wie das Ausmaß des Respiratory Burst in Phagozyten, die Apoptose als Mechanismus des gesteuerten Zelltodes, sowie die Ausschüttung von  $\text{PGE}_2$ , eines Lipidmediators, der als Botenmolekül einer inflammatorischen Reaktion entgegenwirkt.

Ob und wie eine Zelle einen externen Stimulus verarbeitet, hängt zum großen Teil davon ab, mit welchem Satz von Rezeptoren sie ausgestattet ist. Diese können spezifisch sein oder auch ein breites Spektrum von Liganden binden.

Zu den spezifischen Arten von Rezeptoren gehören die  $\text{Fc}\gamma$ -Rezeptoren, die als integrale Membranproteine auf Makrophagen und anderen inflammatorischen Zellen [46, 47] vorkommen. Sie binden spezifisch Immunglobulin-Moleküle (z.B. IgG) über deren Fc-Teil. Der Ablauf der Phagozytose und die Auslösung des Respiratory Burst können durch  $\text{Fc}\gamma$ -Rezeptoren induziert werden.

Rezeptoren mit relativ unspezifischem Bindungsverhalten stellen die bisher identifizierten Rezeptoren dar, an denen sich Partikel anlagern können. Sie werden Scavenger-Rezeptoren (SR) genannt. Diese wurden ursprünglich von Brown und Goldstein [48] als Rezeptoren für acetyliertes LDL (low-density lipoprotein) entdeckt.

Inzwischen unterscheidet man fünf Klassen (Klasse A – E) [49, 50] von Scavenger-Rezeptoren, von denen vor allem den SR-A Bedeutung bei der Bindung von Stäuben zukommt. Die Fähigkeit dieser Rezeptoren zur Partikelbindung wurde indirekt durch spezifische Blockade mit Poly-Inosin-Säure dokumentiert. Es ist auf diese Weise nachgewiesen worden, dass diese Rezeptoren in der Lage sind, feine  $\text{TiO}_2$ -,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -,  $\text{SiO}_2$ - und Latex-Partikel zu binden [51].

Weitere wichtige Rezeptoren der inflammatorischen Zellen sind die Endotoxin- oder auch Lipopolysaccharid-bindenden Rezeptoren [52, 53]. Lipopolysaccharide (LPS) sind ein Bestandteil der Membranen von gramnegativen Bakterien. Sie sind in der Lage, bereits in kleinsten Mengen (1 pg/ml) Makrophagen zu aktivieren und in höheren Konzentrationen einen septischen Schock auszulösen.

Neben der Art der Signalauslösung durch unterschiedliche Partikelarten gibt es in der Literatur Hinweise auf die Auswirkung auf nachfolgende Signalwege. So ist bekannt, dass Silikate und Asbestfasern die Auslösung von Apoptose bewirken können, die über SR-A vermittelt wird [54]. Für Rußpartikel sind hingegen bisher noch keine Rezeptoren bekannt. Scavenger-Rezeptoren sind auch an der Erkennung von apoptotischen Zellen durch Makrophagen über das membranständige Phospholipid Phosphatidylserin beteiligt [55]. Eine weitere Zellfunktion, die über eine Liganden/Rezeptoren-Bindung eingeleitet wird, ist die Phagozytose. Da die Phagozytose ein essentieller Vorgang zur Entfernung und Bekämpfung von in den Körper eingedrungenen Fremdkörpern ist, soll dieser Vorgang im Folgenden kurz beschrieben werden.

### **Phagozytose**

Unter Phagozytose versteht man die Aufnahme von partikulärem Material in Zellen durch einen Vesikulationsvorgang der Plasmamembran. Eine zweite Form der Ingestion von Material in die Zelle ist die Pinozytose, bei der gelöste Stoffe in die Zelle aufgenommen werden. Prinzipiell unterscheiden sich diese beiden Vorgänge nicht, so dass häufig der übergeordnete Begriff „Endozytose“ verwendet wird.

## II. Theoretische Grundlagen

---

Die Endozytose hat in den Zellen höherer Organismen eine Reihe verschiedener Aufgaben:

- Die Eliminierung von körpereigenen Zellen oder extrazellulären Makromolekülen, die nach Aufnahme abgebaut werden sollen.
- Den Transport von Makromolekülen durch Epithelzellen.
- Die Aufnahme von bestimmten körpereigenen Verbindungen zur Weiterverarbeitung oder Deponierung.
- Die Eliminierung von körperfremden Zellen, Molekülen oder Fremdkörpern.

Besonders der letzte Punkt ist für die in dieser Arbeit behandelte Problemstellung von grundlegender Bedeutung. Eine der Hauptfunktionen von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten als „professionelle Phagozyten“ ist die Elimination von, in den Körper eingedrungenen, Fremdkörpern durch Phagozytose. Die Phagozytose verläuft rezeptorvermittelt. Dabei erfolgt nach Ablauf einer Signalkaskade über die Membran eine gerichtete Polymerisierung von Aktinfilamenten im Zellinneren, die zu einer Einsenkung der Zellmembran an der Stelle des gebundenen Fremdkörpers führt, wodurch dieser umschlossen wird. Das den Partikel umschließende Membranstück löst sich schließlich von der restlichen Zellmembran und wird über Tubulinfasern als Phagosom in das Zellinnere befördert, wo es mit Lysosomen, die abbauende Enzyme enthalten und in denen reaktive Sauerstoffspezies gebildet werden, zum Phagolysosom verschmilzt, in dem letztendlich der Abbau von Fremdstoffen erfolgt.

Makrophagen sind in der Lage, Partikel zu phagozytieren, die ihr eigenes Volumen überschreiten. Dies ist allerdings nur bis zu einer bestimmten Größe möglich. Darüber hinaus spricht man von einer „frustrierten“ Phagozytose, die dann eintritt, wenn ein Phagozyt ein Partikel zu ingestieren versucht, das zu groß ist, um vollständig von der Zelle umschlossen zu werden [55]. Auf diese Weise kann es passieren, dass abbauende Enzyme und reaktive Sauerstoffspezies in die Umgebung der Zelle freigesetzt werden und dort körpereigene Zellen schädigen. Dies ist für die vorliegende Arbeit von Interesse, da die untersuchten Partikelsorten z.T. große Aggregate bilden.

### 2.2.2. Intrazellulärer Calciumgehalt

Im Rahmen der intrazellulären Signaltransduktion nehmen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen eine herausragende Stellung als second messenger ein [56]. Eine Vielzahl von zellulären Funktionen werden direkt oder indirekt über die freie zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) reguliert. Zwei Eigenschaften prädestinieren  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen gegenüber anderen Ionen als Signalmoleküle:

Zum einen sind freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen im Zytosol nur gering diffusibel und somit geeignet, lokale Reaktionen in der Zelle zu steuern [57].

Zum anderen sind freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in der Zelle, im Vergleich zu anderen Ionen nur zu einem geringen Anteil vorhanden. Zwar speichert eine Zelle, je nach Art, 1 bis 2  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Sie liegen jedoch in einer ruhenden Zelle nahezu vollständig in gebundener Form vor, sind aber durch Regelprozesse kurzzeitig freisetzbar. Tabelle 1 zeigt am Beispiel des humanen neutrophilen Granulozyten die Verteilung der freien Ionen in der Zelle:

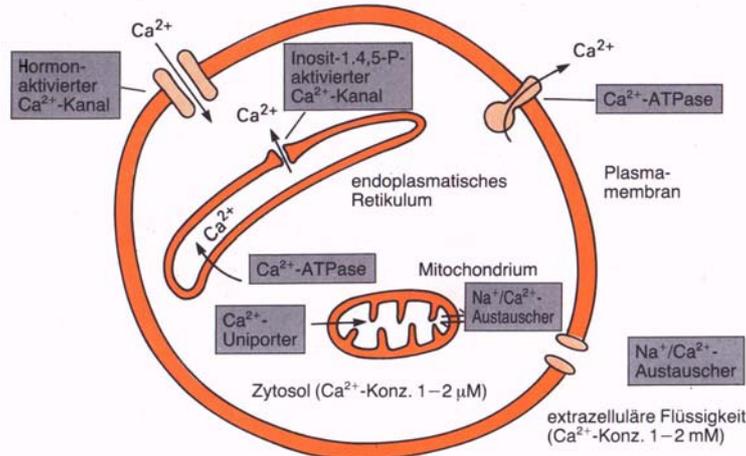
Ion:	Konzentration:
$\text{Na}^+$	29 mM
$\text{K}^+$	132 mM
$\text{Cl}^-$	80 mM
$\text{Ca}^{2+}$ (ungebunden im Zytosol)	100 nM

**Tabelle 1:** Ionenverteilung im humanen neutrophilen Granulozyten (nach [58]).

Das Zytosol ist also im Gegensatz zum extrazellulären Bereich, in dem die Calciumkonzentration im millimolaren Bereich liegt, und im Vergleich zu intrazellulären Calciumspeichern (z.B. endoplasmatisches Reticulum oder Calcisomen) nahezu calciumfrei.

Dieser Zustand wird durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Translokatoren ( $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen) aufrechtgehalten, die in die Zytoplasmamembran oder auch in die Membran des endoplasmatischen Reticulums eingelagert sind. Diese Translokatoren sind spezielle Enzyme, sogenannte  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen, die die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in einem aktiven, energieverbrauchenden Prozess durch die Membran transportieren. Ein induzierter Einstrom von außen oder eine Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus den Sequestorkompartimenten führen somit zu einem sprunghaften Anstieg des intrazellulären freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts und somit zu einer wirkungsvollen Signaltransduktion. Die folgende Abbildung zeigt eine kurze Zusammenfassung über die Calciumflüsse in einer Modellzelle:

## II. Theoretische Grundlagen



**Abb. 2:** Calciumflüsse in der Zelle (nach [59]).

Je nach Rezeptormechanismus gibt es unterschiedliche Möglichkeiten der Regulation der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Eine Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  kann durch den Einstrom von Calcium aus der extrazellulären Umgebung über hormon-aktivierte Calcium-Kanäle in der Plasmamembran oder durch Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem endoplasmatischen Reticulum, nach Aktivierung mit Inositol-1,4,5-trisphosphat [54], erfolgen.  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen erniedrigen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch Delokalisation in das endoplasmatische Reticulum oder in den extrazellulären Raum. Der  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher ist in der Lage,  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bidirektional über Membranen zu transportieren [56]. Mitochondrien wird eine Funktion als intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher zugeschrieben. Die angegebenen  $1-2 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Zytosol fasst gebundene und ungebundene  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zusammen.

Die Wirkungsweise von  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen ist vielfältiger Art und unterstreicht die Bedeutung dieses sekundären Botenstoffes. So weisen neuere Experimente darauf hin, dass die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung von bestimmten Quellpunkten ausgeht und sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen gerichtet durch das Zytoplasma ausbreiten [60]. Es kommt also zur Ausbildung von Calcium-Wellen.

Diese Calcium-Wellen können vereinzelt („Spikes“) oder periodisch (oszillierend) auftreten. Mit diesen verschiedenartigen Signalmustern ist es möglich, eine Vielzahl von zellphysiologischen Reaktionen zu steuern.

Eine weitere, auch im Bezug auf die vorliegende Arbeit wichtige Funktion des intrazellulären freien Calciums, ist der Einfluss auf Zellform und Motilität von Zellen. Besonders für Granulozyten und Makrophagen sind eine gerichtete Bewegung auf das Ziel hin und, damit verbunden, eine Änderung der Zellgestalt bei der Bewegung von essentieller Bedeutung. Über den Mechanismus der zielgerichteten Zellbewegung ist noch wenig bekannt. Brundage [61] postuliert einen bisher nicht näher charakterisierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher, von dem aus sich ein Konzentrationsgradient in der Zelle ausbildet. Die Bewegungsrichtung der Zelle soll über diese inhomogene  $\text{Ca}^{2+}$ -Verteilung reguliert werden.

## II. Theoretische Grundlagen

---

Kruskal et al. [62] konnten zeigen, dass eine Zunahme der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in Neutrophilen erfolgt, wenn diese über Integrine Kontakt mit den Endothelzellen in Blutgefäßen treten, sich nachfolgend eng an die Oberfläche des Endothels anlagern und dabei eine Formveränderung erfahren. Ein ähnliches  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal wird bei der sogenannten „frustrierten“ Phagozytose erzeugt (s.o.). Im Gegensatz zu dieser erfolgt bei der regulären Phagozytose kein Anstieg der intrazellulären freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, wie in einigen Arbeiten nachgewiesen werden konnte [63, 64]. Eine lokale Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ist aber für die Verschmelzung des bei der Ingestion eines Partikels entstehenden Phagosoms mit einem Lysosom zu einem Phagolysosom nötig [65]. Weitere  $\text{Ca}^{2+}$ -gekoppelte zelluläre Reaktionen, die im Zusammenhang mit dem Thema dieser Arbeit stehen, seien noch kurz skizziert.

Die Aktivierung der NADPH-Oxidase, die die reaktiven Sauerstoffspezies für den Respiratory Burst synthetisiert, erfolgt ebenfalls nach einer Erhöhung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts [66].

Eine essentielle Bedeutung hat Calcium auch in der Regulation des Ablaufs der Apoptose, wie aus Arbeiten hervorgeht, die die Apoptose-induzierende Wirkung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophoren nachweisen konnten [67]. Diese Aussage wird bestätigt durch den Nachweis des Apoptose-hemmenden Einflusses von  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelatoren oder  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblockern [68, 69].

$\text{Ca}^{2+}$ -Ionen wirken meist nicht direkt auf die Vorgänge im Zytoplasma ein, sondern indirekt über  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Proteine wie das Calmodulin [70]. Diese Proteine erfahren durch die Anlagerung von  $\text{Ca}^{2+}$  selbst eine Konformationsänderung und werden dadurch zu aktiven Signalträgern.

Dass Partikel bzw. Stäube den zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt beeinflussen können, wurde in einigen Arbeiten publiziert.

So zeigten z.B. Gercken und Kollegen, dass Quiso G32, ein feiner Quarzstaub, und Sikron F 600, ein feiner Silikatstaub, mit einer Konzentration von jeweils 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  eine bis zu fünffache Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  nach fünf bzw. drei Minuten in Rinder-Alveolarmakrophagen induzieren können. Dabei konnte durch die Verwendung von EGTA im Medium gezeigt werden, dass ein Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem extrazellulären Bereich am Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beteiligt ist [71]. Weiterführende Untersuchungen von Tarnok et al. [72] bestätigen diese Ergebnisse. Chen et al. behandelten Ratten-Alveolarmakrophagen mit feinen Silikat-Stäuben (Durchmesser  $< 5 \mu\text{m}$ , Konzentration: 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Sie stellten nach 15 Minuten einen Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  fest, der nach zwei Stunden sein Maximum mit einer fünffachen Erhöhung im Vergleich zur Ausgangskonzentration erreichte [73].

Stone und Kollegen [74] untersuchten die Wirkung von ultrafeinen Kohlenstoffteilchen (ultrafine carbon Black (ufCB), Partikeldurchmesser: 14 nm), feinen Kohlenstoffteilchen (fine Carbon Black (fCB), Partikeldurchmesser: 260 nm) und einem Quarzstaub (DQ-12, Partikeldurchmesser: 1,45  $\mu\text{m}$ ) an MM6-Zellen, einer humanen Monozyten-Zelllinie. Die Partikelkonzentrationen, mit denen die Zellen exponiert wurden, betragen 66  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Nach einer Expositionszeit von 2000 sec konnte an den mit ufCB behandelten Zellen eine Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  festgestellt werden (Kontrollzellen:  $86,84 \pm 14,00 \text{ nM}$ , mit ufCB:  $140,22 \pm 16,54 \text{ nM}$ ) Bei fCB oder DQ-12 wurde keine signifikante Veränderung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  gemessen.

In der vorliegenden Arbeit wurde  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mit der Indo-1-AM-Ratiomethode untersucht (siehe „Methodische Grundlagen“ III.1.2.1.).

### 2.2.3. Respiratory Burst

Makrophagen und Granulozyten verfügen über eine unspezifische Art der Abwehr von Mikroorganismen, den sogenannten „Respiratory Burst“ (RB). Unter RB versteht man einen intrazellulären Reaktionsweg, der zur Produktion von reaktiven Sauerstoffmetaboliten führt [75, 76, 77]. Diese reaktiven Sauerstoffspezies dienen vor allem dazu, die von den Phagozyten ingestierten Mikroorganismen in den Phagolysosomen durch Oxidationsprozesse zu zerstören.

Je nach Konzentration können diese reaktiven Sauerstoffmetaboliten zur intrazellulären Signalvermittlung [78] beitragen oder auch, bei zu hoher Konzentration, die produzierende Zelle selbst und sogar das umgebende Gewebe schädigen. Vorgänge dieser Art bezeichnet man auch als oxidativen Stress [79, 80, 81]. Hier wird deutlich, wie wichtig eine exakte Regulation der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies ist, und dass eine Beeinflussung dieses Gleichgewichts, z.B. durch den modulierenden Einfluss von Partikel, nachhaltige Folgen für die Zelle und ihre Umgebung haben kann.

Das zentrale Enzym für die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies ist eine membrangebundene NADPH-Oxidase. Diese besteht aus mehreren Untereinheiten, die in der ruhenden Zelle im Zytosol (Untereinheiten: p47, Rac-2 im Zytoplasma und p67 an das Zytoskelett gebunden) und in der Plasmamembran (Cytochrom  $b_{558}$ , bestehend aus p91-FAD/p22) verteilt sind. Nach der Aktivierung der inflammatorischen Zelle werden diese Untereinheiten zu einem funktionellen Enzym zusammengefügt, das eine transmembrane Elektronentransportkette bildet [82]. Die Edukte für die Generierung der reaktiven Sauerstoffspezies sind zytosolisches NADPH und Sauerstoff [83]. Die NADPH-Oxidase katalysiert folgende Reaktionen:

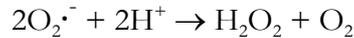
## II. Theoretische Grundlagen

---

In einem ersten Schritt entstehen zwei Moleküle Superoxid  $O_2^{\cdot-}$ .



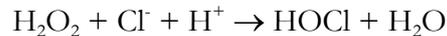
Die Superoxid-Moleküle reagieren mit den freigesetzten Protonen zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff. Dies kann spontan oder katalysiert durch die Superoxid-Dismutase erfolgen [84]:



Eine weitere Reaktion ist zwischen den Superoxid-Molekülen und dem Wasserstoffperoxid möglich. Hierbei kommt es zu Ausbildung von Hydroxyl-Radikalen, die zu den stärksten oxidativen Reagenzien in biologischen Systemen gehören [85]:



Myeloperoxidase, ein weiteres Enzym, katalysiert die Reaktion von Wasserstoffperoxid mit  $Cl^-$ -Ionen zu hypochloriger Säure [86]:



Eine Reaktion mit anderen Halogeniden ( $Br^-$ ,  $I^-$ ) ist möglich, jedoch liegen die  $Cl^-$ -Ionen im Vergleich zu ihnen in einer tausendmal höheren Konzentration vor. Hypochlorige Säure ist ein starkes Oxidans, das viele relevante Biomoleküle angreifen kann.

Die Modulation des Respiratory Burst durch Partikel ist in vielen Arbeiten belegt.

Lenz und Kollegen [87] untersuchten die Auslösung von oxidativem Stress in Affenlungen. Hierzu setzten sie die Tiere über 26 Monate einer Atmosphäre aus, die  $5 \text{ mg/m}^3$  DQ12 (ein feiner Quarzstaub) enthielt. Ein Teil der Tiere wurde bei erhöhtem Aussendruck ( $2,5 \text{ hPa}$ ) mit und ohne Staubbelastung gehalten. Als Indikator für die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies wurde der Gehalt von Carbonyl-Gruppen in den durch Alveolar-Lavage (BAL) gewonnenen Proteinen ( $\text{nmol Carbonyl/mg Protein}$ ) herangezogen. Carbonyle entstehen bei der Denaturierung von Proteinen in Phagozyten durch den Respiratory Burst. Es zeigte sich, dass bei den unter Überdruck, aber ohne Staubbelastung gehaltenen Tieren nach 6 Monaten ein erhöhter Prozentsatz (156%) an Carbonyl-Gehalt nachzuweisen war, wohingegen sich der Carbonyl-Gehalt in den BAL-Proteinen der Tiere, die dem Quarzstaub ausgesetzt waren, verringerte ( $< 50\%$ ). Diese Reduzierung war von dem Aussendruck unabhängig. Hippeli und Elstner beobachteten nach Exposition mit Dieselruß-Partikel und anschließender Stimulation mit opsoniertem Zymosan eine Zunahme der Phagozytoserate und eine Abnahme des RB in humanen neutrophilen Granulozyten [88].

Nach Exposition mit Flugaschen wiesen Janice et al. [89] an Primärkulturen von trachealen Rattenepithelzellen, und Gercken und Kollegen [71] an Rinderalveolarmakrophagen die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies nach. Stone et al. [74] konnten eine Auslösung von oxidativem Stress mit ultrafeinen Kohlenstoffteilchen an einer humanen Alveolar-Epithelzelllinie (A549) zeigen.

### 2.2.4. Apoptose

Nach einer Teilchenexposition kann es zu einem erhöhten Auftreten von inflammatorischen Zellen in den betroffenen Organen kommen. Diese Zellen müssen, nachdem sie ihre Aufgabe erfüllt haben, wieder eliminiert werden, um zu verhindern, dass sie durch unspezifische Abwehrreaktionen, wie z.B. den Respiratory Burst, körpereigenes Gewebe schädigen.

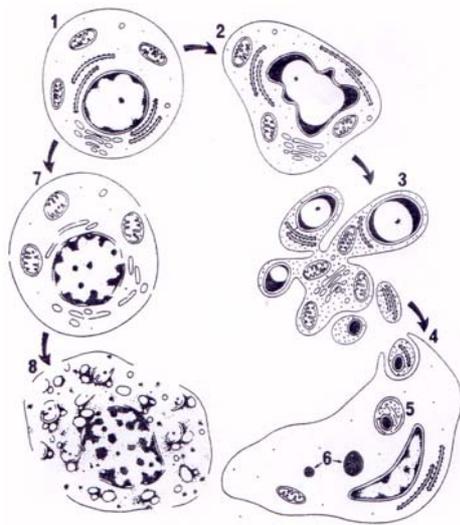
Dieser Abbau der Zellen erfolgt durch apoptotische Prozesse. Es ist daher sinnvoll, in der vorliegenden Arbeit der Frage nachzugehen, ob Partikel die Apoptoserate der inflammatorischen Zellen modulieren können. Im Falle einer erhöhten Apoptoserate würden die inflammatorischen Zellen zu früh eliminiert werden und so für die Bekämpfung von z.B. Infektionen nicht mehr in ausreichenden Mengen zur Verfügung stehen. Bei einer reduzierten Apoptoserate würden die inflammatorischen Zellen zu lange ihre zytotoxische Wirkung in den betroffenen Organen entfalten können.

Als Apoptose wird eine bestimmte Form von Zelltod bezeichnet, bei dem die Zelle in einem aktiven und energieverbrauchenden Prozess selbst ihre Degradation einleitet und vollendet [90, 91, 92]. Die Apoptose spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und der Homöostase von Geweben in Organismen. Apoptose steuert z.B. das Absterben von Neuronen, die keinen korrekten intrazellulären Kontakt zu anderen Nervenzellen aufgebaut haben [93] oder auch die stetige Erneuerung von Darmepithelzellen, die mit einer Lebensdauer von durchschnittlich vier Tagen mit zu den am kürzesten lebenden Zellen im Körper zählen [94]

Der Ausdruck Apoptose wurde im Jahre 1972 von Kerr eingeführt [95], der beobachtet hatte, dass sich der Ablauf der Schritte, die zum natürlichen Zelltod führen, in vielen Geweben gleicht und nach einem festen Programm abzulaufen scheint. Daher wird oft auch die Bezeichnung „programmierter Zelltod“ verwendet. Dieser kontrollierten Form des Zelltodes steht die Nekrose gegenüber, die nach außergewöhnlichen Ereignissen, wie z.B. Verletzungen der Zellmembran, eintritt. Im englischen Sprachgebrauch spricht man deshalb auch von „accidental cell death“ [91, 96, 97].

## II. Theoretische Grundlagen

Die Phänomene der beiden Arten des Zelltodes unterscheiden sich stark in Art und Ablauf. Bei der Nekrose kann die Zelle, wegen Defekten in der Zellmembran, das interne Ladungs- und osmotische Druckgleichgewicht nicht mehr aufrecht erhalten, so dass sie durch Wasseraufnahme anschwillt und schließlich platzt. Die Zellbestandteile können zu einer inflammatorischen Reaktion führen. Dieser Vorgang verläuft unkontrolliert und kann für das Gewebe, bei einer starken entzündlichen Reaktion, schädigende Wirkung haben. Bei der Apoptose hingegen kommt es zu einem gesteuerten Abbau der Zelle, ohne dass dabei eine Inflammation hervorgerufen wird.



**Abb. 3:** *Ablauf der Apoptose und der Nekrose (aus [98]).*

*Ausgehend von einer normalen Zelle (1) zeigt die Abbildung den nekrotischen (7,8) und den apoptotischen Zelltod (2-6). Bei der Nekrose bilden sich unregelmäßige Chromatinansammlungen, die Zellorganellen schwellen an und die Zellmembran wird zerstört (7). Im Endstadium der Nekrose ist die Zelle nachhaltig geschädigt, wobei sie allerdings in ihrer ursprünglichen Form erhalten bleibt (8). Bei der Apoptose ist die frühe Degradationsphase (s.u.) durch eine regelmäßige Fragmentierung des Chromatins und eine Kondensierung des Zytoplasmas gekennzeichnet. Im Gegensatz zur Nekrose schrumpft die Zelle (2). Im*

*weiteren Verlauf der Apoptose werden „apoptotic bodies“, die DNA-Fragmente, Organellen und Zytoplasma enthalten, abgeschnürt (3), von benachbarten Zellen phagozytiert (4) und dort in Phagolysosomen abgebaut (5,6).*

Kroemer et al. teilen die Apoptose in drei Phasen ein [99]:

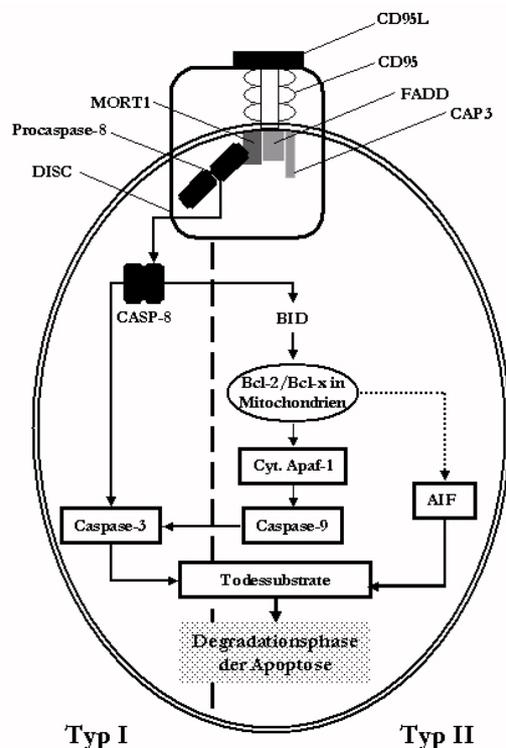
Während einer Initiationsphase erfährt die Zelle den Zelltod auslösenden Stimulus. Diese Phase kann sehr unterschiedliche Auslösemechanismen involvieren. Die Induzierung kann z.B. durch den Mangel an lebenswichtigen Substraten, die Anlagerung eines Apoptose induzierenden Liganden [100, 101] an spezielle Rezeptoren (z.B. APO-1/CD95/Fas oder TNF) oder auch unspezifisch durch „Vergiftung“ (z.B. Tributyltin (TBT)) erfolgen. Es folgt die Effektorphase, in der die Apoptose auslösenden Signale verarbeitet werden, und für die Zelle die Entscheidung über Leben oder Tod fällt. Im Ablauf der Apoptose entscheidet sich am „point of no return“, ob die Apoptose unumkehrbar in ihre Degradationsphase eintritt oder nicht.

In der dritten Phase der Apoptose, der Degradationsphase, laufen schließlich die gut zu verfolgenden Abbauvorgänge in der Zelle ab, die zu den charakteristischen, morphologischen Phänomenen (Zellschrumpfungen, apoptotische Bodies u.ä.) führen, gemäß derer eine apoptotische Zelle definiert wird.

## II. Theoretische Grundlagen

Neben der unspezifischen Auslösung der Apoptose ist v.a. die Induktion, die über den CD95-Rezeptor verläuft, erforscht. CD95 (wird auch als APO-1/Fas bezeichnet) ist ein Zelloberflächenrezeptor, der in den meisten Säugetiergeweben exprimiert wird [102] und der der NGF/TNF-Rezeptorfamilie zugeordnet wird. Eine Untergruppe dieser Rezeptorfamilie, zu der auch CD95 gehört, bilden die sogenannten Todesrezeptoren, die in der Lage sind, Apoptose zu induzieren. Der Ligand von CD95 ist CD95L (APO-1L/FasL), ein glykolysiertes Protein, das von aktivierten T-, B- und NK-Zellen produziert wird, die somit in der Lage sind, Targetzellen durch Induktion von Apoptose aus dem Zellverband zu entfernen.

Die zur Zeit manifestierten apoptotischen Reaktionswege, die die drei Phasen der Apoptose verbinden, sind in Abb. 4 anhand der Induktion der Apoptose durch CD95/CD95L skizziert:



**Abb. 4:** Schematische Abbildung der Apoptose-Signalwege nach Induktion durch Anlagerung des Liganden CD95L an den Rezeptor CD95.

Die Anlagerung des spezifischen Liganden CD95L an CD95 führt in einem ersten Schritt zu einer Bindung von FADD/MORT1, eines Adapters, an die Zellmembran. An dessen Untereinheit FADD wird Procaspase-8 gebunden. Mit einer weiteren Untereinheit, CAP3, deren Funktion allerdings noch nicht geklärt ist, bilden CD95, FADD/MORT1 und Procaspase-8 den sogenannten „death inducing signalling complex“ (DISC). Procaspase-8 wird autokatalytisch gespalten und die beiden Untereinheiten lagern sich zur Caspase-8 (CASP-8) zusammen, von der aus verschiedene weiterführende Signalwege möglich sind.

In Zellen, in denen die Apoptose-Induzierung nach Typ I abläuft, erfolgt die Signaltransduktion rein über eine Caspasenkaskade, in der die Effektorcaspase Caspase-3 (CASP-3) aktiviert wird. Bei den Caspasen handelt es sich um eine Form von Proteasen, die im aktiven Zentrum Cystein enthalten. Voraussetzung hierfür ist, dass hinreichend CASP-8 erzeugt wird. Ist dies nicht der Fall, kann die Signaltransduktion auch über den Typ II-Weg erfolgen. Bei diesem wirken Mitochondrien als Verstärker, indem sie, durch das Molekül BID angeregt, Cytochrom c freisetzen. BID gehört zur Gruppe der Bcl-2-Familie und kann die Mitochondrien „aktivieren“, nachdem es von CASP-8 gespalten wurde. (Die Bcl-2-Proteine sind eine Gruppe von Proteinen, die die Induktion der Apoptose regulieren.) Das freigesetzte Cytochrom c lagert sich an das apoptose-steuernde Gen Apaf-1 an. Dieser Komplex aktiviert unter ATP-Verbrauch die Caspase-9 (CASP-9), welche dann ihrerseits die CASP-3 anregt. Eine dritte Möglichkeit, die Apoptose einzuleiten, ist die Freisetzung von „Apoptosis Inducing Factor“ (AIF) aus den Mitochondrien. AIF ist in der Lage, Caspase-3-ähnliche Caspasen zu aktivieren, die DNA-Fragmentierung im Zellkern auszulösen und eine Exposition von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Plasmamembran zu induzieren [103].

## II. Theoretische Grundlagen

---

*Der Typ II-Reaktionsweg kann auch durch eine unspezifische Apoptoseinduktion (Strahlung, Entzug von Wachstumsfaktoren u.ä.) aktiviert werden. Alle diese Prozessabläufe enden letztendlich in der Spaltung zellulärer Substrate, die auch „Todessubstrate“ genannt [133] werden, durch Effektorcaspasen (CASP-3).*

*Zu diesen Todessubstraten gehören z.B. Zellgerüstproteine wie das Aktin. Mit der Spaltung der Todessubstrate wird die dritte Phase der Apoptose, die Degradationsphase eingeleitet.*

Wie bereits erwähnt beginnt die Zelle im frühen Stadium der Degradationsphase (im Gegensatz zur Nekrose) zu schrumpfen, das Chromatin verdichtet sich und sammelt sich an der inneren nukleären Membran an. Im weiteren Verlauf zerfällt die DNA in 50 – 300 kB große Fragmente. Zeitgleich werden in der Zelle Proteine zu kleineren Einheiten gespalten.

Der Zellkörper wird stark eingefurcht (Zeiose) [104] und es werden Zellteile, die sog. „apoptotic bodies“, abgeschnürt (dieser Vorgang wird auch „Blebbing“ genannt), welche auch DNA-Fragmente enthalten können. Diese werden von umgebenden Zellen („non-professional phagocytes“) oder von Phagozyten aufgenommen. Zeitgleich mit der Bildung der „apoptotic bodies“ kommt es zu einem Verlust der Membranasymmetrie und zur Präsentation von Phosphatidylserin in der äußeren Plasmamembran. Phosphatidylserin dient Phagozyten als Erkennungssignal für apoptotische Zellen.

Dass Partikel Apoptose in Zellen auslösen können, haben Iyer und Kollegen an humanen Alveolarmakrophagen nachgewiesen [55]. Sie stellten fest, dass Silikat-Partikel apoptotische Veränderungen in den Zellen hervorrufen, die über Scavenger-Rezeptoren vermittelt werden. Kristalline Silikatpartikel (Durchmesser: 5  $\mu\text{m}$ , Konzentration: 133  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) zeigten nach sechs Stunden einen deutlichen Apoptose induzierenden Effekt.

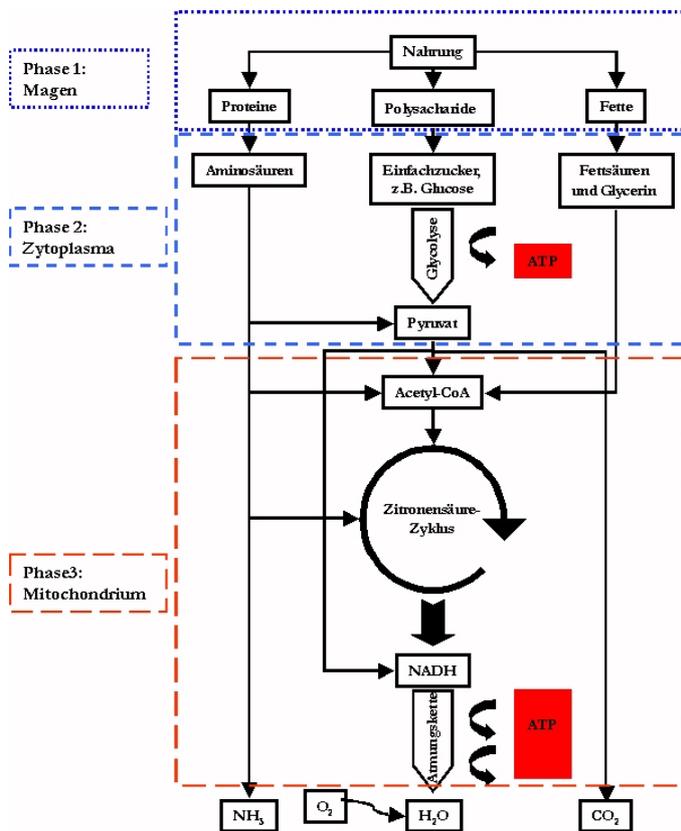
Amorphe Silikatpartikel (Durchmesser: 1 - 5  $\mu\text{m}$ , Konzentration: 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und feine  $\text{TiO}_2$ -Partikel (Durchmesser: 0,45  $\mu\text{m}$ , Konzentration: 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) riefen dagegen keine Induktion der Apoptose hervor.

Des Weiteren ist aus einigen Arbeiten bekannt, dass Mineralfasern, wie z.B. verschiedene Arten von Asbest [105, 106], Apoptose induzieren können. Dopp und Kollegen [33] zeigten die Induktion von Apoptose durch verschiedene Asbestfasern anhand der DNA-Fragmentierung in Embryo-Fibroblastenzellen aus Hamstern. Als Asbestfasern wurden Chrysotil (Durchmesser: 0,10  $\mu\text{m}$ , Länge: 2,24  $\mu\text{m}$ ), Crocidolit (Durchmesser: 0,25  $\mu\text{m}$ , Länge: 1,71  $\mu\text{m}$ ) und Amosit (Durchmesser: 0,24  $\mu\text{m}$ , Länge: 2,05  $\mu\text{m}$ ) in Konzentrationen von 1,0 bis 10,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  eingesetzt. Chrysotil (10,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) wirkte (mit einem Anteil von 33 % apoptotischen Zellen an der Gesamtzellzahl nach 66 Stunden) am stärksten Apoptose induzierend, wohingegen Crocidolit und Amosit mit 3 % bzw. 8 % apoptotischer Zellen deutlich geringere Effekte zeigten.

### 2.2.5. Mitochondrien-Membranpotential

Wie unter Punkt 2.3.2.4. beschrieben, sind Mitochondrien bei Typ II-Zellen an der Auslösung der Apoptose beteiligt.

Die wichtigste Funktion der Mitochondrien innerhalb der Zelle ist allerdings die Energiegewinnung in Form von ATP. Die zentralen Reaktionen (Zitronensäurezyklus und oxidative Phosphorylierung) finden in diesen Organellen statt. Die folgende Abbildung zeigt eine schematische Übersicht über die wichtigsten Abläufe zur ATP-Synthese:



**Abb. 5:** Schematische Übersicht über die wichtigsten Abläufe zur ATP-Synthese.

In der ersten Phase, die im Magen stattfindet, werden Makromoleküle in kleinere Untereinheiten (Aminosäuren, Einfachzucker, Fettsäuren und Glycerol) umgewandelt.

Diese werden in der zweiten Phase in die Zellen aufgenommen. Dort werden die Einfachzucker in der Glykolyse zu Pyruvat prozessiert, wobei ATP erzeugt wird. Je nach Art, werden die Aminosäuren entweder direkt zu Molekülen des Zitronensäurezyklus metabolisiert oder über die Zwischenprodukte Pyruvat oder Acetyl-CoA in diesen eingebracht.

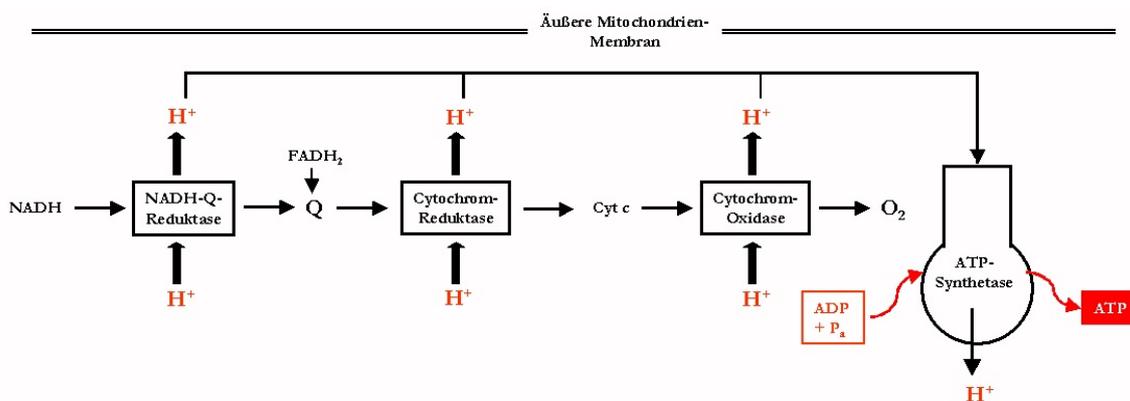
Die dritte Phase der ATP-Synthese läuft in den Mitochondrien ab. Pyruvat und

Fettsäuren werden über die Mitochondrienmembran in den Innenraum des Mitochondriums befördert, dort zu Acetyl-CoA umgewandelt, welches im Zitronensäurezyklus, der das Redoxäquivalent NADH produziert, weiterverarbeitet wird. In der anschließenden oxidativen Phosphorylierung werden energiereiche Elektronen durch die Atmungskette in der Innenmembran des Mitochondriums von NADH auf Sauerstoff übertragen. Die freiwerdende Energie wird zur ATP-Erzeugung genutzt (verändert und ergänzt nach [59]).

Besonders die terminale Reaktion dieser metabolischen Oxidation, die oxidative Phosphorylierung, ist für die vorliegende Arbeit von Interesse, denn sie bedingt die Ausbildung eines Potentials an der Mitochondrienmembran. Deshalb soll diese Reaktion hier etwas eingehender erläutert werden.

## II. Theoretische Grundlagen

Die ATP-Synthese bei der oxidativen Phosphorylierung ist durch einen Protonengradienten an der inneren Mitochondrienmembran mit dem Elektronenfluss von den Redoxäquivalenten NADH und  $\text{FADH}_2$  zu  $\text{O}_2$  gekoppelt. Diese Theorie der Chemiosmose wurde von Mitchell postuliert [107]. Der Elektronenfluss durch drei asymmetrisch orientierte Transmembrankomplexe führt dazu, dass Protonen aus der Mitochondrienmatrix in den Intermembranraum translokalisiert werden und dadurch ein Membranpotential entsteht. Dieses Membranpotential ist mit bis zu 180 mV größer als andere Potentiale, die sich an zellulären Membranen ausbilden. Die folgende Abbildung gibt eine schematische Übersicht über die Atmungskette:



**Abb. 6:** Schematische Übersicht über die Atmungskette.

Die Elektronencarrier und die ATP-Synthetase sind Transmembranzymoleküle der inneren Mitochondrienmembran, die aus Übersichtsgründen hier nicht eingezeichnet ist.

Die eigentliche ATP-Synthese erfolgt beim Rückfluss der Protonen in die Matrix durch einen kanalbildenden ATP-synthetisierenden Komplex, die sogenannte ATP-Synthetase. Diese besteht aus zwei Untereinheiten, wobei die hydrophobe  $\text{F}_0$ -Einheit die Protonen durch die Membran leitet und die hydrophile  $\text{F}_1$ -Einheit die ATP-Synthese katalysiert, welche an drei aktiven Zentren im Wechsel abläuft.

Wie bereits angesprochen, resultiert das Mitochondrien-Membran-Potential aus einer ungleichen Verteilung von Protonen und Ionen an beiden Seiten der inneren Mitochondrien-Membran. Hieraus entsteht ein chemischer (pH) und ein elektrischer Gradient, die beide für die Entstehung einer protonenmotorischen Kraft und damit für den oben beschriebenen Ablauf der ATP-Synthese essentiell sind.

Das Membran-Potential ist für die Anwendung des in dieser Arbeit verwendeten und unter Punkt 1.2.5. der Methodischen Grundlagen besprochenen Mitochondrien-Membran-Potential-Farbstoffs JC-1 von grundlegender Bedeutung.

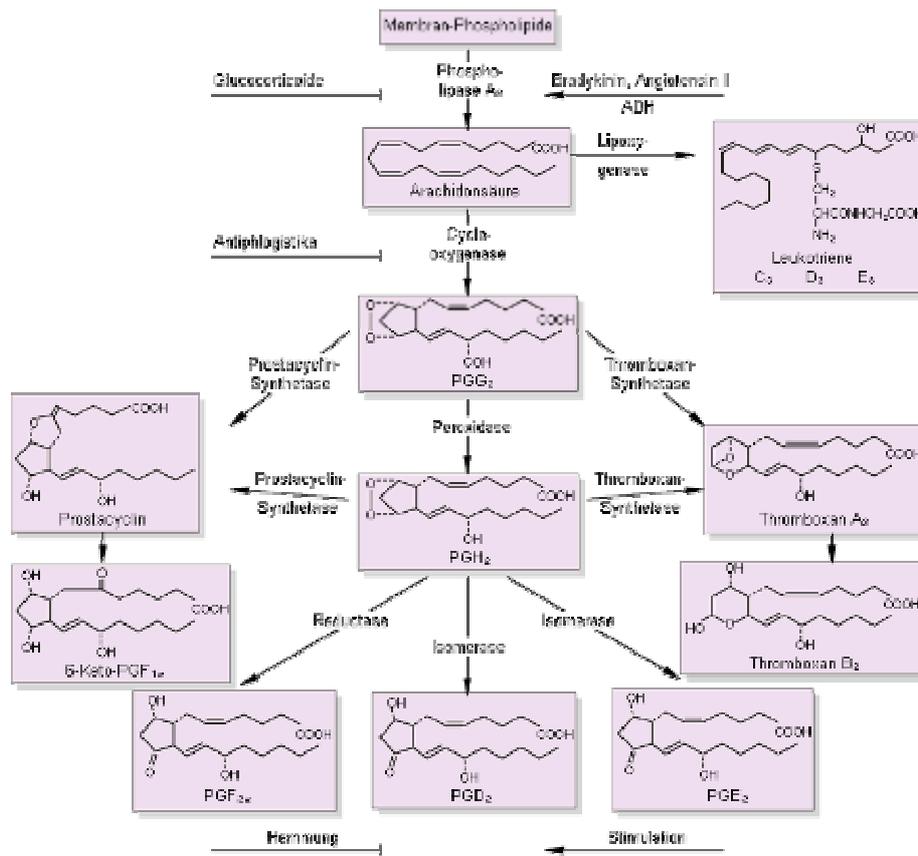
Außer ihrer essentiellen Stellung im Energiehaushalt der Zellen, spielen Mitochondrien auch in der Signaltransduktion eine wichtige Rolle, wie schon bei der Auslösung der Apoptose bei Typ II-Zellen gezeigt wurde. Des Weiteren sind Mitochondrien in den  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt der Zelle [108] involviert. So steht der Calciumgehalt in den Mitochondrien mit der Calciumkonzentration im Zytosol in Verbindung. Kurzzeitige Schwankungen des zytosolischen Calciumgehalts können Depolarisationen in der Mitochondrienmembran und somit Oszillationen in der Rate der oxidativen Phosphorylierung hervorrufen. Die zentrale Stellung der Mitochondrien im Energiehaushalt der Zellen und ihre Beteiligung an Signaltransduktionsprozessen haben Anlass gegeben, das Mitochondrien-Membran-Potential mit in die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit aufzunehmen.

Über die Auswirkung von Partikel auf die Mitochondrien ist bisher wenig bekannt. Es gibt einige Arbeiten, die die Mitochondrien aufgrund ihrer Schlüsselstellung in der Typ II-Apoptose mit in die Untersuchungen mit einbezogen haben. So konnten z.B. Hiura et al. nach Exposition mit Dieselstäuben eine Veränderung des Mitochondrien-Membran-Potentials nachweisen, welcher eine Freisetzung von Cytochrom c folgte [109].

### 2.2.6. Prostaglandin $\text{E}_2$

Die bisher besprochenen zellphysiologischen Parameter betreffen Vorgänge, die sich an der Zelle oder im Zellinneren abspielen. Das Hormon Prostaglandin  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ) dient der Kommunikation zwischen den Zellen. Prostaglandin  $\text{E}_2$  gehört zur Gruppe der Eicosanoide, wie man oxygenierte Derivate der Arachidonsäure bezeichnet. Es existiert eine Vielzahl von natürlich vorkommenden Prostaglandinen. Die Prostaglandine wurden von Euler [110] in der Samenflüssigkeit entdeckt und nach der Prostata benannt, von der Euler fälschlicherweise annahm, dass sie diese Hormone produzieren würde. Nach ihrer Substitution im Fünfring mit Oxo- bzw. Hydroxy-Gruppen werden sie in die Reihen A –H eingeteilt. Durch zusätzliche, tief gestellte Ziffern wird die Zahl der Doppelbindungen in der Seitenkette bezeichnet.  $\text{PGE}_2$  ist das Hauptprodukt der Umsetzung von Arachidonsäure durch Cyclooxygenase.

Die folgende Abbildung gibt die Biosynthese einiger Prostaglandine wieder:



**Abb. 7: Biosynthese von Prostaglandinen.**

Prostaglandine werden über den Cyclooxygenaseweg aus Arachidonsäure synthetisiert (aus [111]).

Prostaglandine sind im Körper an einer Vielzahl physiologischer Funktionen beteiligt. Besondere Bedeutung kommt den Prostaglandinen bei der lokalen Regulation der Durchblutung (Entzündungsreaktion), bei der Steuerung von endo- u. exokrinen Drüsenfunktionen und bei Schwangerschaft und Geburt zu. Des Weiteren gelten die Prostaglandine als membranständige Schutzfaktoren mit pathophysiologischer Bedeutung bei Schmerz, Fieber und Entzündung. Therapeutische Anwendung finden z.B. PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2</sub> als Wehenmittel bzw. zur Aborteinleitung (Dinoprost® bzw. Dinoproston®).

PGE<sub>2</sub> spielt im Bezug auf das Krankheitsbild der rheumatischen Arthritis eine große Rolle. So hemmt PGE<sub>2</sub> die Synthese von Collagen in den Knochen und fördert die Produktion von Collagenase in Osteoblasten [112, 113].

Für die vorliegende Arbeit ist die antiinflammatorische Wirkung von PGE<sub>2</sub> von Bedeutung. Prostaglandin E<sub>2</sub> wirkt inflammatorischen Reaktionen entgegen, indem es die Mitogenese von Lymphozyten, die Migration von Abwehrzellen und die zellvermittelte Zytotoxizität unterdrückt [114, 115].

Des Weiteren wurde beobachtet, dass in Makrophagen die Produktion von IL-1 und TNF durch PGE<sub>2</sub> herunterreguliert wird [116]. Sottile und Kollegen konnten zeigen, dass PGE<sub>2</sub> den Respiratory Burst in Neutrophilen hemmt [117].

In einigen Arbeiten wurde die Freisetzung von PGE<sub>2</sub> durch inflammatorische Zellen nach Stimulation mit Partikel beobachtet. Kuhn und Demers [118] konnten eine Verdreifachung der Produktion von PGE<sub>2</sub> nach Stimulation mit frischgemahlene (fünf Tage nach Herstellung) Kohle- und Quarzstäuben (Durchmesser 2-7 µm, Konzentration: 100 µg/ml) in Alveolarmakrophagen aus Ratten feststellen. Gealterte (acht Wochen nach Herstellung) Kohlestäube verursachten eine Reduktion auf 75 % des PGE<sub>2</sub>-Ausstoßes der Kontrollzellen. Koren und Kollegen [119] zeigten eine konzentrationsabhängige Abnahme der PGE<sub>2</sub>-Produktion in menschlichen Alveolarmakrophagen nach Exposition mit feinen Quarzpartikel (Durchmesser: 2,2 µm, Konzentrationen: 10, 60, 100 µg/ml). Dabei reduzierte sich der PGE<sub>2</sub>-Gehalt in den Überständen der Zellsuspensionen nach einer 24-stündigen Exposition mit 100 µg/ml Partikel auf ein Viertel der Ausgangskonzentration. Shibata [120] beschreibt eine Freisetzung von PGE<sub>2</sub> in Knochenmarksmakrophagen durch feine Latexpartikel (Durchmesser 1,1 µm, Konzentration: 50 µg/ml, Expositionszeit: 1 h), nachdem diese mit IFN-γ und LPS vorbehandelt wurden. Ohne Vorbehandlung der Zellen wurde keine erhöhte PGE<sub>2</sub>-Produktion in den Zellen infolge der Teilchenexposition festgestellt.

Beck-Speier et al. [121] fanden eine zweifache Erhöhung der PGE<sub>2</sub>-Produktion in Alveolarmakrophagen aus dem Hund nach einer einstündigen Behandlung mit 1 µg/ml ultrafeinen Kohlenstoffpartikel (Durchmesser: 77 nm) und 10 µg/ml ultrafeinen TiO<sub>2</sub>-Partikel (Durchmesser: 21 nm). Bei feinen TiO<sub>2</sub>-Partikel konnte erst ab einer Konzentration von 100 µg/ml eine signifikante Erhöhung der PGE<sub>2</sub>-Produktion festgestellt werden.

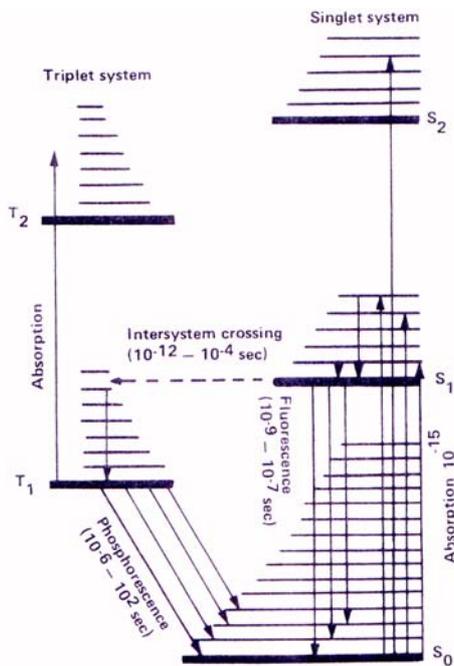
## III. Methodische Grundlagen

### 1. Fluoreszenzmessungen

#### 1.1. Prinzip der Fluoreszenz

Da in dieser Arbeit ein großer Teil der Untersuchungen mit Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt wurde, soll kurz auf das Prinzip der Fluoreszenz eingegangen werden:

Bei der Wechselwirkung von Licht mit Materie sind hauptsächlich zwei Prozesse von Bedeutung, die Streuung und die Absorption der Strahlung. Bei der Absorption müssen Übergänge zwischen verschiedenen Elektronenzuständen betrachtet werden.



*Abb. 8: Vereinfachtes Energieniveau-Diagramm eines mehratomigen Moleküls (nach [122]).*

Trifft elektromagnetische Strahlung mit der Frequenz  $\nu$  auf ein Atom innerhalb eines (Farbstoff-) Molekülverbandes, so entsteht eine Wechselwirkung zwischen dem elektrischen Feld der Strahlung und den Feldern, die von den Ladungen von Atomkern- und Atomhülle stammen.

Entspricht die Frequenz  $\nu$  einer Spektrallinie des Moleküls, kann ein Elektron durch Absorption eines Photons der Strahlung auf ein höheres Energieniveau angehoben werden.

Gewöhnlich wird bei der Anregung das Molekül in einen höheren Vibrationszustand des betreffenden Elektronenzustands versetzt. Die Rückkehr des Elektrons zum Grundzustand kann auf verschiedene Weise erfolgen: Wird das angeregte Elektron über mehrere, energieärmere strahlungslose Niveaus (interne Konversion) schließlich in den Ausgangszustand zurückgeführt, werden Lichtquanten emittiert, die einen geringeren Energieinhalt aufweisen als das anregende Lichtquant. Diesen Vorgang, der in ca. bis  $10^{-9}$  sec bis  $10^{-7}$  sec abläuft, nennt man Fluoreszenz. Kehrt das angeregte Elektron unmittelbar (d.h. in weniger als  $10^{-9}$  sec) auf sein ursprüngliches Energieniveau zurück und emittiert dabei ein Lichtquant, das der Frequenz des absorbierten entspricht, spricht man von Resonanzfluoreszenz. Außerdem sind strahlungslose Übergänge in einen Triplettzustand des Moleküls möglich (Intersystem-Crossing), der meist langlebig ist (bis zu mehreren Tagen) und der zur Phosphoreszenz führt. Auch wenn das anregende Licht gerichtet ist, verteilt sich das resultierende emittierte Fluoreszenzlicht über alle Raumrichtungen. Bei Anregung mit sichtbarem Licht bedeutet die Abnahme des Energieinhalts der emittierten Lichtquanten, relativ zu den absorbierten Lichtquanten, eine Verschiebung des Farbspektrums zu längerwelliger Strahlung hin.

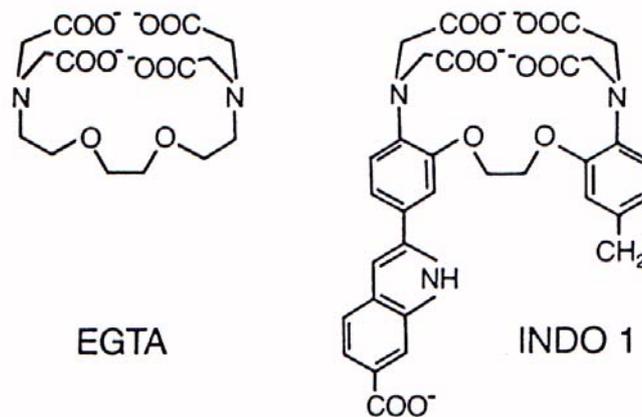
Diese Zunahme der Wellenlänge des emittierten Fluoreszenzlichts wird auch als „Stokes'sche Verschiebung“ bzw. „Stokes shift“ bezeichnet. Die Bestrahlung von Zellen kann zu einer Fluoreszenzemission durch zelleigene Farbstoffe wie z.B. intrinsische Pyridin- und Flavinnukleotide (Autofluoreszenz) oder extrinsisch durch experimentell zugeführte Fluorochrome führen.

#### 1.2. Fluoreszenzfarbstoffe

Die untersuchten Parameter wurden hauptsächlich mit Fluoreszenzfarbstoffen (Indo-1-AM, DHR123 bzw. DCFH, JC-1) oder mit Fluoreszenzkonjugaten (Annexin-V-Fluos®) quantifiziert.

##### 1.2.1. Calciummessung mit der Indo-1-AM-Methode

Zur Detektion des intrazellulären freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts wurde 1-[2-Amino-5(carboxyino-2-yl)-phenoxy]-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)-ethan-tetraessigsäure] oder kurz Indo-1 verwendet. Dieser Farbstoff ist ein Chelator, ähnlich EGTA ([Ethylen-bis-(oxyethylennitrilo)]-tetraessigsäure), und zeigt eine Frequenz-Verschiebung seines Emissionsmaximums von  $\sim 470\text{nm}$  im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Zustand zu  $\sim 400\text{nm}$  nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung [123].



**Abb. 9:** *Strukturformeln von EGTA und Indo-1*

Diese Emissionsverschiebung macht man sich bei der Messung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts zu Nutze. Sie ermöglicht es, die beiden Emissionssignale ins Verhältnis zu setzen und somit als Maß für  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  heran zu ziehen. Durch dieses Verhältnissverfahren werden systematische Fehler, wie Photobleaching, unterschiedliche Farbstoffbeladung, variierende Zelldicken oder Schwankungen der Laserintensität kompensiert. Dabei zeigt sich Indo-1 30-fach sensitiver als das von Tsien et al entwickelte Quin 2 [123], das früher für  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Messungen der Farbstoff der Wahl war.

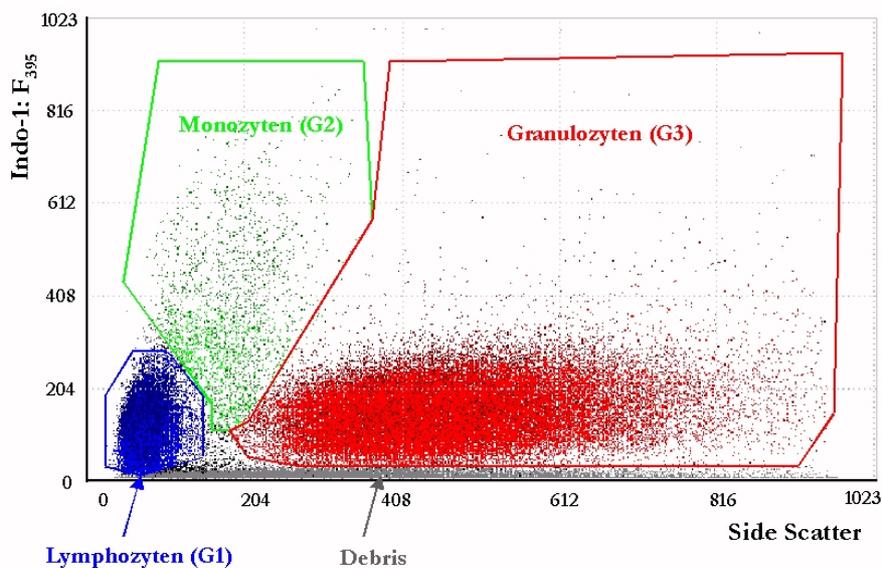
Die Zellmembran ist für Indo-1 impermeabel. Um es dem Farbstoff zu ermöglichen, in die Zelle einzudringen, wird dieser mit Acetoxymethyl(AM)-ester zu Indo-1-AM konjugiert. In der Zelle wird Indo-1-AM durch Esterasen zu freiem Farbstoff hydrolysiert.

Indo-1 eignet sich sehr gut für die Durchflusszytometrie, da für die Anregung nur ein Laser nötig ist, der Licht im UV-Bereich (351-356 nm) emittiert. So kann diese Anordnung mit einem weiteren Laser mit der Anregungslinie 488 nm kombiniert werden, die für die Anregung der meisten Fluoreszenzfarbstoffe, wie z.B. FITC, benutzt wird.

Dieser Vorteil war in der vorliegenden Arbeit von grundlegender Bedeutung, da so mehrere zellphysiologische Parameter zeitgleich gemessen und eine Populationstrennung mit der Indo-1-AM/SSC-Methode vorgenommen werden konnte. Durch die Einbeziehung der Zeit als Testparameter konnten zeitaufgelöste  $\text{Ca}^{2+}$ -Kinetiken ( $\Delta t = 1$  s, bzw.  $\Delta t = 5$  s) gemessen werden, die im Gegensatz zu üblichen Zeitreihenmessungen fortlaufend stattfinden und mit hoher Auflösung intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten zu ermitteln erlauben.

#### 1.2.2. Populationsanalyse mit Indo-1-AM/SSC

Einer der Hauptvorteile von durchflusszytometrischen Messungen ist die Möglichkeit, verschiedene Subpopulationen aus einer Zellsuspension gleichzeitig zu erfassen und anschließend ihr Verhalten gesondert auszuwerten und zu quantifizieren. Für diese Arbeit war dies von besonderem Nutzen, da sich die aus dem Blut entnommenen Leukozyten in drei Untergruppen aufteilen ließen: Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten. Bei klinischen Routinemessungen erfolgt die Trennung dieser Untergruppen oft anhand von Zellgröße (Vorwärtsstreulicht, FSC) und Granularität (Seitwärtsstreulicht, SSC) der Zellen. Allerdings liefert diese Methode, besonders in Hinsicht auf die Monozyten, eine nur ungenaue Auftrennung. Deshalb wurde bei den Auswertungen der Messung eine Separierung der Subpopulationen nach der Granularität (SSC) und dem Gehalt des freien Calciums (Indo-1- $[Ca^{2+}]_i$ -Fluoreszenz; 395 nm) in der Zellen vorgenommen.



**Abb. 10:** Dotplot-Darstellung der Indo-1-F<sub>395</sub>/SSC-Methode.

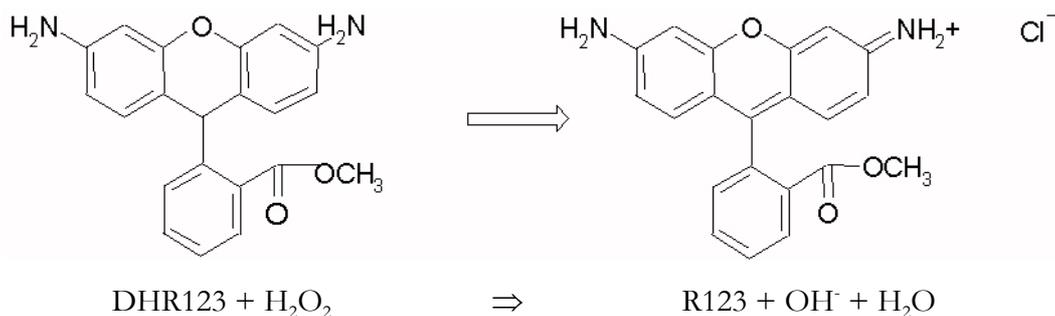
Deutlich sind die drei Zellfraktionen anhand ihres  $Ca^{2+}$ -Gehalts (Indo: F<sub>395</sub>) und ihrer Granularität (Side Scatter) zu unterscheiden. Der Debris besteht aus Zelltrümmern, der aufgrund des niedrigen  $Ca^{2+}$ -Gehalts gut von intakten Zellen separiert werden kann (G1 - G3: Gate 1 - 3, siehe auch III.1.3.2.).

#### 1.2.3. Nachweis des Respiratory Burst mit DHR123 und DCFH

Leukozyten sind in der Lage, eine Reihe von reaktiven Sauerstoffmetaboliten im Verlauf einer unspezifischen Immunabwehr, dem Respiratory Burst, zu produzieren (siehe „Theoretische Grundlagen“ II.2.2.3.). Zur Messung dieser oxidativen Prozesse in Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit die Farbstoffe Dihydrorhodamin123 (DHR123) und Dichlorodihydrofluorescein-diacetat ( $H_2DCFDA$ ) verwendet. Um die Farbstoffe zur Detektion von reaktiven Sauerstoffmetaboliten verwenden zu können, werden sie chemisch reduziert und in ihre nichtfluoreszenten „Dihydro“-Formen überführt. Durch die beim Respiratory Burst freigesetzten Sauerstoffverbindungen erfolgt dann eine Rückoxidation zu den fluoreszenten Ausgangssubstanzen.

Dihydrorhodamin123 ist das nichtfluoreszente, chemisch reduzierte Produkt von Rhodamin123. Rhodamin123 ist ein seit längerem bekannter Farbstoff, der aufgrund seiner positiven Ladung die Plasmamembran und besonders Mitochondrien markiert, an deren Membran sich ein negatives Potential als an den anderen, in der Zelle vorhandenen, Membranen ausbildet.

DHR123 kann frei durch die Zellmembran diffundieren und wird während des Respiratory Burst hauptsächlich durch  $H_2O_2$  wieder zu Rhodamin123 oxidiert, das durch seine grüne Fluoreszenz detektiert werden kann [124, 125, 126]. Dichlorodihydrofluorescein-diacetat wird durch reaktive Sauerstoffmetaboliten in Fluorescein überführt, welches bei einer Anregung mit Licht mit der Wellenlänge 488 nm, wie das Rhodamin123, im grünen Bereich emittiert.



**Abb. 12:** *Oxidation von DHR123 zu R123*

DHR123 diffundiert frei in die Zellen, so dass sich über die Membran ein Diffusionsgleichgewicht ausbildet. DHR123 kann folglich im Zellinneren und im Zellaußenraum zu R123 oxidiert werden.  $H_2DCFDA$  dagegen wird aufgrund seiner Diacetat-Gruppe über die Zellmembran aufgenommen und im Zellinneren durch Esterasen von seiner Acetatgruppe getrennt, ähnlich wie dies für Indo-1-AM beschrieben wurde.

Der freie Farbstoff verbleibt dann in der Zelle, was systematischen Fehlern, wie Farbstoffverlusten über die Membran vorbeugt. Allerdings wird dieser Vorteil gegenüber DHR123 durch die geringe Sensitivität von H<sub>2</sub>DCFDA im Bezug auf die Detektion des Respiratory Burst in Granulozyten kompensiert [127].

#### 1.2.4. Messung apoptotischer Zellen mit der Annexin-V-Fluos-Technik

Die Annexin-V-Fluos-Technik stellt eine wirksame Methode dar, die es ermöglicht, apoptotische von nichtapoptotischen Zellpopulationen zu trennen.

Grundlage für dieses Assay ist die asymmetrische Verteilung von Phospholipiden in den inneren und äußeren Schichten der Plasmamembran [128]. Dabei sind bei intakten, nichtapoptotischen Zellen die Aminophospholipide Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin (PS) nur auf der zytoplasmatischen Membranseite zu finden [129, 130]. Dieser Zustand der Membran-Asymmetrie wird durch spezielle Mg<sup>2+</sup>/ATP-abhängige Membranproteine, sogenannte Flipasen, aufrecht erhalten [131].

Wenn eine Zelle in die Apoptose übergeht, ändert sich die oben beschriebene Phospholipid-Verteilung, und PS wird auch auf der äußeren, extrazellulären Membranseite exponiert.

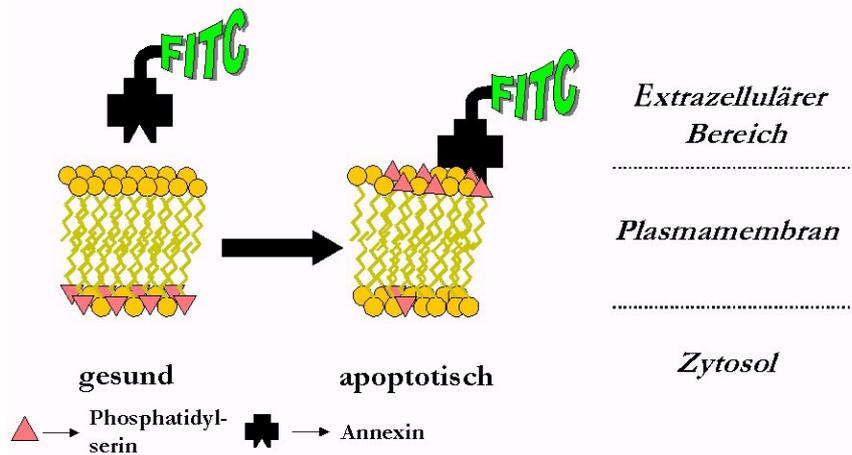
Fadok und Mitarbeiter konnten nachweisen, dass dieser Zustand als Erkennungssignal für Makrophagen dient, um die apoptotische Zelle zu erkennen und aus dem Gewebe zu entfernen [132, 133]. Diese Umlagerung von Phosphatidylserin scheint ein omnipräsentes Ereignis in der frühen Phase der Apoptose zu sein. Sie wurde sowohl an vielen kernhaltigen Säugetierzellen, wie z.B. B-Zellen [134], als auch bei kernlosen Zellen, wie z.B. Erythrozyten [135] und auch bei Insekten- und Pflanzenzellen nachgewiesen [136].

Die Exposition von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche kann mit Hilfe des Proteins Annexin V spezifisch nachgewiesen werden. Annexin V weist eine starke Homologie zur Proteinfamilie der Annexine auf [137]. Hieraus erklärt sich auch die Benennung. Annexin V wurde ursprünglich als PP4 aus der Plazenta bzw. als vaskuläres Anticoagulat aus der Nabelschnur isoliert und hat die Eigenschaft, Ca<sup>2+</sup>-abhängig spezifisch an Phosphatidylserin zu binden [138]. Dies machten sich Koopman und seine Mitarbeiter zu Nutze. Sie erarbeiteten eine Methode zur Markierung von apoptotischen Zellpopulationen, indem sie das Protein mit einem Fluorochrom konjugierten und so einen spezifischen Marker für apoptotische Zellen herstellten [139].

Annexin V kann aufgrund seiner Größe die intakte Zellmembran nicht passieren. Der zeitgleiche Einsatz von Annexin V und niedermolekularen Farbstoffen, die zur Lebend/Tod-Diskriminierung dienen, wie z.B. Ethidium-Bromid oder Propidium-Iodid, lassen eine Unterscheidung zwischen „gesunden“, früh- und spätapoptotischen Zellen zu (Abb. 13).

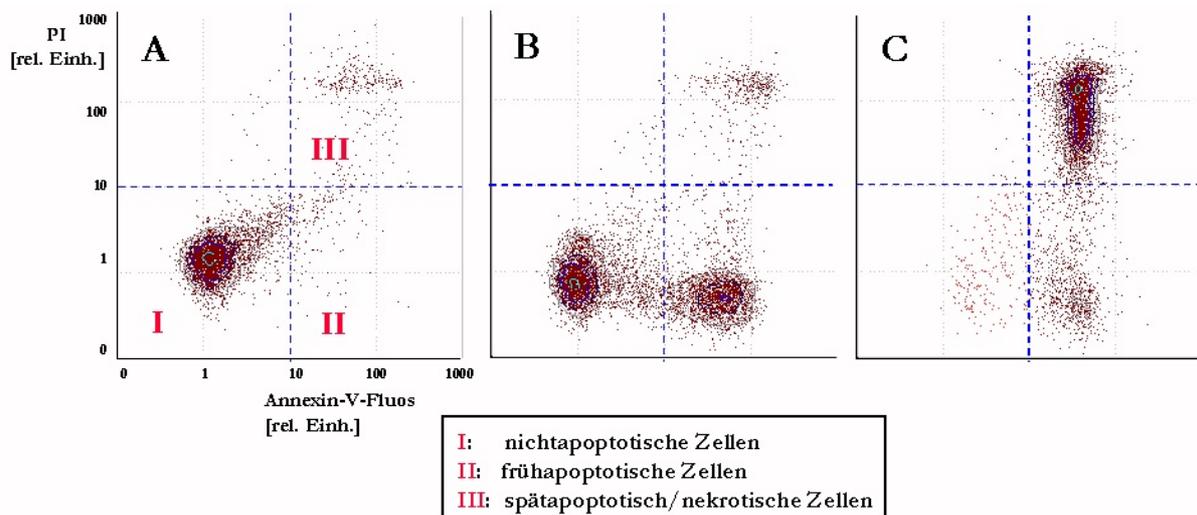
### III. Methodische Grundlagen

Dies macht diese Methode ideal für eine quantitative Populationsuntersuchung im Durchflusszytometer.



**Abb. 13:** Schema zum Annexin V-Assay.

Während in der gesunden Zelle kein Phosphatidylserin (Dreiecke) in der äußeren Membranschicht zu finden ist, wird dieses bei apoptotischen Zellen in den extrazellulären Raum präsentiert und kann durch Annexin V in Verbindung mit einem Fluoreszenzfarbstoff detektiert werden.



**Abb. 14:** Dotplot-Darstellung: Behandlung von Granulozyten mit TBT ( $3 \mu\text{M}$ ).

A) Bei vitalen Zellen zeigen sich nur schwache Annexin-V-Fluos- (Abszisse) und PI-Signale (Ordinate).

B) Nach 3 h TBT-Behandlung zeigt sich deutlich eine Zunahme des Annexin-V-Fluos-Signals: Die Zellen werden apoptotisch. Da die Membranintegrität noch erhalten ist, kann kein PI in die Zellen eindringen, so dass es zu keiner wesentlichen Zunahme der Rotfluoreszenz kommt.

C) Die Membranen weisen nach 5 h größere Öffnungen auf, durch die PI in die Zellen diffundieren kann, so dass man Zellen mit hohen Grün- und Rot-Signalen erhält. Die Zellen befinden sich jetzt, bedingt durch die Gifteinwirkung, in einem Übergangsstadium von einem spät-apoptotischen zu einem nekrotischen Zustand. Im natürlichen Ablauf der Apoptose ist eine solche starke Schädigung nicht enthalten, da ein Austreten von Zellinhaltsstoffen in die Umgebung verhindert werden soll.

#### 1.2.5. Messung des Mitochondrien-Membranpotentials mit JC-1

Wie bereits unter Punkt II.2.2.5. der „Theoretischen Grundlagen“ erläutert wurde, weisen Mitochondrien mit ca. - 100 bis - 180 mV ein größeres negatives Potential als die übrigen Membranen in der Zelle auf, wie z.B. die Plasmamembran mit - 70 mV [59]. Diesen Umstand kann man sich zu Nutze machen, um gezielt in Mitochondrien den zeitlichen Verlauf des Potentials bzw. die Integrität der Mitochondrien-Membran zu untersuchen.

Prinzipiell gibt es zwei verschiedene Ansätze, um Membranpotentiale zu messen [140]:

a) Mit Hilfe der sogenannten „fast response dyes“, also mit Farbstoffen, die sehr schnell (im Bereich von Millisekunden) auf Potentialänderungen in Membranen reagieren [141].

Dies geschieht durch das diese Farbstoffe umgebende, veränderte elektrische Feld, das eine Umgestaltung ihrer Elektronenstruktur induziert und damit der Fähigkeit, Fluoreszenzlicht zu emittieren. Hierbei sind die Fluoreszenzausbeuten allerdings eher gering. „Fast response dyes“ eignen sich v.a., um schnelle Reaktionen, wie sie zum Beispiel bei der Reizübertragung durch Nervenzellen ablaufen, zu beobachten. Als Beispiele seien hier Styrylpyridinium-Verbindungen genannt.

b) Die „slow response dyes“ brauchen eine vergleichsweise längere Zeit, um auf Potentialänderungen zu reagieren. Bei diesen Farbstoffen erfolgt diese Anzeige nicht über eine Veränderung ihrer Elektronenstruktur, sondern durch eine Änderung der Farbstoffverteilung an der bzw. über die Membran, wodurch sich auch die längere Responsezeit erklärt. Für diese Diffusionsvorgänge sind prinzipiell das elektrische Feld, das sich über die Membran (mit den negativen Ladungen im Zell- bzw. Organellinneren) ausbildet, und der chemische Gradient des Farbstoffes die alleinigen Ursachen, die zur Farbstoffverteilung an der Membran beitragen. Diese Farbstoffe werden dann herangezogen, wenn es darum geht, langsame Potentialänderungen zu beobachten, wie sie z.B. nach Vergiftungen eintreten. Im Gegensatz zu den „fast response dyes“ bekommt man bei diesen Farbstoffen meist deutliche Änderungen in der Intensität bzw. der Frequenz der Fluoreszenzsignale. Die beiden am häufigsten verwendeten Gruppen der „slow response dyes“ sind die Rhodamine [142] und die Carbocyanine [143]. Zu letzteren gehört auch das in der vorliegenden Arbeit verwendete „J-aggregate-forming-cationic-dye“ JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetra-ethylbenzimidazolylcarbocyanin-jodid) [144].

JC-1 ist ein lipophiles Carbocyanin mit einer delokalisierten positiven Ladung. Der Farbstoff liegt bei niederen Konzentrationen oder niedrigem Membranpotential als Monomer vor, das bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm eine grüne Fluoreszenz (527 nm) emittiert. Bei höherer Konzentration und/oder höheren Membranpotentialen zeigt sich ein weiteres Emissionsmaximum im orangen Bereich (590 nm).

### III. Methodische Grundlagen

---

Diese Emissionsfrequenz-Verschiebung resultiert aus einer Interaktion zwischen einer Vielzahl von Monomeren, die gleiche räumliche Orientierung aufweisen, und sogenannte J-Aggregate ausformen. Diese Polymerenbildung wurde im Jahre 1937 von Jelly erstmals beschrieben und mit seinem Kürzel benannt [145]. Der Farbstoff ist ein lipophiles Kation mit einer delokalisierten Ladung. Für die Ausbildung der J-Aggregate ist eine Stabilisierung der kationischen Formation durch negative Ladungen nötig [146]. Die Anzahl der angelagerten Monomere ist also in erster Näherung direkt proportional zu den negativen Ladungen, die das Membranpotential bilden. Die höchsten negativen Ladungsdichten in der Zelle sind an den Mitochondrien-Membranen zu finden. Daher verursacht das negative Membranpotential mit bis zu  $-180$  mV auf der Innenseite der Mitochondrien-Membran die Aufnahme von JC-1 in den Matrixraum der Mitochondrien.

Die Ausbildung des Membran-Potentials folgt prinzipiell der Nernst'schen Gleichung:

$$V = \frac{RT}{zF} \ln \frac{c_o}{c_i}$$

$V$  = Membranpotential [mV]

$V_m$  = Mitochondrien-Membranpotential

$R$  = Gaskonstante

$T$  = absolute Temperatur [K]

$z$  = Ladung der Ionen

$F$  = Faraday-Konstante

$c_o$  = Konzentration der permeablen Ionen im Medium [mol/l]

$c_i$  = Konzentration der permeablen Ionen im Zytosol [mol/l]

$c_m$  = Konzentration der permeablen Ionen in der mitochondrialen Matrix

Die potentialabhängige Aufteilung von JC-1 zwischen Medium, Zytosol und mitochondrialer Matrix kann aus obiger Gleichung abgeleitet werden:

$$c_i = c_o \exp \frac{-zFV}{RT} \quad \text{und} \quad c_m = c_i \exp \frac{-zFV_m}{RT}$$

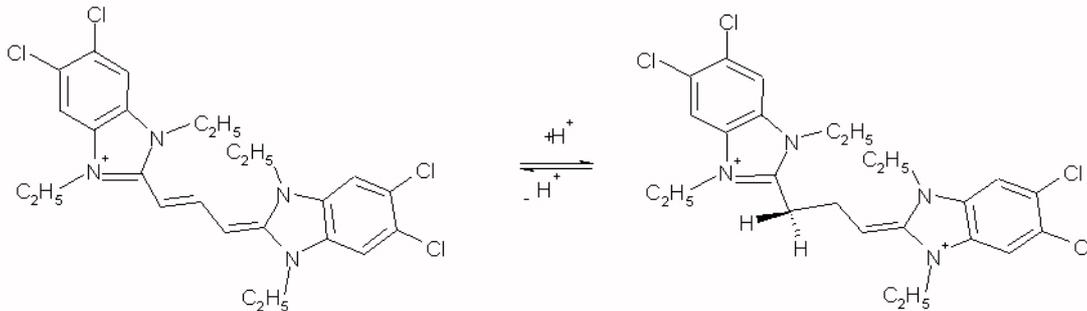
mit Plasmamembranpotential  $V$  und Mitochondrien-Membranpotential  $V_m$ , wobei sich schließlich für  $c_m$  ergibt:

$$c_m = c_o \exp \frac{-zF(V+V_m)}{RT}$$

Wird eine genügend hohe Konzentration, die sogenannte „critical J-aggregate formation concentration“ (CJC) in den Mitochondrien überschritten, kommt es zur Ausbildung von J-Aggregaten und somit zum Auftreten eines Maximums im roten Teil des Emissionsspektrums [147].

### III. Methodische Grundlagen

Diesem konzentrations- und ladungsabhängigen Gleichgewicht zwischen Monomeren- und Polymerenbildung steht ein zweites Gleichgewicht gegenüber, das vom pH-Wert der Farbstoffumgebung abhängt und zwei Molekülzustände innerhalb der Monomeren betrifft. In Abhängigkeit vom pH-Wert (besonders bei Werten  $< 7,2$ ) des umgebenden Mediums kann es zu einer Protonierung des JC-1-Moleküls kommen.



**Abb. 15:** *Protonierung von JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin-iodid)*

Diese Protonierung hat zwei Konsequenzen. Zum einen erhält das Molekül eine Gesamtladung von +2:  $\text{H}^+ + \text{JC-1}^+ \leftrightarrow \text{H-JC-1}^{2+}$

Zum anderen wird die konjugierte Methin-Kette unterbrochen, was einen Verlust von Absorption und Emission sichtbaren Lichts bedingt.

Das bisher Besprochene zeigt, dass in der Zelle die wichtigsten Faktoren, die zur Formierung von J-Aggregaten führen, die Konzentration des Farbstoffes, der pH-Wert, sowie die Ionenstärke der Umgebung sind. Zudem reagiert das Monomeren-Polymeren-Gleichgewicht sehr empfindlich auf Temperaturänderungen. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Parameter von JC-1 eingehender mit dem Spektralphotometer untersucht. Die Ergebnisse werden unter IV.1.2.2. dargestellt.

### 1.3. Durchflusszytometrie

#### 1.3.1. Prinzip der Durchflusszytometrie

Unter dem Begriff Durchflusszytometrie versteht man eine Messmethode, bei der chemische und physikalische Parameter an biologischen oder anorganischen Partikel untersucht werden, während sie sich in einem Flüssigkeitsstrom durch eine Messapparatur bewegen.

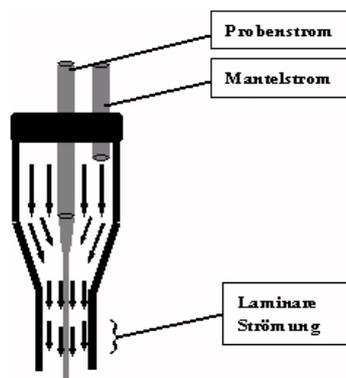


Diese haben, gegenüber den zum Teil auch verwendeten Quecksilberdampfampfen, die Vorteile einer größeren spektralen Reinheit und höherer Anregungsintensitäten. Des Weiteren können Laser auf Querschnittsflächen fokussiert werden, die den Ausdehnungen von Zellen entsprechen. In der Praxis finden für Standardapplikationen meist Argon-Ionen-Laser mit Anregungswellenlängen im Sichtbaren von 488 nm, 515 nm und im UV-Bereich zwischen 351 – 363 nm Anwendung. Diese beiden Lasertypen wurden auch in dem von uns verwendeten Gerät eingesetzt.

#### Hydrodynamische Fokussierung

Im Durchflusszytometer werden die Parameter einzelner Partikel im Fokus einer Anregungsquelle („Intersektionspunkt“) gemessen, was einen räumlich stabilen Probenstrom erfordert. Des Weiteren soll gewährleistet sein, dass jeweils nur ein Teilchen den Fokuspunkt passiert.

Um derartige Konditionen zu erhalten, bedient man sich einer sogenannten hydrodynamischen Fokussierung. Wie aus der Schemazeichnung (Abb. 17) ersichtlich ist, wird durch eine feine Kanüle der die Partikel enthaltende Proben-Strom („core“) aus einem Vorratsgefäß zentrisch in eine Düse geleitet. Der Probenstrom hat einen Durchmesser von nur wenigen  $\mu\text{m}$ . In die gleiche Düse mündet konzentrisch ein zweiter Flüssigkeitsstrom, der sogenannte Mantelstrom („sheath“), der den Probenstrom umhüllt und einen Durchmesser von 50-200  $\mu\text{m}$  aufweist. Durch diese Anordnung kommt es zur Ausbildung einer laminaren Strömung, in der die zu untersuchenden Partikel perlenschnurartig aufgereiht durch den Intersektionspunkt geleitet werden. Der die Düse verlassende Flüssigkeitsstrahl kann entweder von einer Küvette umschlossen sein oder frei durch die Luft fliegen („stream-in-air“).



**Abb. 17:** *Hydrodynamische Fokussierung*

*Durch die Kombination von Mantel- und Probenstrom kommt es zur Ausbildung einer laminaren Strömung am Ausgang der Düse.*

Die Erzeugung einer laminaren Strömung ist für durchflusszytometrische Verfahren von elementarer Wichtigkeit, denn nur dann erhält man einen Flüssigkeitsstrahl, der sowohl in seiner räumlichen Ausrichtung als auch in seiner Fließgeschwindigkeit stabil ist.

#### Erfassung der Parameter

Am Intersektionspunkt wird das Anregungslicht auf den die Partikel tragenden Flüssigkeitsstrom fokussiert. Passiert ein Partikel diesen Punkt, kommt es zu Wechselwirkungen zwischen den Teilchen und den auf sie treffenden Photonen.

Zum einen wird Streulicht erzeugt, das in seiner Wellenlänge dem ursprünglichen Anregungslicht entspricht, sich aber in Raumausrichtung und Intensität von diesem unterscheidet. Das Streulicht ist abhängig von der Größe, der Form und von den Lichtbrechungseigenschaften des den Anregungsstrahl passierenden Teilchens. In der Durchflusszytometrie werden meist Streulicht mit kleinen Streuwinkeln (ca.  $0,5-2^\circ$ ) und Licht, das im rechten Winkel zum Anregungslicht gestreut wird, erfasst. Die Intensität des vorwärtsgestreuten Lichts ist in diesen kleinen Streuwinkeln nahezu proportional zu dem Volumen der gemessenen Partikel [148, 149].

Bei ersterem spricht man von „Vorwärts-Streulicht“ (im Englischen auch von „forward scatter“, FSC, bzw. „forward angle light scatter“, FALS). Der Detektor für den FSC ist in der axialen Verlängerung des Anregungsstrahls positioniert. Um nur das Streulicht, nicht aber das Anregungslicht selbst zu erfassen, wird der Anregungsstrahl durch eine Strahlensperre („obscuration bar“, „beam stop“) abgeblockt. Das Vorwärts-Streulicht ist vor allem ein Maß für die Größe der untersuchten Partikel.

Das orthogonal zum Anregungslicht detektierte Seitwärts-Streulicht („side scatter“, SSC, bzw. „right angle light scatter“, RALS) lässt neben der Größe Rückschlüsse auf die Form und innere Struktur der gemessenen Partikel zu.

Als wichtige Parameter können Fluoreszenzemissionen detektiert werden, die von intrinsischen Farbstoffen der Zellen oder von experimentell zugeführten Reagenzien abhängen. Die getrennte Registrierung von mehreren, simultanen Fluoreszenzsignalen wird durch, auf die jeweilige Anwendung abgestimmte, Filter- und Spiegelsysteme erreicht. So lassen sich einzelnen Detektoren bestimmte Wellenlängenbereiche zuweisen.

#### Filter und Strahlteiler

Um nur die für die Messungen relevanten spektralen Bereiche zu erfassen, müssen unerwünschte Streu- und Fluoreszenzsignale ausgeschlossen werden, bevor sie auf die Photodetektoren treffen. Hierzu werden optische Filter benutzt. Man unterscheidet zwischen drei Filterarten:

- Kurzpassfilter: Sie sind durch eine obere Wellenlänge begrenzt, d.h. nur Licht bis zu einer bestimmten Wellenlänge kann den Filter passieren. Längerwelligeres Licht wird absorbiert.
- Bandpassfilter: Bandpassfilter selektieren ein Fenster eines bestimmten Wellenlängenbereichs, weisen also eine Unter- und Obergrenze im Bezug auf das gefilterte Licht auf.
- Langpassfilter: Langpassfilter lassen Licht über einer bestimmten Wellenlänge passieren, sie haben also eine untere Grenzwellenlänge, über der alles längerwelligere Licht durch den Filter treten kann.

Für die Verzweigung des Strahlengangs im Gerät und Aufteilung des emittierten Lichts in distinkte Wellenlängenbereiche werden dichroitische Spiegel als Strahlenteiler verwendet. Hierunter versteht man Interferenzfilter, die, wie Langpass- bzw. Kurzpassfilter, Licht oberhalb bzw. unterhalb einer bestimmten Wellenlänge passieren lassen und alles Licht mit einer geringeren bzw. höheren Frequenz reflektieren, und somit in eine andere Raumrichtung lenken.

#### Elektronische Verarbeitung der emittierten Signale

Als Detektoren für die emittierten Signale werden Photodioden und Photomultiplier verwendet. Photodioden, die selbst keinen verstärkenden Effekt ausüben, eignen sich besonders zur Aufzeichnung von starken Signalen, wie z.B. dem Vorwärtsstreulicht. In Photomultipliern werden durch die absorbierte Strahlung aus einer ersten Elektrode (Kathode) Elektronen freigesetzt, die dann mit Hilfe einer angelegten Spannung derart zur Anode beschleunigt werden, dass sie aus zwischengeschalteten weiteren Elektroden (Dynoden) Sekundär-Elektronen herausschlagen.

Durch das Hintereinanderschalten von mehreren Dynoden kann das Signal wesentlich verstärkt werden. Diese Verstärkung ist von der angelegten Spannung abhängig, so dass die Signalintensität (Impulshöhe) durch Variation dieser Spannung geregelt werden kann.

Photomultiplier eignen sich deshalb sehr gut für schwache Signale, wie sie z.B. Fluoreszenzsignale aus markierten Zellen darstellen. Die durch die Photodetektoren aufgenommenen Signale werden an die elektrische Konsole des Zytometers weitergeleitet und über Oszilloskope visualisiert. Über die Konsole erfolgt zudem die Steuerung der Signalerfassung.

Nach der Detektion liegen die Signale analog vor. Durch Analog-Digital-Konverter (ADC) werden sie digitalisiert und an einen, mit spezieller Programmsoftware ausgestatteten Computer weitergeleitet und gespeichert. Die endgültige Auswertung der Messdaten erfolgt mit Hilfe von speziell für die Durchflusszytometrie entwickelter Software.

#### **Darstellung und Weiterbearbeitung der ermittelten Daten**

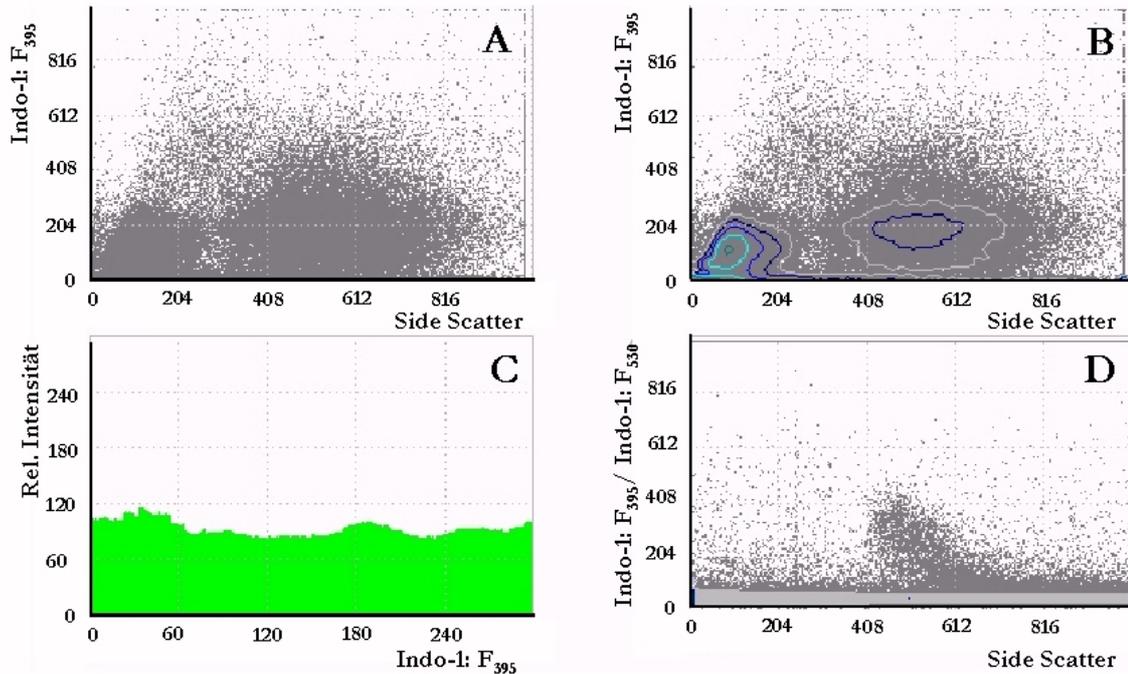
Die registrierten Daten können durch die Software des Durchflusszytometers (Lysis II <sup>TM</sup>) oder durch die Auswertesoftware DAS 4.40 [150] dargestellt und weiterbearbeitet werden.

Nach der Erfassung werden die Daten als Listmode-Files, also in Listenform, gespeichert.

Jedes Ergebnis (z.B. Messung an einer Zelle) wird darin mit maximal acht Koordinatenwerten charakterisiert, denen die ausgewählten Messparameter zugeordnet werden.

Für die Darstellung der gemessenen Streu- und Fluoreszenzparameter gibt es verschiedene Möglichkeiten:

- Die einfachste Form stellt der sogenannte Dot plot dar. Hierbei werden jeder gemessenen Zelle zwei Parameter zugeordnet und im kartesischen Koordinatensystem eingeordnet. In dieser Darstellung entspricht jeder Punkt einem Partikel.
- Eine erweiterte Form des Dot Plots ist der Contour Plot. In diesem geben Konturlinien Auskunft über die Dichteverteilung der auftretenden Ereignisse.
- Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Kinetik-Messungen wurden Dot Plots in Abhängigkeit von der Zeit betrachtet.
- Bei eindimensionalen Histogrammen werden die Signaldichten, also die relative Häufigkeit, mit der ein Signal auftritt, für einen Parameter auf der Ordinate aufintegriert. Die Intensität des Parameters entspricht dem Abszissenwert.
- Die Darstellung als Histogramm ist auch zweidimensional, also für zwei Parameter, möglich. Diese Art der Darstellung kam aber in der vorliegenden Arbeit nicht zur Anwendung.



**Abb. 18:** *Verschiedene Darstellungsarten bei der Verarbeitung der Durchflusszytometerdaten:  
Dot plot (A), Contour plot (B), Histogramm (C) und 2-Density plot (D).*

Mit Hilfe der Analyse-Software DAS können aus der Gesamtheit der dargestellten Ereignisse einzelne Gruppen mit wählbaren Eigenschaften gesondert untersucht werden. Um diese Unterpopulationen zu definieren, werden sie „graphisch gekennzeichnet“, indem man sogenannte „Gates“ setzt. Dies bedeutet, dass in einer zweidimensionalen Dot Plot-Darstellung Ereignisbereiche zu Gruppen zusammengefasst werden, deren Daten jeweils durch ein graphisches Gate bestimmter Nummer gekennzeichnet sind. Diese Gatenummern werden für jedes eingeschlossene Ereignis als Koordinate in das Listmode-File eingetragen.

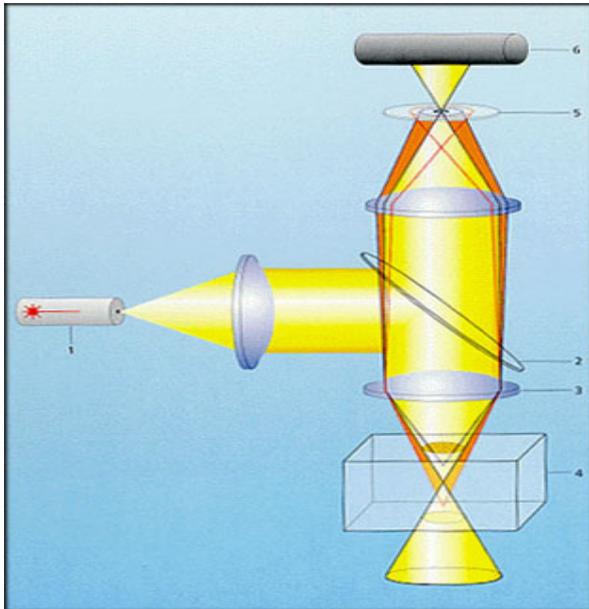
So lassen sich einem Parameter zugeordnete Ereignisse separat aufrufen, darstellen und weiteranalysieren. Dies stellt die Grundlage für die Populationsanalysen am Durchflusszytometer dar.

#### 1.4. Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)

Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie verfügt über eine sehr hohe räumliche Auflösung und niedrige Hintergrundintensität. Damit ist die Beobachtung besonders von subzellulären Strukturen, wie z.B. Mitochondrien, möglich.

### III. Methodische Grundlagen

Als Lichtquelle kommen, wie bei der Durchflusszytometrie, Laser zum Einsatz, die gegenüber herkömmlichen Quecksilberdampf lampen eine größere spektrale Reinheit und höhere Anregungsintensitäten aufweisen und auf kleine Querschnittsflächen fokussiert werden können. Diese enge Fokussierung erlaubt, dass die Probe punktuell mit dem Laserstrahl beleuchtet und mit Hilfe einer Scanningeinrichtung in der Betrachtungsebene abgetastet werden kann (X-Y-Scan). Das nach Anregung emittierte Licht der intrinsischen oder zugegebenen Fluoreszenzfarbstoffe wird über Photomultiplier detektiert. Vor die Photomultiplier sind Lochblenden (Pinholes) angeordnet, die zur Fokusebene konjugiert (konfokal) ausgerichtet sind. Diese blenden alles Fluoreszenzlicht, das außerhalb des Beobachtungspunktes der zu untersuchenden Objektebene liegt, aus. Diese enge Fokussierung erlaubt das untersuchte Objekt in Schichten (Schichtdicken  $\geq 0,5 \mu\text{m}$ ) zu analysieren (Z-Scan). Die mit dieser Technik und der nachfolgenden Analog-Digital-Umwandlung gewonnenen Daten werden als 512 x 512 Pixel-Bild im tif-File-Format gespeichert. Bei Mehrfachmarkierungen wird pro Farbe ein Bild aufgezeichnet. Diese Bilder können anschließend übereinandergelagert und zu einem mehrfarbigen RGB-tif-Bild angeordnet werden. Diese Bilder wurden zum Teil mit Graphik-Programmen weiterbearbeitet.



**Abb. 20: Das konfokale Prinzip:**  
Ein Laser (1) wird über einen Farbsplitter (2) durch das Objektiv des Mikroskops (3) auf die Probe (4) gelenkt und fokussiert. Das aus der Probe emittierte Licht wird durch einen Photomultiplier (6) detektiert. Eine konfokale Blende (Pinhole) (5) verhindert, dass Licht, das nicht aus der zu untersuchenden Ebene stammt, an den Detektor gelangt (aus [www.zeiss.de](http://www.zeiss.de)).

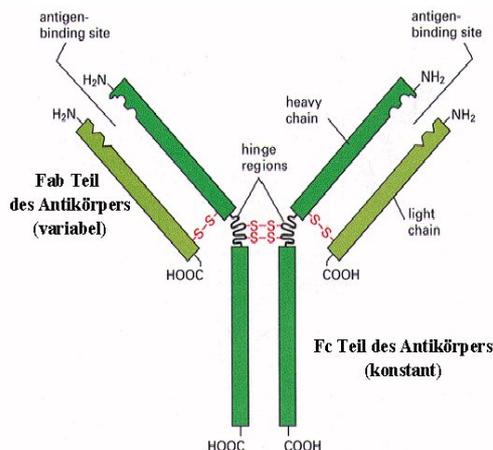
## 2. Lipidmediatoren-Messung

### 2.1. Grundlagen der immunologischen Methoden

Bereits 1890 stellten Emil von Bering und Shibasaburo Kitasato die These auf, dass lösliche Stoffe aus Krankheitserregern, die damals als Toxine bezeichnet wurden, die Bildung spezifischer Antitoxine im Organismus auslösen. Die Toxine werden heute als Antigene und die Antitoxine als Antikörper bezeichnet. Paul Ehrlich führte 1897 die ersten quantitativen Untersuchungen über Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen durch [151]. Die Antigen-Antikörper-Wechselwirkung macht man sich heute in immunochemischen Bestimmungsmethoden zunutze. Hierzu werden gezielt Antikörper gegen zu detektierende Stoffe hergestellt.

Antikörper entstammen alle einer Proteinfamilie, die als Immunglobuline (Ig) bezeichnet wird. Die Immunglobuline werden in 5 Klassen eingeteilt: IgG, IgM, IgA, IgD und IgE.

Die meisten immunochemischen Verfahren benutzen die IgG-Globuline. Abb. 21 zeigt die schematische Struktur eines IgG-Moleküls.



**Abb. 21:** Schematische Darstellung des Prototyps eines Ig-Moleküls:

Die Moleküle bestehen aus je zwei identischen schweren ( $M_r \approx 50$  kDa) und zwei leichten Ketten ( $M_r \approx 25$  kDa), die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die Ketten sind unterteilt in verschiedene Regionen. Die schweren Ketten werden in die  $V_H$ - und die  $C_H$ -Domänen und die leichten Ketten in die  $V_L$ - und  $C_L$ -Domänen eingeteilt. Hierbei steht H für „heavy“, also für einen Teil der schweren Kette und L für

„light“, also einer Zuordnung zur leichten Kette. C sagt aus, dass es sich um eine Peptidkette mit konstanter Aminosäuresequenz handelt. Die Regionen, die durch V gekennzeichnet sind, zeigen sich als sehr variabel in ihrer Aminosäuresequenz. Diese Variabilität ist bei den leichten und den schweren Ketten auf je drei verschiedene Regionen, die jeweils etwa 10 Aminosäuren umfassen, konzentriert. Diese Domänen bezeichnet man deshalb auch als hypervariable Regionen oder auch komplementaritätsbestimmende Abschnitte („complementary determining region“, CDR). Die CDRs enthalten die Aminosäuresequenz, welche die Antigenbindungsstelle, das sogenannte Paratop des Antikörpers auskleiden.

Die C-Domänen am C-terminalen Ende der schweren Kette üben die sogenannten Effektorfunktionen aus. Hierzu gehören z.B. die Bindung an spezifische Membranrezeptoren. Bei der Strukturanalyse der Antikörper hat man sich der gezielten proteolytischen Spaltung bedient. So erhält man nach Papain-Einwirkung zwei antigenbindende Fragmente (Fab-Fragmente). Die restlichen Teile der schweren Ketten kristallisieren leicht und werden deshalb  $F_c$ -Fragmente („fragment crystallizing“) genannt.

### III. Methodische Grundlagen

---

Zur Herstellung von Antikörpern gibt es zwei Möglichkeiten:

- 1) Das Immunogen wird mehrmals in ein Versuchstier injiziert, und anschließend das die Antikörper enthaltende Serum isoliert. Das gewonnene Antiserum enthält viele verschiedene Antikörperpopulationen, da es von verschiedenen antikörperproduzierenden Zellen synthetisiert worden ist. Auf eine solche Weise produzierte Antikörper werden polyklonal genannt.
- 2) Nach Injektion des Immunogens in das Versuchstier, meist einer Maus, werden die B-Lymphozyten aus der Milz isoliert. Diese B-Lymphozyten werden mit Zellen aus einer B-Lymphozyten-Zelllinie, welche selbst kein Ig produzieren können, zu Hybridomzellen fusioniert. Diese Hybridomzellen haben die Vorteile, dass sie potentiell unsterblich sind und als individuelle Klone gezüchtet werden können, von denen jeder Antikörper produziert, die nur gegen ein einziges Antigen gerichtet sind. Diese Antikörper werden als monoklonal bezeichnet, da sie nur von einer Gruppe identischer Zellen synthetisiert werden.

#### 2.2. Wirkungsprinzip des verwendeten Enzym-Immunoassays zur Detektion von Prostaglandin E<sub>2</sub>

Immunoassays liegt die Wechselwirkung zwischen dem Antigen und dem Antikörper zugrunde. Diese Wechselwirkung kann mit den folgenden Beziehungen beschrieben werden:



$$K = \frac{[K_{\text{ass}}]}{[K_{\text{diss}}]} = \frac{[AG-AK]}{[AG] * [AK]}$$

K = Affinitätskonstante [l/mol]

K<sub>ass</sub> = Assoziationskonstante

K<sub>diss</sub> = Dissoziationskonstante

[AK] = Konzentration des Antikörpers [mol/l]

[AG] = Konzentration des Antikörpers [mol/l]

[AG-AK] = Konzentration des Antigen-Antikörper-Komplexes [mol/l]

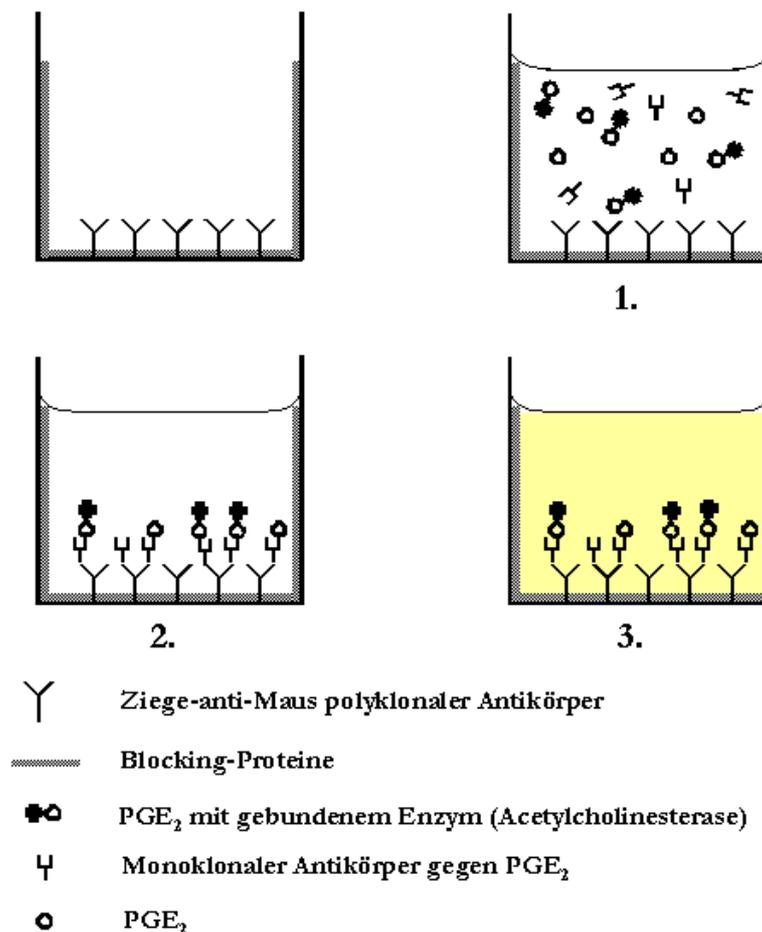
Es gibt verschiedene Arten der Immunoassays:

- Beim direkten Immunoassay werden zum Antigennachweis die Antigene irreversibel an den Träger gebunden und der zugegebene spezifische Antikörper direkt mit dem Tracer (meist ein Enzym) markiert.

### III. Methodische Grundlagen

- Im indirekten Immunoassay lässt man den spezifischen Antikörper mit dem Antigen reagieren und weist dann diesen durch einen markierten Zweitantikörper nach.
- Im kompetitiven Immunoassay lässt man ein Gemisch aus einer bekannten Menge des mit einem Enzym gekoppelten Antigens und eine unbekannte Menge des freien Antigens mit einem Antikörper reagieren, der an eine feste Phase gebunden ist.

Zur Untersuchung des intrazellulären  $\text{PGE}_2$  wurde eine Kombination der zwei zuletzt genannten Assays verwendet:



**Abb. 22:** Indirekter kompetitiver Enzym-Immunoassay zum Nachweis von  $\text{PGE}_2$   
Auf der Oberfläche der Inkubationsgefäße sind Ziege-anti-Maus-Antikörper adsorbiert. Die noch freien Bindungsstellen wurden mit einer sogenannten „Blocking“-Proteinlösung abgesättigt. In einem ersten Verfahrensschritt wird mit dem  $\text{PGE}_2$ -Enzym-Komplex (Tracer), dem monoklonalem Antikörper gegen  $\text{PGE}_2$  und der unbekannt Probe, bzw. einem Standard inkubiert (1.). Während der Inkubationszeit bilden sich Antikörper-Antigen-Komplexe aus. Im Folgenden werden die nicht gebundenen Reagenzien durch einen Waschschriff entfernt (2.). In einem dritten und letzten Arbeitsschritt erfolgt die Farbstoffentwicklung mit Ellmans Reagenz (3.).

Das verwendete kompetitive Immunoassay basiert auf der Konkurrenzreaktion zwischen freiem  $\text{PGE}_2$  und  $\text{PGE}_2$ -Acetylcholinesterasekonjugaten ( $\text{PGE}_2$ -Tracer) um eine begrenzte Anzahl von monoklonalen  $\text{PGE}_2$ -Antikörpern. Da die Konzentration der  $\text{PGE}_2$ -Acetylcholinesterasekonjugate im Rahmen des Assays konstant ist, ist die Anzahl der an  $\text{PGE}_2$ -Antikörper gebundenen Tracermoleküle umgekehrt proportional zu der Konzentration von freiem  $\text{PGE}_2$  im Ansatz. Die gebildeten Antikörper/ $\text{PGE}_2$ -Komplexe binden an die Ziege-anti-Maus-Antikörper, mit denen die Wells beschichtet sind.

Nachdem die Wells gewaschen wurden, um ungebundene Reagenzien zu entfernen, wird Ellmans Reagenz zu dem Ansatz gegeben. Dieses enthält Acetylcholin, das Substrat der Acetylcholinesterase, und 5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoat. Acetylcholin wird durch die Esterase zu Thiocholin hydrolysiert, das in einer nichtenzymatischen Reaktion mit 5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoat zu 5-Thio-2-nitrobenzoat reagiert. Letzteres ist eine gelbliche Verbindung, die stark Licht der Wellenlänge 412 nm absorbiert. Diese Reaktion wird zur Auswertung des Assays mit einem automatischen Lesegerät herangezogen.

Das in dieser Arbeit verwendete Enzym-Immunoassay hat gegenüber Radio-Immunoassays (RIA) den Vorteil, dass auf eine radioaktive Markierung verzichtet werden kann, was die Handhabung wesentlich erleichtert und die Entstehung von radioaktiven Abfällen vermeidet. Die verwendete Acetylcholinesterase zeichnet sich durch eine hohe pH-Stabilität (pH-Bereich 5-10) und hohe Umsetzungsraten (bis zu  $64000 \text{ s}^{-1}$ ) aus. Anders als z.B. die oft verwendete Meerrettich-Peroxidase unterliegt sie keiner Selbstinaktivierung während der Umsetzung des Substrates. Aufgrund der hohen Stabilität des Enzyms ist es möglich, die fertig pipettierten Platten vor der Auswertung über einen längeren Zeitraum zu lagern.

### 3. Zellmodelle

Für die durchgeführten Experimente wurden drei verschiedene Typen von Zellen verwendet:

Die humane T-Zelllinie Jurkat, die monozytäre Zelllinie J774A.1 aus der Maus und humane Leukozyten, die vor jedem Experiment frisch aus Vollblut isoliert wurden.

#### 3.1. Jurkat-Zellen

Jurkat-Zellen sind eine humane T-Zelllinie, die 1976 aus dem Blut eines 14-jährigen Jungen, der an akuter lymphoblastischer Leukämie litt, etabliert wurde [152]. Die Jurkat-Zellen wurden als leicht zu handhabende, bereits in Suspension wachsende Zellen zur Einführung in die Gerätebedienung und für Testzwecke herangezogen.

#### 3.2. J774.A1-Zelllinie

Bei der J774.A1-Zelllinie handelt es sich um eine monozytäre Zelllinie, die 1968 von Hirst und Kollegen [153] aus einer Maus, nach der künstlichen Auslösung von Tumoren, etabliert wurde. Die Zellen zeigen Makrophagen-ähnliche Eigenschaften im Bezug auf die Morphologie, die Phagozytose und die Zytotoxizität [154, 155]. Des Weiteren verfügen sie über Rezeptoren für Immunglobuline und sind in der Lage, nach Aktivierung durch Antikörper, Zielzellen zu zerstören [156]. Für die vorliegende Arbeit stellte sich das adhärenente Wachstum der Zellen als nachteilig heraus, da sie durch die für die Verwendung im Durchflusszytometer notwendige Ablöseprozedur eine Vorstimulation erfuhren, die sie für die meisten Versuche unbrauchbar werden lies. Die Zellen wurden hauptsächlich für ergänzende Versuche am CLSM eingesetzt.

#### 3.3. Humane Leukozyten

Leukozyten, isoliert aus dem Blut von menschlichen Spendern, dienten als wesentliches Modellsystem in dieser Arbeit.

Wie rote Blutkörperchen, die Erythrozyten, gehen auch weiße Blutkörperchen, die Leukozyten aus pluripotenten hämatopoetischen (blutbildenden) Stammzellen hervor. Aufgrund ihres lichtmikroskopischen Erscheinungsbildes werden die Leukozyten in drei Hauptklassen eingeteilt: Granulozyten und Monozyten (Zellen der unspezifischen Immunabwehr), sowie Lymphozyten (Zellen der spezifischen Abwehr).

Die Bezeichnung Granulozyten wurde aufgrund der hohen Anzahl von sekretorischen Vesikeln (Granula) und Lysosomen gewählt, die ein granuläres Erscheinungsbild bedingen. Granulozyten werden, wegen ihrer unterschiedlichen Anfärbungseigenschaften und Morphologie, ihrerseits wieder in drei Gruppen unterteilt:

- Die neutrophilen Granulozyten, die wegen ihres gelappten Zellkerns auch polymorphkernige Leukozyten genannt werden, sind anteilmäßig am stärksten (ca. 90%) unter den Granulozyten vertreten. Ihre vorrangige Aufgabe ist es, in den Körper eingedrungene Fremdorganismen, v.a. Bakterien, zu zerstören und zu phagozytieren. Hierfür steht ihnen ein großes Arsenal von unspezifischen Abwehrstoffen, wie z.B. reaktive Sauerstoffmetaboliten und abbauende Enzyme zur Verfügung.
- Die basophilen Granulozyten setzen Mediatoren (z.B. Histamin) frei und verursachen so Entzündungsvorgänge, indem sie andere Abwehrzellen anlocken.

### III. Methodische Grundlagen

---

- Die eosinophilen Granulozyten beteiligen sich an der Zerstörung von großen Parasiten, die nicht phagozytiert werden können. Diese werden mit Hilfe von kanalbildenden Proteinen, den sogenannten Perforinen, extrazellulär abgetötet.

Die Monozyten werden im Blut transportiert und reifen, nachdem sie die Blutbahn verlassen haben, zu Makrophagen. Neben den neutrophilen Granulozyten stellen sie die zweite Hauptgruppe der phagozytierenden Zellen dar. Wie bei den neutrophilen Granulozyten verschmilzt dabei das den Fremdkörper beinhaltende Phagosom mit zytoplasmatischen Vesikeln zum Phagolysosom, in dem dann Sauerstoffradikale und lysosomale Enzyme das Fremdmaterial zerstören. Makrophagen sind größer als Neutrophile und deshalb auch in der Lage, voluminösere Organismen, wie z.B. Protozoen zu umschließen.

Neben der Elimination von Partikel ist die zweite Hauptfunktion von Makrophagen und Granulozyten die Produktion von Mediatoren, die die Inflammation steuern. Als Beispiel seien die Prostaglandine genannt.

Granulozyten und Monozyten stellen die Zellen der unspezifischen oder auch angeborenen Abwehr dar, dies bedeutet, dass Fremdkörper, nach Begegnung mit einer solchen Zelle, direkt über generell wirksame Rezeptoren erkannt und angegriffen werden. Die unspezifische Abwehr ist für lokal begrenzte Infektionen ausreichend.

Bei ausgedehnteren Infektionen werden jedoch höhere Anforderungen an das Immunsystem gestellt. Hier ist es wichtig, dass die Zellen spezifisch gegen Krankheitserreger vorgehen können. Um dies zu gewährleisten zu können, verfügen die Zellen der spezifischen Abwehr, die Lymphozyten, über Rezeptoren, die ein hohes Maß an Variabilität aufweisen, um auf neue Fremdorganismen reagieren zu können. Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um Immunglobuline, die bereits unter „Methodische Grundlagen“ III.2.1 beschrieben wurden. Die Lymphozyten teilen sich in zwei Untergruppen ein: In die antikörperproduzierenden B-Lymphozyten und in die T-Lymphozyten, die die Aktivität anderer Leukozyten regulieren und körpereigene Zellen, die von Viren infiziert sind, abtöten.

Zusätzlich zu den genannten Lymphozyten-Hauptklassen gibt es Lymphozyten-ähnliche Zellen, die sog. natürlichen Killerzellen, die sich auf die Abtötung bestimmter Tumorzellen oder virus-infizierter Zellen spezialisiert haben.

Durch die Verwendung der humanen Leukozyten stand ein Zellmodell zur Verfügung, das deswegen aussagekräftig ist, weil es nicht aus einer Fremdspezies entnommen wurde und Zellen bzw. Vorstadien der Zellen involviert, die in die Retention von Umweltpartikel einbezogen waren.

#### 4. Verwendete Partikel

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, durch eine Auswahl von Partikel verschiedenen Fragestellungen gerecht zu werden. Zum einen sollte der Bogen gespannt werden von chemisch inerten Partikel, wie sie  $\text{TiO}_2$ -Teilchen darstellen, bis hin zu chemisch komplexen Partikel mit großen Oberflächen, wie die SRM1650-Teilchen. Zudem wurde ein Hauptaugenmerk auf ultrafeine Partikel gelegt.

##### 4.1. $\text{TiO}_2$ -Partikel

$\text{TiO}_2$ -Partikel wurden als Modell für chemisch inerte, einfach gebaute Teilchen verwendet.  $\text{TiO}_2$  wird in der Farbstoffchemie als Aufheller benutzt.  $\text{TiO}_2$  kann in zwei verschiedenen Kristallstrukturen vorliegen: als Anatas- oder Rutilform.  $\text{TiO}_2$  in Anatasform besteht aus tetragonalen, pyramidenförmigen Kristallen mit einer Dichte von  $3,8 - 3,9 \text{ g/cm}^3$ . Rutil ist prismatisch gebaut und mit  $4,2 - 4,3 \text{ g/cm}^3$  etwas schwerer als die Anatasform.

Laut Angaben des Herstellers bestehen die verwendeten  $\text{TiO}_2$ -Partikel zu 20 % aus Rutil- und zu 80 % aus Anatas-Kristallen. Durch die Verwendung von zwei Fraktionen von  $\text{TiO}_2$ -Teilchen mit unterschiedlichem Durchmesser, die aus dem gleichem Material bestehen, wurde es möglich, einen Vergleich zwischen feinen und ultrafeinen Teilchen zu ziehen.

Um abschätzen zu können, ob und in welchem Umfang Partikel in wässrigen Lösungen Agglomerate bilden, wurde am Modell der  $\text{TiO}_2$ -Partikel näherungsweise ihre Volumenverteilung durchflusszytometrisch untersucht. Die Ergebnisse sind unter „Ergebnisse und Diskussion“ VI.2. beschrieben.

##### Feine $\text{TiO}_2$ -Partikel

Feine  $\text{TiO}_2$ -Partikel wurden ursprünglich über Fisher Scientific (Springfield, NJ, USA) bezogen. Laut Hersteller haben sie einem mittleren Durchmesser von 250 nm und eine spezifische Oberfläche von  $6,5 \text{ m}^2/\text{g}$ .

##### Ultrafeine $\text{TiO}_2$ -Partikel

Ultrafeine  $\text{TiO}_2$ -Partikel, mit einem mittleren Durchmesser von 21 nm und einer spezifischen Oberfläche von  $50 \text{ m}^2/\text{g}$ , wurden von Degussa (Frankfurt/Deutschland) geliefert.

#### 4.2. EC-Partikel

Elemental carbon (EC)-Partikel wurden durch Funkenentladung erzeugt, wie dies bei Roth et al. [157] beschrieben ist. Diese Partikel weisen einen mittleren Durchmesser von 77 nm und eine spezifische Oberfläche von 750 m<sup>2</sup>/g auf. Diese Werte wurden mit Hilfe von Stickstoffabsorption ermittelt. Elementarer Kohlenstoff entsteht bei den meisten Verbrennungsprozessen in der Umwelt und stellt einen Trägerstoff für Umweltchemikalien dar.

#### 4.3. Printex-Partikel

Printex-Partikel (P90) werden als Toner für Laserdrucker und Kopierer vertrieben (Degussa, Frankfurt). Sie haben einen mittleren Durchmesser von 90 nm und eine spezifische Oberfläche von 300 m<sup>2</sup>/g. Als Verunreinigungen sind in den Partikel laut Hersteller 0,02 Vol.% Metalle und 0,7 – 1 Vol.% organische Verbindungen enthalten. Mit den Printex-Partikel wurde eine Teilchenfraktion mit in die Arbeit aufgenommen, die durch ihre Präsenz an vielen Arbeitsplätzen von hoher Relevanz ist.

Die TiO<sub>2</sub>-, EC- und Printex-Partikel wurden freundlicherweise von Hrn. Dr. Kreyling vom Institut für Inhalationsbiologie der GSF zur Verfügung gestellt.

#### 4.4. Standard Reference Material 1650 (Dieselstaub)

Es ist die komplexeste Teilchenfraktion, die in dieser Arbeit zur Anwendung kam. SRM wurde vom National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg, MD, USA) produziert und zertifiziert. Für die Produktion von SRM wurden vier Dieselmotoren unter Standardbedingungen betrieben. Das Material entspricht daher den in der Umwelt auftretenden Dieselstäuben. Es enthält eine Reihe von toxischen organischen Verbindungen, wie z.B. Anthracen-, Pyren- und Fluorenverbindungen. Das Zertifikat kann im Internet unter der Adresse [http://ois.nist.gov/srmcatalog/certificates/view\\_cert2.cfm?certificate=1650](http://ois.nist.gov/srmcatalog/certificates/view_cert2.cfm?certificate=1650) eingesehen werden. Standard Reference Material 1650 (SRM) wurde freundlicherweise von Hrn. Prof. Dr. Nießner vom Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie der TU München zur Verfügung gestellt.

#### 4.5. Staphylococcus aureus

Staphylococci wurden als natürliches Stimulans zur Aktivierung inflammatorischer Zellen in den Untersuchungen herangezogen. *Staphylococcus aureus* ist der Erreger der sogenannten Staphylokokkose, einer Infektionskrankheit, die in schweren Fällen zum Tod durch schwere Sepsis und Toxämie führen kann. Die Gefährlichkeit der Staphylococci liegt vor allem in ihrer Übertragbarkeit durch Nahrungsmittel. Sie bilden eine Anzahl Exo- und Endotoxine aus, von denen Letztere sehr thermostabil sind und selbst nach einer Stunde Erhitzen auf 125°C noch nicht zerstört werden können [158].

#### 5. Verwendete Stimulantien

##### 5.1. TBT

Organo-Zinn-Verbindungen finden eine breite Anwendung als Konservierungsmittel für Holz, Antifouling-Anstrichen bei Schiffen, als Pestizide und als Desinfektionsmittel in Kühlwasserkreisläufen [159, 160]. Die jährliche Produktion dieser Verbindungen ist von 500 Tonnen im Jahre 1950 auf über 50.000 Tonnen im Jahre 1986 angestiegen [161]. Mittlerweile können diese Stoffe in vielen marinen und limnischen Ökosystemen nachgewiesen werden [159, 162] und stellen ein xenotoxisches Gefahrenpotential dar.

Der prominenteste Vertreter der Organo-Zinn-Verbindungen ist Tri-n-Butylzinn (TBT, Strukturformel:  $(\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2)_3\text{-Sn-O-Sn-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3)_3$ ), besonders seit es als Desinfektionsmittel für die T-Shirts des amerikanischen Herstellers Nike in die Medien gekommen ist:

TBT zeigt eine vielfältige Wirkung auf Zellen. So greift es in den  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt der Zelle ein, indem es die Freisetzung von intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus Sequestorkompartimenten fördert, den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen über die Zellmembran aktiviert und den Ausstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus der Zelle hemmt, wie Chow und Kollegen an Thymozyten festgestellt haben [163]. Des Weiteren wird der intrazelluläre pH-Wert durch TBT gesenkt [164]. Durch Hemmung der  $\text{F}_1\text{F}_0\text{ATPase}$  stört TBT auch nachhaltig den Energiehaushalt der Zelle. TBT ist in bestimmten Konzentrationen ein Apoptose-Inducer, wie in einigen Arbeiten nachgewiesen werden konnte. Es verursacht die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien [165] und die Aktivierung von Caspasen [166].

In dieser Arbeit wurde TBT als Stimulans für intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten und zur Auslösung von Apoptose verwendet.

#### 5.2. fMLP

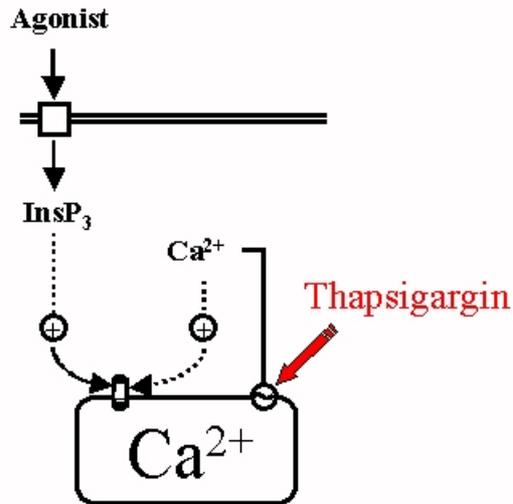
Formylierte Peptide aus Bakterien sind einer der Hauptstimuli für die Aktivierung von Granulozyten und Makrophagen [167, 168]. Im Unterschied zu der Biosynthese von Proteinen in Säugetierzellen, in der meist ein nicht modifiziertes Methionin die erste Aminosäure der synthetisierten Kette ist, wird in Bakterienproteine ein formyliertes Methionin eingebaut.

In diesen Untersuchungen wurde das Peptid fMLP (n-formyl-Met-Leu-Phe) als rezeptorvermitteltes Stimulans benutzt. Von ihm ist bekannt, dass es einen starken Anstieg der intrazellulären freien Calciumkonzentration [167] auslöst. Dieser Anstieg wird durch eine Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären Speicherkompartimenten erreicht, in deren Membran Ionenkanäle durch  $\text{IP}_3$  aktiviert und geöffnet worden sind.

#### 5.3. Thapsigargin

Thapsigargin ist ein Sesquiterpen-Lacton, das aus der Pflanze *Thapsia garganica* L. (Fam. Apiaceae) isoliert wurde und dem eine Funktion als Tumorpromotor zugeschrieben wird [169]. Hier ist Thapsigargin von Interesse, da es in den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt eingreift, wie in einer Vielzahl von Arbeiten gezeigt werden konnte.

Thapsigargin erhöht die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, indem es spezifisch die ATP-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen in der Membran des endoplasmatischen Reticulums und der Calcisomen hemmt [169, 170]. Dies geschieht über einen Stoffwechselweg, der Inositol-1,4,5-trisphosphat nicht involviert [169].  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen in der Plasmamembran sind von dieser Inhibierung nicht betroffen. Der durch Hemmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen bedingte Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird zusätzlich dadurch verstärkt, dass  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen selbst die Freisetzung von weiterem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen über Kanäle in den Membranen der Sequestorkompartimente induzieren (positive Rückkopplung).



**Abb. 23:** *Wirkungsweise von Thapsigargin:*  
*Thapsigargin hebt den intrazellulären Gehalt an freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch Hemmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen in den Membranen von Sequestorkompartimenten.*

Thapsigargin wurde in der vorliegenden Arbeit als unspezifischer intrazellulärer Stimulus zur Erzeugung von stationären  $\text{Ca}^{2+}$ -Niveaus in der Zelle benutzt.

### IV. Ergebnisse und Diskussion

#### 1. Entwicklung und Optimierung von Methoden

Im ersten Abschnitt des Kapitels IV. „Ergebnisse und Methoden“ werden die methodischen Innovationen und Verbesserungen besprochen, die nötig waren, um die Untersuchungen dieser Arbeit mit der nötigen Genauigkeit und Reproduzierbarkeit zu ermöglichen.

##### 1.1. Zellkulturen

Die Gewinnung ausreichender Mengen von humanen Versuchszellen in guter Kondition stellt die Grundlage für alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche dar.

Wie unter Abschnitt 3. des Kapitels „Methodische Grundlagen“ bereits beschrieben, wurden für diese Untersuchungen drei verschiedene Zellmodelle verwendet.

Für die Kultivierung der Jurkat-Zelllinie wurde ein bereits vorhandenes Protokoll herangezogen (siehe „Experimenteller Teil“ VII.2.2.), das gute Zellausbeuten erbrachte ( $93 \pm 7$  % lebende Zellen, ermittelt mit der Trypanblau-Methode; Anzahl der Auszählungen: 10).

Methodische Verbesserungen waren jedoch bei den beiden anderen Zellsystemen notwendig:

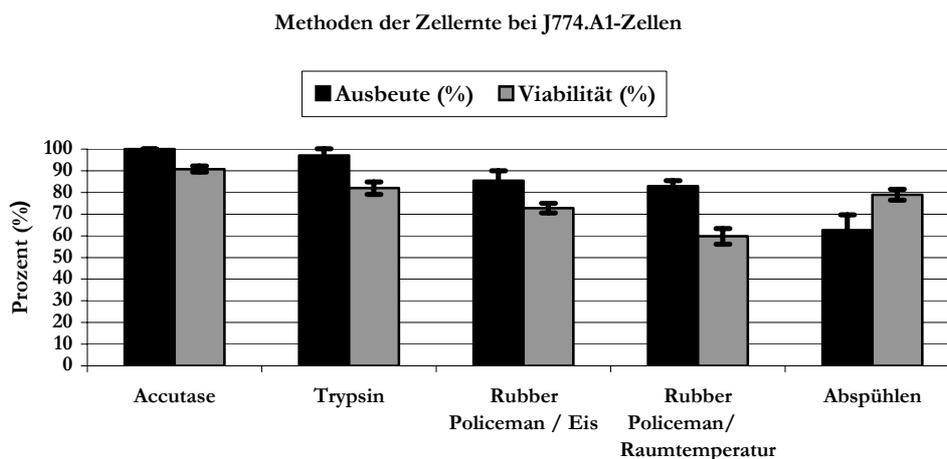
So stellten bei Verwendung der J774A.1-Zellen deren Adhärenz und ihre Ernte aus den Kulturschalen für Suspensionsexperimente ein Problem dar. Zudem musste die Isolation der Leukozyten aus dem Vollblut sehr schonend durchgeführt werden, um eine schwache, intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Stimulierung zu unterdrücken.

##### 1.1.1. Kultivierung und Verwendung der J774A.1-Zelllinie

###### Adhärenz: Vergleich verschiedener Zellernte-Methoden

Bei der J774A.1-Zelllinie handelt es sich um eine adhärent wachsende Monozyten-Makrophagen-Zelllinie (siehe „Methodische Grundlagen“ III.3.2.). Um die Zellen weiter passagieren oder im Durchflusszytometer untersuchen zu können, müssen sie vorher von ihrer Unterlage abgelöst werden. Durch diesen Arbeitsschritt wird die Membran dieser Zellen beschädigt, und so auch ihre physiologische Funktionalität beeinträchtigt. Die folgende Abbildung 24 zeigt einen Vergleich zwischen verschiedenen getesteten Methoden, um die angewachsenen Zellen von ihrer Unterlage zu entfernen.

#### IV. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 24:** *Auswirkungen der Zellernte auf die Ausbeute und die Viabilität bei J774A.1-Zellen.*

*Die höchste Ausbeute, die durch die Verwendung von Accutase<sup>TM</sup> erreicht wurde, wird in dieser Abbildung als 100 % gesetzt. Die Viabilität der Zellen wurde mit der Trypanblau-Methode ermittelt (n=4).*

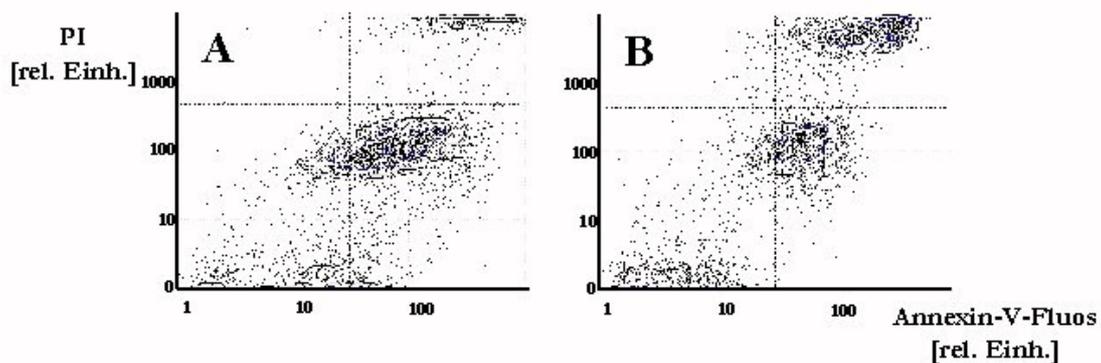
Abbildung 24 lässt erkennen, dass die Methoden, bei denen die Zellen durch die Einwirkung von Enzymen vom Untergrund abgelöst und anschließend abgespült werden, die Methoden der Wahl sind, auf Ausbeute, wie auch auf Viabilität der Zellen bezogen. Die Gewinnung der Zellen mit Hilfe eines Plastik-Werkzeuges („Rubber-Policeman“) liefert zwar relativ gute Ausbeuten, beansprucht aber die Zellen durch die einwirkenden Scherkräfte so stark, dass die Viabilität der Zellen erheblich reduziert ist. Diese Reduktion kann abgemildert werden, indem man die Zellen vor ihrer Ablösung mit dem Werkzeug für einige Minuten auf Eis stellt. Dies führt zu einer schonenderen Loslösung der Zellen. Das bloße Abspülen der Zellen von der Unterlage mit der Pipette wirkt sich vergleichsweise positiv auf den physiologischen Zustand der Zellen aus, jedoch erhält man hier die niedrigsten Ausbeuten.

*Für die Kultivierung der J774A.1-Zelllinie wurde in dieser Arbeit Accutase<sup>TM</sup> (Mischung aus proteolytischen und collagenolytischen Enzymen aus Invertebraten, PAA Laboratories, Cölbe) verwendet, da diese Methode nachweislich die besten Zellausbeuten und die schonendste Behandlung der Zellen liefert.*

##### Verwendung der J774A.1-Zelllinie für Messungen im Durchflusszytometer

Das Hauptproblem bei der Verwendung der J774A.1-Zelllinie ist die Schädigung der Zellen durch die Ablösung vom Untergrund, auf dem sie wachsen. Dies wirkt sich besonders bei der Anwendung des Annexin-V-Assays auf die J774A.1-Zellen im Durchflusszytometer aus.

Wie die folgende Abbildung 25 veranschaulicht, zeigen die Zellen bereits bei den Kontrollmessungen (A) ein stark positives Annexin-Signal, was auf eine Vorschädigung der Membran schließen lässt, da das plasmaseitig in die Membran eingelagerte Phosphatidylserin bereits für die Annexinbindung zur Verfügung steht. Nach Stimulation mit TBT (1  $\mu$ M) wird ein Teil der Zellen sehr schnell ( $\Delta t = 5$  min) spätapoptotisch bzw. nekrotisch (Einstrom von PI in die Zellen, siehe auch „Methodische Grundlagen“ III.1.2.4.), während in intakten Zellsystemen diese TBT-Konzentration nur Apoptose auszulösen vermag.



**Abb. 25:** Verwendung des Annexin-V-Assays bei J774A.1-Zellen im Durchflusszytometer.

Deutlich zu erkennen ist das hohe Annexin-V-Fluos-Signal unmittelbar nach Anfärbung der unstimulierten Zellen (A). Dies lässt auf eine starke Vorschädigung begleitet von einem Verlust der Membranintegrität der Zellen schließen. (B) dokumentiert den Zustand der Zellen nach 5 min TBT-Einwirkung (1  $\mu$ M). Bereits nach dieser kurzen Zeit geht ein großer Teil der Zellen in den nekrotischen Zustand über (PI-Einstrom in Folge schwerer Membranschädigungen).

Aufgrund dieser Befunde wurde die J774A.1-Zelllinie nicht als Hauptzellmodell verwendet. Sie wurde nur in Vorversuchen für die Mitochondrienmembranpotential-Messungen mit JC-1 und als adhärentes System für begleitende Untersuchungen am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) eingesetzt. Dafür erfolgte die Kultivierung der Zellen direkt auf Deckgläsern.

Die Untersuchungen zur Verwendung der J774A.1-Zelllinie für Messungen im Durchflusszytometer haben gezeigt, dass diese adhärent wachsenden Zellen durch ihre, für diese Methode notwendige Ablösung eine starke Vorschädigung erfahren, die sie für Experimente, in denen zelluläre Stressreaktionen gemessen werden, unbrauchbar werden lässt.

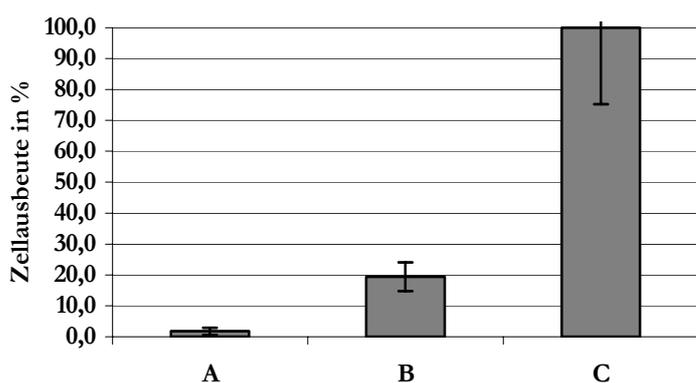
### 1.1.2. Kultivierung und Verwendung der Leukozyten

#### Verbesserung des Isolationsprotokolls für Leukozyten aus Vollblut

Die Leukozyten wurden aus dem Vollblut gemäß einem Protokoll isoliert, dem die Verfahrensanweisung für den verwendeten Isolationsgradienten „Polymorphprep<sup>TM</sup>“ zu Grunde liegt (siehe „Experimenteller Teil“ VII.2.4.). Um ausreichende Menge und Qualität an Zellmaterial zu erhalten, mussten einige Schritte des Protokolls modifiziert werden.

Zum Einen erwies sich die Verwendung von vorevakuierten und vorheparinisierten Spritzen vom Typ „Vacutainer<sup>TM</sup>“ als nachteilig, da durch den schnellen Einstrom in die evakuierten Entnahmegefäße die Zellen Stöße und Volumenänderungen erfuhren, die im Zellplasma zu erhöhten  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen führten, der Vorstimulation entsprachen. Des Weiteren war die in den „Vacutainer<sup>TM</sup>“-Spritzen vorhandene Heparinmenge zu niedrig, so dass es im Laufe des Isolationsverfahrens zur Koagulation der Zellen und somit zu einer deutlichen Verringerung der Zellausbeute kam. Eine Verbesserung stellte die Verwendung von 20ml-Einwegspritzen dar, in die 1,0 ml Heparin vorgelegt wurden.

Eine weitere Steigerung der Zellausbeute brachte die Resuspension der Zellen in verdünntem RPMI 1640 (1:1-Verdünnung mit Aqua<sub>bidesi</sub>) nach der Auftrennung über den Gradienten. Dadurch wurde der osmotische Druck, der durch den Ficoll-Gradienten auf die Zellen wirkt, abgemildert.



**Abb. 26: Verbesserung der Zellausbeute durch Modifikation des Isolationsprotokolls (n = 5).**

*A: Verwendung von „Vacutainer<sup>TM</sup>“-Gefäßen zur Blutentnahme*

*B: Verwendung von Braun<sup>®</sup> Leichtlaufspritzen mit 1 ml Heparin*

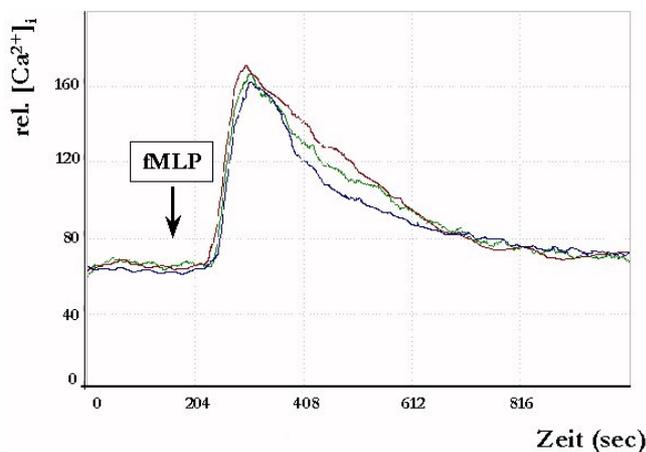
*C: Resuspension der Zellen nach dem Ficoll-Gradienten in verdünntem RPMI 1640*

Wie Abbildung 26 zeigt, konnte durch die Modifikation des vom Hersteller des Ficoll-Gradienten empfohlenen Isolationsprotokolls eine deutliche Steigerung der Ausbeute an Leukozyten erreicht werden. Durch diese methodische Verbesserung war es erst möglich, dieses Zellmodell für die vorliegende Arbeit überhaupt zu verwenden.

### Charakterisierung des Zellmaterials

Die Isolation der Leukozyten aus Vollblut involviert das Problem der Spendervariation, d.h. bedingt durch verschiedene Blutspender und jeweils unterschiedliche Tageskonstitution können sich die Zusammensetzung und die Sensibilität der gewonnenen Zellen unterscheiden. Diese Variabilität wurde in der vorliegenden Arbeit eingegrenzt, indem für die relevanten Experimente immer Blut von dem selben Spender verwendet wurde.

Um die Qualität und Reaktivität der Zellen beurteilen zu können, wurden den durchflusszytometrischen Untersuchungen der Partikelwirkung auf  $[Ca^{2+}]_i$  ein Vitaltest vorausgestellt, der die  $Ca^{2+}$ -Kinetik von fMLP stimulierten Leukozyten als Standardreaktion benutzte.



**Abb. 27: Vitaltests mit fMLP**  
(Intrazellulärer Calciumgehalt als Funktion der Zeit, gemessen mit der Indo-1-AM-Ratio-Methode, Versuchsbedingungen: RPMI ohne Phenolrot und FCS, Indo-1-AM: 5  $\mu$ M, 37°C.)

Wie in Abbildung 27 zu erkennen ist, zeigen diese Vitaltests für Zellmaterial aus dem gesunden Spender gut reproduzierbare Calciumamplituden nach Stimulierung durch fMLP. So kann dieser Test zur Verifizierung für normal reagierende Zellen herangezogen werden.

*Es wurde ein schonendes Isolationsprotokoll für die Gewinnung von Leukozyten aus Vollblut entwickelt, mit dem die Ausbeute gegenüber herkömmlichen Verfahren deutlich gesteigert werden konnte. Die Überprüfung der Vitalität anhand der  $Ca^{2+}$ -Kinetik in mit fMLP stimulierten Leukozyten stellt eine gute Methode dar, die Qualität und Reaktivität der isolierten Zellen zu beurteilen.*

### 1.1.3 Diskussion der Zellmodelle und Schlussfolgerung

In dieser Arbeit sollen Zellmodelle verwendet werden, die in ihrem Typus und in ihren physiologischen Parametern Zellen entsprechen, die in der Lunge eine inflammatorische Funktion ausüben.

Die Jurkat-Zelllinie wurde daher nur für die Einführung der durchflusszytometrischen Methoden benutzt, da sie als in Suspension wachsende Zelllinie leicht zu kultivieren ist und mit ihr in der Durchflusszytometrie viele Methoden dokumentiert werden. Als T-Zelllinie besitzt sie jedoch nicht alle Anlagen, die für die Nutzung als Zellmodell in dieser Arbeit nötig sind, wie z.B. den Respiratory Burst. So wurde von einer weiteren Verwendung abgesehen.

Als weiterführendes Zellmodell wurde die J774A.1-Zelllinie kultiviert und getestet, die als Makrophagen-/Monozytenzelllinie Fähigkeiten haben, die denen von Alveolarmakrophagen entsprechen [154, 155, 156]. Weitere Vorteile wären eine gute Verfügbarkeit und die Möglichkeit einer andauernden Kultivierung, was Langzeitbeobachtungen mit identischem Material gestatten würde. Es hat sich jedoch gezeigt, dass diese adhärent wachsenden Zellen durch die für durchflusszytometrische Untersuchungen nötige Überführung in Suspension geschädigt und damit für die weitere Untersuchung unbrauchbar werden.

Daher wurden diese Zellen für Vorversuche und ergänzende Arbeiten am CLSM verwendet, bei denen eine Ablösung der Zellen nicht nötig war.

Ein weiterer Nachteil der J774A.1-Zellen ist, dass diese Zelllinie aus der Maus kultiviert wurde, so dass eine Interpretation ihrer Reaktion und deren Übertragbarkeit auf Vorgänge in menschlichen Zellen kritisch zu betrachten sind.

Als relevantes Zellmodell wurden aus Vollblut isolierte humane Leukozyten genutzt, von denen u.a. die Monozyten und die neutrophilen Granulozyten, als Abwehrzellen in den respiratorischen Trakt einwandern. Mit den oben beschriebenen Modifikationen des Isolationsprotokolls und den Begleitexperimenten konnten die Leukozyten als aussagekräftiges Zellmodell etabliert werden. Die Nachteile dieses Modells liegen v.a. in der kurzen Nutzungsdauer von nur ca. sieben Stunden nach Isolation (siehe „Ergebnisse und Diskussion“ IV.4.3.1.) und, verglichen mit Zelllinien, im hohen Aufwand zur Gewinnung der Zellen. Eine Möglichkeit, die Nutzungsdauer der Zellen weiter auszudehnen, wäre die Kultivierung der Blutmonozyten.

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Allerdings wäre auch hier mit ähnlichen Schwierigkeiten zu rechnen, wie sie für die J774A.1-Zelllinie beschrieben wurden, da die Monozyten auch als adhärenente Kultur wachsen.

Das beste Zellmodell würden natürlich Zellen darstellen, die aus Lavagen der Lunge von gesunden Menschen stammen. Solche Zellen standen jedoch aufgrund des hohen organisatorischen und medizinischen Aufwands, den eine Beschaffung erfordern würde, nicht zur Verfügung.

### 1.2. Analysetechniken

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es notwendig, die drei wichtigen Subpopulationen der Leukozytenfraktion durch geeignete Wahl von Streu- bzw. Fluoreszenzsignalen zu trennen, um für die Quantifizierung der Zellreaktionen ein eindeutiges „Gating“ (siehe „Methodische Grundlagen“ III.1.3.2.) zu garantieren.

Zudem waren zur Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials mit dem Farbstoff JC-1 die relevanten Parameter im Spektralphotometer zu untersuchen, um die Methode für den Einsatz im Durchflusszytometer zu optimieren.

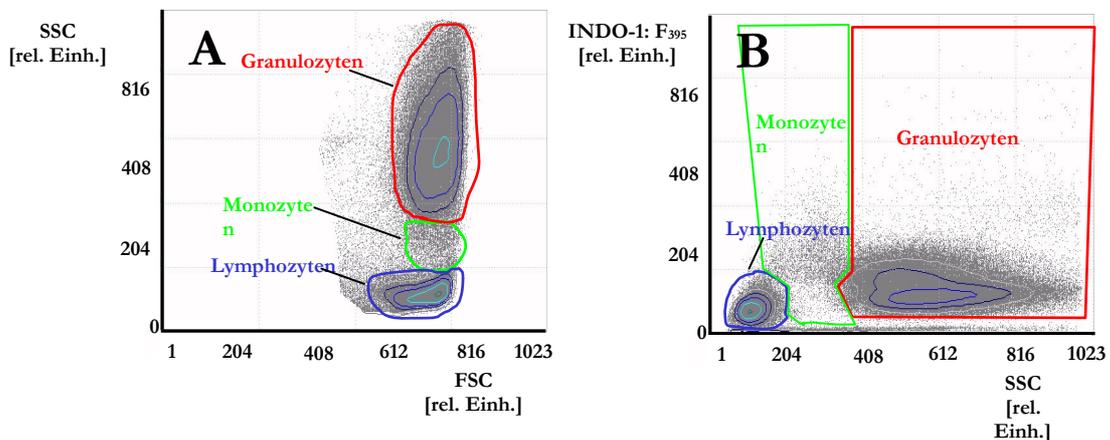
#### 1.2.1. Vergleich von durchflusszytometrischen Populationsanalysemethoden

Im herkömmlichen durchflusszytometrischen Verfahren zur Unterscheidung von Leukozyten werden Größe (FSC) und Granularität (SSC) zweidimensional dargestellt. Dieses Verfahren hat den Nachteil, dass die Monozyten in dieser Dotplot-Darstellung überlappend zwischen den Lymphozyten und den Granulozyten liegen und v.a. von den Granulozyten nicht deutlich abgegrenzt sind (siehe Abbildung 28). Ein weiteres Problem dieser Art der Populationsanalyse besteht darin, dass, bei gleichzeitigem Vorhandensein von Debris, Partikel und Zellen in der Suspension, die Partikel bei ausreichender Größe und Granularität als Zellen interpretiert werden könnten.

Durch die Anwendung der Populationsauftrennung nach Grundler et al. [171], bei der die Granularität (SSC) und der intrazelluläre Calciumgehalt der Zellen (Indo-1-AM-Methode) als Parameter herangezogen werden, können die beiden angesprochenen Probleme umgangen werden.

## IV. Ergebnisse und Diskussion

Man erhält eine bessere Trennung der einzelnen Zellpopulationen, und da die in der zu untersuchenden Zellsuspension befindlichen Partikel kein Calcium enthalten, gehen diese nicht mit in die Messungen ein.



**Abb. 28:** Vergleich der durchflusszytometrischen Populationsanalysen über FSC/SSC- (A) und Indo-1-AM/SSC-Dotplotdarstellung (B).

Deutlich erkennt man die bessere Auftrennung der Zellpopulationen über die Parameter intrazelluläres Calcium und Granularität. Besonders die Monozyten, die zahlenmäßig schwächste Zellfraktion, können bei der FSC/SSC-Methode schwer erfasst werden, da sie teilweise mit den Lymphozyten und Granulozyten überlappen. Debris und tote Zellen sind in (B) ohne Indo-1-Signal auf die Abszisse gedrängt und aus den Gates ausgeschlossen.

Die durchflusszytometrische Populationsanalyse von Leukozyten über den intrazellulären Calciumgehalt und die Granularität der Zellen bietet gegenüber der üblichen Auftrennung der Subpopulationen nach Größe und Granularität die Vorteile einer besseren Erfassung der einzelnen Zellfraktionen und der Möglichkeit, lebende Zellen von Debris oder von als Stimulans eingesetzten Partikel zu unterscheiden.

### 1.2.2. Mitochondrien-Membran-Potential-Messung mit JC-1

Zur Messung des Mitochondrien-Membran-Potentials wurde das lipophile kationische Carbocyanin JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetra-ethylbenzimidazolylcarbocyanin-jodid) verwendet (siehe „Methodische Grundlagen“ III.1.2.5.), das bei niedrigen Konzentrationen oder niedrigem Membranpotential als Monomer vorliegt und eine grüne Fluoreszenz (527 nm) emittiert.

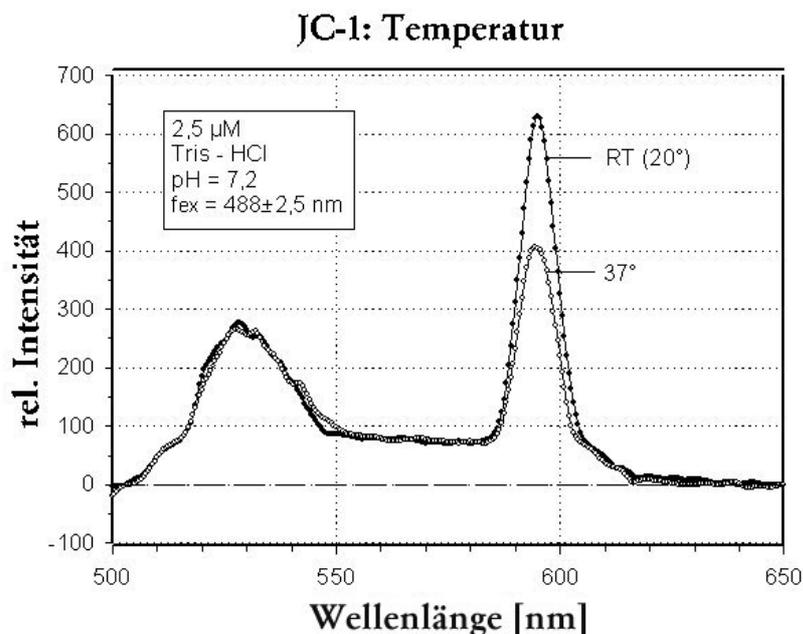
#### IV. Ergebnisse und Diskussion

Bei höherer Konzentration und/oder höheren Membranpotentialen bildet der Farbstoff ein weiteres Emissionsmaximum im roten Bereich (590 nm) aus.

Dieses resultiert aus einer Interaktion zwischen einer Vielzahl von Monomeren, die sogenannte J-Aggregate ausformen. Die Ausbildung der J-Aggregate ist abhängig von der Temperatur, dem pH-Wert, und der Konzentration des Farbstoffes. Um den Farbstoff optimal einsetzen zu können, wurden diese Parameter eingehender untersucht.

##### **Einfluss der Umgebungstemperatur auf die Ausbildung von J-Aggregaten**

Um die Auswirkung der Temperatur auf die Formation von J-Aggregaten abschätzen zu können, wurden die Emissionsspektren (Anregung 488 nm) von JC-1 bei 37°C und bei Raumtemperatur im Fluoreszenzspektrometer gemessen.



*Abb.29: Temperaturabhängigkeit von JC-1. Der Peak mit dem Maximum bei 527 nm entspricht den Monomeren und der Peak mit dem Maximum bei 590 nm den J-Aggregaten von JC-1 (Anregung  $488 \pm 2,5$  nm, zellfreies Medium, pH 7,2).*

Aus Abbildung 29 wird der starke Einfluss der Temperatur auf die Ausbildung von J-Aggregaten deutlich. Das Maximum der Intensität bei 590 nm ist, wenn bei 37°C gemessen, im Vergleich zu der Messung bei Raumtemperatur reduziert, aber noch deutlich ausgeprägt. Eine Erklärung hierfür ist die Zunahme der kinetischen Energie der Farbstoffmoleküle durch die Brown'sche Molekularbewegung bei Erhöhung der Temperatur.

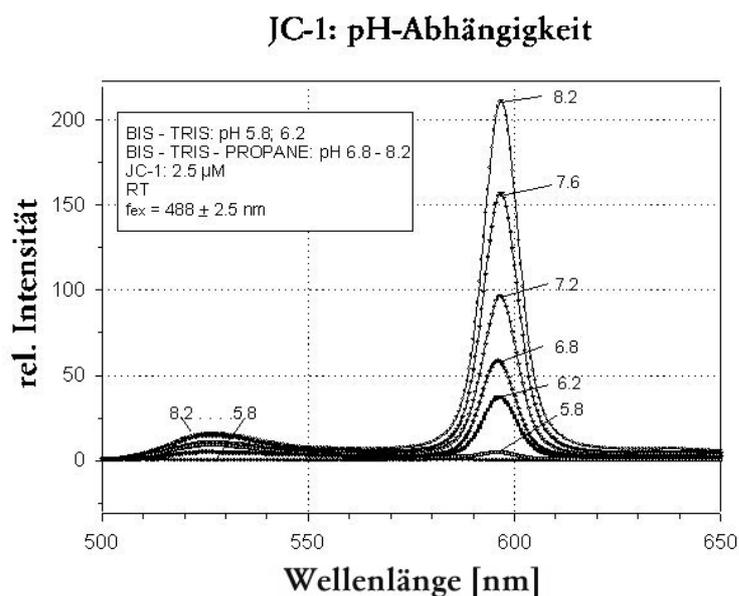
#### IV. Ergebnisse und Diskussion

Dadurch wird eine gerichtete Anordnung der kationischen Monomere und damit die Ausbildung von J-Aggregaten in der Umgebung von negativen Ladungen erschwert. Diese Beobachtung belegt die Notwendigkeit einer exakten Temperaturregelung im Experiment. Um physiologische Verhältnisse zu simulieren, wurden alle Versuche mit Zellen bei 37°C durchgeführt.

In den durchflusszytometrischen Experimenten wurde die Temperaturkonstanz durch die Verwendung eines temperierten Probenhalters gewährleistet, der eigens für Langzeitexperimente konzipiert wurde (siehe „Experimenteller Teil“ VII.6.3.1.).

#### Einfluss des pH-Wertes auf die Ausbildung von J-Aggregaten

Der pH-Wert wirkt sich in zweifacher Art auf den Farbstoff JC-1 aus. Zum Einen ist für die Ausbildung der J-Aggregate eine Stabilisierung der kationischen Formation durch negative Ladungen erforderlich [146], deren Felder bei niedrigem pH-Wert durch die hohe Konzentration von H<sup>+</sup>-Ionen teilweise abgeschirmt werden. Des Weiteren können sich durch Protonierung der Monomere nicht fluoreszierende Moleküle ausbilden, so dass niedrigere Emissionsintensitäten auftreten sollten als bei intakten JC-1-Monomeren. Um die pH-Abhängigkeit von JC-1 zu untersuchen, wurde der Farbstoff in zellfreien Pufferlösungen mit unterschiedlichen pH-Werten gelöst und im Fluoreszenzspektrometer die Emissionsspektren gemessen. Die verwendete Konzentration (2,5 µM) wurde hinreichend hoch gewählt, um deutliche Signale zu erhalten.



**Abb. 30: pH-Abhängigkeit von JC-1.**  
(Anregung 488 nm, Spaltbreite 5 nm, zellfreies Medium, 37°C)

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Die Abbildung 30 zeigt, dass sowohl die Monomere (530 nm) als auch die J-Aggregate (590 nm) bei dem höchsten gemessenen pH-Wert von 8,2 ihre maximalen Fluoreszenzintensitäten erreichen. Je höher der pH-Wert ist, desto weniger JC-1-Moleküle liegen in ihrer protonierten Form vor.

Bei pH 5,8 hingegen reduzieren sich die Intensitäten beider Emissionslinien drastisch. Der zweite pH-Effekt (Abschirmung von negativen Ladungen) wirkt sich zusätzlich auf die 590nm-Emission aus und erlaubt bei hohem pH-Wert besonders die Polymerenbildung.

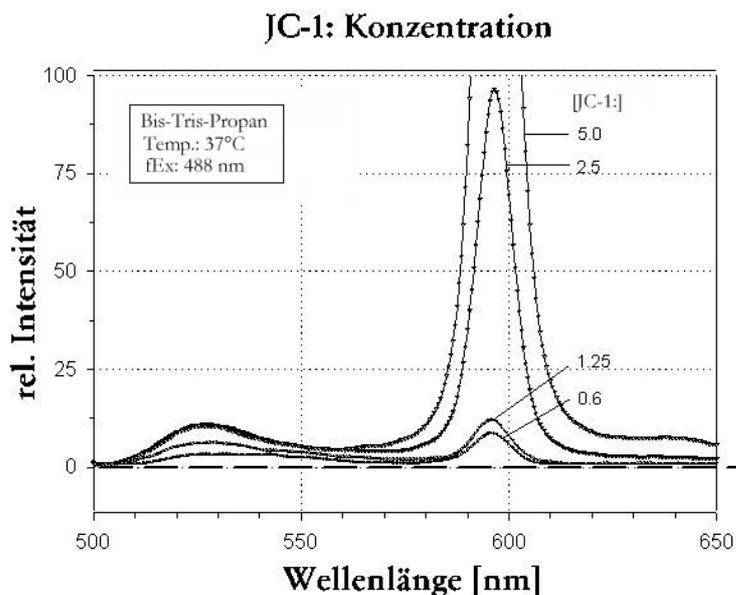
In den Experimenten mit Zellen gelten folgende pH-Verhältnisse: Frisches RPMI 1640-Medium hat einen pH-Wert von ca. 7,2. Dieser entspricht ungefähr dem pH-Wert, der im Zytosol der Zellen vorliegt (7,0 – 7,2) [59]. Der pH-Wert in den Mitochondrien wird in der Literatur mit 8,2 angegeben [144, 147]. Im Medium und im Zytosol liegt also im Vergleich zu den Mitochondrien ein höherer Anteil an protonierten, nichtfluoreszenten Farbstoffmolekülen vor, die eine Ladung von +2 aufweisen. Wie bereits in „Methodische Grundlagen“ III.1.2.5. beschrieben, verteilen sich die monomeren Farbstoffmoleküle der Nernst'schen Gleichung entsprechend über die Zellmembran.

In der Zelle werden die positiv geladenen Moleküle bevorzugt in den Mitochondrien aufgenommen, da diese über ein im Vergleich zum Plasmamembranpotential negatives Membranpotential aufweisen. Die nichtfluoreszierenden Monomere werden in den Mitochondrien deprotoniert, so dass es zu einer Akkumulation von fluoreszierenden Monomeren an der Innenseite der Mitochondrien-Membran kommt. Wird eine kritische Monomeren-Konzentration überschritten, formieren sich J-Aggregate und bilden ein Emissionsmaximum bei 590 nm. Der relativ hohe pH-Wert von 8,2 begünstigt die durch negative Ladungen stabilisierte Anordnung zu J-Aggregaten. JC-1 hat dadurch, gegenüber anderen Membranfarbstoffen, den Vorteil einer selektiven Akkumulation in den Mitochondrien.

### **Einfluss der Farbstoffkonzentration auf die Ausbildung von J-Aggregaten**

Für die Ausbildung von J-Aggregaten ist eine genügend hohe Konzentration von Monomeren erforderlich [147]. Um die optimale Farbstoff-Konzentration für die Experimente zu finden, wurden Konzentrationsreihen in zellfreiem Medium und in Zellsuspensionen im Fluoreszenzspektrometer gemessen.

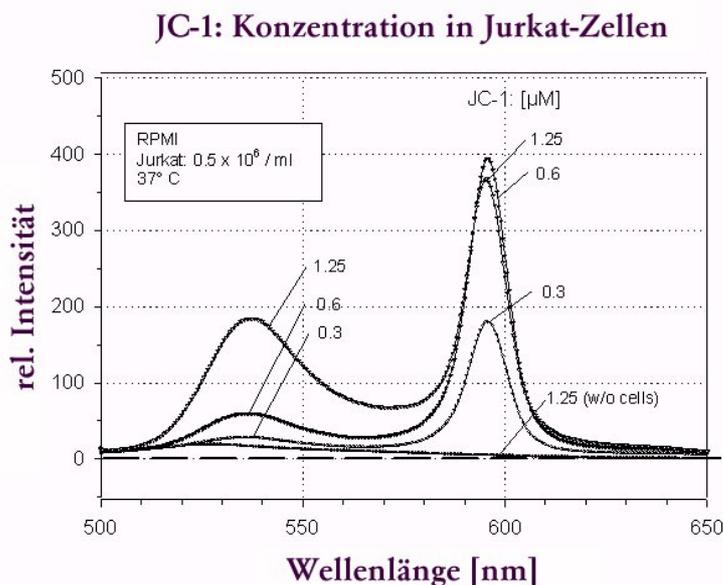
Abbildung 31 zeigt die Ausbildung der Emissionsmaxima von Monomeren und J-Aggregaten in Abhängigkeit von der Farbstoffkonzentration in zellfreiem Medium:



**Abb. 31.: Konzentrations-  
Abhängigkeit von JC-1.**  
(Anregung 488 nm,  
Spaltbreite 5 nm, zellfreies  
Medium, pH: 7,2, 37°C)

Aus der Abbildung 31 ist deutlich der Anstieg der J-Aggregat-Formierung in der Pufferlösung mit steigender Farbstoffkonzentration zu erkennen. Auffällig ist, dass die Konzentration der Monomere ab einer Farbstoffkonzentration von 2,5  $\mu\text{M}$  nicht mehr weiter zunimmt. Das bedeutet, dass sich über diese Konzentration hinaus alle Monomere zu J-Aggregaten zusammenlagern.

Für die Experimente mit Zellen wurde eine Farbstoffkonzentration gesucht, die einerseits gute Signalausbeuten, andererseits aber auch eine hinreichende Sensitivität gewährleistet. Die Konzentration muss also unterhalb des Sättigungsbereichs von 2,5  $\mu\text{M}$  liegen, da darüber hinaus ein Überangebot von Monomeren vorliegt, das für die Ausbildung von J-Aggregaten ausreichend ist. Die folgende Abbildung 32 gibt eine Konzentrationsreihe mit Jurkat-Zellen wieder:



**Abb. 32.: Konzentrations-  
Abhängigkeit von JC-1 in  
Jurkat-Zellen.**  
(Anregung 488 nm,  
Spaltbreite 5 nm, pH: 7.2,  
37°C.)

In zellfreien RPMI (37°C) bilden sich bei einer Konzentration von 1,25  $\mu\text{M}$  keine J-Aggregate aus. Hier wird auch der Einfluss des Mediums auf die Formation von J-Aggregaten deutlich. Während in Bis-Tris-Propan noch ein Emissionsmaximum bei 590 nm erkennbar ist (Abb. 31), bleibt dieses in RPMI-Medium völlig aus. Mit Zellen bilden sich schon ab einer Farbstoff-Konzentration von 0,3  $\mu\text{M}$  deutliche Emissionsmaxima aus, die bis 1,25  $\mu\text{M}$  ansteigen. Die Farbstoffmoleküle werden potentialabhängig und pH-bedingt in die Mitochondrien aufgenommen und dort akkumuliert. Hieraus resultieren die im Vergleich zu zellfreien Medien höheren Emissionsmaxima. In den durchflusszytometrischen Messungen wurde für die Auswertung der Ergebnisse eine Ratiomethode analog zu der im Kapitel „Methodische Grundlagen“ III.1.2.1. beschriebenen Indo-1-Methode verwandt. Auf diese Weise kann das Verhältnis der maximalen Intensitäten als Maß für die Sensibilität der Methode herangezogen werden. Die Verhältnisse liefern folgende Werte:

Farbstoffkonzentration	Verhältnis der maximalen Intensitäten
1,25 $\mu\text{M}$	2,0
0,6 $\mu\text{M}$	6,5
0,3 $\mu\text{M}$	6,6

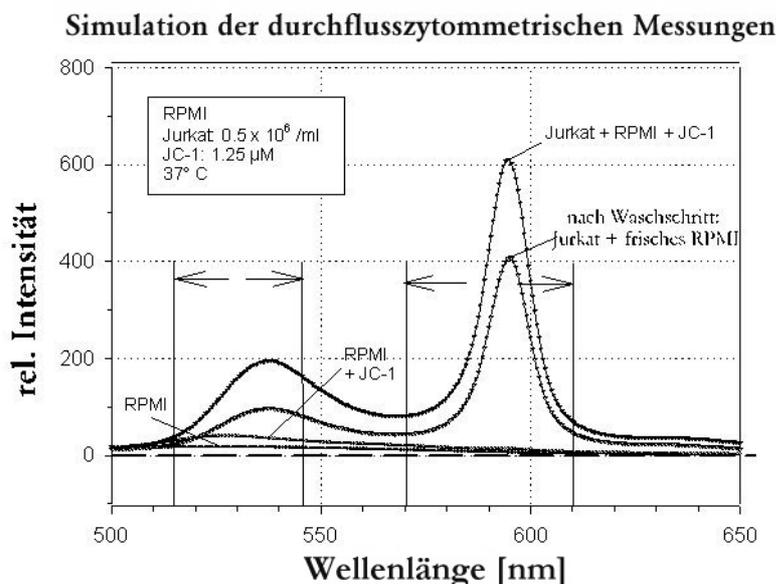
**Tab. 2.:** *Verhältnis der maximalen Emissionsintensitäten in Abhängigkeit von der Farbstoffkonzentration*

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

Wie aus Abbildung 32 und Tabelle 2 zu erkennen ist, ist eine Konzentration von  $0,6 \mu\text{M}$  optimal, da hier ein hoher Verhältniswert bei gleichzeitig hoher Signalintensität vorliegt.

##### Simulation der durchflusszytometrischen Messungen

In den durchflusszytometrischen Messungen wurde eine JC-1-Konzentration von  $1,25 \mu\text{M}$  verwendet. Diese etwas über der optimalen Konzentration von  $0,6 \mu\text{M}$  liegende Konzentration wurde gewählt, um Intensitätsverlusten, wie sie im Durchflusszytometer (Messung an Einzelzellen) gegenüber den Untersuchungen im Fluoreszenzspektrometer (Aufintegrierung der Signale über den Lichtweg in der Küvette) auftreten können, Rechnung zu tragen. Um die Verhältnisse im Durchflusszytometer zu simulieren, wurden die Zellen nach der Färbung mit JC-1 abzentrifugiert und in frischem RPMI-Medium resuspendiert. Auf diese Weise wurde der Hintergrund, der durch Farbstoff im Medium bedingt wird, reduziert.



**Abb. 33: Simulation der durchflusszytometrischen Messungen.**

Die durch Pfeile gekennzeichneten Bereiche geben die Bandbreite der Filter an, mit denen die Signale im Durchflusszytometer aufgezeichnet wurden (Anregung  $488 \text{ nm}$ , Spaltbreite  $5 \text{ nm}$ , RPMI1640-Medium,  $\text{pH}$ :  $7,2$ ,  $37^\circ \text{C}$ ).

Wie aus Abbildung 33 hervorgeht, wird in RPMI1640-Medium nur eine leichte Basisfluoreszenz gemessen. Bei Zugabe von  $1,25 \mu\text{M}$  JC-1 in den Versuchsansatz zeigt sich ein geringer Anstieg der Intensität des Monomerensignals.

Sind im Medium Zellen und JC-1 enthalten, kommt es, bedingt durch die Akkumulation von Farbstoffmolekülen in den Mitochondrien, zu einem starken Anstieg der Signalintensitäten. Nachdem die Zellen gewaschen und in frischem Medium resuspendiert wurden, nehmen die Signalintensitäten wieder ab. Zu diesem Verlust an Signalintensität durch Reduzierung des Hintergrunds können hier auch Farbstoffverluste durch Ausstrom aus den Zellen beitragen.

### Schlussfolgerung zur Mitochondrienmembran-Messung mit JC-1

JC-1 weist gegenüber anderen Membranpotential-Farbstoffen eine Reihe von Vorteilen auf. Es wird in Folge seiner positiven Ladung spezifisch in die Mitochondrien aufgenommen und teilweise erst dort durch Deprotonierung fluoreszent. Andere auch für die Mitochondrien-Membranpotential-Messung benutzte Farbstoffe wie R123 (Strukturformel unter Punkt „Methodische Grundlagen“ III.1.2.3.) oder DiOC<sub>6</sub> (3,3'-Dihexyloxo-carbocyanin) weisen ebenfalls kationischen Charakter auf und werden daher ebenfalls in die Mitochondrien eingelagert. Der Nachteil dieser Farbstoffe ist jedoch, dass sie über keine potentialabhängige Verschiebung des Emissionsmaximums verfügen, wie dies bei J-Aggregaten der Fall ist. Unterschiede in Membranpotentialen werden bei diesen Farbstoffen durch eine unterschiedlich hohe Anlagerung von Farbstoffmolekülen an den Membranen und durch eine veränderte Fluoreszenzintensität dokumentiert. Eine Fluoreszenzintensitätsänderung ist allerdings schwerer zu detektieren als eine Fluoreszenzverschiebung. Die Notwendigkeit einer hohen Messintensität wird aber durch Arbeiten deutlich, in denen beschrieben wird, dass die Mitochondrien einer Zelle unterschiedliche Potentiale aufweisen können, und dass sogar innerhalb eines Mitochondriums unterschiedliche Membranpotentialabstufungen vorliegen können [172, 173]. Eine solche Heterogenität der Mitochondrien kann durch JC-1 deutlich gemacht werden (siehe Abbildung 34). Hier würde der Einsatz von herkömmlichen Membranpotential-Farbstoffen an seine Grenzen stoßen, da die Fluoreszenzintensitäts-Unterschiede innerhalb eines Organells mit Hilfe von Fluoreszenz-Mikroskopie nicht mehr aufgelöst werden können. Aufgrund ihrer positiven Ladung können sich alle hier besprochenen Membranpotential-Farbstoffe potentiell auch an andere Membranen der Zelle anlagern, die ein negatives Potential aufweisen (z.B. endoplasmatisches Reticulum).

In diesem Fall hat JC-1 gegenüber anderen Membranpotential-Farbstoffen den Vorteil der Fluoreszenzinduktion durch Deprotonierung. Erst der hohe pH-Wert in den Mitochondrien überführt die Farbstoff-Moleküle in ihre fluoreszente Form, so dass Fluoreszenzsignale, die nicht aus den Mitochondrien stammen, vermieden werden.

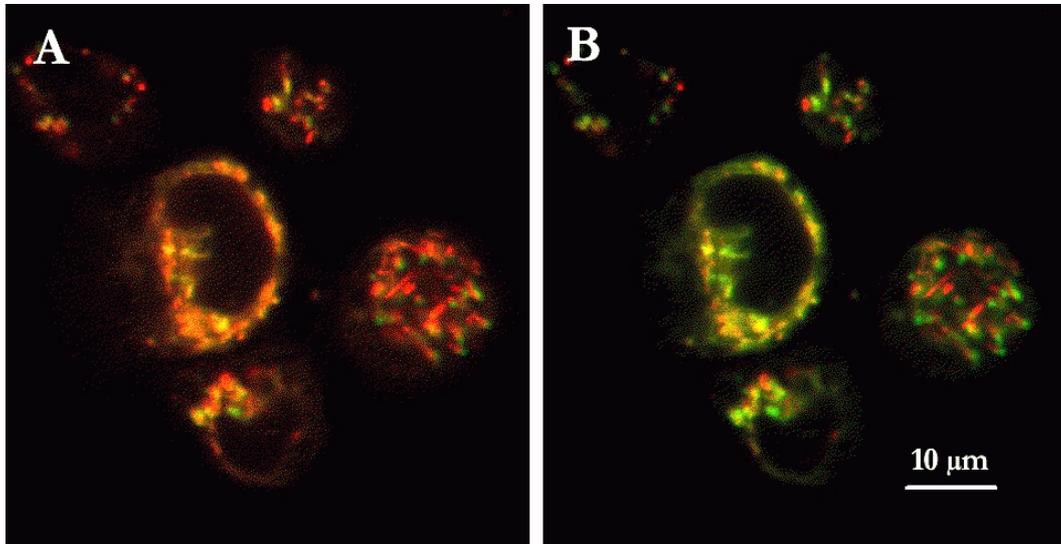
Ein Nachteil der Nutzung von JC-1 als Mitochondrienpotential-Farbstoff ist, dass eine gleichzeitige Nutzung von PJ zur Lebend/Tod-Diskriminierung nicht möglich ist, da sich das Emissionsmaximum von PJ mit dem der J-Aggregate von JC-1 überschneidet.

JC-1 ist ein kationischer Farbstoff und wirkt dadurch selbst depolarisierend auf die Mitochondrienmembran. Die Untersuchungen müssen daher immer von Kontrollmessungen begleitet werden.

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Als Bestätigung der nachgeprüften Parameter wurden J774A.1-Zellen innerhalb der erarbeiteten Rahmenbedingungen mit JC-1 gefärbt und im CLSM untersucht.



**Abb. 34: Mitochondrien-Membranfärbung mit JC-1 in J774A.1-Zellen.**  
*Deutlich erkennbar ist die bereits im Text angesprochene Heterogenität der Mitochondrien (CLSM-Aufnahme, Balken: 10 µm).*  
A) Unbehandelte Kontrollzellen  
B) Nach Stimulation mit TBT (1 µM, 30 min)  
(Farbstoffkonzentration: 1,25 µM, Temperatur: 37°C)

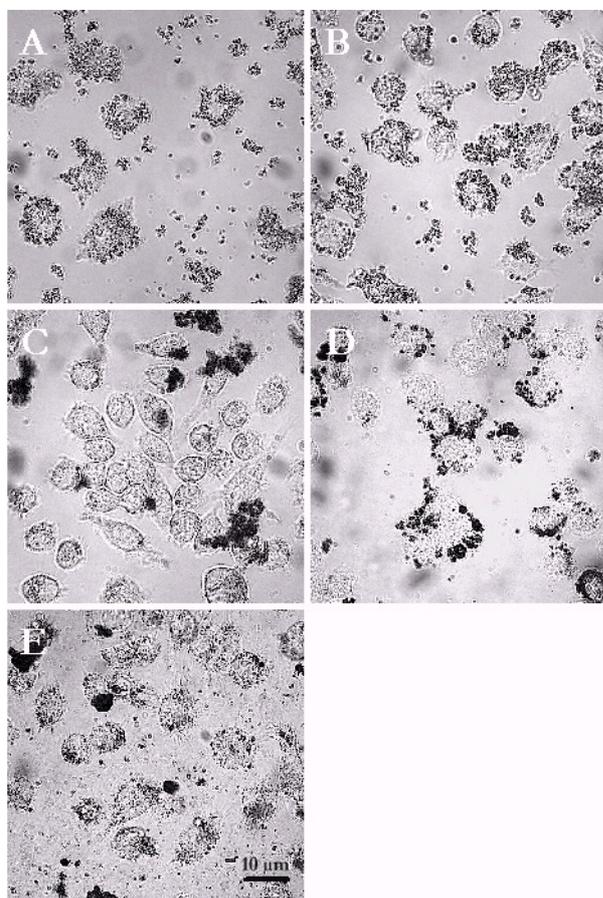
*Durch die potentialabhängige Ausbildung von J-Aggregaten und dem damit verbundenen Fluoreszenzfarbshift ist JC-1 unter den derzeit zur Verfügung stehenden Membranpotential-Farbstoffen am besten geeignet, um spezifisch Änderungen im Membranpotential von Mitochondrien zu messen. Durch die Untersuchungen der Einflüsse von Temperatur, pH-Wert, sowie der Farbstoffkonzentration konnte ein optimales Protokoll für die Verwendung von JC-1 im Durchflusszytometer erstellt werden.*

### 2. Charakterisierung partikulärer Noxen

Die Auswirkungen einer Exposition von inflammatorischen Zellen mit feinen und ultrafeinen Partikel sind Gegenstand dieser Arbeit. Deshalb ist es wichtig, der Frage nachzugehen, ob die verschiedenen Partikel sich in wässriger Umgebung als Einzelpartikel lösen oder zur Aggregatbildung neigen, und in welcher Form sie auf die Zellen treffen. Die unterschiedlichen Teilchengometrien, ob Einzelteilchen oder Agglomerat, beeinflussen die Art der Interaktion mit den Zellen und sind bei der Interpretation von Effekten zu berücksichtigen.

#### 2.1. Lichtmikroskopische Aufnahmen der Teilchenagglomerate

Hinweise auf die Entstehung von Teilchenverklumpungen geben bereits die ersten Experimente am Durchflusszytometer. Das Auftreten von größeren Teilchenagglomeraten war offensichtlich die Ursache dafür, dass in zeitabhängigen Experimenten, bei konstanter Zellkonzentration, die Zählrate der Ereignisse dann drastisch zunahm (von ca. 200 auf 1000 s<sup>-1</sup>), wenn Partikel (z.B. 75 ng/ml) zur Zellsuspension zugegeben wurden (erst Objekte mit einem Durchmesser von > ca. 0,1 µm sind im Durchflusszytometer zu erkennen).



**Abb. 35:** CLSM-Aufnahmen von J774A.1-Zellen in Suspension, die den verwendeten Teilchenarten exponiert wurden.

Die einzelnen Abbildungen zeigen, dass alle Teilchenfraktionen Agglomerate ausbilden. Je nach Teilchenspezies können diese Ausmaße erreichen, die der Größe von ganzen Zellen entsprechen. Die TiO<sub>2</sub>-Fraktionen (fein (A), ultrafein (B)) bilden ähnlich große Agglomerate. Sie sind kleiner als die Agglomerate der EC-Partikel (C), die sich, wie die Printex-Partikel (D), zu großen Flocken zusammenlagern. Die größte Variationsbreite der Aggregatgrößen zeigen die SRM-Teilchen (E). (Die verwendeten Partikel wurden unter „Methodische Grundlagen“ III.4. bereits beschrieben.)

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Die mikroskopischen Aufnahmen von Zellen aus partikelbeladenen Suspensionen bestätigen die Existenz der Aggregate. Abbildung 35 zeigt, dass alle untersuchten Partikelarten Agglomerate bilden, die bereits im Lichtmikroskop bei einer 64-fachen Vergrößerung zu erkennen sind.

### 2.2. Eigenfluoreszenz der Partikel und Reaktionen der verwendeten Farbstoffe mit Teilchen

Eine Eigenfluoreszenz der untersuchten Partikel kann die Ergebnisse von Messungen verfälschen. Daher wurden alle verwendeten Partikelarten bei den in dieser Arbeit benutzten Anregungswellenlängen im Spektralfluorometer auf ihre Fluoreszenz getestet. Dabei ergab sich, dass keine der verwendeten Partikelarten eine Eigenfluoreszenz bei den relevanten Anregungen aufwies. Des Weiteren wurde getestet, ob die verwendeten Teilchen mit den eingesetzten Farbstoffen reagieren. Auch hier ergaben sich keine Anhaltspunkte für eine direkte Wirkung der Partikel auf die Farbstoffe (Daten nicht gezeigt).

### 2.3. Analyse der Volumenspektren der Teilchen-Agglomerate

Zur Quantifizierung dieser Beobachtungen wurden die Volumenverteilungen der von den Teilchen gebildeten Agglomerate im Durchflusszytometer gemessen und der Anteil der in den Agglomeraten gebundenen Partikel mit Hilfe der vom Partikelhersteller gelieferten Daten abgeschätzt.

Die Volumenbestimmung dieser Aggregate unterliegt natürlich bestimmten, gerätebedingten Einschränkungen. So lassen sich nur Objekte mit einem Durchmesser größer 100 nm erkennen, und als Maß für die Objektgröße müssen die FSC-Signale dienen, die nur unter bestimmten Voraussetzungen proportional dem Volumen sind.

Lichtstreuung wird häufiger zur Zellgrößenbestimmung benutzt. Die Anwendung dieser Technik für die Flusszytometrie ist ausführlich in [174] behandelt. Es wird gezeigt, dass die Intensität des gestreuten Lichts eines Laserstrahls innerhalb kleiner Winkel ( $0,5 - 2,0^\circ$ ) proportional zum Partikelvolumen ist (wie es durch die Theorie der Mie-Streuung vorhergesagt wird). Der Vorwärtsscatter oder die Kleinwinkelstreuung (FSC) ist in der Tat angenähert linear proportional dem Volumen von z.B. Kunststoffkügelchen („Beads“), wenn diese in einem Durchmesserbereich von 6 bis 14  $\mu\text{m}$  liegen.

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Im Falle der in diesem Experiment verwendeten Beads (Durchmesser von 0,5 und 1,8  $\mu\text{m}$ ) beträgt das Volumenverhältnis 44, das Querschnittsverhältnis 12,5 und das Verhältnis der FSC-Signale 31. Die Abweichung von der Proportionalität wird durch Kalibrierungskurven bei der Aggregatsvolumenbestimmung berücksichtigt.

Um die unbekanntes Teilchenagglomerate nach Zahl und Größe registrieren und analysieren zu können, wurden ihre FSC-Signale ohne eine Diskriminierungsschwelle aufgenommen.

Zur Kalibrierung der aufgenommenen Volumensignale wurde kurz vor Ende der Registrierung eine Mischung aus zwei unterschiedlich großen (Durchmesser: 0,5  $\mu\text{m}$  und 1,8  $\mu\text{m}$ ), fluoreszierenden Referenz-Beads (FITC-markiert) zugegeben.

Die Triggerung der Messungen erfolgte über die SSC-Signale, wobei eine Schwelle gewählt wurde, die knapp unterhalb der Signale für die kleinen Beads lag. Auf diese Weise wurden alle Objekte registriert, deren Signalamplituden für den Sidescatter größer oder gleich derjenigen der kleinen Beads waren.

Als Musterpartikel wurden drei verschiedene  $\text{TiO}_2$ -Teilchenarten verwendet:

Teilchenart	Durchmesser lt. Hersteller <sup>1)</sup>	Zusammensetzung lt. Hersteller <sup>1)</sup>
Ultrafeine hydrophile Teilchen (UFP)	21 nm	80 % Anatas- und 20 % Rutil-Kristalle
Ultrafeine hydrophobe Teilchen (LUFP)	21 nm	80 % Anatas- und 20 % Rutil-Kristalle
Feine hydrophile Teilchen	250 nm	n.n.

1) Degussa, Frankfurt

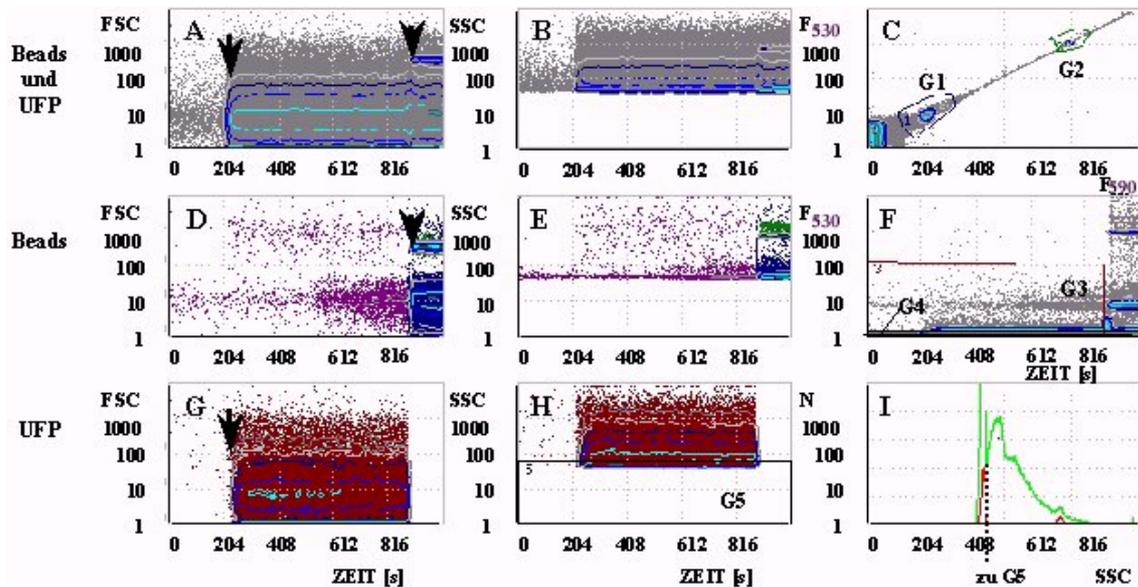
**Tab. 3:** *Muster-Partikel für die durchflusszytometrische Charakterisierung ihres Aggregationsverhaltens in Suspension.*

### Registrierung mit dem Durchflusszytometer und Erstellung der Volumenspektren:

Nach einem Vorlauf von drei Minuten, während dem nur Untergrundsignale der jeweiligen Suspensionsflüssigkeit (Puffer oder Medium) auftreten, wurden die Partikel jeweils in einer Konzentration von 75 ng/ml zugegeben. 15 Minuten nach Beginn des Experiments wurden die Kalibrierbeads ohne Unterbrechung der Messung der Versuchssuspension beigemischt, um die Einzelergebnisse untereinander vergleichen und für die Auswertung reproduzierbare Schwellen setzen zu können.

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

Die folgende Abbildung 36 gibt eine Übersicht über den Versuchsablauf eines konkreten Experiments:



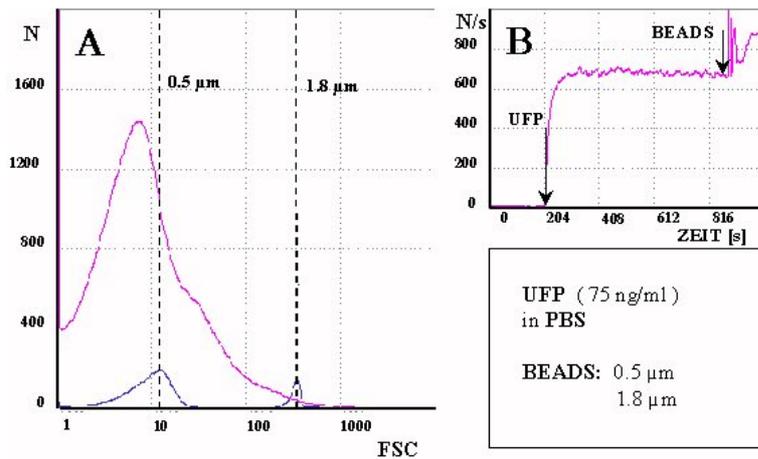
**Abb. 36:** *Messungen zur Volumenverteilungen der Agglomerate (am Beispiel UFP). Die oberen drei Bilder geben die Gesamtheit der Signale (Beads und Partikel) in FSC (A), SSC (B) und  $F_{530}$ -Fluoreszenz (C), also der Bead-Fluoreszenz, wieder. G1 und G2 bezeichnen die Gates für die Beads (G1:  $0,5 \mu\text{m}$ , G2:  $1,8 \mu\text{m}$ ), die zum Ausschluss der Bead-Signale verwendet werden. Die Bilder (D), (E) und (F) beziehen sich nur auf die entsprechenden Bead-Signale. G3 ist ein Gate, welches ebenfalls Bead-Anteile ausschließt. (G) und (H) zeigen die Messungen der Partikel (FSC und SSC gegen die Zeit). G5 bestimmt alle Ereignisse, deren SSC-Signalintensität über den Signalen der kleinen Beads mit einem Durchmesser von  $0,5 \mu\text{m}$  liegt. (I) stellt das SSC-Histogramm für alle Ereignisse dar, wobei sich die roten Peaks auf die beiden Beadsorten beziehen. Die obere Schwelle für G5 kann in diesem Histogramm leicht und eindeutig bestimmt werden. (Die Untersuchungen wurden an den hydrophilen ultrafeinen Partikeln durchgeführt; die Partikelkonzentration betrug  $75 \text{ ng/ml}$ .)*

#### Auswertung der Daten zur Erstellung der Volumenspektren (FSC-Histogramme) der Aggregate

Einen Zwischenschritt der Auswertung der in Abbildung 36 registrierten Daten ist in Abbildung 37 zu sehen. Das FSC-Histogramm (A) gibt alle Ereignisse (Teilchenaggregate und Untergrund) des Experiments von Abbildung 36 (A) wieder. Lediglich die durch die beiden Beadarten bedingten Verteilungen sind getrennt gezeigt. Die Lage ihrer Maxima (Kanal 11 bzw. 338) dienen zur Kalibrierung.

Das zeitabhängige Auftauchen der FSC-Signale aller Ereignisse (Aggregate, Untergrund, Beads) ist anschaulich in der Darstellung der Zählrate in Abhängigkeit von der Zeit (N/s) zu erkennen.

#### IV. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 37: Histogramm und zeitabhängige Raten der FSC-Werte**

(A) zeigt die Histogramm-Darstellung der FSC-Werte für die UFP-Teilchenaggregate und den Untergrund (Debris im Hüllstrom und elektronisches Rauschen) und die Peaks für beide Beadsorten (Kanal 11 entspricht den Beads mit 0,5 μm und Kanal 338 den Beads mit 1,8 μm

Durchmesser). In (B) sind die zeitabhängigen Raten (Ereignisse pro Zeit) für alle registrierten FSC-Signale (siehe Abbildungen 36A) aufgetragen.

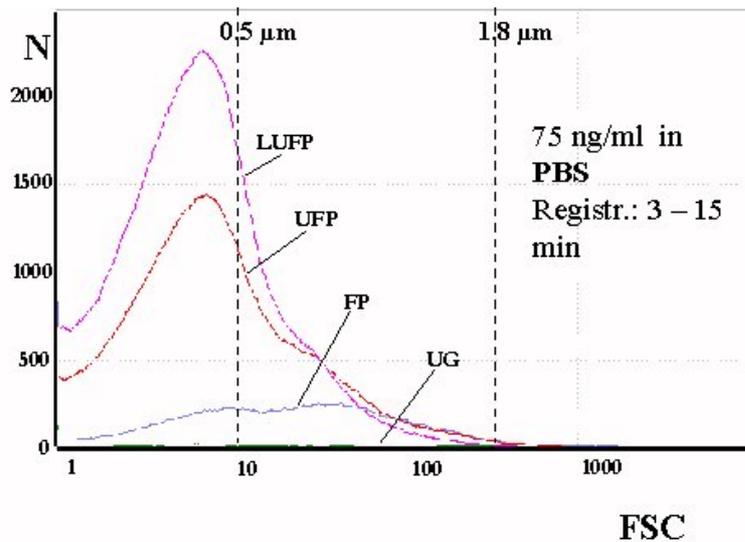
Für die quantitative Auswertung wurden die Volumenspektren der Aggregate der drei untersuchten Teilchenarten korrigiert und so durch Verwendung der in Abbildung 36 definierten Gates von Beiträgen aus Untergrund (Debris im Hüllstrom, elektronisches Rauschen) und Beadanteilen befreit.

Dabei gilt für die einzelnen Gates:

- 1)  $\neq G1$ : Ausschluss von Beads mit einem Durchmesser von 0,5 μm und Debris
- 2)  $G3$ : Ausschluss von Beads mit einem Durchmesser von 1,8 μm
- 3)  $\neq G5$ : es werden nur Ereignisse mit einer SSC-Signalintensität gewertet, die über der der Beads mit 0,5 μm Durchmesser liegt.
- 4)  $G6$ : es gehen nur die Ereignisse im Zeitfenster von drei bis 15 Minuten in die Auswertung ein.

Als Voraussetzung für alle Auswertungen (z.B. Abbildung 38 für Teilchen in PBS) gilt folglich die logische Kombination:  $\neq G1 \cap G3 \cap \neq G5 \cap G6$ .

#### IV. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 38:** Vergleich der FSC-Histogramme für alle untersuchten Teilchenfraktionen in PBS-Puffer. Die Darstellungen beziehen sich auf das Zeitfenster von 3 bis 15 min (für UFP: Abbildung 36 (G)). Der Beitrag des Untergrundes (UG) ist ebenfalls dargestellt.

Neben den FSC-Spektren der drei Teilchenarten in PBS (Abbildung 38) wurden auch die Spektren in RPMI ohne FCS und RPMI mit 10 % FCS als Lösungsmittel in ähnlicher Weise registriert und dargestellt (Abbildungen nicht gezeigt). Es ergaben sich ähnliche FSC-Spektren wie in Abbildung 38. Allerdings sind sie je nach Suspensionsart zueinander verschoben.

Für einen groben Vergleich dieser Ergebnisse sind die mittleren Aggregatvolumina für die unterschiedlichen Medien und Teilchenarten in Tabelle 4 aufgelistet. Dazu wurden aus den FSC-Spektren die Mittelwerte (arithmetische Mittel) für die jeweiligen Teilchenfraktionen ermittelt. Zur Umrechnung in mittlere Aggregatvolumina diente eine aus den Beaddaten (FSC/Volumen-Diagramm) erstellte Kalibrierkurve.

$V_{\text{Agglomerate}} [\mu\text{m}^3]$	PBS	RPMI ohne FCS	RPMI mit 10 % FCS
FP	0,59	0,69	0,34
UFP	0,21	0,32	0,37
LUF	0,14	0,17	0,38

**Tab. 4:** Mittlere Aggregatvolumina ( $V_{\text{Agglomerate}}$ ) in verschiedenen Medien (Partikelkonzentration: 75 ng/ml) für die drei unterschiedlichen Teilchenarten.

Aus Tabelle 4 ist zu erkennen, dass in PBS und RPMI ohne FCS die mittleren Agglomeratvolumina in der Reihenfolge FP > UFP > LUF abnehmen. In RPMI ohne FCS bilden sich etwas größere Agglomerate als in PBS. Die Ungenauigkeit der Streumethode lässt nur eine Tendenz erkennen. Die Unterschiede sind nicht signifikant.

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

Bemerkenswert ist jedoch, dass in RPMI mit 10 % FCS die Agglomerate aller drei Teilchensorten ein etwa gleich großes mittleres Volumen aufweisen. Ob dies mit der Möglichkeit der Oponierung der Teilchen zusammenhängt, ist nicht untersucht worden.

Aus den mittleren Aggregatvolumina wurde die Anzahl der in den Agglomeraten enthaltenen Teilchen ( $N_{\text{Teilchen}}$ ) als Orientierungswerte unter sehr konservativen Annahmen ermittelt. Dabei wurden die Einzelteilchen als kugelförmig behandelt, die in den Agglomeraten in kubischer Kugelpackung (entsprechend  $\text{TiO}_2$ ) vorliegen.

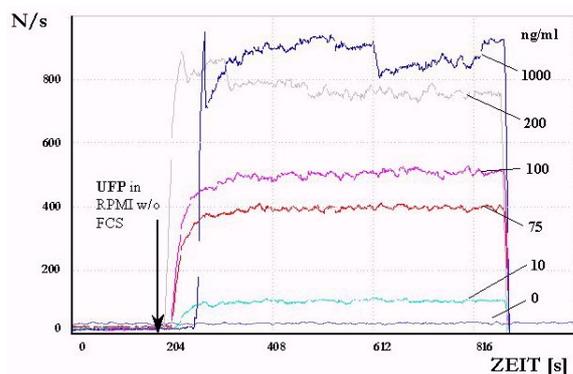
$N_{\text{Teilchen}}/V_{\text{Agglomerate}}$	PBS	RPMI ohne FCS	RPMI mit 10 % FCS
<b>FP</b>	49	57	28
<b>UFP</b>	29300	44800	52100
<b>LUFP</b>	19500	23400	53300

*Tab. 5: Anzahl der Teilchen ( $N_{\text{Teilchen}}$ ) in den mittleren Agglomeratvolumina ( $V_{\text{Agglomerate}}$ ) in verschiedenen Medien (Partikelkonzentration: 75 ng/ml) für drei unterschiedliche Teilchenarten. (Konservative Annahmen: Kugelvolumen der Einzelteilchen, Kugelpackung der Einzelteilchen im Agglomerat).*

Diese grobe Abschätzung liefert für FP eine Teilchenzahl pro mittleres Agglomerat  $< 100$ , für UFP und LUFP jedoch Teilchenzahlen von einigen 10000.

#### Zeitliche Bildung von Agglomeraten in einer Teilchensuspension

Um der Frage nachzugehen, wie schnell sich Aggregate im Medium ausbilden, wurden die Raten der registrierten Ereignisse in Abhängigkeit der Zeit gemessen.



*Abb. 39: Zeitliches Erscheinen der Agglomerate.*

*Aufgetragen sind die registrierten Ereignisse pro sec gegen die Zeit. Nach einem Vorlauf von 3 min wurden verschiedene Konzentrationen von ultrafeinen  $\text{TiO}_2$ -Partikel in RPMI ohne FCS zugegeben und die Raten der registrierten Ereignisse weitere 12 Minuten aufgezeichnet. Die Abbildung demonstriert auch, dass sich die registrierten Ereignisse auf Teilchen beziehen und keine Artefakte sind.*

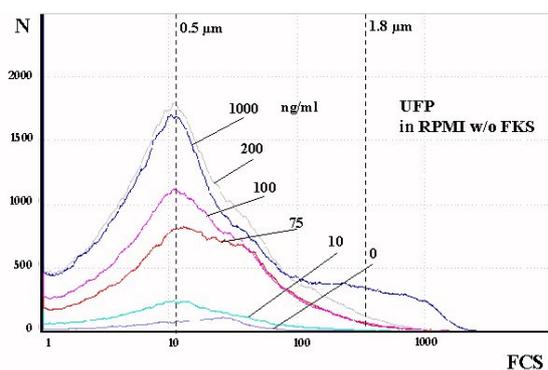
Wie Abbildung 39 zeigt, steigen die Raten der registrierten Ereignisse nach Zugabe der Partikel in Abhängigkeit von der eingesetzten Partikelkonzentration schnell an ( $< 1$  min) und bleiben über die weiteren 12 min Messzeit konstant.

## IV. Ergebnisse und Diskussion

Dies bedeutet, dass sich entweder die Agglomerate in der Versuchslösung sehr schnell ausbilden oder bereits bei Zugabe existent sind. Letzteres dürfte wahrscheinlicher sein, da die in den Experimenten eingesetzten Teilchensuspensionen nach ihrer Präparation (siehe Experimenteller Teil VII.3.1.) erst in Hamilton-Spritzen überführt wurden, um dann in die Versuchslösung eingespritzt zu werden. Für diese Arbeitsschritte sind mehrere Minuten nötig, so dass sich die Agglomerate nach der Behandlung der Teilchensuspensionen im Ultraschallbad wieder rückbilden könnten.

### Abhängigkeit der Aggregatentstehung von der Konzentration der Partikel

Zur Interpretation der Aggregatentstehung ist ihre Abhängigkeit von der Konzentration der Teilchenzugabe nötig. Stellvertretend für die verschiedenen Teilchenfraktionen wird die konzentrationsabhängige Aggregatbildung bei UFP in RPMI ohne FCS gezeigt.



**Abb. 40: Konzentrationsabhängige Bildung von Aggregaten bei UFP in RPMI1650-Medium ohne FCS.**

*Aufgetragen ist die Anzahl der Ereignisse (N) gegen ihre Größe der gemessen als FCS. Als Orientierungspunkte wurden die FCS-Mittelwerte der 0,5 µm und 1,8 µm großen Beads mit in die Darstellung aufgenommen.*

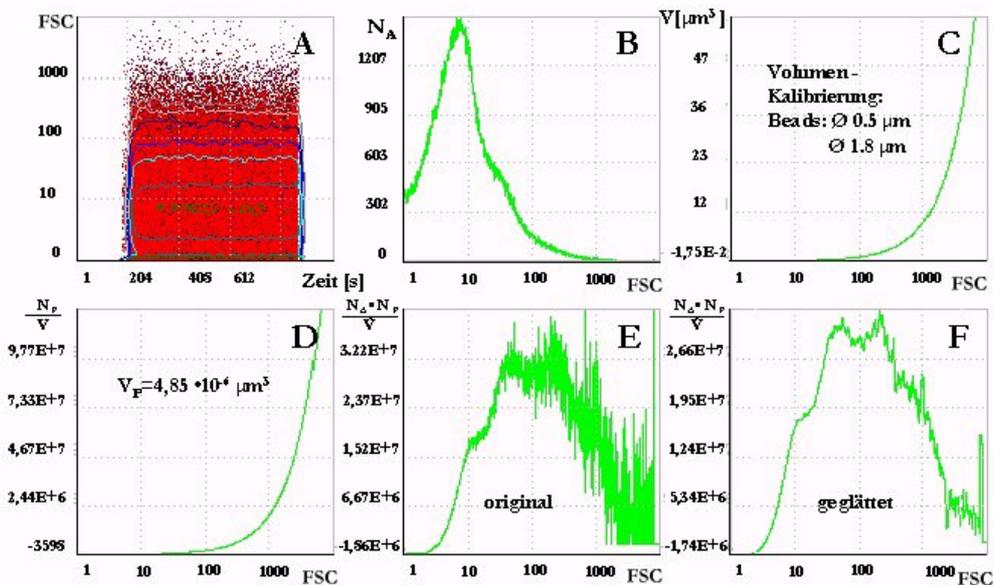
Abbildung 40 zeigt, dass die mittleren Aggregatgrößen mit der eingesetzten Teilchenkonzentration zunehmen. Aus diesen FCS-Spektren lässt sich eine Aggregatsvolumenvergrößerung von  $0,24 \mu\text{m}^3$  (bei einer zugegebenen Teilchenkonzentration von 10 ng/ml) auf  $0,89 \mu\text{m}^3$  (bei einer Teilchenkonzentration von 1000 ng/ml) errechnen.

### Konservative Abschätzung der in den Aggregaten gebundenen Einzelpartikel

Um zu ermitteln, welcher Anteil der Partikel in den Agglomeraten gebunden ist und welcher als Einzelpartikel bzw. in Einheiten mit SSC von 0,5 µm Beads vorliegt, wurden die in Agglomeraten gebundenen Partikelzahlen mit Hilfe des DAS-Auswerteprogramms [150] errechnet.

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

In der folgenden Abbildung 41 ist der Ablauf der mathematischen Ermittlungen der Einzelpartikel in allen Aggregaten dargestellt:



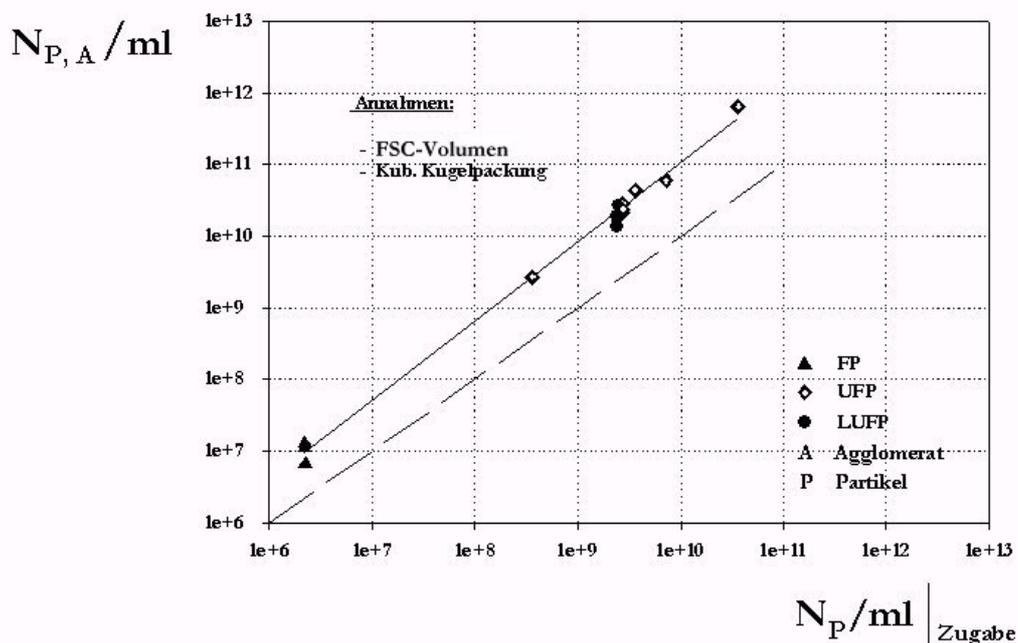
**Abb. 41:** *Mathematische Ermittlung der Einzelpartikel in allen Aggregaten (Faltung von 2 Kurven).*

Die im Beobachtungszeitraum (3 – 12 min) mit dem Durchflusszytometer registrierten und mit logischen Gates dargestellten Ereignisse (UFP-Agglomerate + Untergrund (UG)) (A) werden als Histogramm in einem eindimensionalen logarithmischen Speicher dargestellt (FSC aufgelöst in 10000 Kanälen;  $N_A$  = Anzahl der Ereignisse pro Kanal) und von diesem Histogramm das des UG abgezogen (B). Darauf wird die lineare Kalibrierungskurve ebenfalls in einem eindimensionalen logarithmischen Speicher dargestellt (C). Hierbei entspricht der Kanal 11 dem Volumen der 0,5 µm-Beads ( $V_{0,5 \mu\text{m}} = 0,079 \mu\text{m}^3$ ) und der Kanal 338 dem Volumen der Beads mit einem Durchmesser von 1,8 µm ( $V_{1,8 \mu\text{m}} = 3,17 \mu\text{m}^3$ ). Für die Kalibrierungskurve ergibt sich die Beziehung  $y = 9,47 \cdot 10^{-3}x - 0,0323$ . Durch Division der Volumen-Kalibrierungskurve mit dem theoretischen Kugelvolumen der UFP ( $4,85 \cdot 10^{-6} \mu\text{m}^3$ ) ergibt sich die Kalibrierungskurve FSC gegen  $N_P/V$  (D). Die Multiplikation dieser Kurve mit der Kurve in Abbildung (B) (Faltung) ergibt die Verteilung der Anzahl aller Einzelpartikel in Abhängigkeit von FSC (E). Nach einer Glättung (gleitendes Mittel über 11 Punkte) ergibt sich die Kurve in (F).

Aus der Kurve (F) der Abbildung 41 erhält man durch Integration zwischen den FSC-Kanälen 2 und 3000, die alle registrierten Ereignisse einschließen, die Anzahl der Einzelpartikel in den Aggregaten des Messvolumens. Da sich die Messvolumen in den verschiedenen Experimenten unterschieden, wurden alle Werte auf ein Volumen von 1 ml normiert. Für den Aufbau der Agglomerate wurde von einer kubischen Kugelpackung ausgegangen. Deshalb wurden alle so ermittelten Ergebnisse für alle Teilchenarten und Konzentrationen mit den Faktor 0,68 berichtigt.

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

Die endgültigen Ergebnisse der Berechnungen sind in der folgenden Graphik gezeigt:



**Abb. 42:** Ergebnisse der konservativen Abschätzung der in den Aggregaten gebundenen Einzelpartikel.

Aufgetragen sind für alle untersuchten Teilchenarten und Konzentrationen die Anzahl der zugegebenen Partikel ( $N_P/\text{ml}$ ) gegen die Anzahl der in Agglomeraten (mit  $SSC > SSC$  der  $0,5 \mu\text{m}$  Beads) gebundenen Partikel ( $N_{P,A}/\text{ml}$ ). Die gestrichelte Linie kennzeichnet den Fall, dass alle zugegebenen Teilchen in Aggregaten gebunden sind, die durchgezogene Linie ergibt sich als Fitgerade für die experimentellen Werte.

Wie in Abbildung 42 zu erkennen ist, liegen die Werte aus den Experimenten etwa um einen Faktor 10 über der Kurve, die für den Fall gilt, dass alle zugegebenen Teilchen in Aggregaten gebunden sind. Das bedeutet, dass sich mehr Partikel in den Agglomeraten befinden, als ursprünglich zugegeben wurden.

Diese zu konservative Abschätzung kann auf zwei mögliche Ursachen zurückgeführt werden:

- 1) Es wurde von einer kubischen Packungsdichte (Korrekturfaktor 0,68) ausgegangen. In Wirklichkeit sind die Agglomerate eher flockenförmig, was auch in Abbildung 35 zu erkennen ist und eine wesentlich lockerere Packung der Teilchen bedeutet.
- 2) Die Annahme einer Proportionalität zwischen Volumen und FSC gilt für kugelförmige Beads (Aggregate). In diesen Experimenten liegen allerdings eher gestreckte und/oder flache Gebilde vor, die im Mantelstrom orientiert, große FSC-Signale geben können, obgleich ihre Volumen viel kleiner sind als die entsprechender Kugeln.

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Wenn der Fehler dieser Abschätzung, bedingt durch diese beiden falschen Abschätzungen, nur einen Faktor 10 ausmacht, so würde dies bedeuten, dass sich alle zugegebenen Teilchen zu Aggregaten zusammengelagert haben, die einen Durchmesser größer als  $0,5 \mu\text{m}$  bzw. ein Volumen größer als  $0,07 \mu\text{m}^3$  aufweisen.

#### **Schlussfolgerung zur Charakterisierung der partikulären Noxen**

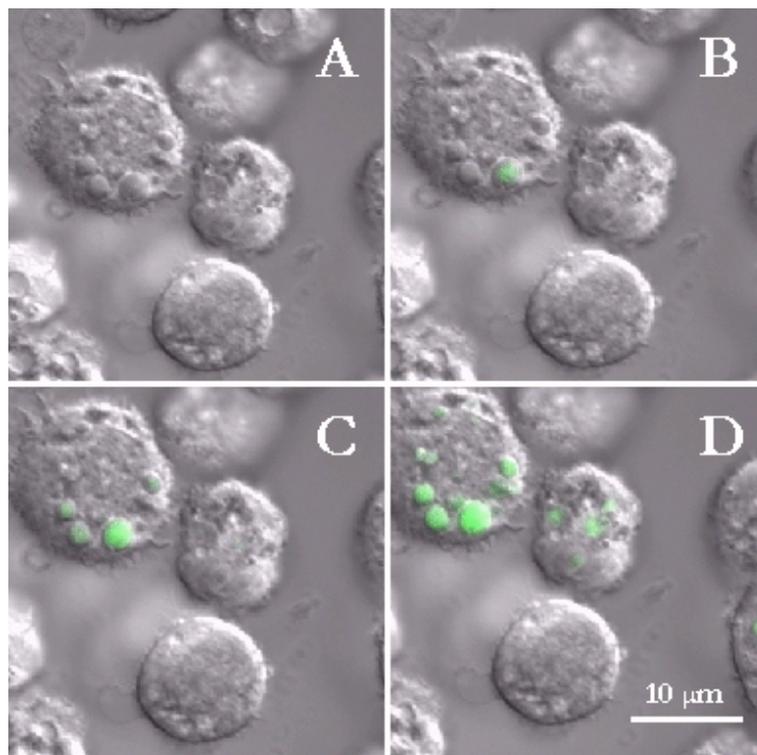
Die Messungen zeigen, dass alle Partikel in Agglomeraten gebunden auf die Zellen treffen. Dabei hängt die Größe der Agglomerate vom Medium ab, in dem die Teilchen gelöst wurden. Interessanterweise bilden in RPMI1640-Medium mit 10 % FCS alle drei analysierten Partikelfractionen in etwa gleich große Agglomerate aus. Da das Lungenfluid ebenfalls ein komplexes Medium ist, könnte dies auch in der Lunge der Fall sein. Nähere Aufschlüsse hierüber könnten Teilchenanalysen in Lungenlavagen liefern, nachdem Versuchstieren Partikel instilliert wurden. Wie die Partikel in den Zellen weiterprozessiert werden, d.h. ob sie in Agglomeraten verbleiben oder die Agglomerate wieder zu Einzelpartikel zerfallen, ist noch unklar. Elektronenmikroskopische Untersuchungen könnten zur Aufklärung dieses Problems beitragen.

*Die lichtmikroskopischen und durchflusszytometrischen Untersuchungen der verwendeten Partikel haben gezeigt, dass alle analysierten Teilchen Agglomerate ausbilden. In weiterführenden Experimenten an feinen und ultrafeinen  $\text{TiO}_2$ -Partikel wurde gefunden, dass die Agglomeratbildung schnell und abhängig vom Medium, in dem die Teilchen suspendiert wurden, erfolgte und dass nahezu alle Einzelpartikel in Agglomeraten gebunden vorlagen. In RPMI1640-Medium mit 10 % FCS bildeten alle drei analysierten  $\text{TiO}_2$ -Partikelfractionen in etwa gleich große Agglomerate aus.*

### 3. Phagozytose

Um abzuschätzen, innerhalb welcher Zeitspanne Partikel von phagozytierenden Zellen aufgenommen werden und um so wichtige Informationen für die Experimentplanung und Experimentinterpretation zu erhalten, wurde der, der Phagozytose folgende Respiratory Burst, in J774.A1-Zellen mit Hilfe der FcOxyBurst®-Methode mikroskopisch untersucht. Bei diesem Test werden Latex-Partikel verwendet, auf deren Oberfläche  $H_2DCF$  gebunden ist, das durch reaktive Sauerstoffspezies zu Fluorescein oxidiert wird.

Auf diese Weise kann der zeitliche Verlauf des Respiratory Burst anhand der Bildung von Fluorescein in den Phagolysosomen der Zellen im Laser-Scanning-Mikroskop beobachtet werden. Der Vorteil dieser Methode gegenüber der herkömmlichen Beobachtung von fluoreszenten Partikel ist, dass das Fluoreszenzsignal erst in der Zelle entsteht. So wird verhindert, dass Partikel, die nur an die Zelloberfläche gebunden, aber (noch) nicht phagozytiert sind, als bereits in die Zelle inkorporierte Teilchen interpretiert werden.



**Abb. 43:** Untersuchung der Phagozytose mit FcOxyBurst™ in J774.A.1-Zellen. Die Bilder zeigen die Zellen vor Zugabe von FcOxyBurst™ (A) und 15 min (B), 30 min (C), 45 min (D) nach Zugabe der Partikel. Ein erstes Signal nach Oxidation von  $H_2DCF$  lässt sich nach 15 min erkennen (CLSM-Aufnahmen, Balken 10 µm).

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Die Bilder der Zeitsequenz der Abbildung 43 zeigen, dass ein erstes Fluoreszenzsignal 15 min nach Zugabe der Partikel in den phagozytierenden Zellen zu erkennen ist, dessen Intensität sich im Laufe weiterer 30 min merklich steigert. Die Ergebnisse korrelieren mit Beobachtungen an Leukozyten im Durchflusszytometer. Auch bei ihnen setzt der Respiratory Burst als eine Antwort auf eine Teilchenexposition nach ca. 15 min ein (siehe „Ergebnisse und Methoden“ IV.4.2.). Diese Messungen sind wichtig, um das zeitliche Fenster der Reaktionen der Zellen auf Partikel zu definieren.

### 4. Modulation zellphysiologischer Parameter durch Partikel und Stimulantien

Die Intension dieser Arbeit ist es, die Reaktionen von inflammatorischen Zellen auf feine und ultrafeine Teilchen zu analysieren. Die untersuchten zellphysiologischen Parameter sind: die Erzeugung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten und die Freisetzung von Prostaglandin  $\text{E}_2$  als Beispiele für intrazelluläre Signaltransduktionswege; die mitochondrielle Integrität quantifiziert über die Messung des Mitochondrien-Membranpotentials; der Respiratory Burst und die Apoptose als Endpunkte der Inflammation. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse dieser Untersuchungen dargestellt und diskutiert.

#### 4.1. Modulation der plasmatischen Calciumkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Leukozyten

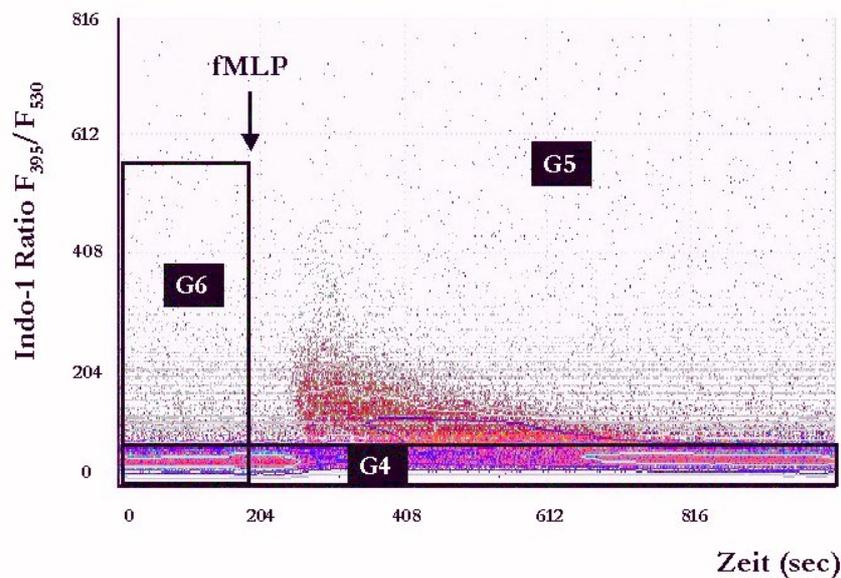
Unter Punkt 2.2.2. der „Theoretischen Grundlagen“ wurde die Bedeutung von freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen als second-messenger-Moleküle in der Zelle hervorgehoben.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen nehmen eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion der Zelle ein und stehen am Anfang einer Vielzahl von intrazellulären Prozessen. So haben  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen u.a. Einfluss auf den Respiratory Burst [66] und die Apoptose [67, 68]. In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Untersuchungen über die Modulation des intrazellulären Calciumgehalts ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) durch Partikel dargestellt.

Die Messungen wurden mit der unter dem Punkt „Methodische Grundlagen“ III.1.2.1. beschriebenen Indo-1-AM-Ratiomethode gemacht. Die Durchführung und Auswertung der Experimente basiert auf einer Methode von Grundler et al. [171].

### 4.1.1. Modulation von $[Ca^{2+}]_i$ durch fMLP und Thapsigargin

Zur Prüfung der Vitalität der Zellen und zur Verifikation der Methode wurden die Zellen mit fMLP stimuliert (siehe auch „Ergebnisse und Diskussion“ IV.1.1.2.).

fMLP stellt einen äußeren Reiz dar (siehe „Methodische Grundlagen“ III.5.2.), der über den fMLP-Rezeptor vermittelt wird. Die folgende Abbildung gibt in einer Dot-Plot-Darstellung den zeitlichen Verlauf des Verhältnisses der  $F_{395}$ - zur  $F_{530}$ -Fluoreszenzintensitäten von Indo-1 wieder:

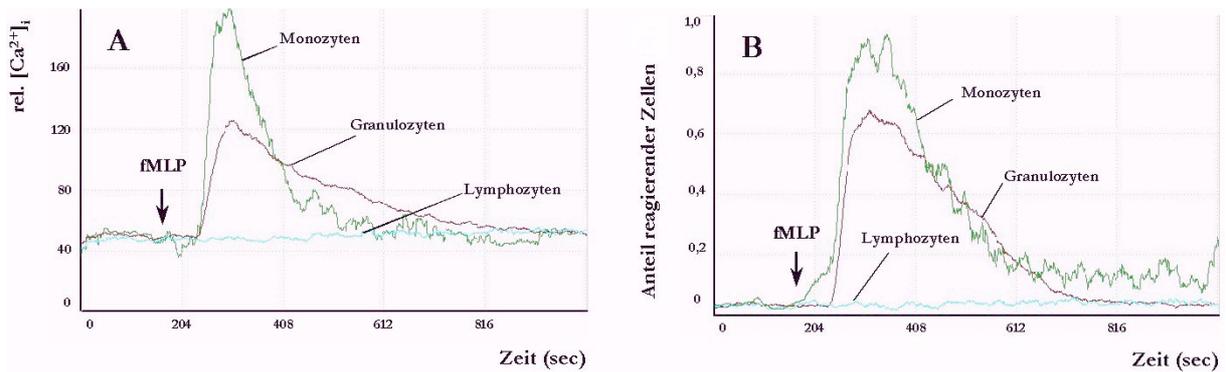


**Abb. 44.: Modulation von  $[Ca^{2+}]_i$  durch fMLP bei Leukozyten.**

Auf der y-Achse ist das Verhältnis der 395nm- und der 530nm-Fluoreszenzintensitäten von Indo-1 (Indo-1-Ratio) aufgetragen und auf der x-Achse die Zeit. Die Messungen im Durchflusszytometer erfolgten über einen Zeitraum von 17 min, wobei das Stimulans nach 3 min zugegeben wurde (Pfeil). Das Gate G4 umschließt alle nichtreagierenden Zellen, G5 definiert die reagierenden Zellen und G6 umfasst alle Zellen vor Zugabe des Stimulans, also die Kontrollzellen (Medium: RPMI1640 ohne FCS und ohne Phenolrot, fMLP-Konzentration:  $10^7$  M,  $37^\circ\text{C}$ ).

Abbildung 44 zeigt die Vorteile von Kinetik-Messungen. Die Kontrolle ist als Vorlauf in der Messung enthalten, so dass die Qualität der Messung beurteilt werden kann, und selbst kleine relative Unterschiede in unterschiedlichen Messungen miteinander verglichen werden können. Des Weiteren werden durch die kontinuierliche Aufzeichnung der Signale auch sehr schnelle Reaktionen, wie z.B. die auf fMLP, in Sekundenaufösung erfasst. In Abbildung 44 sind die Reaktionen aller drei Zellfraktionen (Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten) enthalten. Diese dot-plot-Daten wurden, wie in „Methodische Grundlagen“ III.1.2.2. beschrieben, in die Subpopulationen unterteilt, und die Daten für jede Zellgruppe getrennt ausgewertet. Die folgende Abbildung 45 zeigt die Reaktionsverläufe der verschiedenen Zellspesies:

#### IV. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 45:** *Reaktionen von Leukozyten auf fMLP.*

*(Gemittelte Reaktionsverläufe aus den dot-plot-Daten, zeitliche Auflösung  $\Delta t = 1$  s, Mittelwerte pro Zeitkanal aus ca. 250 Einzelwerten, Standardabweichung aus Übersichtsgründen nicht gezeigt; Versuchsbedingungen: RPMI ohne Phenolrot und ohne FCS, Indo-1-AM:  $5 \mu M$ ,  $37^\circ C$ , fMLP:  $100 nM$ .)*

A) *Kinetiken des relativen intrazellulären Calciumgehalts.*

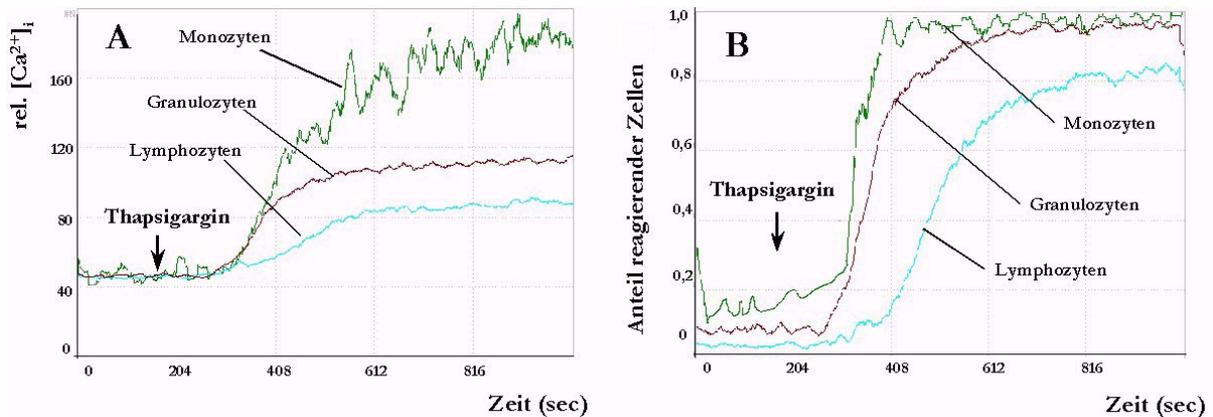
B) *Anteile von reagierenden Zellen an der Gesamtanzahl der lebenden Zellen der jeweiligen Subpopulation.*

Abbildung 45 A gibt den Verlauf des relativen  $[Ca^{2+}]_i$  in den verschiedenen Zellpopulationen wieder. In Monozyten und Granulozyten zeigt sich eine schnelle Veränderung von  $[Ca^{2+}]_i$  nach Stimulation mit fMLP (30 sec nach fMLP-Zugabe bei der angewandten Schüttel- und Boosttechnik). Dabei übersteigt das durch Monozyten ausgelöste Signal das der Granulozyten. In Lymphozyten wird durch fMLP kein Effekt induziert. Dies erklärt sich durch das Fehlen von fMLP-Rezeptoren dieser Zellen.

Abbildung 45 B zeigt den Anteil der reagierenden Zellen, also der Zellen, die eine hinreichend große Veränderung (größer als die zweifache Standardabweichung des Kontrollzellen-Signals) in ihrem Indo-1-Fluoreszenzsignal aufweisen, an der Gesamtzahl der lebenden Zellen der jeweiligen Subpopulation. Bei Monozyten reagierten maximal 95 % und bei Granulozyten 63 % der Zellen. Bei Lymphozyten konnten keine reagierende Zellen festgestellt werden.

Als zweites Stimulans zur Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  wurde Thapsigargin eingesetzt. Thapsigargin stellt einen unspezifischen, nicht über Rezeptoren vermittelten, Stimulus dar, der intrazellulär durch Hemmung der ATP-abhängigen  $Ca^{2+}$ -Pumpen in der Membran des endoplasmatischen Reticulums und der Calcisomen wirkt (siehe „Methodische Grundlagen“ III.5.3.) und daher unabhängig von der Zellart ist.

#### IV. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 46:** Modulation von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Thapsigargin.

(Versuchsbedingungen: RPMI ohne Phenolrot und ohne FCS, Indo-1-AM:  $5 \mu M$ ,  $37^\circ C$ , Thapsigargin:  $100 nM$ .)

A) Kinetiken des relativen intrazellulären Calciumgehalts.

B) Anteile von reagierenden Zellen an der Gesamtanzahl der lebenden Zellen der jeweiligen Subpopulation.

Thapsigargin löst in allen drei Zellfraktionen eine Erhöhung des intrazellulären Calciumgehalts aus.

Wie schon bei der Reaktion auf fMLP, zeigen sich auch nach Stimulation mit Thapsigargin in Monozyten, verglichen mit den beiden anderen Zellfraktionen, die höchsten Werte, was sowohl durch die Heraufsetzung des intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Gehalts, als auch durch die unterschiedlichen Zellvolumina bedingt sein kann. (Der pro Zelle registrierte Spannungsimpuls stellt das integrale Signal über alle Fluoreszenzmoleküle nach Laseranregung dar.) Aufgrund der nicht-rezeptorvermittelten Hemmung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Pumpen kommt es auch in Lymphozyten zu einer Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$ .

Die Beispiele der Stimulation von  $[Ca^{2+}]_i$  durch fMLP und Thapsigargin macht die Vorteile der zeitaufgelösten Kinetikmessung zur Erfassung des intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Gehalts deutlich. Es werden schnelle Reaktionen erfasst, und durch die synchrone Analyse von mehreren Zellpopulationen können verschiedene Zellspezies untereinander verglichen werden, ohne dass systematische Fehler, bedingt durch verschiedene Versuchsansätze, die Ergebnisse verfälschen können. Diese Art der experimentellen Durchführung wurde auch bei den Versuchen verwendet, bei denen die Modulation von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Partikel untersucht worden ist und deren Ergebnisse im Folgenden präsentiert werden sollen.

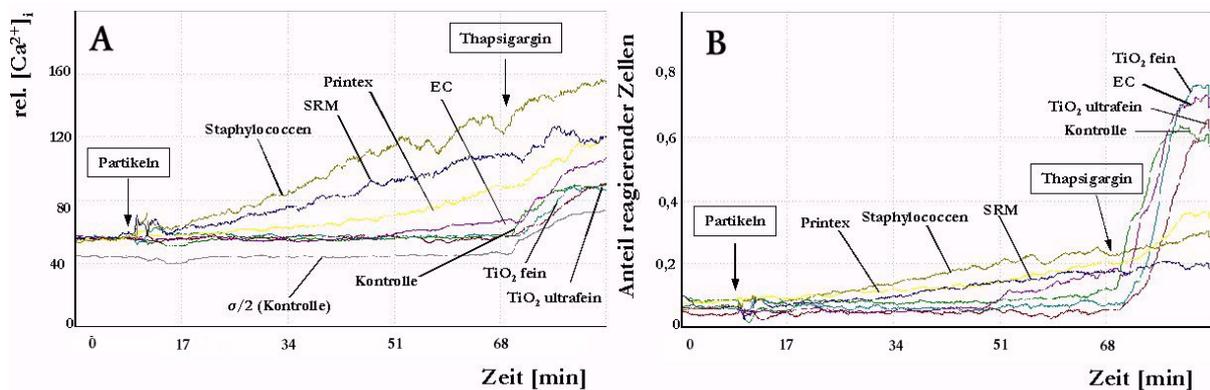
### 4.1.2. Modulation von $[Ca^{2+}]_i$ durch Partikel und Thapsigargin

Um der Frage nachzugehen, ob Partikel Einfluss auf den intrazellulären Calciumgehalt ausüben, wurden die Zellen den Partikel exponiert, und der Verlauf des intrazellulären Calciumgehalts mit der Indo-1-AM-Ratiomethode durchflusszytometrisch gemessen (siehe oben).

Zur Messung einer möglichen Induktion von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Teilchen wurden die Versuche auf eine Dauer von 85 Minuten ausgedehnt. Zur Untersuchung der modulativen Eigenschaften von Partikel wurden die Zellen nach 60-minütiger Exposition mit Teilchen zusätzlich mit Thapsigargin (100 nM) stimuliert.

Die Kinetik-Experimente teilen sich also in drei Abschnitte ein: Nach einem Vorlauf von zehn Minuten wurden die Teilchen (jeweils in einer Konzentration von 32 mg/ml, bzw. die Staphylococci in einem Bakterien/Zellverhältnis von 100:1) zugegeben. Nach einer Expositionsdauer von 60 min, in der die direkte Partikelwirkung untersucht wurde, erfolgte die Zugabe von Thapsigargin (Konzentration: 100 nM).

In den folgenden Abbildungen (Abb. 47 – 49) werden die Ergebnisse der Messungen, nach Zellfraktionen aufgeteilt wiedergegeben:



**Abb. 47:** *Modulation des intrazellulären Calciumgehalts in Granulozyten durch Partikel.*

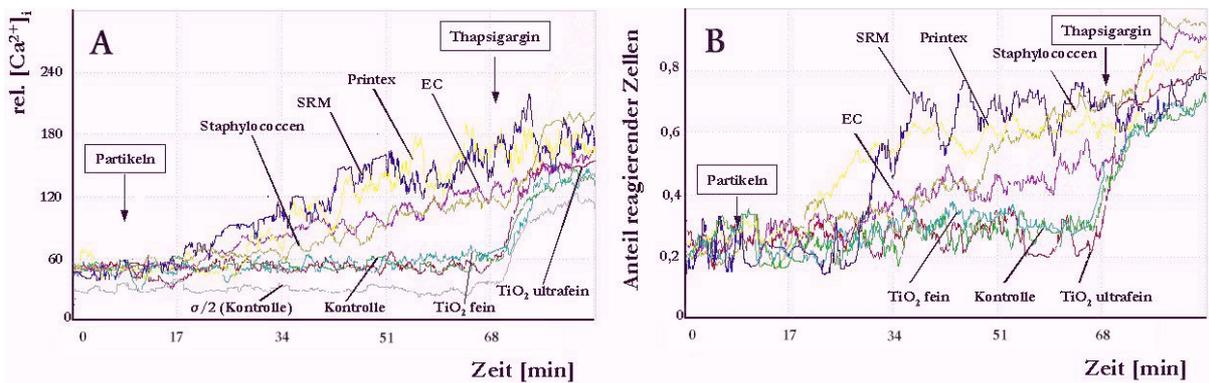
*(Versuchsbedingungen: RPMI ohne Phenolrot und ohne FCS, Indo-1-AM: 5  $\mu$ M, 37°C, Thapsigargin:*

*100 nM, Partikelkonzentration: 32  $\mu$ g/ml bzw. Zell-Bakterien-Verhältnis 1:100, Zugabe der Partikel: nach 10 min Kontrolllauf, Zugabe von Thapsigargin: nach 60 min Einwirkzeit der Teilchen, repräsentative Experimente.)*

A) *Kinetiken des relativen intrazellulären Calciumgehalts.*

B) *Anteile von reagierenden Zellen an der Gesamtanzahl der lebenden Zellen.*

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

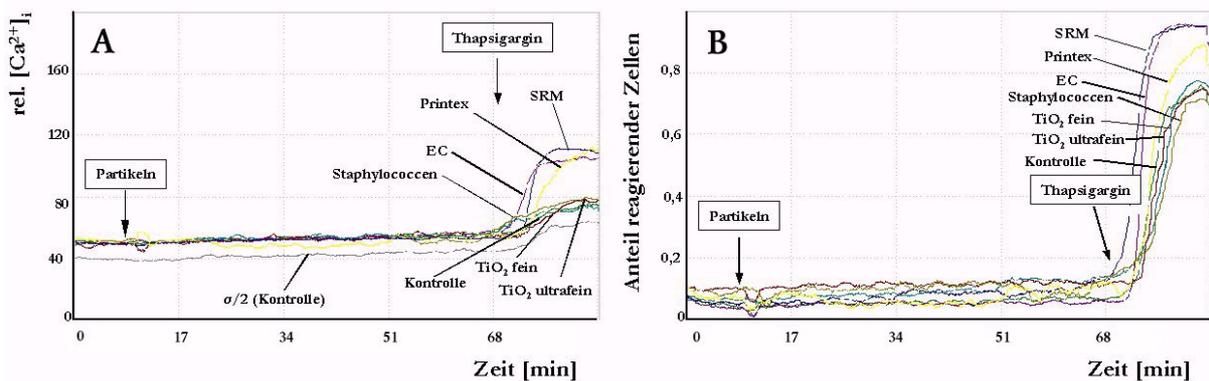


**Abb. 48:** *Modulation des intrazellulären Calciumgehalts in Monozyten durch Partikel.*

(Versuchsbedingungen: RPMI ohne Phenolrot und ohne FCS, Indo-1-AM: 5  $\mu$ M, 37°C, Thapsigargin: 100 nM, Partikelkonzentration: 32  $\mu$ g/ml bzw. Zell-Bakterien-Verhältnis 1:100, repräsentative Experimente.)

A) *Kinetiken des relativen intrazellulären Calciumgehalts.*

B) *Anteile von reagierenden Zellen an der Gesamtanzahl der lebenden Zellen.*



**Abb. 49:** *Modulation des intrazellulären Calciumgehalts in Lymphozyten durch Partikel.*

(Versuchsbedingungen: RPMI ohne Phenolrot und ohne FCS, Indo-1-AM: 5  $\mu$ M, 37°C, Thapsigargin: 100 nM, Partikelkonzentration: 32  $\mu$ g/ml bzw. Zell-Bakterien-Verhältnis 1:100, repräsentative Experimente.)

A) *Kinetiken des relativen intrazellulären Calciumgehalts.*

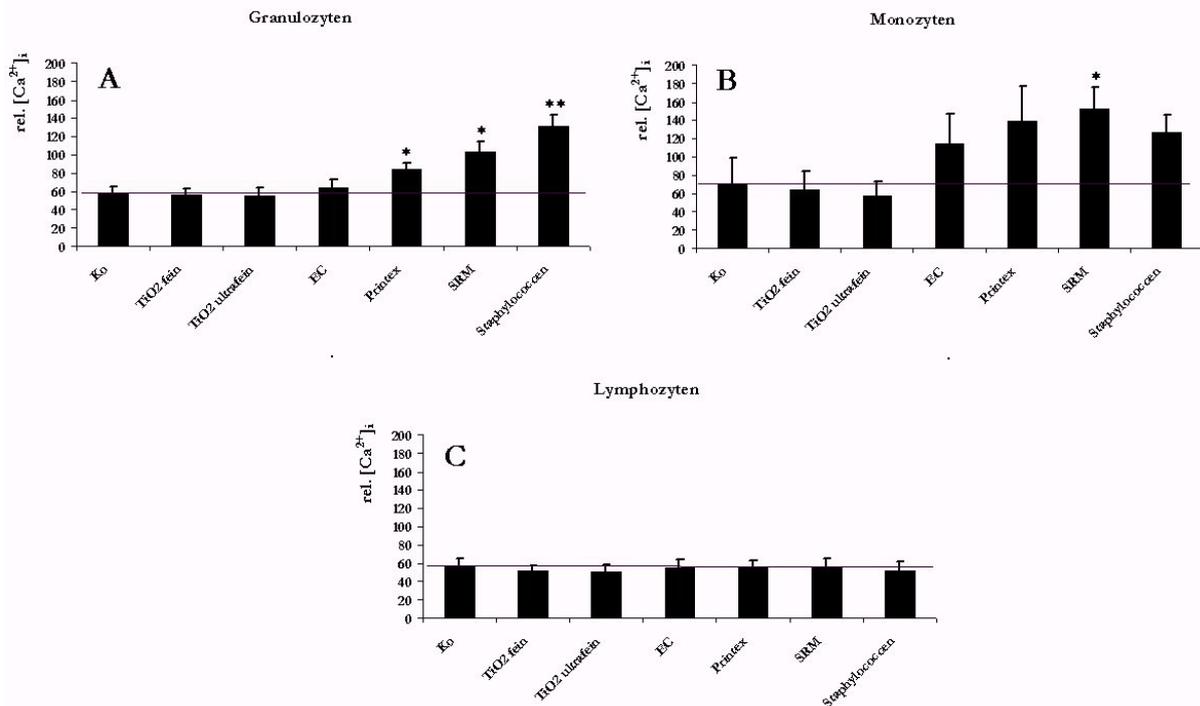
B) *Anteile von reagierenden Zellen an der Gesamtanzahl der lebenden Zellen.*

##### 4.1.2.1. Direkte Induktion von $[Ca^{2+}]_i$ durch Partikel

Aus den dargestellten Ergebnissen ist zu schließen, dass einige der untersuchten Partikel-Arten in der Lage sind, den intrazellulären Calciumgehalt in inflammatorischen Zellen (d.h. in Granulozyten und Monozyten) zu erhöhen. In Lymphozyten hingegen induziert keine der verwendeten Teilchensorten direkt eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$ .

## IV. Ergebnisse und Diskussion

Zur Quantifizierung dieser Effekte wurden die maximalen relativen  $[Ca^{2+}]_i$ -Werte vor der Stimulation mit Thapsigargin (69 – 70 min) mit Hilfe des DAS-Analyseprogramms ermittelt und miteinander verglichen. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 50:



**Abb. 50:** Maximale relative  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen nach 1 h Einwirkzeit der Teilchen (Abszisse 69 – 70 min der Abbildungen 47A – 49A).

- A) Maximale relative  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen in Granulozyten  
 B) Maximale relative  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen in Monozyten  
 C) Maximale relative  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen in Lymphozyten

(Versuchsbedingungen: RPMI ohne Phenolrot und ohne FCS, Indo-1-AM: 5  $\mu$ M, 37°C, Partikelkonzentration: 32  $\mu$ g/ml bzw. Zell-Bakterien-Verhältnis 1:100, MW  $\pm$  S.D., \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , repräsentative Experimente.)

Die Fehlerindikatoren in Abbildung 50, sowie in den weiteren Balkendiagrammen zur Modulation von  $[Ca^{2+}]_i$  und zu den Untersuchungen des Respiratory Burst, geben die Standardabweichungen in den einzelnen Experimenten wieder. Die Signifikanz der Werte wurde, wie unter „Experimenteller Teil“ VII.7. beschrieben, mit dem Student-t-Test getestet, nachdem die Daten mit dem F-Test auf homo- bzw. heterogene Verteilung geprüft worden waren. Alle Experimente wurden mindestens zweimal wiederholt

Wie in Abbildung 50 zu erkennen ist, unterscheiden sich die untersuchten Teilchen-Sorten in ihren Vermögen  $[Ca^{2+}]_i$  zu beeinflussen. TiO<sub>2</sub>-Partikel und EC-Teilchen verursachten in keiner der drei untersuchten Zellfraktionen einen signifikanten Anstieg des intrazellulären Calciumgehalts.

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Printex-Partikel hoben die Konzentration der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen im Zytoplasma von Granulozyten um den Faktor 1,48; in Monozyten und Lymphozyten führte die Exposition mit Printex-Partikel zu keiner signifikanten Anhebung des intrazellulären Calciumgehalts im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle. SRM-Teilchen dagegen zeigten sich als am die effektivsten Teilchen. Sie erhöhten  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  um den Faktor 1,81 in Granulozyten und um den Faktor 2,15 in Monozyten.

In Granulozyten waren es die Staphylococcen, die die größte Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration hervorriefen. Der Steigerungsfaktor lag hier bei 2,3.

Die Ergebnisse belegen, dass Partikel auf den intrazellulären Calciumgehalt direkt einwirken und einen Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzieren können. Dabei steigen die intrazellulären Calciumwerte in Granulozyten in der Reihenfolge  $\text{EC} < \text{P90} < \text{SRM} < \text{Staphylococcen}$  und in Monozyten in der Reihenfolge  $\text{EC} < \text{Staphylococcen} < \text{P90} < \text{SRM}$ . Feine  $\text{TiO}_2$ - und ultrafeine  $\text{TiO}_2$ -Teilchen induzieren im Vergleich zu Kontrollwerten keine signifikanten Unterschiede in den Indo-1-Signalhöhen. Dass  $\text{TiO}_2$   $[\text{Ca}^{2+}]_i$  nicht beeinflusst, konnten auch Gercken und Kollegen [175] beobachten, die die Wirkung von Quarzstäuben (QUSO G 32, Sikron F 600) und  $\text{TiO}_2$  (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) auf Kuh-Alveolarmakrophagen untersuchten. Dagegen führten QUSO G 32 und Sikron F600 (je 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) zu einem deutlichen Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  um einen Faktor von 5,4.

Der Vergleich zwischen EC- und P90-Teilchen zeigt (siehe Abbildung 50 A und 50 B), dass P90-Partikel eine stärkere direkte Wirkung auf den intrazellulären Calciumgehalt haben, als EC-Partikel, obwohl diese eine größere spezifische Oberfläche besitzen als Printex-Teilchen (siehe „Methodische Grundlagen“ III.4.).

Stone et al. [74] arbeiteten ebenfalls mit ultrafeinen EC-Teilchen (Durchmesser: 14 nm, Konzentration 66  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und ließen sie auf MM6-Zellen einwirken. Sie konnten eine Erhöhung der freien intrazellulären Calciumkonzentration um einen Faktor 1,6 (nach einer Expositionszeit von 2000 sec) feststellen. Feine EC-Partikel mit einem Durchmesser von 260 nm und Quarz-Partikel induzierten hingegen keine Veränderung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . In den Untersuchungen dieser Arbeit wurde zwar eine Erhöhung aber kein signifikanter Effekt im Bezug auf  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch EC-Partikel festgestellt. Dies könnte an den verschiedenen Zellsystemen und an der geringeren Größe der von Stone et al. eingesetzten EC-Teilchen (14 nm Durchmesser, in dieser Arbeit: 77 nm) liegen.

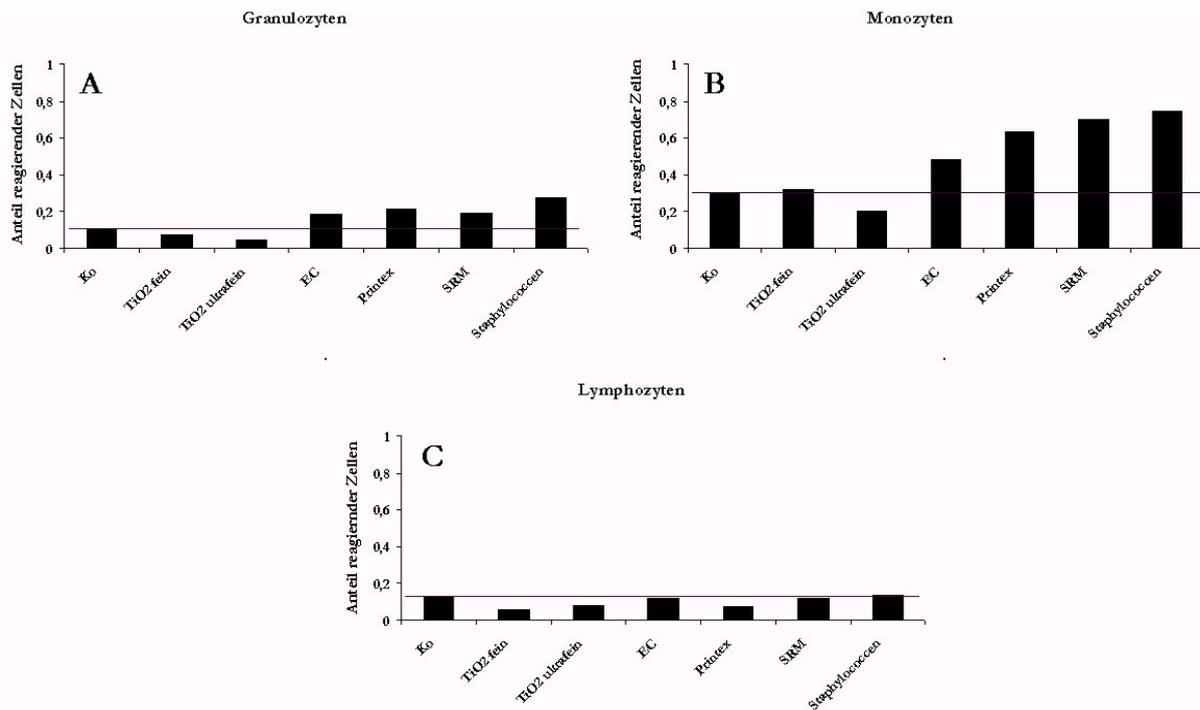
Die SRM-Partikel haben sich in den Untersuchungen als die am stärksten  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -induzierende, abiotische Teilchenfraktion erwiesen. Die Induktion von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch SRM1650-Partikel wurde bisher noch nicht beschrieben.

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

Staphylococccen stellen einen adäquaten Reiz für die Abwehrzellen dar. Über den Fc-Rezeptor bzw. den LPS-Rezeptor (siehe „Methodische Grundlagen“ III.4.5.) vermittelt, laufen die Phagozytose und die Eliminierung der Bakterien in den Phagolysosomen ab. Wie bereits im Kapitel „Theoretische Grundlagen“ II.2.3.2.1. erläutert, ist für die eigentliche Phagozytose kein Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  nötig [63].

Allerdings erfolgen die Verschmelzung der Phagosomen mit den Lysosomen und die Formierung der NADPH-Oxidase aus ihren Untereinheiten erst nach einer lokalen Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  [64, 65, 66]. Eine Zunahme des intrazellulären Calciumgehalts nach Exposition mit Staphylococccen belegen auch Untersuchungen von Wilson et al. [176].

Neben den relativen  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen wurden auch die Anteile  $[Ca^{2+}]_i$ -reagierender Zellen an den jeweiligen lebenden Subpopulationen im Zeitraum von 69 – 70 min während der Experimente erfasst.



**Abb. 51:** Anteile  $[Ca^{2+}]_i$ -reagierender Zellen nach 1 h Einwirkzeit der Teilchen (Abszisse 69 – 70 min der Abbildungen 47 -49).

(Versuchsbedingungen: RPMI ohne Phenolrot und ohne FCS, Indo-1-AM: 5  $\mu$ M, 37°C, Partikelkonzentration: 32  $\mu$ g/ml bzw. Zell-Bakterien-Verhältnis 1:100, repräsentative Experimente).

- A) Anteile reagierender Zellen in Granulozyten
- B) Anteile reagierender Zellen in Monozyten
- C) Anteile reagierender Zellen in Lymphozyten

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Bei der Betrachtung der Anteile der reagierenden Zellen (Abbildung 51) fällt der im Vergleich zu den Monozyten geringe Anteil von reagierenden Granulozyten auf. In dieser Zellfraktion muss es also eine reaktive Subpopulation geben, die auf die Partikel anspricht.

Des Weiteren zeigt sich, dass ein hoher Anteil an reagierenden Zellen nicht zwangsweise ein hohes  $[Ca^{2+}]_i$ -Signal mit sich bringt. So liegt der maximale Prozentsatz reaktiver Granulozyten nach einer Stimulation mit Printex-Partikel mit 21,3 % leicht über dem Anteil, der durch SRM-Teilchen ausgelöst wird (19,1 %), obwohl diese den größeren Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  in den Zellen induzieren.

Eine Erklärung hierfür könnte die größere Apoptose-induzierende Wirkung von SRM-Teilchen sein (siehe Punkt 4.3. dieses Kapitels), die zum Absterben einer Subpopulation innerhalb der Granulozyten führen könnte. Ähnliche Ergebnisse zeigen sich beim Vergleich der  $Ca^{2+}$ -Induktion durch Staphylococccen und EC-Partikel in Monozyten. Die maximale Rate reagierender Zellen nach Stimulation mit Staphylococccen übertrifft mit 74,3 % die der Printex- (63,0 %) und der SRM-Teilchen (70,3 %), obgleich Staphylococccen niedrigere  $[Ca^{2+}]_i$ -Werte induzierten.

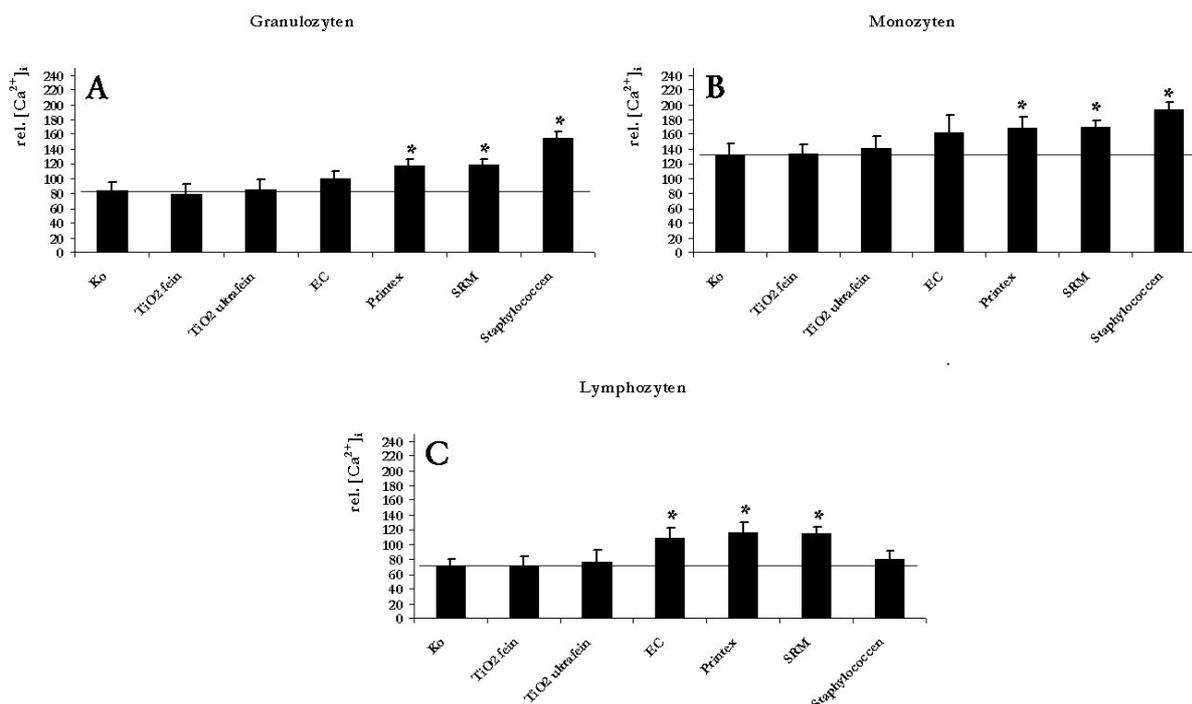
Aus den hier dargestellten Ergebnissen lässt sich folgern, dass weniger die spezifische Oberfläche als viel mehr die Zusammensetzung der Teilchen oder ihre Oberflächenbeladung über ihr Vermögen, Veränderungen in  $[Ca^{2+}]_i$  zu induzieren, entscheidet.

### 4.1.2.2. Modulation von $[Ca^{2+}]_i$ durch Partikel nach Stimulation der Zellen mit Thapsigargin

Wie aus den Ergebnissen des letzten Abschnitts hervorgeht, hat ein Teil der untersuchten Partikel eine direkte induktive Wirkung auf die intrazelluläre Calciumkonzentration.

In dieser Arbeit zeigte sich, dass Partikel auch eine modulierende Wirkung auf den von Thapsigargin verursachten Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  haben können. Um dies zu untersuchen, wurden die Zellen, wie unter IV.4.2.1. beschrieben, mit Thapsigargin (100 nM) stimuliert, nachdem sie 1 h den Partikel ausgesetzt worden waren. Zur Quantifizierung der Effekte wurden die relativen  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen und die Anteile der reagierenden Zellen in der 84 Minute der Kinetikmessungen (siehe Abb. 47 – 49) erfasst und ausgewertet. Die Ergebnisse zeigt die folgende Graphik:

## IV. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 52:** Relative  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen nach 60 min Einwirkzeit der Teilchen und 14 min nach Stimulation mit Thapsigargin (gemessen am Abszissenwert 83 – 84 min der Abbildungen 47A – 49 A).

(Versuchsbedingungen: RPMI ohne Phenolrot und ohne FCS, Indo-1-AM: 5  $\mu$ M, 37°C, Partikelkonzentration: 32  $\mu$ g/ml bzw. Zell-Bakterien-Verhältnis 1:100, MW  $\pm$  S.D., \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$  repräsentative Experimente.)

A) Relative  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen in Granulozyten

B) Relative  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen in Monozyten

C) Relative  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen in Lymphozyten

Die Untersuchungen belegen synergistische Effekte zwischen Thapsigargin und einem Teil der untersuchten Partikelarten. In Granulozyten und Monozyten konnte eine signifikante Steigerung des Effekts von Thapsigargin im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle nach Vorinkubation mit Printex- und SRM-Partikel, sowie mit Staphylococccen festgestellt werden. Interessanterweise ergaben sich auch synergistische Effekte zwischen Thapsigargin und Partikel in Lymphozyten, in denen EC-, Printex- und SRM-Partikel in Kombination mit Thapsigargin eine signifikante Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration verursachten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst:

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

	Faktor der Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$		
	Granulozyten	Monozyten	Lymphozyten
EC-Partikel	-	-	1,54
Printex-Partikel	1,28	1,46	1,64
SRM-Partikel	1,29	1,48	1,62
Staphylococcen	1,46	1,94	-

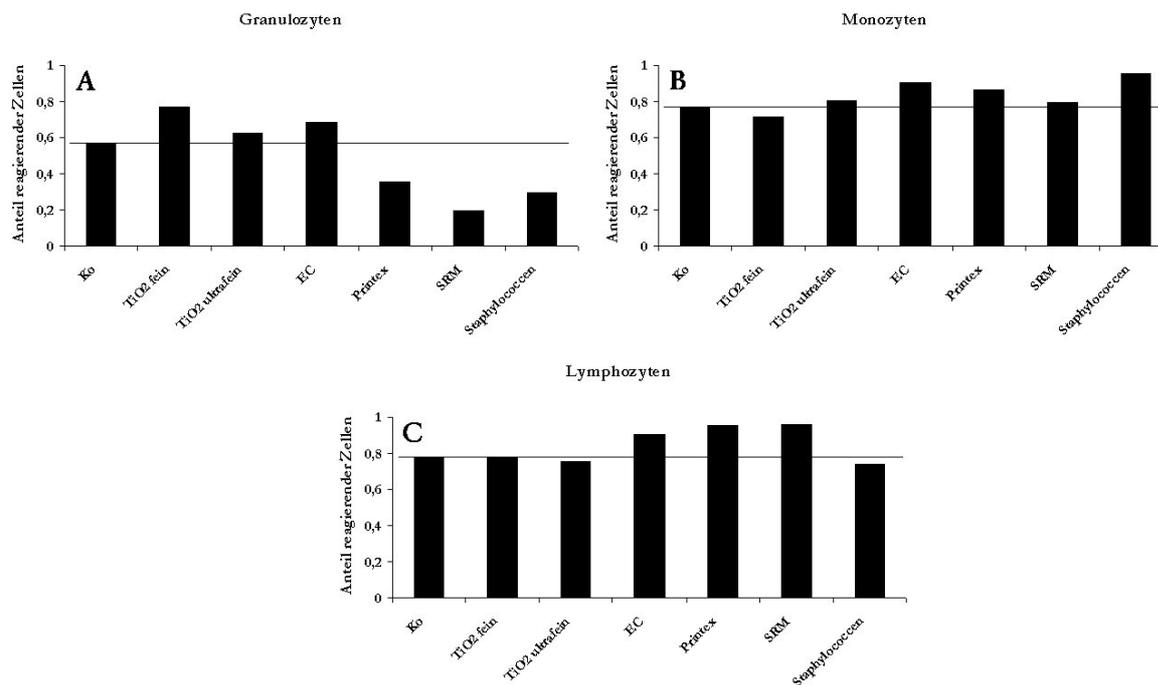
**Tabelle 6:** Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  in Leukozyten: Synergistische Wirkung von Partikel mit Thapsigargin.

Tabelle 6 zeigt, dass Printex- und SRM-Partikel in allen drei Zellfraktionen etwa die gleichen Effekte auslösten. Dies steht im Gegensatz zur direkten Wirkung dieser Partikel. Hier induzierten SRM-Teilchen in Granulozyten und Monozyten deutlich höhere Effekte als Printex-Teilchen. In Lymphozyten wurde durch Teilchen direkt keine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  ausgelöst. Bei der Kombination von Partikel und Thapsigargin dagegen ergaben sich auch bei dieser Zellfraktion für EC-, Printex- und SRM-Teilchen signifikante Effekte. Da Lymphozyten keine Partikel-eliminierende Funktion ausüben und daher Partikel nicht über Phagozytose in die Zellen aufgenommen werden, ist es wahrscheinlich, dass es sich bei dem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in Lymphozyten um keine spezifische Abwehrreaktion handelt, sondern um eine nichtphysiologische Interaktion zwischen den Partikel und der Zellmembran. Auf diesen Sachverhalt wird in Verbindung mit dem Punkt IV.5 („Wirkung von SRM-Partikel: Adsorption von Farbstoffen und Synergismus mit Stimulantien“) in der allgemeinen Diskussion (IV.6.) ausführlich eingegangen.

Vergleichbare Experimente haben Stone et al [74] durchgeführt. Sie beobachteten eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  um einen Faktor 2,6 nach einer Exposition von MM6-Zellen mit ultrafeinen EC-Partikel (Durchmesser 14 nm, Konzentration 66  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und nachfolgender Stimulation mit Thapsigargin. Feine EC-Partikel mit einem Durchmesser von 260 nm und Quarz-Partikel induzierten hingegen keine Veränderung von  $[Ca^{2+}]_i$ .

Wie für die direkte Induktion von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Partikel (siehe vorherigen Abschnitt IV.4.1.2.1.) wurden auch für die synergistischen Effekte von Partikel und Thapsigargin die Anteile der  $[Ca^{2+}]_i$ -reagierenden Zellen bestimmt:

## IV. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 53:** *Anteile  $[Ca^{2+}]_i$ -reagierender Zellen nach 60 min Einwirkzeit der Teilchen und 14 min nach Stimulation der Zellen mit Thapsigargin (gemessen am Abszissenwert 84 – 85 min der Abbildungen 47 –49 B).*

*(Versuchsbedingungen: RPMI ohne Phenolrot und ohne FCS, Indo-1-AM: 5  $\mu$ M, 37°C, Partikelkonzentration: 32  $\mu$ g/ml bzw. Zell-Bakterien-Verhältnis 1:100, repräsentative Experimente).*

- A) *Anteile reagierender Zellen in Granulozyten*
- B) *Anteile reagierender Zellen in Monozyten*
- C) *Anteile reagierender Zellen in Lymphozyten*

Die Anteile der reagierenden Zellen nach Thapsigargin-Zugabe sind sowohl in der Kontrolle als auch in den Experimenten, in denen die Zellen mit Partikel vorbehandelt wurden, unabhängig von der Zellart, relativ hoch (siehe Abbildung 53). Eine Ausnahme machen nur die mit Printex- und SRM-Teilchen sowie mit Staphylococci inkubierten Granulozyten. Diese Reaktionsraten sind, gegenüber denen mit reiner Partikelexposition vor Stimulation mit Thapsigargin gemessenen (siehe Abbildung 51), nur geringfügig erhöht. Wie sich diese niedrigen Reaktionsraten erklären lassen, ist unklar. Möglicherweise kommt es durch die kombinierte Wirkung von Partikel und Thapsigargin zu einem Kollabieren einer apoptotischen Subpopulation. Dies kann aber durch die Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Apoptose (siehe Punkt IV.4.3.2.) nicht bestätigt werden.

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Die Ergebnisse zeigen, dass sich ein Teil der untersuchten Partikelarten direkt oder synergistisch auf  $[Ca^{2+}]_i$  auswirken kann. Dabei hat sich gezeigt, dass die auf Kohlenstoff basierenden Teilchen (EC-, Printex- und SRM-Partikel) effektiver sind als die verwendeten  $TiO_2$ -Partikel.

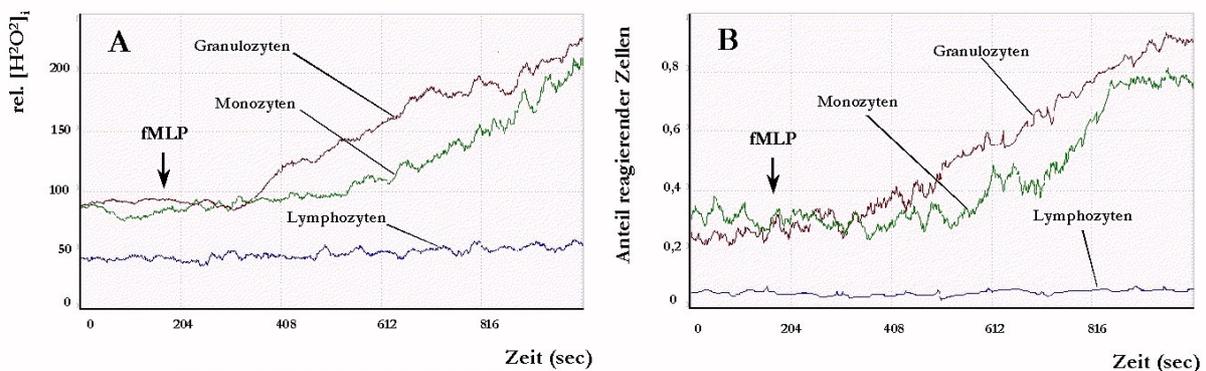
*Partikel können Einfluss auf  $[Ca^{2+}]_i$  nehmen. In Granulozyten setzten SRM-, Printex-Partikel, sowie Staphylococcen  $[Ca^{2+}]_i$  nach einer Stunde Einwirkzeit signifikant herauf. In Monozyten zeigten nur SRM-Partikel eine deutliche Wirkung und in Lymphozyten konnte im untersuchten Zeitraum kein direkter Einfluss auf  $[Ca^{2+}]_i$  durch die untersuchten Partikel festgestellt werden. Synergistische Effekte von Partikeln und Thapsigargin konnten in Granulozyten und Monozyten nach Vorinkubation mit SRM- und Printex-Partikeln, sowie mit Staphylococcen nachgewiesen werden. Eine Modulation von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Partikel nach Stimulation mit Thapsigargin konnte auch in Lymphozyten beobachtet werden. Hier waren es EC-, Printex- und SRM-Partikel, die signifikante Effekte auslösten.*

### 4.2. Respiratory Burst in Granulozyten und Monozyten

Im Folgenden soll auf den Respiratory Burst in Granulozyten und Monozyten eingegangen werden. Der Respiratory Burst ist, wie bereits unter Punkt II.2.2.3. der „Theoretischen Grundlagen“ beschrieben wurde, ein intrazellulärer Reaktionsweg, der zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies führt. Diese dienen der Elimination von Mikroorganismen, die von Abwehrzellen phagozytiert und in die Phagolysosomen aufgenommen worden sind. Die reaktiven Sauerstoffmetaboliten können in niedrigen Konzentrationen zur intrazellulären Signaltransduktion beitragen [78]. Eine zu hohe Konzentration kann sich schädigend auf die produzierende Zelle und das umliegende Gewebe auswirken [79, 80, 81]. Dies unterstreicht die Notwendigkeit einer exakten Steuerung des intrazellulären Redoxgleichgewichtes. Der Respiratory Burst ist eine Abwehrreaktion gegen biogene Partikel, wie z.B. Bakterien. Umweltpartikel wie die in dieser Arbeit untersuchten  $TiO_2$ - und Rußteilchen sind im Gegensatz dazu kaum durch reaktive Sauerstoffspezies degradierbar. Ob die inflammatorischen Zellen nach Stimulation mit Partikel trotzdem reaktive Sauerstoffmetabolite produzieren und wenn ja, in welchem Ausmaß, ist Gegenstand der folgenden Abschnitte.

### 4.2.1. Stimulation des Respiratory Burst durch fMLP

Im Punkt „Methodische Grundlagen“ III.3.3. wurden die Untergruppen der Leukozyten beschrieben und die Monozyten bzw. Makrophagen und die Granulozyten als Zellen der unspezifischen Abwehr, sowie die Lymphozyten als Zellen der spezifischen Abwehr dargestellt. Dementsprechend zeigen die drei Subpopulationen ein unterschiedliches Verhalten im Bezug auf die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies. Dies soll hier kurz anhand der Stimulation der Zellen mit fMLP dargestellt werden. Die Zellen wurden in RPMI1640 ohne Phenolrot und ohne FCS mit DHR-123 (siehe „Methodische Grundlagen“ III.1.2.3.) 20 min vorinkubiert und anschließend über einen Zeitraum von 17 min im Durchflusszytometer gemessen.



**Abb. 54:** *Unterschiedliche Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies in Leukozyten nach Stimulation mit fMLP.*

- A) *Nach einem Vorlauf von drei Minuten wurde fMLP ( $10^7$  M) zugegeben. Die Lymphozyten zeigen keine Reaktion, wohingegen in Neutrophilen und in Monozyten ein deutlicher Anstieg der R-123-Fluoreszenz zu verzeichnen ist.*
- B) *Anteile der reagierenden Zellen (Versuchsbedingungen: RPMI oder Phenolrot und ohne FCS, DHR-123:  $15 \mu\text{M}$ ,  $37^\circ\text{C}$ , Partikelkonzentration:  $32 \mu\text{g/ml}$ , repräsentative Experimente).*

Wie aus Abbildung 54 zu erkennen ist, zeigen die Granulozyten die höchste Produktion an reaktiven Sauerstoffspezies, gefolgt von den Monozyten. Die relativ hohe Respiratory Burst-Aktivität der Granulozyten lässt sich mit ihrer Funktion erklären. Sie kommen bei bereits manifestierten Entzündungen zum Einsatz, bei der eine große Anzahl von eingedrungenen Mikroorganismen eliminiert werden muss. Bei dieser Reaktion kommt es in erster Linie darauf an, die Fremdkörper unschädlich zu machen. Für den geringeren Ausstoß von reaktiven Sauerstoffmetaboliten in Monozyten sind zwei Ursachen denkbar. Zum Einen sind die aus dem Blut gewonnenen Monozyten Vorstufen von Makrophagen und könnten deshalb nur eine verminderte Reaktion zeigen.

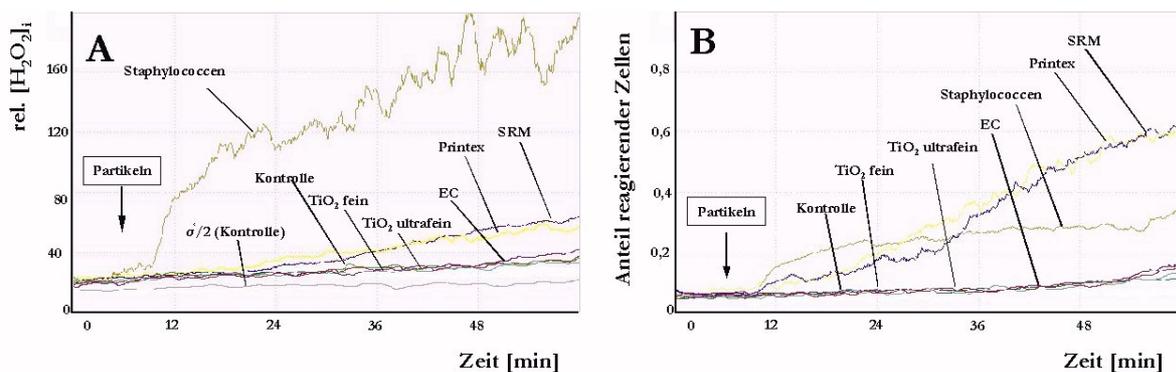
## IV. Ergebnisse und Diskussion

Zum Zweiten sind Makrophagen in den Geweben permanent präsent und haben die Funktion von „Straßenkehrern“ inne, die vereinzelte Mikroorganismen entfernen. Eine überstarke Abwehrreaktion ist daher nicht nötig und könnte sich sogar nachteilig auswirken.

Bei den Lymphozyten handelt es sich um Zellen der spezifischen Abwehr. Sie sind keine „professionellen“ Phagozyten und verfügen deshalb nicht über die unspezifische Abwehrreaktion des Respiratory Burst. Sie wurden aber trotzdem in die Experimente aufgenommen, da sie eine gute Kontrollgruppe darstellen.

### 4.2.2. Modulation des Respiratory Burst durch verschiedene Partikelarten

Um zu untersuchen, ob und in welchem Ausmaß Partikel die Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffspezies in inflammatorischen Zellen stimulieren, wurden die Zellen den Teilchen in Suspension ausgesetzt und der Verlauf der R123-Fluoreszenz in Kinetikmessungen verfolgt. Dabei wurden die Partikel nach einem Vorlauf von sechs Minuten zur Zellsuspension zugegeben und ihre Wirkung über weitere 54 min beobachtet. Die Ergebnisse dieser Messungen werden, wie bereits bei der Darstellung der Modulation des intrazellulären Calciumgehalts, im Folgenden nach Zellpopulationen aufgeteilt dargestellt. Da in Lymphozyten keine Effekte oder reagierende Zellen nachgewiesen werden konnten, werden hier nur die Ergebnisse für Granulozyten und Monozyten wiedergegeben.

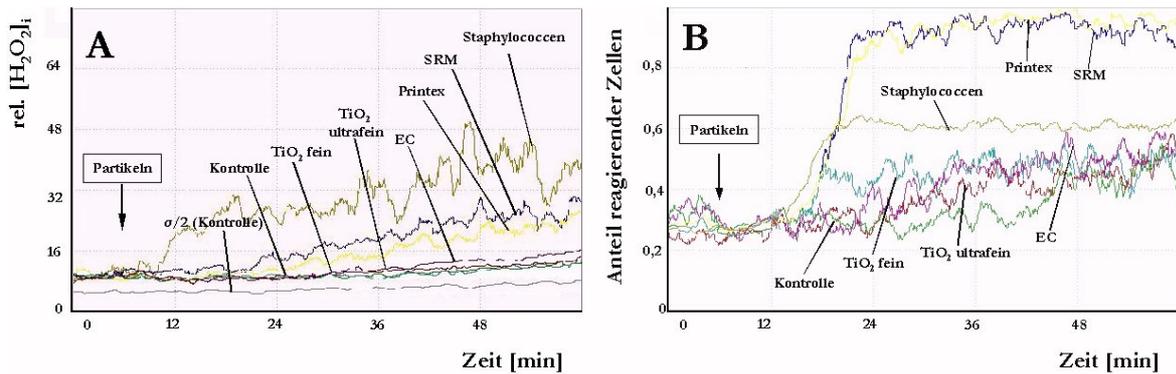


**Abb. 55:** *Modulation des Respiratory Burst in Granulozyten durch Partikel*  
(Versuchsbedingungen: RPMI ohne Phenolrot und ohne FCS, DHR123:  $15 \mu M$ ,  $37^\circ C$ , Partikelkonzentration:  $32 \mu g/ml$  bzw. Zell-Bakterien-Verhältnis 1:100, repräsentative Experimente.)

A) *Kinetiken des relativen intrazellulären  $H_2O_2$ -Gehalts.*

B) *Anteile von reagierenden Zellen an der Gesamtanzahl der lebenden Zellen.*

#### IV. Ergebnisse und Diskussion



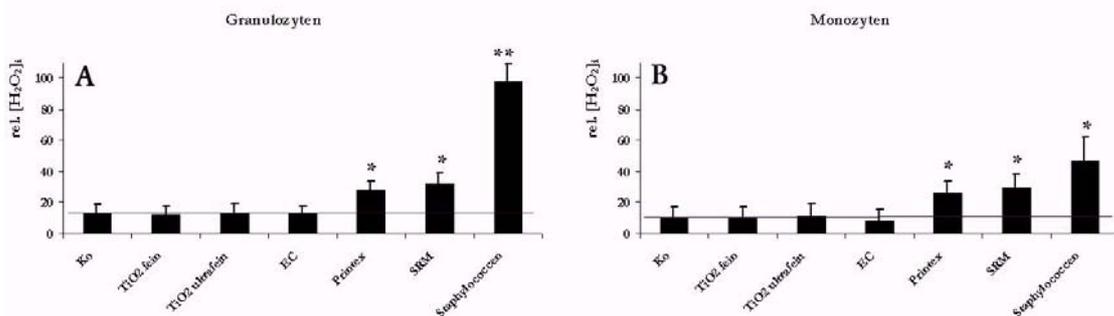
**Abb. 56:** *Modulation des Respiratory Burst in Monozyten durch Partikel.*

(Versuchsbedingungen: RPMI ohne Phenolrot und ohne FCS, DHR123: 15  $\mu$ M, 37°C, Partikelkonzentration: 32  $\mu$ g/ml bzw. Zell-Bakterien-Verhältnis 1:100, repräsentative Experimente.)

A) *Kinetiken des relativen intrazellulären H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gehalts.*

B) *Anteile von reagierenden Zellen an der Gesamtanzahl der lebenden Zellen.*

Die Abbildungen 55 A und 56 A zeigen, dass die Auslösung des Respiratory Burst durch abiotische Teilchen, im Vergleich zu Staphylococci, zeitlich verzögert erfolgt. Während nach Inkubation von Granulozyten und Monozyten mit Staphylococci bereits nach ca. sechs Minuten ein signifikant ansteigendes Signal zu erkennen ist, erfolgt dieser Anstieg der intrazellulären H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration, ausgelöst durch Printex- und SRM-Partikel, erst ca. 15 min nach Zugabe. Diese Ergebnisse decken sich mit den Untersuchungen der Phagozytose (siehe „Ergebnisse und Diskussion“ IV.3.), bei denen eine erste FcOxyburst™-Fluoreszenz ebenfalls erst nach 15 min zu erkennen war. In der folgenden Abbildung 57 sind die relativen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen in Granulozyten und Monozyten, im Zeitfenster 59 – 60 min der Abbildungen 56 A und 57 A gemessen, zusammengefasst:



**Abb. 57:** *Modulation des intrazellulären H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gehalts in Granulozyten und Monozyten durch Partikel nach 54 min Einwirkzeit.*

(Versuchsbedingungen: RPMI ohne Phenolrot und ohne FCS, DHR123: 15  $\mu$ M, 37°C, Partikelkonzentration: 32  $\mu$ g/ml bzw. Zell-Bakterien-Verhältnis 1:100, MW  $\pm$  S.D., \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , repräsentative Experimente.)

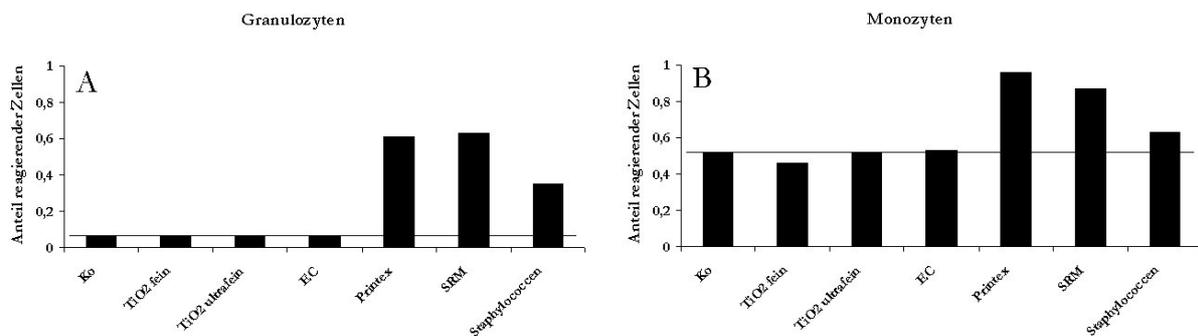
A) *Relative H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen in Granulozyten*

B) *Relative H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen in Monozyten*

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

Wie Abbildung 57 darlegt, lösen Printex- und SRM-Partikel sowie Staphylococcen nach 54 min eine signifikante Steigerung des Respiratory Burst im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in Granulozyten und Monozyten aus. Dabei heben Printex-Partikel die intrazelluläre  $H_2O_2$ -Konzentration in Granulozyten um einen Faktor 2,3 und in Monozyten um einen Faktor 2,7 an. In ähnlicher Weise wirken SRM-Teilchen. Hier betragen die Steigerungsfaktoren 2,6 in Granulozyten und 3,0 in Monozyten. Den stärksten Einfluss auf den Respiratory Burst haben die Staphylococcen gezeigt. Sie bewirkten einen Anstieg der intrazellulären  $H_2O_2$ -Konzentration in Granulozyten um einen Faktor 7,9 und in Monozyten um einen Faktor 4,7.  $TiO_2$ - und EC-Teilchen riefen keine signifikante Veränderung des Respiratory Burst hervor.

Die Anteile an reagierenden Zellen, die zu den beschriebenen  $H_2O_2$ -Konzentrationen beitragen, sind für das gleiche Zeitfenster (59 – 60 min der Abbildungen 56 B und 57 B) ermittelt worden und in Abbildung 58 dargestellt:



**Abb. 58:** Anteile reagierender Zellen in den Untersuchungen des Respiratory Burst nach 54 min Einwirkzeit der Teilchen.

(Versuchsbedingungen: RPMI ohne Phenolrot und ohne FCS, DHR123: 15  $\mu M$ , 37°C, Partikelkonzentration: 32  $\mu g/ml$  bzw. Zell-Bakterien-Verhältnis 1:100, repräsentative Experimente).

- A) Anteile reagierender Zellen in Granulozyten  
B) Anteile reagierender Zellen in Monozyten

Bei der Auswertung der Anteile der reagierenden Zellen fällt auf, dass bei Monozyten im Vergleich zu Granulozyten ein höheres Grundniveau an reagierenden Zellen besteht. Während in der unbehandelten Kontrolle der Granulozyten nur 6,5 % der Zellen reagieren, sind dies bei Monozyten bereits 52,1 %. Wie schon zum Teil bei den Messungen von  $[Ca^{2+}]_i$ , zeigt sich auch bei den Untersuchungen des Respiratory Burst, dass die Anteile der reagierenden Zellen nicht unbedingt mit den mittleren Signalthöhen in den Zellen korrelieren. Dies zeigt sich besonders bei der Reaktion von Granulozyten und Monozyten auf Staphylococcen.

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Hier ergeben sich die höchsten intrazellulären  $H_2O_2$ -Konzentrationen (59 – 60 min), die Anteile der reagierenden Zellen liegen mit 35,3 % bei Granulozyten und 63,2 % in Monozyten unter denen der Printex- (61,0 % in Granulozyten und 96,0 % in Monozyten) und SRM-Partikel (63,2 % in Granulozyten und 87,2 % in Monozyten).

Die hohe Wirksamkeit von komplexen Teilchen wie SRM-Partikel bestätigen auch Arbeiten von Dye et al. [89] und Gercken et al. [177], die eine Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies in trachealen Rattenepithelzellen bzw. Rinderalveolarmakrophagen nach Behandlung der Zellen mit Flugaschen festgestellt haben.

Je komplexer die Teilchen gebaut sind desto größer ist also ihre Fähigkeit, die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies in den Zellen zu induzieren. Auf welche Weise Partikel Einfluss auf den Respiratory Burst nehmen können, wird in der allgemeinen Diskussion besprochen (siehe „Ergebnisse und Diskussion“ 6.2.1.).

*Die Ergebnisse zeigen, dass Partikel einen Respiratory Burst in inflammatorischen Zellen hervorrufen können und belegen eine unterschiedlich starke Wirksamkeit der Teilchen. Dabei nimmt das Stimulationspotential in der Reihenfolge  $fTiO_2 = ufTiO_2 = EC < P90 < SRM < Staphylococccen$  zu.*

### 4.3. Apoptose in inflammatorischen Zellen

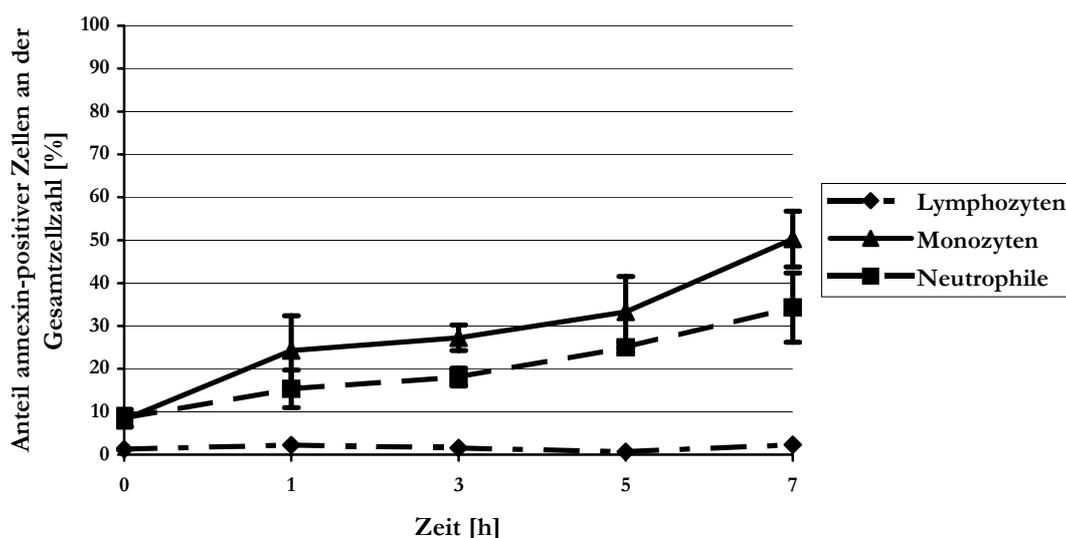
Die Apoptose ist ein essentieller Vorgang im Organismus, ohne den ein geregeltes Wachstum und die Zellhomöostase in Geweben nicht möglich wären (siehe „Theoretische Grundlagen“ II.2.2.4.). Eine wichtige Rolle spielt die Apoptose auch für den Verlauf inflammatorischer Reaktionen. Dabei ist es von großer Wichtigkeit, dass die an der Abwehrreaktion beteiligten Zellen nach Ausübung ihrer Funktion durch Apoptose eliminiert werden. Dies muss in einem exakten Zeitfenster erfolgen. Ein zu frühes Entfernen der Zellen aus den betroffenen Geweben hätte zur Folge, dass Abwehrreaktionen nicht zu Ende geführt werden könnten. Eine zu späte Elimination der inflammatorisch wirksamen Zellen könnte eine Schädigung von körpereigenem Gewebe nach sich ziehen.

## IV. Ergebnisse und Diskussion

Um die unterlegte Apoptose von inflammatorischen Zellen, die nach Isolation der Zellen autonom abläuft und die Wirkung von Partikel auf die Apoptose trennen zu können, wurden mit Hilfe des Annexin-V-Assays die Apoptoseraten in Zeitreihen gemessen.

### 4.3.1. Apoptose ohne Einwirkung von Modulatoren

Eine selbstständig, d.h. ohne Zugabe von beeinflussenden Substanzen, ablaufende Apoptose in den zu untersuchenden Zellen ist den Messwerten der Versuche über die Modulation der Apoptose durch Partikel unterlegt. Erst die Quantifizierung dieses Vorgangs lässt Aussagen über die Verwendbarkeit des Zellmodells zu. Zur Abschätzung dieser unterlegten Apoptose wurden mit Hilfe des Annexin-V-Assays die Apoptoseraten in Zeitreihen gemessen. Die Ergebnisse werden in Abbildung 59 dargestellt:



**Abb. 59:** *Unterlegte Apoptose bei Leukozyten.*

*Die Zellen wurden unmittelbar nach ihrer Isolierung aus Vollblut in RPMI ohne FCS überführt und über einen Zeitraum von 7 h gemessen (n = 4) (RPMI1640 ohne Phenolrot und ohne FCS, 37 °C, 30000 Zellen pro Messung).*

Nachdem die Leukozyten aus dem Blut isoliert und in Medium überführt sind, ist die ablaufende Apoptose bereits ohne Einwirkung von Modulatoren zu messen.

Lymphozyten zeigen zwar nach der Isolation aus Blut eine nur geringe Neigung zur Apoptose. Mit  $1,2 \pm 0,4$  % apoptotischer Zellen unmittelbar nach der Isolation liegen sie deutlich unter den Ausgangswerten von Monozyten ( $8,2 \pm 1,5$  %) und Neutrophilen ( $8,5 \pm 2,1$  %).

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Die Werte für die Lymphozyten bleiben über die Zeit relativ konstant und erreichen nach sieben Stunden nur  $2,3 \pm 0,2$  %. Im Gegensatz dazu ist bei Monozyten und Neutrophilen bereits in der ersten Stunde nach der Isolation ein starker Anstieg der Apoptoserate festzustellen (Monozyten  $24,3 \pm 8,1$ ; Neutrophile  $15,4 \pm 4,4$ ). Nach sieben Stunden liegt der Anteil apoptotischer Zellen bei Neutrophilen bei  $34,3 \pm 6,5$  %, und bei Monozyten ist mit  $50,3 \pm 8,1$  % die Hälfte aller Zellen apoptotisch.

Eine Ursache für die erhöhten Apoptoseraten in Neutrophilen und Monozyten im Vergleich zu den Lymphozyten könnte die unterschiedliche Morphologie der Zellen sein. Die beiden erst genannten Zellfraktionen sind größer und dadurch anfälliger gegenüber mechanischen Einflüssen, denen die Zellen während der Isolation ausgesetzt sind. Ein Indiz hierfür ist der höhere Prozentsatz an apoptotischen Zellen unmittelbar nach der Präparation.

Zudem können Neutrophile und Monozyten eine höhere natürliche Prädisposition für die Apoptose aufweisen, da diese Zellarten nach Ausübung ihrer inflammatorischen Funktion durch apoptotischen Zelltod aus den betroffenen Geweben entfernt werden.

Die Regulation der Apoptoseauslösung erfolgt unter anderem über Botenstoffe (siehe „Theoretische Grundlagen“ II.2.2.4.). Durch die Überführung der Zellen in Kulturmedium ist die Zusammensetzung der ursprünglichen Umgebung im Blut nicht mehr gegeben, so dass ein Fehlen von Apoptose-hemmenden Substanzen die Einleitung der Apoptose begünstigen kann.

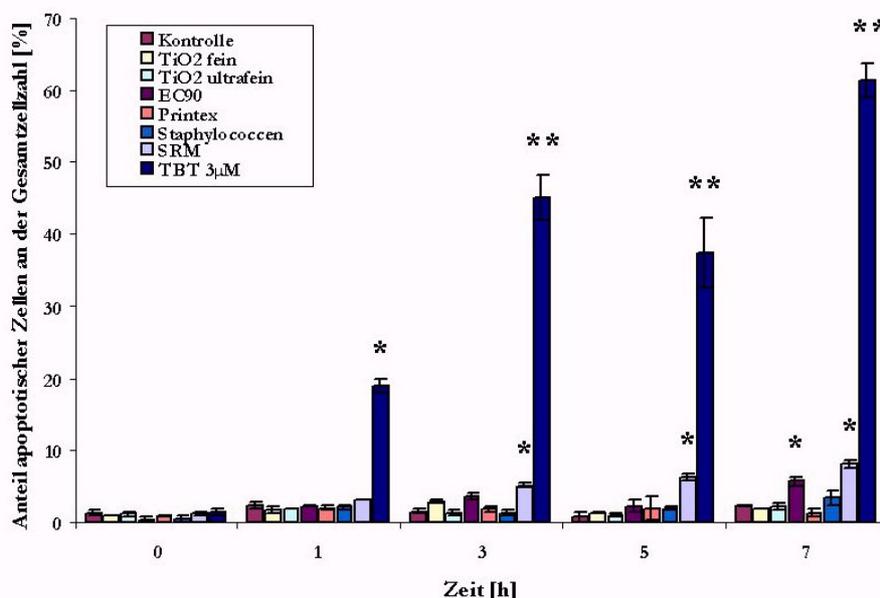
Für diese Zellsysteme bedeutet dies eine Beschränkung ihrer Nutzungsdauer auf ca. sieben Stunden nach Isolation aus dem Blut. Besonders in der ersten Stunde nach der Gewinnung der Zellen und ab der fünften Stunde zeigen Monozyten und Neutrophile eine starke Veränderung der Apoptoserate. Die Effekte der Partikel auf die Apoptoserate müssen daher immer mit der unterlegten Apoptose der unbehandelten Kontrolle korrigiert werden.

### 4.3.2. Modulation der Apoptoserate durch unterschiedliche Partikelarten

In Punkt II.2.2.4. der „Theoretischen Grundlagen“ wurden Möglichkeiten besprochen, wie sich die Veränderung der Apoptoserate durch den modulierenden Einfluss von Partikel nachhaltig auf die Abwehrreaktion von inflammatorischen Zellen auswirken könnte. Um dies näher zu untersuchen, wurden die drei Blutzellpopulationen den Teilchen ausgesetzt und der Anteil der apoptotischen Zellen mit dem Annexin-V-Assay (siehe „Methodische Grundlagen“ III.1.2.4.) zeitabhängig bestimmt.

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

Hierfür wurde die Zellsuspension jeweils mit 32 µg/ml der verschiedenen Partikelarten, bzw. in einem Verhältnis von 1:100 mit Staphylococccen exponiert, und die Apoptoserate zu verschiedenen Zeitpunkten (0h, 1h, 3h, 5h und 7h) gemessen. Die Ergebnisse geben die folgenden Abbildungen getrennt für die drei Zellarten wieder:



**Abb. 60:** Auswirkung von Partikel und TBT (3 µM) auf den Anteil von Annexin-positiven Zellen bei Lymphozyten.

Die Konzentration der Partikel betrug 32 µg/ml. Staphylococccen wurden in einem Bakterien/Zellen-Verhältnis von 100:1 gegeben. Die Versuche erfolgten in RPMI1640-Medium ohne Phenolrot und ohne FCS bei 37 °C (MW ± S.D., n = 4, \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01).

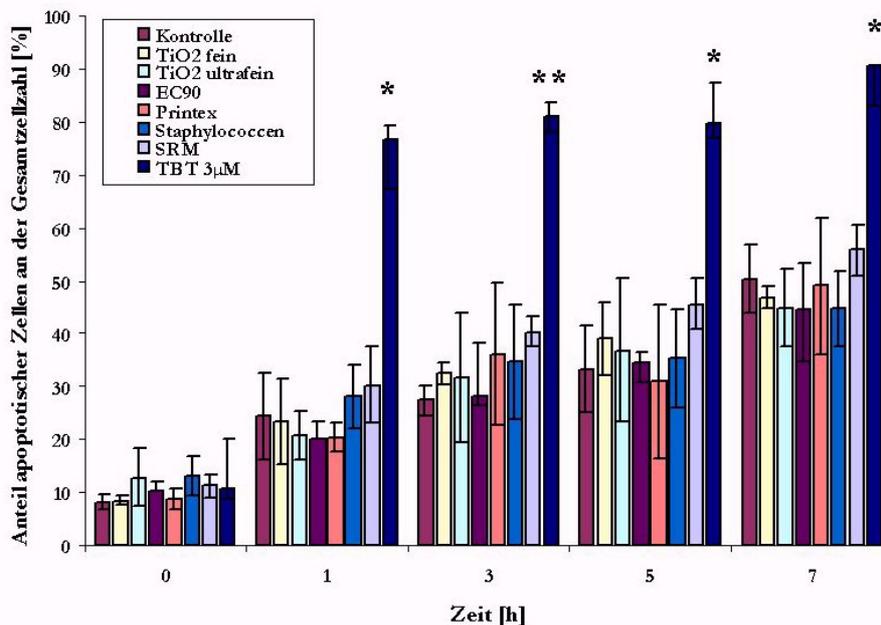
An den Ergebnissen der Abbildung 60 lässt die geringe Apoptoseneigung der Lymphozyten erkennen. Für die Kontrollen, TBT und die Partikel, die signifikante Veränderungen in den Apoptoseraten von Lymphozyten hervorgerufen haben, werden die Ergebnisse in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

	Apoptoseraten in Lymphozyten [%]				
	0 h	1 h	3 h	5 h	7 h
<b>Kontrolle</b>	1,2 ± 0,4	2,4 ± 0,4	1,5 ± 0,6	0,9 ± 0,4	2,3 ± 0,4
<b>EC-Partikel</b>	0,4 ± 0,3	2,2 ± 0,1	3,5 ± 0,4	2,3 ± 0,8	5,7 ± 0,9 (*)
<b>SRM-Partikel</b>	1,2 ± 0,3	3,0 ± 0,1	5,1 ± 0,4 (*)	6,3 ± 0,5 (*)	8,1 ± 0,6 (*)
<b>TBT</b>	1,4 ± 0,4	18,9 ± 0,9 (*)	45,1 ± 3,1 (**)	37,5 ± 4,8 (**)	61,3 ± 2,3 (**)

**Tabelle 7:** Apoptoseraten in Lymphozyten (MW ± S.D., n = 4, \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01).

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

Eine starke Expression von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche wird nur von TBT ( $3 \mu\text{M}$ ) ausgelöst. Hier kann bereits nach einer Stunde eine beträchtliche Zunahme des Anteils der apoptotischen Zellen gemessen werden, der innerhalb von 7 h stark ansteigt. Unter den verwendeten Partikel rufen EC-Teilchen nach sieben Stunden eine signifikant erhöhte Apoptoserate hervor. Die Apoptose-induzierende Wirkung von SRM-Partikel in Lymphozyten lässt sich, nach drei Stunden Exposition der Zellen mit den Partikel, signifikant nachweisen. Bei Monozyten ergaben sich Apoptoseraten, die in Abbildung 61 gezeigt sind:



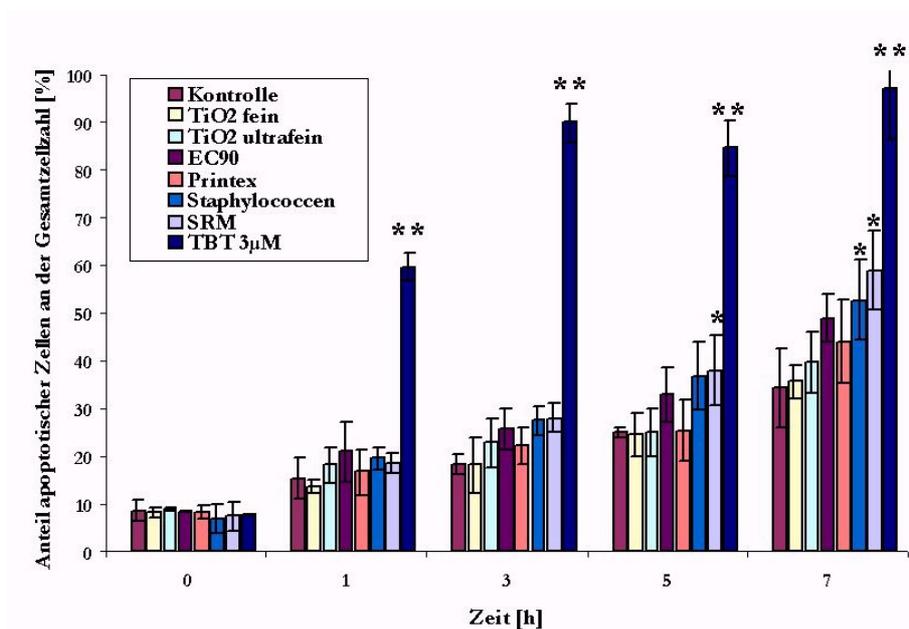
**Abb. 61:** *Auswirkung von Partikel und TBT ( $3 \mu\text{M}$ ) auf den Anteil von Annexin-positiven Zellen bei Monozyten.*

*Die Versuchsbedingungen sind in Abb. 60 beschrieben ( $MW \pm S.D.$ ,  $n = 4$ , \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,001$ ).*

In Monozyten konnte keine signifikante Steigerung der Apoptoserate durch Partikel festgestellt werden. Nachteilig wirkt sich hier die starke unterlegte Apoptoserate aus, die nach sieben Stunden einen Wert von über 50 % (siehe vorhergehenden Abschnitt) erreicht. Es wäre möglich, dass durch Teilchen ausgelöste andere Effekte durch die hohe Hintergrundapoptose überlagert werden. Zudem sind die Monozyten nur zu einem geringen Anteil im peripheren Blut (5 – 10 % der Leukozyten) vorhanden, so dass die statistischen Streuungen dieser Ereignisse im Vergleich zu den beiden anderen Zellfraktionen größer sind. Eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate konnte in Monozyten nur durch den starken Apoptose-Inducer TBT hervorgerufen werden. Hier zeigt sich, wie bei den Lymphozyten, bereits nach einer Stunde Exposition ein starker Anstieg des Anteils der Annexin-positiven Zellen, der nach sieben Stunden nahezu 100 % erreicht.

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

Für Granulozyten ergaben sich folgende Ergebnisse (siehe Abb. 62):



**Abb. 62:** Auswirkung von Partikel und TBT (3 µM) auf den Anteil von Annexin-positiven Zellen bei Granulozyten.

Die Versuchsbedingungen sind analog zu den in Abb. 60 beschriebenen (MW ± S.D., n = 4, \* = p < 0,05,

\*\* = p < 0,001).

Tabelle 8 zeigt die Apoptoseraten der Kontrollen, der SRM-Partikel und TBT:

	Apoptoseraten in Granulozyten [%]				
	0 h	1 h	3 h	5 h	7 h
<b>Kontrolle</b>	8,4 ± 2,1	15,4 ± 4,4	18,1 ± 2,1	25,0 ± 1,2	34,3 ± 8,1
<b>SRM-Partikel</b>	7,4 ± 3,0	18,6 ± 2,2	28,0 ± 3,1	38,0 ± 7,2 (*)	59,0 ± 8,3 (*)
<b>Staphylococcen</b>	7,0 ± 0,2	19,5 ± 2,8	27,5 ± 4,2	36,9 ± 6,0	52,6 ± 10,4 (*)
<b>TBT</b>	7,7 ± 1,7	59,7 ± 5,5 (**)	89,9 ± 2,1 (**)	84,5 ± 2,0 (**)	97,0 ± 2,4 (**)

**Tabelle 8:** Apoptoseraten in Granulozyten (MW ± S.D., n = 4, \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01).

In Granulozyten heben SRM-Teilchen nach fünf Stunden die Apoptoserate signifikant an. Dieser Trend setzt sich fort, so dass nach sieben Stunden ein weiterer Anstieg des Anteils der Annexin-positiven Zellen zu verzeichnen ist. Ebenfalls Apoptose-induzierend wirken Staphylococcen in Granulozyten.

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Die Ergebnisse zeigen generell, dass Umweltpartikel in der Lage sind, die Apoptose in inflammatorischen Zellen zu modulieren. Alle modulierend wirkenden Teilchen setzten den Anteil der Annexin-positiven Zellen herauf. Eine Hemmung der unterlegten Apoptose konnte nicht beobachtet werden.

Unter den Apoptose-induzierenden Teilchen erwiesen sich die SRM-Partikel als die wirksamsten. Diese Teilchen enthalten eine Vielzahl von organischen toxischen Verbindungen, die apoptotisch wirksam sein könnten (siehe „Methodische Grundlagen“ III.4.4.). Es ist auffällig, dass auch Lymphozyten als nicht phagozytierende Zellen durch die Belastung mit SRM-Teilchen eine Erhöhung ihrer Apoptoserate erfahren.

Dies unterstützt die Vermutung, dass die toxischen Substanzen an den SRM-Partikel für die gesteigerte Apoptoseinduktion verantwortlich sind. Diese könnten, nach unspezifischer Anlagerung an die Zellen, in gelöster Form über die Plasmamembran in das Zellinnere diffundieren und dort Apoptose induzieren.

Staphylococccen heben nach sieben Stunden den Anteil Annexin-positiver Zellen in Granulozyten signifikant an. Eine Reihe von Arbeiten postulieren einen Zusammenhang zwischen reaktiven Sauerstoffspezies und der Induktion von Apoptose [81, 178, 179]. In Punkt IV.4.2.2. wurde die Auslösung des Respiratory Burst durch Staphylococccen dokumentiert. Die dadurch freigesetzten Sauerstoffradikale können die Lebensdauer der inflammatorischen Zellen determinieren und verhindern, dass sie ihre Abwehrfunktion zu lange ausüben.

Unklar ist die Induktion der Apoptose durch EC-Teilchen in Lymphozyten. EC-Teilchen tragen keine toxischen Substanzen, und Lymphozyten sind nicht in der Lage Teilchen zu phagozytieren. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt wären Radikal-generierende Systeme auf der Oberfläche von Partikel (siehe auch IV.6.2.). Radikale können in ähnlicher Weise die Auslösung der Apoptose haben wie die oben angesprochenen reaktiven Sauerstoffspezies. Allerdings konnte in Mono- und Granulozyten keine signifikante Steigerung der Apoptoserate durch EC-Teilchen nachgewiesen werden. Durch die hohe unterlegte Apoptose in diesen Zellen könnte dieser schwache Effekt überlagert werden.

TBT (3 $\mu$ M) löst in einem hohen Anteil von Zellen aller drei Zellpopulationen Apoptose aus. So zeigte sich, dass bereits nach der ersten Stunde in der Granulozytenfraktion Zellen Phosphatidylserin auf ihrer Oberfläche exponierten. Bei Monozyten lag dieser Prozentsatz mit  $76,6 \pm 9,3$  % (Kontrolle 1h:  $24,3 \pm 8,1$  %) nach einer Stunde sogar noch höher.

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Die Lymphozyten erwiesen sich als die insensitivsten Zellen gegenüber TBT. Nach sieben Stunden sind von den Monozyten und von den Granulozyten mit nahezu alle Zellen Annexin-positiv. In der Lymphozytenfraktion ist der Prozentsatz der Annexin-positiven Zellen ( $61,4 \pm 2,3$  %) im Vergleich zu den anderen beiden Zellpopulationen deutlich geringer, jedoch weisen die Lymphozyten im Vergleich zur Kontrolle nach sieben Stunden die größte effektive Erhöhung (von  $2,3 \pm 0,2$  % auf  $61,4 \pm 2,3$  %) auf.

Die effektive Induktion der Apoptose durch TBT in allen drei Zellpopulationen macht das hohe xenotoxische Gefahrenpotential deutlich, das von dieser Organo-Zinn-Verbindung ausgeht. Die Apoptose-induzierende Wirkung von TBT wird in mehreren Arbeiten bestätigt [165, 166, 180] und die zu Grunde liegenden Mechanismen eingehend erläutert [181].

Printex-Partikel und  $\text{TiO}_2$ -Teilchen induzierten keine Veränderung des Anteils der Annexin-positiven Zellen zur Gesamtzellzahl. Dass feine  $\text{TiO}_2$ -Teilchen keinen Einfluss auf die Apoptoserate nehmen können, deckt sich mit Beobachtungen von Iyer et al, die zwar eine Steigerung der Apoptoserate durch kristalline Silikatpartikel (Durchmesser:  $5 \mu\text{m}$ , Konzentration:  $133 \mu\text{g/ml}$ ), nicht aber durch feine  $\text{TiO}_2$ -Teilchen (Durchmesser:  $0,45 \mu\text{m}$ , Konzentration:  $60 \mu\text{g/ml}$ ) oder amorphe Silikatpartikel (Durchmesser:  $1 - 5 \mu\text{m}$ , Konzentration:  $80 \mu\text{g/ml}$ ) nachgewiesen haben. Der Apoptose-induzierende Effekt der kristallinen Silikatpartikel ließ sich nach sechs Stunden erkennen.

Die Apoptose-induzierende Wirkung der in dieser Arbeit untersuchten Teilchen setzt frühestens nach drei Stunden (SRM-Partikel) ein: EC-Teilchen und Staphylococccen verursachen erst nach sieben Stunden eine signifikante Veränderung der Apoptoserate. Dabei erweisen sich die unterlegte Apoptose in Mono- und Granulozyten und die damit verbundene relativ kurze Nutzungsdauer des Zellmodells von maximal sieben Stunden als nachteilig, da bei längerer Exposition deutlichere Effekte zu erwarten wären. Der hohe Untergrund an apoptotischen Zellen kann außerdem geringe Apoptose-induzierende Effekte, die eventuell von den Partikel erzeugt werden, überlagern.

Zusammenfassend lässt sich feststellen: Umweltpartikel können Einfluss auf die Apoptoserate von inflammatorischen Blutzellen nehmen. Dies geschieht in Abhängigkeit von der Teilchenart und des Zelltyps. Toxische Partikel erwiesen sich als effektiver als Teilchen, die keine chemischen Verbindungen tragen.

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Eine erhöhte Apoptose-Induktion durch ultrafeine Teilchen verglichen mit feinen Partikeln konnten nicht festgestellt werden.

*Bei den Analysen zur Apoptose in Leukozyten stellte sich heraus, dass besonders in Granulozyten und Monozyten nach ihrer Isolation bereits erhöhte Apoptoseraten auftraten, ohne dass die Zellen durch Apoptose-Inducer oder Partikel stimuliert worden waren. Hieraus ergab sich eine Nutzungsdauer der humanen Leukozyten von maximal sieben Stunden nach ihrer Gewinnung aus dem Blut. Des Weiteren belegen die Experimente eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate durch SRM-Partikel in Granulozyten nach fünf Stunden bzw. in Lymphozyten nach sieben Stunden. In Lymphozyten konnten außerdem mit EC-Teilchen und in Granulozyten mit Staphylococccen, jeweils nach sieben Stunden, eindeutige Anstiege der Apoptose nachgewiesen werden.*

### 4.4. Freisetzung von Prostaglandin E<sub>2</sub> in Granulozyten

Teilchen können einen potentiellen Stimulus für inflammatorische Zellen darstellen, wie durch die Ergebnisse der vorausgegangenen Darlegungen bestätigt ist. Bestimmte unspezifische Abwehrreaktionen, wie z.B. der Respiratory Burst, sind darauf ausgelegt, eingedrungene biotische Partikel zu eliminieren. Bei Partikel, die durch die beim Respiratory Burst freigesetzten reaktiven Sauerstoffspezies und Enzyme nicht oder nur unzureichend abgebaut werden können, stoßen diese Systeme an ihre Grenzen, und es kann darüber hinaus zu Schädigungen des umliegenden Gewebes kommen. Es sind also Regelmechanismen nötig, die die inflammatorische Antwort der Zellen steuern. PGE<sub>2</sub> ist ein solcher Regulator. Wie bereits unter Punkt II.2.2.6. der „Theoretischen Grundlagen“ eingehender beschrieben, hemmt PGE<sub>2</sub> den Respiratory Burst [114] die Mitogenese und Migration von Abwehrzellen, sowie die zellvermittelte Zytotoxizität [115]. Außerdem kontrolliert PGE<sub>2</sub> die Produktion von IL-1 und TNF als proinflammatorische Mediatoren [116]. Um zu untersuchen, ob die Produktion von PGE<sub>2</sub> in inflammatorischen Zellen durch die in dieser Arbeit verwendeten Partikel beeinflusst wird, wurden die Zellen über eine Stunde mit den Teilchen inkubiert und anschließend mit dem, unter Punkt III.2.2. der „Methodischen Grundlagen“ beschriebenen, Enzym-Immunoassays analysiert. Die Untersuchungen wurden an neutrophilen Granulozyten durchgeführt. Der PGE<sub>2</sub>-Gehalt in den Zellen wurde mit Hilfe einer Eichkurve ermittelt, die aus den relativen Fluoreszenz-Intensitäten bekannter Konzentrationen erstellt wurde (siehe „Experimenteller Teil“ VII.5.3.):

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

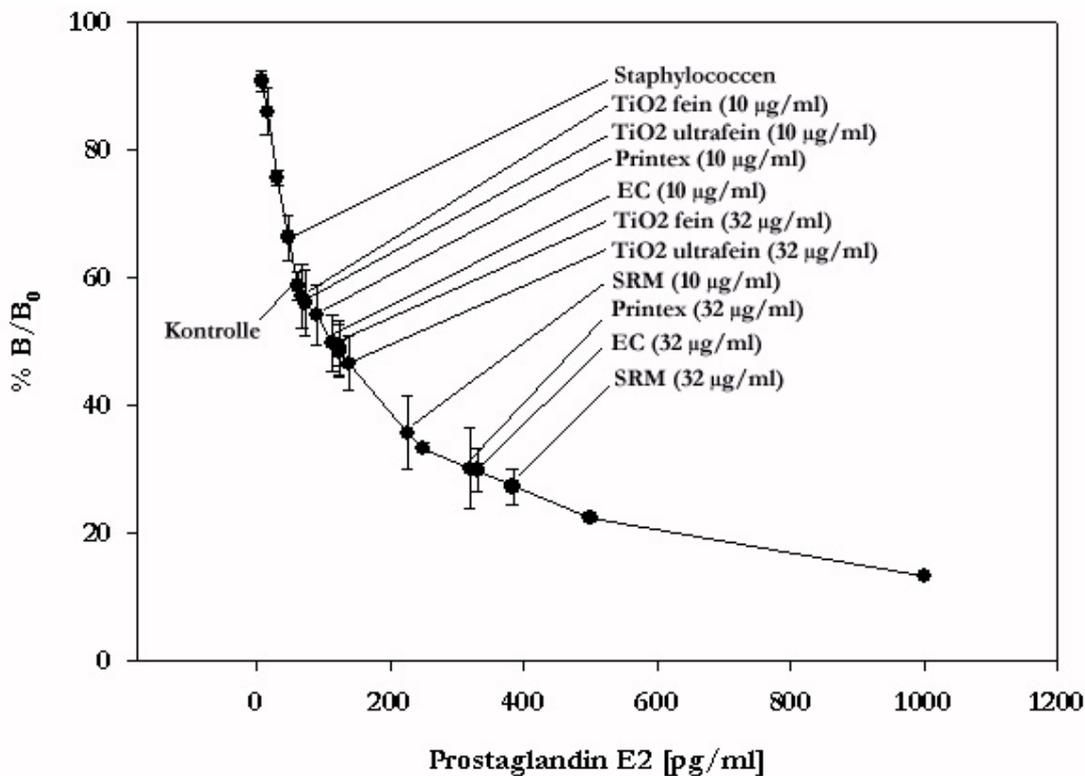


Abb. 63: Eichkurve zur Bestimmung der PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen [pg/ml] in den mit Teilchen vorinkubierten Proben. (Inkubationszeit: 1h, %B/B<sub>0</sub>: gebundenes Protein in Probe/maximale Bindung x 100, n = 4.)

Aus der Eichkurve ergaben sich folgende Ergebnisse:

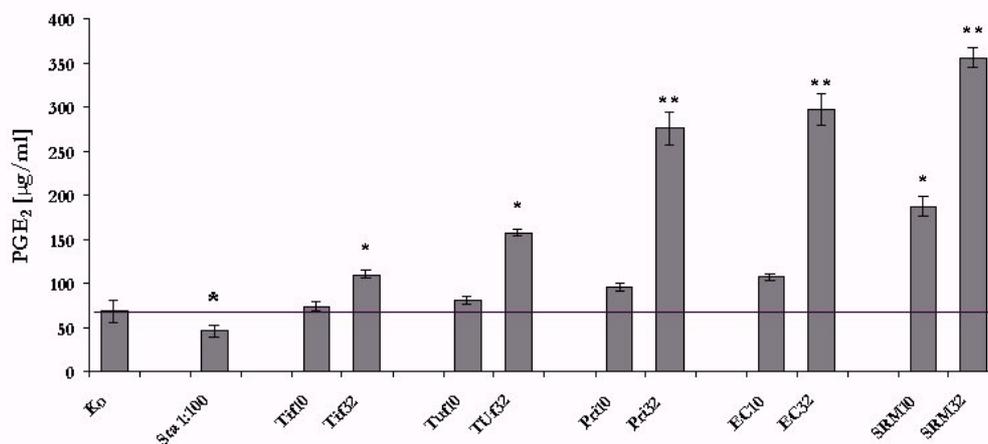


Abb. 64: PGE<sub>2</sub>-Gehalt in neutrophilen Granulozyten nach Inkubation mit Partikel. (Inkubationszeit: 1h, Konzentrationen: 10 µg/ml und 32 µg/ml (Ko: Kontrolle, Sta: Bakterien-Zellverhältnis: 100:1, Tif: TiO<sub>2</sub> fein, Tuf: TiO<sub>2</sub> ultrafein, Pri: Printex, EC: EC, SRM: SRM, MW ± S.D., n = 4, \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01)).

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Aus Abbildung 64 ist zu erkennen, dass Partikel konzentrationsabhängig die Produktion von PGE<sub>2</sub> in neutrophilen Granulozyten modulieren. Alle abiotischen Partikel rufen eine Erhöhung des intrazellulären PGE<sub>2</sub>-Gehalts hervor, während Staphylococccen die PGE<sub>2</sub>-Konzentration in den Zellen herabsetzen.

Sowohl feine, als auch ultrafeinen TiO<sub>2</sub>-Partikel induzieren eine Steigerung des PGE<sub>2</sub>-Gehalts in den Zellen. Dabei rufen die ultrafeinen TiO<sub>2</sub>-Partikel (32 µg/ml), mit einem Steigerungsfaktor von 2,3 relativ zur Kontrolle, eine höhere Produktion von PGE<sub>2</sub> in neutrophilen Granulozyten hervor als feine TiO<sub>2</sub>-Partikel (32 µg/ml), die die intrazelluläre PGE<sub>2</sub>-Konzentration nur um einen Faktor 1,6 anheben. Die Fähigkeit, die Produktion von PGE<sub>2</sub> in neutrophilen Granulozyten zu induzieren, korreliert also bei den verwendeten TiO<sub>2</sub>-Teilchen mit ihrer relativen Oberfläche. Die erhöhte Wirksamkeit von ultrafeinen TiO<sub>2</sub>-Partikel werden durch Untersuchungen von Beck-Speier et al. [121] bestätigt, die nach einstündiger Exposition der Zellen mit den ultrafeinen Partikel (Durchmesser: 21 nm, Konzentration: 10 µg/ml) eine zweifache Erhöhung der PGE<sub>2</sub>-Produktion feststellen konnten, wohingegen feine TiO<sub>2</sub>-Teilchen erst ab einer Konzentration von 100 µg/ml eine Heraufsetzung der intrazellulären PGE<sub>2</sub>-Konzentration verursachten.

Im Vergleich zwischen EC- und Printex-Partikel zeigen sich die EC-Teilchen (Faktor 4,3 relativ zur unbehandelten Kontrolle bei einer Konzentration von 32 µg/ml) geringfügig induktiver als die Printex-Partikel (Faktor 4,0 relativ zur unbehandelten Kontrolle bei der gleichen Konzentration).

Auch hier rufen die Partikel mit der größeren relativen Oberfläche die höhere PGE<sub>2</sub>-Produktion in Granulozyten hervor.

Mit einer 5,2-fachen Erhöhung des PGE<sub>2</sub>-Gehalts in den Zellen regen die SRM-Partikel (32 µg/ml) die PGE<sub>2</sub>-Produktion am stärksten an. Für SRM-Teilchen liegen keine vergleichbaren Untersuchungen vor. Jedoch konnten Henderson et al. [183] in Lungenlavagen von Mäusen und Ratten einen relativ zu Kontrolltieren bis zu zweifach erhöhten PGE<sub>2</sub>-Gehalt feststellen, nachdem die Tiere einer Atmosphäre von Dieselabgasen (3,5 mg Ruß/m<sup>3</sup>) ausgesetzt worden waren.

Staphylococccen (100 Bakterien / Zelle) verursachen eine Herabsetzung des PGE<sub>2</sub>-Gehalts in neutrophilen Granulozyten um einen Faktor von 0,66 im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle. Staphylococccen stellen einen natürlichen Stimulus für die neutrophilen Granulozyten dar.

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Eine Herunterregulierung der PGE<sub>2</sub>-Produktion ist daher nicht sinnvoll, da sie die inflammatorischen Zellen in ihrer Funktion hemmen würde.

Diese Ergebnisse werden durch Beobachtungen von Mackenzie et al. [184] gestützt, die eine Herabsetzung der Cyclooxygenase-Aktivität in peritonealen Makrophagen nach einer Exposition mit zellfreien Überstand aus Staphylococcus aureus festgestellt haben.

Wie die Partikel die Produktion von PGE<sub>2</sub> in den Zellen induzieren, ist noch nicht näher erforscht. Beck-Speier et al. [121] postulieren einen Zusammenhang zwischen einer oxidativen Potenz der Partikel und einer Freisetzung von Arachidonsäure in Alveolarmakrophagen. Dieser These nach initiieren die Radikale an der Oberfläche der Teilchen die Aktivierung von Phospholipase A<sub>2</sub>, die dann Phospholipide mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren hydrolysiert, um so einer Fettoxidation entgegenzuwirken. Während dieser Hydrolyse entsteht auch Arachidonsäure, die über den Cyclooxygenaseweg zu PGE<sub>2</sub> umgebaut wird.

Insgesamt zeigen die Untersuchungen, dass die Induktion der PGE<sub>2</sub>-Produktion von der Art und der Konzentration der Teilchen abhängig ist. Tendenziell kann man sagen, dass je komplexer die Teilchen gebaut sind, desto höher ihre Fähigkeit ist, die Produktion von PGE<sub>2</sub> in den Zellen zu induzieren. Eine Ausnahme bilden hier lediglich die EC-Partikel, die einen geringfügig stärkeren Effekt zeigen als die Printex-Partikel. Anhand des Vergleiches zwischen feinen und ultrafeinen TiO<sub>2</sub>-Teilchen und EC- und Printex-Partikel kann man eine Korrelation zwischen der relativen Oberfläche der Teilchen und ihrer Fähigkeit, die Produktion von PGE<sub>2</sub> in Granulozyten zu beeinflussen, postulieren. Wie sich diese Ergebnisse in einen Kontext mit den anderen, in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen bringen lassen, soll unter Punkt 6.1. der allgemeinen Diskussion erläutert werden.

*Aus den Untersuchung der PGE<sub>2</sub>-Produktion in Granulozyten geht hervor, dass alle untersuchten Partikel einen Anstieg von PGE<sub>2</sub> in den Zellen induzierten. Ultrafeine TiO<sub>2</sub>-Partikel riefen dabei stärkere Effekte hervor wie feine TiO<sub>2</sub>-Teilchen. Ebenso hoben EC-Partikel die intrazelluläre PGE<sub>2</sub>-Produktion stärker an, als die größeren Printex-Partikel. Damit stellen die Untersuchungen zur intrazellulären PGE<sub>2</sub>-Konzentration in dieser Arbeit die einzige Bestätigung für eine größere Wirksamkeit von ultrafeinen gegenüber feinen Partikel dar. Den größten Effekt lösten die SRM-Teilchen aus.*

### 5. Wirkungen von SRM-Partikel: Adsorption von Farbstoffen und Synergismus mit Stimulantien

Partikel können auf vielfältige Weise auf Zellen und deren Umgebung einwirken. Unter „Ergebnisse und Diskussion“ IV.4. wurden die Induktion von zellphysiologischen Reaktionen, wie die Modulation von  $[Ca^{2+}]_i$  und der Produktion von  $PGE_2$ , sowie die Induktion der Apoptose und des Respiratory Burst durch unterschiedliche Teilchenarten nach unmittelbarem Kontakt mit Zellen bzw. deren Rezeptoren in Screeningexperimenten untersucht. Durch diese Untersuchungen ist es möglich, die Wirksamkeiten der verschiedenen verwendeten Partikel auf inflammatorische Zellen zu vergleichen. Um mehr Einsicht in die Mechanismen der Teilchenwirkung zu gewinnen, wurden zusätzlich Experimente mit SRM-Partikel durchgeführt, die in den Screeningexperimenten meist signifikante Effekte ausgelöst haben. In den folgenden Unterpunkten werden die Ergebnisse beschrieben, die bei der Analyse weiterer Aspekte der Teilchenwirkung gefunden wurden.

Der Punkt „Ergebnisse und Diskussion“ IV.5.1. befasst sich mit der Adsorption von JC-1 an SRM-Partikel. Die Adsorption stellt einen rein physikalischen Effekt dar, der aber durch Bindung von Substanzen aus der Umgebung der Zellen mittelbar physiologische Wirkung haben kann. Außerdem ist es für die Durchführung von Experimenten von Interesse, abschätzen zu können, in welchem Umfang, Farbstoffe und Stimulantien an Partikel adsorbiert werden.

Die in „Ergebnisse und Diskussion“ IV.5.2. ausgewerteten Untersuchungen stellen die konsequente Weiterführung der in IV.5.1. besprochenen Analysen dar. Während in IV.5.1. die direkte Wirkung von SRM auf JC-1 in zellfreiem Medium und auf die Färbung von Leukozyten mit JC-1 dargestellt wird, befasst sich V.I:5.2 mit den Effekten, die SRM-Partikel auf bereits mit JC-1 gefärbte Zellen haben. Dabei wird auch die direkte Wirkung von SRM-Partikel auf das Mitochondrien-Membranpotential und somit die Auslösung der Apoptose über den Typ II -Weg (siehe „Theoretische Grundlagen“ II.2.2.4.) analysiert.

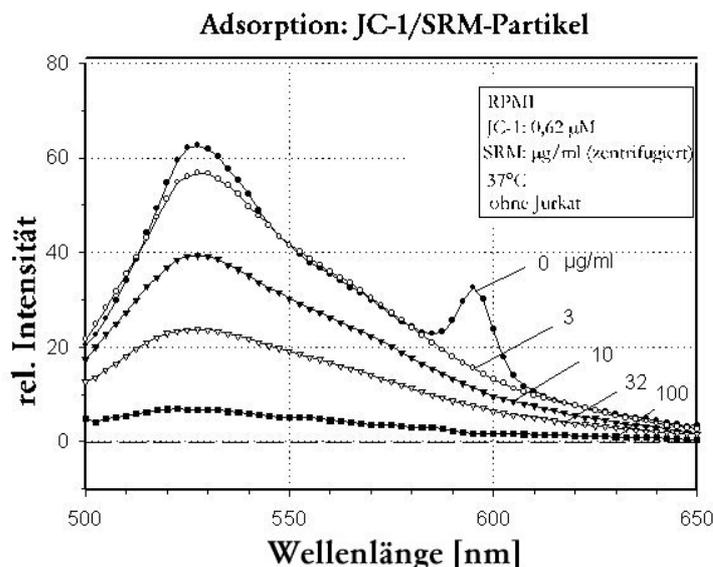
Unter „Ergebnisse und Diskussion“ IV.5.3. werden die Ergebnisse aus den Untersuchungen zur synergistischen Wirkung von SRM-Partikeln und TBT, bzw. fMLP auf  $[Ca^{2+}]_i$  dargestellt.

### 5.1. Adsorption von JC-1 an SRM-Partikel

Stellvertretend für die verwendeten Farbstoffe wurde die Adsorption von JC-1 an SRM-Teilchen untersucht. JC-1 ist hierfür gut geeignet, da der Farbstoff konzentrationsabhängig J-Aggregate ausbildet, als Kation zu Coulomb-Wechselwirkungen fähig ist und sowohl in den Zellen als auch extrazellulär während der Experimente vorliegt (siehe „Methodische Grundlagen“ III.1.2.5.).

#### 5.1.1. Untersuchungen der Adsorption von JC-1 an SRM-Partikel im Fluoreszenzspektrometer

Um die Adsorption zu analysieren, wurde JC-1 in Medium, nach dem im „Experimentellen Teil“ VII.4.5. ausgeführten Protokoll, gelöst und anschließend für 30 min mit verschiedenen Teilchenkonzentrationen inkubiert. Darauf wurden die Suspensionen abzentrifugiert und die Überstände direkt, bzw. nach Inkubation mit Zellen, im Fluoreszenzspektrometer gemessen.



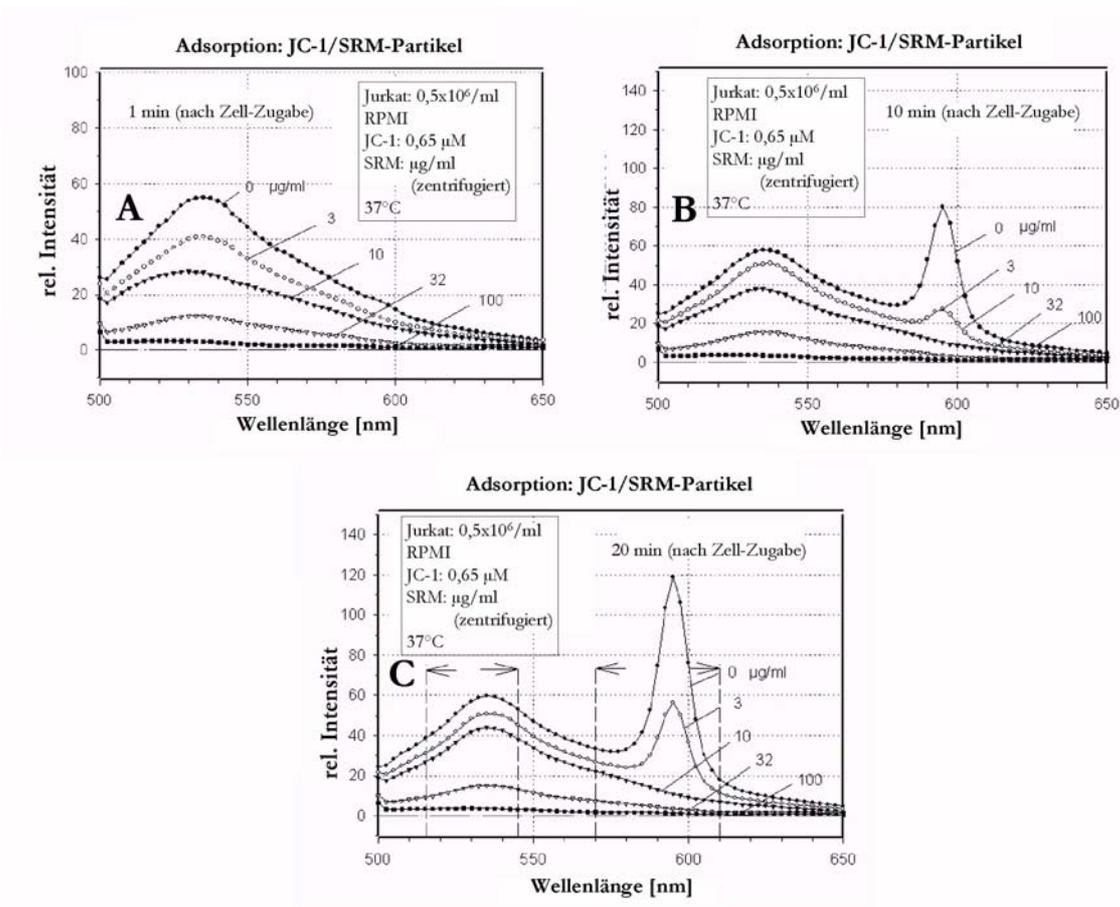
**Abb.65: Emissionsspektren von JC-1 nach Adsorption an SRM-Partikel in zellfreiem Medium.**  
(Medium: RPMI 1640 ohne FCS, JC-1-Konzentration: 0,62 µM, Temperatur: 37 °C,  $f_{EX} = 488$  nm, Slit-Breite: 5 nm.)

Abbildung 65 zeigt die Adsorption von JC-1 an SRM-Teilchen in zellfreiem Medium. Ohne Zugabe von Partikel ist deutlich die Ausbildung eines Intensitätsmaximums bei 590 nm zu erkennen (J-Aggregat-Formation). Bereits nach Inkubation mit einer Konzentration von 3 µg/ml Partikel und anschließender Zentrifugation wird genügend Farbstoff an den Teilchen adsorbiert, um die kritische Konzentration, die zur Ausbildung von J-Aggregaten nötig ist (CJC, siehe auch „Methodische Grundlagen“ III.1.2.5.) zu unterschreiten, so dass das Emissionsmaximum bei 590 nm ausbleibt. Ab einer Teilchenkonzentration von 10 µg/ml ist auch eine starke Abnahme der Emission der Monomerensignale (Maximum bei 527 nm) zu registrieren.

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

Bei 100 µg/ml betragen diese nur noch 6 % der Werte der unbehandelten Kontrolle.

Die folgende Abbildung 66 zeigt die Verhältnisse nach Zugabe von Jurkat-Zellen zu den Überständen nach Abzentrifugation der SRM-Partikel:



**Abb. 66:** Emissionsspektren von JC-1 nach Adsorption an SRM-Partikel und anschließender Zugabe von Jurkat-Zellen.

- A) Emissionsspektren 1 min nach Zellzugabe.
  - B) Emissionsspektren 10 min nach Zellzugabe.
  - C) Emissionsspektren 20 min nach Zellzugabe. Die Wellenlängenbereiche innerhalb der strichierten Linien (in C) entsprechen den Messfenstern, die durch die Filtersätze im Durchflusszytometer bestimmt werden und zur Quantifizierung des Adsorptionseffekts (siehe Abbildung 67) verwendet worden sind.
- (Versuchsbedingungen analog Abbildung 65.)

Abbildung 66 (A) zeigt, dass im Gegensatz zu den Versuchen in zellfreiem Medium, eine Minute nach Zellzugabe kein Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von 590 nm erscheint. Dies ist durch einen Verteilungseffekt nach Beifügung der Zellen zu erklären. Denn die Zellen nehmen Farbstoffmoleküle in das Zellinnere auf und erniedrigen so die Farbstoffkonzentration im Medium.

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Für die Ausbildung von J-Aggregaten an der Mitochondrienmembran stehen aber zu diesem Zeitpunkt noch nicht genügend Monomere zur Verfügung. Ansonsten zeigt sich auch hier, wie im zellfreien Medium, eine Partikelkonzentrations-abhängige Erniedrigung des Farbstoffgehalts in der Zellsuspension.

Abbildung 66 (B) gibt die JC-1-Emissionsspektren nach zehn Minuten wieder. In der partikelfreien Suspension bildet sich nun deutlich das Emissionsmaximum der Polymere bei einer Wellenlänge von 590 nm aus.

Dieses ist deutlich höher, als der Peak, der sich in zellfreiem Medium zeigt (Abbildung 65). Dadurch wird der Signal-verstärkende Effekt der Mitochondrien deutlich, wie er unter Punkt IV.1.2.2. des Kapitels „Ergebnisse und Diskussion“ beschrieben wurde. Dies belegt auch das Experiment, in dem eine Teilchenkonzentration von 3 µg/ml verwendet wurde. Während im zellfreien Medium keine J-Aggregat-Formierung zu beobachten ist, ist eine Ausbildung des Emissionsmaximums bei 590 nm im Medium mit Zellen eindeutig zu sehen. Diese Trends setzten sich auch nach 20 min Einwirkzeit fort, wie Abbildung 66 (C) zeigt. Während die Intensitäten bei 590nm in den mit 0 µg/ml und 3 µg/ml exponierten Medien weiter ansteigen, bleiben die Maxima bei den Konzentrationen über 10 µg/ml aus.

Alle Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung 67 zusammengefasst. Es ist die relative Intensitätsabnahme für die Messfenster um 530 nm bzw. 590 nm, wie sie in Abbildung 66 C skizziert sind, gegen die SRM-Partikelkonzentration aufgetragen. Diese Ordinatenwerte, die der Adsorption entsprechen, sind für jedes Messfenster und die jeweiligen Emissionskurven von den drei gezeigten Abbildungen gemäß der folgenden Beziehung berechnet:

$$\frac{I_{K_0} - I_{ii}}{I_{K_0}}$$

dabei gilt:  $I_{K_0}$  = integrierte Emissionswerte innerhalb der Messfenster für die partikelfreien Kontrollen  
 $I_{ii}$  = integrierte Emissionswerte innerhalb der Messfenster für die entsprechenden Konzentrationen und Zeiten

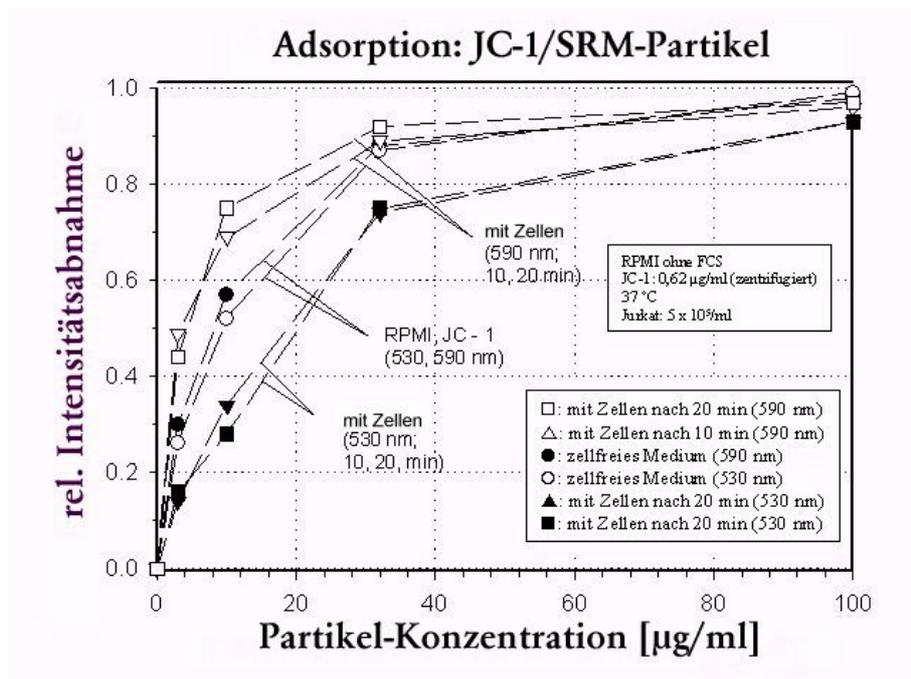


Abb. 67 Intensitätsabnahme der 530 nm- und 590 nm-Emissionsmaxima. Mit zunehmender Partikelkonzentration reduzieren sich die JC-1-Signale.

Die Signalintensitäten reduzieren sich bei einer Partikelkonzentration von 32 µg/ml auf 25 %, bezogen auf das Monomerensignal um 530 nm, bzw. auf ca. 10 %, bezogen auf das Polymerensignal um 590 nm.

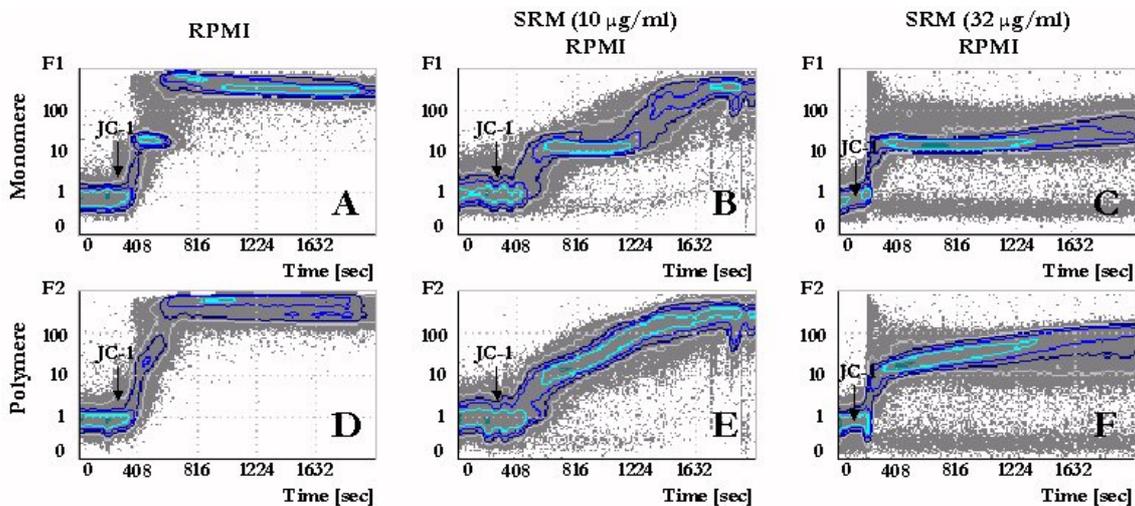
Die Ergebnisse der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen zeigen eindrucksvoll die adsorptive Kapazität der SRM-Teilchen. Ab einer Konzentration von 10 µg/ml wird bereits soviel Farbstoff an die Partikel gebunden, dass die Restkonzentration des Farbstoffes im Medium nicht mehr ausreicht, um die kritische Konzentration zu überschreiten, die für die Formierung von J-Aggregaten (CJC) in den Zellen notwendig ist.

### 5.1.2. Untersuchungen der Beladungskinetiken von JC-1 in Leukozyten im Durchflusssystem

Die adsorptive Wirkung von Partikel wird auch in Experimenten bestätigt, in denen die Beladungskinetiken von Leukozyten mit JC-1 untersucht wurden, nachdem diese 30 min mit SRM-Teilchen vorinkubiert worden waren. Ohne das Wissen um diese Adsorptionseffekte würden die gemessenen Ergebnisse fälschlich als Einfluss der SRM-Teilchen auf die Mitochondrienpotentiale überinterpretiert.

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

Die JC-1-Beladungskinetik wird stellvertretend für die drei Zellpopulationen für Granulozyten als Dot-plot-Darstellungen wiedergegeben (Abb. 68):



**Abb. 68:** *Beladungskinetiken von JC-1 in Granulozyten unter Einfluss verschiedener Konzentrationen von SRM-Teilchen*

- Obere Reihe: Monomeren-Signale (F1) bei unbehandelter Kontrolle (A), bei Vorinkubation (1 h) mit 10 µg/ml SRM-Partikel (B) und (C) mit 32 µg/ml SRM-Partikel (30 min) gegen die Zeit.
- Untere Reihe: Polymeren-Signale (F2) bei unbehandelter Kontrolle (D), bei Vorinkubation (1 h) mit 10 µg/ml SRM-Partikel (E) und (F) mit 32 µg/ml SRM-Partikel (30 min) gegen die Zeit.

Die Zugabe von JC-1 erfolgte bei der Kontrolle und bei der SRM-Konzentration von 10 µg/ml nach einem Vorlauf von 6 min, bzw. bei der Vorinkubation von 32 µg/ml nach 3 min. (RPMI1640 ohne Phenolrot und ohne FCS, JC-1-Konzentration: 0,62 µM, 10<sup>6</sup> Zellen/ml, Temperatur 37 °C.)

Aus der Abbildungen 68 wird der starke Effekt, den die Teilchen im Vergleich zur Kontrolle auf die Beladung der Zellen mit Farbstoff-Molekülen haben, deutlich. Dabei treten (je nach Partikelkonzentration) unterschiedliche zeitliche Verzögerungen und reduzierte Sättigungswerte am Ende der Beobachtungszeit (34 min) auf. Diese Effekte betreffen sowohl die intrazellulären mitochondrialen Monomeren- als auch die Polymerensignale.

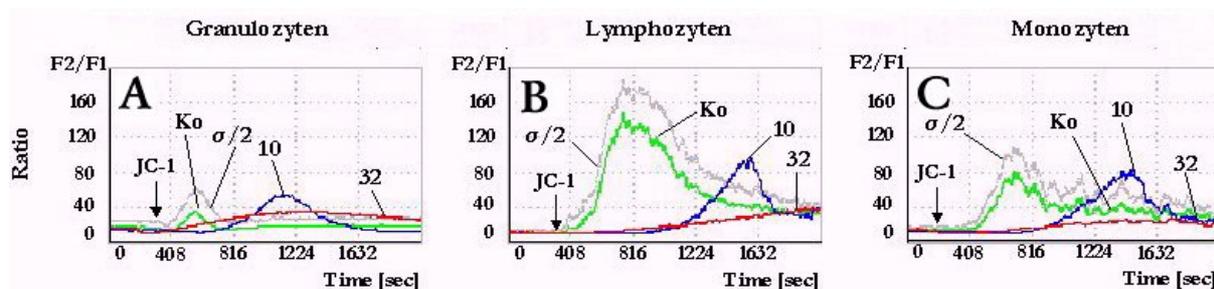
Insbesondere wird nach einer Vorinkubation mit SRM-Teilchen einer Konzentration von 10 µg/ml die zeitabhängige Signalintensität in den Zellen merklich verringert und erreicht später die Sättigung, als in der unbehandelten Kontrolle. Dieser maximale Sättigungswert wird nach Vorinkubation mit 32 µg/ml SRM-Partikel bei keiner der drei Zellpopulationen mehr erreicht.

Diese gemessenen Effekte können durch Änderungen der Mitochondrien-Membranpotentiale bedingt sein, als Folge der durch die SRM-Teilchen induzierten Apoptose (siehe Abbildung 60 – 62), und zudem stark durch die Reduzierung des zur Verfügung stehenden Farbstoffs, aufgrund der JC-1-Adsorption an den Partikel, beeinflusst sein (siehe Abbildung 67).

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

Diese Dot-Plot-Darstellungen geben als gemessene Rohdaten nur einen qualitativen Eindruck wieder.

Zur besseren Quantifizierung der beobachteten Effekte werden die zeitabhängigen Mittelwerte (pro Zeitkanal  $\Delta t = 2$  sec) in Abbildung 69 als Ratiowerte von Polymeren- und Monomeren-Signalen (F2/F1-Ratio) mit einer linearen Ordinate dargestellt:



**Abb. 69:** *Beladungskinetiken (gemittelte Werte pro Zeitintervall  $\Delta t = 2$  sec) von JC-1 in Leukozyten:*

*Verläufe der F2/F1-Ratio in Granulozyten (A), Lymphozyten (B) und Monozyten (C) (Versuchsbedingungen analog Abb. 68).*

Die Beladung der Zellen mit Farbstoffmolekülen und ihre Aggregatbildung spiegeln die Verhältnisse des Membranpotentials wider, wie sie unter Punkt III.1.2.5. der „Methodischen Grundlagen“ beschrieben wurde. Allgemein bedingen Konzentrationsgradienten (zwischen Zellinnerem und Zelläußerem) und Ladungsverteilungen (auf den Farbstoffmolekülen und Mitochondrienmembranen) die treibenden Kräfte. Im Besonderen müssen die aktuellen biologischen Verhältnisse noch berücksichtigt werden: labile apoptotische Membranen bei Granulozyten und Monozyten (siehe Abbildung 59) und geringe Mitochondrienkonzentration in Granulozyten [58].

Allgemein gilt, dass bei Experimenten mit JC-1 und Partikel Adsorptionseffekte zu berücksichtigen sind (siehe Punkt IV.5.1.1.). So stehen nach Zugabe von 10  $\mu\text{g/ml}$  SRM-Partikel noch 70 % und bei einer Konzentration von 32  $\mu\text{g/ml}$  SRM-Partikel nur noch 25 % der ursprünglich vorhandenen Monomere für die Diffusion in die Zellen zur Verfügung, wie in spektroskopischen Experimenten ermittelt werden konnte.

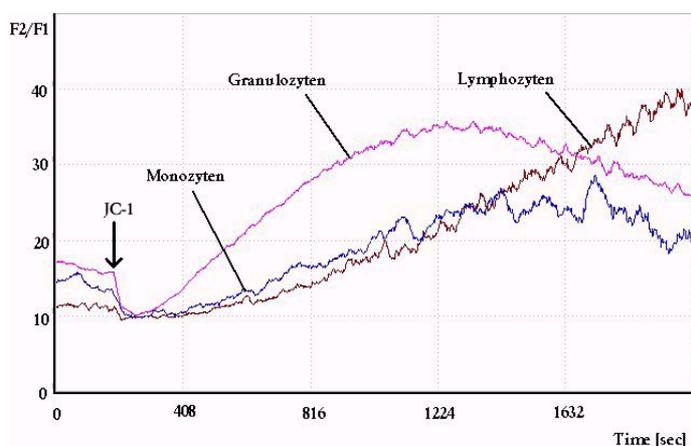
Allerdings unterscheiden sich die durchflusszytometrischen Experimente von denen, die im Fluoreszenzspektroskop durchgeführt wurden. Dort wurden die Partikel mit den adsorbierten JC-1-Molekülen vor den Messungen und vor Zugabe der Zellen abzentrifugiert, während im Durchflusszytometer die Teilchen im Medium verblieben.

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

So kann es in der Suspension wegen der Zusammenlagerung der Monomere zu Polymeren zu einer Erniedrigung der Monomerenkonzentration kommen, und adsorbierte Monomere können erneut in Lösung gehen und zu einer Nachdiffusion des Farbstoffs in die Zellen führen.

Die Beladungsexperimente an Leukozyten im Durchflusszytometer zeigen, dass sich nach Inkubation mit SRM-Partikel die Monomeren- und Polymerensignale im Vergleich zu den unbehandelten Proben zeitlich stark verzögert in den Zellen herausbilden. Diese zeitliche Verschiebung wird in der veränderten der Lage der Maxima in den Ratiogrammen (Abb. 69) deutlich.

Bei einer SRM-Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  erreichen die Mono- und Polymerensignale innerhalb des Beobachtungszeitraums von 30 min nahezu die Sättigungsintensitäten der unbehandelten Kontrollen, allerdings erst nach ca. 20 min. Nur in Granulozyten bleiben die Signalmaxima unter denen der Kontrolle. Zur Beschreibung der Wirkung einer SRM-Exposition von 32  $\mu\text{g/ml}$  sind die Verläufe der Ratio-Werte (rote Kurven aus den Abbildungen 69) der drei untersuchten Zellfraktionen in der folgenden Abbildung 70 dargestellt:



**Abb. 70: Beladungskinetiken ( $F2/F1$ -Ratio) von JC-1 in Leukozyten nach Inkubation mit SRM-Partikel (32  $\mu\text{g/ml}$ ).**

(RPMI1640 ohne Phenolrot und ohne FCS, JC-1-Konzentration: 0,62  $\mu\text{M}$ , SRM-Konzentration: 32  $\mu\text{g/ml}$ ,  $10^6$  Zellen/ml, Temperatur 37  $^{\circ}\text{C}$ , vergrößerter Auszug aus den Abbildungen 69 G, H und I).

Man erkennt prinzipiell ähnliche Effekte, wie sie bereits für die Partikelkonzentration 10  $\mu\text{g/ml}$  beschrieben wurden. Die Maxima der Ratio-Verläufe bilden sich für Monozyten und Granulozyten zeitlich verzögert und in den Amplituden sehr stark reduziert aus. In Lymphozyten steigt die  $F2/F1$ -Ratio während der Beobachtungszeit stetig an.

Bei dieser Teilchenkonzentration steht aufgrund der hohen Adsorption an die Partikel nur noch eine geringe Restfarbstoffmenge für die Mitochondrienfärbung zur Verfügung (bezüglich der JC-1-Monomere nur noch 25 %, siehe Abbildung 67). Aufgrund dieser niedrigen Farbstoffkonzentration kann die Mitochondrienfärbung in keiner der drei Zellfraktionen mehr die Sättigung der unbehandelten Kontrollen erreichen.

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Dadurch wird es unmöglich, Teilchen-Effekte auf das Mitochondrienpotential zu erkennen, weil diese von den beschriebenen, starken indirekten Wirkungen der Partikel überlagert werden.

Ob die beobachteten starken Teilcheneffekte nur auf Adsorption zurückzuführen sind, oder auch eine Erniedrigung der Mitochondrien-Membranpotentiale durch SRM-Partikel zu messen ist, wie dies apoptotische Zellen im Allgemeinen zeigen, können nur Experimente über eine längere Zeitspanne prüfen, die im folgenden Punkt 5.2. beschrieben werden.

*Die durchflusszytometrischen Analysen der Beladungskinetiken von JC-1 in Leukozyten unter Einwirkung von SRM-Partikel belegen die bereits in den fluoreszenzspektroskopischen Messungen gefundenen adsorptiven Eigenschaften der Teilchen. In den durchflusszytometrischen Messungen lässt sich in den mit SRM-Partikeln inkubierten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen konzentrationsabhängig eine zeitliche Verzögerung in der Ausbildung der Signale der Mitochondrien-Membranpotentiale feststellen. Außerdem werden die ursprünglichen Signalhöhen nicht mehr erreicht.*

### 5.2. Direkte Wirkung von SRM-Partikel auf mit JC-1 gefärbte Zellen

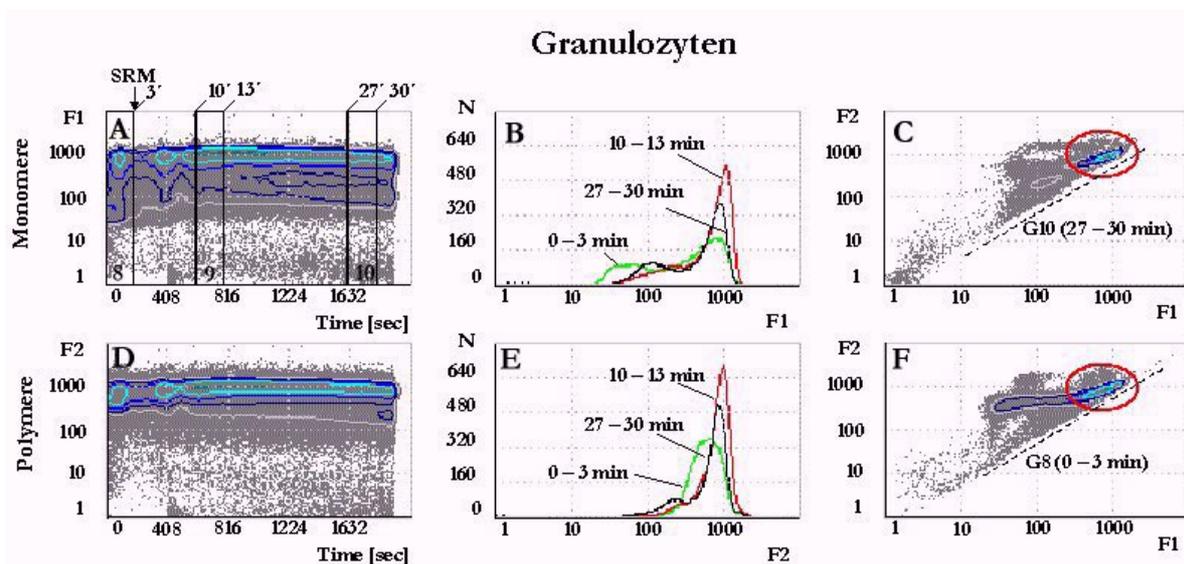
Die Ziele der Untersuchungen, die in diesem Abschnitt dargestellt werden, waren die Analyse der direkten Wirkung der SRM-Teilchen auf JC-1-gefärbte Zellen, einerseits während der ersten 30 min nach Teilcheninjektion in die Zellsuspension und andererseits nach längerer Einwirkdauer (bis 4 h). Es sollte versucht werden zu klären, ob neben Adsorptionseffekten auch der direkte Einfluss der SRM-Partikel auf die Apoptose, wie in IV.4.3.1 durch die Annexin-Signale beschrieben, auch über Mitochondrienpotentialänderungen zu messen ist.

Um den Kurzzeit-Einfluss von SRM-Teilchen auf bereits gefärbte Zellen, in denen die JC-1-Moleküle verteilt sind, zu untersuchen, wurden Leukozyten mit JC-1 15 min inkubiert, und im Durchflusszytometer, nach einem Vorlauf von 3 min, SRM-Partikel mit der Test-Konzentration von 32 µg/ml zugegeben (siehe Abbildung 71 A und D). Die Reaktionskinetik wurde über 31 min verfolgt. Zur Datenanalyse wurden die Zeitintervalle von 0 bis 3 min, 10 bis 13 min und 27 bis 30 min als Gates verwendet. In diesen Zeit-Gates sind für Granulozyten die Histogramme der Monomerensignale (Abbildung 71 B) und der Polymerensignale (Abbildung 71 E) ermittelt worden.

Die in Abbildung 71 zu beobachtenden Kurzzeiteffekte sind klein (meist nicht signifikant) und spiegeln die für Granulozyten gültigen Merkmale wider: Niedrige Mitochondrienkonzentration und unterlegte Apoptose, die durch die SRM-Teilchen in der Tat verstärkt wird.

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

In der Dot-Plot-Darstellung der Kontrolle (Abbildung 71 F) erscheint nur eine kleine Subpopulation vitaler Zellen mit relativ hohen Polymerensignalen als Indikatoren eines „normalen“ Mitochondrienmembran-Potentials (Polymere  $F2 >$  Monomere  $F1$ ; Zelldichtekontour links der roten Ellipse). Nach SRM-Teilchen-Zugabe erhöhen sich die zu dieser Population gehörenden Signale und wandern daher in den Bereich der roten Ellipse (Abbildung 73 C), die nahe der Diagonalen in den  $F1/F2$ -Diagrammen liegt (gestrichelte Linie) und die den Bereich markiert, in dem die Fluoreszenzen  $F2$  und  $F1$  von Zellen liegen, die keine (wenig) Mitochondrien besitzen (viele Kontrollzellen) oder deren Mitochondrienmembran-Potential durch Apoptose-Induktion zusammengebrochen ist.



**Abb. 71:** *Beeinflussung von JC-1 in Granulozyten durch SRM-Teilchen.*

- A) Monomerensignale ( $F1$ ) gegen die Zeit. Die Gates 8, 9 und 10 geben die untersuchten Zeitintervalle wieder.  
 B) Histogramme der  $F1$ -Intensitäten in den verschiedenen Zeitintervallen.  
 C)  $F2$  gegen  $F1$  im Zeitintervall 27 – 30 min (nach Zugabe der SRM-Partikeln [ $32 \mu\text{g/ml}$ ]).  
 D) Polymerensignale ( $F2$ ) gegen die Zeit.  
 E) Histogramme der  $F2$ -Intensitäten in den verschiedenen Zeitintervallen.  
 F)  $F2$  gegen  $F1$  im Zeitintervall 0 – 3 min (Dieses Intervall wird als Kontrolle gewertet).

Die Ratio  $F2/F1$  (siehe Abbildung 69 G, H, I) ist ein Maß für die Höhe des Mitochondrienmembran-Potentials.  $F2/F1$  ist als Steigung in C und F abzulesen. (RPMI1640 ohne Phenolrot und ohne FCS, SRM:  $32 \mu\text{g/ml}$ , JC-1-Konzentration:  $0,62 \mu\text{M}$ , Temperatur:  $37^\circ\text{C}$ .)

Diese Erhöhung der  $F1$ - und  $F2$ -Fluoreszenzintensitäten innerhalb der ersten 10 min nach Teilchenzugabe ist auch in den logarithmischen Histogrammen der Abbildungen 71 B und E zu erkennen (Rechtsshift der roten Verteilungen gegenüber der grünen Kontrollverteilungen).

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Die Reaktionen dürften durch zwei, voneinander nicht zu trennende Vorgänge bedingt sein: Phagozytose von Partikel, an die JC-1-Moleküle adsorbiert sind und/oder durch Eindiffusion von JC-1-Molekülen durch die labile Granulozyten-Membran (wegen unterlegter Apoptose) als Folge eines osmotischen Ausgleiches nach Teilchengabe.

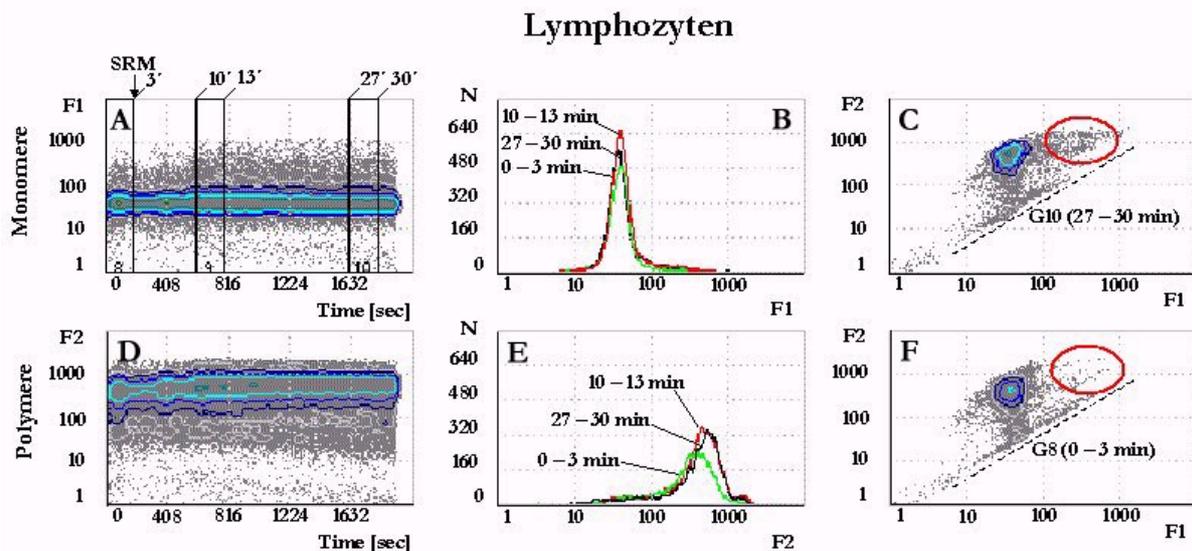
In den folgenden 20 min dieser kinetischen Untersuchung ist ein gegenläufiger Effekt zu beobachten. Monomeren- und Polymerensignale der Zellen nehmen wieder ab (siehe Abbildung 71 B und E: Linksshift der schwarzen Histogramme gegenüber den roten), bedingt durch die nun einsetzende Apoptose, die von einer Zellschrumpfung [91, 95] und daher einer Erniedrigung der Signalintensität begleitet ist. Dieser Vorgang ist besonders schön an den zeitlich sich absenkenden Konturen einer Subpopulation in den Abbildung 71 A und B zu sehen.

Eine zusätzliche Datenanalyse ergab, dass die Zellen dieser Subpopulation signifikant pygnotisch sind (ihr FSC ist nur halb so groß wie der der Kontrollzellen) und ca. 5 % der Gesamtpopulation betragen. Zum Vergleich: Nach einer Stunde ist im Annexintest der apoptotische Anteil an Granulozyten ca. 20 %.

Leider lassen sich in Langzeitversuchen (bis 4 h) die gezeigten, schwachen Effekte des JC-1-Tests wegen der beschriebenen Eigenschaften der Granulozyten nicht verstärken und keine Signifikanz erzielen.

So muss man sich bei dieser wichtigen Zellgruppe mit den dargestellten Reaktionstendenzen begnügen. Im Vergleich werden die Ergebnisse eines analogen Experiments mit Lymphozyten betrachtet, die keiner unterlegten Apoptose ausgesetzt und nicht zur Phagozytose fähig sind.

Die intakte Lymphozytenmembran und eine normale Mitochondrienkonzentration führen zu einer exemplarisch ausgeprägten Kontrollzellpopulation (Abbildung 72 F) mit deutlich stärkeren Polymeren- als Monomeren-Signalen ( $F2 \gg F1$ ). Dieser Unterschied (ca. Faktor 100) wird besonders durch die Lage der entsprechenden Histogramme in der Abbildungen 72 B und E erkennbar.



**Abb. 72:** *Beeinflussung von JC-1 in Lymphozyten durch SRM-Teilchen.*

- A) *Monomerensignale (F1) gegen die Zeit. Die Gates 8, 9 und 10 geben die untersuchten Zeitintervalle wieder.*
- B) *Histogramme der F1-Intensitäten in den verschiedenen Zeitintervallen.*
- C) *F2 gegen F1 im Zeitintervall 27 – 30 min (nach Zugabe der SRM-Partikel [32 µg/ml]).*
- D) *Polymerensignale (F2) gegen die Zeit.*
- E) *Histogramme der F2-Intensitäten in den verschiedenen Zeitintervallen.*
- F) *F2 gegen F1 im Zeitintervall 0 – 3 min (Dieses Intervall wird als Kontrolle gewertet).*  
*(RPMI1640 ohne Phenolrot und ohne FCS, SRM: 32 µg/ml, JC-1-Konzentration: 0,62 µM, Temperatur: 37 °C)*

Nach Zugabe der SRM-Partikel (32 µg/ml) wandern die JC-1-Signale einer kleinen Subpopulation bereits nach 30 min in den Bereich des F1/F2-Diagramms, der durch die rote Ellipse charakterisiert ist und bei Granulozyten der Bereich der apoptotischen Zellen war. Die zudem beobachtbare Verschiebung des Mittelwerts der Polymerenhistogramme zu höheren Werten (Abbildung 72 E) lässt sich durch eine schwache JC-1-Diffusion erklären, die durch eine beginnende apoptotische Membranlabilisierung bedingt sein könnte.

Ob diese Subpopulation, die ganz schwach z.B. auch an den rechten Flanken der roten Histogramme in Abbildungen 72 B und E zu erkennen ist, apoptotisch und, nach längeren Expositionszeiten signifikant über das JC-1-Assay zu messen ist, soll eine weitere Untersuchung zeigen.

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

---

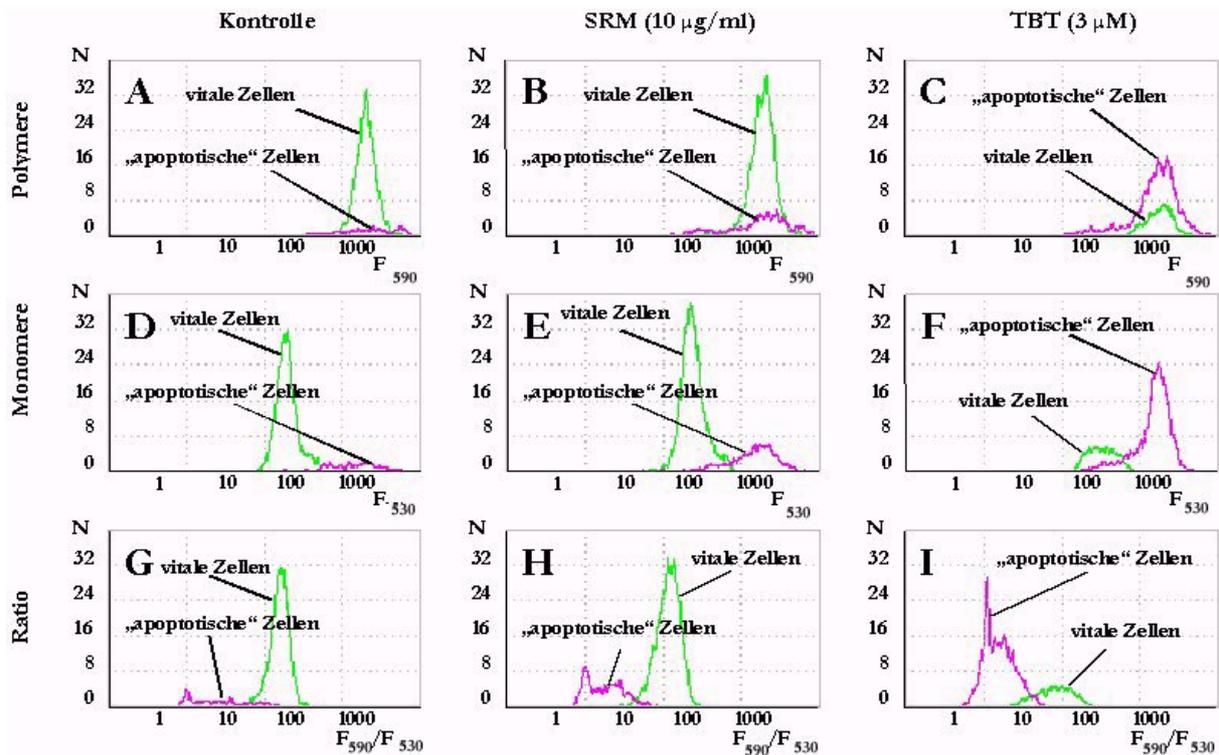
An dieses Experiment sind auch die Fragen gekoppelt, ob die unter Punkt 5.1. dargestellten Teilcheneffekte nur auf Adsorptionseffekten beruhen oder ob die SRM-Partikel auch direkt auf die Mitochondrienmembran-Potentiale einwirken. Das würde bedeuten, dass die in diesen Zellen durch SRM-Partikel ausgelöste Apoptose (siehe Abbildung 60 bis 62) von der Art ist, dass nach Veränderung des Mitochondrienmembran-Potentials die Freisetzung von Cytochrom c induziert wird, das eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion der Apoptose von Typ II-Zellen (siehe „Theoretische Grundlagen“ II.2.2.4.) spielt.

Zur Klärung dieses Sachverhalts wurden Leukozyten über einen längeren Zeitraum (4 h) den Teilchen (SRM-Konzentration: 10 µg/ml und 32 µg/ml) ausgesetzt, und in einer Zeitreihe zu jeder Stunde die JC-1-Signale von Lymphozyten ausgewertet. In dieser Zellfraktion konnten die verschiedenen Subpopulationen am besten durch Gating (etwa wie in Abbildung 72 C) erfasst werden (Monozyten liefern wegen ihres geringen Anteils eine zu große Streuung für signifikante Ergebnisse, obwohl sich die Subpopulationen vital/apoptotisch gut trennen ließen).

So wurden die Anteile der Zellen mit einem niedrigen Mitochondrien-Membranpotential an der Gesamtzahl der lebenden Zellen ermittelt, und die mit Partikel behandelten Proben mit unbehandelten Kontrollen und Zellen, die mit 3 µM TBT inkubiert wurden, verglichen. Als Zellen mit einem niedrigen Mitochondrien-Membranpotential wurden solche definiert, die eine Polymeren/Monomeren-Ratio ( $F_{590}/F_{530}$ ) von  $< 10$  aufwiesen.

Zum Beweis des richtigen Trennens von vitalen und apoptotischen Zellen und auch des Verstärkungseffekts durch längere Expositionszeiten im Vergleich zu den 30 min der Abbildung 72, sollen zuvor die Histogramme von unbehandelten Lymphozyten und von Lymphozyten, die vier Stunden 10 µg/ml SRM-Partikel ausgesetzt waren, mit Histogrammen von Zellen verglichen werden, auf die 1 h TBT (3 µM) eingewirkt und in ihnen teilweise Apoptose ausgelöst hat (Abbildung 73).

#### IV. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 73:** *Histogramme der JC-1-Signale in unbehandelten und in 4 h mit 10 µg/ml SRM-Partikel inkubierten Lymphozyten, sowie in mit TBT (3 µM, 1h) behandelten Zellen (partiell apoptotisch).*

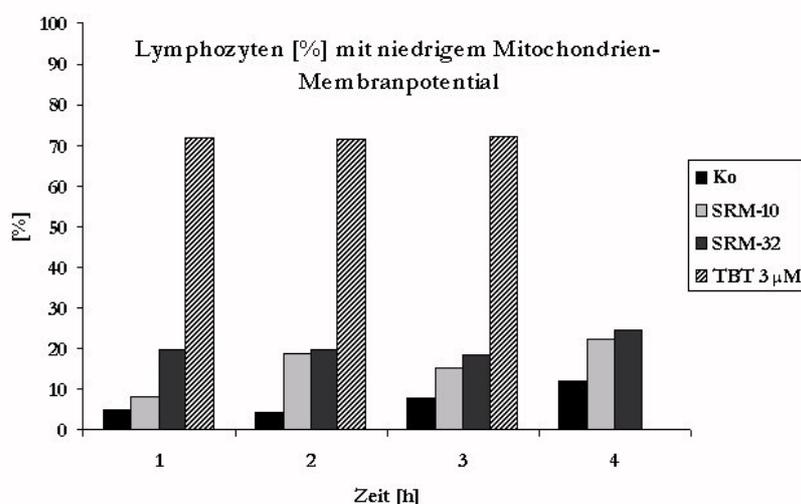
*(RPMI1640 ohne Phenolrot und ohne FCS, SRM: 10 µg/ml, TBT: 3µM, JC-1-Konzentration: 0,62 µM, Temperatur: 37°C.)*

- *Obere Reihe: Histogramme der Polymeren-Signale ( $F_{590}$ ) in der unbehandelten Kontrolle (4h) (A), in Lymphozyten, die 4 h mit 10 µg/ml SRM-Partikel (B) und 1 h mit TBT (3 µM) (C) behandelt wurden.*
- *Mittlere Reihe: Histogramme der Monomeren-Signale ( $F_{530}$ ) in der unbehandelten Kontrolle (4h) (D), in Lymphozyten, die 4 h mit 10 µg/ml SRM-Partikel (E) und 1 h mit TBT (3 µM) (F) behandelt wurden.*
- *Untere Reihe: Histogramme der  $F_{590}/F_{530}$ -Ratio in der unbehandelten Kontrolle (4h) (G), in Lymphozyten, die 4 h mit 10 µg/ml SRM-Partikel (H) und 1 h mit TBT (3 µM) (I) behandelt wurden.*

Die Histogramme in Abbildung 73 lassen deutlich eine Trennung der Lymphozyten in Subpopulationen mit hohem und niedrigem Mitochondrien-Membranpotential in allen drei Versuchsansätzen (Kontrolle, 10 µg/ml SRM und TBT (3 µM)) erkennen. Diese Trennung der mit SRM-Partikel behandelten Zellpopulationen in vitale und „apoptotische“ Zellen ist korrekt, da die Lage der zu diesen Zellen gehörenden Monomeren- und Polymeren-Histogramme mit der der apoptotischen Zellen übereinstimmt, die mit TBT erzeugt worden sind (Abbildung 73: vergleiche B mit C und E mit F). Besonders deutlich zeigt sich in der Lage der  $F_{590}/F_{530}$ -Histogramme die Ausprägung der apoptotischen Subpopulationen.

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

Die Verhältnisverschiebung der Zellen mit niedrigem Mitochondrien-Membranpotential im Vergleich zur Kontrolle, ist vor allem durch die Zunahme der Monomeren-Fluoreszenzintensitäten (Nenner des Verhältnisses) bedingt (siehe Abbildung 73 E und F) und zu einem geringen Teil durch eine Abnahme der  $F_{590}$ -Intensität (siehe Abbildung 73 B und C), die einem Zerfall von Polymeren entspricht. Die Zunahme der Fraktion apoptotischer Zellen nach SRM-Partikel-Exposition, sowie nach TBT-Behandlung kann durch die integrale Häufigkeit dieser Verteilungen quantifiziert werden. Diese Ergebnisse und die für die anderen Zeiten und für andere Agenskonzentrationen sind in Abbildung 74 dargestellt:



**Abb. 74:** *Anteile von Lymphozyten mit einem niedrigem Mitochondrien-Membranpotential an der Gesamtzahl der lebenden Lymphozyten.*

*(RPMI1640 ohne Phenolrot und ohne FCS, SRM: 10 bzw. 32 µg/ml, TBT: 3µM, JC-1-Konzentration:*

*0,62 µM, Temperatur: 37°C)*

In Abbildung 74 fällt vor allem der hohe Anteil an Lymphozyten mit niedrigem Mitochondrien-Membranpotential nach Behandlung mit TBT (3 µM) auf: Bereits nach einer Stunde steigt hier der Prozentsatz auf 72 % (unbehandelte Kontrolle: 5 %). Dieser Wert bleibt bis zu 3 h relativ konstant. Nach 3 h Stunden kollabieren die mit TBT inkubierten Zellen, so dass für die vierte Stunde keine Messwerte mehr ermittelt werden konnten. Aber auch SRM-Partikel (32 µg/ml) bewirken schon nach einer Stunde einen signifikanten Anstieg des Anteils an Zellen mit niedrigem Mitochondrien-Membranpotential (19,6 %).

Die der geringeren SRM-Konzentration (10 µg/ml) für 1 h ausgesetzten Zellen zeigen mit 8 % nur einen kleinen Unterschied zur Kontrolle, erreichen aber nach zwei Stunden mit 19 % das Niveau der mit 32 µg/ml behandelten Zellen (19,7 %, Kontrolle: 4,1%).

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Nach vier Stunden steigen auch die Werte in der unbehandelten Kontrolle und in den Proben, die mit SRM-Partikel behandelt wurden, weiter an (Kontrolle: 11,9 %, SRM 10 µg/ml: 22,5 %, SRM 32 µg/ml: 24,6 %).

Interessant ist, dass in den mit 32 mg/ml SRM-Partikel und 3 µM TBT behandelten Lymphozyten sich der nach 1 h einstellende Anteil von Zellen mit niedrigem Mitochondrien-Membranpotential über die ganze Beobachtungszeit von 4 h nur geringfügig ändert.

Dies bedeutet, dass relativ früh die Entscheidung über die Initiierung der apoptotischen Prozesse in den Zellen getroffen wird. Die innerhalb von 4h allmählich steigenden Apoptoseraten (bis ca. 10 % in Lymphozyten, Kontrolle < 2 %), die in Kapitel IV.4.3.2. beschrieben worden sind, sind mit den Annexin-Assay bestimmt und messen einen späteren Schritt in der Abfolge der Apoptose, der wohl während der gewählten Beobachtungszeit noch nicht beendet sein dürfte.

*Der Vergleich der Histogramme der Abbildung 73 und die Ergebnisse der Abbildung 74 beweisen, dass die SRM-Teilchen nicht nur adsorptiv wirken, sondern auch direkt die Mitochondrien-Membranpotentiale in den Zellen beeinflussen und somit Apoptose vom Typ II induzieren können.*

*Unter „Ergebnisse und Diskussion“ IV.5.2. konnte gezeigt werden, dass SRM-Partikel indirekt durch Adsorption von Substanzen aus der Umgebung der Zellen als auch direkt durch die Beeinflussung des Mitochondrien-Membranpotential auf Leukozyten einwirken kann.*

### 5.3. Einfluss von SRM-Partikel auf die Wirkung von Stimulantien

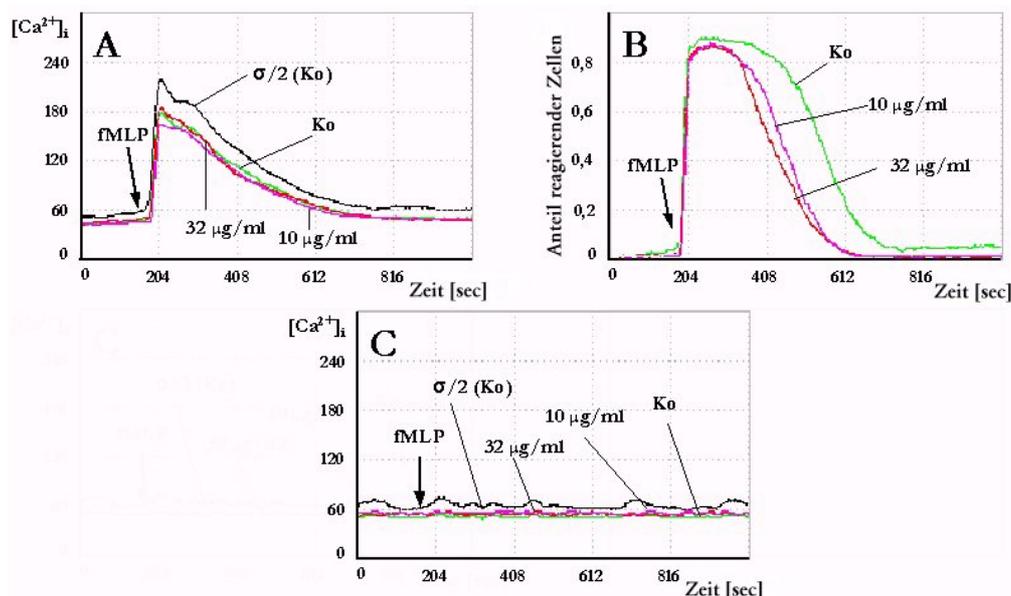
Durch Adsorption an Partikel könnten auch Stimulantien gebunden und so ihre Wirkung verändert werden. Dies wurde über eine mögliche Teilchen-Beeinflussung der Modulation des intrazellulären Calciumgehalts durch TBT und fMLP untersucht. Neben der direkten Interaktion Teilchen/Stimulans soll auch an die Möglichkeit eines indirekten Teilcheneffekts gedacht werden. So könnte extrazellulär eine Beeinflussung der primären Interaktion zwischen fMLP und fMLP-Rezeptor erfolgen oder intrazellulär eine Beeinflussung der TBT-Wirkung auf die Ca<sup>2+</sup>-Pumpen der Ca<sup>2+</sup>-Speicher.

Für die Untersuchungen wurden die Leukozyten eine halbe Stunde mit verschiedenen Konzentrationen (10 und 32 µg/ml) von SRM-Teilchen vorinkubiert. Zur Detektion von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> wurde die Indo-1-Ratio-Methode (siehe „Methodische Grundlagen“ III.1.2.1.) benutzt.

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

Die Beladung der Zellen mit dem Farbstoff erfolgte vor Inkubation mit den Teilchen. Indo-1-AM hat den Vorteil, dass der Farbstoff nach Abspaltung der Estergruppe in der Zelle verbleibt, so dass der für JC-1 unter Punkt 5.1.2. beschriebene Adsorptions-Effekt bei diesem Farbstoff nicht auftritt (s.u.).

Den Einfluss der Teilchen auf die Stimulation durch fMLP zeigt Abbildung 75:



**Abb. 75:** *Beeinflussung der durch fMLP ausgelösten Modulation von  $[Ca^{2+}]_i$  durch SRM-Partikel.*

A) *Beeinflussung von  $[Ca^{2+}]_i$  in Granulozyten.*

B) *Anteil reagierender Granulozyten.*

C) *Beeinflussung von  $[Ca^{2+}]_i$  in Lymphozyten.*

*(RPMI ohne Phenolrot und ohne FCS, fMLP: 100 nM nach 3 min, SRM-Inkubation: 30 min, Indo-1-AM: 5  $\mu\text{M}$ , Temperatur: 37 °C.)*

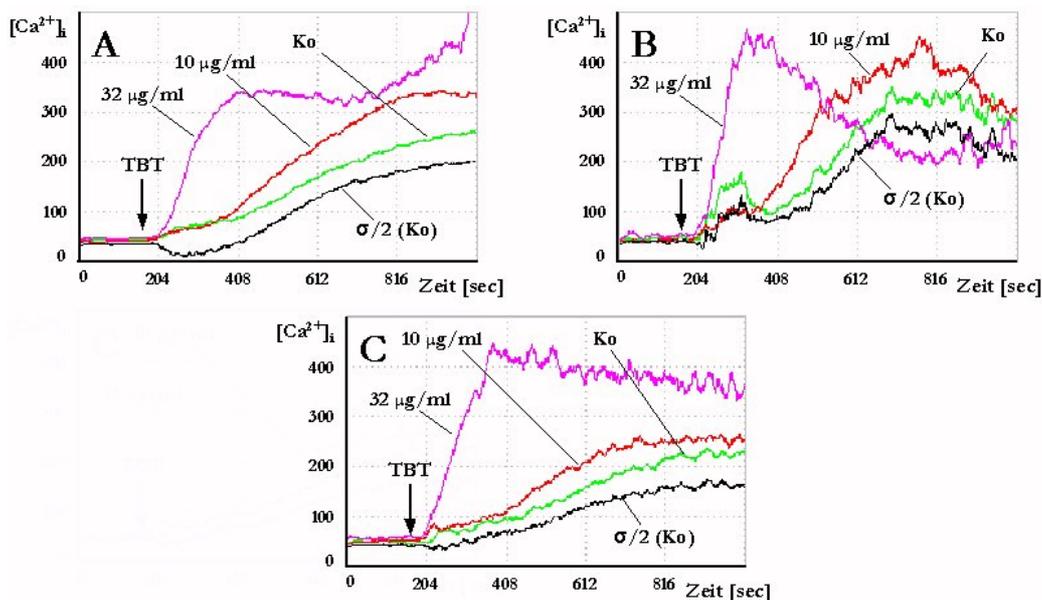
In Abbildung 75 wird die  $Ca^{2+}$ -Reaktion von Granulozyten und Lymphozyten auf fMLP in Kombination mit verschiedenen Konzentrationen von SRM-Partikel wiedergegeben. In Granulozyten zeigen sich keine synergistischen Effekte zwischen fMLP und den SRM-Partikel im Bezug auf  $[Ca^{2+}]_i$ . Die Interaktion fMLP/fMLP-Rezeptor wird nicht gestört, obwohl die Teilchen ebenfalls an der äußeren Membran vorhanden sind (Abbildung 75 A). Dass in Lymphozyten durch fMLP kein Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  ausgelöst wird (Abbildung 75 C), erklärt sich aus dem Fehlen von fMLP-Rezeptoren.

Da sich die, mit Partikel vorinkubierten, Zellen in ihrem intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Gehalt nicht von den unbehandelten Kontrollzellen unterscheiden, belegt, dass die Teilchen auch keinen Einfluss auf Indo-1 in den Zellen nehmen. Ebenfalls lässt sich in Granulozyten keine Veränderung der  $[Ca^{2+}]_i$ -Kinetik nach Stimulation mit fMLP in den Zellen erkennen, nachdem diese mit SRM-Partikel vorinkubiert wurden.

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

Interessanterweise zeigen sich im Granulozyten-Experiment Unterschiede im Prozentsatz der reagierenden Zellen. Bei den mit SRM-Partikel behandelten Granulozyten nimmt der Anteil der reagierenden Zellen schneller ab als in der unbehandelten Zellpopulation. Die Ursache hierfür könnte ein Kollabieren einer apoptotischen Subpopulation unter den Granulozyten sein, ausgelöst durch die Exposition mit SRM-Partikel.

fMLP ist ein Stimulans, das eine über  $IP_3$  vermittelte Ausschüttung von  $Ca^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären Sequestor-Kompartimenten verursacht, nachdem es an fMLP-Rezeptoren an der äußeren Plasmamembran gebunden hat (siehe „Methodische Grundlagen“ III.5.3.). TBT dagegen wirkt intrazellulär (siehe auch „Methodische Grundlagen“ III.5.2.). Der Reaktionsweg zur Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch TBT beginnt mit einer Hemmung der  $Ca^{2+}$ -ATPasen, d.h. der  $Ca^{2+}$ -Pumpen, die  $Ca^{2+}$ -Ionen in die intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speicher transportieren. Der niedrige  $Ca^{2+}$ -Gehalt der Speicher bewirkt die Freisetzung eines Signalmoleküls, das externen  $Ca^{2+}$ -Einstrom durch  $Ca^{2+}$ -Kanäle auslöst („store opened  $Ca^{2+}$ -influx“ [185]). Wie sich SRM-Partikel auf die Reaktion von Granulozyten und Lymphozyten nach TBT-Gabe auswirken, wird in der folgenden Abbildung 76 dargestellt:



**Abb. 76:** *Beeinflussung der durch TBT ausgelösten Modulation von  $[Ca^{2+}]_i$  durch SRM-Partikel.*

A) *Beeinflussung von  $[Ca^{2+}]_i$  in Granulozyten.*

B) *Beeinflussung von  $[Ca^{2+}]_i$  in Monozyten.*

C) *Beeinflussung von  $[Ca^{2+}]_i$  in Lymphozyten.*

*(RPMI1640 ohne Phenolrot und ohne FCS, TBT:  $1 \mu M$  nach 3 min, SRM-Inkubation: 30 min, Indo-1-AM:  $5 \mu M$ , Temperatur:  $37^\circ C$ )*

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Abbildung 76 zeigt, dass SRM-Partikel in Kombination mit TBT in allen drei Zellfraktionen den intrazellulären Calcium-Gehalt konzentrationsabhängig anheben. Da die Erhöhung unmittelbar und auch in nichtphagozytierenden Lymphozyten eintritt, kann ausgeschlossen werden, dass TBT an Partikel gebunden über Phagozytose in die Zellen gelangt. Die Signalerhöhungen mit steigender Partikelkonzentration belegen, dass TBT im Medium nicht in großem Umfang an die Teilchen adsorbiert wird, was eine gegenläufige Reaktion auslösen müsste. Die Ursache für die beobachteten synergistischen Effekte durch SRM-Partikel kann nur durch weitere Untersuchungen zur Modulation des Signalweges geklärt werden. Es lässt sich jedoch spekulativ anführen, dass TBT auch durch osmotische Effekte nach einer Labilisierung der Membran durch die Teilchen, verbunden mit TBT-bedingten apoptotischen Einflüssen, eine erhöhte Diffusionsrate haben könnte, jedoch auch Interaktionen der SRM-Partikel mit einem der  $Ca^{2+}$ -erhöhenden Reaktionsschritte (s.o.) möglich sind.

*Die Ergebnisse belegen eine synergistische Wirkung von SRM-Partikel mit einem nichtrezeptorvermittelten Stimulus (TBT), die zu einer Erhöhung von intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen führt. Eine Störung von an der Membran ablaufenden Prozessen durch Partikel (kompetitive Wirkung) konnte bei der Untersuchung der Wirkung einer Vorinkubation mit SRM-Partikel auf die Stimulation von Granulozyten mit fMLP nicht nachgewiesen werden.*

### 6. Allgemeine Diskussion

Im vorhergehenden Kapitel „Ergebnisse und Diskussion“ wurden die erarbeiteten Ergebnisse dargestellt und einzeln in engerem Rahmen diskutiert.

In der nun folgenden allgemeinen Diskussion sollen Querverbindungen zwischen den beeinflussten Parametern herausgestellt und somit eine Einordnung der Ergebnisse in den Kontext „Biochemische und physiologische Reaktionen von inflammatorischen Zellen auf feine/ultrafeine Teilchen“ erarbeitet werden.

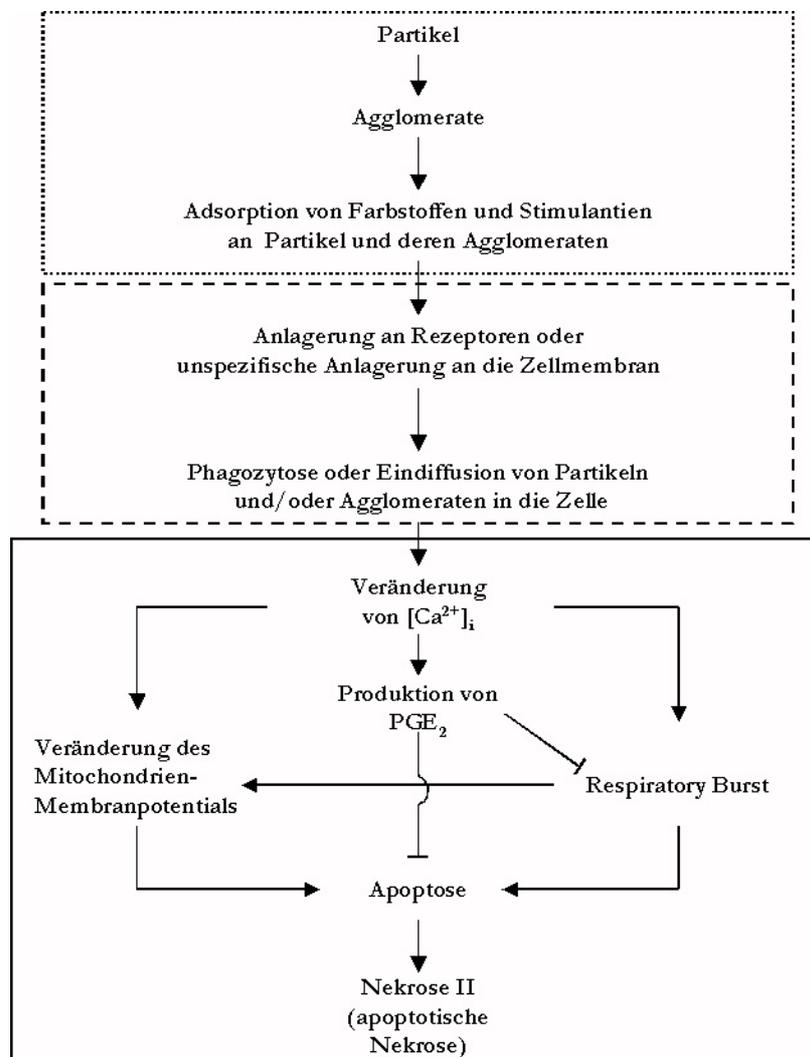
#### 6.1. Übersicht der untersuchten Parameter und ihre gegenseitige Beeinflussung

In dieser Arbeit wurde versucht, die Wirkung von Teilchen in inflammatorischen Zellen vom Beginn der Signaltransduktion (Modulation von  $[Ca^{2+}]_i$ ), über regulative Mechanismen (intrazelluläre  $PGE_2$ -Produktion), bis hin zur Manifestation von physiologischen Endpunkten (Apoptose, Respiratory Burst) zu analysieren.

Die Partikel lagern sich nach ihrer Zugabe in das Medium zu Agglomeraten zusammen (siehe IV.2.3.). Diese können bereits im Medium entsprechende Farbstoffe, Mediatoren und Stimulantien adsorbieren und dadurch ihre Konzentration erniedrigen (siehe IV.5.1.1.). Nach Anlagerung an die Zellmembran besteht die Möglichkeit, dass die Partikel und/oder deren Agglomerate durch unspezifische oder spezifische Bindung an Rezeptoren Effekte auf die Zellen ausüben (siehe IV.6.2). Anschließend vermögen die Partikel und/oder deren Agglomerate durch Diffusion oder aktive Aufnahme über Phagozytose in das Zellinnere gelangen. Die Bindung von Partikel an Rezeptoren führt zur Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden, an deren Beginn oft die Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration (siehe Punkt IV.4.2.1.) steht. Die Modifikation von  $[Ca^{2+}]_i$  kann sich auf nachfolgende zellphysiologische und biochemische Parameter auswirken. So sind Zusammenhänge mit der Induktion des Respiratory Burst [65, 66], der Produktion von  $PGE_2$  [185] und der Veränderung des Mitochondrien-Membranpotentials [108] beschrieben worden. Diese drei Parameter haben direkten oder indirekten Einfluss auf die Apoptose bzw. apoptotische Nekrose. Die intrazelluläre Produktion von  $PGE_2$  wiederum wirkt einer inflammatorischen Reaktion entgegen, indem sie den Respiratory Burst hemmt [117] und somit eine regulatorische Funktion ausübt.

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 77 gibt eine Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten Parameter wieder. Zusätzlich zeigt die Graphik die Beziehung der einzelnen Parameter untereinander.



**Abb. 77:** *Übersicht über mögliche Wirkungen von Partikel auf inflammatorische Zellen (punktierte Linie: Vorgänge außerhalb der Zelle, gestrichelte Linie: Vorgänge an der Zellmembran, durchgezogene Linie: Vorgänge in der Zelle).*

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass Partikel in die beschriebenen zellphysiologischen und biochemischen Prozesse eingreifen können. Dies wurde besonders am Beispiel der SRM-Partikel, die sich als die wirkungsvollsten Teilchen erwiesen haben, deutlich.

Nachdem die Leukozyten mit SRM-Partikel (32 µg/ml) inkubiert worden waren, verdoppelte sich  $[Ca^{2+}]_i$  nach einer Stunde in Granulozyten und Monozyten (siehe IV.4.1.2.1). In Lymphozyten war kein Effekt erkennbar.

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Im selben Zeitraum verdreifachte sich die intrazelluläre Produktion von reaktiven Sauerstoffmetaboliten in Granulozyten und Monozyten (siehe IV.4.2.2). Eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate durch SRM-Partikel, die über die Präsentation von Phosphatidylserin in der äußeren Zellmembranschicht gemessen wurde, konnte in Granulozyten nach fünf Stunden registriert werden. Hier betrug der Anteil apoptotischer Zellen an der Gesamtzahl der lebenden Zellen ca. 40 % (Kontrolle: 25 %) und stieg nach sieben Stunden auf ca. 60 % (Kontrolle: 34 %) an. Die hohen Werte in unbehandelten Kontrollzellen zeigen, dass diese Zellen eine hohe natürliche Prädisposition für den Übergang in die Apoptose besitzen. In Monozyten ist diese unterlegte Apoptose besonders stark ausgebildet, so dass sie die Teilcheneffekte vollständig überlagert.

In Lymphozyten hingegen sind die Anteile der apoptotischen Zellen an der Gesamtzellzahl wesentlich geringer und erreichen nach sieben Stunden nur 8 % in mit SRM-Partikel behandelten Zellen und 2 % in den Kontrollen (siehe IV.4.3.). In diesen Zellen erfolgt also keine so starke unterlegte Apoptose, wie sie bei Granulozyten und Monozyten zu beobachten war.

Die Beeinflussung des Mitochondrien-Membranpotentials durch SRM-Partikel konnte in Granulozyten und Lymphozyten beobachtet, aber aus methodischen Gründen nur an Letzteren näher quantifiziert werden. Bei ihnen wurde ein Anstieg des Anteils an Zellen mit niedrigen Mitochondrien-Membranpotentialen bei Behandlung mit 32 µg/ml SRM-Partikel bereits nach einer Stunde von ca. 20 % erreicht, der nach vier Stunden nur noch geringfügig auf 24 % anstieg (siehe IV.5.2.). Die Involvierung des Mitochondrien-Membranpotentials lässt auf eine Auslösung der Apoptose nach dem Typ-II-Modell schließen. Die schnelle Einstellung eines relativ konstanten Anteils von Zellen mit niedrigen Mitochondrien-Membranpotentialen zeigt, dass die Entscheidung über die Einleitung der Apoptose relativ früh getroffen wird.

Der auch nach sieben Stunden immer noch niedrige Anteil von Phosphatidylserin-präsentierenden Lymphozyten zeigt, dass die Abnahme des Mitochondrien-Membranpotentials ein frühes Ereignis im Ablauf der Apoptose ist, der Verlust der Zellmembranasymmetrie dagegen relativ spät erfolgt.

Die unterschiedlichen Reaktionsintensitäten der verschiedenen Zellpopulationen spiegeln ihre Funktionen wider. Granulozyten und Monozyten sind Zellen der unspezifischen Abwehr („innate immunity“) und müssen deshalb schnell reagieren, um in den Körper eingedrungene Fremdkörper zu eliminieren. Die dabei eingesetzten Abwehrreaktionen können sich aber auch gegen körpereigenes Gewebe richten und müssen daher streng reguliert werden.

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Dies kann über die Hemmung inflammatorischer Reaktionen durch Metabolite wie PGE<sub>2</sub> oder durch eine Terminierung der Lebensdauer der inflammatorischen Zellen über apoptotische Prozesse erfolgen. Lymphozyten müssen ihre Aufgabe als Zellen der spezifischen Abwehr gerichtet und langfristig erfüllen. Ihre Abwehrreaktionen richten sich im Normalfall nicht gegen körpereigenes Gewebe, so dass sie in der Ausübung ihrer Funktion nicht zeitlich beschränkt werden müssen.

Interessanterweise setzten alle untersuchten Partikel, mit Ausnahme der Staphylococcen, die Produktion von PGE<sub>2</sub> in Granulozyten herauf (siehe IV.4.4.). Dass durch alle der untersuchten abiotischen Teilchen eine vermehrte PGE<sub>2</sub>-Produktion in den Zellen induziert wird, lässt darauf schließen, dass die Partikel generell von Zellen der unspezifischen Abwehr erkannt werden.

Auffallend sind hier zwei Beobachtungen: Ultrafeine TiO<sub>2</sub>-Partikel induzieren eine höhere PGE<sub>2</sub>-Produktion in Granulozyten als feine TiO<sub>2</sub>-Teilchen, ebenso sind EC-Partikel wirksamer als die größeren Printex-Teilchen. Somit sind die Untersuchungen zur intrazellulären PGE<sub>2</sub>-Produktion die einzigen Analysen in dieser Arbeit, in denen die These einer höheren Wirksamkeit von ultrafeinen gegenüber feinen Teilchen bestätigt wird.

PGE<sub>2</sub> wirkt einer inflammatorischen Antwort der Zellen entgegen. Die Produktion von PGE<sub>2</sub> in den Zellen könnte also eine Komponente eines regulativen Systems sein, die verhindert, dass abiotische Partikel, die häufig nicht oder nur schwer degradierbar sind, eine inadäquate Reaktion in inflammatorischen Zellen hervorrufen. Über welche Mechanismen solche Partikel erkannt werden, ist noch unklar. Eine Möglichkeit hierfür könnte in der Art und der Anzahl der Rezeptoren liegen, an die sich die Teilchen anlagern. Jedoch gibt es Hinweise dafür, dass Scavenger-Rezeptoren z.B. Metalloxide binden können. Die Bindung und Aufnahme von Partikel an bzw. in Zellen wird unter IV.6.2. noch eingehender diskutiert. Es besteht außerdem die Möglichkeit, dass durch Opsonierung von Teilchen mit Substanzen aus dem umgebenden Medium Partikel zu potentiellen Liganden für weitere Rezeptoren werden. Dies würde die hohe PGE<sub>2</sub>-Produktion in Granulozyten nach Vorinkubation mit SRM-Partikel erklären. Ultrafeine Teilchen könnten mehr Rezeptoren besetzen als feine Teilchen gleicher Konzentration. Dieses Argument trifft allerdings nur bei niedrigen Teilchenkonzentrationen zu.

*Die zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse dieser Arbeit zeigt, dass Partikel in der Lage sind, auf verschiedenen Ebenen in inflammatorische Signalwege von Zellen der unspezifische Abwehr einzugreifen. Dabei werden sowohl inflammatorische Reaktionen, wie der Respiratory Burst, als auch regulative Reaktionen, wie die intrazelluläre Produktion von PGE<sub>2</sub> oder die Terminierung der inflammatorischen Reaktionen durch Einleitung der Apoptose, beeinflusst.*

### **6.2. Wirkung der untersuchten Partikel in Abhängigkeit von Oberfläche und Oberflächenbeladung**

Ein Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Wirksamkeit der verwendeten Partikel in Abhängigkeit von ihrer relativen Oberfläche und ihrer Oberflächenbeladung. Hierzu wurden mit einer Auswahl von Partikel, die unterschiedliche Größe und Oberflächenbeladung aufweisen, Screening-Experimente für die bereits beschriebenen zellphysiologischen und biochemischen Parameter durchgeführt.

Im Bezug auf alle Ergebnisse kann für die Wirksamkeit der verwendeten abiotischen Teilchen die Reihenfolge: feine TiO<sub>2</sub>-Partikel < ultrafeine TiO<sub>2</sub>-Partikel < EC-Partikel < Printex-Partikel < SRM-Partikel festgelegt werden, wobei die ultrafeinen TiO<sub>2</sub>-Partikel nur in den Untersuchungen zur intrazellulären PGE<sub>2</sub>-Produktion signifikant stärkere Effekte auslösten als feine TiO<sub>2</sub>-Partikel (siehe auch IV.4.4.), sonst aber die TiO<sub>2</sub>-Teilchen sich gleich inert verhielten. Um einen Einblick in mögliche Wirkmechanismen der unterschiedlichen Partikelarten zu bekommen, soll noch einmal auf die verschiedenen Wege eingegangen werden, über die Partikel auf Zellen und ihre Umgebung wirken können.

Prinzipiell können Effekte durch Partikel auf Zellen unspezifisch über physikalische Wirkungen und/oder spezifisch nach Bindung an Rezeptoren ausgelöst werden. Für die unspezifischen Wirkungen der Teilchen wurde bereits unter „Theoretische Grundlagen“ II.2.2.1. eine Übersicht erstellt.

So können Partikel durch Adsorption von Substanzen aus der Umgebung der Zellen Einfluss auf die Wirkung von Botenstoffen und Stimulantien haben. Dass Partikel stark adsorptiv wirken können, wurde anhand der Wirkung von SRM-Partikel auf die Beladungskinetiken des kationischen Farbstoffes JC-1 in Lymphozyten im Punkt „Ergebnisse und Diskussion“ IV.5.1.2. nachgewiesen.

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Dem gegenüber stehen die Ergebnisse aus IV.5.3., in denen die Wirkung einer Vorinkubation mit SRM-Partikel auf die  $[Ca^{2+}]_i$ -Reaktion von Leukozyten auf das neutrale Stimulans TBT untersucht wurde. Hier zeigte sich, dass die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  in den Zellen durch TBT mit der SRM-Teilchenkonzentration positiv korrelierte, anstatt bei höheren SRM-Konzentrationen in Folge der Bindung von TBT abzunehmen. Dies macht deutlich, dass die Adsorption von Substanzen an Partikel sowohl von Ladung und Struktur der zu adsorbierenden Stoffe abhängig ist, als auch von der Oberflächenbeladung und – struktur der Partikel sein dürfte.

Die Beobachtungen der synergistischen Wirkung von SRM-Teilchen und TBT sprechen für einen direkten Einfluss der Partikel auf die Zellen. Dabei kann es sich um osmotische Wirkungen und/oder eine Eindiffusion von Partikel und Stimulantien in die Zellen handeln. Die Veränderung der Osmolalität, also der Konzentration von osmotisch aktiven Teilchen, durch Zugabe von Partikel im Umfeld der Zellen zieht eine Ausgleichsreaktion der Zellen nach sich [186]. Um die Konzentration der gelösten Partikel in den Zellen den erhöhten Außenkonzentrationen anzupassen, gibt die Zelle Wasser in die Umgebung ab, wodurch die Zelle an Volumen verliert. Um wieder physiologische Verhältnisse herzustellen, hat die Zelle verschiedene Möglichkeiten: Sie kann intrazelluläre Makromoleküle, wie zum Beispiel Proteine oder Glukagon, zu kleineren Einheiten abbauen, um so die Teilchenkonzentration im Zellinneren zu erhöhen. Auf diese Weise greift die Veränderung der Osmolalität direkt in den Metabolismus der Zellen ein. Eine zweite Möglichkeit ist die Aufnahme von Ionen und Makromolekülen aus der Umgebung der Zellen. Dies kann spezifisch über Ionenpumpen (z.B.  $Ca^{2+}$ -Pumpe) oder unspezifisch über Membrankanäle erfolgen. Letztere sind zum Teil über das Zytoskelett direkt an das Zellvolumen gekoppelt (mechanosensitive Membrankanäle [186]). So könnte auch der Einstrom von v.a. ultrafeinen Partikel und Stimulantien wie TBT in die Zellen erleichtert werden. Auf diesen Weg weisen die Ergebnisse der Untersuchungen der synergistischen Effekte von SRM-Partikel und TBT unter VI.5.3 hin, zumal auch in Lymphozyten, die nicht zur Phagozytose fähig sind, die  $Ca^{2+}$ -Reaktion mit der zur Vorinkubation eingesetzten Konzentration von SRM-Partikel korreliert war.

Ähnlich würde sich eine Eindiffusion von Partikel über die Zellmembran auswirken, die durch die Apoptose-induzierende Wirkung von TBT labilisiert wird. Dies ist v.a. bei Granulozyten und Monozyten in Betracht zu ziehen, da bei diesen Zellen, wie unter IV.4.3.1. dargestellt, Apoptose bereits ohne Fremdeinwirkung abläuft.

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Gegen eine allgemeine Gültigkeit der Modelle zur unspezifischen Wirkung von Partikel spricht die Beobachtung, dass diese Effekte nicht bei Zugabe aller Teilchenarten auftreten und sich die in dieser Arbeit untersuchten abiotischen Partikel gemäß ihrer Wirksamkeit in zwei Gruppen aufteilen lassen: In die Gruppe der inerten  $\text{TiO}_2$ -Partikel, die keine signifikanten Effekte in Leukozyten verursachten (mit Ausnahme in den  $\text{PGE}_2$ -Versuchen) und die Gruppe der auf Kohlenstoff basierenden Partikel (EC-, Printex- und SRM-Teilchen), die Reaktionen in den untersuchten Zellen hervorriefen. Im Gegensatz zu Printex- und SRM-Partikel zeigten die beiden Fraktionen der  $\text{TiO}_2$ -Partikel auch keine synergistischen Wirkungen mit Thapsigargin (siehe IV.4.1.2.2.).

Worin diese unterschiedlichen Wirkungen der Partikel begründet liegen, bleibt unklar. Denkbar ist ein Transport von Stimulantien in die Zellen, vermittelt durch die Teilchen-Abhängigkeit von ihrer Oberflächenchemie, oder durch ein unterschiedliches Zerfallen der Partikelagglomerate an der Zellmembran und damit eine Erhöhung der Osmolalität. Beide Ansätze sind aber spekulativ, so dass erst durch zusätzliche Untersuchungen mehr Einsichten gewonnen werden können.

Im Gegensatz zur unspezifischen Wirkung stellt die spezifische Wirkung von Partikel eine Störung von an der Zellmembran ablaufenden Prozessen dar, bedingt durch die Anlagerung von Teilchen an relevante Strukturen der Membranoberfläche (kompetitive Wirkung). Derartige Effekte konnten in den Untersuchungen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Zum Beispiel konnte die Reaktion von Leukozyten auf fMLP durch die vorhergehende Inkubation mit SRM-Partikel nicht beeinflusst werden (siehe IV.5.3.). Andererseits ist jedoch bekannt, dass  $\text{TiO}_2$ -Partikel an Scavenger-Rezeptoren binden, die auch in der Erkennung von apoptotischen Zellen durch Makrophagen eine Rolle spielen [55].

So konnte, wie unter Punkt II.2.2.1. beschrieben für  $\text{TiO}_2$ -,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -,  $\text{SiO}_2$ - und Latex-Partikel mit Hilfe von Blockadeversuchen mit Poly-Inosin-Säure eine Bindung an den Scavenger-A-Rezeptor nachgewiesen werden [51]. Eine Bedeutung dieser Rezeptoren für Rußpartikel wurde bisher noch nicht festgestellt.

$\text{TiO}_2$ -Partikel haben in den Untersuchungen dieser Arbeit keine oder nur schwache Effekte in Leukozyten ausgelöst. Somit ist auszuschließen, dass allein eine über den Scavenger-Rezeptor vermittelte Signaltransduktion für die Effekte der abiotischen Partikel verantwortlich ist. Die Wirksamkeit von EC-, Printex- und SRM-Teilchen muss also andere Ursachen haben. Denkbar wäre eine Involvierung weiterer Rezeptoren. Dies könnte durch eine Konditionierung der Partikel durch im Medium enthaltene Substanzen zustande kommen.

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Für diesen Prozess kommen z.B. Lipopolysaccharide (LPS), die aus der Zellwand von gram-negativen Bakterien stammen, in Betracht. Zwar wurden für die Kultivierung der Zellen und für die Durchführung der Versuche verwendeten Medien vor ihrem Gebrauch sterilisiert. Doch gewährleistet dies nicht, dass die verwendeten Medien völlig LPS-frei sind. LPS könnten sich auf die Oberfläche der verwendeten Partikel anlagern und sie auf diese Weise konditionieren. Leukozyten besitzen einen eigenen Rezeptor für LPS, über den ein Signaltransduktionsweg beschriftet wird, der zu einer Modulation des intrazellulären Calciumgehalts führen kann [187].

Eine weitere Konditionierungsmöglichkeit besteht in Komplement-Proteinen, die über nicht hitzeinaktiviertes Serum in das Medium gelangen können. Auch für diese Proteine haben die Zellen eigene Rezeptoren (CD11b/CD18). Serrander et al. beschreiben die Auslösung des Respiratory Burst in humanen neutrophilen Granulozyten durch inaktivierte Staphylococci, die mit Komplement-Proteinen konditioniert wurden [188].

Somit kann das variierende Vermögen der Partikel, eventuell im Medium enthaltene Stoffe an ihre Oberfläche zu binden, ein ausschlaggebender Parameter sein, um Reaktionen in Zellen auszulösen. Diese Fähigkeit ist von der Oberflächenstruktur und der chemischen Beladung der Teilchen abhängig. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten auf eine derartige Oponierung von Partikel hinweisen, da die Effekte mit zunehmender Komplexität der Oberfläche der Partikel deutlicher werden.

Die chemische Beladung der Teilchen ist von vorrangiger Bedeutung für ihre Wirkung im Zellinneren. Partikel können so als Träger für chemische Substanzen fungieren, die auf diese Weise in die Zellen gelangen und dort ihre Wirkung entfalten. Im Organismus können Substanzen durch die Teilchen in den Bronchialraum transportiert und dort auf der Bronchialschleimhaut oder der Alveolenwand deponiert werden. Durch die Bindung an die Oberfläche der Partikel könnten diese Substanzen länger im Gewebe persistent sein als ungebunden im flüssigen oder gasförmigen Zustand. Diese These stützen Hinweise, dass besonders an die Partikeloberfläche gebundene freie Radikale oder Radikal-generierende Systeme zur Toxizität oder/und zur Fähigkeit einer Zellstimulation durch die Partikel beitragen. Radikale wurden z.B. auf Quarz [189] Asbest [190] und Flugaschen [191] nachgewiesen. Es sind v.a. Verunreinigungen durch Übergangsmetalle, die als Radikal-generierende Systeme in Frage kommen. Die Freisetzung von Radikalen verursacht oxidativen Stress in der Umgebung der Teilchen [192].

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Dies könnte eine Erklärung für die Wirkung von Teilchenspezies sein, die selbst aus relativ inertem Material bestehen, wie z.B.  $\text{TiO}_2$ -Teilchen in den Expositionsversuchen von Oberdörster et al [30]. Letztendlich wäre auch hier die Oberflächenchemie ausschlaggebend für die Fähigkeit der Teilchen, Radikale zu generieren oder zu transportieren. Solche radikalischen Reaktionen könnten auch Grund für die erhöhte Wirksamkeit von Printex-Partikel sein, da diese Teilchen 0,02 % Verunreinigungen durch Übergangsmetalle enthalten, die über eine Fenton-Reaktion Sauerstoffradikale generieren. (Unter einer Fenton-Reaktion versteht man eine Redox-Reaktion, bei der durch die Reaktion von Eisenverbindungen mit Peroxiden Sauerstoffradikale entstehen.) Diesem Mechanismus widersprechen jedoch Beobachtungen von Stone et al [193], nach denen sich die höhere oxidative Potenz der Printex-Teilchen nicht dem Gehalt an Übergangsmetallen oder dem höheren Eisengehalt der Partikel zuordnen ließen. Außerdem konnte bei eigenen Vorversuchen keine direkte Oxidation von DHR123 durch die verwendeten Partikel festgestellt werden (siehe „Ergebnisse und Diskussion“ IV.2.2.). Somit kann mit den Ergebnissen, die in dieser Arbeit gefunden wurden, die These einer Generierung von oxidativem Stress durch auf die Partikel aufgelagerte Radikale nicht bestätigt werden.

Abschließend sei darauf hingewiesen, dass die Analyse der Volumenspektren von drei verschiedenen  $\text{TiO}_2$ -Partikelarten gezeigt hat, dass diese in RPMI-Medium mit 10 % FCS (im Gegensatz zu PBS und RPMI ohne FCS) nahezu gleich große Agglomerate ausbilden. Dadurch könnte auch im Lungenfluid, das auch ein komplexes Medium ist, der Parameter der relativen Oberfläche neutralisiert werden.

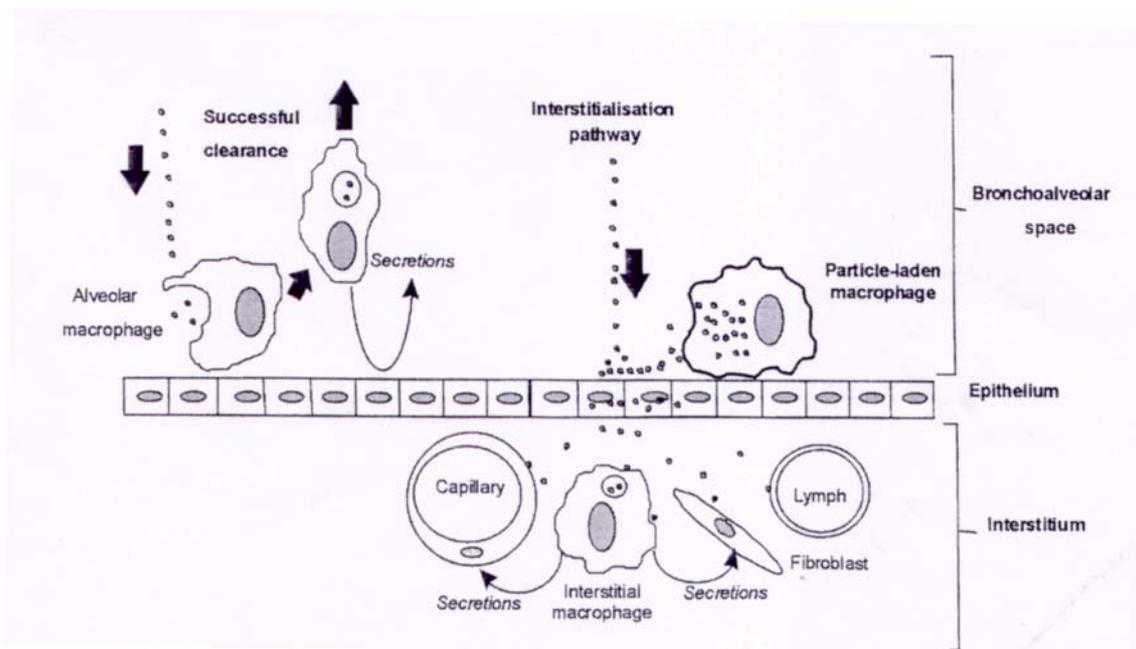
*Zusammenfassend lässt sich aus den Untersuchungen dieser Arbeit schließen, dass die relative Oberfläche zwar verstärkend auf durch Teilchen ausgelöste Effekte wirken kann, aber die Oberflächenbeladung und die Oberflächenstruktur die wichtigeren Parameter für die Wirksamkeit von Partikel auf inflammatorische Zellen sein dürften.*

### 6.3. Bezug der in-vitro-Reaktionen von Partikel zu systemischen Wirkungen

In den in-vitro-Untersuchungen dieser Arbeit haben TiO<sub>2</sub>-Partikel (mit Ausnahme in den Analysen zur intrazellulären PGE<sub>2</sub>-Produktion in Granulozyten) im Gegensatz zu Arbeiten von Oberdörster et al. an Tieren [30] keine signifikanten Effekte gezeigt.

Diese Diskrepanz könnte mit der sogenannten „Overload“-Hypothese erklärt werden, die Ferin et al. [194] vertreten. Nach dieser kommt es vor allem bei ultrafeinen Teilchen, aufgrund ihrer höheren relativen Anzahl, zu einer lokalen Partikelüberladung.

Dies bedeutet, dass die Teilchen in sehr großer Anzahl z.B. in die Lunge gelangen und nicht mehr vollständig von den Phagozyten eliminiert werden können. Auf diese Weise können die Partikel ihren Weg auf das Epithel und bis in das Interstitium finden, wie dies die folgende Abbildung 78 darstellt:



**Abb. 78:** *Elimination von Partikel aus dem Bronchoalveolarraum unter normalen Bedingungen (links) und bei Partikelüberladung (rechts) [aus 195].*

Unter normalen Bedingungen ist die Clearance-Funktion der Alveolarmakrophagen ausreichend, um eine Interaktion zwischen eingedrungenen Partikel und dem Lungenepithel zu vermeiden. Bei einer Partikelüberladung treten Teilchen in größerem Umfang mit dem Lungenepithel in Kontakt und gelangen von dort in das Interstitium, wo sie eingelagert werden (Interstitialisation) und Langzeitwirkungen entfalten können, wenn sie nicht über Interstitialmakrophagen oder Fibroblasten entfernt werden.

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Diese Hypothese würde erklären, warum in den meisten Experimenten dieser Arbeit im Gegensatz zu Tierversuchen, keine erhöhte Wirksamkeit in Bezug auf die spezifische Oberfläche der Partikel festgestellt worden ist. Wenn im Organismen Phagozyten Partikel bis zu einem bestimmten Konzentrationslimit aufnehmen, und die Wirkung der Partikel sich erst bei sehr hohen Partikelzahlen im Epithel und Interstitium manifestiert, kann dies mit dem Zellmodell der Leukozyten nicht untersucht werden. Somit könnte eine kumulative Wirkung der Partikel im Lungenepithel für die erhöhte Wirksamkeit von ultrafeinen Teilchen verantwortlich sein. Dass ultrafeine  $\text{TiO}_2$ - langsamer als feine  $\text{TiO}_2$ -Teilchen aus der Lunge entfernt werden, konnten Ferin und Kollegen an Ratten nachweisen [194].

Auch die methodische Begrenzung auf eine obere Partikelkonzentration von  $32 \mu\text{g/ml}$  könnte sich hier als nachteilig erweisen. Weiterführende Untersuchungen an Epithelzellen (z.B. der Zelllinie A549) könnten zur Bestätigung dieser Hypothese beitragen.

Für die systemische Wirkung der Partikel sind v.a. die Ergebnisse der Untersuchungen zum Respiratory Burst, zur Apoptose und zur intrazellulären  $\text{PGE}_2$ -Produktion von Interesse.

Die Induktion des Respiratory Burst durch schwer degradable Partikel kann zu einer Überproduktion von reaktiven Sauerstoffmetaboliten im Gewebe führen (siehe IV.4.2.2.). Dadurch können Systeme beeinflusst werden, die das Redoxgleichgewicht in den Zellen aufrecht erhalten, wie z.B. das Glutathion-System. Auf diese Weise kann es zur Einschränkung der zellulären Abwehr kommen, wenn zusätzliche Belastungen, z.B. durch Bakterien, auftreten. Des Weiteren kann ein erhöhter Respiratory Burst auch körpereigene Zellen schädigen und zu Gewebeveränderungen führen.

Wie die Ergebnisse in IV.4.3.2. gezeigt haben, sind Partikel in der Lage, die Apoptoserate in Leukozyten zu erhöhen. Dadurch kann die Funktion von inflammatorischen Zellen vorzeitig terminiert und die körpereigene Abwehr nachhaltig geschwächt werden.

Ähnlich wirkt sich die durch Partikel induzierte intrazelluläre Produktion von  $\text{PGE}_2$  aus (siehe IV.4.4.). Hier kommt es durch die Unterdrückung von inflammatorischen Reaktionen zur Herabsetzung der zellulären Abwehr.

*Insgesamt lässt sich aus den Beobachtung dieser Arbeit schließen, dass Partikel die Reaktivität von inflammatorischen Zellen herabsetzen und damit die Abwehr gegen Infektionen nachhaltig stören können.*

### V. Zusammenfassung

Seit den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts ist ein Rückgang der Gesamtmasse der anthropogenen Partikelbelastung in den Industriestaaten zu verzeichnen [3]. Diese Ausstoßreduzierung wird durch verbesserte Verbrennungs- und Filtertechniken erreicht, was allerdings einen erhöhten Anteil der ultrafeinen Teilchenfraktion (Durchmesser  $< 0,1 \mu\text{m}$ ) zur Folge hat. Doch gerade Partikel, die diesem Größenbereich zuzuordnen sind, scheinen eine erhöhte Wirksamkeit bezüglich der Induktion von inflammatorischen Prozessen aufzuweisen, wie einige Arbeiten der letzten Jahre gezeigt haben.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Reaktionen von repräsentativen Abwehrzellen auf eine Auswahl partikulärer Noxen in unterschiedlichen physiologischen Ebenen zu analysieren. Die Untersuchungen betrafen die Signaltransduktion im Rahmen einer inflammatorischen Response (Erzeugung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten, Freisetzung von Prostaglandin  $\text{E}_2$ ), die mitochondrielle Integrität (Mitochondrien-Membranpotential) und Endpunkte der Inflammation (Respiratory Burst, Apoptose).

Als Zellmodell wurden humane Leukozyten aus dem peripheren Blut herangezogen. Durch die Verwendung von durchflusszytometrischen Methoden war es möglich, simultan die Reaktionen von Monozyten, die potentielle Vorläuferzellen von Alveolarmakrophagen darstellen, von Granulozyten, die in bereits etablierten inflammatorischen Prozessen eine wichtige Rolle ausüben, und Lymphozyten, die an spezifischen Mechanismen der Immunabwehr mitwirken, zu messen.

Mit der Auswahl der Partikel wurde versucht, ein breites Spektrum von Teilchen mit unterschiedlichen Größen und variierender Oberflächenchemie und –struktur zu erfassen.

Als chemisch inerte Modellpartikel wurden feine und ultrafeine  $\text{TiO}_2$ -Partikel verwendet. Durch die Nutzung von zwei unterschiedlichen Größenfraktionen des gleichen Materials sollte eine besondere Wirksamkeit von ultrafeinen Teilchen untersucht werden. Als umweltrelevante Partikel wurden folgende Teilchensorten verwendet: Elementarer ultrafeiner Kohlenstoff (EC90), Printex 90 (P90), ein ultrafeiner Kohlenstoff, der als Toner in Laserdruckern verwendet wird und SRM 1650, ein Dieselruß, der unter Standardbedingungen am National Institute of Standards and Technology, USA, hergestellt und charakterisiert wurde.

Als natürlicher Stimulus wurde das Bakterium *Staphylococcus aureus* mit in die Untersuchungen aufgenommen.

$\text{Ca}^{2+}$ -Ionen nehmen eine zentrale Funktion in der Signaltransduktion von Zellen ein und steuern nach ihrer Freisetzung eine Vielzahl von nachfolgenden Reaktionen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Partikel die Konzentration von freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in der Zelle ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) beeinflussen können. So setzten SRM-, Printex-Partikel, sowie *Staphylococci*  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in Granulozyten nach einer Stunde Einwirkzeit signifikant herauf. In Monozyten zeigten nur SRM-Partikel eine deutliche Wirkung, während in Lymphozyten im untersuchten Zeitintervall kein direkter Einfluss auf  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch die untersuchten Partikel festgestellt werden konnte. Synergistische Effekte von Partikeln mit Thapsigargin konnten in Granulozyten und Monozyten nach Vorinkubation mit SRM- und Printex-Partikeln, sowie mit *Staphylococci* nachgewiesen werden. Eine Modulation von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch Partikeln, nach Stimulation mit Thapsigargin, konnte auch in Lymphozyten beobachtet werden. Hier waren es EC-, Printex- und SRM-Partikel, die signifikante Effekte auslösten.

Der Respiratory Burst (RB) ist ein intrazellulärer Reaktionsweg, der zur Produktion von reaktiven Sauerstoffmetaboliten führt, mit denen von Phagozyten ingestierte Fremdkörper durch Oxidationsprozesse zerstört werden. Diese unspezifische Abwehrreaktion erfordert eine exakte Regulation, da sie sich auch gegen eigenes Gewebe richten kann, wie das bei etablierten Entzündungsprozessen der Fall ist. Die Induktion des RB durch nur schwer degradierbare abiotische Partikel könnte diese Regulation nachhaltig beeinflussen. Die Untersuchungen dieser Arbeit haben gezeigt, dass neben *Staphylococci* auch Printex- und SRM-Partikel innerhalb einer Stunde Einwirkzeit die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies in Granulozyten und Monozyten signifikant erhöhen können.

Unter Apoptose versteht man einen physiologischen Prozess, während dessen in Zellen der Zelltod eingeleitet wird, und die Zellen, im Gegensatz zur Nekrose, ohne inflammatorische Reaktionen aus Geweben entfernt werden. Die Apoptose spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und während der Homöostase von Geweben. Da auch inflammatorische Zellen, nach Ausübung ihrer Funktion auf diese Weise eliminiert werden, war es für diese Arbeit von Interesse herauszufinden, welchen Einfluss die verwendeten Partikel auf die Apoptoseraten der untersuchten Zellen haben oder nicht.

Die Signale, die letztendlich zur Degradationsphase der Apoptose in den Zellen führen, können unterschiedlich prozessiert werden. Bei der sogenannten Typ-II-Apoptose sind die Mitochondrien durch die Freisetzung von Cytochrom c mit in die Signalkaskade involviert. Außerdem kann die Beeinflussung der mitochondrialen Integrität nachhaltige Folgen für den Energiehaushalt der Zellen haben. Deshalb wurde die Auswirkung einer Vorinkubation mit SRM-Partikel auf das Mitochondrien-Membranpotential von Lymphozyten untersucht und gefunden, dass in mit Teilchen behandelten Zellen der Prozentsatz von Zellen mit niedrigem Mitochondrien-Membranpotential signifikant höher lag als in der unbehandelten Kontrolle. Daraus kann geschlossen werden, dass SRM-Partikel in der Lage sind, Apoptose vom Typ II in Lymphozyten auszulösen.

Prostaglandin  $E_2$  ist ein Hormon, das inflammatorischen Reaktionen entgegenwirkt. Aus der Untersuchung der  $PGE_2$ -Produktion in Granulozyten geht hervor, dass alle untersuchten Partikel einen Anstieg von  $PGE_2$  in den Zellen induzierten. Das bedeutet, dass die Teilchen generell von den Zellen erkannt werden. Ultrafeine  $TiO_2$ -Partikel riefen dabei stärkere Effekte hervor als feine  $TiO_2$ -Teilchen. Ebenso hoben EC-Partikel die intrazelluläre  $PGE_2$ -Produktion stärker an als die größeren Printex-Partikel. Damit stellen die Untersuchungen zur intrazellulären  $PGE_2$ -Konzentration in dieser Arbeit die einzige Bestätigung für eine größere Wirksamkeit von ultrafeinen gegenüber feinen Partikel dar. Den größten Effekt lösten jedoch die SRM-Teilchen aus. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass Granulozyten über regulative Mechanismen verfügen, um einer Auslösung der Inflammation durch inadäquate Reize, wie inerte Umweltpartikel, entgegen zu wirken.

Um mehr Aufschluss darüber zu erhalten, worin sich die Wirksamkeit der Teilchen begründet, wurden stellvertretend die SRM-Partikel, die sich als am effektivsten erwiesen haben, bezüglich ihres Adsorptionsvermögens und ihrer synergistischen Wirkung mit dem rezeptorvermittelten Stimulans fMLP und dem intrazellulär angreifenden TBT untersucht. Es konnte beobachtet werden, dass SRM-Partikel bereits bei geringen Konzentrationen eine stark adsorptive Wirkung auf den kationischen Farbstoff JC-1 haben. Die Adsorption muss daher generell als Wirkparameter von Partikel mit in Betracht gezogen werden; zumal sie sich z.B. auf die interzelluläre Kommunikation auswirken.

Dagegen konnte bei den Kombinationen des neutralen Stimulans TBT und der SRM-Partikel eine starke Adsorption ausgeschlossen werden kann. Hier wurde eine synergistische Wirkung zwischen TBT und den SRM-Partikel beobachtet, deren Ursache noch unklar ist. Eine mögliche Erklärung sind von den Teilchen ausgehende osmotische Effekte. Wie zu erwarten, erwies sich die Adsorption von Substanzen als abhängig von der Oberflächenchemie der Partikel und von der eigenen Struktur und Größe.

Eine Störung von an der Membran ablaufenden Prozessen durch Partikel (kompetitive Wirkung) konnte bei der Untersuchung des Einflusses einer Vorinkubation mit SRM-Partikel auf die Stimulation von Granulozyten mit fMLP nicht nachgewiesen werden.

Bei den Untersuchungen dieser zellphysiologischen Parameter konnten keine Unterschiede in den Reaktionen der Zellen auf feine oder ultrafeine Teilchen festgestellt werden. Deshalb wurde der Frage nachgegangen, ob die Partikel in Suspension als Einzelpartikel oder als Agglomerate auf die Zellen treffen. Hierzu wurden die Volumenspektren von drei unterschiedlichen TiO<sub>2</sub>-Partikelarten durchflusszytometrisch analysiert, und die Anzahl der in den Agglomeraten gebundenen Einzelpartikel abgeschätzt. Die Ergebnisse weisen auf eine nahezu vollständige Bindung aller Einzelpartikel in Agglomeraten hin. In komplexen Medium (RPMI1650 mit 10 % FCS im Gegensatz zu PBS oder RPMI ohne FCS) konnten zudem für die Agglomerate von feinen und ultrafeinen Teilchen in etwa gleiche Größen ermittelt werden. Da auch das Lungenfluid als komplexes Medium angesehen werden muss, könnte die Größe von Einzelpartikel als Wirkparameter von untergeordneter Wichtigkeit sein. Allerdings ist nicht bekannt, ob die Agglomerate bei Aufnahme in die Zellen erhalten bleiben oder wieder zu Einzelpartikel zerfallen.

Bei einem Vergleich aller Ergebnisse kann bezüglich der Wirksamkeit der Partikel auf die untersuchten Parameter die Reihenfolge „feine TiO<sub>2</sub>-Partikel < ultrafeine TiO<sub>2</sub>-Partikel < EC-Partikel < Printex-Partikel < SRM-Partikel“ aufgestellt werden. Zudem lassen sich die Partikel in zwei Gruppen einteilen: die inerten TiO<sub>2</sub>-Partikel und die effektiven, auf Kohlenstoff basierenden Teilchen (EC-, Printex- und SRM-Partikel). Die beiden Teilchengruppen unterscheiden sich deutlich in ihrer Oberflächenstruktur und – chemie. Die Wirksamkeit von Partikel korreliert also mit ihrer chemischen Komplexität.

Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung der unterschiedlichen beobachteten Effekte ist die Bindung geeigneter Substanzen an die Teilchen aus dem sie umgebenden Medium (Opsonierung) und die daraus folgende Anlagerung der Partikel an spezifische Rezeptoren (z. B. LPS-Rezeptor). Die Fähigkeit zu Opsonierung liegt ebenfalls in der Chemie und Physik der Partikeloberfläche und in ihrer räumlichen Struktur begründet.

*Die erarbeiteten Ergebnisse belegen, dass Partikel Reaktionen in inflammatorischen Zellen hervorrufen und somit inflammatorische Prozesse beeinflussen können. Dies gilt für die Signaltransduktion, wie anhand der Modulation von  $[Ca^{2+}]_i$  ermittelt werden konnte und für regulative Mechanismen, wie die intrazelluläre Produktion von  $PGE_2$ . Des Weiteren greifen Partikel in Endpunkte der Inflammation ein, wie die Untersuchungen des Respiratory Burst und der Apoptose gezeigt haben. Eine erhöhte Wirksamkeit von ultrafeinen Teilchen im Vergleich zu den feinen Teilchen konnte nur bei der Induktion der  $PGE_2$ -Produktion in Granulozyten gezeigt werden. Aus der Gesamtschau der Ergebnisse ergibt sich, dass für die Wirksamkeit von Partikel die chemische Oberflächenbeladung und die Geometrie ihrer Oberflächenstruktur die ausschlaggebenden Faktoren für ihre Wirksamkeit sind. Die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse tragen dazu bei, die Wirkung feiner und ultrafeiner Teilchen auf inflammatorische Zellen einzuschätzen und die ablaufenden Wirkmechanismen aufzuklären.*

### VI. Ausblick

Partikel können Reaktionen in inflammatorischen Zellen auslösen. Dies geschieht in Abhängigkeit von Teilchenart und Zellspezies, wie im Teil IV. „Ergebnisse und Diskussion“ dargestellt worden ist. Die gewonnenen neuen Einsichten könnten durch ergänzende Experimente, die im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr ausgeführt werden konnten, weiter vertieft werden. Diese Experimente sollen im folgenden Ausblick kurz umrissen werden.

Eines der Hauptprobleme dieser Arbeit war die kurze Nutzungsdauer des verwendeten Zellmodells. Hier könnte durch die Verwendung von primären Makrophagen-Zellkulturen Abhilfe geschaffen werden. Allerdings handelt es sich bei diesen um adhärent wachsende Zellen, die in Suspensionsexperimenten zu ähnlichen Schwierigkeiten führen würden, wie sie für die J774A.1-Zelllinie beschrieben wurden. Um die Untersuchungen auf adhärente Zellen ausdehnen zu können, bietet sich die Verwendung eines Laser-Scanning-Cytometers (LSC) an. Dieses erst kürzlich auf den Markt gekommene und in der Arbeitsgruppe Durchflusszytometrie des GSF-Forschungszentrums in Neuherberg zur Verfügung stehende Gerät vereinigt die Vorteile eines Scanning-Mikroskops mit denen eines Durchflusszytometers. Das LSC erlaubt, große Zellpopulationen, die auf Objektträgern kultiviert wurden, zu erfassen und statistisch auszuwerten [196]. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, von den untersuchten Zellen mikroskopische Aufnahmen anzufertigen und die Ergebnisse simultan optisch zu verifizieren. Besonders bei der Untersuchung der durch Teilchen induzierten Apoptose könnten sich weitere interessante Aspekte ergeben.

Wie die Untersuchungen des intrazellulären Calciumgehalts gezeigt haben, sind Partikel in der Lage, die Wirkung von Stimulantien, in diesem Fall Thapsigargin, zu modulieren. Daher ist es sinnvoll, die kombinierte Wirkung von Partikel und Stimulantien auch an weiteren Parametern (Respiratory Burst, Apoptose, Mitochondrien-Membranpotential) zu analysieren.

Die Effekte von Partikel auf das Mitochondrien-Membranpotential wurden in dieser Arbeit nur mit SRM-Teilchen untersucht. Um beurteilen zu können, ob die chemische Beladung oder die relative Oberfläche der Partikel für diese Resultate verantwortlich sind, ist eine Durchführung dieser Experimente mit weiteren Partikelsorten zweckmäßig.

## VI. Ausblick

---

Unter Punkt IV.6.3. wurde angesprochen, dass sich die Effekte der Partikel im Tierversuch aus einer Wechselwirkung der Teilchen mit Epithelzellen ergeben könnten, nachdem die Partikel aufgrund ihrer hohen Anzahl nicht mehr vollständig von den Phagozyten eliminiert werden („Overload-Hypothese“) können. Deshalb wäre es eine sinnvolle Weiterführung der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen, die bisher durchgeführten Experimente mit einer Epithelzelllinie (z.B. A549) zu ergänzen.

Die Untersuchungen der adsorptiven Potenz der Teilchen mit dem Farbstoff JC-1 haben eindrucksvoll gezeigt, dass Partikel einen großen Einfluss auf die wirksame Konzentration von Substanzen in der Umgebung der Zellen haben können. Besonders gravierend könnte sich dies auf die interzelluläre Kommunikation auswirken. Daher wären Experimente, bei denen der PGE<sub>2</sub>-Gehalt in Überständen von Zellsuspensionen nach Zentrifugation mit verschiedenen Teilchenkonzentration gemessen wird, von hoher Aussagekraft.

Der Vergleich der Wirksamkeit verschiedener Partikelarten zeigt, dass die Induktion von Effekten in den Zellen mehr von ihrer Oberflächenbeladung als von ihrer relativen Oberfläche abhängt. Um diesen Sachverhalt noch eingehender zu beleuchten, wäre es konsequent, die Teilchenpalette zu erweitern.

### VII. Experimenteller Teil

#### 1. Material

##### 1.1. Reagenzien

Accutase™	Kat.-Nr. L11-007 Paa Laboratories GmbH, Cölbe
Aceton	Kat.-Nr. A-4206, Sigma, Taufkirchen
Annexin-V-Fluos-Kit	Kat.-Nr. 1828681, Boehringer, Mannheim
Aqua <sub>dest.</sub>	bidestilliertes Wasser aus Reinstwasser-Aufbereitungssystem Milli-Q®
CaCl <sub>2</sub>	Kat.-Nr. C-5080, Sigma, Taufkirchen
DCFH-DA	Kat.-Nr. D-399, Molecular Probes, Leiden, Niederlande
DHR123	Kat.-Nr. D-632, Molecular Probes, Leiden, Niederlande
DMSO	Kat.-Nr. D-5879, Sigma, Taufkirchen
EDTA	Kat.-Nr. E-5134, Sigma, Taufkirchen
Ethanol absolut	Kat.-Nr. 1.00983, Merck, Darmstadt
FcOxyBurst™	Kat.-Nr. F-2902, Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin (fMLP)	Kat.-Nr. A13342, Bachem, Heidelberg
HCl	Kat.-Nr. H-7020, Sigma, Taufkirchen
Heparin	Heparin-Natrium 25000 I.E./ml, Braun, Melsungen
Indo-1-AM	Kat.-Nr. 13261, Sigma, Taufkirchen
JC-1	Kat.-Nr. T-3168, Molecular Probes, Leiden, Niederlande
UltraPure Water	Kat.-Nr. 400000, Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA
NaCl	Kat.-Nr. S-9625, Sigma, Taufkirchen
NaOH	Kat.-Nr. S-0899, Sigma, Taufkirchen
Opsonierungsreagenz für S. aureus	Kat.-Nr. S-2860, Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Pluronic F-127	Kat.-Nr. D-2443, Sigma, Taufkirchen
Polymorphprep™	Kat.-Nr.1001971, Nycomed Pharma, Oslo, Norwegen
Propidiumjodid	Kat.-Nr. D-4170, Sigma, Taufkirchen
Prostaglandin E2 EIA Kit	Kat.-Nr. 514010, Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA
TBT	Kat.-Nr. 22,924-5, Aldrich, MW, USA
Thapsigargin	Kat.-Nr. T-9033, Sigma, Taufkirchen
Trypanblau	Kat.-Nr. T-6146, Sigma, Taufkirchen

### 1.2. Medien und Lösungen

Bis-Tris Base	Kat.-Nr. B 7535, Sigma, Taufkirchen
Bis-Tris-Propan	Kat.-Nr. O 7754, Sigma, Taufkirchen
FCS	Seromed low endotoxin, Kat.-Nr. S 0115, Biochrom KG, Berlin
Hepes-Puffer	Kat.-Nr. H-6903, Sigma, Taufkirchen
Inkubationslösung für das Annexin-V-Fluos-Assay	10 mM Hepes/NaOH, 140 mM NaCl, 5mM CaCl <sub>2</sub> , pH 7,4
L-Glutamin	200 mM, Kat.-Nr. 7513, Sigma, Taufkirchen
Medium für J774A.1- Zellen	RPMI 1640 mit 10 % FCS und 2 mM L-Glutamin
PBS	Dulbecos PBS, pH 7,4, LPS-frei, Kat.-Nr. 14040, Life Technologies, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium	Kat.-Nr. 61870-10, Life Technologies, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium ohne Phenolrot	Kat.-Nr. 32404-022, Life Technologies, Karlsruhe

### 1.3. Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	15 mm Durchmesser, Hecht Assistent, Sondheim
Deckgläschen	33 mm Durchmesser, Hecht Assistent, Sondheim
Filtergaze, Maschenweite 37 µm	Typ 1152, Kat.-Nr. 03-57/24-1020, Bückmann, Wehrheim
Kanüle 0,90 x 40 mm	Venofix®, Braun, Melsungen
Einmal-Küvetten	Kat.-Nr. 297872805, MTB, Gießen
Leichtlaufspritzen 20 ml	Omnifix®, 20 ml, Kat.-Nr. 04617207, Braun, Melsungen
Objektträger	76 x 26 mm, Kat.-Nr. 2407/1, Hecht Assistent, Sondheim
15-ml- Polypropylenröhrchen	Falcon®, BLUEMAX™ Jr., Kat.-Nr. 352096, Becton- Dickinson, NJ, USA
50-ml- Polypropylenröhrchen	Falcon®, BLUEMAX™, Kat.-Nr. 352070, Becton-Dickinson, NJ, USA
Polypropylenröhrchen für die Durchflusszytometrie	Falcon®, Kat.-Nr. 352054, Becton-Dickinson, NJ, USA
Reaktionsgefäße 0,5 ml	Kat.-Nr. 0030121023, Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 0,7 ml	Kat.-Nr. 0030120422, Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Kat.-Nr. 0030120086, Eppendorf, Hamburg
Zellkulturpetrischale	Durchmesser 110 mm, Nunclon™, Kat.-Nr. 150350, Nunc, Wiesbaden
Zellkulturpetrischale	Durchmesser 55 mm, Nunclon™, Kat.-Nr. 150288, Nunc, Wiesbaden

### 1.4. Partikel

PolystyrolatexPartikel Durchmesser 0,5 $\mu\text{m}$	Fluoresbrite Carboxylate Microspheres YG, fluoreszent Kat.Nr. 19507, Polysciences, Warrington, USA
PolystyrolatexPartikel Durchmesser 1,8 $\mu\text{m}$	Fluoresbrite Carboxylate Microspheres YG, fluoreszent 19508, Polysciences, Warrington, USA
Staphylococcus aureus Bioparticles $\text{\textcircled{R}}$ , unlabeled EC90	Kat.-Nr. F-2859, Molecular Probes, Leiden, Niederlande elementarer Kohlenstoff, hergestellt in einem Funkengenerator [229], Durchmesser 90 nm, spezifische Oberfläche 600 $\text{m}^2/\text{g}$
Printex 90	Kohlenstoff-Partikel für die Verwendung als Toner, Durchmesser 90 nm, spezifische Oberfläche 300 $\text{m}^2/\text{g}$ , Verunreinigungen: 0,02 Vol. % Metalle und 0,7 - 1,0 Vol. % organische Verbindungen, Kat.-Nr. 25.10680000, Degussa, Frankfurt
SRM	Standard Reference Material 1650, Dieselmotoren-Ruß, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA, <a href="http://ois.nist.gov/srmcatalog/certificates/view_cert2.cfm?certificate=1650">http://ois.nist.gov/srmcatalog/certificates/ view_cert2.cfm?certificate=1650</a>
TiO <sub>2</sub> ultrafein	Durchmesser 21 nm, spezifische Oberfläche 50 $\text{m}^2/\text{g}$ , Kat.-Nr. 23.8595, Degussa, Frankfurt
TiO <sub>2</sub> fein	Durchmesser 250 nm, spezifische Oberfläche 6,5 $\text{m}^2/\text{g}$ , Kat.-Nr. T-315, Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA

### 1.5. Geräte

Autoklav	Typ GVA 4.6, Gössner, Hamburg
Brutschrank	Modell 3862, Labotect, Göttingen
Durchflusszytometer (Sorter)	FACStarPlus, Becton-Dickinson, Mountain View, USA
iEMS-Reader	Fluoroscanner II, Labsystems, Marburg
Konfokales Laser Scanning Mikroskop	CLSM 510, Zeiss, Jena
Laborschüttler	Vibrofix VFZ, Kat.Nr. 9.730.002, Kleinfeld, Hannover
Laborzentrifuge	Megafuge 1.0, Haereus, München
Laborzentrifuge	Typ 6K15, Sigma, München
Lumineszenzspektrometer	LS 50 B, Perkin-Elmer, Überlingen
Reinstwasser- Aufbereitungssystem	Milli-Q $\text{\textcircled{R}}$ , Kat.-Nr. ZFMQ 240 04, Millipore, Eschborn
Schüttel-Wasserbad	Kat.-Nr. 9.906242, Köttermann, Hannover
Thermostat	Typ F 10-C, Kat.-Nr. 8511177, Julabo, Seelbach
Zählkammer	nach Neubauer, Hecht Assistent, Sondheim

### 2. Zellkultur

#### 2.1. Vitalitätstest

Die Vitalität aller verwendeten Zellen wurde mit Trypanblau getestet. Trypanblau ist ein Farbstoff, der erst dann in die Zelle eindringen kann, wenn die Zellmembran stark geschädigt ist. Für diesen Test wurde eine Standard-Trypanblau-Lösung im Verhältnis 1:1 mit der Zellsuspension vermischt und 5 min inkubiert. Danach wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer im Durchlichtmikroskop ausgezählt, und so der prozentuale Anteil geschädigter Zellen an der Gesamtzellzahl ermittelt.

#### 2.2. Jurkat-Zellen

Die Zelllinie wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen in Braunschweig unter der Bezeichnung ACC282 bezogen.

Jurkat-Zellen wachsen einzeln oder in kleinen Verbänden in Suspension. Als Kulturmedium wurde RPMI-1640-Medium verwendet, dem als Supplemente 10 % fötales Kälberserum (FCS) und 2 mM L-Glutamin zugesetzt wurden. Eine Zugabe von Antibiotika erfolgte nicht. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90 % und einem CO<sub>2</sub>-Anteil von 5 % kultiviert. Die Zellen wurden alle drei Tage in einem Verhältnis von 1:3 verdünnt.

#### 2.3. J774A.1-Zelllinie

Die J774A.1-Zelllinie wurde ursprünglich von der American Tissue Culture Collection (Manassas, Virginia, USA) unter der Katalog-Nr. TIB-67 bezogen und freundlicherweise von Hrn. Dr. K. Maier (Institut für Inhalationsbiologie an der GSF, Neuherberg) zur Verfügung gestellt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Einweg-Petrischalen in RPMI-1640-Medium mit 10 % FCS. Auf den Einsatz von Antibiotika wurde verzichtet.

Die J774A.1-Zelllinie wurde alle vier Tage passagiert. Dazu wurden in die Petrischalen jeweils 5 ml Accutase™-Lösung gegeben, und die Zellen zur Lösung ihrer Haftung vom Untergrund ca. fünf Minuten inkubiert. Die endgültige Ablösung der Zellen erfolgte durch Abspritzen mit einer Pipette. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 10<sup>5</sup> ml<sup>-1</sup> in 25 ml Medium neu ausgesät und im Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C und in einer Atmosphäre von 5 % CO<sub>2</sub> weiterkultiviert. Für Versuche wurden die Zellen wie oben beschrieben abgelöst und mit Trypanblau auf ihre Vitalität geprüft.

Für die Experimente mit dem Laser-Scanning-Mikroskop wurden die Zellen auf Deckgläsern (Durchmesser von 30 mm) kultiviert. Dazu wurden die Deckgläser mit Ethanol (80 %) sterilisiert und in Petrischalen ausgelegt. Anschließend wurden die Deckgläser mit Zellsuspension überschichtet ( $10^5$  Zellen/ml) und zwei Tage im Brutschrank (unter den oben genannten Bedingungen) inkubiert.

Zur Lagerung wurden die Zellen in einer Konzentration von  $3 \times 10^6$  ml<sup>-1</sup> in eine Lösung von FCS mit 10 % DMSO gegeben und im flüssigen Stickstoff eingefroren.

### 2.4. Leukozytenisolation aus Vollblut

Um die Leukozyten in möglichst unstimuliertem Zustand aus Vollblut zu isolieren, wurde folgendes Protokoll angewandt:

In sterile Leichtlaufspritzen (Fassungsvermögen 20 ml, Kanüle 0.90 x 40 mm, Braun) wurde 0,5 ml Heparin (Heparin-Natrium 25000 I.E./ml, Braun) vorgelegt und anschließend eine neue Kanüle aufgesteckt. Dann wurden aus der Armvene der Probanden 20 ml Blut entnommen. Es ist dabei sehr wichtig, dass die Blutentnahme langsam und der Transport der Spritzen möglichst erschütterungsfrei erfolgte, da eine unsachgemäße Behandlung hier zu einer Vorstimulation der Zellen führen kann.

In einem 15ml-Zentrifugengefäß (Blue Max™ Jr. Polypropylene-Tubes, Falcon) wurden jeweils 5 ml Gradientenlösung (Polymorphprep™, Nycomed) mit 5 ml Blut vorsichtig überschichtet und 30 min bei 400 g (1500 UpM, Megafuge 1.0, Heraeus) abzentrifugiert. Um die Schichten des Gradienten am Ende der Trennung nicht erneut zu durchmischen, wurde die Bremse der Zentrifuge deaktiviert. Das Schema in Abbildung 79 gibt den Gradienten vor und nach der Zentrifugation wieder:

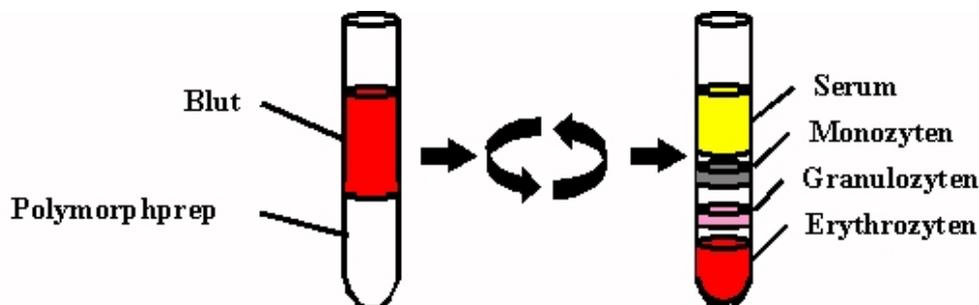


Abb. 79: Isolationsgradient vor und nach der Zentrifugation

Mit einer 5ml-Pasteurpipette wurde der Bereich zwischen den Erythrozyten und dem Serum entnommen.

Da sich die Monozyten sehr dicht unter dem Serum befinden, wurde etwas Serum mit aufgenommen und das Ganze in ein 50ml-Zentrifugengefäß überführt. Anschließend wurde mit halbkonzentriertem RPMI1640 (ohne  $\text{Ca}^{2+}$ , ohne Phenolrot und ohne FCS) auf 40 ml aufgefüllt. Nach einer viertelstündigen Zentrifugation (mit Bremse) bei 174 g wurde der Überstand abdekantiert.

Zur Lyse von übernommenen Erythrozyten wurde das Pellet in 20 ml  $\text{Aqua}_{\text{bidest}}$  gegeben und mit einer 5ml-Pipette genau 1 min (Stoppuhr !) resuspendiert. Um wieder eine isotonische Umgebung herzustellen, wurde mit 1,8-%iger NaCl-Lösung auf 40 ml aufgefüllt und dann die Zellsuspension vorsichtig durch Kippen gemischt. Darauf schloss sich eine erneute Zentrifugation (10 min bei 174 g Megafuge 1.0, Heraeus) an. Der Arbeitsschritt zur Lyse der Erythrozyten wurde wiederholt, falls das Pellet nach der Zentrifugation noch eine rötliche Färbung aufwies.

Das Pellet wurde in 5 ml RPMI1640 (mit FCS) resuspendiert, und die Zellkonzentration gemessen. Die Lagerung der isolierten Zellen erfolgte bei Raumtemperatur und im Dunkeln.

### 2.5. Filtration und Lagerung der Zellen für die Verwendung im Durchflusszytometer

Vor der Verwendung im Durchflusszytometer wurden die Zellsuspensionen durch ein Gazefilter mit der Maschenweite 37  $\mu\text{m}$  gefiltert. Die Lagerung der Zellen erfolgte, wenn nicht in den einzelnen Arbeitsprotokollen anders vermerkt, bei Raumtemperatur im Dunkeln.

## 3. Partikel und Stimulantien

### 3.1. Partikel

Die verwendeten Partikelarten wurden bereits im Kapitel 4 der Methodischen Grundlagen beschrieben. Die SRM-Partikel stellte freundlicherweise Hr. Prof. Dr. Nießner (Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie der TU München) zur Verfügung. Die  $\text{TiO}_2$ -, EC- und Printex-Teilchen wurden dankenswerterweise von Hrn. Dr. Kreyling (Institut für Inhalationsbiologie der GSF) bereit gestellt.

### 3.1.1. Präparation der Partikel

#### 3.1.1.1. TiO<sub>2</sub>-, EC-, Printex- und SRM-Teilchen

Von den TiO<sub>2</sub>-, EC-, Printex- und SRM-Teilchen wurden alle zwei Wochen Stammlösungen der Konzentration 1 mg/ml in PBS erstellt. Diese wurden im Autoklaven (2 x 10<sup>5</sup> Pa, 121 °C, 20 min) sterilisiert und vor den Versuchen 30 min im Ultraschallbad behandelt. Die Versuchszugaben wurden direkt aus den Stammlösungen entnommen oder bei Bedarf über Zwischenverdünnungen erstellt.

#### 3.1.1.2. Staphylococcus aureus

Um ihre Wirksamkeit zu erhöhen, wurden die Bakterien opsoniert, d.h. mit polyklonalen Anti-S. aureus-Antikörpern aus Kaninchen inkubiert. Dazu wurden 30 µl des bereits fertigen „Bioparticles opsonizing reagent“, das die Antikörper enthält, in 0,5 ml Aqua<sub>bidest</sub> verdünnt. Anschließend wurden 10 mg Staphylococci abgewogen und in 0,5 ml Aqua<sub>bidest</sub> suspendiert. Die Suspension und die das „Opsonizing Reagent“ enthaltende Lösung wurden daraufhin zu gleichen Teilen vermischt und 1 h bei 37°C inkubiert. Die opsonierten Bakterien enthaltende Suspension wurde nach ihrer Fertigstellung im Autoklaven sterilisiert (2 x 10<sup>5</sup> Pa, 121 °C, 20 min) und drei Wochen verwendet. Für die Experimente wurden 50 µl aus der gerade beschriebenen Suspension entnommen und in ein Eppendorf-Gefäß (Cup) mit 1,5 ml PBS gegeben. Um die Staphylococci zu dispergieren, wurden sie im Cup eine Minute auf einem Schüttelblock durchmischt und dann 30 min lang im Ultraschallbad behandelt.

Nach zweimaligem Waschen und anschließender Resuspendierung in PBS wurde die Konzentration der Bakterien mit Hilfe einer Zählkammer eingestellt. Für die Versuche wurden die Konzentrationen so gewählt, dass sich ein Bakterien/Zell-Verhältnis von 100:1 ergab.

### 3.1.2. Konzentration und Expositionszeiten der Partikel

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Partikel in einer Konzentration von 32 µg/ml verwendet. Staphylococci wurden in einem Bakterien-Zell-Verhältnis von 100:1 zugegeben. Eine Partikelkonzentration von 32 µg/ml war die höchste Konzentration die im Durchflusszytometer eingesetzt werden konnte, da bei Anwendung höherer Konzentrationen die Gefahr eines Verstopfens der Düse durch Partikelagglomerate zu hoch wurde.

Die Expositionszeiten der Zellen mit den Partikel betrug in allen Experimenten 50 min, wenn nicht anders vermerkt.

### 3.2. Stimulantien

#### 3.2.1. TBT

TBT wurde als Stammlösung mit einer Konzentration von 20 mM in Ethanol<sub>abs</sub> angesetzt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C. Für die Versuche wurde die Stammlösung ebenfalls mit Ethanol<sub>abs</sub> herunterverdünnt. Die Endkonzentration in den Zellsuspensionen während der Messungen betrug, wenn nicht anders angegeben, 3 µM zur Stimulierung der Leukozyten und 1 µM zur Auslösung von Testreaktionen der verwendeten Zelllinien.

#### 3.2.2. fMLP

fMLP wurde als Stammlösung mit einer Konzentration von 10 mM bei – 20 °C gelagert. Um die Stammlösung herzustellen, wurden 10 mg fMLP in 2,285 ml DMSO gelöst. Für die Experimente wurde fMLP mit PBS auf die gewünschte Versuchskonzentration herunterverdünnt. Als Endkonzentration in den Versuchen diente meist eine Konzentration von 100 nM.

#### 3.2.3. Thapsigargin

Thapsigargin wurde als 1 mM Stammlösung in Ethanol<sub>abs</sub> angesetzt und bei 4 °C gelagert. In den Experimenten betrug die Versuchskonzentration 100 nM.

## 4. Fluoreszenzfärbungen

### 4.1. Arbeitsprotokoll zur Indo-1-AM-Färbemethode

Zur Lagerung wurde der gelieferte Indo-1-Ester (Indo-1-AM, 1 mg) in 1,25 ml Aceton gelöst und jeweils 25 µl der Lösung in 0,7 ml -Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben. Anschließend wurden die nicht verschlossenen Cups 30 min in ein mit N<sub>2</sub> begastes Gefäß gestellt, um das Aceton zu verdunsten. Die Cups wurden hierauf in der Stickstoffatmosphäre verschlossen und bei – 20 °C gelagert.

Für die Färbung der Zellen wurde der Farbstoff eines Cups in einer Mischung aus 20  $\mu\text{l}$  DMSO und 20  $\mu\text{l}$  DMSO/Pluronic (hergestellt aus DMSO und Pluronic im Verhältnis 3:1; Pluronic ist ein Detergens, das das Eindringen von Indo-1-AM in die Zellen erleichtert) gelöst.

Der Inhalt eines Cups wurde in 4 ml Zellsuspension ( $10^6$  Zellen/ml) gegeben (Farbstoffkonzentration: 5  $\mu\text{M}$ ) und die Zellen bei 37°C und 5 %  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre über einen Zeitraum von 25 min gefärbt. Als Medium wurde RPMI1640 ohne Phenolrot benutzt, das üblicherweise Medien als pH-Indikator zugesetzt wird. Um Wechselwirkungen mit den verwendeten Farbstoffen zu vermeiden, wurde bei den vorliegenden Färbungen auf diesen Indikator verzichtet. Nach der Färbung wurden die Zellen durch zweimalige Zentrifugation (bei 175 g) gewaschen und auf eine Endkonzentration von  $0,5 \times 10^6$  Zellen verdünnt. Zur Lebend/Tod-Diskriminierung der Zellen wurden die fertigen Verdünnungen mit 3  $\mu\text{g/ml}$  Propidiumiodid versetzt. Die Lagerung der Zellen bis zur Messung bei Raumtemperatur und im Dunkeln erwies sich als notwendig zum Erhalt der Zellaktivität. Zur Messung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurden beladenes und unbeladenes Indo-1 mit einem Argon-Laser angeregt, der ultraviolettes Licht der Multilinen 351,1 – 363,8 nm emittiert. Die violetten und grünen Fluoreszenzsignale der beiden Indo-1-Zustände wurden mit Hilfe eines Stahlteilers (LP 430 DC) separiert und über zwei Bandpass-Filter (395/25 nm (395BP25) und 530/30 nm (530BP30)) aufgezeichnet.

### 4.2. Arbeitsprotokoll für die Färbung mit DHR123

Um eine Stammlösung mit einer Konzentration von 40 mM zu erhalten, wurden 10 mg Dihydrorhodamin 123 in 722  $\mu\text{l}$  DMSO gelöst. Die Stammlösung wurde lichtgeschützt bei – 20 °C gelagert. Die Verdünnungen für die Versuche erfolgten ebenfalls in DMSO.

Vor der Färbung wurden die Zellen auf ihre Endkonzentration von  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml verdünnt und bei 37 °C 5 min vorgewärmt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 15  $\mu\text{M}$  DHR 123 in RPMI1640 (ohne Phenolrot) für 15 min bei 37°C im Schüttelbad. Die gefärbte Suspension wurde unmittelbar nach der Inkubation ohne Waschen verwendet. Die R-123-Emissionen wurden mit einem 530-nm-Bandpassfilter (530BP30) und die PI-Emissionen mit einer Kombination aus zwei Langpassfiltern (550 nm (KV550) und 590 nm (OG590)) aufgezeichnet, nachdem die Signale über einen dichroitischen Strahlteiler (DM560) getrennt worden waren.

### 4.3. Arbeitsprotokoll für den Phagozytosenachweis mit FcOxyBurst™

Das FcOxyburst™-Assay besteht aus Kälber-Serum-Albumin (BSA), an das H<sub>2</sub>DCF gebunden ist und das mit gereinigten polyklonalen anti-BSA-IgG-Antikörpern aus dem Kaninchen komplexiert wurde. Auf diese Weise entstehen Immun-Komplexe, die an die F<sub>c</sub>-Rezeptoren der Zellen binden und anschließend phagozytiert werden.

In den Zellen wird das nichtfluoreszente H<sub>2</sub>DCF zu grün fluoreszierenden DCF oxidiert, wie dies unter Punkt III.1.2.3. der Methodischen Grundlagen beschrieben ist. Der Assay wurde in einer Konzentration von 3,0 mg Protein pro ml in PBS geliefert. Vor ihrer Verwendung wurde die Proteinlösung 15 min im Ultraschallbad behandelt, um eventuelle Agglomerate zu lösen. Für die Phagozytostests mit J774A.1-Zellen wurden 200 µg/ml Protein eingesetzt, d.h. 33 µl aus der fertigen Lösung. Die Detektion der in die Zellen aufgenommenen Farbstoffkomplexe erfolgte am konfokalem Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) nach Anregung mit einem 488-nm-Argon-Laser mit einem 530-nm-Bandpassfilter (530/30).

### 4.4. Arbeitsprotokoll zum Annexin-V-Fluos-Assay

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente wurde das Annexin-V-Fluos-Kit von Boehringer (Mannheim) verwendet. Für die Färbung wurde eine Markierungslösung erstellt, die sich wie folgt zusammensetzt: 20 µl Annexin-V-Fluos-Lösung und 20 µl Propidiumiodid-Lösung (50µg/ml in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>) in 1000 µl Inkubationspuffer (10 mM Hepes/NaOH, 140 mM NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4).

Es wurden pro Messung 10<sup>6</sup> Zellen bei 175 g über einen Zeitraum von 5 min abzentrifugiert und in 100 µl Annexin-V-Fluos-Markierungslösung resuspendiert. Die Inkubationszeit betrug 15 min bei 37 °C. Ohne erneutes Waschen wurden dann weitere 150 µl Inkubationspuffer zugegeben und die Probe sofort gemessen. Dabei wurden jeweils 30000 Zellen im Durchflusszytometer registriert. Die Signalerfassung erfolgte mit dem gleichen Filtersatz, der für die Detektion der Signale der R-123- und PI-Emissionen verwendet worden war und unter Punkt 4.2. beschrieben ist.

### 4.5. Arbeitsprotokoll für die JC-1-Färbemethode

JC-1 wurde als Stammlösung mit einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  in Ethanol<sub>abs</sub> lichtgeschützt bei 4 °C gelagert. Die Stammlösung musste alle vier Wochen neu hergestellt werden. Für die Färbung der Zellen betrug die Versuchskonzentration 2,5  $\mu\text{M}$ . Dazu wurde die Stammlösung in PBS verdünnt. Die Zellen wurden 15 Minuten in einem Schüttelbad bei 37 °C gefärbt und anschließend ohne weiteren Waschschrift für die Versuche verwendet. Der Filtersatz zur Erfassung der Emissionssignale wurde in Punkt 4.2 beschrieben.

Für die Aufnahmen im CLSM wurde die grüne Fluoreszenz der Monomere mit einem 530-nm-Bandpassfilter (BP 530 – 550) und die Signale der J-Aggregate mit einem 560-nm-Langpassfilter (LP 560) aufgezeichnet.

## 5. Nachweis von PGE<sub>2</sub>

### 5.1. Vorbereitung der Zellen

Humane Granulozyten ( $10^6$  Zellen/ml) wurden nach dem Standard-Protokoll (siehe Punkt 2.3) isoliert und über einen Zeitraum von 1 h mit Partikel (32  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) bei 37 °C in PBS (pH 7, mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  und 0,1 % Glucose) inkubiert. Die Inkubation endete mit einem Zentrifugationsschritt (10 min bei 400 g). Nach Resuspendierung des Zellpellets wurde zur Eiweißfällung die Zellsuspension mit einer 90-prozentigen methanolischen Lösung (pH 7,4), die 0,5 mM EDTA und 1 mM HTMP (4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl) enthielt, im Verhältnis 1:9 versetzt und 24 h bei – 40 °C gelagert. Anschließend wurde die Suspension mit 10000 g bei 0 °C für 20 min zentrifugiert, um das Proteinsediment aus der Lösung zu entfernen. Dieser Schritt musste nach erneuter 24-stündiger Lagerung bei – 40 °C wiederholt werden. Aus den gewonnenen methanolischen Lösungen wurden Aliquote in einer Vakuumzentrifuge eingengt und für die Bestimmung des PGE<sub>2</sub>-Gehalts verwendet, welcher mit Hilfe eines Enzym-Immunoassays (EIA) durchgeführt wurde.

### 5.2. Durchführung des Enzym-Immunoassays

Die PGE<sub>2</sub>-Bestimmungen ließen sich mit dem Prostaglandin-E<sub>2</sub> EIA Kit von Cayman (Cayman, Ann Arbor, USA) durchführen, in dem alle für die Untersuchungen benötigten Reagenzien (mit Ausnahme des UltraPure Water) enthalten waren. Das UltraPure Water kann über den gleichen Lieferanten bezogen werden.

Das EIA-Puffer-Konzentrat wurde im Verhältnis 1:9 in UltraPure Water gelöst. Für eine benötigte Waschpufferlösung wurden 625 µl des im Kit enthaltenen Konzentrats in 250 ml UltraPure Water gelöst und mit 125 µl Tween 20 (ebenfalls im Kit enthalten) versetzt. Zum Ansetzen des PGE<sub>2</sub>-Acetylcholinesterase-Tracers und der monoklonalen Antikörper gegen PGE<sub>2</sub> wurden die beiden Aliquote in jeweils 6 ml EIA-Puffer gelöst.

Die Inkubationen und die Messungen wurden in einer 96-Well-Mikrotiter-Platte durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine Polyethylen-Platte mit 96 Vertiefungen („Wells“). Vor ihrer Verwendung wurde die Platte einmal mit Wasch-Puffer gewaschen und getrocknet. Anschließend erfolgte die Beschickung der Platte mit den vorbereiteten Reagenzien und Proben.

Für die Auswertung müssen zwei leere Wells („Blanks“: B) um die nichtspezifische Bindung zu erfassen („Non-specific Binding“: NSB) und zwei Wells für die maximale Bindekapazität (B<sub>0</sub>) auf der Platte enthalten sein.

Um den PGE<sub>2</sub>-Gehalt der Proben zu ermitteln, wurden deren Werte mit denen einer Standard-Konzentrationskurve verglichen, die anhand eines im Kit enthaltenen PGE<sub>2</sub>-Standards erstellt worden ist. Dabei wurden, ausgehend von einer Lösung von 10 ng/ml, durch Verdünnung mit EIA-Puffer PGE<sub>2</sub>-Standards angefertigt, die eine PGE<sub>2</sub>-Endkonzentration von 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,5, 15,6 und 7,8 pg/ml in den Wells der Platte aufwiesen. Dazu wurden pro Well 50 µl der Standardproben einpipettiert.

Von den zu untersuchenden Proben wurden ebenfalls jeweils 50 µl in die Wells eingebracht.

Dann wurden alle Wells mit 50 µl PGE<sub>2</sub>-Acetylcholinesterase-Tracer (außer B-Wells) und 50 µl der Lösung mit den monoklonalen Antikörpern gegen PGE<sub>2</sub> (außer den B- und den NSB-Wells) versetzt, und die Platte nach Abdeckung mit einem Plastik-Film 18 Stunden bei 4 °C inkubiert. Wie unter Punkt III. 2.2. der Methodischen Grundlagen beschrieben wurde, wird in diesem Immunoassay Ellmans Reagenz zur Farbentwicklung in den Wells benutzt.

Da Ellmans Reagenz lichtempfindlich ist, wird es erst unmittelbar vor seiner Verwendung angesetzt. Hierzu wurde das im Kit enthaltene Konzentrat in 40 ml UltraPure Water in einem, mit Alufolie lichtdicht umschlossenen, 50 ml-Falcon-Röhrchen gelöst. Vom Ellmans Reagenz wurden jeweils 200 µl in die Wells gegeben, nachdem die Platte fünf mal mit Waschpuffer (jeweils 200 µl pro Well) gewaschen und auf saugfähigem Papier trockengeklopft wurde. Unmittelbar nach Zugabe von Ellmans Reagenz wurde die Platte in den iEMS-Reader eingebracht, 1,5 h unter Schütteln entwickelt, die Farbabsorption gemessen und anschließend durch den, dem Reader nachgeschalteten Computer ausgewertet.

### 5.3. Auswertung der ermittelten Daten

Aus den ermittelten relativen Absorptionen wurden die arithmetischen Mittelwerte bestimmt. Von diesen wurden die NSB-Mittelwerte subtrahiert. Hierauf wurden alle Werte durch den korrigierten  $B_0$ -Wert (maximal mögliche Bindung) dividiert und mit 100 multipliziert.

Hieraus ergibt sich der Prozentwert des Verhältnisses aus der Bindung der einzelnen Proben zur maximal möglichen Bindung:

$$B/B_0 [\%] = \frac{(\bar{X}_{\text{Probe}} - \bar{X}_{\text{NSB}})}{(\bar{X}_{B_0} - \bar{X}_{\text{NSB}})} \cdot 100 [\%]$$

Den im Kit enthaltenen Standard-Konzentrationen wurden die so ermittelten Prozentwerte zugeordnet und daraus eine Eichkurve erstellt, aus der die  $\text{PGE}_2$ -Konzentrationen der unbekanntenen Proben abgelesen werden konnten (siehe Abbildung 63).

## 6. Geräte

### 6.1. Durchflusszytometrie

#### 6.1.1. FACStar<sup>Plus</sup>

Für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen durchflusszytometrischen Messungen wurde ein Zellsorter des Typs „FACStar<sup>Plus</sup>“ (Becton Dickinson, Mountain View, USA) verwendet. Dieses Zytometer ist mit zwei Argon-Lasern (Coherent, Dieburg, Deutschland) ausgestattet. Einer dieser Laser (Innova 90, 1000 mW) emittiert Licht im sichtbaren Bereich (488 nm).

## VII. Experimenteller Teil

Der zweite Laser (Innova 100, 500 mW) dient zur Generierung ultravioletten Lichts (Multilinien: 351,1 – 363,8 nm). Das Gerät verfügt über eine Fotodiode zur Erfassung des Vorwärtsstreulichts (FSC), sowie über fünf Fotomultiplier für das Seitwärtsstreulicht (SSC) und vier Fluoreszenzwellenlängen (FL1 - FL4).

### 6.1.2. Optische Filter

Um die verschiedenen Fluoreszenz- und Streulichtsignale in den durchflusszytometrischen Messungen zu detektieren, musste eine Reihe unterschiedlicher optischer Filter eingesetzt werden.

Die folgende Tabelle zeigt eine Auflistung aller verwendeten Filter und Strahlteiler:

Filter.	Hersteller:
Bandpassfilter 488 nm, 488 BP 10	Becton-Dickinson, Sunnyvale, CA, USA (BD)
Bandpassfilter 530 nm, 530 BP 30	Schott, Mainz
Langpassfilter 550 nm, KV 550	Schott, Mainz
Langpassfilter 590 nm, OG 590	Schott, Mainz
Lang Pass Beam Splitter LP 430 DC	BD
Bandpassfilter 395 nm, 395 BP 25	BD
Beam Splitter DM 560	BD

*Tab. 9: Übersicht über die im Durchflusszytometer verwendeten optischen Filter.*

Die FSC- und SSC-Signale wurden unter Verwendung von 488-nm-Bandpassfiltern (488 BP 10) aufgenommen. Die zusätzlich eingesetzten Filter sind in den Beschreibungen der einzelnen Färbemethoden explizit aufgeführt.

### 6.1.3. Thermostat und Einspritzkopf (für Probenröhrchen)

Temperatur, Regulierung und Stabilität sind essentielle Voraussetzungen für die Analyse von kinetischen Parametern in lebenden Zellen. Zur Temperaturkontrolle ( $\pm 0,1$  °C) und zur unterbrechungsfreien Einbringung von Stimulantien (auch mehrfach pro Messlauf möglich) wurde ein in der Arbeitsgruppe Durchflusszytometrie entwickelter Probenröhrchenhalter [199] verwendet, wie er in der Abbildung 80 dargestellt.

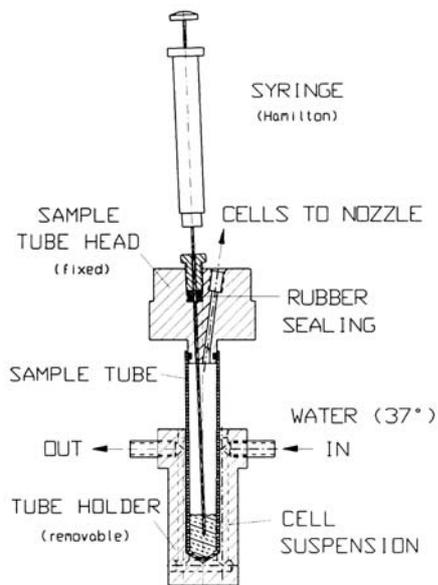


Abb 80: Thermostat und Einspritzkopf für Probenröhrchen des Zytometers (aus [197]).

Die Einbringung von Stimulantien während der kinetischen Messungen konnte unterbrechungsfrei durch die Verwendung von speziell gefertigten Hamilton-Spritzen erfolgen. Das wesentliche Element dieser Vorrichtung ist ein Septum, welches einerseits mit der Hamilton-Spritze durchstoßen werden kann und andererseits dem Überdruck von 100 hPa im Probenröhrchen standhält.

### 6.1.4. Erfassung und Auswertung der Daten

Zur Erfassung der Messimpulse, die nach der elektronischen Umwandlung der Photomultiplier-Signale vom Zytometer geliefert werden, wurde ein HP-Computer der Serie 3000 (Hewlett-Packard, Covallis, OR, USA) benutzt, der mit der „Lysis II™-Software (Becton Dickinson, Mountain View, USA) ausgestattet war. Die im sogenannten „Listmode-Files“ zwischengespeicherten Daten wurden nach Abschluss der jeweiligen Messserien mit Hilfe der FASTnet™-Software (Becton Dickinson, Mountain View, USA) auf einen MS-DOS-kompatiblen Server übertragen und mit dem Auswerteprogramm DAS V4.40 [150] bearbeitet. Für die Auswertung der Daten wurden mit dem DAS-Analyseprogramm eigens für die jeweiligen Experimentarten spezielle Dateien („Makros“) erstellt. Für die Experimente, die nach der Ratio-Methode (Indo-1-AM, JC1-1) ausgewertet wurden, wurden die Daten der beiden ins Verhältnis zu setzenden Signale der List-Mode-Files zuerst mittels eines Makros durch den errechneten numerischen Quotienten ersetzt. Als erster allgemeiner Schritt für alle Analysen wurden interaktiv die notwendigen Gates gesetzt.

Abschließend wurden mit Hilfe einer weiteren Standardroutine die Mittelwerte, Standardabweichungen und Prozentanteile der reagierenden Zellen berechnet. Zum Teil wurden zusätzlich Auswertungen für bestimmte Zeitintervalle vorgenommen.

### 6.2. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die in dieser Arbeit gezeigten Bilder wurden in einem Laser-Scanning-Mikroskop vom Typ CLSM 510 der Firma Zeiss, Jena aufgenommen. Dieses basiert auf einem inversen Lichtmikroskop (Axiovert 100 M, Zeiss, Jena), das über spezielle Epifluoreszenzoptik und einen dazu passenden Filtersatz verfügt. Als Lichtquellen dienen optional drei Laser (Ar 458/488/514 nm, 25 mW; HeNe 543 nm, 1 mW und HeNe 630 nm, 5 mW).

Zudem kann an diesem CLSM gewöhnliche Transmissions-Mikroskopie mit einer Quecksilber-Dampf-Lampe als Anregungsquelle durchgeführt werden.

Die Bildverarbeitung erfolgt über die auf das Gerät abgestimmte Computer-Software (LSM 510 Software Version 2.01, Zeiss, Jena). Die Nachbearbeitung der Bilder wurde mit Adobe Photoshop<sup>TM</sup> 5.0 durchgeführt.

### 6.3. Spektralfluorometrie

Für die spektralfluorometrischen Messungen wurde ein Lumineszenzspektrometer vom Typ LS 50B der Firma Perkin-Elmer (Überlingen, Deutschland) verwendet. Die Einstellung der Geräteparameter und die Aufnahme der Daten erfolgten mit der FL-Winlab-Software (Release 1.1., Mai 1996, Perkin-Elmer). Als Messgefäße dienten Einmal-Küvetten.

## 7. Statistik

Falls nicht explizit angegeben, sind die Messergebnisse als arithmetische Mittelwerte (M.W.)  $\pm$  Standardabweichung (S.D.) dargestellt. Nachdem die Daten mit dem F-Test auf homo- bzw. heterogene Verteilung geprüft worden waren, wurde die Signifikanz der Werte mit dem Student-t-Test getestet. Dabei wurde ein Ergebnis mit einem Wert  $p \leq 0,05$  als signifikant und  $p \leq 0,01$  als hochsignifikant eingestuft.

**VIII. Abkürzungen:**

ADC	Analog-Digital-Konverter
AG	Antigen
AG-AK	Antigen-Antikörper
AK	Antikörper
ATP	Adenosin-triphosphat
CDR	Complementary –Determining Region
CJC	critical J-aggregate formation concentration
CLSM	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
DCFH-DA	2',7'-Dichlorofluoreszein-Diacetat
DHR123	Dihydrorhodamin123
DiOC <sub>6</sub>	3,3'-Dihexyloxo-carbocyanin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EC	ultrafeine Kohlenstoffpartikel
EDTA	Ethylen-diamin-tetraessigsäure
EGTA	[(Ethylen-bis-(oxyethylenitrilo)]-tetraessigsäure
EPA	Environmental Protection Agency
f	fein
F <sub>ab</sub>	Antigen-bindendes Fragment
F <sub>c</sub>	Cristalin Fragment
fCB	fine Carbon Black
FCS	fötale Kälber-Serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
fMLP	n-formyl-Met-Leu-Phe
FP	Feine Partikel
FSC	Forward Scatter
H <sub>2</sub> DCFDA	Dichlorodihydrofluorescein-diacetat
HEPES	N`-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N`-butansulfon-säure
HTMP	4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin

## IX. Literatur

---

Indo-1	1-[2-amino-5(carboxyino1-2-yl)-phenoxy]-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)-ethan-tetraessigsäure]
JC-1	J-aggregate-forming-cationic-dye (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanin-jodid)
kB	Kilobase
LDL	Low-density-lipoproteine
LPS	Lipopolysacharide
LUFP	lipophile ultrafeine Partikel
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Replikate
NC	Number Concentration
P90	Printex-(Toner)-Partikel
PAH	Polycyclic Aromatic Hydrocarbon
PBS	Phosphate-buffered Saline (Phosphatpuffer)
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PJ	Propidium-Jodid
PM	Particular Matter
R123	Rhodamin123
RB	Respiratory Burst
Rpm	Rounds per Minute
RT	Raumtemperatur (ca. 22°C)
S.D.	Standardabweichung
SR	Scavenger-Rezeptor
SRM 1650	Stadard Reference Material 1650 (Dieselruß)
SSC	Side Scatter
TBT	Tributyltin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid
TSP	Total Suspended Particles
uf	ultrafein
ufCB	ultra fine Carbon Black
UFP	Ultrafeine Partikel
UV	Ultraviolett
Vol.	Volumen

IX. Literatur

- [1] Wilson R. and Spengler J.D.: *Particles in Our Air: Concentrations and Health Effects*, Harvard University Press (1996)
- [2] Ministry of Health: *Mortality and morbidity during the London fog of December, 1952*. Her Majesty's Stationary Office. Reports on public health and medical subjects (1954) 95
- [3] Europäische Gemeinschaft: *Umweltstatistik 1996*, Europäische Gemeinschaft (1997)
- [4] Friket J.: *Fog along the Meuse Valley*, Transactions of the Faraday Society (1936) 32: 1192 – 1197
- [5] Friket M.: *Sur les causes des accidents survenus dans la vallée de la Meuse, lors des brouillards de décembre 1930*, Bulletin Academic Royal Medicine Belgique (1931) 11: 683 – 734
- [6] Ferlitz R.: *Pneumologie in Praxis und Klinik*, Thieme, Stuttgart (1994)
- [7] Pope C.A.III., Schwartz J. and Ransom M.R.: *Daily mortality and PM<sub>10</sub> pollution in Utah Valley*, Archives of Environmental Health (1992) 47: 211 – 217
- [8] Kinney P.L., Ito K. and Thurston G.D.: *A sensitivity analysis of mortality/PM<sub>10</sub> associations in Los Angeles*, Inhalation Toxicology (1995) 7: 59 – 69
- [9] Schwartz J.: *Short term fluctuations in air pollution and hospital admissions of the elderly for respiratory disease*, Thorax (1995) 50: 531 – 538
- [10] Schwartz J.: *Air pollution and hospital admissions for respiratory disease*, Epidemiology (1996) 7: 20 – 28
- [11] Pope C.A.III., Nambodiri M.M., Thun M.J., Dockery D.W., Evans J.S., Speizer F.E.: *Particulate air pollution as a predictor of mortality in a prospective study of U.S. adults*, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine (1995) 151: 669 – 674
- [12] Burnett R.T., Dales R., Krewski D., Vincent R., Dann T. and Brook J.R.: *Associations between ambient particulate sulfate and admissions to Ontario hospitals for cardiac and respiratory diseases*, American Journal of Epidemiology, (1995) 142 (1): 15 – 22
- [13] Schwartz J.: *Air pollution and hospital admissions for cardiovascular disease in Tucson*, Epidemiology (1997) 8: 371 – 377
- [14] Dockery D.W., Pope C.A.III., Xu X., Spengler J.D., Ware J.H., Fay M.E., Ferris B.G. and Speizer F.E.: *An association between air pollution and mortality in six U.S. cities*, New England Journal of Medicine (1993) 329: 1753 – 1759
- [15] Dockery D.W., Schwartz J. and Spengler J.D.: *Air pollution and daily mortality: Association with particulates and acid aerosols*, Environmental Research (1992) 59: 362 – 373

- [16] Schwartz J.: *Particulate air pollution and chronic respiratory disease*, Environmental Research (1993) **62**: 7 – 13
- [17] Jaakkola J.J.K., Paunio M., Virtanen M. and Heinonen O.P.: *Low-level air pollution and upper respiratory infections in children*, American Journal of Public Health (1991) **81**: 1060 – 1063
- [18] Zemp E., Perruchoud A.P., Elsasser S., Medici T.C., Domenighetti G. et al: *Long-term ambient air pollution and chronic respiratory symptoms (SAPALDIA)*, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine (1994) **149**: 662
- [19] Schindler C., Ackermann-Liebrich U., Leuenberger Ph., Kaiser R., Haab D., Monn Ch. et al: *Long-term exposure to PM10 and duration of symptom episodes and symptom free intervals (SAPALDIA-study)*, European Respiratory Journal (1995) **8 (Suppl. 19)**: 3495
- [20] Peters A., Wichmann H.E., Tuch T., Heinrich J. and Heyder J.: *Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles*, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine (1997) **155**: 1376 – 1383
- [21] Utell M.J., Frampton M.W. and Morrow P.E.: *Air pollution and asthma: clinical studies with sulfuric acid aerosols*, Allergy Proceedings (1991) **12**: 385-388
- [22] Bascom R., Bromberg P.A., Costa D.A., Devlin R., Dockery D.W., Frampton M.W., Lambert W., Samet J.M., Speizer F.E. and Utell M.: *Health effects of outdoor air pollution*, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine (1996) **153**: 3 –50
- [23] Ghio A.J., Kim C. and Devlin R.B.: *Concentrated ambient air particles induce mild pulmonary inflammation in healthy human volunteers*, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine (2000) **162**: 981 – 988
- [24] Bowden D.H. and Adamson I.Y.R., *The role of cell injury and the continuing inflammatory response in the generation of silicotic pulmonary fibrosis*, Journal of Pathology (1984) **144**: 149 – 161
- [25] Antonini J.M., Roberts J.R., Yang H.M., Barger M.W., Ramsey D. and Ma J.Y.: *Effect of silica inhalation on the pulmonary clearance of a bacterial pathogen in Fischer 344 rats*, Lung (2000) **178**: 341 – 350
- [26] Godleski J.J., Sioutas C., Kalter M. et al.: *Death from inhalation of concentrated ambient particles in animal models of pulmonary disease [Abstract]*, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine (1996a) **153**: A15
- [27] Holian A., Uthman M.O., Goltsova T., Brown S.D. and Hamilton R.F. Jr.: *Asbestos and Silica-induced changes in human alveolar macrophage phenotype*, Environmental Health Perspectives (1997) **105 (Suppl. 5)**: 1139 – 1142
- [28] Murphy S.A., BeruBe K.A., Pooley F.D. and Richards R.J.: *The response of lung epithelium to well characterised fine particles*, Life Sciences (1998) **62**: 1789 – 1799

- [29] Gulyas H. and Gercken G.: *Cytotoxicity to alveolar makrophages of airborne particles and waste incinerator fly-ash fractions*, Environmental Pollution (1988) **51**: 1 – 18
- [30] Oberdörster G., Gelein R., Ferin J. and Weiss B.: *Association of particulate air pollution and acute mortality: involvement of ultrafine particles ?*, Inhalation Toxicology (1995) **7**: 111 – 124
- [31] Li X.Y., Gilmour P.S., Donaldson K., and McNee W.: *Free radical activity and proinflammatory effects of particulate air pollution(PM<sub>10</sub>) in vivo and in vitro*, Thorax (1996) **51**: 1216 – 1222
- [32] Killingworth C.R., Skornik W., Gazula G. et al., *Ultrafine copper oxide particles increase pulmonary inflammation and resistance in hamsters [Abstract]*, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine (1997) **153**: A470
- [33] Dopp E., Nebe B., Hahnel C., Papp T., Alonso B., Simkó M. and Schiffmann D.: *Mineral fibers induce apoptosis in syrian hamster embryo fibroblasts*, Pathobiology (1995) **63**: 213-221
- [34] Chen L.C., Miller P.D., Amdur M.O. and Gordon T.: *Airway hyperresponsiveness in guinea pigs exposed to acid-coated ultrafine particles*, Journal of Toxicology and Environmental Health (1992) **35**: 165-174
- [35] Federal Register (1987) 52: 24634
- [36] Olmez I., Sheffield A.E., Gordon G.E., Houck J.E., Pritchett L.C., Cooper J.A., Dzubay T.G., Bennett R.L.: *Compositions of particles from selected sources in Philadelphia for receptor modeling applications*, JAPCA (1988) **38**:1392-402
- [37] Watson J.G., Chow J.C., Lu C., Fujita E.M., Lowenthal D.H. and Lawson D.R.: *Chemical mass balance source appointment of PM<sub>10</sub> during Southern California air quality study*, Aerosol Science and Technology (1994) **21**: 1 – 36
- [38] Ayers J.G.: *How green is diesel ?*, Indoor Environment (1994) **3**: 318 – 322
- [39] Roemer W., Hoek G., Brunekreef B., Clench-Aas J., Forsberg B., Pekkanen J., Schutz A.: *PM<sub>10</sub> elemental composition and acute respiratory health effects in European children (PEACE project). Pollution effects on asthmatic children in Europe*, European Respiratory Journal (2000) **15**: 553 - 559
- [40] Wäger P.A.: *Flüchtige organische Verbindungen in der Luft neuer und renovierter Wohn- und Aufenthaltsräume*, ETH Zürich: Dissertation Nr. 10074 (1993) 317
- [41] Künzli N., Ackermann-Liebrich U., Leuenberger Ph., Braendli O. and SAPALDIA-Team: *Between-area variation of time spent outdoors – a theoretical determinant of ambient air pollution exposure*, Epidemiology (1995) **6 (Suppl.)** 154A
- [42] Clayton C.A., Perrit R.L., Pellizzari E.D., Thomas K.W. and Whitmore R.W.: *Particle total exposure assessment methology study: distributions of aerosols and elemental concentrations in personal, indoor and outdoor samples in a southern California community*, Journal of Exposure Analysis of Environmental Epidemiology (1993) **3**: 227

– 250

- [43] Brädli O.: *Sind inhalierte Staubpartikel schädlich für unsere Lungen ?*, Schweizer Medizinische Wochenschrift (1996) **126**: 2165 – 2174
- [44] Ferin J., Oberdörster G. and Penney D.P.: *Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats*, American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology (1992) **6**: 535 – 542
- [45] Missiaen L., de Smedt H., Droogmans G. and Casteels R.: *Ca<sup>2+</sup> release induced by inositol 1,4,5-trisphosphate is a steady-state phenomenon controlled by luminal Ca<sup>2+</sup> in permeabilized cells*, Nature (1992) **357**: 599 – 602
- [46] Suzuki T.: *Signal transduction mechanisms through Fcγ receptors on the mouse macrophage surface*, FASEB Journal (1991) **5**: 187 - 193
- [47] Homburg C.H.E., de Haas M., von dem Borne A.E.G.Kr., Verhoeven A.J., Reutelingsperger C.P.M. and Roos D.: *Human neutrophils lose their surface FcRIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis*, Blood (1995) **85**: 532-540
- [48] Goldstein J.L., Ho Y.K., Basu S.K. and Brown M.S.: *Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition*, Proceedings of the National Academy of Science of the USA (1979) **76**: 333 – 337
- [49] Greaves D.R., Gough P.J. and Gordon S.: *Recent progress in defining the role of scavenger receptors in lipid transport, atherosclerosis and host defence*, Current Opinion in Lipidology (1998) **9**: 425 – 432
- [50] Platt N. and Gordon S.: *Scavenger receptors : diverse activities and promiscuous binding of polyanionic ligands*, Chemistry and Biology: (1998) **5**: R193 - R203
- [51] Palecanda A., Paulauskis J., Al-Mutairi E., Imrich A., Quin G., Suzuki H., Tryggvason K., Koziel H. and Kobzik L.: *Role of the scavenger receptor MARCO in alveolar macrophage binding of unopsonized environmental particles*, Journal of Experimental Medicine (1999) **189**: 1497 – 1506
- [52] Fenton M.J. and Golenbock D.T.: *LPS-binding proteins and receptors*, Journal of Leucocyte Biology (1998) **64**: 25 – 32
- [53] Morrison D.C., Lei M.-G., Kirikae T. and Chen T.-Y.: *Endotoxin receptors on mammalian cells*, Immunobiology (1993) **187**: 212 – 226
- [54] Iyer R., Hamilton F.R., Li L. and Holian A.: *Silica-induced apoptosis mediated via scavenger receptor in human macrophages*, Toxicology and applied Pharmacology (1996) **141**, 84-92
- [55] Kruskal B.A. and Maxfield F.R.: *Cytosolic free calcium increases before and oscillates during frustrated phagocytosis in macrophages*, The Journal of Cell Biology (1987) **105**: 2685 – 2693

- [56] *Calcium and the Cell*, Ciba Foundation Symposium 122, J. Wiley and Sons Ltd., Chichester, UK (1986)
- [57] Missaen L., Robberecht W., van den Bosch L., Callewaert G., Parys J.B., Wuytack F., Raeymaeckers L., Nilius B., Eggermont J. and de Smedt H.: *Abnormal intracellular  $Ca^{2+}$  homeostasis and disease*, Cell Calcium (2000) **28**: 1 – 21
- [58] Hallet B.H. and Lloyds D.: *The molecular and ionic signalling neutrophils*, Springer-Verlag, Heidelberg (1997)
- [59] Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson J.D.: *Molekularbiologie der Zelle*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (1994)
- [60] Bock, G.R. and Ackrill K., eds.: *Calcium waves, gradients and oscillations*, Ciba foundation, J. Wiley and Sons Ltd., Chichester, UK (1995)
- [61] Brundage R.A., Fogarty K.E., Tuft R.A. et al., *Chemotaxis of newt eosinophils: calcium regulation of chemotactic response*, American Journal of Physiology (1993) **265**: C1527 – C1543
- [62] Kruskal B.A., Shak S. and Maxfield F.R.: *Spreading of neutrophils is immediately preceded by a large increase in cytosolic free calcium*, Proceedings of the National Academy of Science of the USA (1986) **83**: 2919 – 2923
- [63] Hallet M.B., Luzio J.P. and Campbell A.K.: *Measurement of changes in cytoplasmic free calcium in fused cell hybrids*, Nature (1982) **294**: 155 – 158
- [64] Campbell A.K. and Hallet M.B.: *Measurement of intracellular calcium ions and oxygen radicals in polymorphonuclear leucocyte-erythrocyte “ghost” hybrids*, Journal of Physiology (1983) **338**: 537 – 550
- [65] Hallet M.B. and Campbell A.K.: *Two distinct mechanisms for stimulation of oxygen radical production by polymorphonuclear leucocytes*, The Biochemical Journal (1983) **216**: 459 – 465
- [66] Davies E.V., Hallet M.B. and Campbell A.K.: *Localised superoxide release by neutrophils can be provoked by a cytosolic calcium “cloud”*, Immunology (1991) **73**: 228 – 234
- [67] Schwartzman R.A. and Cidlowski J.A.: *Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death*, Endocrine Reviews (1993) **14**, 133-151
- [68] Stridh H., Gigliotti D., Orrenius S. and Cotgreave I.: *The role of calcium in pre- and postmitochondrial events in tributyltin-induced T-cell apoptosis*, Biochemical and Biophysical Research Communications (1999) **266**: 460 – 465
- [69] Trump B.F. and Berezsky I.K.: *The role of cytosolic  $Ca^{2+}$  in injury, necrosis and apoptosis*, Current Opinion in Cell Biology (1992) **4**: 227 – 232
- [70] Cheung W.Y.: *Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation*, Science (1980) **207**: 19 – 27

- [71] Gercken G., Berg I., Doerger M. and Schlueter T.: *Mechanisms of particle-induced activation of alveolar macrophages*, Toxicology Letters (1996) **88**: 121 – 129
- [72] Tarnok A., Schlueter T., Berg I. and Gercken G.: *Silica induces changes in cytosolic free calcium, cytosolic pH, and plasma membrane potential in bovine alveolar macrophages*, Analytical Cellular Pathology (1997) **15**: 61 –72
- [73] Chen J., Armstrong L.C., Gerriets J.E. and Last J.A.: *Silica increases cytosolic free calcium ion concentration of alveolar macrophages in vitro*, Toxicology and Applied Pharmacology (1991) **111**: 211 – 220
- [74] Stone V., Tiunman M., Vamvakopoulos J.E., Shaw J., Brown D., Petterson S., Faux S.P., Borm P. and MacNee W.: *Increased calcium influx in a monocytic cell line on exposure to ultrafine carbon black*, European Respiratory Journal (2000) **15**: 297 – 303
- [75] Skulachen V.P.: *Role of uncoupled and non uncoupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants*, Quarterly Reviews of Biophysics (1996) **29**, 169-202
- [76] Jonsson S., Musher D.M., Chapman A., Goree A. and Lawrence E.C.: *Phagocytosis and killing of common bacterial pathogens of the lung by human alveolar macrophages*, The Journal of Infectious Diseases (1985) **152**: 4 – 13
- [77] Alvarez E., Santa María C. and Machando A.: *Respiratory burst reaction changes with age in rat peritoneal macrophages*, Biochimica et Biophysica Acta (1993) **1179**: 247 – 252
- [78] Hampton M.B. and Orrenius S.: *Redox regulation of apoptotic cell death*, BioFactors (1998) **8**: 1 – 5
- [79] Castranova V.: *Generation of oxygen radicals and mechanisms of injury prevention*, Environmental Health Perspectives (1994) **102 (Suppl. 10)**: 65 – 68
- [80] Stone V., Shaw J., Brown D.M., MacNee W., Faux S.P. and Donaldson K.: *The role of oxidative stress in the prolonged inhibitory effect of ultrafine carbon black on epithelial cell function*, Toxicology in Vitro (1998) **12**: 649 – 659
- [81] Buttke T.M. and Sandstrom P.A.: *Oxidative stress as mediator of apoptosis*, Immunology Today (1994) **15**: 7-10
- [82] Dewald B., Baggiolini M., Curnutte J.T. et al.: *Subcellular localisation of the superoxide forming enzyme in human neutrophils*, Journal of Clinical Investigation (1979) **63**: 21 – 29
- [83] Babior B.M.: *The respiratory burst of phagocytes*, Journal of Clinical Investigation (1984) **73**: 599 – 601
- [84] Klebanoff S.J.: *Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes*, Annals of Internal Medicine (1980) **93**: 480 – 489

- [85] Halliwell B. and Gutteridge J.M.C.: *Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease*, The Biochemical Journal (1984) **219**: 1 – 14
- [86] Test S.T. and Weiss S.J.: *The generation and utilisation of chlorinated oxidants by human neutrophils*, Advances in Free Radical Biological Medicine (1986) **2**: 91 – 96
- [87] Lenz A.-K., Krombach F. and Maier K.L.: *Oxidative stress in vivo and in vitro: modulation by quartz dust and hyperbaric atmosphere*, Free Radical Biology and Medicine (1992) **12**: 1 – 10
- [88] Hippeli S.C. and Elstner E.F.: *Influence of diesel soot particles and sulfite on functions of polymorphonuclear leucocytes*, Free Radiation Research Communication (1996) **25**: 125-131
- [89] Dye J.A., Adler K.B., Richards J.H. and Dreher K.L.: *Epithelial injury induced by exposure to residual oil fly-ash particles: Role of reaktive oxygen species ?*, American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology (1997) **17**: 625-633
- [90] Henkes W.: *Apoptose - der programmierte Zelltod*, Biotec (1995) **3**: 16-22
- [91] Darzynkiewicz Z., Juan G., Li X., Gorczyca W., Murakami T., and Traganos F.: *Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis)*, Cytometry (1997) **27**: 1-20
- [92] Ren Y. and Savil J.: *Apoptosis: The importance of being eaten*, Cell Death and Differentiation (1998) **5**: 563 – 568
- [93] Kimua K.I. and Truman J.W.: *Postmetamorphic cell death in the nervous and muscular systems of *Drosophila melanogaster**, Journal of Neuroscience (1990) **10**: 403 – 411
- [94] Potten C.S. et al.: *Extreme sensitivity of some intestinal crypt cells to X and  $\gamma$  irradiation*, Nature (1977) **269**: 518 – 521
- [95] Kerr J.F.R., Wyllie A.H. and currie A.R.: *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*, British Journal of Cancer (1972) **26**: 239 –257
- [96] Kane A.B.: *Commentary: Redefining cell death*, American Journal of Pathology (1995) **146**: 1-2
- [97] Schwartzman R.A. and Cidlowski J.A.: *Apoptosis: The biochemistry and molekular biology of programmed cell death*, Endocrine Reviews (1993) **14**: 133-151
- [98] Kerr J.F.R, Winterford C.M. and Harmon B.V.: *Apoptosis - its significance in cancer and cancer therapy*, Cancer (1994) **73**: 2013-2026
- [99] Kroemer G., Petit P., Zamzami N., Vayssière J.-L., and Mingnotte B.: *The biochemistry of programmed cell death*, FASEB (1995) **9**: 1277-1287
- [100] Nagata S. and Golstein P.: *The fas death factor*, Science (1995) **267**: 1449 – 1456

- [101] Oddo M., Renno T., Atztinger A., Bakker T., MacDonald H.R. and Meylan R.A.: *Fas ligand induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular Mycobacterium tuberculosis*, The Journal of Immunology (1998) **160**: 5448 – 5454
- [102] Krammer P.H.: *Apoptose*, Deutsches Ärzteblatt (2000) **97**: A-1752 – A-1759
- [103] Cande C., Cecconi F., Dessen P., Kroemer G.: *Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death?*, Journal of Cell Science (2002) **115 (Pt 24)**: 4727 - 4734
- [104] Majno G. and Joris I.: *Apoptosis, Oncosis and necrosis - an overview of cell death*, American Journal of Pathology (1995) **146**: 3-15
- [105] Bowden D.H. and Adamson I.Y.R.: *The role of cell injury and the continuing inflammatory response in the generation of silicotic pulmonary fibrosis*, Journal of Pathology (1984) **144**: 149 – 161
- [106] Otha H., Sweeney E.A., Masamune A., Yatomi Y., Hakomori S. and Igarashi Y.: *Induction of apoptosis by sphingosine in human leukemic HL-60 cells: a possible endogenous modulator of dNA fragmentation occurring during phorbol ester-induced differentiation*, Cancer Research (1995) **1**: 691 – 697
- [107] Mitchell P.: *Keillin`s respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences*, Science (1979) **206**: 1148 – 1159
- [108] Babcock D.F., Herrington J., Goodwin P.C., Park Y.B., and Hille B.: *Mitochondrial participation in the intercellular Ca<sup>2+</sup> network*, The Journal of Cell Biology (1997) **136**: 833-844
- [109] Hiura T.S., Kaszubowski M.P., Li N. and Nel A.E.: *Chemicals in diesel exhaust particles generate reactive oxygen radicals and induce apoptosis in macrophages*, Journal of Immunology (1999) **163 (10)**: 5582 – 5591
- [110] Schmid G.H., Radunz A. and Gröschel-Stewart U.: *Immunologie und ihre Anwendung in der Biologie*, Thieme, Stuttgart (1993)
- [111] Kleinig H. and Sitte P.: *Zellbiologie*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1986)
- [112] Horton J.K., Williams A.S., Smith-Phillips Z., Martin R.C. and O`Beirne G.: *Intracellular measurement of prostaglandin E2: Effect of anti-inflammatory drugs on cyclooxygenase activity and prostanoid expression*, Analytical Biochemistry (1999) **271**. 18 – 21
- [113] Zhang X., Schwarz E.M., Young D.A., Puzas J.E., Rosier R.N., O`Keefe R.J.: *Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair*, Journal of Clinical Investigation (2002) **109**: 1405 - 1415
- [114] Harris S.G., Padilla J., Koumas L., Ray D. and Phipps R.P.: *Prostaglandins as modulators of immunity*, Trends in Immunology (2002) **23**: 144 - 150

- [115] Nataraj C., Thomas D.W., Tilley S.L., Nguyen M.T., Mannon R., Koller B.H. and Coffman T.M.: *Receptors for prostaglandin E(2) that regulate cellular immune responses in the mouse*, Journal of Clinical Investigation (2001) **108**:1229 - 1235
- [116] Dooper M.M., Wassink L., M'Rabet L. and Graus Y.M.: *The modulatory effects of prostaglandin-E on cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells are independent of the prostaglandin subtype*, Immunology (2002) **107**: 152 – 159
- [117] Sottile A., Venza M., Venza I. and Teti D.: *Prostaglandins affect the respiratory burst of human neutrophils*, Immunopharmacology and Immunotoxicology (1995) **17**: 311 – 321
- [118] Kuhn D.C. and Demers L.M.: *Influence of mineral dust surface chemistry on eicosanoid production by the alveolar macrophage*, Journal of Toxicology and Environmental Health (1992) **35**: 39-50
- [119] Koren H.S. , Joyce M., Devlin R.B., Becker S., Driscoll K. and Madden M.: *Modulation of eicosanoid production by human alveolar macrophages exposed to silica in vitro*, Environmental Health Perspectives (1992) **97**: 77-83
- [120] Shibata Y.: *Prostaglandin E2 release triggered by phagocytosis of latex particles*, The Journal of Immunology (1995) **154**: 2878-2887
- [121] Beck-Speier I., Dayal N., Karg E., Maier K.L., Roth C., Ziesenis A. and Heyder J.: *Agglomerates of ultrafine particles of elemental carbon and TiO<sub>2</sub> induce generation of lipid mediators in alveolar macrophages*, Environmental Health Perspectives (2001) **109 (Suppl. 4)**: 613 – 618
- [122] Trautwein A., Kreibitz U. and Oberhausen E.: *Physik für Mediziner*, de Gruyter, Berlin (1986)
- [123] Gryniewicz G., Poenie M. and Tsien R. Y.: *A new generation of Ca<sup>2+</sup>-indicators with greatly improved fluorescence properties*, The Journal of Biological Chemistry (1985) **260**: 3440-3450
- [124] Szücs S., Vámosi G., Póka R., Sáváry A., Bárdos H., Balázs M., Kappelmayer J., Tóth L., Szöllösi J. and Adány R.: *Single-cell measurement of superoxide anion and hydroxide peroxide production by human neutrophils with digital imaging fluorescence microscopy*, Cytometry (1998) **33**: 19 – 31
- [125] Emmendörffer A., Hecht M., Lohmann-Matthes M.-L. and Roesler J.: *A fast and easy method to determine the production of reactive oxygen intermediates by human and murine phagocytes using dihydrorhodamine 123*, Journal of Immunological Methods (1990) **131**: 269 – 275
- [126] Rothe G. and Valet G.: *Measurement of phagosomal hydrogen peroxide production with dihydrorhodamine 123*, In: Handbook of Flow Cytometry Methods, Robinson J.P. (ed.), John Wiley & Sons, Inc., New York (1993)

- [127] Rothe G., Oser A. and Valet G.: *Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes*, Naturwissenschaften (1988) **75**: 354 – 355
- [128] Bretscher M.S.: *Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes*, Nature New Biology (1972) **236**: 11 – 12
- [129] Op den Kamp, J.A.F.: *Lipid asymmetry in membranes*, Annual Review of Biochemistry (1979) **48**: 47-71
- [130] Devaux P.F.: *Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes*, Biochemistry (1991) **30**: 1163 – 1173
- [131] Connor J., Pak C.H., Zwaal R.F. and Schroit A.J.: *Bidirectional transbilayer movement of phospholipid analogs in human red blood cells. Evidence for an ATP-dependent and protein-mediated process*, Journal of Biological Chemistry (1992): **267**: 19412 – 19417
- [132] Fadok V.A., Bratton D.L., Frasch S. C., Warner M.L. and Henson P.M.: *The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes*, Cell Death and Differentiation (1998) **5**: 551 – 562
- [133] Fadok V.M., Voelker D.R., Campbell P.A., Cohen J.J., Bratton D.L. and Henson P.M.: *Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages*, The Journal of Immunology (1992) **148**: 2207-2216
- [134] Martin S.J., Reutelingsperger C.P.M., McGahon A.J., Rader J.A., van Schie R.C.A.A., LaFace D.M., and Green D.R.: *Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl*, Journal of Experimental. Medicine (1995) **182**: 1545-1556
- [135] Lang K.S., Roll B., Myssina S., Schittenhelm M., Scheel-Walter H.G., Kanz L., Fritz J., Lang F., Huber S.M. and Wieder T.: *Enhanced erythrocyte apoptosis in sickle cell anemia, thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency*, Cell Physiology and Biochemistry (2002) **12**: 365 – 372
- [136] Richardson H. and Kumar S.: *Death to flies: Drosophila as a model system to study programmed cell death*, Journal of Immunological Methods. (2002) **265**: 21 – 38
- [137] Maurer Fogy I., Reutelingsperger C.P., Pieters J., Bodo G., Stratowa C. and Hauptmann R.: *Cloning and expression of cDNA for human vascular anticoagulant, a Ca<sup>2+</sup>-dependent phospholipid-binding protein*, European Journal of Biochemistry (1988) **174**: 585 – 592
- [138] Andree H.A.M., Reutelingsperger C.P.M., Hauptmann R., Hemker H.C., Hermens W.Th., and Willems G.M.: *Binding of vascular anticoagulant a (VACa) to planar phospholipid bilayers*, The Journal of Biological Chemistry (1990) **265**: 4923

- [139] Koopman G., Reutelingsperger C.M.P., Kuijten G.A.M., Keehnen R.M.J., Pals S.T., and van Oers M.H.J.: *Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis*, Blood (1994) **84**: 1415-1420
- [140] Plassek J. and Sigler K.: *Slow fluorescent indicators of membrane potential: a survey of different approaches to probe response analysis*, Journal of Photochemistry and Photobiology (1996) **33**: 101-124
- [141] Freedman J.C. and Novak T.S.: *Optical measurement of membrane potential in cells, organelles and vesicles*, Methods in Enzymology (1989) **172**: 102 – 122
- [142] Johnson I.: *Fluorescent probes for living cells*, Histochemical Journal (1998) **30**: 123 – 140
- [143] Sims J., Waggoner A.S., Wang C.-H. and Hoffman J.F.: *Studies on the mechanism by which cyanine dye measures membrane potential in red blood cells and phosphatidylcholine vesicles*, Biochemistry (1974) **13**: 3315 – 3330
- [144] Chen B. C. and Smiley S.T.: *Probing mitochondrial membrane potential in living cells by a J-aggregate forming dye, Fluorescent and luminescent probes for biological activity*, Biological Techniques, Academic Press, London (1993)
- [145] Jelly E.E.: *Molecular, nematic and crystal states of 1:1' Diethyl- $\phi$ -cyanine chlorid*, Nature (1937) **139**: 631 – 632
- [146] Smiley T.S.; Reers M., Mottola-Hartshorn C., Lin M.; Chen A., Smith T.W.; Steele G.D., and Chen L.B.: *Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1*, Proceedings of the National Academy of Science of the USA (1991) **88**: 3671 – 3679
- [147] Reers M., Smith T.W. and Chen L.B.: *J-Aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential*, Biochemistry (1991) **3**: 4480-4486
- [148] Shapiro H.M.: *Practical Flow Cytometry*, Alan R. Liss, Inc., New York (1988)
- [149] Darznkiewicz Z. and Crissman H.A.: *Flow cytometry*, Methods in Cell Biology (1990) **33**: 427 – 451
- [150] Beisker W.: *A new combined integral-light and slit-scan data analysis system (DAS) for flow cytometry*, Computer Methods and Programs in Biomedicine (1994) **42**: 15 –26
- [151] Roitt I.M., Brostoff J. and Male D.K.: *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*, Thieme, Stuttgart, (1995)
- [152] Weiss A. et al.: *The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL-2 production reflects events occurring at a pre-translational level*, The Journal of Immunology (1984) **133**: 123 – 128
- [153] Hirst J., Jones G. and Cohn M.: The Journal of Immunology (1971) **107**: 926

- [154] Ralph P. and Nakoinz I.: *Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumour and his cloned cell line*, Nature (1975) **257**: 393-394
- [155] Ralph P. and Nakoinz I.: *Antibody-dependent killing of erythrocyte and tumor targets by macrophage-related cell-lines: Enhancement by PPD and LPS*, The Journal of Immunology (1977) **119**: 950-954
- [156] Ralph P., Prichard J., and Cohn M.: *Reticulum cell sarcoma: An effector cell in antibody-dependent cell-mediated immunity*, The Journal of Immunology (1975) **144** (2): 898 – 905
- [157] Roth C., Karg E. and Heyder J.: *Do inhaled ultrafine particles cause acute health effects in rats ? I: Particle production*, Journal of Aerosol Science (1998) **29 (Suppl.1)**: S679 – S680
- [158] Denkow W.: *Gifte der Natur*, Bechtermünz-Verlag, Augsburg (2001)
- [159] Lau M.M.: *Tributyltin antifoulings: a threat to the Hong Kong marine environment*, Archives of Environmental Contamination and Toxicology (1991) **20**: 299 – 304
- [160] Corsini E., Vivani B., Marinovich M. and Galli C.L.: *Role of mitochondria and calcium in Tributyltin-induced gene regulatory pathways*, Toxicology and Applied Pharmacology (1997) **145**: 74 – 81
- [161] Snoeji N.J., Penninks A.H. and Seinen W.: *Biological activity of organotin compounds – An overview*, Environmental Research (1987) **44**: 335 – 353
- [162] Jacobsen J.A. and Asmund G.: *TBT in marine sediments and blue mussels (*Mytilus edulis*) from central-west Greenland*, The Science of the Total Environment (2000) **245** (1 – 3): 131 – 136
- [163] Chow S.C., Kass G.E.N., McCabe M.J. and Orrenius S.: *Tributyltin increases cytosolic free  $Ca^{2+}$  concentration in Thymocytes by mobilizing intracellular  $Ca^{2+}$ , activating a  $Ca^{2+}$  entry pathway, and inhibiting  $Ca^{2+}$  efflux*, Archives of Biochemistry and Biophysics (1992) **298**: 143 – 149
- [164] Reader S., Steen H.B. and Deizeau F.: *Intracellular calcium and pH alterations induced by Tri-n-butyltin chloride in isolated rainbow trout hepatocytes: a flow cytometric analysis*, Archives of Biochemistry and Biophysics (1994) **312**: 407 – 413
- [165] Stridh H., Kimland M., Jones D.P., Orrenius S. and Hampton M.B.: *Cytochrome c release and caspase activation in hydrogen peroxide- and tributyltin-induced apoptosis*, FEBS Letters (1998) **429**: 351 – 355
- [166] Stridh H., Orrenius S. and Hampton M.B.: *Caspase involvement in the induction of apoptosis by the environmental toxicants tributyltin and triphenyltin*, Toxicology and Applied Pharmacology (1999) **156**: 141 – 146
- [167] Zhang J., Kaupke C.K., Yousefi S., Cesario T.C. and Vaziri N.D.: *Flow cytometric investigation of neutrophil activation pathways by n-formyl-Met-Leu-Phe and phorbol myristate acetate*, Biology of the Cell (1995) **84**: 147 – 153

- [168] Schmitt M. and Bültmann B.: *Fluorescent chemotactic peptides as tools to identify the f-Met-Leu-Phe receptor on human granulocytes*, Biochemical Society Transactions (1990) **18**: 219 – 222
- [169] Takemura H., Hughes A.R., Thastrup O. and Putney J.W. Jr.: *Activation of calcium entry by the tumor promotor Thapsigargin in parotid acinar cells*, The Journal of Biological Chemistry (1989) **264**: 12266 – 12271
- [170] McConkey D.J. and Orrenius S.: *Signal transduction pathways to apoptosis*, Trends in Cell Biology (1994) **4**: 370-375
- [171] Grundler W., Dirscherl P., Beck-Speier I., Beisker W., Stampfl A., Zimmermann I. and Maier K.: *Simultaneous recording of calcium transients and reaktive oxygen intermediates of human polymorphonuclear granulocytes in response to formyl-met-leu-phe and the environmental agent sulfite*, Cytometry (2000) **40**: 219 – 229
- [172] Johnson L.V., Walsh M.L. and Chen L.B.: *Localisation of mitochondria in living cells with rhodamine 123*; Proceedings of the National Academy of Science of the USA (1980) **77**: 990 – 994
- [173] Cossarizza A., Ceccarelli D. and Masini A.: *Functional heterogeneity of an isolated mitochondrial population revealed by cytofluorometric analysis at the single organelle level*, Experimental Cell Research (1996) **222**: 84 – 94
- [174] Melamed M.R., Lindmo T. and Mendelsohn M.L.: *Flow cytometry and sorting*, John Wiley & Sons, New York (1990)
- [175] Gercken G., Berg I., Doerger M. and Schlueter T.: *Mechanisms of particle-induced activation of alveolar macrophages*, Toxicology Letters (1996) **88**: 121 – 129
- [176] Wilson A., Lundqvist H., Gustafsson M. and Stendahl O.: *Killing of phagocytosed Staphylococcus aureus by human neutrophils requires intracellular free calcium*, Journal of Leucocyte Biology (1996) **59**: 902 – 907
- [177] Berg I., Schlueter T. and Gercken G.: *Increase of bovine alveolar macrophage superoxide anion and hydrogen peroxide release by dusts of different origin*, British Journal of Haematology (1999) **105**: 215 – 224
- [178] Hampton M.B. and Orrenius S.: *Redox regulation of apoptotic cell death*, Biofactors (1998) **8**: 1 – 5
- [179] Zamzami N., Marchetti P., Castedo M., Decaudin D., Macho A., Hirsch T., Susin S.A., Petit P.X., Mignotte B., and Kroemer G.: *Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death*, The Journal of Experimental Medicine (1995) **182**: 367-377
- [180] Stridh H., Fava E., Single B., Nicotera P., Orrenius S. and Leist Marcel: *Tributyltin-induced apoptosis requires glycolytic adenosine trisphosphate production*, Chemical Research in Toxicology (1999) **12**: 874 – 882

- [181] Stridh H., Cotgreave I., Müller M., Orrenius S. and Gigliotti D.: *Organotin-induced caspase activation and apoptosis in human peripheral blood lymphocytes*, Chemical Research in Toxicology (2001) **14**: 791 – 798
- [182] Henderson R.F., Leung H.W., Harmsen .G. and Mc Clellan R.O.: *Species differences in release of arachidonate metabolites in response to inhaled diluted diesel exhaust*, toxicology Letters (1988) **42**: 325 – 332
- [183] Mackenzie R.K., Topley N., Neubauer A., Coles G.A. and Williams J.D.: *Staphylococcal exoproducts down-regulate cyclooxygenase 1 and 2 in peritoneal macrophages*, Journal of Laboratorial and Clinical Medicine (1997) **129**: 23 – 34
- [184] Rabinovitch P.S. and June C.H.: *Measurement of intracellular ionized calcium and membrane potential*, Flow Cytometry and Sorting, (1990): 651 – 668
- [185] Borgland S.L., Connor M., Ryan R.M., Ball H.J., Christie M.J.: *Prostaglandin E<sub>2</sub> inhibits calcium current in two sub-populations of acutely isolated mouse trigeminal sensory neurons*, Journal of Physiology (2002) **539**: 433 – 444
- [186] Lang F. and Waldegger S.: *Regulating cell volume*, American Scientist (1997) **85**: 456 – 463
- [187] Myers J.T. and Swanson J.A.: *Calcium spikes in activated macrophages during Fcγ<sub>3</sub> receptor-mediated phagocytosis*, Journal of Leukocyte Biology (2002) **72**: 677 - 684.
- [188] Serrander L., Larsson J., Lundqvist H., Lindmark M., Fällman M., Dahlgren C. and Stendahl O.: *Particles binding β<sub>2</sub>-integrins mediate intracellular production of oxidative metabolites in human neutrophils independently of phagocytosis*, Biochimica et Biophysica Acta (1999) **1452**: 133 – 144
- [189] Castranova V., Dalal N.S. and Vallyatahn V.: *Role of the surface free radicals in the pathogenicity of silicia, Silica and Ciilca-induced Diseases* (edited by Castranova V., Vallyathan V. and Wallace W.E.) CRC Press, Boca Raton
- [190] Simeova P.P. and Luster M.I.: *Iron and reactive oxygen species in the asbestos-induced tumor necrosis factor-α response from alveolar macrophages*, American Journal of Respiratory Cell and Molekular Biology (1995) **12**: 676 – 683
- [191] Dreher K.L., Jaskot R.H., Lehmann J.R., Richards J.H., McGee J.K. and Ghio A.J.: *Soluble transition metals mediate residual oil fly ash induced lung injury*, Journal of Toxicology and Environmental Health (1997) **50**: 286 – 305
- [192] Bauerle P.A. and Henkel T.: *Function and activation of NF kappa B in the immune system*, Annual Review of Immunology (1994) **12**: 141 – 179
- [193] Brown D.M., Stone V., Findlay P., MacNee W. and Donaldson K.: *Increased inflammation and intracellular calcium caused by ultrafine carbon black is independent of transition metals or other soluble components*, Occupational and Environmental Medicine (2000) **57**: 685 – 691

- [194] Ferin J., Oberdörster G. and Penney D.P.: *Pulmonary retention of ultrafine particles in rats*, American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology (1992) **6**: 535-542
- [195] Donaldson K., Li X.Y. and McNee W.: *Ultrafine (nanometre) particle mediated lung injury*, Journal of Aerosol Science (1998) **29**: 553 – 560
- [196] Kamensky L.A., Burger D.E., Gershman R.J., Kamensky L.D. and Luther E.: *Slide-based laser scanning cytometry*, Acta Cytologica (1997) **41**: 123 – 143
- [197] Grundler W., Dirscherl P., Beisker W., Marx K., Stampfl A., Maier K., Zimmermann I. and Nuesse M.: *Early functional apoptotic responses of thymocytes induced by tri-n-butyltin*, Cytometry (2001) **44**: 45 -56

## **Danksagung**

---

*Diese Arbeit wurde im Zeitraum vom Februar 1998 bis November 2002 im Rahmen des Querschnittsthemas „Mechanismen der Stressreaktionen“ am Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit (GSF) in der Arbeitsgruppe Durchflusszytometrie in Kooperation mit dem Institut für Inhalationsbiologie durchgeführt.*

### **Herzlichen Dank an:**

Herrn Prof. Dr. Reinhard Nießner

für die interessante Themenstellung, für hilfreiche Anregungen, für die Überlassung der SRM-Partikel und für vielfältige Unterstützungen.

Herrn Dr. Werner Grundler

für die fachkundliche Betreuung der Arbeit, sein allzeit offenes Ohr, die gute Zusammenarbeit und die kritische Korrektur der Dissertation.

Herrn Dr. Michael Nüsse

für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe Durchflusszytometrie, die anregenden Gespräche, die Hilfe beim Annexin-V-Fluos-Assay und für die Korrektur der Dissertation.

Herrn Dr. Konrad Maier

für die Korrektur der Dissertation, die ständige Diskussionsbereitschaft und die wertvollen Anregungen.

Herrn Prof. Dr. Joachim Heyder

für die Ausarbeitung des zweiten Gutachtens.

## **Danksagung**

---

### **Ferner danke ich:**

Herrn Dr. Wolfgang Beisker für die umfassende Hilfe am Durchflusszytometer und am Computer.

Herrn Oskar Lock für den technischen Beistand und seine ansteckende gute Laune.

Frau Ingrid Zimmermann für vielfältige und tatkräftige Hilfe in Labor und Zellkultur.

Herrn Dr. Wolfgang Kreyling für die Überlassung der TiO<sub>2</sub>-, Printex- und EC-Partikeln.

Frau Dr. Ingrid Beck-Speier für die unkomplizierte Hilfe beim PGE<sub>2</sub>-Immuno-Assay.

Frau Dr. Karin Bink und Frau Ulrike Buchholz für die Hilfe am CLSM und die vielen angenehmen Mittagessen.

Herrn Dr. Peter Dirscherl für Anregungen, Tips, Motivation und stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. Thomas Hofer für Hinweise zur Promotion und fachkundliche Gespräche.

Allen Kolleginnen und Kollegen möchte ich für die kooperative Zusammenarbeit und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre danken, besonders Frau Margit Ellendorf, Dr. Heinrich Eisenmann, Dr. Harald Meier, Dr. Bernhard Bruckmeier, Alexander Loy und Ioanna Letsiou.

Claudia und Sabine für Seelenmassagen und Aufmunterungen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir meine Ausbildung und Promotion ermöglicht haben und die mir immer helfend zur Seite standen.