

**Charakterisierung der proteomischen,
metabolomischen und funktionellen Reaktionen in
endothelialen Zellen nach Langzeitexposition gegen
Dieselrußsurrogate**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Mario Pink

geboren in Lutherstadt Wittenberg

Institut für Hygiene und Arbeitsmedizin

der

Universität Duisburg-Essen

2012

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Mai 2009 bis Oktober 2012 in der Arbeitsgruppe „Toxicoproteomics“ am Institut für Hygiene und Arbeitsmedizin der Universität Duisburg-Essen angefertigt.

Tag der Disputation: 28.06.2013

Gutachter: Prof. Dr. Rettenmeier

Prof. Dr. Epple

Prof. Dr. Pischetsrieder

Vorsitzender: Prof. Dr. Gutmann

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	DEFINITION VON FEINSTAUB	1
1.2	VORKOMMEN, QUELLEN UND CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN VON FEINSTAUB	2
1.3	DIESELRUß	3
1.4	CARBON BLACK	5
1.5	DEPOSITION VON FEINSTAUB IM ORGANISMUS UND TOXIKOKINETIK	7
1.6	TOXIZITÄT VON FEINSTAUB	9
1.7	ZIELSETZUNG	13
1.7.1	<i>Studiendesign</i>	14
1.7.2	<i>Toxikologische Untersuchungen</i>	14
2	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	16
2.1	PROTEOMIK (<i>PROTEOMICS</i>)	16
2.1.1	<i>2D-Gelelektrophorese</i>	16
2.1.2	<i>Massenspektrometrie</i>	17
2.2	POSTTRANSLATIONALE MODIFIKATIONEN/PHOSPHORYLIERUNG VON PROTEINEN	17
2.3	METABOLOMIK (<i>METABOLOMICS</i>)	18
2.3.1	<i>Gaschromatographie</i>	19
3	METHODEN	21
3.1	HERSTELLUNG VON BENZO[A]PYREN-BELADENEM CARBON BLACK (CB+B[A]P)	21
3.1.1	<i>Quantifizierung des Benzo[a]pyren-Gehalts der beladenen Partikel (CB+B[a]P)</i>	21
3.1.2	<i>Bestimmung der Partikelgröße in Suspension</i>	22
3.2	ZELLKULTUR	22
3.2.1	<i>Zelllinie EA.hy926</i>	22
3.2.2	<i>Subkultivierung</i>	22
3.2.3	<i>Partikelsuspension und Zellexposition</i>	23
3.3	TOXIKOLOGISCHE ZELLTESTS	23
3.3.1	<i>BrdU-Assay</i>	23
3.3.2	<i>ROS-Assay</i>	24
3.4	PROTEOMISCHE ANALYSE VON ZELLEN NACH EXPOSITION GEGEN DIESELRUß-SURROGATE	24
3.4.1	<i>Zelllyse</i>	24
3.4.2	<i>Proteinextraktion aus dem Zellkern</i>	25
3.4.3	<i>Bradford-Test</i>	25
3.4.4	<i>Herstellung von Polyacrylamidgelen</i>	26
3.4.5	<i>Zweidimensionale Gelelektrophorese zur Proteinanalyse</i>	26
3.4.6	<i>Proteinvisualisierung</i>	28
3.4.7	<i>Bilderfassung und -analyse</i>	28
3.4.8	<i>In-Gel-Verdau von Proteinen</i>	29
3.4.9	<i>MALDI-ToF-MS-Analyse und Proteinidentifikation</i>	30

3.4.10	<i>Aktivitätsanalyse zellulärer Transkriptionsfaktoren (PPAR α, β/δ, γ)</i>	31
3.5	BESTIMMUNG DER MITOCHONDRIALEN VITALITÄT	31
3.6	METABOLOMISCHE CHARAKTERISIERUNG VON ZELLEN NACH EXPOSITION GEGEN DIESELRUßSURROGATE.....	32
3.6.1	<i>Extraktion zellulärer Metaboliten</i>	32
3.6.2	<i>GC/MS-Analyse der extrahierten Metaboliten</i>	33
3.7	ENTWICKLUNG EINES VERFAHRENS ZUR EXTRAKTION PHOSPHORYLIERTER PROTEINE	34
3.7.1	<i>Präparation verschiedener Phosphoprotein-haltiger Proben</i>	34
3.7.2	<i>Phosphoproteinfällung aus verschiedenen Proben</i>	34
3.7.3	<i>Photometrische Reinheitsbestimmung der extrahierten Proteine</i>	35
3.7.4	<i>Eluierung der Phosphoproteine aus dem Niederschlag</i>	35
3.7.5	<i>Proteomische Analyse der Phosphoproteine</i>	36
3.8	ANALYSE DES PHOSPHOPROTEOMS DER ENDOTHELIALEN ZELLEN EA.HY926	38
3.8.1	<i>Entwicklung eines geeigneten „Refold“-Puffers zur Präzipitation von Phospho- proteinen</i>	38
3.8.2	<i>Phosphoproteinfällung aus Zelllysaten</i>	39
3.8.3	<i>2D-Gelelektrophorese zur Phosphoproteinanalyse</i>	39
3.8.4	<i>Analyse der 2D-Gele</i>	41
3.9	UNTERSUCHUNG DES ANGIOGENESEVERHALTENS	41
3.9.1	<i>Fluoreszenz-basierte Quantifizierung von Aktin und Vimentin</i>	41
3.9.2	<i>Transwell-Assay zum Test der Invasion und Migration</i>	42
3.9.3	<i>Transwell-Assay zum Test der zellulären Barrierefunktion</i>	43
3.9.4	<i>Relative Quantifizierung des intrazellulären Calciumgehalts</i>	44
3.10	STATISTISCHE AUSWERTUNG DER ERHALTENEN DATEN	44
4	ERGEBNISSE	45
4.1	ANALYSE DES PROTEOMS UND METABOLOMS VON ENDOTHELZELLEN NACH EXPOSITION GEGEN DIESELRUßSURROGATE	45
4.1.1	<i>Zielsetzung</i>	45
4.1.2	<i>Ergebnisse</i>	45
4.2	ENTWICKLUNG EINES VERFAHRENS ZUR EXTRAKTION PHOSPHORYLIERTER PROTEINE	55
4.2.1	<i>Zielsetzung</i>	55
4.2.2	<i>Ergebnisse</i>	55
4.3	UNTERSUCHUNG DES PHOSPHOPROTEOMS UND ZELLULÄRER ANGIOGENESE-MARKER NACH EXPOSITION GEGEN DIESELRUßSURROGATE	62
4.3.1	<i>Zielsetzung</i>	62
4.3.2	<i>Ergebnisse</i>	62
5	DISKUSSION	71
5.1	PROTEOMISCHE UND METABOLOMISCHE CHARAKTERISIERUNG DER ENDOTHELIALEN ANTWORT AUF EINE EXPOSITION GEGEN DIESELRUßSURROGATE.....	71
5.1.1	<i>Printex[®] 90-Nanopartikel und Verunreinigung mit polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAH)</i>	72
5.1.2	<i>Bestimmung der intrazellulären ROS-Bildung und Zellproliferation</i>	73
5.1.3	<i>Proteomische Analyse</i>	74

5.1.4	<i>Metabolomische Analyse</i>	75
5.1.5	<i>Zusammenfassung I</i>	77
5.2	ENTWICKLUNG EINES VERFAHRENS ZUR EXTRAKTION PHOSPHORYLIERTER PROTEINE	79
5.2.1	<i>Elution und Auftrennung der ausgefällten Proteine</i>	80
5.2.2	<i>Reinheitsbestimmung der extrahierten Phosphoproteine</i>	81
5.2.3	<i>Theoretische Betrachtung des Elutionsmechanismus</i>	82
5.2.4	<i>Validierung der Phosphoproteine</i>	83
5.2.5	<i>Zusammenfassung II</i>	84
5.3	UNTERSUCHUNG DES PHOSPHOPROTEOMS UND ZELLULÄRER ANGIOGENESEMARKER NACH EXPOSITION GEGEN DIESELRUßSURROGATE	85
5.3.1	<i>Analyse des zellulären Phosphoproteoms</i>	85
5.3.2	<i>Fluoreszenzmikroskopie des Aktin- und Vimentinzytoskeletts</i>	87
5.3.3	<i>Test der zellulären Invasion, Migration und Barrierefunktion</i>	88
5.3.4	<i>Intrazelluläre Bestimmung des Calciumgehalts</i>	91
5.3.5	<i>Zusammenfassung III</i>	91
6	ZUSAMMENFASSUNG	93
7	LITERATUR	95
8	ANHANG	105
8.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	105
8.2	IDENTIFIZIERTE PROTEINE UND METABOLITEN	110
8.2.1	<i>Proteomische und metabolomische Analyse von Endothelzellen nach Exposition gegen Dieselrußsurrogate</i>	110
8.2.2	<i>Entwicklung eines Verfahrens zur Extraktion phosphorylierter Proteine</i>	115
8.2.3	<i>Untersuchung des Phosphoproteoms und zellulären Angiogenesemarker nach Exposition gegen Dieselrußsurrogate</i>	118
8.3	VERWENDETE CHEMIKALIEN	121
8.4	PUBLIKATIONSLISTE	123
8.5	LEBENS LAUF	126
8.6	ERKLÄRUNG	127
8.7	DANKSAGUNG	128

1 Einleitung

Das Einatmen von Feinstaub macht krank.

Diese und ähnliche Aussagen sind immer wieder in den Medien zu finden, insbesondere wenn striktere Regulierungen der Feinstaubexposition von Allgemein- und arbeitender Bevölkerung, beispielsweise durch Einrichtung von Umweltzonen in den Städten oder durch Absenkung des Grenzwertes für Feinstaub am Arbeitsplatz, eingeführt werden.

Die Aussage „Feinstaub macht krank“ fasst in verkürzter Form Erkenntnisse aus In-vivo- und In-vitro-Studien zusammen, die auf Gesundheitsrisiken durch Feinstaubexposition hinweisen. Allerdings verbirgt sich hinter dieser scheinbar klaren Aussage eine Reihe von Fragen. Die wohl wichtigste Frage bezieht sich auf den zugrunde liegenden Wirkungsmechanismus, was den Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit darstellt.

Derzeit werden nach Feinstaubexposition beobachtete Effekte teilweise als Reaktion auf oxidativen Stress erklärt, wobei diese Hypothese im Wesentlichen auf Versuchen im Hochdosisbereich beruht. Um die Mechanismen unter physiologischeren Bedingungen zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit zelluläre Reaktionen nach Exposition im Niedrigdosisbereich mit proteomischen und metabolischen Methoden analysiert.

1.1 Definition von Feinstaub

Feinstaub (engl. *particulate matter*, PM) bezeichnet den Anteil des Gesamtstaubs der aufgrund seines aerodynamischen Verhaltens eingeatmet werden kann. Das aerodynamische Verhalten charakterisiert die Schwebeseigenschaften der Feinstäube. Als Feinstaub werden alle einatembare Stäube mit einem maximalen Durchmesser von 10 μm (PM_{10}) bezeichnet (Abbildung 1). Die $\text{PM}_{2,5}$ -Fraktion fasst Feinstäube zusammen, die wesentlich tiefer in die Lunge eindringen können. Die kleinste Fraktion ($\text{PM}_{0,1}$) wird als Ultrafeinstaub (UFP) bzw. Nanopartikel bezeichnet.

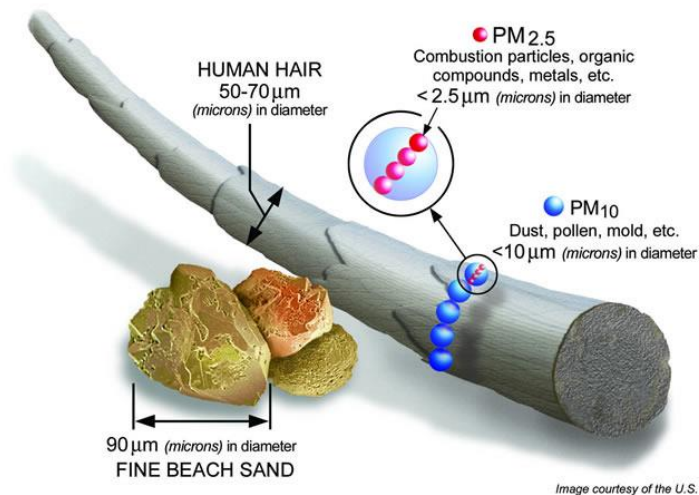


Abbildung 1: Größenvergleich zwischen einem menschlichen Haar und Feinstaub.

(Quelle: U.S. EPA)

1.2 Vorkommen, Quellen und chemische Eigenschaften von Feinstaub

Feinstaub setzt sich zusammen aus Partikeln natürlichen sowie anthropogenen Ursprungs. Feinstaub aus anthropogenen Quellen entsteht überwiegend bei Verbrennungsprozessen im Straßenverkehr, in Haushalten und in der Industrie (Abbildung 2).

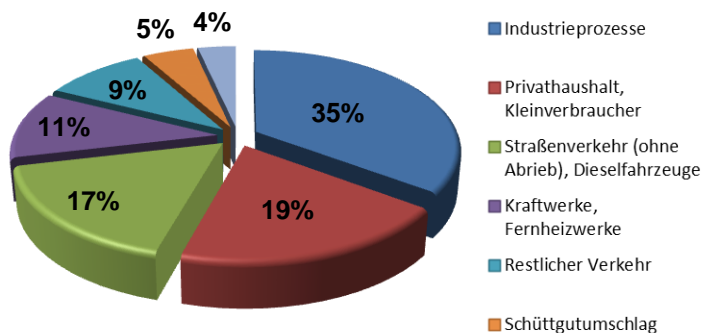


Abbildung 2: Verursacher von Feinstaub anthropogenen Ursprungs in Deutschland 2001.

(Quelle: Umweltbundesamt 2004)

Im Gegensatz zu industriell hergestellten Partikeln ist Feinstaub eine heterogene Mischung unterschiedlich großer Partikel verschiedener Zusammensetzung, die sich in ihrer Form und Oberflächenstruktur unterscheiden und darüber hinaus eine Vielzahl von Verunreinigungen mit Metallen (z. B. Fe, Na, Al, Ca, K, Mg, Ba, Pb), Salzen (primär als Nitrate und Sulfate) und organischen Verbindungen, vor allem aus unvollständigen Verbrennungsprozessen (z. B. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, PAH), aufweisen [1–4]. Abbildung 3 gibt eine Übersicht über die chemische Diversität von Feinstaub in Abhängigkeit von der Partikelgröße wieder.

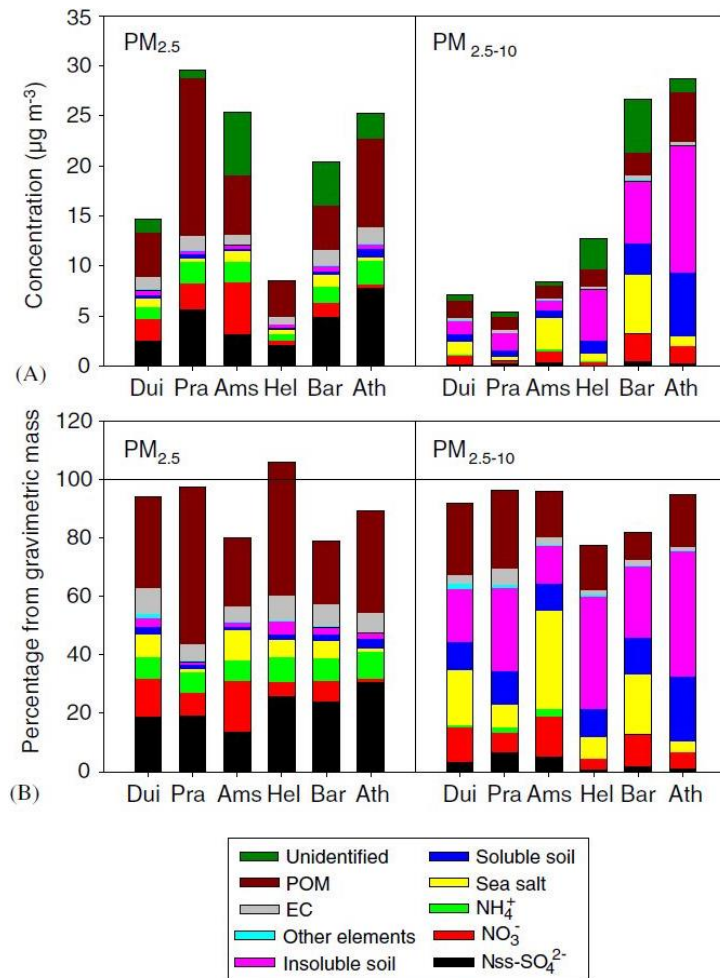


Abbildung 3: Zusammensetzung von Feinstaub am Beispiel der Großstädte Duisburg, Prag, Amsterdam, Helsinki, Barcelona, Athen.

Dargestellt sind die mittleren Massenkonzentrationen (A) und der relative Gehalt (B) von neun chemischen Substanzen und nicht identifizierten Materialien (POM: *particulate organic matter*; EC: *elemental carbon*; Nss- SO_4^{2-} : *non-sea-salt sulfate*).

(Quelle: Sillanpää et al. [3], *reprinted with permission from Elsevier*)

1.3 Dieselruß

Ein Hauptbestandteil der $\text{PM}_{2.5}$ - und $\text{PM}_{0.1}$ -Fraktionen des Feinstaubs sind Dieselrußpartikel, wobei bis zu 90 % der Dieselruße ultrafeine Partikel ($\text{PM}_{0.1}$) sind [5,6]. Dieselrußpartikel entstehen bei der unvollständigen Verbrennung von Dieselmotorkraftstoff. Der initiale Bildungsprozess von Rußpartikeln aus aromatenfreien Kraftstoffen besteht nach der Acetylentheorie in der Bildung von Benzol bzw. eines Phenylradikals (Abbildung 4).

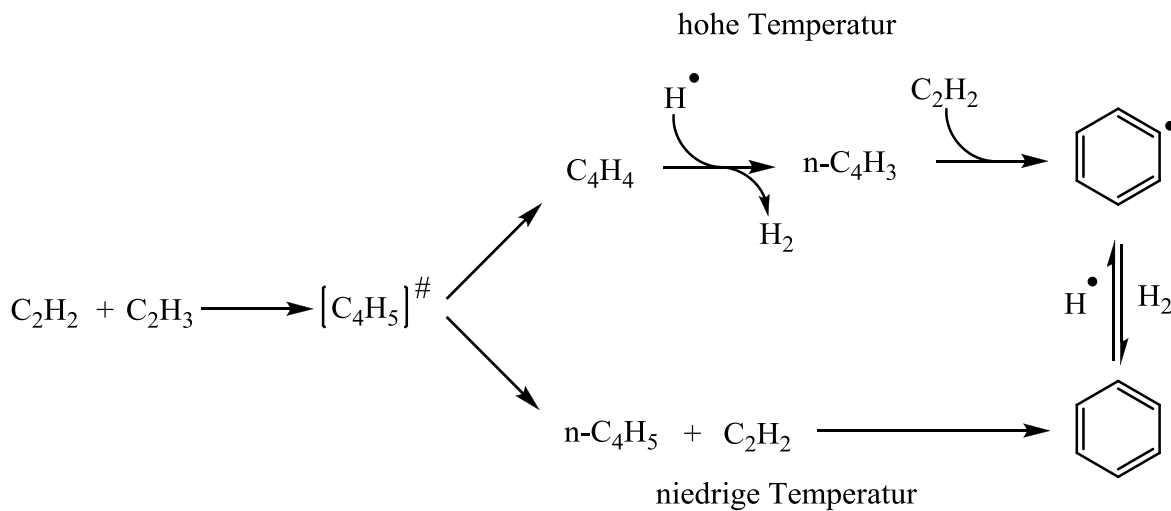


Abbildung 4: Bildung von Benzol bzw. eines Phenylradikals aus aromatenfreien Kraftstoffen nach der Acetylentheorie.

Als initialer Schritt der Partikelbildung wird die Bildung von aromatischen Systemen beispielsweise durch die Reaktion von Ethin mit Ethen angenommen. In Abhängigkeit von der Temperatur erfolgt die Darstellung aromatischer Systeme über ein $n\text{-C}_4\text{H}_3$ -Radikal (hohe Temperatur) oder ein $n\text{-C}_4\text{H}_5$ -Radikal (niedrige Temperatur), welche durch Addition von Ethin zu Benzol bzw. einem Phenylradikal zyklisieren.

(nach Frenklach et al. [7])

Durch einen H-Abstraktions- C_2H_2 -Additions-Mechanismus (*hydrogen abstraction carbon addition*, HACA-Mechanismus) des Ethins erfolgt aus den gebildeten Phenylradikalen die Bildung hochmolekularer polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAH, Abbildung 5), die sich in weiteren Koagulationsprozessen zu 3D-Strukturen zusammenlagern [7].

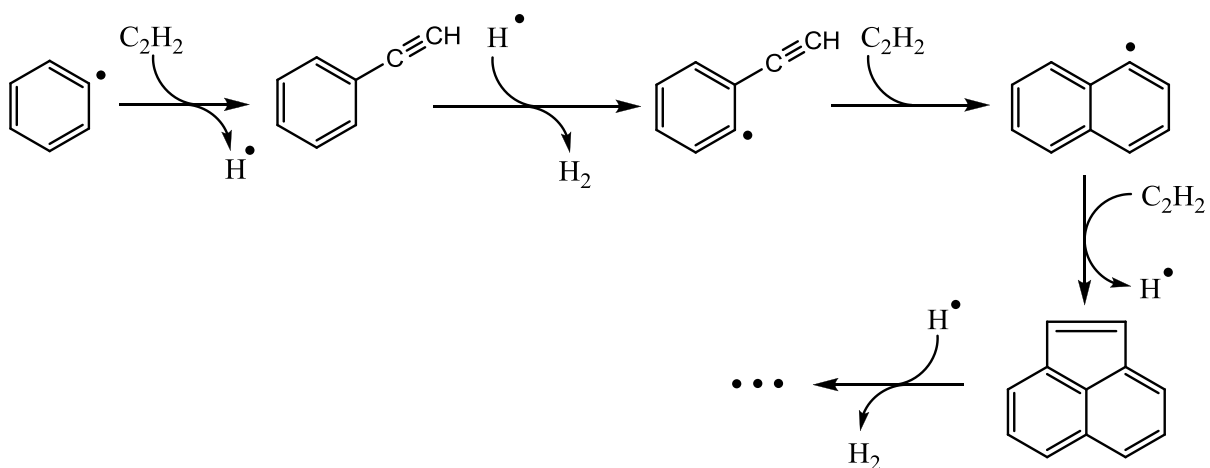


Abbildung 5: PAH-Bildung über den HACA-Mechanismus.

(nach Frenklach et al. [7])

Bei Verwendung aromatenhaltiger Kraftstoffe verläuft der initiale Bildungsprozess von Dieselruß in abgewandelter Form. Die Bildung von PAH erfolgt hier durch direkte Kondensation, gefolgt von H-Abstraktions- C_2H_2 -Additions-Reaktionen zum Ringwachstum (Abbildung 6).

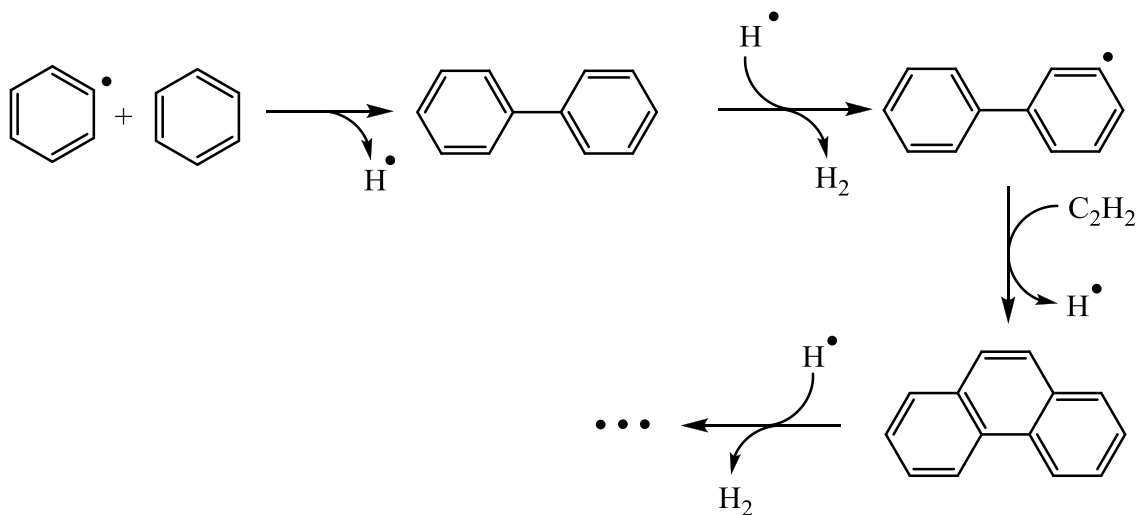


Abbildung 6: Bildung von PAH durch Kondensation von Aromaten, gefolgt von HACA-Reaktionen zum Ringwachstum.

(nach Frenklach et al. [7])

Die Zusammensetzung der Dieselrußpartikel hängt vom Motordesign, von der Arbeitslast, der Drehzahl und der Zusammensetzung des Kraftstoffs ab. Entsprechend unterschiedlich ist die Zusammensetzung der emittierten Dieselrußpartikel. Dieselabgase setzen sich aus einer Vielzahl von Substanzen zusammen, hauptsächlich aus schwerflüchtigen organischen Verbindungen (PAH, Nitro-PAH, Oxy-PAH, Hopanoide und Sterane) und elementarem Kohlenstoff, daneben aus Schwefeloxiden, Stickoxiden, Chloriden, Ammoniumverbindungen, Metallen und leichtflüchtige organischen Verbindungen [5,8]. In Tabelle 1 werden verschiedene Eigenschaften der Dieselruße zusammengefasst.

1.4 Carbon Black

Industrieruß (Carbon Black) wird in vielen Studien aufgrund seiner Reinheit als Surrogat für Dieselruß eingesetzt [9–12]. Carbon Black wird fast ausschließlich nach dem Furnaceruß-Verfahren hergestellt. In diesem Verfahren wird Öl (am besten reich an Aromaten) als Rußrohstoff in einer beheizten Brennkammer bei 1200–1800 °C eingedüst und einer thermischen Zersetzung (Pyrolyse) unterzogen (Abbildung 7).

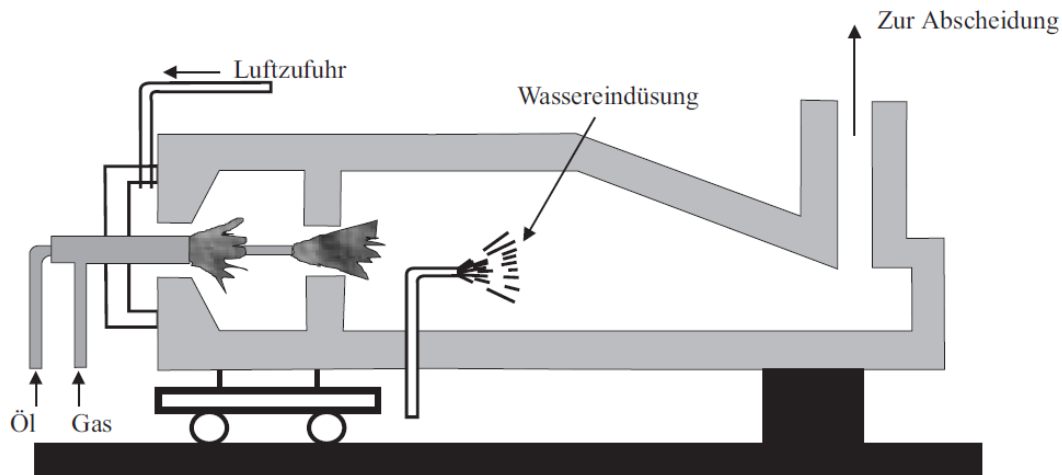


Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Furnace-Rußreaktors zur Herstellung von Carbon Black.
(Quelle: Degussa)

Durch diesen industriell optimierten Prozess lassen sich die generierten Carbon-Black-Partikel physikalisch und chemisch genau definieren. Dementsprechend besteht Carbon Black zu mehr als 97 % aus Kohlenstoff und ist nur in geringem Umfang (<1 %) mit Schwefel und organischen Verbindungen (einschließlich PAH) kontaminiert. Die primäre Partikelgröße der hergestellten Partikel liegt üblicherweise im Bereich von 10-500 nm, wobei Aggregate selten einen Durchmesser von über 1 μm besitzen [6].

Der größte Teil des produzierten Carbon Black wird als Verstärkerfüllstoff in der Gummiindustrie verarbeitet, der Rest als Pigmente in Druckfarben und Lacken oder in der Kunststoff- und Elektroindustrie.

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über verschiedene Charakteristika von Dieselruß- und Carbon-Black-Partikeln.

Tabelle 1: Charakteristika von Dieselrußpartikeln im Vergleich zu Carbon Black.

(nach Watson et al. [6])

	Dieselruß	Carbon Black
Kohlenstoffgehalt	$\leq 60 \%$	$\geq 97 \%$
Partikelgröße	$\leq 2,5 \mu\text{m}$ 90 % als $\text{PM}_{0,1}$ (bezogen auf die Partikelanzahl)	10–500 nm
Agglomerate	traubenförmig aus sphärischen Primärpartikeln	traubenförmig aus sphärischen Primärpartikeln
Verhältnis Wasserstoff zu Kohlenstoff (H/C)	~ 1	$\leq 0,05$
Aschegehalt	variabel	$\leq 1 \%$
organische Bestandteile	10–65 %	$\leq 1 \%$
anorganische Bestandteile	1 %	0,1–1 %

1.5 Deposition von Feinstaub im Organismus und Toxikokinetik

Zentrale Eintrittspforte für Feinstaub in den menschlichen Organismus ist die Lunge mit ihrer 140 m^2 großen Oberfläche. Die Verteilung inhalierter Feinstaubpartikel im Respirationstrakt erfolgt nicht homogen. Nach dem Modell der Internationalen Strahlenschutzkommission (International Commission on Radiological Protection, ICRP) wird angenommen, dass die einzelnen Partikelfraktionen (PM_{10} , $\text{PM}_{2,5}$, $\text{PM}_{0,1}$) in verschiedenen Bereichen des Respirationstrakts abgeschieden werden. Nach diesem Modell werden Partikel der Größe PM_{10} überwiegend im Nasopharynx (Nasenrachenraum) deponiert, Partikel der Größe $\text{PM}_{2,5}$ größtenteils im Nasopharynx und den Alveolen (Lungenbläschen) und Ultrafeinstaub abhängig vom aerodynamischen Durchmesser über alle Kompartimente der Lunge, $<0,005 \mu\text{m}$ im Nasopharynx, $0,005\text{-}0,015 \mu\text{m}$ primär im tracheobronchialen Raum (Luftröhre-Bronchien) und $0,015\text{-}0,1 \mu\text{m}$ in den Alveolen (Abbildung 8) [1,13].

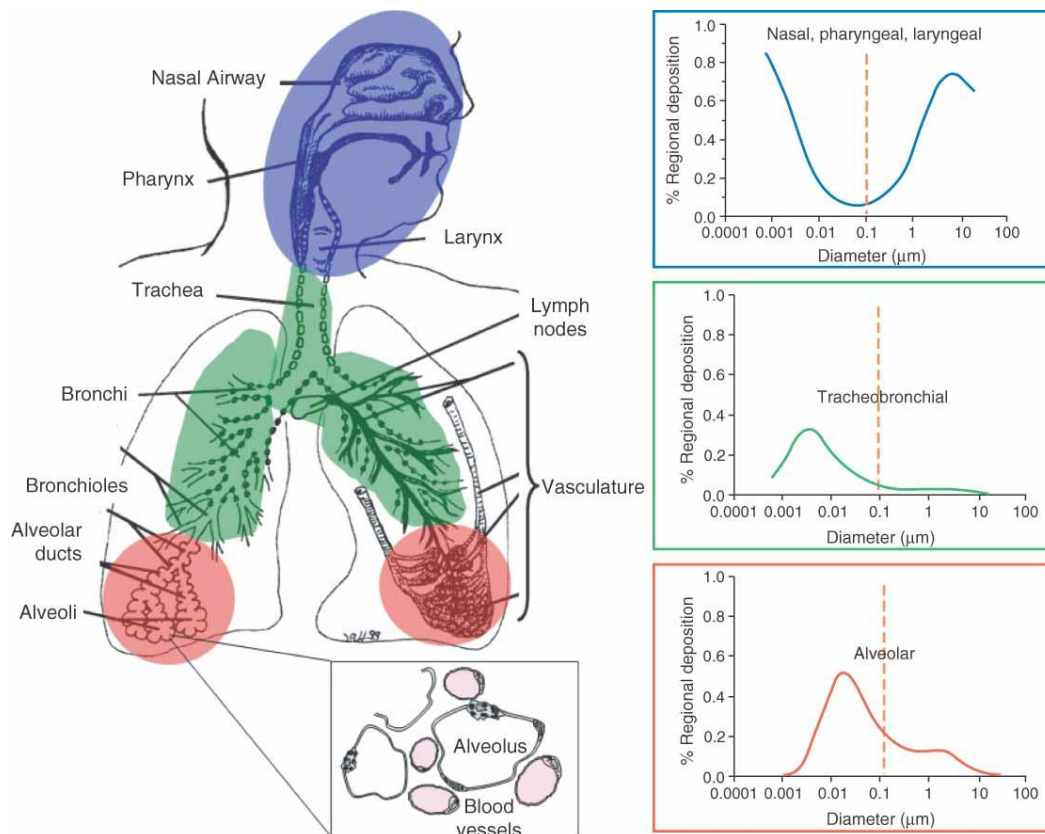


Abbildung 8: Deposition inhalierter Partikel in der Lunge.

Partikel der Größenklasse PM_{10} werden überwiegend im Nasenrachenraum (Nasopharynx) abgeschieden, während sich Partikel der Größe $\text{PM}_{2,5}$ überwiegend Nasopharynx und in geringerem Maße in den Alveolen niederschlagen. Die kleinste Fraktion, Partikel der Größe $\text{PM}_{0,1}$, werden in Abhängigkeit von ihrer Größe in allen Kompartimenten der Lunge deponiert ($<0,005 \mu\text{m}$ im Nasopharynx, $\sim 0,01 \mu\text{m}$ im tracheobronchialen Raum und $>0,01 \mu\text{m}$ in den Alveolen). Basierend auf dem theoretischen Verteilungsmodell der International Commission on Radiological Protection.

(Quelle: Elder et al. [14], reprinted with permission from John Wiley and Sons)

Der im Atemtrakt deponierte Feinstaub wird durch verschiedene Reinigungsmechanismen (Clearance) eliminiert, die vom Ort der Deposition abhängen. Während Feinstaub aus dem oberen Respirationstrakt (Nasenrachenraum und tracheobronchialer Raum) durch mukoziliäre Clearance (Flimmerhärchen in den Bronchien und Bronchiolen) sowie Husten, Niesen oder Verschlucken entfernt wird, müssen alveolär deponierte Partikel durch Makrophagen (Alveolarmakrophagen, AM) aufgenommen und entfernt werden. Die Clearance durch Alveolarmakrophagen ist ein zeitaufwändiger Prozess, der u. a. von der Erkennung der Partikel als Fremdkörper, aber auch von der Menge und Zusammensetzung der deponierten Partikel abhängt. Inhalationsstudien mit radioaktiv markierten Partikeln ergaben entsprechende Verweildauern von bis zu 700 Tagen im Menschen [15–17].

Eine lange Verweildauer begünstigt die Translokation und die Verteilung der Partikel im gesamten Organismus. Die Translokation in den Blutkreislauf und die direkte Interaktion mit sekundären Organen ist neben Immunreaktionen des Lungenepithels ein wesentlicher Prozess, durch den gesundheitliche Effekte ausgelöst werden können. In-vivo-Untersuchungen an Ratten ergaben Translokationsraten zwischen 1 % und 11 % bezogen auf die applizierten Partikel [18,19]. Als vornehmlicher Transportmechanismus wird die Transzytose, d. h. der rezeptorabhängige Transport in Vesikeln durch die Zelle, angenommen (Abbildung 9). Ein wichtiger Faktor spielt dabei die Oberflächenchemie. So wurde beschrieben, dass Partikel, deren Oberfläche mit Albumin, Lecithin, Polyethylenglycol, Polysorbat 80 oder Peptiden beladen ist, bevorzugt aufgenommen werden [20].

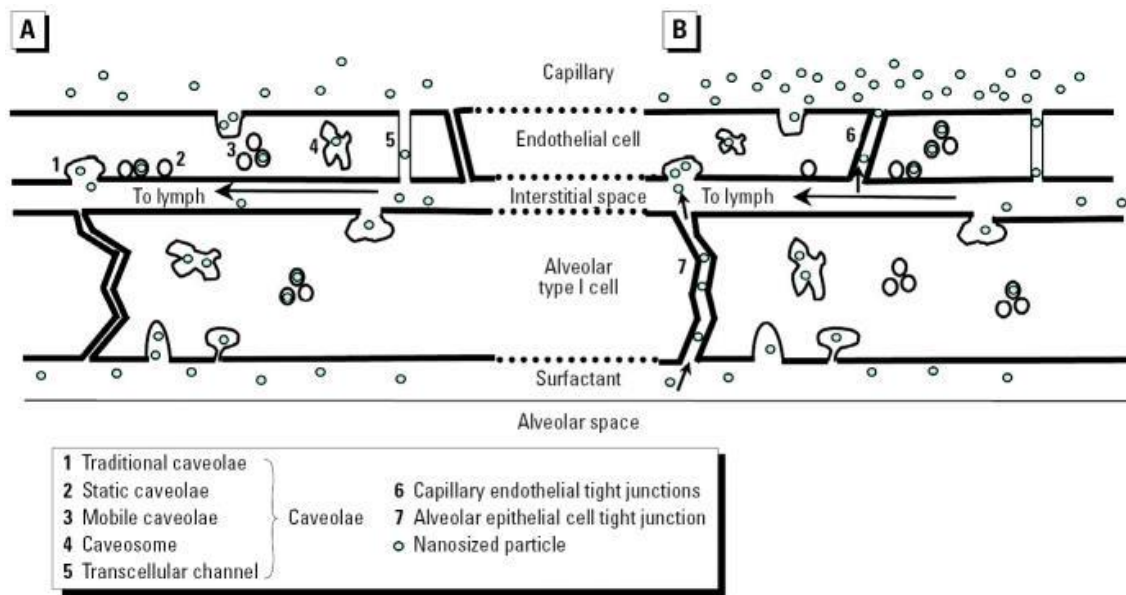


Abbildung 9: Translokation der Partikel in der Lunge

In der gesunden Lunge erfolgt die Translokation der Partikel je nach der Oberflächenchemie der Partikel ausschließlich durch Transzytose (rezeptorabhängiger Transport, A). Die Translokation über *tight junctions* wird nur in gereizten bzw. erkrankten Lungen beobachtet (B).

(Quelle: Oberdörster et. al. [1], *reprinted with permission from Environmental Health Perspectives*)

1.6 Toxizität von Feinstaub

Zahlreiche epidemiologische Studien weisen auf eine erhöhte pulmonale und kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität durch Feinstaubbelastung hin [21–28]. Eine mögliche kanzerogene Wirkung in der Lunge wird derzeit kontrovers diskutiert. Die International Agency for Research on Cancer (IARC) der Weltgesundheitsorganisation hat kürzlich aufgrund neu erschienener epidemiologischer Studien Dieselabgase als krebserregend für den Menschen eingestuft [29,30].

Der zurzeit hauptsächlich angenommene Mechanismus der toxischen Wirkung von Feinstaub ist die Induktion von oxidativem Stress. Die systemischen – speziell kardiovaskulären – Veränderungen werden entweder durch Mediatoren ausgelöst, die infolge der lokalen pulmonalen Effekte freigesetzt werden, oder sie werden durch translozierte Partikel, die direkt die Homöostase im kardiovaskulären System beeinflussen, induziert (Abbildung 10).

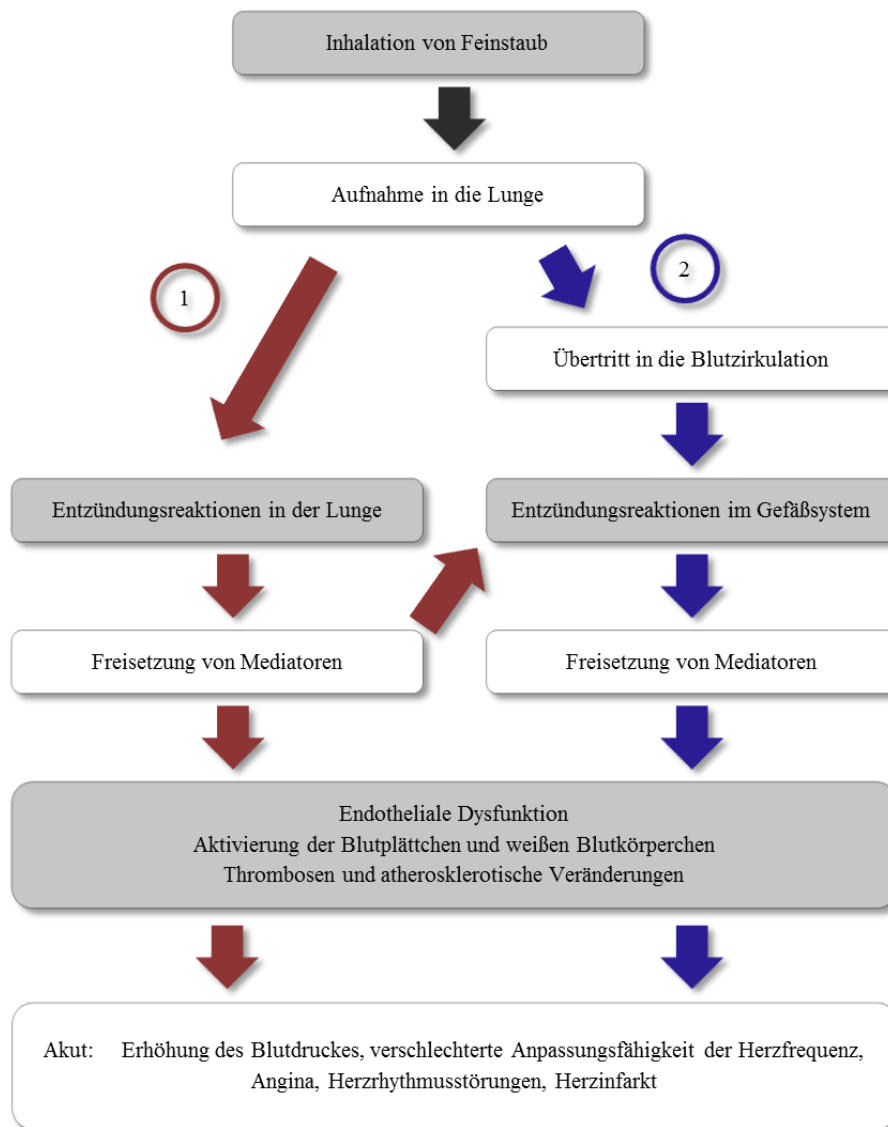


Abbildung 10: Postulierte Mechanismen, über die Nanopartikel das kardiovaskuläre System beeinflussen.

Signalweg 1: Nanopartikel induzieren in der Lunge eine Entzündungsreaktion, die nachfolgend über Mediatoren das Gefäßsystem beeinflusst.

Signalweg 2: Nanopartikel translozieren und lösen lokal im Gefäßsystem eine Entzündungsreaktion aus. Weitere Erklärungen finden sich im Text.

(nach Delfino et al. 2005 und Knol et al. 2009 [31,32])

Systemische Reaktion infolge lokaler Entzündungsreaktionen in der Lunge

Ein Expertengremium aus Klinikern, Toxikologen und Epidemiologen diskutierte 2009 über die Wahrscheinlichkeit einer negativen Wirkung von Nanopartikeln auf die Gesundheit [32]. Basierend auf dem verfügbaren Datenmaterial hielten sie es für wahrscheinlich bis sehr wahrscheinlich, dass Nanopartikel einerseits Atemwegserkrankungen wie Asthma und chronisch-obstruktive Bronchitis verschlimmern und andererseits kardiovaskuläre Erkrankungen negativ beeinflussen, indem sie die Gefäßfunktion beeinträchtigen sowie die Bildung von Thromben und das Fortschreiten der Atherosklerose fördern.

Als Initialschritt der toxischen Wirkungen von Nanopartikeln wird dabei die Induktion von oxidativem Stress mit nachfolgender Inflammation (= Entzündung) in der Lunge angenommen (Abbildung 10, Weg „1“).

Oxidativer Stress beschreibt einen Zustand der Zelle, in dem das Gleichgewicht zwischen der Generierung freier Sauerstoff- und Stickstoffradikale (u. a. Superoxidanion ($O_2^{\bullet-}$), Hydroxylradikal (OH^{\bullet}) oder Stickstoffmonoxid (NO^{\bullet})) und deren Elimination gestört ist. In der Folge beeinträchtigen die Sauerstoffradikale (*reactive oxygen species*, ROS) intrazelluläre Funktionen, indem sie Proteine, Lipide, DNA oder zelluläre Organellen wie z. B. Mitochondrien schädigen. Die Produktion von ROS kann entweder durch die Partikel selbst erfolgen (katalytische Reaktionen auf der Oberfläche) oder durch die Freisetzung von Metallionen und eine nachfolgende Fenton-artige Reaktion [33,34]. Die Fenton-Reaktion ist eine durch Eisenionen ($Fe(II) \rightarrow Fe(III)$) katalysierte Oxidation organischer Substrate durch Wasserstoffperoxid, bei der Sauerstoffradikale (Hydroxyl-Radikale) erzeugt werden. In Fenton-artigen Reaktionen wird das Eisen durch zweiwertige Metallionen (z. B. $Cr(II)$, $Cu(II)$, $Ti(II)$) ersetzt.

Als Antwort auf den oxidativen Stress setzt die Zelle u. a. eine Reihe von Mediatoren (z. B. die Interleukine IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-13, den Tumornekrosefaktor α (TNF- α) sowie die Zelladhäsionsmoleküle ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule*) und VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule*)) frei, welche die Ausbreitung der Entzündung unterstützen und das kardiovaskuläre System durch Endothelschädigungen, Thrombosen und Destabilisierung atherosklerotischer Läsionen beeinflussen sowie die Fließeigenschaft des Blutes verändern [35]. Zusätzlich werden über verschiedene Wege Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B aktiviert, die die Expression von Genen fördern, die u. a. die obigen Proteine kodieren. Daneben aktiviert z. B. NF- κ B die Bildung von Proteinen, die der Zelle helfen, den oxidativen Stress abzubauen [36].

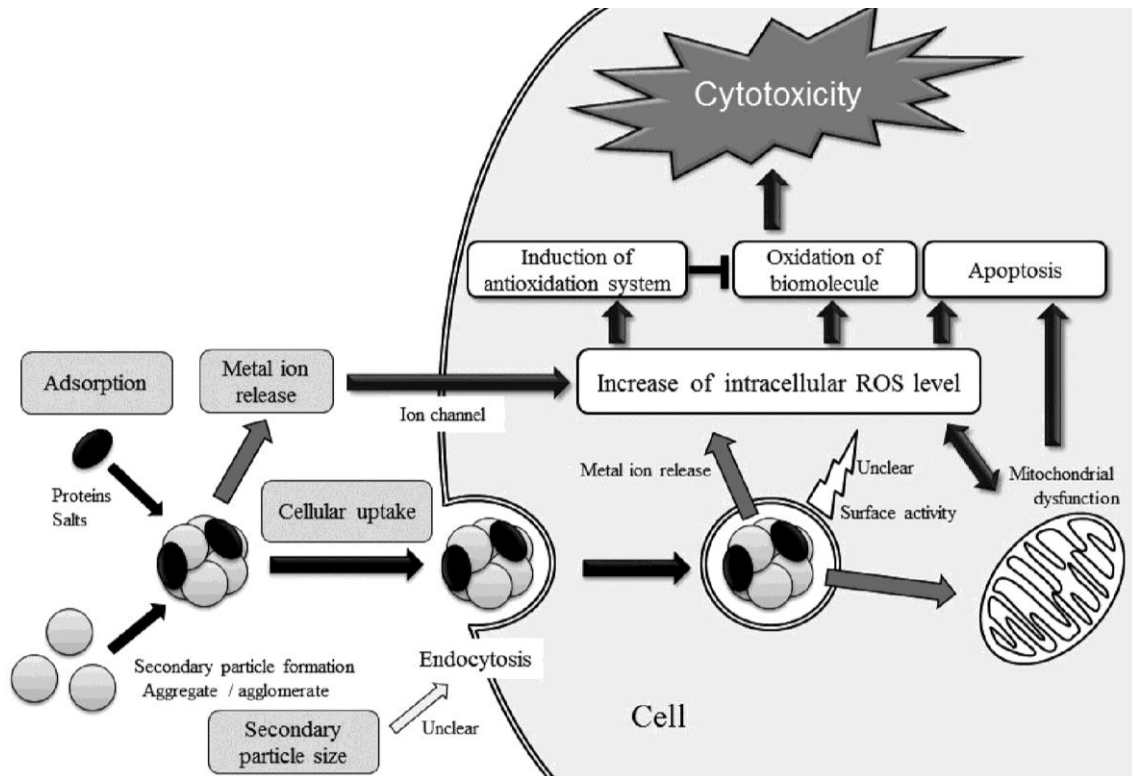


Abbildung 11: Mechanismus der Nanopartikel-induzierten Zytotoxizität.

(Quelle: Horie et al. [34], reprinted with permission from American Chemical Society)

Lokale Reaktionen im kardiovaskulären System bei Nanopartikelexposition

Die Reinigungsmechanismen der Lunge (mukoziliäre Clearance und Phagozytose durch Makrophagen) sind bei der Beseitigung von Ultrafeinstaub weniger effektiv als bei größeren Partikeln. Einerseits verbleiben die Partikel dadurch länger in der Lunge (bis zu 700 Tage) und können dort die oben beschriebenen Reaktionen auslösen, andererseits können sie über einen längeren Zeitraum in das Blutssystem translozieren und die Funktion anderer Organe beeinflussen [15,19,37,38].

Die Blutgefäße werden vom Endothel ausgekleidet. Das Endothel der Koronargefäße erfüllt eine Vielzahl von Aufgaben, indem es z. B. Substanzen produziert, die den Spannungszustand (= Tonus) der Gefäße regulieren. Die wichtigsten Substanzen sind der Vasodilatator Stickstoffmonoxid (NO) und sein Gegenspieler, der Vasokonstriktor Endothelin-1 [39]. Die Störung dieses Gleichgewichts wird als endotheliale Dysfunktion bezeichnet, die zu einer Verminderung der Vasodilatation führt. Die Folgen sind ein Anstieg des Gefäßtonus und eine sinkende Durchblutung. Daneben beeinflusst das Endothel die Fließeigenschaften des Blutes, indem es beispielsweise über die Expression entsprechender Adhäsionsmoleküle Mono-, Granulo- oder Thrombozyten „einfängt“. Außerdem kann es über die Freisetzung von Hormonen die Kontraktilität des Myokards regulieren [40].

Davon ausgehend wird in einer weiteren Hypothese angenommen, dass ultrafeine Partikel in Endothelzellen analog zur Lunge oxidativen Stress auslösen und nachfolgend Reaktionen wie die unter Weg „2“ in Abbildung 10 dargestellten hervorrufen [41]. Allerdings sind die Untersuchungsergebnisse zu diesen Effekten bislang sehr dürftig. So ist nicht bekannt, ob ultrafeine Partikel in endothelialen Zellen ein vergleichbares Maß an oxidativem Stress wie in den Lungenzellen induzieren, welche intrazellulären Abwehrmechanismen in endothelialen Zellen durch oxidativen Stress ausgelöst werden und wie die Signalkette zwischen oxidativem Stress und den in Abbildung 10 beschriebenen kardiovaskulären Veränderungen aussieht.

1.7 Zielsetzung

Die genauen Mechanismen, die zur Entwicklung der durch Feinstaub hervorgerufenen kardiovaskulären Erkrankungen führen, sind nicht bekannt. Diskutierte Mechanismen beruhen auf Experimenten, bei denen meist Nanopartikel in hohen Dosen über einen kurzen Zeitraum eingesetzt wurden. Als Zellmodell für kardiovaskuläre Untersuchungen wurden zudem überwiegend primäre Zellen verwendet, die in Langzeitkultur funktionelle Eigenschaften verlieren und je nach Präparationsmethode als heterogene Zellmischung extrahiert werden, was die proteomischen Analysen erheblich erschwert. Ferner werden häufig Dieselruße eingesetzt, die aus unterschiedlichen Quellen stammen und dadurch in ihrer Zusammensetzung stark variieren, was ebenfalls die Untersuchungsergebnisse entscheidend beeinflusst. Darüber hinaus verfolgen die meisten Studien einen Hypothesen-gesteuerten Ansatz, in dem sie bekannte Mechanismen in einem neuen Kontext – hier im Zusammenhang mit einer Feinstaubbelastung – untersuchen. Nachteil dieser Vorgehensweise ist, dass neue und mitunter unbekannte Mechanismen nicht in den Fokus rücken können.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher ein Studiendesign und Analysetechniken verwendet, die die erwähnten Probleme minimieren sollten.

1.7.1 Studiendesign

Die Exposition des Menschen erfolgt im Gegensatz zu den gängigen experimentellen Studien über einen längeren Zeitraum gegen geringe Dosen. Aus diesem Grunde wurden in der vorliegenden Arbeit ein Expositionszeitraum von 14 Tagen sowie eine Exposition im Niedrigdosisbereich gewählt. Der Dosisbereich wurde in Voruntersuchungen anhand der Effekte auf Proliferation und ROS-Generierung ermittelt.

Die Studien wurden mit Zellen der permanenten endothelialen Zelllinie EA.hy926 durchgeführt, die durch Fusion primärer humaner Endothelzellen (HUVEC) mit der humanen Lungenkarzinom-Zelllinie A549 entstanden ist. Die EA.hy926 Zelllinie besitzt neben eigener Charakteristika zahlreiche Gemeinsamkeiten mit HUVEC-Zellen. Sie verfügt über Endothelspezifische Organellen (Weibel-Palade-Körperchen) und Eigenschaften wie die Fähigkeit, in einen proangiogenen Phänotyp zu konvertieren [42–45].

Dieser Ruß ist in Abhängigkeit vom Entstehungsort mit einer Vielzahl von Substanzen wie Übergangsmetallen (z. B. Eisen, Chrom), Salzen und organischen Verbindungen (z. B. PAH) belastet, die selbst zelluläre Effekte auslösen können. Daher sollten in dieser Arbeit die Zellen gegen die Dieselerußsurrogate Carbon Black und mit Benzo[a]pyren beladenes Carbon Black exponiert werden. Benzo[a]pyren (Leitsubstanz der PAH) soll stellvertretend für die Gruppe der PAH die Kontamination von Dieseleruß mit dieser Verbindungsgruppe simulieren.

1.7.2 Toxikologische Untersuchungen

In der vorliegenden Arbeit sollten die toxischen Reaktionen auf eine Feinstaubexposition mit proteomischen Techniken untersucht werden. Weiterhin sollte eine Methode zur Extraktion phosphorylierter Proteine aus Probenmaterial entwickelt werden, um die wichtige posttranslationale Modifikation der Phosphorylierung von Proteinen mittels 2D-Gelelektrophorese untersuchen zu können. Basierend auf den proteomischen Daten sollten Hypothesen generiert werden, die in metabolischen und funktionellen Untersuchungen weiter überprüft werden sollten.

Zusammengefasst war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Effekte zu analysieren, die auf zellulärer und molekularer Ebene durch eine Langzeitexposition (14 Tage) gegen Carbon Black sowie mit Benzo[a]pyren beladenes Carbon Black im Niedrigdosisbereich hervorgerufen werden. Dies sollte anhand folgender Punkte erfolgen:

- Bestimmung der Schwellenkonzentration, bei der erste zelluläre Veränderungen auftreten

-
- Proteomische Analyse zur Identifizierung zellulärer Signalwege als Antwort auf eine Feinstaub- bzw. Ultrafeinstaubexposition
 - Entwicklung eines Verfahrens zur Extraktion phosphorylierter Proteine aus Harnstoff-haltigem Puffer
 - Verifizierung beobachteter Effekte auf das Proteom durch weitergehende Analysen
 - Untersuchung des Phosphoproteoms und Verifizierung beobachteter molekularer Effekte.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Proteomik (*Proteomics*)

Der Begriff „Proteom“ wurde von Marc R. Wilkins in Anlehnung an den Begriff „Genom“ geprägt und beschreibt die Gesamtheit aller Proteine in einer Zelle, einem Gewebe, Organ oder Lebewesen zu einem definierten Zeitpunkt und unter definierten Bedingungen. Ziel der Proteomik ist die Analyse dieses hochdynamischen Systems, das sich in Abhängigkeit von intra- und extrazellulären Stimuli verändert. Eine technische Herausforderung stellt dabei die ungeheure Vielzahl an zellulären Proteinen (bis zu 1 Million) dar, die nur zum Teil durch Transkription der ca. 30.000 Gene und zu einem viel größeren Teil durch Modifikationen der kodierenden mRNA (alternatives Spleißen) bzw. der Proteine (Strukturänderungen, post-translationale Modifikationen) entstehen.

Entsprechend identifiziert und quantifiziert die Proteomik nicht nur die Proteine, sondern erfasst darüber hinaus auch deren Interaktionspartner sowie ihre Lokalisation, Aktivität und Funktion [46]. Folglich erhält man gewissermaßen eine Momentaufnahme der Zelle, die Rückschlüsse auf aktivierte Signalwege ermöglicht.

2.1.1 2D-Gelelektrophorese

Zwei Schlüsseltechnologien haben zur Entwicklung der heutigen Proteomik geführt. Die erste Schlüsseltechnologie stellt die 2D-Gelelektrophorese dar, die in den 1970er-Jahren entwickelt wurde [47,48]. Sie verknüpft die isoelektrische Fokussierung mit der SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese), wodurch eine große Zahl an Proteinen in Gesamtzellextrakten getrennt und visualisiert werden können. Die isoelektrische Fokussierung beschreibt dabei die Trennung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt bzw. dem Ladungsgleichgewicht zwischen sauren und basischen Aminosäuren im Protein. An diesem Punkt ist die Gesamtladung (Nettoladung) des Proteins gleich null, da die Proteine in Abhängigkeit vom pH-Wert des umgebenden Mediums eine positive oder negative Ladung aufweisen. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes migrieren Proteine entsprechend ihrer Ladung entlang eines pH-Gradienten zur Anode bzw. Kathode, bis ihre Nettoladung null beträgt (Trennung in der ersten Dimension). Zur Trennung in der zweiten Dimension erhalten alle Proteine (elektrisch ungeladen) durch das Beladen mit einem anionischen Detergenz, zumeist Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate* oder SDS), eine konstante negative Ladung und können somit durch erneutes Anlegen eines elektrischen Feldes nach ihrer molekularen Masse („Größe“) getrennt werden. Nach der Färbung der Proteine entspricht die

Intensität eines Spots der „Konzentration“ des enthaltenen Proteins und kann zur relativen Quantifizierung zweier Zustände, zumeist Kontrollzellen gegen exponierte Zellen, verwendet werden [49].

2.1.2 Massenspektrometrie

Die zweite Schlüsseltechnologie stellt die Massenspektrometrie beziehungsweise die Entwicklung der matrixgestützten Laserdesorptions-Ionisierung (MALDI, *matrix-assisted laser desorption/ionization*) und der Elektrospray-Ionisierung (ESI, *electrospray ionization*) dar. Beide ermöglichen die Identifizierung von Proteinen, Peptiden oder posttranslationalen Modifikationen, da diese durch schonende Ionisierung nicht fragmentiert werden [50,51]. Die MALDI-Ionisierung beruht auf der Kokristallisation des Analyten mit einer Matrixsubstanz (Sinapinsäure, α -Cyanozimtsäure). Der genaue Ionisationsmechanismus der matrixgestützten Laserdesorptions-Ionisierung ist unbekannt. Es wird jedoch angenommen, dass durch Absorption der Laserenergie die Matrix photoionisiert (protoniert) und desorbiert wird. Währenddessen wird der im Kristallgitter eingeschlossene Analyt mitgerissen und die Ionisierung von der Matrix auf den Analyten übertragen [52]. Während bei der MALDI-basierten Ionisierung die Verwendung einer Matrixsubstanz notwendig ist, kann bei der Elektrospray-Ionisierung die flüssige Probe direkt ionisiert werden. Das Prinzip beruht auf der Bildung eines elektrischen Feldes zwischen einer Metallkapillare, die die Probe einbringt, und einer Gegenelektrode. An der Spitze der Kapillare bildet sich aufgrund des elektrischen Feldes ein Überschuss gleichartig geladener Ionen, die als Aerosol aus der Kapillare austreten und als Gasphasenionen in das Massenspektrometer überführt werden. Der genaue Mechanismus, der zur Entstehung von Gasphasenionen aus dem Aerosol führt, ist nicht bekannt. Zur Diskussion stehen jedoch das *ion evaporation model* (IEM), nach dem Ionen aus den Aerosoltröpfchen desorbiert werden, und das *charge residue model* (CRM), nach dem kontinuierliche Verdampfungs- und Desorptionszyklen durchlaufen werden, bis alle Analyt-Ionen separiert in einzelnen Tröpfchen vorliegen [53,54].

2.2 Posttranslationale Modifikationen/Phosphorylierung von Proteinen

Posttranslationale Modifikationen (PTM) bzw. die Addition einer funktionellen Gruppe, wie beispielsweise einer Phosphat- oder Glycosyl-Gruppe, verändern entscheidend die Eigenschaften von Proteinen und steuern zellulärer Prozesse. Posttranslationale Modifikationen stellen somit fundamentale Prozesse in der Regulation der biologischen Aktivitäten dar, deren Störung zu verschiedenen Krankheiten, einschließlich der Bildung von Tumoren, führen kann [55,56].

Die Phosphorylierung von Proteinen wird durch ein fein reguliertes System von Protein-kinasen und Phosphatasen gesteuert. Das menschliche Genom kodiert dazu mehr als 500 Kinasen und 100 Phosphatasen, aber nur 1 % der zellulären Proteine sind zu einem gegebenen Zeitpunkt reversibel phosphoryliert. Dies entspricht einer Konzentration von etwa 10 bis 100 fmol Proteinen [57]. Gleichwohl wird angenommen, dass wenigstens 30 % bis 50 % der Proteine während ihrer Lebensdauer phosphoryliert werden [58].

Die dynamische Natur (Kinetik) der Phosphorylierung bietet der Zelle eine Vielzahl von Reaktionen als Antwort auf sich ändernde Bedingungen. Die Anzahl an möglichen Antworten wird zusätzlich durch den Umstand erhöht, dass Proteine an verschiedenen Aminosäureresten sowie mehrfach phosphoryliert werden können. Im Zusammenhang mit der geringen Menge und der niedrigen Stöchiometrie an modifizierten Proteinen, ist die Forschung am Phosphoproteom eine anspruchsvolle Aufgabe.

Obwohl erhebliche Anstrengungen in den letzten Jahren unternommen worden sind, wird die Forschung auf dem Gebiet der Proteinphosphorylierung durch analytische Einschränkungen erschwert. Dennoch wurden eine Reihe von analytischen Methoden in den letzten Jahren etabliert [55,56,59]. In Gel-basierten proteomischen Ansätzen können Phosphoproteine durch die Verwendung eines spezifischen fluoreszierenden Farbstoffs Pro-Q[®] Diamond [60–62], durch Isotopenmarkierung mit ³²P-*ortho*-Phosphat [60,63] oder durch Antikörperdetektion im Western Blot [64] nachgewiesen werden. Diesen Techniken gemeinsam ist die Markierung der phosphorylierten Proteine in Gegenwart des gesamten Proteoms. Dies ist jedoch eine schwierige Aufgabe in Anbetracht des geringen Vorkommens der meisten Phosphoproteine. Die Anreicherung der Phosphoproteine ist dabei ein vielversprechender Ansatz. Zu den verfügbaren Methoden gehören chromatographische Methoden wie die *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography* (IMAC) mit Fe³⁺-, Al³⁺-, Ga³⁺-, Zr⁴⁺- oder Ti⁴⁺-Ionen [65–69], die Metalloxid-Affinitätschromatographie (MOAC) mit TiO₂ [70], die Ionenaustauschchromatographie (kationisch) [71] oder das Verfahren der Immunopräzipitation [72,73]. Chromatographische Anreicherungsmethoden scheinen jedoch mit einer geringen Reproduzierbarkeit, Spezifität, Effizienz und dem Verlust von Probenmaterial einherzugehen [56,74].

2.3 Metabolomik (*Metabolomics*)

Das Metabolom bezeichnet die Stoffwechselprodukte (Metaboliten), die in jeder lebenden Zelle oder in einem Organismus gefunden werden [75,76]. Ähnlich der Proteomik werden Metaboliten qualitativ und quantitativ (u. a. Aminosäuren, Fettsäuren, Kohlenhydrate) analysiert. Die Analyse der zellulären Metaboliten liefert wichtige Informationen über die

Physiologie bzw. Pathophysiologie der Zelle, die die Daten der anderen „omics“-Technologien ideal ergänzen und die Momentaufnahme der Zelle weiter vervollständigen.

Metabolic profiling bzw. die Analyse der Metaboliten erfordert eine Reihe von analytischen Werkzeugen, um die Gesamtheit der chemisch sehr divergenten Metaboliten zu erfassen und die zellulären Änderungen zu charakterisieren. Neben geeigneten Extraktionsverfahren ist deshalb die Wahl einer geeigneten Trennmethode ein zentraler Aspekt der Metabolomik. Typische Methoden sind die Gaschromatographie (GC), [Hochdruck-]Flüssigkeitschromatographie ([*high pressure*] *liquid chromatography*; [HP]LC) oder Kapillarelektrophorese (*capillary electrophoresis*; CE), gekoppelt mit einer massenspektrometrischen Detektion und Charakterisierung der separierten Metaboliten [76–79]. Bevorzugt wird die Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC/MS), da diese im Vergleich zu den flüssigkeitsbasierten Methoden ([HP]LC, CE) eine höhere chromatographische Auflösung besitzt.

2.3.1 Gaschromatographie

Die Gaschromatographie stellt eine Trennmethode dar, die auf dem Prinzip der Adsorptions- bzw. der Verteilungschromatographie beruht. Bei der Adsorptionschromatographie ist die stationäre Phase ein Feststoff (Aluminium- oder Siliziumoxid), bei der Verteilungschromatographie ein Flüssigkeitsfilm (Polyorganosiloxane). Als mobile Phase werden üblicherweise inerte oder nichtreaktive Gase (Stickstoff, Helium) verwendet. Grundvoraussetzung für die gaschromatographische Bestimmung ist die zersetzungsfreie Verdampfung der Analyten. Schwerflüchtige Analyten müssen dazu vor der Analyse ggf. durch Derivatisierung polarer Gruppen in leichter flüchtige Substanzen umgewandelt werden. Die Derivatisierung polarer Gruppen senkt zum einen den Siedepunkt (bessere thermische Stabilität) und erhöht andererseits den Gehalt an detektierbaren Analyten [80]. Gebräuchliche Derivatisierungsmittel sind u. a. Methoxyamin (zum Schutz von Aldehyd- und Ketogruppen in Zuckern) sowie Trimethylsilyl-haltige Verbindungen (z. B. MSTFA, BSTFA), die die Siedepunkte in Hydroxy-, Thiol-, Amin-, Amid- oder Carboxylgruppen-haltigen Verbindungen senken [81]. Die aufgetrennten Metaboliten werden in der nachfolgenden Massenspektrometrie identifiziert bzw. charakterisiert, die üblicherweise mit chemischer (*chemical ionization*; CI) oder elektronenstoßinduzierter (*electron impact*; EI) Ionisation arbeiten. Die elektronenstoß-induzierte Ionisation erfolgt dabei gewöhnlich mit Ionisierungsenergien, die größer als die Bindungsenergie in kovalenten Bindungen sind, typischerweise mit 70 eV. Dies ermöglicht die Aufnahme von Analyten-spezifischen Fragmentspektren, die durch den Vergleich mit

Substanzen in entsprechenden Datenbanken (GMD - The Golm Metabolome Database) identifiziert werden können [82].

3 Methoden

3.1 Herstellung von Benzo[a]pyren-beladenem Carbon Black (CB+B[a]P)

Zur Herstellung eines Surrogats für Dieselrußpartikel wurde Printex[®] 90 (Evonik, Essen, Deutschland) mit Benzo[a]pyren beladen. B[a]P ist die Leitsubstanz der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAH). Es ist in Wasser unlöslich und ein vollständiges Kanzerogen nach metabolischer Aktivierung.

Die Beladung der Nanopartikel bzw. die Adsorption von B[a]P an die Partikeloberfläche erfolgte nach der von Dasenbrock et al. beschriebenen Methode [83]. Nach dieser Methode wurde 1 g der Printex[®] 90-Partikel in 50 mL *n*-Hexan aufgenommen und mit 30 mg B[a]P versetzt. Nach einer Inkubationsdauer von 10 Minuten wurden die Partikel durch einen 0,45 µm PTFE-Membranfilter filtriert und zweimal mit 5 mL *n*-Pentan gewaschen.

3.1.1 Quantifizierung des Benzo[a]pyren-Gehalts der beladenen Partikel (CB+B[a]P)

Die Quantifizierung des B[a]P-Gehalts der beladenen Partikel erfolgte nach Soxhlet-Extraktion durch gaschromatographische Analyse des erhaltenen Extraktes.

Zur Extraktion des adsorbierten B[a]P wurden 6,21 mg der Partikel in eine Extraktionshülse überführt und mit Toluol als Lösungsmittel in einer Soxhlet-Apparatur für sechs Stunden unter Rückfluss erhitzt. Im Anschluss an die Extraktion wurde das B[a]P-haltige Toluol auf Raumtemperatur gekühlt, danach wurden 90 µL der Lösung mit 10 µL B[a]P-d12 (100 µg/mL) versetzt. Die Probe wurde in einem GC/MS System (HP 6890/5973, Agilent Technologies, Santa Clara, USA), ausgerüstet mit einer Optima 5-Säule (5 % Phenyl – 95 % Methylpolysiloxan), analysiert. Die Probe wurde in den Gaschromatographen mittels computergesteuertem Injektor injiziert (HP 6890 Injektor, splitlose Injektion, 1 µL Probenvolumen). Das Temperaturprofil für die Messung ist in Tabelle 2 wiedergegeben.

Tabelle 2: Temperaturprofil zur B[a]P-Quantifizierung

GC-Bauteil	Temperaturanstieg	Endtemperatur	Vorhaltezeit
Injektor		270 °C	konstant
Säulenofen		80 °C	10 min
	12 °C/min	250 °C	8 min
	5 °C/min	290 °C	10 min
Quadrupol		150 °C	
MS-Quelle		230 °C	

Die massenspektrometrische Analyse wurde im *Single Ion Monitoring*-Modus (SIM, Detektion ausgewählter Ionen) für die Ionen mit m/z 252 (B[a]P) und m/z 264 (B[a]P-d12) durchgeführt. Die Analyten wurden durch Elektronenstoß im positiven Modus mit einer Ionisierungsenergie von 70 eV in einem Quadropolmassenspektrometer (HP 5973) ionisiert. Die B[a]P-Konzentration wurde über eine Eichgerade ermittelt, die anhand des Ionenstromverhältnisses verschiedener B[a]P-Konzentrationen (0,5; 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 25 $\mu\text{g/mL}$) gegen den internen Standard B[a]P-d12 (1 $\mu\text{g/mL}$) erstellt wurde.

3.1.2 Bestimmung der Partikelgröße in Suspension

Die Partikelgröße wurde am Institut für Anorganische Chemie der Universität Duisburg-Essen (Arbeitskreis Prof. Epple) bestimmt. Als Analysetechnik wurde das Prinzip der dynamischen Lichtstreuung (*dynamic light scattering*, DLS) verwendet. Die Messung der dynamischen Lichtstreuung wurde bei einer Laser-Wellenlänge von 633 nm durchgeführt (Malvern Zetasizer Nano ZS). Die Partikelsuspension (Konzentration 100 ng/mL in Zellkulturmedium) wurde in Plastikkuvetten mit einer optischen Weglänge von 1 cm vermessen. Zur Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers wurde die Autokorrelationsfunktion pro Messung über drei Zyklen je 30 s aufgenommen und aus drei Messungen der Mittelwert gebildet. Die Partikelsuspension wurde wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben hergestellt.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Zelllinie EA.hy926

Für alle Experimente wurden humane Endothelzellen der Zelllinie EA.hy926 (ATCC Nr. CRL-2922) verwendet. Zellen dieser Zelllinie entstanden durch Fusionierung von primären Nabelschnurendothelzellen mit der humanen Lungenepithel-Zelllinie A549 mittels Exposition gegen Polyethylenglycol (PEG). Die Zellen wachsen adhärent als Monolayer und besitzen die typischen Charakteristika endothelialer Zellen, wie die Fähigkeit zur Angiogenese sowie zur Modulation des Blutflusses, des Blutdrucks und entzündlicher Prozesse.

3.2.2 Subkultivierung

Die Zellen wurden unter standardisierten Wachstumsbedingungen von Mitarbeiterinnen des Instituts für Hygiene und Arbeitsmedizin kultiviert.

Die Zellkultivierung erfolgte bei 37 °C in einer 5 %igen CO₂-Atmosphäre. Als Zellkulturmedium wurde DMEM NEAA verwendet, welches 10 % FCS enthält. Das Nährmedium wurde alle drei Tage gewechselt und konfluente Zellen auf neue Kulturflaschen (175 cm²) verteilt („gesplittet“). Das Medium konfluenter Zellen wurde dafür entfernt und die Zellen

zunächst mit warmem PBS (37 °C) gewaschen, bevor zum Ablösen der Zellen 10 mL Trypsin-Lösung zugesetzt wurde. Nach einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen durch Schütteln vom Flaschenboden gelöst und in einem Falcon-Röhrchen gesammelt. Zur Hemmung des Trypsins wurden die Zellen in Zellkulturmedium suspendiert und anschließend durch Zentrifugation (50 x g, 10 min, 4 °C) sedimentiert. Das Medium wurde im Anschluss an die Zentrifugation verworfen, die Zellen wurden in einem Milliliter frischem Nährmedium aufgenommen. Je nach Verwendung der Zellen wurden diese um den Faktor 10 verdünnt ausgesät oder nach dem Auszählen in Tests verwendet.

3.2.3 Partikelsuspension und Zellexposition

Abhängig von den geplanten Experimenten wurden die Zellen entweder in Kulturflaschen (75 oder 175 cm²) oder in 96-Well-Platten für 14 Tage gegen Carbon Black bzw. B[a]P-beladenes Carbon Black exponiert. Die Partikel wurden im Zellkulturmedium aufgenommen und im Ultraschallbad homogenisiert, bis keine Agglomerate mehr erkennbar waren. Die Konzentration der Stammlösung betrug 0,1 mg/mL. Aliquote der homogenisierten Stammlösung wurden anschließend mit Zellkulturmedium auf die jeweiligen Partikel-Expositionskonzentrationen verdünnt. Die Exposition erfolgte durch den Wechsel des Zellkulturmediums gegen partikelhaltiges Kulturmedium. Zu jedem exponierten Ansatz wurde eine nicht-exponierte Kontrolle parallel kultiviert. Der Wechsel des Mediums erfolgte alle drei Tage, wobei die Zellen erneut gegen eine frisch präparierte Partikellösung exponiert wurden. Demnach wurden die Zellen während 14 Tagen insgesamt viermal exponiert (Maximalkonzentration nach 14 Tagen Exposition 400 ng/mL).

3.3 Toxikologische Zelltests

3.3.1 BrdU-Assay

Zur Bestimmung der Zellteilungsrate (Proliferation) wurde dem Zellkulturmedium 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU), ein Nukleosidanalogen von Desoxythymidin, zugegeben. BrdU kann von der Zelle aufgenommen werden und wird während der Replikationsphase (S-Phase) des Zellzyklus in die DNA anstelle von Desoxythymidin eingebaut. In die DNA eingebautes BrdU kann anschließend in einem Immunoassay detektiert werden.

25000 Zellen der Zelllinie EA.hy926 wurden je Well auf einer 96-Well-Platte ausgesät und für 14 Tage gegen Carbon Black bzw. B[a]P-beladenes Carbon Black exponiert. Die Exposition erfolgte in einem Konzentrationsbereich von 0,1 ng/mL bis 1000 ng/mL. 3,5 Stunden vor Ablauf der Exposition wurde *BrdU-Labeling-Lösung* (100 µM)

hinzugegeben. Nach Abschluss der 14-tägigen Exposition wurden die Zellen gewaschen (PBS/10 % FCS) und mit einer sauren Ethanol-Lösung (70 % Ethanol, 7,5 % 4 M HCl) für 30 Minuten bei -20 °C fixiert, bevor die Zellen mit Nuklease für weitere 30 Minuten bei 37 °C inkubiert wurden. Die Zellen wurden danach dreimal gewaschen (PBS/10 % FCS) und für 30 Minuten mit anti-BrdU-Antikörpern bei 37 °C inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden anschließend durch Waschen mit 1 %iger wässriger BSA-Lösung entfernt, bevor die Peroxidase/0,1 % *Substrat-Enhancer*-Lösung zugegeben wurde. Nach 30-minütiger Inkubation wurde die Fluoreszenzintensität der Lösung in einem Mikroplatten-Reader gemessen (Exzitations-/Emissionswellenlänge: 405 nm/490 nm).

3.3.2 ROS-Assay

Der Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies wurde durch Fluoreszenzquantifizierung mit H₂DCF-DA gemessen. H₂DCF-DA (2',7'-Dichlordihydrofluoresceindiacetat) ist ein etablierter Fluoreszenzindikator für Sauerstoffradikale, welcher durch Diffusion in die Zelle aufgenommen wird. Nach erfolgter Aufnahme wird die Acetatgruppe des Fluorophors durch intrazelluläre Esterasen hydrolysiert. Durch Reaktion mit gebildeten ROS wird H₂DCF zu 2',7'-Dichlorfluorescein (DCF) oxidiert, welches bei Licht der Wellenlänge 488 nm fluoresziert.

25000 Zellen der Zelllinie EA.hy926 wurden je Well auf einer 96-Well-Platte ausgesät und für 14 Tage gegen Carbon Black bzw. B[a]P-beladenes Carbon Black exponiert. Die Exposition erfolgte in einem Konzentrationsbereich von 1 ng/mL bis 1000 ng/mL. Im Anschluss an die Exposition wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit H₂DCF-DA (0,01 % in PBS) für 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Fluoreszenzintensität wurde in einem Mikroplatten-Reader gemessen (Exzitations-/Emissionswellenlänge: 488 nm/535 nm)

3.4 Proteomische Analyse von Zellen nach Exposition gegen Dieselruß-surrogate

3.4.1 Zellyse

Zur proteomischen Analyse wurden die Zellen in Kulturfleichen mit einer Fläche von 175 cm² für zwei Wochen gegen 100 ng/mL Carbon Black bzw. B[a]P-beladenes Carbon Black exponiert und nachfolgend wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben mit Trypsin vom Flaschenboden abgelöst und sedimentiert (Zellernte). Die erhaltenen Zellen wurden anschließend dreimal mit eiskühler Tris-Sucrose-Lösung (10 mM Tris-HCl, 250 mM Sucrose, pH 7,0) gewaschen und durch Zugabe von einem Milliliter Lysispuffer (8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff,

2 % CHAPS, 1 % DTT, 0.8 % Ampholyte, 3 Tabletten Proteaseinhibitor-Cocktail je 20 mL Puffer) bei 4 °C für 30 Minuten lysiert. Anschließend wurden die Proteine von den Zellresten durch Ultrazentrifugation (30000 x g, 60 min, 4 °C) getrennt. Die gewonnene Proteinlösung wurde entnommen und die Proteinkonzentration mithilfe des Bradford-Tests bestimmt.

3.4.2 Proteinextraktion aus dem Zellkern

Die Proteinextraktion aus dem Zellkern erfolgte entsprechend dem Protokoll des Herstellers (Cayman Chemical, Item Number 10009277, Tallinn, Estland).

Exponierte bzw. nichtexponierte Zellen von zwei 75 cm²-Flaschen wurden geerntet und in ein gekühltes 15 mL Falcon-Röhrchen (4 °C) überführt. Anschließend wurden die Zellen einmal mit kalter PBS-Lösung (1 ml, 4 °C) und zweimal mit 3 mL kalter PBS/Phosphatase-Inhibitor-Lösung gewaschen (Zentrifugation bei 400 × g, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 500 µL hypotonischem Puffer mit Phosphatase-Inhibitoren resuspendiert. Das Aufbrechen der Zellen erfolgte durch Inkubation in hypotonischem Puffer für 15 Minuten auf Eis. Zu den lysierten Zellen wurden 100 µL Nonident-P40 (10 %) zugegeben und die zytosolische Fraktion (Überstand) von der nukleären (Pellet) durch Zentrifugation getrennt (30 s, 18000 x g, 4 °C). Das Pellet wurde nachfolgend in 50 µL *Nuclear-Extraction-Puffer*, welcher Phosphatase-Inhibitoren enthielt, resuspendiert. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Suspension gevortext und für 15 Minuten zentrifugiert (18000 x g, 4 °C). Der Überstand (nukleäre Proteinfraction) wurde entnommen und bei -80 °C eingefroren.

3.4.3 Bradford-Test

Die Proteinkonzentration der erhaltenen Zelllysate wurde mit dem Bradford-Test bestimmt [84]. Der Test beruht auf der Bindung eines Farbstoffs (Coomassie) an die Proteine, gefolgt von einer differenziellen Farbänderung als Reaktion auf verschiedene Proteinkonzentrationen. Das Absorptionsmaximum der sauren Reagenzlösung verschiebt sich bei Reaktion mit Proteinen von 465 nm nach 595 nm. Zur Kalibration wurden Albumin-Standards mit verschiedenen Konzentrationen (50 µg/mL bis 500 µg/mL) verwendet, da der Extinktionskoeffizient des Farbstoff-Albumin-Komplexes über einen 10-fachen Konzentrationsbereich hinweg konstant ist [85].

Der Assay wurde im Mikromaßstab auf 96-Well-Platten durchgeführt. Dazu wurden 10 µL Zelllysate-Proben mit Wasser (MilliQ) um die Faktoren 1:10, 1:20, 1:40 und 1:80 verdünnt und jeweils als Dreifachbestimmung auf die 96-Well-Platte aufgetragen (10 µL je Well). Die Bestimmung des Standards erfolgte ebenfalls als Dreifachbestimmung (10 µL je Well). Die

benötigte Menge an Farbstofflösung (BioRad, München, Deutschland) wurde der Vorratsflasche entnommen und im Verhältnis 1:5 mit Wasser verdünnt. Danach wurden Farbstoffpartikel durch Filtrieren (Faltenfilter) der verdünnten Farbstofflösung entfernt und 200 µL der Reagenzlösung in jedes Well der Platte pipettiert. Nach erfolgter Inkubation für 15 Minuten wurden die Extinktionen der einzelnen Wells in einem Mikroplatten-Reader bei 595 nm gemessen.

3.4.4 Herstellung von Polyacrylamidgelen

Zur Herstellung von sechs Gelen mit den Maßen 20 x 25 cm (12,5 % Acrylamid-Gehalt, 1 mm Dicke) wurden 600 mL Gellösung (6 Gele; 41,7 % Acrylamid-Lösung [Stamm-lösung: 30 %], 25 % Tris-HCl [1,5 M, pH 8,8], 10 % SDS) hergestellt und 30 Minuten entgast. Die Gelkassetten wurden mit Ethanol gereinigt und mit einem Etikett zur späteren Identifizierung der Gele versehen. Die gereinigten Gelkassetten wurden anschließend abwechselnd mit Trennfolie in den Gelgießstand sortiert und dieser fest verschlossen. Im Anschluss an die horizontale Ausrichtung des Gießstands wurden der entgasten Gellösung 1 % Ammoniumperoxodisulfat und 0,014 % TEMED zugegeben, um die Polymerisation zu initiieren. Unmittelbar darauf wurde die Gellösung bis ca. 0,5 cm unterhalb der Glaskante der Kassetten in den Gießstand eingefüllt. Zur Gewährleistung einer ebenen Geloberfläche wurde die noch flüssige Gellösung in den Kassetten mit einer 0,1 %igen SDS-Lösung überschichtet. Nach zweistündiger Polymerisation der Gele wurden die Kassetten aus dem Gießstand gelöst und mit Wasser (MilliQ) gewaschen, bevor sie feucht bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert wurden.

Die Herstellung von Polyacrylamidgelen mit den Maßen 10 x 8 cm erfolgte nach dem gleichen Verfahren, wobei 25 mL Gellösung für zwei Gele hergestellt wurden. Für 1D-Gele wurde Tris-HCl (pH 8,8) gegen BisTris (pH 6,5) mit gleicher Konzentration ausgetauscht.

3.4.5 Zweidimensionale Gelelektrophorese zur Proteinanalyse

Die Trennung der Proteine in zwei Dimensionen erfolgt in zwei Schritten. Im ersten Schritt werden die Proteine mittels isoelektrischer Fokussierung anhand ihrer Eigenladung getrennt, bevor im zweiten Schritt die Trennung nach der Größe durchgeführt wird. Um eine Trennung in der zweiten Dimension zu ermöglichen, ist ein Equilibrierungsschritt nach der Fokussierung notwendig, bei dem die Proteine mit SDS beladen und durch das Aufbrechen der Disulfidbrücken entfaltet werden. Zur Beladung der IPG-Streifen in der ersten Dimension wurde das *Rehydration Loading* verwendet, bei dem der IPG-Streifen in einer Mischung aus Probe und Rehydrierungspuffer inkubiert wird. Die verwendeten 24-cm-Streifen deckten

einen pH-Bereich von 3 bis 10 ab (nichtlinearer Gradient). Die Proteinmenge für einen Streifen betrug 500 µg. Fehlendes Probenvolumen (Gesamtvolumen: 450 µL) wurde durch Rehydrierungspuffer (8 M Harnstoff, 10 % Glycerol, 0,5 % CHAPS, 0,5 % Ampholyte, 0,002 % Bromphenolblau) ausgeglichen. Die Probe wurde anschließend gleichmäßig auf ein Keramikscheffchen verteilt und ein IPG-Streifen mit der Gelseite zur Probe darüber gelegt (Abbildung 12).



Abbildung 12: Rehydration Loading.

Die Probe wird gleichmäßig in einem Keramikscheffchen verteilt (a) und anschließend der IPG-Streifen mit der Gelseite zur Probe darüber platziert (b, c).

(Quelle: GE Healthcare, 2-D Electrophoresis Principles and Methods)

Zum Schutz vor Oxidation und Austrocknung wurde der Streifen mit *DryStrip Cover Fluid* (ein Mineralöl) überschichtet. Die Trennung der Proteine erfolgte automatisiert (siehe Protokoll Tabelle 3). Es wurden immer sechs Streifen parallel mit Proteinen beladen.

Tabelle 3: IEF-Elektrophoreseprotokoll

Arbeitsschritt	Dauer	Spannung	Trennung
Rehydration	2 h	-	
Rehydration	12 h	30 V	Step-n-hold
Trennen	1 h	500 V	Step-n-hold
Trennen	1 h	1000 V	Gradient
Trennen	8 h 20 min	8000 V	Gradient
Konservierung	15 h	500 V	Step-n-hold

Im Anschluss an die isoelektrische Fokussierung der Proteine wurden die Streifen aus den Keramikscheffchen entnommen, mit Wasser (MilliQ) vom *Cover Fluid* befreit und mit SDS in zwei Schritten equilibriert. Im ersten Schritt wurden die Streifen zunächst in Equilibrierungspuffer (25 mL/Streifen; 6 M Harnstoff, 30 % Glycerol, 2 % SDS, 0,002 % Bromphenolblau, 50 mM Tris-HCl; pH 8), welcher 1 % DTT enthielt, für 15 Minuten inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Streifen gewaschen (MilliQ) und im zweiten Schritt erneut in Equilibrierungspuffer inkubiert (15 min), welcher jedoch 2,5 % Iodacetamid anstelle von

DTT enthielt. Anschließend wurden die equilibrierten Streifen in die zuvor präparierten Gelkassetten für die 2D-Gelelektrophorese überführt und mit ca. 30 °C warmer Agaroselösung (0,5 % Agarose, 0,2 % Bromphenolblau, 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycerin, 0,1 % SDS) überschichtet. Die Trennung der Proteine erfolgte im Tris-Glycin-Puffersystem (Einfachpuffer 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycerin, 0,1 % SDS) über Nacht (14-16 h) mit 600 V, 400 mA und 2 W/Gel. Für die Anode wurde zweifach konzentrierter Puffer verwendet.

3.4.6 Proteinvisualisierung

Zur Visualisierung der Proteine wurde die von mir modifizierte Methode der Coomassiefärbung mit Aluminiumsulfat verwendet [86]. Im Vergleich zur Silberfärbung besitzt Coomassie den Vorteil, dass es sich um eine Endpunktfärbung handelt, d. h. Coomassie färbt Proteine nur bis zu einem bestimmten Punkt an. Ferner treten im Gegensatz zur Silberfärbung keine autokatalytischen Effekte und somit keine Proteinmodifikationen auf [87]. Die Färbung der Proteine mit Coomassie erfolgt durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem Farbstoff und dem Protein. Die Anlagerung des Coomassiefarbstoffs wird zusätzlich durch das verwendete Aluminiumsulfat begünstigt, da Repulsionseffekte durch negativ geladene Substituenten (Sulfate, Phosphate) an den Proteinen verringert werden. Die Aufhebung von Repulsionseffekten wird überdies durch die Verwendung von Phosphorsäure begünstigt, wodurch der Coomassiefarbstoff von seiner anionischen in seine neutrale Form überführt wird, was sich in einer Farbänderung von blau nach grün bemerkbar macht.

Zur Färbung der Proteine wurden die Gele zunächst aus den Kassetten befreit und mit Wasser (MilliQ) gewaschen. Anschließend wurden die Gele in Färbelösung (5 % Aluminiumsulfat, 10 % Ethanol, 0,02 % Coomassie G-250, 8,5 % Phosphorsäure) für drei Stunden inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurde überschüssiger Farbstoff durch Inkubation für 45 Minuten in einer sauren Ethanolösung (10 % Ethanol, 2 % Phosphorsäure) entfernt. Danach wurden die Gele über Nacht (mindestens 12 Stunden) in Wasser (MilliQ) gelagert, um die Phosphorsäure aus den Gelen zu entfernen und den Farbstoff in seine anionische Form (blau) zu überführen. Dies verbesserte außerdem die Sichtbarkeit schwach exprimierter Proteine.

3.4.7 Bilderfassung und -analyse

Die gefärbten Gele wurden im Anschluss an die Färbung in Kunststoffolie eingeschlagen und digitalisiert (ScanMaker 9800XL, Microtek International, Willich, Deutschland). Gleichzeitig wurden der Kontrast der einzelnen Gele angepasst sowie Staub und Kratzer softwaregestützt entfernt. Die Gelbilder wurden im TIFF-Format gespeichert, da bei diesem Format der Farbraum nicht komprimiert wird, was die Genauigkeit bei der Auswertung der Gele erhöht.

Tabelle 4: Einstellungen in der Scanner-Software Silverfast

Scanmodus:	normal	Scantyp:	16 bit Graustufen
Original:	Durchsicht	Filter:	GANE - wenig (Rauschunterdrückung)
Positiv/Negativ	positiv	Auflösung:	150 dpi

Die digitalisierten Gele wurden mittels der Software Delta2D (Version 4.0, Decodon, Greifswald, Deutschland) analysiert. Dazu wurden zu Beginn Laufunterschiede der Proteine zwischen den Gelen ausgeglichen. Als softwaregestützte Strategie wurde dazu das sogenannte *Group Warping* angewendet. Die korrigierten Gele wurden danach zu einem virtuellen Mastergel fusioniert, auf dem die Proteinspots detektiert wurden. Die resultierenden Spot-Marker wurden wiederum zurück auf die einzelnen Gele transferiert, sodass die Software die relative Stärke der einzelnen Spots (*relative volume*) in Abhängigkeit zur Gesamtfarbbintensität des Gels berechnen konnte. Zur Bestimmung von Proteinexpressionsunterschieden zwischen den exponierten und nichtexponierten Zellen wurde das Verhältnis der relativen Volumina (Ratio) gebildet. Unterschied sich das relative Volumen um mindestens den Faktor $\pm 1,7$, wurde die Expression des Spots als verändert angesehen. Diese Spots wurden nachfolgend markiert und auf den Gelen zur massenspektrometrischen Identifizierung ausgeschnitten.

3.4.8 In-Gel-Verdau von Proteinen

Proteine, die dem Kriterium einer Expressionsänderung von mindestens $\pm 1,7$ unterlagen, wurden aus dem Gel ausgeschnitten und in 50 μL reinem Acetonitril (ACN, 100 %) für 5 Minuten inkubiert. Dieser Schritt diente dem Waschen und Dehydrieren der Proteinspots. Im Anschluss an die Inkubation wurden das Acetonitril entfernt und die Spots in 30 μL Trypsinlösung (40 mM Ammoniumbicarbonat, 3 % ACN, 0,1 ng/mL Trypsin) bei 37 °C für drei Stunden verdaut. Nach erfolgter Inkubation wurden der Verdau durch Zugabe von 20 μL 1 % Trifluoressigsäure (TFA) inhibiert und die in der Lösung enthaltenen Peptide extrahiert. Die Extraktion der Peptide erfolgte nach dem Prinzip der Festphasenextraktion an einem C18-Sorbens (Kieselgel modifiziert mit C18-Alkanketten). Die Extraktion erfolgte nach Herstellerangaben. Im ersten Schritt wurde das C18-Sorbens in den Pipettenspitzen (ZipTip[®], Millipore, Billerica, USA) mit reinem Acetonitril aktiviert und dieser Schritt zweimal wiederholt. Anschließend wurden die Spitzen mit wässriger 0,1 %iger TFA-Lösung zweimal gespült, um verbleibendes ACN zu entfernen. Im dritten Schritt wurden die Peptide aus der Probe durch 7- bis 10-maliges Pipettieren extrahiert. Das wiederholte Pipettieren ist notwendig, um das

C18-Sorbens mit den Peptiden zu beladen. Im vierten Schritt wurden die adsorbierten Peptide mit wässriger 0,1 %iger TFA-Lösung zweimal gewaschen, bevor sie im fünften Schritt mit Matrixlösung (10 mg/mL α -Cyano-4-hydroxymethylsäure [CHCA] in 70 % ACN, 29,7 % Wasser [MilliQ], 0,3 % TFA) auf ein MALDI-Target eluiert wurden.

3.4.9 MALDI-ToF-MS-Analyse und Proteinidentifikation

Zur Identifikation der verdauten Proteine wurden die in der Probe enthaltenen Peptide mittels MALDI-ToF-MS (Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie) analysiert. Die Untersuchungen wurden mit einem Voyager DE-STR MALDI-ToF-MS (Applied Biosystems, Foster City, USA) im positiven Ionenmodus durchgeführt. Die Beschleunigung der desorbierten Probe (nach Laserionisierung) zur Analyse mittels Flugzeitanalysator erfolgte um 250 ns verzögert (*delayed extraction*). Zur Erhöhung der Massengenauigkeit wurden die einzelnen Peptide im Reflektormodus detektiert. Die Beschleunigungsspannung der desorbierten Probe betrug 22,5 kV, von der 70 % auf das Beschleunigungsgitter angelegt wurden. Die gemessenen *peptide mass fingerprint*-Spektren (PMF-Spektren) wurden anschließend mittels der Software DataExplorer „bereinigt“ (siehe Tabelle 5). Die „Bereinigung“ der Spektren umfasste eine Korrektur der Basislinie, die Entfernung des Hintergrundrauschens und der durch Isotope erzeugten Peaks. Abschließend erfolgte die Peakdetektion.

Tabelle 5: Einstellungen des DataExplorers zur Spektrenkorrektur

Funktion	Einstellung
Baseline Peak Width	32
Baseline Flexibility	0,5
Baseline Degree	0,1
Noise Filter Coefficient	0,7
Deisotope Base Formula	C6H5NO
Deisotope Adduct Formula	H

Die erhaltene Peakliste (m/z-Werte) wurde in die Software Mascot (Matrix Science, London, England) zum Datenbankabgleich importiert. Die Kriterien für die Datenbanksuche wurden folgendermaßen festgelegt: Peptidmassen-Toleranz 100 ppm, Taxonomie Human, eine verpasste Spaltung der Peptidkette (*missed cleavage*), Carboxyamidomethylcystein als feste Modifikation und Oxidation von Methionin als variable Modifikation. Als signifikante Identifizierungen wurden jene angesehen, die dem Kriterium $p < 0,05$ bzw. einem MOWSE

Score >64 entsprachen (Berechnung des Schwellenwertes der Signifikanz bei gegebener Signifikanzschwelle von $p < 0,05$ durch die Software Mascot).

3.4.10 Aktivitätsanalyse zellulärer Transkriptionsfaktoren (PPAR α , β/δ , γ)

Der Assay detektiert nukleäre Transkriptionsfaktoren, die an für sie spezifische regulatorische Bindungsstellen der DNA binden (*response element*). Der Assay wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt (Cayman Chemical, Item Number 10008878, Tallinn, Estland).

Die Wells der in dem Kit enthaltenen 96-Well-Platte wurden zunächst mit 90 μL komplettem Bindungspuffer equilibriert, bevor 7 μL nukleärer Proteinextrakt (Kapitel 3.4.2) zugegeben wurde. Danach wurde die Platte über Nacht (mindestens 12 Stunden) bei 4 °C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden überschüssige Proteine durch Waschen (200 μL Waschpuffer) entfernt. Dieser Schritt wurde fünfmal wiederholt. Unmittelbar nach dem letzten Waschschritt wurde zu jedem Well 100 μL anti-PPAR-Antikörper zugegeben (anti-PPAR α , PPAR β/δ bzw. PPAR γ in separaten Wells; 1:100 verdünnt mit Antikörper-Bindungspuffer). Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde überschüssiger Antikörper durch Waschen (200 μL Waschpuffer, fünf Wiederholungen) entfernt und die Wells mit HRP-konjugiertem Zweitantikörper unter den gleichen Bedingungen inkubiert (100 μL je Well, 1:100 verdünnt mit Antikörper-Bindungspuffer, 1 Stunde bei RT). Überschüssiger Zweitantikörper wurde anschließend durch fünfmaliges Waschen (200 μL Waschpuffer) entfernt, danach wurden die Wells mit 100 μL *Transcription Factor Developing Solution* für 45 Minuten im Dunkeln unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Intensität der Farbreaktion zwischen *Developing Solution* und HRP-konjugiertem Zweitantikörper wurde im Anschluss im Mikroplatten-Reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen.

3.5 Bestimmung der mitochondrialen Vitalität

Die mitochondriale Vitalität wurde anhand ihres Membranpotentials bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 123 inkubiert. Rhodamin 123 ist ein kationischer Farbstoff, der eine grüne Fluoreszenz aufweist. In den Mitochondrien kommt es aufgrund des Protonengradienten (die Innenseite der mitochondrialen Membran ist negativ, die Außenseite ist positiv geladen) zu einer Rotverschiebung des Anregungs- und Emissionsspektrums. Bei einer Schädigung der Mitochondrien bzw. während der Apoptose bricht das Membranpotenzial in den Mitochondrien zusammen, wodurch die Rotverschiebung des Farbstoffs verringert wird. Anhand der verringerten Fluoreszenz im roten Spektralbereich

(Exzitations-/Emissionswellenlänge: 485 nm/535 nm) kann die Integrität und somit die Vitalität der Mitochondrien bestimmt werden.

25000 Zellen der Zelllinie EA.hy926 wurden je Well auf einer 96-Well-Platte ausgesät und für 14 Tage gegen Carbon Black bzw. B[a]P-beladenes Carbon Black exponiert. Im Anschluss wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen vor der Inkubation mit 5 μ M Rhodamin 123 in HBSS zweimal mit warmem HBSS (37 °C) gewaschen. Nach einer 30-minütigen Inkubation wurden freies Rhodamin 123 durch zweimaliges Waschen mit HBSS entfernt und die Fluoreszenzintensität der Zellen im Mikroplatten-Reader gemessen (Exzitations-/Emissionswellenlänge: 485 nm/535 nm).

3.6 Metabolomische Charakterisierung von Zellen nach Exposition gegen Dieselrußsurrogate

3.6.1 Extraktion zellulärer Metaboliten

Zelluläre Metaboliten wurden nach dem von Strelkov et al. beschriebenen Verfahren, mit geringen Modifikationen, extrahiert [88].

Im Anschluss an die Zellernte (10×10^6 Zellen je Probe) wurden die Zellen zweimal mit PBS (1 mL, 4 °C) gewaschen, um verbliebenes Zellkulturmedium zu entfernen. Nach dem Sedimentieren der Zellen (Zentrifugation bei 50 x g, 4 °C) wurden die Zellen durch Zugabe von 1 mL heißem (~65 °C) Methanol lysiert und für 15 Minuten im Ultraschallbad inkubiert. Danach wurden die lysierten Zellen bei 2800 x g zentrifugiert (2 min, RT), der Überstand entnommen und als MeOH-Fraktion verwahrt. Das Zellpellet wurde mit 0,5 mL Hexan/MTBE (1:1) versetzt und für 10 Minuten unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert (2800 x g, RT) und der Überstand mit der methanolischen Fraktion vereinigt. Die gesammelten und vereinigten Fraktionen wurden für fünf Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert und durch Zugabe von 100 μ L Wasser (MilliQ) in eine wässrige Methanol-haltige Phase sowie eine organische Phase separiert. Die Proben wurden für 15 Minuten zentrifugiert (2500 x g) und die Phasen voneinander getrennt.

Zur Derivatisierung der Hexan/MTBE-Phase (organische Phase) wurde die Fraktion mit einer Lösung von 8 % HCl in Methanol verdünnt (Endkonzentration 1,2 % HCl) und über Nacht (≥ 12 Stunden) im Trockenschrank bei 45 °C inkubiert. Dieser Schritt wurde zur milden Veresterung enthaltener Fettsäuren verwendet und beruht auf einem von Ichihara und Fukubayashi beschriebenen Verfahren [89]. Nach erfolgter Inkubation wurden die Fettsäuremethylester durch Zugabe von 200 μ L Hexan sowie 1 mL Wasser (MilliQ) zweimal in die

organische Phase extrahiert. Die organische Phase wurde separiert und im Stickstoffstrom zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde mit 50 μL Pyridin aufgenommen, nach Zugabe von 50 μL MSTFA derivatisiert (30 min, 80 °C) und gaschromatographisch analysiert.

Zur Derivatisierung der methanolischen Phase wurde diese zunächst im Stickstoffstrom zur Trockene eingengt und der Rückstand in 50 μL einer 20 mg/mL Lösung von Methoxyamin/HCl in Pyridin aufgenommen und für 30 min bei 90 °C inkubiert. Anschließend wurden 80 μL MSTFA zugegeben und die Probe für 30 min bei 80 °C derivatisiert und danach mittels GC/MS analysiert.

3.6.2 GC/MS-Analyse der extrahierten Metaboliten

Beide Fraktionen wurden nach der gleichen Methode analysiert. Die derivatisierten Proben wurden automatisiert in das GC/MS-System injiziert (HP 6890 Injektor, splitlose Injektion, Probenvolumen 1 μL). Das Temperaturprofil für die Messung der zellulären Metaboliten ist in Tabelle 6 wiedergegeben.

Tabelle 6: Temperaturprofil zur GC-Analyse zellulärer Metaboliten

GC-Bauteil	Temperaturanstieg	Endtemperatur	Vorhaltezeit
Injektor		280 °C	konstant
Säulenofen		70 °C	initial (1 min)
	1 °C/min	76 °C	-
	6 °C/min	300 °C	5 min
Quadrupol		150 °C	
MS-Quelle		230 °C	

Während der massenspektrometrischen Messung wurde der Gesamtionenstrom (*total ion current*, TIC) über einen Massenbereich von m/z 50-500 registriert. Zur Gewährleistung einer akkuraten Retentionszeitbestimmung der einzelnen Proben wurde in regelmäßigen Abständen eine Alkanmischung (C-11, C-14, C-18, C-21, C-24, C-28 und C-30) als Standard injiziert, um Laufzeitunterschiede auszugleichen. Die Ionisierung der Probe erfolgte durch Elektronenstoß-Ionisation im positiven Modus mit einer Ionisierungsenergie von 70 eV in einem Quadropolmassenspektrometer (HP 5973). Die resultierenden Spektren wurden mit AMDIS transformiert (*dekonvolutiert*) und mit SpecConnect analysiert [90]. Zur Berechnung etwaiger quantitativer Unterschiede zwischen den Metaboliten in exponierten und nichtexponierten Zellen wurde das Verhältnis (Ratio) der relativen Abundanz der detektierten Metaboliten aus der von SpecConnect erstellten Matrix herangezogen.

Als quantitativ unterschiedlich wurden jene Metaboliten angesehen, deren Verhältnis sich zur Kontrolle um $\pm 1,5$ unterschied. Die Metaboliten wurden anhand ihrer Fragmentierungsmuster mithilfe der Datenbanken GMD (Version 20100614) [82] und MassBank [91] identifiziert.

3.7 Entwicklung eines Verfahrens zur Extraktion phosphorylierter Proteine

3.7.1 Präparation verschiedener Phosphoprotein-haltiger Proben

3.7.1.1 Präparation von Proben aus Hühnereiern und Milch

Hühnereier und Milch (1,5 % Fett, homogenisiert und ultrahocherhitzt) wurden von einem lokalen Supermarkt bezogen. Eiweiß und Eigelb wurden getrennt und mit Wasser (50:50, v/v) verdünnt. Je Experiment wurden 300 μL der verdünnten Proben eingesetzt. Milchproben (300 μL) wurden ohne Aufbereitung verwendet. Der Proteingehalt der Proben vor Beginn der Experimente wurde nicht bestimmt.

3.7.1.2 Präparation von Proben aus Schweineurothelzellen

Die Präparation von Schweineurothelzellen wurde von Fr. Verma (Institut für Hygiene und Arbeitsmedizin) durchgeführt.

Die Urothelzellen aus Schweineblasen frisch geschlachteter Schweine wurden entsprechend dem Verfahren von Guhe und Föllmann [92] extrahiert. Nach dem Waschen der Blasen wurden Zellen aus verschiedenen Blasen isoliert, gepoolt und in serumfreiem Medium (F-12 Medium mit *F12 Nutrient Mixture*) suspendiert. Konfluierende Zellen wurden geerntet und entsprechend dem Protokoll in Kapitel 3.4.1 lysiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Proteinkonzentration wurde unter Verwendung des Bradford-Tests bestimmt.

3.7.2 Phosphoprotein-fällung aus verschiedenen Proben

3.7.2.1 Phosphoprotein-fällung aus gefrorenen Zelllysaten, Milch und Hühnereiern

Zu den Proteinproben aus dem Urothel von Schweinen (Kapitel 3.7.1.2) wurden 3 μL einer 1 M LaCl_3 -Lösung je 1 mg/mL Protein gegeben und die Mischung gevortexed. Danach wurde das gleiche Volumen einer 2 M Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung zugegeben und die Mischung nochmals gevortexed. Die ausgefallenen Proteine wurden durch Zentrifugation (1 min, 2500 x g) sedimentiert und der Überstand wurde entfernt. Der Niederschlag wurde anschließend mit 300 μL einer Lösung aus 8 M Harnstoff in 1 % CHAPS resuspendiert und erneut sedimentiert (30 s, 2500 x g). Im Anschluss wurde der Niederschlag dreimal mit

Wasser (MilliQ) gewaschen (Zentrifugation nach jedem Waschschrift für 30 s, 2500 x g). Die Proteine im sedimentierten Pellet wurden mit Elutionspuffer eluiert.

Die Behandlung der Proben aus Milch und Hühnereiern erfolgte wie oben beschrieben, jedoch mit einem festen Volumen von 30 μL LaCl_3 und KH_2PO_4 .

3.7.2.2 Direkte Phosphoproteinfallung aus Gewebeproben

Gewebeproben wurden vom Institut für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikum Essen bereitgestellt. Nichtmaligne Lebergewebeproben wurden von Patienten nach chirurgischer Resektion erhalten. Die Gewebeproben wurden sofort in flüssigen Stickstoff überführt und nachfolgend bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die Proben wurden in Übereinstimmung mit den ethischen Normen, die in der Deklaration von Helsinki festgelegt wurden, sowie nach Genehmigung der lokalen Ethikkommission entnommen. Alle Patienten wurden vor der Probennahme informiert und haben ihre Zustimmung gegeben.

Das gefrorene Gewebe wurde gewogen ($\sim 17\text{ mg}$) und in Lysispuffer (5,8 mL/g, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,2 % SDS, 0,75 % Na-Desoxycholat, 1 % Triton X-100, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, Protease-Inhibitoren) homogenisiert. Nach Inkubation auf Eis für 30 Minuten wurden 6 μL 1 M Lanthanchlorid-Lösung und 6 μL 2 M KH_2PO_4 zugegeben und die Mischungen nach jeder Zugabe gevortext. Die Waschschriffe wurden wie in Kapitel 3.7.2 (einschließlich der Behandlung mit 8 M Harnstoff in 1 % CHAPS) beschrieben durchgeführt.

3.7.3 Photometrische Reinheitsbestimmung der extrahierten Proteine

Die Reinheit der extrahierten Phosphoproteine wurde mit dem UV-VIS-Spektrometer bestimmt. Der Proteingehalt der verwendeten Proben wurde vor und nach der Extraktion mittels Bradford-Test ermittelt. Im Anschluss daran wurden die Proben auf eine Proteinkonzentration von 500 $\mu\text{g/mL}$ mit Wasser (MilliQ) verdünnt und bei 260 nm sowie 280 nm gegen Blindproben (Lysispuffer bzw. Elutionspuffer in der gleichen Verdünnung wie die entsprechenden Proteinproben) gemessen.

3.7.4 Eluierung der Phosphoproteine aus dem Niederschlag

Zur Optimierung der Elution von Phosphoproteinen wurden verschiedene Substanzen und Gemische getestet. Generell wurde das Pellet in der zu testenden Substanz für 10 Minuten inkubiert und nachfolgend für eine Minute bei 18000 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden gesammelt und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die getesteten Elutionspuffer waren: 40 %ige Phosphorsäure (PA), Imidazol (4 M Lösung, I), Lysispuffer

(LB), eine Lösung von 1 % Phosphorsäure in Lysispuffer (PA-LB) und eine 25 %/75 % Imidazol-Lysispuffer-Mischung (ILB) (Tabelle 7). Der Proteingehalt wurde unter Verwendung des Bradford-Test bestimmt.

Tabelle 7: Elutionspuffer

	PA	I	LB	PA-LB	ILB
Phosphorsäure	7.5 M	-	-	0.2 M	-
Imidazol	-	4 M	-	-	1 M
Lysispuffer (u. a. 8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 2 % CHAPS)	-	-	+	+	+

3.7.5 Proteomische Analyse der Phosphoproteine

3.7.5.1 Eindimensionale Gelelektrophorese

Das Probenvolumen für die Elektrophorese betrug 10 μ L. Proteinproben mit einem Gehalt von 10 μ g (wenn nicht anders angegeben) wurden zunächst mit 3 μ L *LDS Sample Buffer* (Lithiumdodecylsulfat-haltiger Probenpuffer, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) versetzt und fehlendes Probenvolumen mit Wasser (MilliQ) ausgeglichen. Zur Beladung der Proteine mit LDS wurden die Proben für 10 Minuten auf 100 °C erwärmt und anschließend für 30 Sekunden mit 14000 x g zentrifugiert. Die so behandelten Proben wurden in die Taschen eines Polyacrylamidgels überführt und durch Anlegen einer elektrischen Spannung im elektrischen Feld aufgetrennt (200 V, 100 mA, 10 W). Als Puffer für die Elektrophorese wurden entweder ein System aus BisTris (Gel-Puffer) und MOPS (Lösungspuffer) oder ein System aus Tris-HCl (Gel-Puffer) und Tris/Glycin (Laufpuffer) verwendet (die Zusammensetzung wurde in Kapitel 3.4.4 und 3.4.5 beschrieben). Das BisTris-Gel-System zeichnet sich durch eine Proteintrennung unter pH-neutralen bis leicht sauren Bedingungen (pH 6,5) aus. Die Proteintrennung unter neutralen Bedingungen erhöht dabei besonders die Auflösung niedermolekularer Proteine von ~10 kDa. Im Tris-HCl-System findet dagegen die Trennung bei pH 8,5 statt.

3.7.5.2 Visualisierung der Phosphoproteine

Zur Visualisierung der Phosphoproteine wurde neben der Färbung mit Coomassie (siehe Kapitel 3.4.6) auch Pro-Q[®] Diamond verwendet. Pro-Q[®] Diamond färbt selektiv phosphorylierte Proteine an, wohingegen Coomassie alle Proteine anfärbt. Da die Proteine in

BisTris-Gelen separiert wurden, wurde die Färbung entsprechend dem Standardprotokoll für diese Gele durchgeführt.

Zu Beginn wurden die Proteine in den Gelen über Nacht (≥ 12 h) in einer Lösung aus 50 % MeOH und 10 % HAc fixiert. Anschließend wurden die Gele dreimal für 10 Minuten in Wasser (MilliQ) gewaschen und danach in 60 mL Färbelösung inkubiert (im Dunkeln unter leichtem Schütteln). Für die Entfärbung lagen die Gele in einer Lösung aus 20 % ACN und 50 mM Natriumacetat für 30 Minuten (dreimal wiederholt), bevor sie zweimal mit Wasser (MilliQ) gewaschen und umgehend mit einem Fluoreszenz-Scanner (GE Typhoon 9400, Exzitations-/Emissionswellenlänge: 532 nm/580 nm, Bandpass 30 Filter, München, Deutschland) digitalisiert wurden. Die Pro-Q[®] Diamond-Färbung wurde nur zur Validierung der von mir entwickelten Anreicherung von Phosphoproteinen mit La³⁺-Ionen eingesetzt. Die restlichen Gele wurden mit Coomassie gefärbt.

3.7.5.3 *Proteinidentifizierung und Validierung der Phosphorylierung mittels Massenspektrometrie*

Die Identifizierung der Proteine wurde entsprechend den Kapiteln 3.4.8 und 3.4.9 durchgeführt. Zusätzlich wurde die Phosphorylierung des Ovalbumins am Peptid mit der Masse m/z 2088 nach kollisionsinduzierter Dissoziation (*collision-induced dissociation*, CID) massenspektrometrisch untersucht. Dazu wurde die Kollisionskammer des Massenspektrometers mit Helium befüllt und die Fragmente des Peptids mit der Masse m/z 2088 durch ein Bradbury-Nielsen-Gitter von den restlichen Fragmenten zur Massenanalyse getrennt. Die Anwesenheit von Phosphatresten kann anhand des Neutralverlustes eines Fragments mit der Masse m/z 98 (H₃PO₄) oder m/z 80 (HPO₃) erkannt werden.

3.7.5.4 *Validierung der Phosphorylierung mittels Western Blot*

Für die Validierung wurden die Phosphoproteine der lysierten Proben nach der Gelelektrophorese auf Nitrocellulose bzw. PVDF-Membranen geblottet. Dazu wurden die Gele aus den Gelkassetten herausgelöst und auf Filterpapier (getränkt in Transferpuffer, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) ausgebreitet. Die Gele wurden für eine Stunde bei 25 V und 100 mA geblottet. Im Anschluss daran wurden die Membranen entnommen und mit 5 % BSA-Blockierungslösung inkubiert. Zur Markierung von Phosphorylierungen wurden die Membranen nachfolgend über Nacht mit anti-Phospho-Ser/Thr/Tyr-Antikörper (Verdünnung 1:1000, Antikörper-online.de, Aachen, Deutschland, ABIN372086) bei 4 °C inkubiert. Die Detektion erfolgte durch Verwendung des *Western Breeze[®] Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit* (Invitrogen).

Zusätzlich wurden die Proteinphosphorylierungen Antikörper-unabhängig durch die Verwendung des Reagenz Phos-Tag[™] (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Deutschland) überprüft. Dazu wurden die auf PVDF-Membranen geblotteten Proteine zunächst in TBS-T-Lösung für eine Stunde inkubiert. Das Phos-Tag[™]-Reagenz (Gesamtvolumen 500 µL) wurde in der Zwischenzeit durch Mischen von 10 µL Phos-Tag[™] BTL-104 (10 mM, in MeOH) mit 20 µL Zinknitrat (10 mM), TBS-T und 1 µL Streptavidin-konjugiertem HRP (GE Healthcare, RPN1231, München, Deutschland) frisch hergestellt. Nach einer 30-minütigen Inkubation der Mischung wurde diese durch einen Zentrifugalfilter (30000 MWCO, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) filtriert und die erhaltene Lösung auf 30 mL mit TBS-T verdünnt. Unmittelbar danach wurden die PVDF-Membranen in der Lösung inkubiert. Nach erfolgter Inkubation (30 Minuten) wurde die Membran aus der Phos-Tag[™]-Lösung entfernt, mit TBS-T gewaschen und mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin zur Visualisierung der Phosphoproteine gefärbt.

3.8 Analyse des Phosphoproteoms der endothelialen Zellen EA.hy926

3.8.1 Entwicklung eines geeigneten „Refold“-Puffers zur Präzipitation von Phosphoproteinen¹

Die Entwicklung eines geeigneten „Refold“-Puffers wurde in Zusammenarbeit mit Fr. Stein im Institut für Hygiene und Arbeitsmedizin durchgeführt.

Die Phosphoproteine der endothelialen Zellen sollten im gleichen Probenstock an Zelllysaten untersucht werden, der zuvor zur proteomischen Analyse (Kapitel 3.4) verwendet wurde. Die Ausfällung der Phosphoproteine mittels Lanthanchlorid (Kapitel 3.7) ergab jedoch kein gemeinsames Proteinmuster zwischen den einzelnen Zelllysaten, was auf eine unspezifische Präzipitation durch Verringerung der Harnstoffkonzentration der Lysate zurückgeführt werden konnte. Um diesen Mangel zu beheben, wurden im Vorfeld verschiedene „Refold“-Puffer getestet. Dazu wurde zu Beginn jeder Proteinfällung dem Zelllysate ein definiertes Volumen an zu testendem „Refold“-Puffer zugegeben. Anschließend wurden die Proteine, wie in Kapitel 3.7 beschrieben, durch Zugabe von 10 µL einer 1 M Lanthanchlorid-Lösung präzipitiert und der Proteingehalt nach der Elution mittels Bradford-Test (Kapitel 3.4.3) bestimmt. Die getesteten Puffer sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Der höchste Proteingehalt wurde durch Anwendung des Puffers XI zu Beginn der Phosphoprotein-Extraktion gemessen.

¹ Pink et al., Gel-based separation of phosphoproteins in samples stored in urea/thiourea after precipitation by lanthanum chloride, *Electrophoresis*; in press

Tabelle 8: „Refold“-Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Puffer I	Wasser (MilliQ)
Puffer II	100 mM Harnstoff
Puffer III	100 mM Harnstoff, 0,2 % SDS
Puffer IV	RIPA-Puffer
Puffer V	RIPA-Puffer, 1 % Na-Desoxycholat, 0,2 % SDS
Puffer VI	RIPA-Puffer, 1 % Na-Desoxycholat, (10:1 Probe)
Puffer VII	RIPA-Puffer, 500 mM NaCl
Puffer VIII	Puffer VII, 20 % Glycerin
Puffer IX	Puffer VII, 800 mM Arginin
Puffer X	Puffer IX, 20 % Glycerin
Puffer XI	Puffer IX, pH 7 mit HCl

3.8.2 Phosphoprotein-fällung aus Zelllysaten

Die Fällung phosphorylierter Proteine wurde von Fr. Stein, Institut für Hygiene und Arbeitsmedizin, durchgeführt.

Zur Fällung der Phosphoproteine aus den gefrorenen Zelllysaten (Kapitel 3.7) wurden diese zunächst mit „Refold“-Puffer (Puffer XI, Tabelle 8) verdünnt. Zur schonenden Verdünnung erfolgte die Zugabe des Puffers zu den Proben in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurden die Proben mit $\frac{1}{8}$ ihres Volumens an „Refold“-Puffer XI (12,5 μL , Probenvolumen: 100 μL) gemischt. Im zweiten Schritt wurden $\frac{8}{8}$ (100 μL) ihres initialen Volumens hinzugegeben. Danach wurden die Proteine wie in Kapitel 3.7 beschrieben mit 15 μL La^{3+} -Lösung ausgefällt. Die Eluierung erfolgte durch Inkubation mit 50 μL optimiertem Elutionspuffer (9 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 2 % CHAPS, 1 % DTT, 0,8 % Ampholyte, Proteaseinhibitor-Cocktail, 250 mM Imidazol).

3.8.3 2D-Gelelektrophorese zur Phosphoproteinanalyse

Die Trennung der extrahierten Phosphoproteine wurde von Fr. Stein, Institut für Hygiene und Arbeitsmedizin, durchgeführt.

Die zweidimensionale Trennung der Phosphoproteine erfolgte nach dem gleichen Prinzip und mit den gleichen Lösungen wie die 2D-Gelelektrophorese der „normalen“ Proteine (siehe Kapitel 3.4.5). Im Gegensatz zum vorher beschriebenen Protokoll wurden die Phosphoproteine per Probencups (*cup loading*) auf die IPG-Streifen aufgebracht, da die Beladung während der Rehydrierung durch die Anwesenheit von Imidazol im verwendeten Elutions-

puffer verhindert wurde. Die verwendeten IPG-Streifen (7 cm, pH 3–10, linearer Gradient) wurden in 125 μ L Rehydrierungspuffer für 12 h inkubiert. Zum Schutz vor dem Austrocknen wurden die Streifen mit *DryStrip Cover Fluid* überschichtet. Im Anschluss wurden die rehydrierten Streifen vom *Cover Fluid* befreit und in die Keramikschißchen gelegt. Zur Gewährleistung des Stromflusses und zur Aufnahme von Salzen wurden an den Streifenenden gewässerte Filterpapierstücke platziert (Abbildung 13 a) und mit Elektrodenclips fixiert. Die Proben wurden über einen Probencup am anodischen (+) Ende des Streifens aufgetragen (Abbildung 13 c). Zusätzlich wurden Streifen und Probe im Probencup zum Schutz vor Austrocknung mit *DryStrip Cover Fluid* überschichtet. Die Trennung der Proteine erfolgte automatisiert (siehe Protokoll Tabelle 9). Im Anschluss wurden die Streifen wie in Kapitel 3.4.5 beschrieben equilibriert und in der zweiten Dimension in 12 %igen Polyacrylamidgelen (10 x 8 cm) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Einstellungen: 125 V, 50 mA, 10 W).

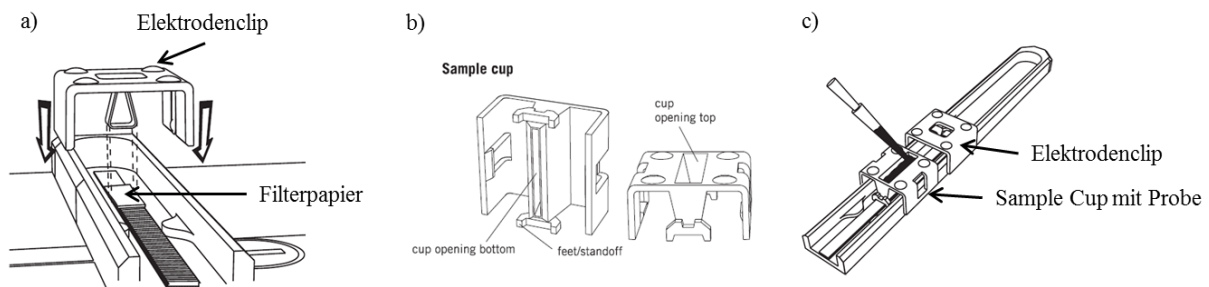


Abbildung 13: Cup Loading.

Der rehydrierte IPG-Streifen wird mit der Gelseite nach oben in ein Keramikschißchen gelegt und mit je einem Elektrodenclip am anodischen und kathodischen Ende gesichert. Zur besseren Leitfähigkeit wird unter den Elektrodenclips ein mit Wasser getränktes Stück Filterpapier platziert (a). Nachfolgend wird am anodischen bzw. kathodischen Ende ein Probencup (*sample cup*, b) aufgesteckt, wobei darauf zu achten ist, dass dieser plan auf den IPG-Streifen aufliegt, jedoch das Gel nicht beschädigt. Die Probe wird über den *Sample cup* auf den Streifen aufgetragen (c).

(Quelle: GE Healthcare, 2-D Electrophoresis Principles and Methods)

Tabelle 9: IEF-Elektrophorese für Phosphoproteine

Arbeitsschritt	Dauer	Spannung	Trennung
Entsalzen	50 Vh	50 V	Step-n-hold
Trennen	150 Vh	150 V	Gradient
Trennen	300 Vh	300 V	Gradient
Trennen	325 Vh	1000 V	Gradient
Trennen	4500 Vh	5000 V	Gradient
Trennen	2500 Vh	5000 V	Step-n-hold
Konservieren	2000 Vh	100 V	Step-n-hold

3.8.4 Analyse der 2D-Gele

Die Analyse der erhaltenen 2D-Gele nach der Elektrophorese erfolgte wie in Kapitel 3.4 beschrieben. Die Auswertung wurde von Fr. Stein durchgeführt. Die Proteine wurden mit Coomassie gefärbt (zur Intensivierung wurde die Proteinfärbung zweimal durchgeführt), digitalisiert, Expressionsunterschiede softwaregestützt ermittelt und Proteine, die das Kriterium einer Expressionsänderung von mindestens $\pm 1,7$ erfüllten, mittels MALDI-ToF-MS identifiziert.

3.9 Untersuchung des Angiogeneseverhaltens

3.9.1 Fluoreszenz-basierte Quantifizierung von Aktin und Vimentin

Zwei wichtige Proteine des Zytoskeletts, Aktin und Vimentin, wurden in fixierten Zellen mit Fluoreszenz-markiertem Antikörper (Vimentin) bzw. Fluoreszenz-markiertem Phalloidin (Aktin) angefärbt und quantifiziert. Dazu wurden die Zellen während der 14-tägigen Exposition (Kapitel 3.2.3) auf rechteckigen Deckgläsern kultiviert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, bevor sie in 4 %iger Formaldehyd-Lösung (in PBS, MeOH frei) für 15 Minuten fixiert wurden. Danach wurde der Formaldehyd entfernt, und die fixierten Zellen wurden dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen, bevor sie in *Blocking*-Puffer (5 % normales Ziegen Serum, 0,3 % Triton X-100, in PBS) für 60 Minuten inkubiert wurden. Währenddessen wurde der primäre Antikörper gegen Vimentin 1:200 verdünnt (1 % BSA, 0,3 % Triton X-100, in PBS). Kurz vor Ende der Inkubation wurde je Deckglas ein Tropfen (200 μ L) dieser Lösung auf Parafilm in einer befeuchteten Kammer aufgebracht (Abbildung 14). Die Deckgläser wurden danach aus dem *Blocking*-Puffer genommen, mit der Zellseite auf die Antikörperlösung aufgelegt und über Nacht (≥ 12 Stunden) bei 4 °C inkubiert.

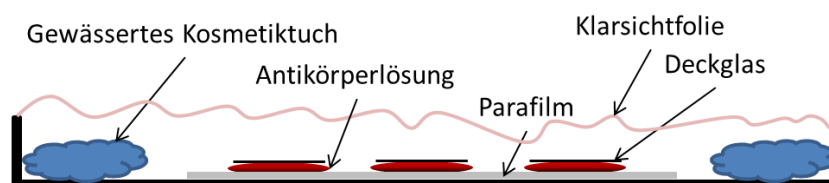


Abbildung 14: Schematischer Aufbau der Kammer zur Immunfluoreszenzfärbung.

Zum Schutz der Proben vor Verdunstung der Antikörperlösung erfolgte die Inkubation in einer befeuchteten Kammer.

Nach der Inkubation wurden die Deckgläser aus der Inkubationskammer entnommen und zur nachfolgenden Aktinfärbung dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen. Die Aktinfärbung erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie die Antikörper-Markierung von Vimentin. Je

Deckglas wurde ein Tropfen (200 μL) der Phalloidin-Lösung (250 ng/mL Rhodamin-konjugiertes Phalloidin, 1 % BSA, in PBS) auf Parafilm aufgetragen. Die Deckgläser wurden mit der Zellseite nach unten aufgelegt. Nach 35-minütiger Inkubation wurden die Deckgläser entnommen, mit PBS dreimal gewaschen und mit Eindeckmedium (*mounting medium*) auf Objektträgern fixiert. Die Fluoreszenzmessung der beiden Proteine erfolgte am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Laserrastermikroskop, Zeiss LSM 510, Oberkochen, Deutschland) mit den Exzitation-/Emissionswellenlängen 488 nm/505-550 nm (Bandpassfilter) für Vimentin und den Exzitation-/Emissionswellenlängen 543 nm/560 nm (Langpassfilter) für Aktin. Zur Auswertung wurde die Gesamtfluoreszenz der erhaltenen Mikroskopiebilder verwendet.

3.9.2 Transwell-Assay zum Test der Invasion und Migration

Der Test der Invasion und Migration wurde von technischen Mitarbeiterinnen des Instituts für Hygiene und Arbeitsmedizin durchgeführt. Zum Test der Invasion wurden die Membraneinsätze (*well inserts*, 8 μm Porengröße der Membran) der Boyden-Kammern mit 100 μL Matrigel™ (Konzentration 200 $\mu\text{g/mL}$) auf Eis beschichtet und zur Polymerisierung des Gels für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Membraneinsätze zum Test der Migration wurden nicht beschichtet. Im Anschluss an die Polymerisation der Gelmatrix wurden 50000 exponierte und nichtexponierte Zellen auf den Membraneinsätzen ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Zur Initiierung der Migration bzw. Invasion wurden die Zellen in Hungermedium inkubiert. Dieses Medium enthielt im Invasions-Assay 2 % FCS und im Migrations-Assay 6 % FCS. Das zweite Kompartiment der Boyden-Kammer enthielt normales Kulturmedium als Lockstoff mit 10 % FCS (Abbildung 15).

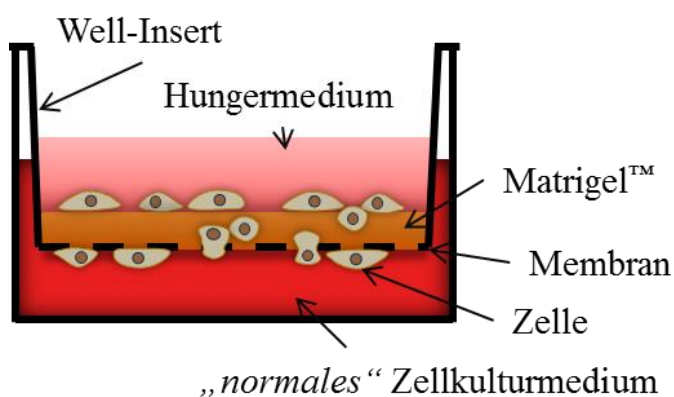


Abbildung 15: Schematischer Aufbau des Transwell-Assay.

Der Transwell-Assay wird in einer aus zwei Kompartimenten bestehenden Boyden-Kammer durchgeführt, die durch eine poröse Membran voneinander getrennt sind. Das Wanderungsverhalten der auf der Membran ausgesäten Zellen kann in diesem System durch verschiedene chemische Lockstoffe in den Medien beeinflusst werden. Im dargestellten Invasions-Assay wurden die Zellen auf Matrigel™ (orange) in reduziertem Kulturmedium (rosa) ausgesät. Normales Zellkultur-

medium (rot) diente zur Stimulation der zellulären Invasion.

Im Anschluss an die 24-stündige Inkubation wurden die Einsätze entnommen und die Zellen in den Membraneinsätzen mit einem PBS-befeuchteten Watteträger entfernt. Die Zellen an

der Außenseite der Einsätze wurden mit 100 % MeOH für 2 min fixiert und danach in einer Lösung von 1 % Toluidinblau in 1 %iger wässriger Borax-Lösung für zwei Minuten angefärbt. Nach zweimaligem Waschen (MilliQ) wurde die Membran mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Mineralöl auf einem Objektträger fixiert. Die Auswertung erfolgte softwaregestützt (ImageJ [93]) durch Bestimmung der Anzahl an migrierten bzw. infiltrierten Zellen je Fläche.

3.9.2.1 Auswertung der migrierten und infiltrierten Zellen

Zur Auswertung der migrierten und infiltrierten Zellen wurde das *Image-based Tool for Counting Nuclei* (ITCN; Center for Bio-Image Informatics, University of California, Santa Barbara), ein Plugin für ImageJ, verwendet. Die digitalen Aufnahmen der Membranen wurden in das Programm ImageJ geladen und nachfolgend in 8-bit-Graustufen konvertiert (Tabelle 10). Des Weiteren wurden die Anzahl der Datenpunkte auf ein Viertel reduziert und der Kontrast sowie die Hintergrundfärbung angepasst. Als Einstellungen für das ITCN-Plugin wurden folgende Werte verwendet: *Width 20, Distance 10, Threshold 1, Detect Dark Peaks*. Als Maß für die Zellzahl wurde die Anzahl an Zellen je Fläche (cells/inch) verwendet.

Tabelle 10: Makroeinstellungen zur Bildbearbeitung

```
run("8-bit");  
run("Scale...", "x=0.25 y=0.25 interpolate create title=[Reduced ea-1]");  
run("Subtract Background...", "rolling=50 white");  
run("Enhance Contrast", "saturated=0.5 normalize equalize");
```

3.9.3 Transwell-Assay zum Test der zellulären Barrierefunktion

Die Barrierefunktion wurde an endothelialen Zellen untersucht, die zunächst für 14 Tage in Kulturflaschen exponiert wurden, bevor sie auf die Membraneinsätze der Boyden-Kammer (1 µm Porengröße, 75000 Zellen je Membraneinsatz) ausgesät und für 24 Stunden inkubiert wurden. Anschließend wurde zum Testbeginn das Inkubationsmedium gegen frisches Medium getauscht, welches fluoreszenzmarkiertes Dextran (MW 4 kDa, Konzentration 1 mg/mL) enthielt. Nach einer weiteren Inkubation für 24 Stunden wurde das Medium des zweiten Kompartiments entnommen und die Fluoreszenz mittels Mikroplatten-Reader bestimmt (Exzitations-/Emissionswellenlänge: 485 nm/535 nm)

3.9.4 Relative Quantifizierung des intrazellulären Calciumgehalts

Der intrazelluläre Calciumgehalt wurde mit Hilfe der Fluoreszenzindikatoren Fluo-4 und Rhod-2 in vitalen Zellen relativ quantifiziert. Fluo-4 und Rhod-2 sind Calcium-sensitive Fluoreszenzfarbstoffe, die über ihre Acetoxymethylester (AM)-Vorstufen schnell in die Zellen aufgenommen werden. In der Zelle erfolgt die Spaltung der AM-Schutzgruppe durch unspezifische Esterasen, wodurch beide Indikatoren in ihre aktive Form überführt werden und die Zelle nur noch bedingt verlassen können. Intrazellulär ist Fluo-4 vornehmlich im Zytosol lokalisiert, während Rhod-2 primär in den Mitochondrien und dem Zellkern zu finden ist. Die Fluoreszenzintensität bei Bindung von Calcium ist direkt proportional zum intrazellulären Calciumgehalt.

Zur Bestimmung des intrazellulären Calciumgehalts wurden die Zellen (Kapitel 3.2.3) auf runden Deckgläsern während der 14-tägigen Exposition kultiviert. Anschließend wurden die Zellen viermal mit warmen HBSS-Puffer (37 °C) vorsichtig gewaschen und danach in einem dreistufigen Inkubationsprozess mit den Fluoreszenzindikatoren beladen. Dazu wurden die Zellen mit 1 mL Fluoreszenzindikatorlösung (Rhod-2 [3,57 µM] und Fluo-4 [1,4 µM] in HBSS) zunächst für 30 Minuten bei RT und anschließend für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Fluoreszenzindikatorlösung entfernt und die Zellen für weitere 30 Minuten mit 2,5 mM Probenecid in HBSS zur Esterspaltung inkubiert. Nach einem finalen Waschschrift mit HBSS wurden die Deckgläser entnommen, in spezielle Halter (*Live-Cell Imaging*) für die Laser-Fluoreszenzmikroskopie eingespannt und mit 2,5 mM Probenecid-haltigem HBSS überschichtet. Die Messung der Calciumfluoreszenz erfolgte unmittelbar danach an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Laserrastermikroskop) mit den Wellenlängen von 552 nm/581 nm (Exzitation/Emission) für Rhod-2 und 488 nm/535 nm (Exzitation/Emission) für Fluo-4. Zur Auswertung wurde die Gesamtfluoreszenz der erhaltenen Mikroskopiebilder verwendet.

3.10 Statistische Auswertung der erhaltenen Daten

Für die statistischen Auswertungen wurde die Statistiksoftware SigmaPlot (Version 12.0) verwendet. Als statistische Tests wurden entweder der zweiseitige t-Test für unabhängige Stichproben (t-Test) oder eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Als Bedingung für ein signifikantes Ergebnis wurde folgende Klassifizierung verwendet: signifikant: *, $p \leq 0,05$; sehr signifikant: **, $p \leq 0,01$; hochsignifikant: ***, $p \leq 0,001$.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse des Proteoms und Metaboloms von Endothelzellen nach Exposition gegen Dieselrußsurrogate

4.1.1 Zielsetzung

Die Mechanismen, die der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen durch Feinstaubexposition zugrunde liegen, sind bislang noch weitgehend hypothetisch. Die angenommenen Modellvorstellungen beruhen überwiegend auf Experimenten, bei denen Feinstaub in hohen Konzentrationen eingesetzt worden ist. Basierend auf diesen Studien gilt derzeit das Paradigma, dass Feinstaub oxidativen Stress induziert, der u. a. inflammatorische Signalwege aktiviert und im weiteren Verlauf die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen begünstigt.

Um die Effekte unter physiologischeren Bedingungen zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit endotheliale Zellen gegen niedrige Feinstaubkonzentrationen über einen längeren Zeitraum exponiert. Als Surrogat für Dieselrußpartikel, die die größte Fraktion innerhalb des Feinstaubes darstellen, wurde Carbon Black bzw. Benzo[a]pyren-beladenes Carbon Black verwendet. Zur Analyse der zellulären Vorgänge wurde ein proteomischer Ansatz gewählt. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden Hypothesen entwickelt, die in weiteren Untersuchungen überprüft wurden.

4.1.2 Ergebnisse

4.1.2.1 Charakterisierung der suspendierten Partikel

Grundvoraussetzung für die Untersuchung zellulärer Effekte nach Exposition gegen Feinstaub ist das Vorliegen der Partikel im entsprechenden Größenbereich. Dazu wurde die Größe der suspendierten Dieselrußsurrogate in Zellkulturmedium (enthielt 10 % FCS, Konzentration 100 ng/mL) mittels dynamischer Lichtstreuung (*dynamic light scattering*, DLS) untersucht.

Die Messung der suspendierten Carbon-Black-Partikel ergab einen hydrodynamischen Durchmesser von ~70 nm, während die B[a]P-beladenen Partikel in zwei Größen von ~150 nm und ~550 nm vorlagen.

Darüber hinaus wurde der B[a]P-Gehalt der beladenen Partikel nach Soxhlet-Extraktion gaschromatographisch bestimmt. Die Bestimmung ergab, dass von den eingesetzten 30 mg B[a]P je Gramm Partikel 25,1 mg adsorbiert wurden.

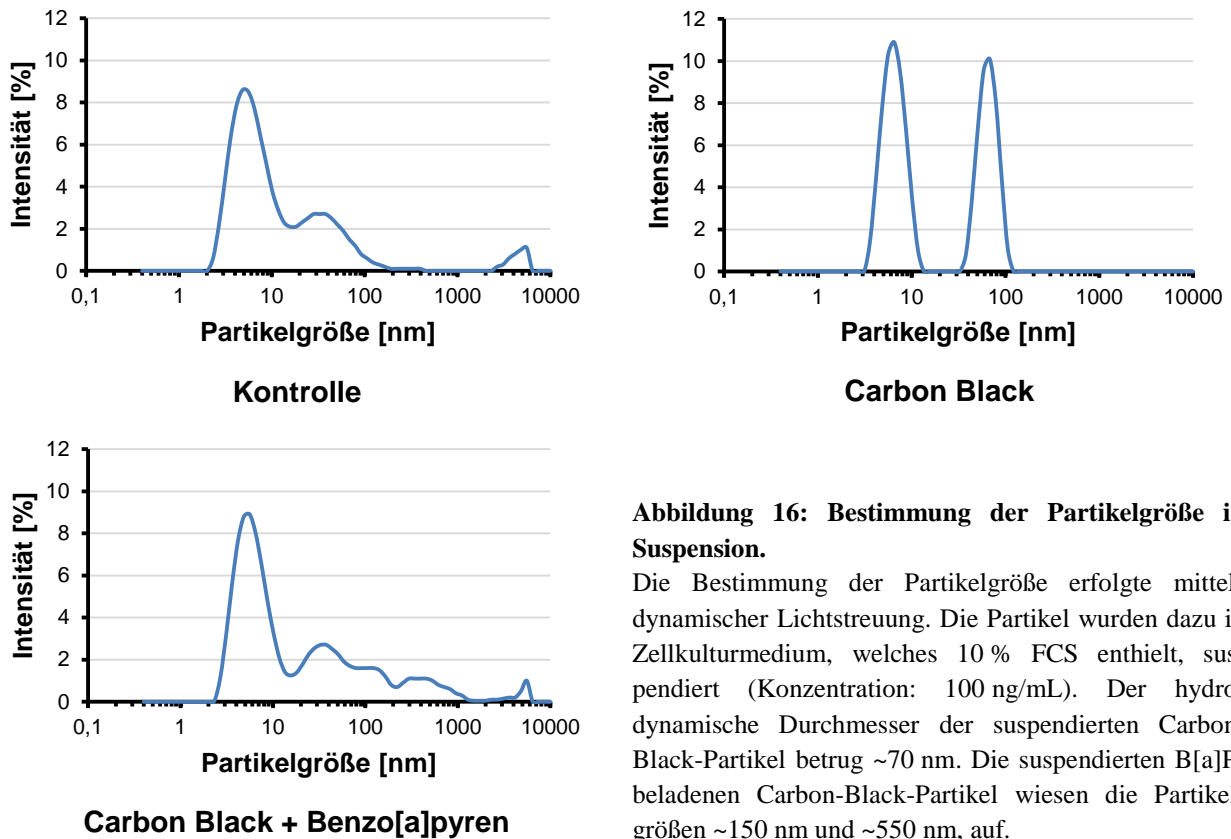


Abbildung 16: Bestimmung der Partikelgröße in Suspension.

Die Bestimmung der Partikelgröße erfolgte mittels dynamischer Lichtstreuung. Die Partikel wurden dazu in Zellkulturmedium, welches 10 % FCS enthielt, suspendiert (Konzentration: 100 ng/mL). Der hydrodynamische Durchmesser der suspendierten Carbon-Black-Partikel betrug ~70 nm. Die suspendierten B[a]P-beladenen Carbon-Black-Partikel wiesen die Partikelgrößen ~150 nm und ~550 nm, auf.

4.1.2.2 ROS-Produktion und Zellproliferation

Außer der Induktion von ROS beeinflusst Feinstaub die Proliferation von Zellen [94]. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit anhand dieser Parameter die Schwellenkonzentration ermittelt, bei der erste zelluläre Reaktionen auftreten. Beide Tests wurden in einem fünffachen Ansatz durchgeführt (n=5).

Zur Messung der ROS-Produktion wurden die Zellen mit H₂DCF nach 14-tägiger Exposition inkubiert. Beide Dieselrußsurrogate hatten in den eingesetzten Konzentrationen keinen Einfluss auf die ROS-Produktion im untersuchten Modell (Abbildung 17).

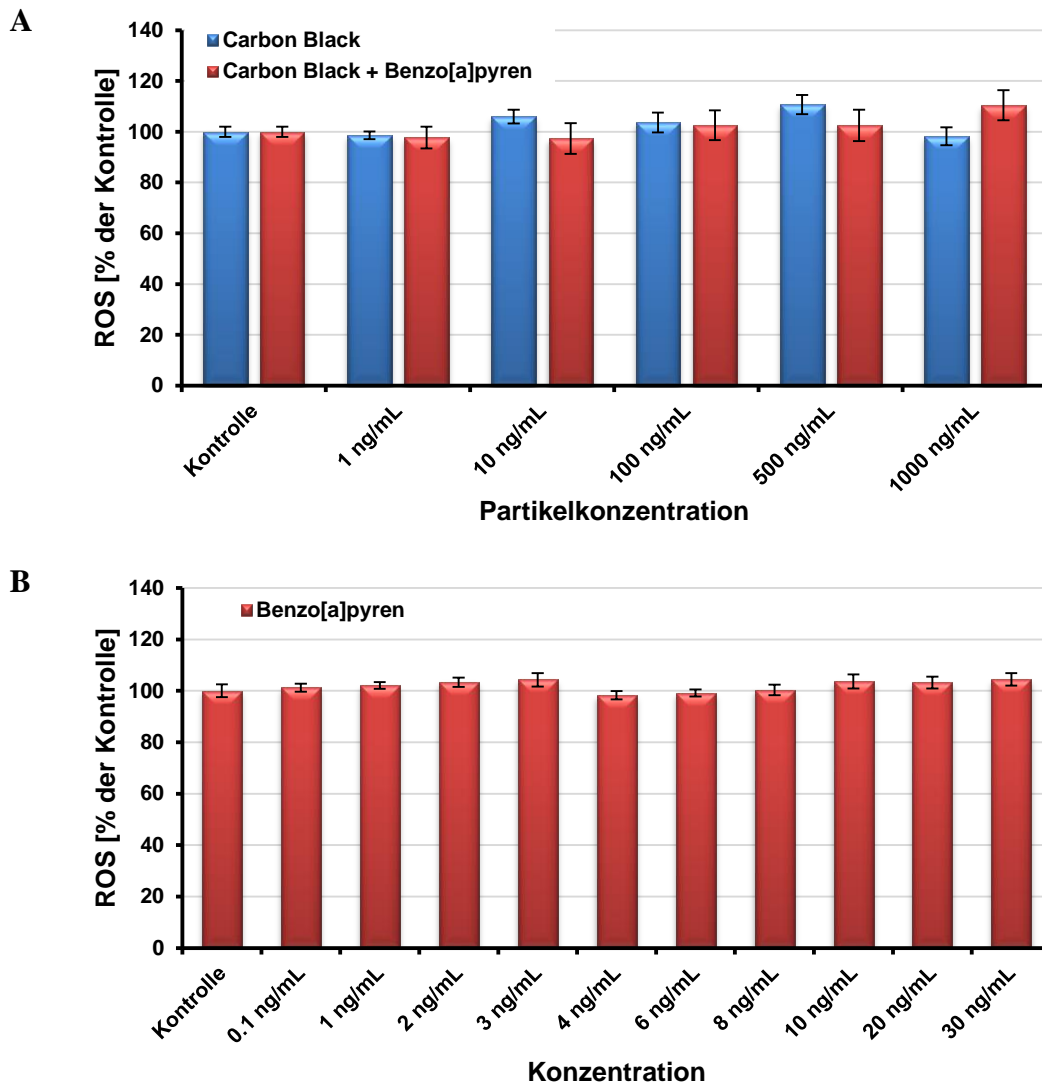


Abbildung 17: Quantifizierung der intrazellulären Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies.

Zur Messung der intrazellulär gebildeten ROS wurden die Zellen für 14 Tage gegen Carbon Black (CB) bzw. Benzo[a]pyren-beladenes Carbon Black (CB+B[a]P) in Konzentrationen von 0,1 ng/mL bis 1000 ng/mL exponiert (A). Zusätzlich wurde zur Abschätzung einer evtl. B[a]P-vermittelten Erhöhung des ROS-Gehalts ein paralleler Ansatz mit äquivalenten B[a]P-Konzentrationen (0,1 ng/mL bis 30 ng/mL) durchgeführt (B). 100 ng CB+B[a]P sind mit ca. 3 ng B[a]P beladen. Die intrazelluläre ROS-Produktion wurde mit H₂DCF gemessen, und die erhaltenen Werte wurden gegen die Kontrolle normalisiert (n=5; Mittelwert ±SEM). In keiner Gruppe wurden signifikante Unterschiede zur Kontrolle ermittelt.

Die Zellproliferation wurde anhand des Einbaus von Bromdesoxyuridin (BrdU) in die DNA getestet. Beide Partikelspezies stimulierten die Proliferation in dosisabhängiger Weise. Während in den gegen CB+B[a]P exponierten Zellen bereits ab einer Konzentration von 0,1 ng/mL eine signifikante Erhöhung der Proliferation gemessen wurde, zeigten die gegen CB exponierten Zellen eine signifikante Veränderung der Proliferation erst ab einer Konzentration von 100 ng/mL. In der CB-exponierten Gruppe war die Proliferation bei einer Konzentration von 100 ng/mL um 20 % erhöht, gegenüber 35 % in der gegen CB+B[a]P exponierten Gruppe (Abbildung 18 A).

Zusätzlich wurden die Zellen gegen äquivalente B[a]P-Konzentrationen exponiert, um einen Effekt der B[a]P-Beladung abschätzen zu können. Die äquivalente B[a]P-Konzentration von 100 ng CB+B[a]P beträgt ~3 ng (2,51 ng). Der zu testende Konzentrationsbereich wurde entsprechend von 0,1 ng/mL bis 30 ng/mL B[a]P gewählt.

In beiden Tests wurden keine zellulären Veränderungen beobachtet. Der Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies entsprach auch nach Exposition den Werten der Kontrolle. Die Proliferation erhöhte sich nach einer Exposition gegen 30 ng/ml nicht signifikant um 6 % (Abbildung 18 B).

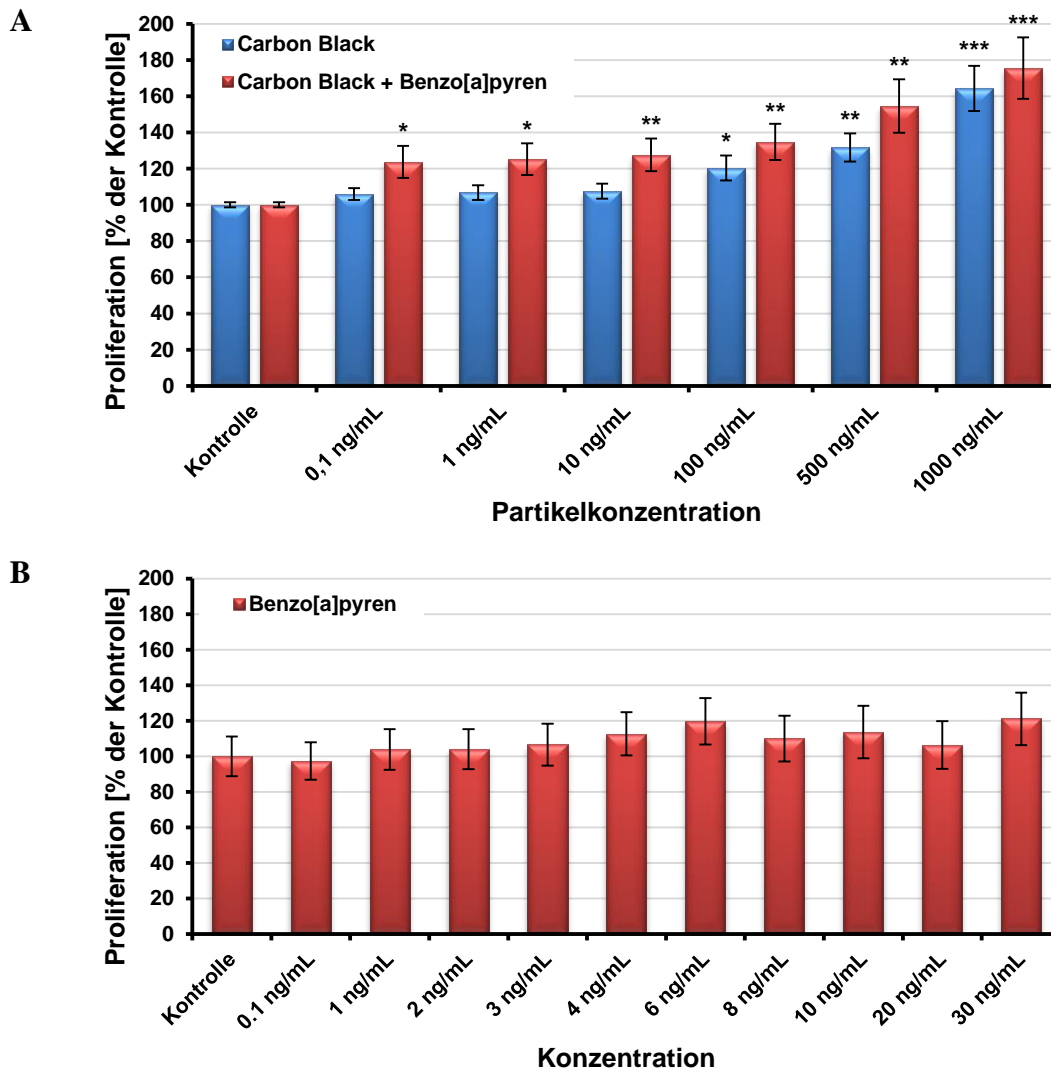


Abbildung 18: Bestimmung der Zellproliferation durch Einbau von Bromdesoxyuridin (BrdU) in die DNA.

Zur Messung der Proliferation wurden die Zellen für 14 Tage gegen Carbon Black (CB) bzw. B[a]P-beladenes Carbon Black (CB+B[a]P) in Konzentrationen von 0,1 ng/mL bis 1000 ng/mL exponiert (A). Zusätzlich wurde ein paralleler Ansatz mit äquivalenten B[a]P-Konzentrationen (0,1 ng/mL bis 30 ng/mL) durchgeführt, um eine mögliche B[a]P-vermittelte Änderung der Proliferationsrate abschätzen zu können (B). Die Zellproliferation wurde durch einen Antikörper-basierten Nachweis von eingebautem BrdU bestimmt. Die Proliferation zeigte für CB eine signifikante Veränderung ab einer Konzentration von 100 ng/mL, während in der gegen CB+B[a]P exponierten Gruppe eine Erhöhung der Proliferation bereits ab einer Konzentration von 0,1 ng/mL beobachtet wurde. Die Änderung der Proliferation bei einer Konzentration von 100 ng/mL betrug für CB 20 % und für CB+B[a]P 35 %. Die Exposition der Zellen gegen vergleichbare B[a]P-Konzentrationen verursachte keine signifikanten Veränderungen. Die erhaltenen Werte wurden gegen die Kontrolle normalisiert (n=6; Mittelwert \pm SEM). Die Sternchen zeigen den Grad der Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle an (*, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$).

4.1.2.3 Analyse des Proteoms von Zellen nach Exposition gegen Carbon Black (CB) bzw. CB+B[a]P

Anhand der Resultate der toxikologischen Tests (ROS und BrdU) wurde für die proteomischen Untersuchungen eine Exposition von 100 ng/mL festgelegt, da bei dieser Konzentration in beiden Gruppen (CB und CB+B[a]P) zelluläre Veränderungen auftraten.

Die Analyse des zellulären Proteoms erfolgte nach Auftrennung der Proteine mittels 2D-Gelelektrophorese. Die erhaltenen Gele wurden softwaregestützt verglichen, und Proteine, die im Vergleich zu den nichtexponierten Zellen eine signifikante Änderung ihrer Expression aufwiesen ($\geq \pm 1,7$), wurden massenspektrometrisch identifiziert (Tabelle 12 und Tabelle 13, im Anhang). Die Funktion der Proteine wurde durch Verwendung der *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) [95] bestimmt. Die proteomischen Analysen wurden bei 11 Versuchsansätzen jeweils als Dreifachbestimmung durchgeführt (n=11).

Insgesamt war die Expression von 19 Proteinen in der gegen Carbon Black exponierten Gruppe und von 18 Proteinen in der gegen CB+B[a]P exponierten Gruppe verändert. In beiden Gruppen war die Expression von Proteinen viermal häufiger hoch- als herunterreguliert. Die regulierten Proteine sind an der Translation, der Modulation der Zellstruktur und an metabolischen Prozessen beteiligt. Entsprechende Kreisdiagramme, die die relativen Anteile der Proteine an den jeweiligen molekularen Funktionen darstellen, werden in Abbildung 19 gezeigt.

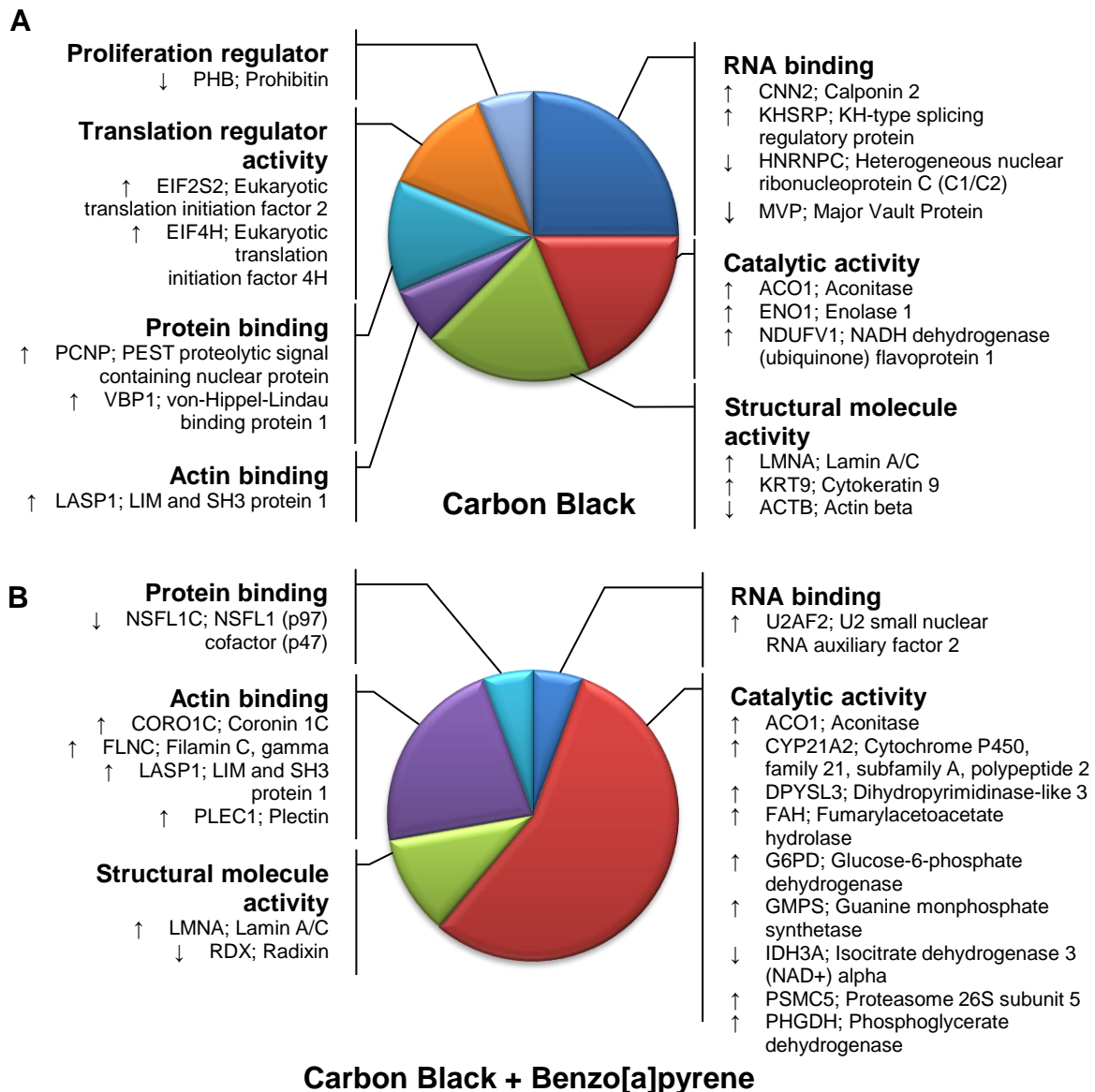


Abbildung 19: Klassifizierung der identifizierten Proteine nach ihrer molekularen Funktion.

Nach 14-tägiger Exposition gegen Carbon Black bzw. B[a]P-beladenes Carbon Black wurden die Proteine mittels 2D-Gelelektrophorese separiert. Proteine, die eine veränderte Expression (Faktor $\geq \pm 1,7$) nach Exposition gegen CB bzw. B[a]P-beladenes Carbon Black zeigten, wurden identifiziert und entsprechend ihrer molekularen Funktion klassifiziert. Die Richtung der Regulationsänderung (hoch oder herunter) wird durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Zur Bestimmung von Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation dieser Proteine beteiligt sind, wurde innerhalb der Datenbank DAVID eine *binding site enrichment analysis* (TFBS) durchgeführt. Diese ergab, dass etwa 69 % der Proteine der CB-exponierten Gruppe bzw. 79 % in der gegen CB+B[a]P exponierten Gruppe Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren der Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor-Familie (PPAR) aufwiesen. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Transkriptionsfaktoren der PPAR-Familie eine zentrale Rolle bei der Kontrolle der zuvor genannten Prozesse spielen, weshalb die Aktivität der Transkriptionsfaktoren der PPAR-Familie nachfolgend untersucht wurde.

4.1.2.4 Aktivitätsassay der Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor-Familie (PPAR)

Die Hypothese, dass Mitglieder der PPAR-Familie auf DNA-Ebene einen Teil der zellulären Antwort auf die Exposition gegen Dieselrußsurrogate vermitteln, wurde mit einem ELISA-basierten Aktivitätsassay (DNA-Bindungsassay) überprüft. Die Transkriptionsfaktoren der PPAR-Familie wurden dazu aus dem Zellkern extrahiert und mit ihren jeweiligen Bindungspartnern (*response elements*) inkubiert. Aktive Transkriptionsfaktoren können an ihre Bindungspartner binden und durch Antikörper detektiert werden. Die Analyse wurde als Vierfachansatz durchgeführt (n=4).

Als einziges Mitglied der PPAR-Familie zeigte PPAR γ im Assay eine Aktivitätsänderung nach Exposition. Die Aktivität von PPAR γ war um 23 % in den CB-exponierten Zellen und um 33 % in den CB+B[a]P-exponierten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe verringert. Die Aktivitäten der beiden anderen Transkriptionsfaktoren PPAR α und β/δ waren unverändert geblieben (Abbildung 20).

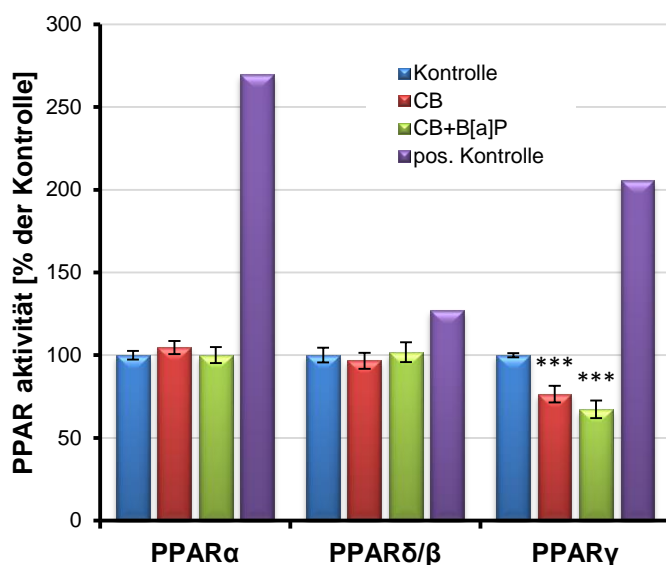


Abbildung 20: Bestimmung der PPAR-Aktivität.

Die Aktivitäten der Transkriptionsfaktoren PPAR α , β/δ und γ wurden in einem ELISA-basierten DNA-Bindungsassay nach 14-tägiger Exposition gegen CB bzw. B[a]P-beladenes CB getestet. Aus dem Zellkern extrahierte Transkriptionsfaktoren (aktive Faktoren) wurden mit ihren Bindungspartnern inkubiert und mittels spezifischer Antikörper detektiert. Die Aktivität von PPAR γ war nach 14-tägiger Exposition in beiden Gruppen signifikant reduziert (23 % CB; 33 %, CB+B[a]P), während die Transkriptionsfaktoren PPAR α und β/δ in ihrer Aktivität nicht beeinflusst wurden.

Die erhaltenen Werte wurden gegen die Kontrolle normalisiert (n=4; Mittelwert \pm SEM). Die Sternchen zeigen den Grad der Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle an (*, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$).

4.1.2.5 Bestimmung der mitochondrialen Vitalität

Die proteomische Analyse exponierter Zellen ergab eine Änderung der Proteinexpression mitochondrialer Proteine (ACO1, NDUFV1, IDH3A), die für die Energieproduktion von Bedeutung sind. Eine Störung der Energieproduktion kann zur Beeinträchtigung der mitochondrialen Vitalität und zur Initiierung der Apoptose führen. Hinweis auf eine gestörte Vitalität ist eine Verringerung oder Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials (Protonengradient über die Membran).

Zur Messung des Membranpotenzials bei CB- bzw. CB+B[a]P-exponierten Zellen wurde der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 123 verwendet. Rhodamin 123 ist ein kationischer Farbstoff, der eine grüne Fluoreszenz aufweist, jedoch in aktiven Mitochondrien aufgrund des Protonengradientens rot fluoresziert. Anhand der Fluoreszenz im roten Spektralbereich (Exzitations-/Emissionswellenlänge: 552 nm/581 nm) kann die Vitalität der Mitochondrien bestimmt werden. Das Membranpotenzial der Mitochondrien zeigte nach Exposition keine Änderung im Vergleich zur Zellkontrolle (Abbildung 21). Die Messung wurde in einem fünffachen Ansatz durchgeführt (n=5).

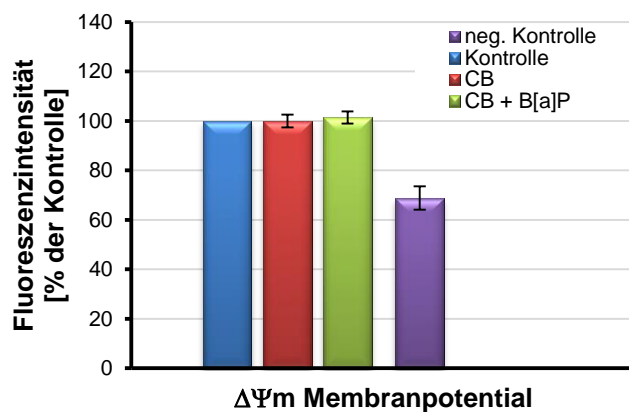


Abbildung 21: Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials.

Die Bestimmung des inneren Membranpotentials der Mitochondrien erfolgte nach 14-tägiger Exposition der Zellen gegen 100 ng/mL Carbon Black bzw. B[a]P-beladenes Carbon Black. Zur Detektion wurde der grüne Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 123 verwendet, der in den Mitochondrien aufgrund des Membranpotentials eine Rotverschiebung seines Anregungs- und Emissionsspektrums aufweist [96]. Die Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials ergab keine

Veränderungen nach 14-tägiger Exposition gegen Nanopartikel. Die erhaltenen Werte wurden gegen die Kontrolle normalisiert (n=5; Mittelwert \pm SEM).

4.1.2.6 Gaschromatographische Bestimmung zellulärer Stoffwechselintermediate

Eine Vielzahl regulierten Proteine ist in katalytischen Prozessen involviert, was wiederum auf einen veränderten zellulären Stoffwechsel infolge der Exposition hinweist. Als sensitive Methode zur Analyse zellulärer Metaboliten wird in der Metabolomik die Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC/MS) angewendet. Die gaschromatographischen Analysen wurden in fünf Ansätzen pro Gruppe jeweils als Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die GC/MS-Analyse zellulärer Metaboliten ergab 58 Intermediate, die ihre Konzentration nach Exposition gegen die Dieselrußsurrogate änderten (Abbildung 22). Die Konzentration eines Metaboliten wurde als verändert angesehen, wenn sich die relative Abundanz des Metaboliten um einen Faktor von $\geq \pm 1,5$ änderte. Die entsprechenden Intermediate, ihre Retentionszeit, Substanzklasse und Konzentrationsänderung sind in Tabelle 14 sowie Tabelle 15 (Anhang) aufgelistet. Zu den veränderten Metaboliten gehören Fettsäuren (Palmitinsäure, Stearinsäure), Aminosäuren (Glycin, Alanin, Phenylalanin) und Substrate der Glykolyse (Pyruvat, Laktat). Zuckerphosphate (Ribose-5-phosphat, Sorbit-6-phosphat, Arabinose-5-phosphat) wurden in niedrigerer und Fettsäuren (Palmitinsäure, Myristinsäure, Stearinsäure,

Lignocerin säure, Cerotinsäure) in höherer Konzentration in den exponierten Zellen nachgewiesen. Ebenso fanden sich Aldosteron und seine Vorstufe Cholesterin in hoher Konzentration in den Zellen nach Exposition.

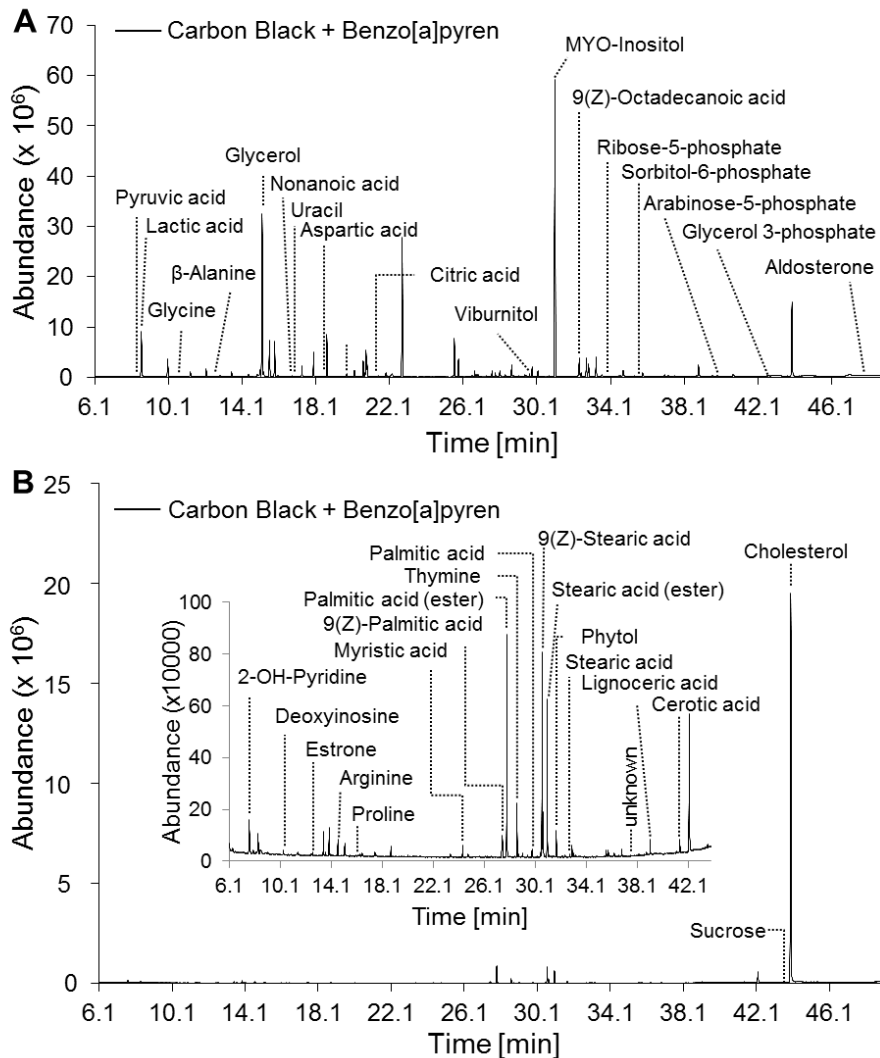


Abbildung 22: Gesamtionenstrom-Chromatogramm (TIC-Chromatogramm) nach Metabolitenextraktion.

Zelluläre Metaboliten wurden nach 14-tägiger Exposition gegen Carbon Black bzw. B[a]P-beladenes Carbon Black aus den Zellen extrahiert. Die Extraktion erfolgte mit Methanol (A) für wasserlösliche Metaboliten und mit MTBE/Hexan (B) für hydrophobe Stoffwechselprodukte. Insgesamt zeigten 58 Intermediate eine Änderung ihrer Konzentration nach Exposition gegen die Dieselrußsurrogate (n=5).

4.2 Entwicklung eines Verfahrens zur Extraktion phosphorylierter Proteine²

4.2.1 Zielsetzung

Die Aktivierung von Signalwegen erfolgt zu einem großen Teil durch posttranslationale Modifikationen von Proteinen, und zwar hauptsächlich durch eine Phosphorylierung. Die Analyse phosphorylierter Proteine ist jedoch eine schwierige Aufgabe in Anbetracht des geringen Vorkommens der meisten Phosphoproteine. Eine Anreicherung der Phosphoproteine erschien dabei ein geeigneter Ansatz zu sein, bislang verfügbare Techniken setzten jedoch hochspezialisierte Geräte voraus. Als vielversprechender Kandidat zur einfachen Anreicherung von Phosphoproteinen galt Lanthan bzw. dessen Salz Lanthanchlorid. Lanthan, das in der dreiwertigen Oxidationsstufe vorliegt, ist ein bekannter Phosphatbinder. Eine der ersten Anwendungen von Lanthanionen war die Dephosphorylierung von Nukleotiden in den 1950er-Jahren [97,98]. Gegenwärtig werden Lanthanionen hauptsächlich bei Patienten mit Hyperphosphatämie zur Bindung des Phosphats eingesetzt [99].

Als Alternative zu den in Kapitel 2.2 beschriebenen chromatographischen Techniken (IMAC, MOAC) sollte die Verwendbarkeit von Lanthanionen zur selektiven und effizienten Präzipitation von Phosphoproteinen untersucht werden. Die Methode sollte zunächst an Proben mit einem hohen Gehalt an Phosphoproteinen wie Hühnereiern (Ovalbumin) und Milch (Kasein) getestet werden.

Zusätzlich sollte das Verfahren der Phosphoproteinfällung mit verschiedenen Puffersystemen kompatibel sein, weshalb die Anwendung der Lanthanfällung in Lysispuffer-Systemen getestet werden sollte, die entweder Harnstoff/Thioharnstoff (verwendet in der 2D-Gelelektrophorese) oder EGTA/EDTA (Chelatoren, Harnstoff-frei) enthielten. Diesbezüglich sollten Proben verwendet werden, wie sie üblicherweise zur proteomischen Bestimmung zur Verfügung stehen.

4.2.2 Ergebnisse

Bei der Zugabe von Lanthanionen zu einer Phosphoprotein-haltigen Lösung, kann eine milchige Trübung der Proteinlösung und eine beginnende Präzipitation beobachtet werden. Zur Unterstützung des Präzipitationsprozesses und zur Erhöhung der Festigkeit des Niederschlags wurde KH_2PO_4 verwendet, gleichzeitig verbesserte dies die Sedimentierungseigenschaften des Niederschlags. Die Analyse der Spezifität der Lanthanionen für eine




² Pink et al. *Journal of Proteomics* **2011**; 75(2): 375-383

bestimmte Form von Phosphatanionen (mono- oder dianionisch) wurde durch Fällung von Proteinen unter sauren (pH 4,5), neutralen (pH 7) und alkalischen (pH 8,5) Bedingungen getestet. Unter diesen Bedingungen wurden folgende Mengenverhältnisse an präzipitierten Proteinen erhalten: 0,86 : 1 : 0,65 (pH 4,5 : 7,0 : 8,5). Zu beachten ist, dass der Niederschlag im sauren Bereich löslich ist.

4.2.2.1 Elution und Auftrennung der ausgefällten Proteine

Ein wichtiger Schritt für die nachfolgende Analyse der phosphorylierten Proteine ist die Elution nach ihrer Ausfällung. Von den getesteten Puffern (Tabelle 11) zeigten die Eluierungspuffer PA-LB (Phosphorsäure-Lysispuffer) und ILB (Imidazol-Lysispuffer) den höchsten Gehalt an Proteinen (Bradford-Test). Die Verwendbarkeit der einzelnen Pufferlösungen für die Gelelektrophorese wurde anhand der 1D-elektrophoretischen Trennung der eluierten Phosphoproteine getestet. Dabei zeigte sich, dass Proteine, die mit Phosphorsäure-haltigen Lösungen eluiert wurden, während der Elektrophorese nicht trennbar sind und augenscheinlich präzipitieren (Tabelle 11, Puffer PA und PA-LB). Die elektrophoretische Trennung mit Puffern, die Imidazol und Lysispuffer enthielten (einschließlich ILB), war möglich. Allerdings enthielten die Gele unterschiedliche Banden. Wie sich in späteren Analysen zeigte, eluiert Imidazol „reine“ Phosphoproteine (Bande 3 und 4, identifiziert als α -S1-Casein und α -S2-Casein), wohingegen der Puffer ILB Phosphoproteine sowie Phosphoglykoproteine aus dem Niederschlag eluiert.

Tabelle 11: Zusammensetzung der Elutionspuffer, Proteinausbeute und -trennung in der 1D-Gelelektrophorese. (Übernommen und angepasst aus [100], *reprinted with permission from Elsevier*)

	PA	I	LB	PA-LB	ILB
Phosphorsäure	7,5 M	-	-	0,2 M	-
Imidazol	-	4 M	-	-	1 M
Lysispuffer (u. a. 8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 2 % CHAPS)	-	-	enthalten	enthalten	enthalten
Proteinausbeute (Bradford-Test)	n. r.	befriedigend	befriedigend	sehr gut	sehr gut
1D-Gele mit den aus Milch extrahierten Proteinen	n. p.			n.p.	

- 1 α -Lactalbumin (möglicherweise phosphoryliert basierend auf UniProt)
 - 2 β -Lactoglobulin (Glykosylierung kann durch Erhitzen in Anwesenheit von Laktat vorkommen)
 - 3 κ -Casein
 - 4 α -S1-Casein
 - 5 α -S2-Casein
 - 6 Serumalbumin (Glykosylierung kann durch Erhitzen in Anwesenheit von Laktat vorkommen)
- n. r. kein Resultat
n. p. nicht möglich

4.2.2.2 Bestimmung der Reinheit der eluierten Phosphoproteine

Ein wichtiger Faktor für ein Anreicherungsverfahren ist die Reinheit der Proben am Ende des Verfahrens. Eine bekannte Kontamination, die durch die Fällung mittels Lanthanionen auftreten kann, ist die Verunreinigung mit DNA und RNA aus der Zelle. DNA- und RNA-Verunreinigungen lassen sich durch Bestimmung der UV-Absorption ermitteln. Die Bestimmung der Reinheit extrahierter Proteine wurde als dreifacher Ansatz durchgeführt (n=3).

Die Reinheit der präzipitierten Phosphoproteine in Bezug auf DNA/RNA wurde durch die Bestimmung der UV-Absorption bei $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 280$ nm untersucht. Nukleinsäuren

absorbieren UV-Licht mit einer Wellenlänge von 260 nm, Proteine hingegen absorbieren UV-Licht mit einer Wellenlänge von 280 nm. Das Verhältnis zwischen den beiden Absorptionswellenlängen ($A_{260/280}$) sollte für reine Phosphoproteine (100 %) bei $\sim 0,57$, für 95 % reine Proteine bei $\sim 1,06$ und für 90 % reine Proteine bei $\sim 1,30$ liegen. Das Verhältnis der beiden Absorptionswellenlängen ($A_{260/280}$) betrug vor und nach der Proteinfällung 0,99 bzw. 1,05. Dies entspricht einer Veränderung der Reinheit von ca. 1 %, bei einer Gesamtreinheit von 95 %.

4.2.2.3 Validierung der Phosphoproteine

Neben möglichen Verunreinigungen ist die selektive Anreicherung der gewünschten Proteine von essentieller Bedeutung. Entsprechend wurden verschiedene Ansätze zur Validierung der Extraktion von Phosphoproteinen gewählt. Zu diesen Ansätzen gehörten die Färbung der Phosphoproteine mittels Pro-Q[®] Diamond, Immunodetektion (Western Blot) mit anti-Phospho-Ser/Thr/Tyr-Antikörpern, chemische Detektion (Western Blot) mit Phos-Tag[™] und MALDI-ToF-Massenspektrometrie zur Bestimmung der Phosphorylierungsstelle in Ovalbumin. Mit allen Methoden konnten die La³⁺-basierte Extraktion von Phosphoproteinen nachgewiesen werden.

Abbildung 23 vergleicht ein mit Pro-Q[®] Diamond gefärbtes Gel mit einem mit CBB gefärbten Gel nach Lanthanfällung und Elution mit ILB.

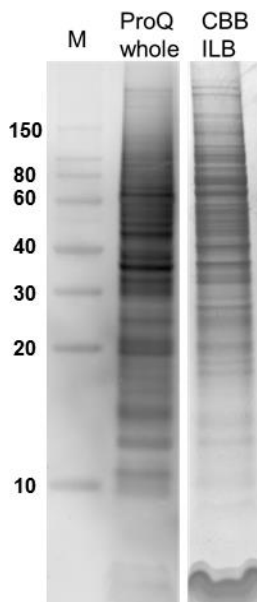


Abbildung 23: Validierung separierter Phosphoproteine durch Färbung mittels Pro-Q[®] Diamond.

Das Proteom einer humanen Leberprobe wurde in einem 1D-Gel parallel zu einer äquivalenten Probe von mit La³⁺ extrahierten Phosphoproteinen getrennt. Zur Visualisierung der Phosphoproteine wurde zunächst Pro-Q[®] Diamond verwendet (links), gefolgt von einer Coomassie-Färbung zur Darstellung der extrahierten Proteine (rechts). Die gleichen Proteinbanden sind in beiden Laufspuren vorhanden. Intensitätsunterschiede zwischen beiden Laufspuren wurden durch die verwendeten Scanner verursacht (Fluoreszenz-Scanner für Pro-Q[®] Diamond und Desktop-Scanner für CBB). (M: Molekularmarker).

(Quelle: Pink et al. [100], reprinted with permission from Elsevier)

Der Vergleich beider Bahnen (Pro-Q[®] Diamond und CBB) zeigte eine hohe Übereinstimmung der mit Pro-Q[®] Diamond gefärbten Phosphoproteine mit den mit Lanthanionen extrahierten Proteinen.

Für die Validierung mittels Western Blot wurden aus Milch und Hühnerei ausgefällte Phosphoproteinproben verwendet. Der Nachweis vorhandener Phosphatreste erfolgte durch Immunodetektion mit anti-Phospho-Ser/Thr/Tyr-Antikörpern und chemischer Detektion mit dem Reagenz Phos-TagTM. Wie in Abbildung 24 dargestellt, bestätigten beide Detektionsverfahren, dass Phosphoproteine durch Lanthanionen extrahiert wurden. Darüber hinaus wurden auch α -Lactalbumin und β -Lactoglobulin als phosphoryliert nachgewiesen, was bisher in der Literatur nicht beschrieben wurde. Lactalbumin galt nach der Datenbank UniProt (*Universal Protein Resource*) nur als potentiell phosphoryliert.

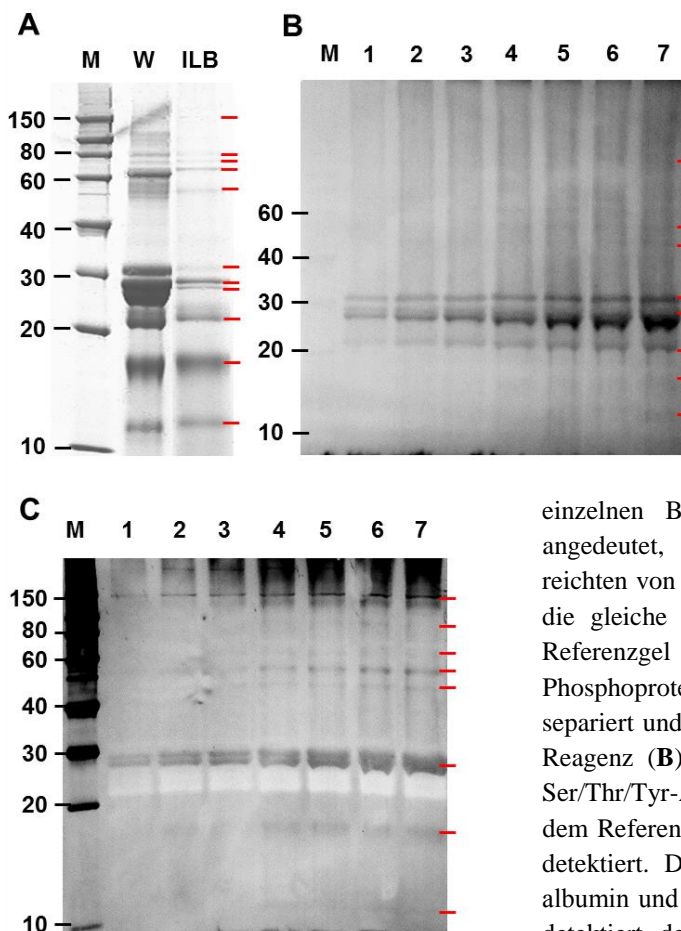


Abbildung 24: Western-Blot-Validierung der extrahierten Phosphoproteine.

Der Nachweis vorhandener Phosphoproteine erfolgte durch Immunodetektion mit anti-Phospho-Ser/Thr/Tyr-Antikörpern und chemischer Detektion mit dem Reagenz Phos-TagTM. Als Referenz wurden in einem separaten 1D-Gel (A) extrahierte Proteine aus der Milch und La^{3+} -extrahierte Proteine separiert (W: Gesamt-Proteom der Milch ausgefällt mit TCA, ILB: Proteine aus dem Pellet mit ILB-Puffer eluiert). Detektierte Proteine wurden mit roten Markern versehen. Die Proteinbeladung der

einzelnen Bahnen ist mit steigenden Zahlen von 1–7 angedeutet, die entsprechenden Proteinkonzentrationen reichten von 20 μg bis 80 μg Protein. Zur Validierung wurde die gleiche Phosphoproteinprobe verwendet, die auch im Referenzgel (A) eingesetzt wurde. Zum Nachweis der Phosphoproteine wurden die Proteine auf zwei Geln separiert und geblottet. Ein Blot wurde mit dem Phos-TagTM-Reagenz (B) inkubiert, der zweite Blot mit anti-Phospho-Ser/Thr/Tyr-Antikörpern (C). Alle markierten Proteine auf dem Referenzgel (A), wurden auch auf den Blots (B und C) detektiert. Darüber hinaus wurden zwei Proteine (α -Lactalbumin und β -Lactoglobulin, Tabelle 11) als phosphoryliert detektiert, deren Phosphorylierung bisher nicht bekannt war (M: Molekularmarker).

(Quelle: Pink et al. [100], *reprinted with permission from Elsevier*)

Zusätzlich wurde die Phosphorylierungsstelle in Ovalbumin durch MALDI-ToF-Massenspektrometrie bestimmt. In einem Vorversuch wurde dazu das Vorkommen von phosphoryliertem Ovalbumin (p-Ovalbumin) im Hühnerei nach Lanthanfällung untersucht (Abbildung 25).

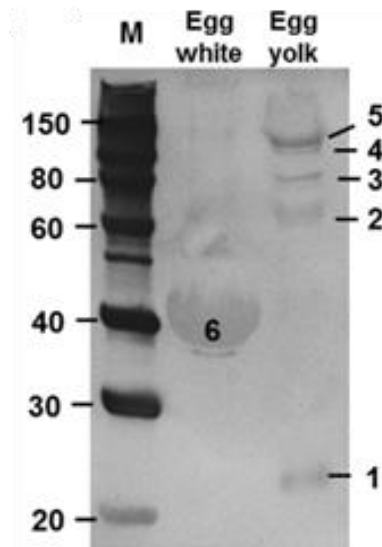


Abbildung 25: Western Blot extrahierter Phosphoproteine aus dem Hühnerei.

Phosphoproteine aus dem Hühnerei wurden mittels La^{3+} präzipitiert und auf einem 1D-Gel separiert. Zur Detektion der Phosphoproteine wurden das Gel geblottet und die phosphorylierten Proteine mittels anti-Phospho-Ser/Thr/Tyr-Antikörpern detektiert. Das zweite Gel wurde zur massenspektrometrischen Analyse mit Coomassie gefärbt. Auf dem Blot wurden Ovalbumin (6), sowie verschiedene Untereinheiten von Vitellogenin-1 (2, 3) und Vitellogenin-2 (1, 4, 5) als phosphoryliert nachgewiesen. Die verschiedenen Molekularmassen des Vitellogenins beruhen auf einem unterschiedlich starken Glykosilierungsgrad des Proteins (M: Molekularmarker).

(Quelle: Pink et al. [100], *reprinted with permission from Elsevier*)

Nachfolgend wurde die gleiche Probe, die p-Ovalbumin enthielt, auf einem weiteren 1D-Gel separiert und der korrespondierende Proteinspot zur massenspektrometrischen Analyse tryptisch verdaut. Bekannte Phosphorylierungsstellen von Ovalbumin sind die Aminosäuren Ser69 und Ser345. Ein entsprechender charakteristischer Neutralverlust von H_3PO_4 (m/z 98) bzw. von HPO_3 (m/z 80) wurde im CID-Spektrum für die Aminosäure Ser69 gezeigt (Abbildung 26).

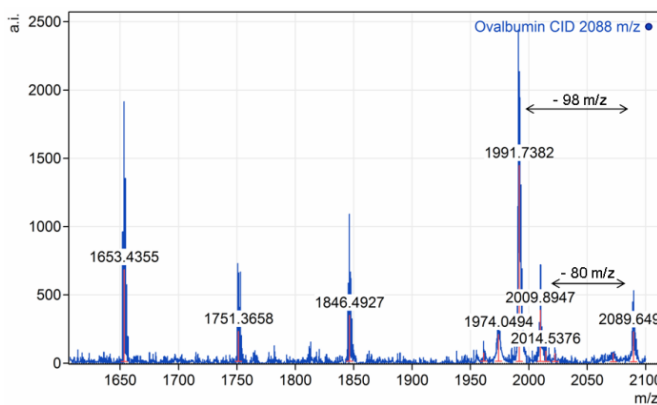


Abbildung 26: MALDI-ToF-CID-Fragmentenspektrum.

Bekannte Phosphorylierungsstellen von Ovalbumin sind die Aminosäuren Ser69 und Ser345. Das dargestellte MALDI-ToF-CID-Fragmentspektrum zeigt die Analyse eines Peptids, das die Aminosäure Ser69 enthält. In diesem Fragmentspektrum wurde der charakteristische Neutralverlust von H_3PO_4 (m/z 98) bzw. von HPO_3 (m/z 80) für die Phosphorylierung der Aminosäure Ser69 gezeigt. Die Präkursormasse des Peptids betrug m/z 2089.

(Quelle: Pink et al. [100], *reprinted with permission from Elsevier*)

4.2.2.4 Praktische Anwendbarkeit der Lanthan-Phosphoproteinfällung

Zum Test der praktischen Anwendbarkeit der Phosphoproteinfällung wurden komplexe Proben, wie sie in der Proteomik üblich sind (lysiert in Harnstoff/Thioharnstoff-haltigem Puffer sowie RIPA-Puffer) untersucht. Als Probenmaterial dienten neben Schweineurothelzellen (lysiert nach Kultivierung mit Harnstoff/Thioharnstoff-Lysispuffer) auch nichtmaligne Lebergewebeproben (lysiert mit RIPA-Puffer). Wie in Abbildung 27 sowie Tabelle 16 und Tabelle 17 (Anhang) gezeigt, ist die Anreicherung und Extraktion von phosphorylierten

Proteinen aus beiden Puffersystemen möglich. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass neben einfach phosphorylierten Proteinen (78 %) auch mehrfach phosphorylierte Proteine (22 %) mit bis zu 33 möglichen Phosphorylierungsstellen (z. B. Keratin 8) präzipitiert und somit angereichert wurden (Tabelle 17). Ferner besitzen zwei Proteine laut UniProt Acetylierungsstellen, für drei Proteine wurden noch keine posttranslationale Modifikationen beschrieben, und ein Protein wurde als acetyliertes Glykoprotein charakterisiert.

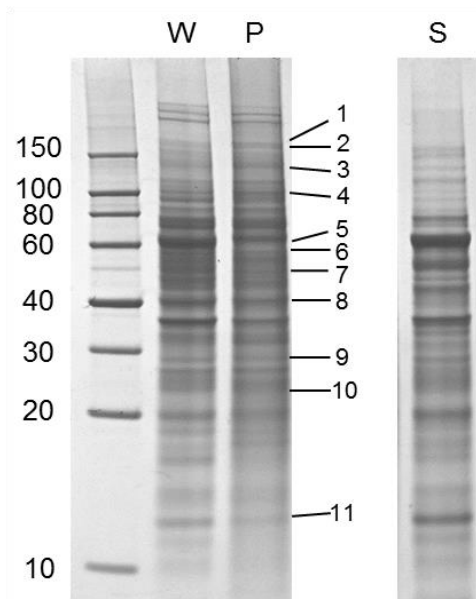


Abbildung 27: Repräsentatives 1D-Gel humaner Phosphoproteine aus der Leber.

Gasamtzelllysate (W), Überstand (S) und Phosphoproteine (P) aus der gleichen Gewebeprobe wurden nach der Lyse von menschlichem Lebergewebe elektrophoretisch in einem 1D-Gel getrennt. Je Bahn wurden 10 µg Protein eingesetzt. Der Überstand (S) repräsentiert die Fraktion an Proteinen, die nach Zugabe von La^{3+} und KH_2PO_4 nicht präzipitiert wurden. Im Anschluss an die gelelektrophoretische Trennung wurden die markierten Banden nach dem Zufallsprinzip für die Identifizierung ausgewählt (Tabelle 16, Anhang).

(Quelle: Pink et al. [100], *reprinted with permission from Elsevier*)

4.3 Untersuchung des Phosphoproteoms und zellulärer Angiogenesemarker nach Exposition gegen Dieselrußsurrogate

4.3.1 Zielsetzung

Niedrigdosis-Experimente führen häufig zu keinen eindeutigen Effekten auf zelluläre Endpunkte, wie etwa DNA-Schäden. Gleichwohl aktivieren Zellen Signalwege als Antwort auf einen äußeren Stimulus, indem beispielsweise zelluläre Proteine phosphoryliert oder dephosphoryliert werden. Daher kommt dieser Form der posttranslationalen Modifikation eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle von zellulären Prozessen zu [55,56].

Da zu erwarten war, dass die bereits identifizierten Proteine (Kapitel 4.1) nicht die Gesamtheit der beeinflussten Signalwege repräsentieren, sollte das Phosphoproteom nach Präzipitation mittels Lanthanionen untersucht werden. Zusätzlich sollten die erhaltenen Daten als Anhaltspunkte für zelluläre Veränderungen dienen, die mit Hilfe von weiteren Tests validiert werden sollten.

4.3.2 Ergebnisse

4.3.2.1 Proteomische Analyse extrahierter Phosphoproteine

Zur Analyse des Phosphoproteoms wurden die extrahierten phosphorylierten Proteine durch 2D-Gelelektrophorese getrennt. Die erhaltenen Gele wurden softwaregestützt verglichen, und Proteine, die eine signifikante Änderung ihrer Phosphorylierung aufwiesen ($\geq \pm 1,5$), wurden massenspektrometrisch identifiziert. Ihre Funktion und zelluläre Lokalisation wurde mit Hilfe der Datenbanken DAVID und *Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships* (PANTHER) *Classification Systems* [101] ermittelt. Die phosphoproteomische Analyse wurde als sechsfacher Ansatz in Triplikaten durchgeführt (n=6).

Insgesamt zeigten 22 Phosphoproteine in der CB-exponierten Gruppe und 33 Proteine in der CB+B[a]P-exponierten Gruppe eine Änderung ihrer Phosphorylierung (Tabelle 18 sowie Tabelle 19, Anhang). Die regulierten Proteine sind im Wesentlichen an drei zellulären Mechanismen beteiligt: am Aufbau des Zytoskeletts (Keratine, Vimentin, Aktin), an katalytischen Prozessen sowie an Protein-DNA-, Protein-RNA- und Protein-Protein-Interaktionen. Die Analyse der potentiellen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen (TFBS) ergab auch bei diesen Proteinen eine erhöhten Anteil an Bindungsmotiven für Mitglieder der PPAR-Familie, 72 % in der CB und 89 % CB+B[a]P-exponierten Gruppe.

Auffallend war, dass viele phosphorylierte Proteine am Zytoskelett beteiligt sind, was auf eine Veränderung des Zytoskeletts als Antwort auf eine Exposition gegen die Dieselrußsurrogate hinwies.

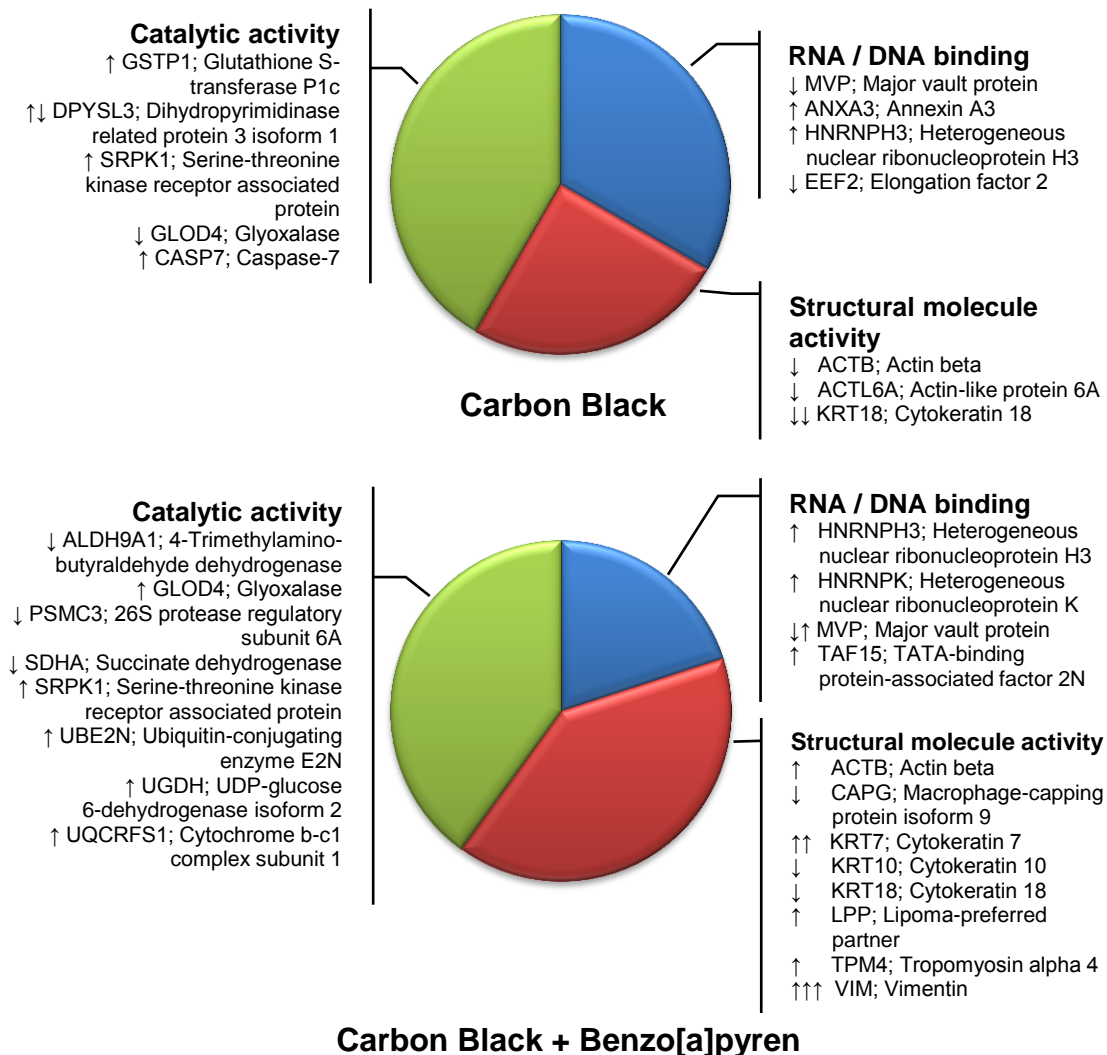


Abbildung 28: Charakterisierung identifizierter Phosphoproteine nach ihrer molekularen Funktion.

Nach 14-tägiger Exposition gegen die Dieselrußsurrogate wurde das Phosphoproteom nach La^{3+} -Extraktion mittels 2D-Gelelektrophorese separiert. Phosphoproteine, die eine veränderte Phosphorylierung (Faktor $\geq \pm 1,5$) nach Exposition gegen CB bzw. B[a]P-beladenes Carbon Black zeigten, wurden identifiziert und entsprechend ihrer molekularen Funktion klassifiziert. Die Richtung der Regulationsänderung (hoch oder herunter) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die Anzahl der Pfeile repräsentiert die Anzahl unterschiedlicher Phosphorylierungszustände für die jeweiligen Phosphoproteine ($n=6$).

4.3.2.2 Fluoreszenzfärbung des Aktin- und Vimentin-Zytoskeletts

Die Auswirkungen der vermehrten Phosphorylierung zytoskelettaler Proteine, vor allem von Aktin und Vimentin, legten strukturelle Veränderungen des Zytoskeletts der exponierten Zellen nahe, die in weiteren Untersuchungen analysiert wurden. Dazu wurden diese beiden

Proteine immunhistochemisch gefärbt und am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop quantifiziert. Die Analyse des Zytoskeletts erfolgte in einem fünffachen Ansatz.

Nach 14-tägiger Exposition gegen Carbon Black bzw. B[a]P-beladenes Carbon Black zeigte die Fluoreszenzmessung eine erhöhte Konzentration beider Zytoskelettfilamente im Vergleich zur Kontrolle. Der Gehalt an Vimentin war um 25 % in beiden Expositionsgruppen erhöht, während Aktin eine Erhöhung um 13 % in der CB-exponierten Gruppe bzw. um 25 % in der CB+B[a]P-exponierten Gruppe aufwies. Darüber hinaus waren morphologische Veränderungen der Aktinfilamente in beiden exponierten Gruppen erkennbar. Zu diesen Veränderungen gehörten das Auftreten von Stressfasern, Filopodia-artigen Strukturen (Filopodien) sowie eine vermehrte Nukleation von Aktin an der Plasmamembran (Abbildung 29). Diese morphologischen Veränderungen treten bei Zellen während der Migration bzw. Invasion auf.

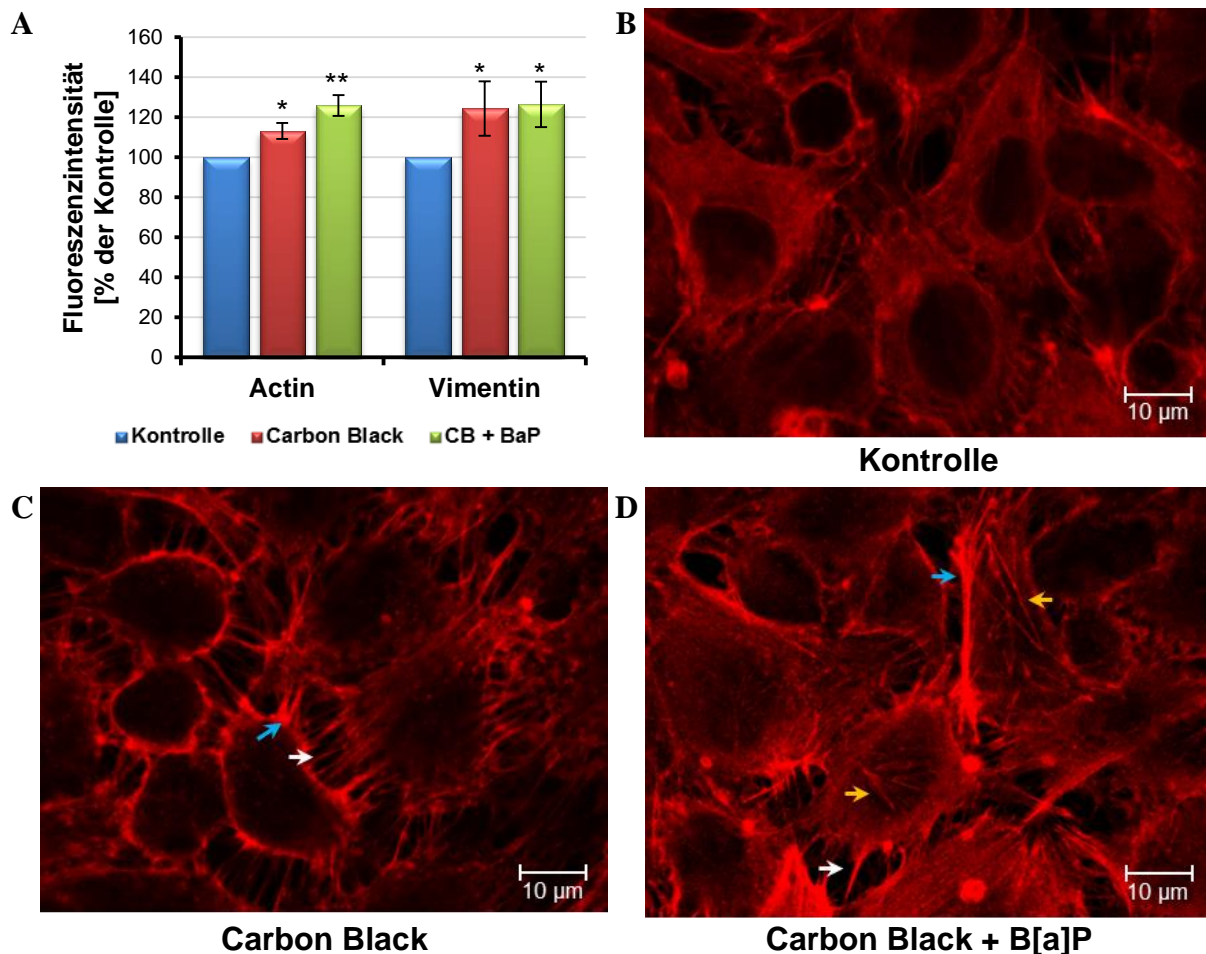


Abbildung 29: Fluoreszenzanalyse der Aktin- und Vimentinfilamente.

Nach 14-tägiger Exposition gegen 100 ng/mL Carbon Black bzw. Benzo[a]pyren-beladenes Carbon Black wurden die auf Deckgläschen kultivierten Zellen mit Formaldehyd fixiert und mit Fluoreszenz-markierten anti-Vimentin-Antikörpern (Vimentinfärbung) sowie TRITC-markiertem Phalloidin (Aktinfärbung) inkubiert. Zur einfacheren Handhabung und zum Schutz der markierten Zellen wurden die Deckgläschen mit der Zellseite auf Objektträger mit Eindeckmedium fixiert. Die Analyse der markierten Zellen erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. Für beide Filamente wurde eine erhöhte Fluoreszenzintensität nach Exposition gegen Dieselrußsurrogate bestimmt. Die Intensität der Vimentinfluoreszenz war um 25 % in beiden Gruppen erhöht, während die Fluoreszenz der Aktinfilamente um 13 % (CB) bzw. 25 % (CB+B[a]P) erhöht war (A). Darüber hinaus zeigten die exponierten Zellen morphologische Veränderungen des Aktinskeletts (C, D). Zu diesen Änderungen gehörten eine erhöhte Nukleation von Aktin in der Plasmamembran (blaue Pfeile), Bildung von Filopodia-artigen Strukturen (weiße Pfeile) sowie Stressfasern (orangefarbene Pfeile). Die erhaltenen Werte wurden gegen die Kontrolle normalisiert (n=5; Mittelwert \pm SEM). Die Sternchen zeigen den Grad der Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle an (*, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$).

4.3.2.3 Test der zellulären Invasion und Migration

Mögliche funktionelle Konsequenzen der morphologischen Veränderungen wurden anhand der Invasions- und Migrationseigenschaften der Zellen untersucht. Die Tests wurden in einem fünffachen Ansatz durchgeführt (n=5).

Zum Test der Invasion wurden Zellen nach 14-tägiger Exposition in einem Transwell-Assay auf MatrigelTM-beschichteten Membraneinsätzen ausgesät. Zur Initiierung der Invasion wurden

die Zellen in reduziertem Zellkulturmedium (2 % FCS) für 24 Stunden inkubiert. Zur Chemotaxis (Lockstoff) diente normales Zellkulturmedium mit 10 % FCS. Sowohl die CB- als auch die CB+B[a]P-exponierte Gruppe zeigten im Vergleich zur Kontrolle nach 24-stündiger Inkubation eine signifikante Erhöhung der Invasionsrate um 90 % (Abbildung 30).

Ein ähnliches Bild ergab sich auch beim Test der Migration. Der Test der Migration erfolgte im Unterschied zur Invasion mit unbeschichteten Membraneinsätzen. Zur Initiierung der Migration diente Zellkulturmedium, welches mit 6 % FCS versetzt war. Normales Zellkulturmedium (enthielt 10 % FCS) diente wie im Invasions-Assay als Lockstoff. Nach 24-stündiger Inkubation zeigten beide Gruppen (CB und CB+B[a]P) im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Erhöhung ihrer Migrationsrate um 35 % (Abbildung 30).

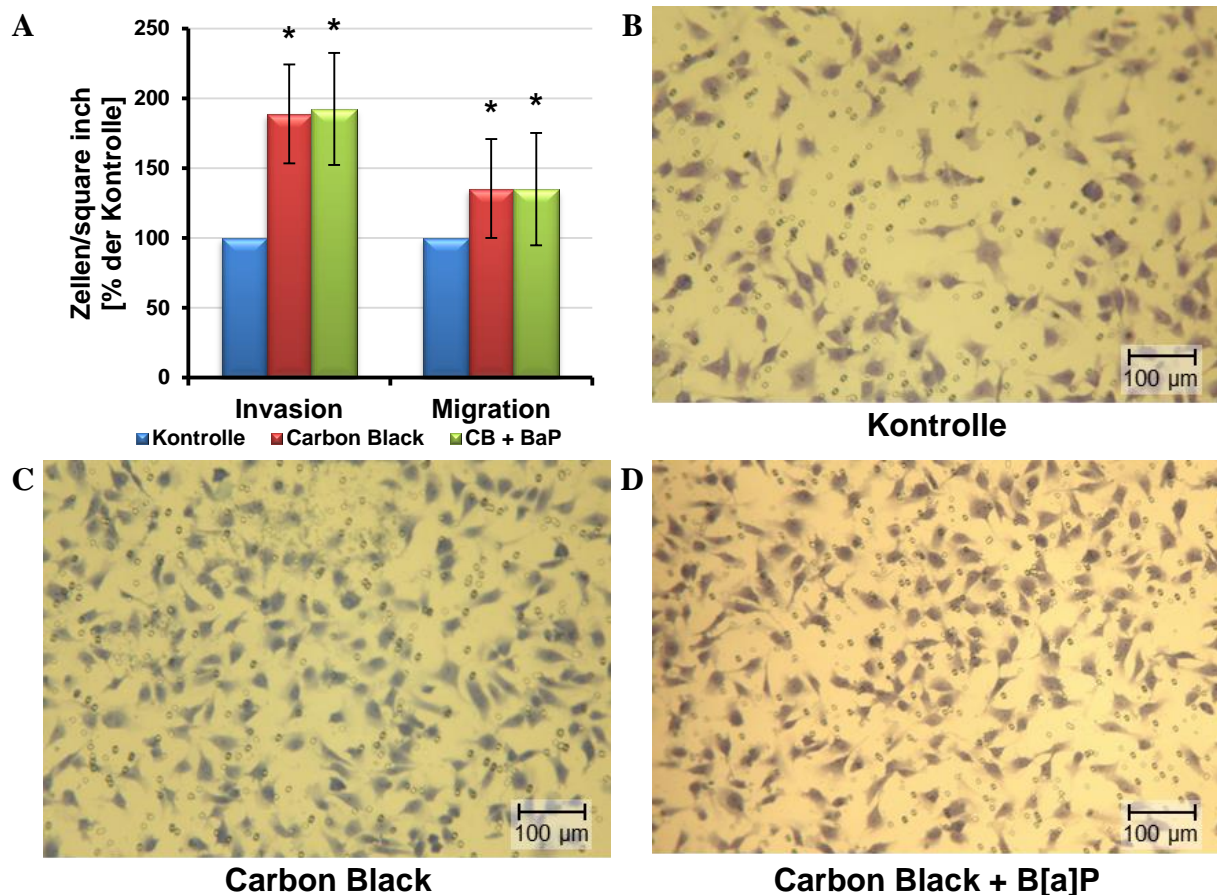


Abbildung 30: Analyse der zellulären Migration und Invasion nach Exposition.

Im Anschluss an die 14-tägige Exposition gegen CB bzw. CB+B[a]P wurden die Zellen in Boyden-Kammern zum Test der Migration und Invasion in einem Transwell-Assay ausgesät. Zum Test der Migration wurden die Zellen mit reduziertem Zellkulturmedium inkubiert, welches 6 % FCS enthielt. Die Invasion der Zellen wurde durch das Aussähen auf Matrigel™-beschichteten Membraneinsätzen und Inkubation mit 2 % FCS getestet. In beiden Tests wurde als Lockstoff Kulturmedium verwendet, welches 10 % FCS enthielt. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen aus den Kammern entfernt und die migrierten bzw. eingewanderten Zellen, die das Matrigel™ passiert hatten, mit Methanol fixiert und mit Toluidinblau gefärbt. Die Analyse der Migration ergab, dass nach Exposition gegen die Dieselrußsurrogate 35 % mehr Zellen migrierten (A). Die Invasion führte im Vergleich zur Kontrolle zu einer Zunahme von 90 % nach Exposition (B, C, D: repräsentative Abbildung der migrierten Zellen). Die erhaltenen Werte wurden gegen die Kontrolle normalisiert (n=5; Mittelwert ±SEM). Die Sternchen zeigen den Grad der Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle an (*, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$).

4.3.2.4 Prüfung der endothelialen Barrierefunktion

Neben der Invasion und Migration regulieren Endothelzellen aktiv den Austausch von Sauerstoff, Nährstoffen und Abfallstoffen zwischen umgebendem Gewebe und dem Blutstrom. Diese „Barrierefunktion“ spielt somit eine entscheidende Rolle bei der Versorgung des umliegenden Gewebes, dessen Störung weitreichende Folgen haben kann. So treten Veränderungen der Barrierefunktion z. B. bei Entzündungsprozessen, allergischen Reaktionen oder bei atherosklerotischen Veränderungen der Gefäße auf. Die Prüfung der endothelialen Barrierefunktion wurde in einem fünffachen Ansatz durchgeführt.

Nach 14-tägiger Exposition gegen die Dieselrußsurrogate wurden die Zellen in Boyden-Kammern ausgesät und nach dem Anwachsen mit fluoreszenzmarkiertem Dextran für 24 Stunden inkubiert. Getestet wurden drei Dextrane unterschiedlicher Ladung, FITC-Diethylaminoethyl-Dextran (FITC-DEAE-Dextran, positiv geladen), FITC-Carboxymethyl-Dextran (FITC-CM-Dextran, negativ geladen) und ungeladenes Dextran (FITC-Dextran). Wie in Abbildung 31 dargestellt, zeigten die exponierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Verringerung der Permeabilität gegenüber den Dextranen. Die Inkubation mit positiv geladenem Dextran (DEAE-Dextran) ergab eine Verringerung um 22 % (CB) bzw. 27 % (CB+B[a]P), mit negativ geladenem Dextran um 32 % (CB) bzw. 39 % (CB+B[a]P) und mit neutral geladenem Dextran um 16 % (CB) bzw. 7 % (CB+B[a]P, nicht signifikant).

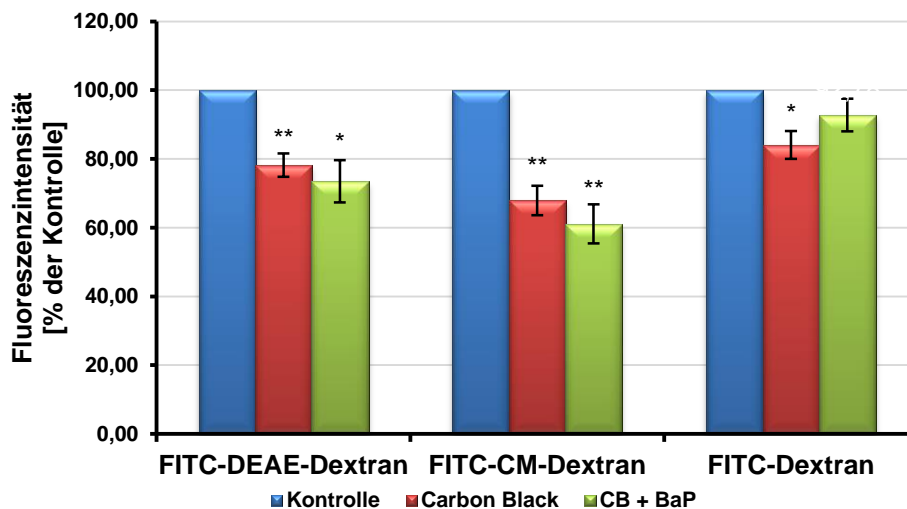


Abbildung 31: Prüfung der endothelialen Barrierefunktion.

Nach 14-tägiger Exposition gegen die Dieselrußsurrogate wurden die Zellen in Boyden-Kammern (Porengröße der Membraneinsätze 1 µm) in einem Transwell-Assay ausgesät. Im Anschluss an eine 24-stündige Inkubation zum Anwachsen der Zellen wurden das Zellkulturmedium gegen Dextran-haltiges Medium (Konzentration 1 mg/mL) ausgetauscht und die Zellen weitere 24 Stunden inkubiert. Zur Bestimmung der Barrierefunktion wurde das Medium des unteren Kompartimentes der Boyden-Kammer entnommen und die Fluoreszenz mittels Mikroplatten-Reader (Exzitations-/Emissionswellenlänge: 485 nm/535 nm) gemessen. Die Exposition der Zellen gegen die Dieselrußsurrogate führte zu einer Verringerung der Permeabilität im Vergleich zur Kontrolle. Die Inkubation mit positiv geladenem Dextran (DEAE-Dextran) ergab eine Verringerung um 22 % (CB) bzw. 27 % (CB+B[a]P), mit negativ geladenem Dextran (CM-Dextran) um 32 % (CB) bzw. 39 % (CB+B[a]P) und mit neutral geladenem Dextran um 16 % (CB) bzw. 7 % (CB+B[a]P). Die erhaltenen Werte wurden gegen die Kontrolle normalisiert (n=5; Mittelwert ±SEM). Die Sternchen zeigen den Grad der Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle an (*, p ≤ 0,05; **, p ≤ 0,01; ***, p ≤ 0,001).

4.3.2.5 Intrazelluläre Bestimmung des Calciumgehalts

Die Expression verschiedener Calcium-bindender Proteine wurde durch die Exposition gegen die Dieselrußsurrogate beeinflusst, ferner ist Calcium eine wichtiger *second messenger*, der eine Vielzahl zellulärer Funktionen beeinflusst, u. a. das Aktinzytoskelett bzw. die Angio-

genese (Kapitel 5.3.4). Um eine Beeinflussung der Calciumhomöostase durch die Exposition gegen die Dieselrußsurrogate abzuschätzen, wurde der intrazelluläre Calciumgehalt im Zytosol mit dem Fluoreszenzindikator Fluo-4 und in den Mitochondrien mit Rhod-2 gemessen. Die Bestimmung der intrazellulären Calciumgehalts erfolgte in einem fünffachen Ansatz (n=5).

Nach 14-tägiger Exposition gegen Carbon Black bzw. B[a]P-beladenes Carbon Black wurden die Zellen mit den Fluoreszenzindikatoren inkubiert und die Fluoreszenzintensität mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie gemessen.

Die zytosolische Calciumkonzentration stieg um 12 % in der CB-exponierten Gruppe bzw. um 21 % in der CB+B[a]P-exponierten Gruppe gegenüber der Kontrolle an. Die mitochondriale Calciumkonzentration verhielt sich ähnlich. Sie stieg in der CB-exponierten Gruppe signifikant um 11 % bzw. ebenfalls signifikant um 16 % in der CB+B[a]P-exponierten Gruppe an (Abbildung 32).

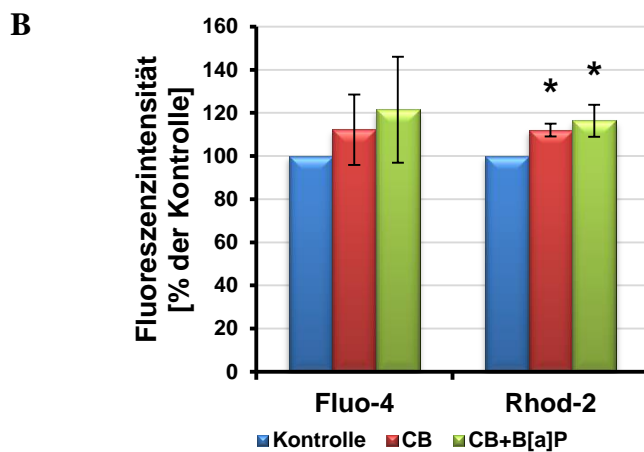
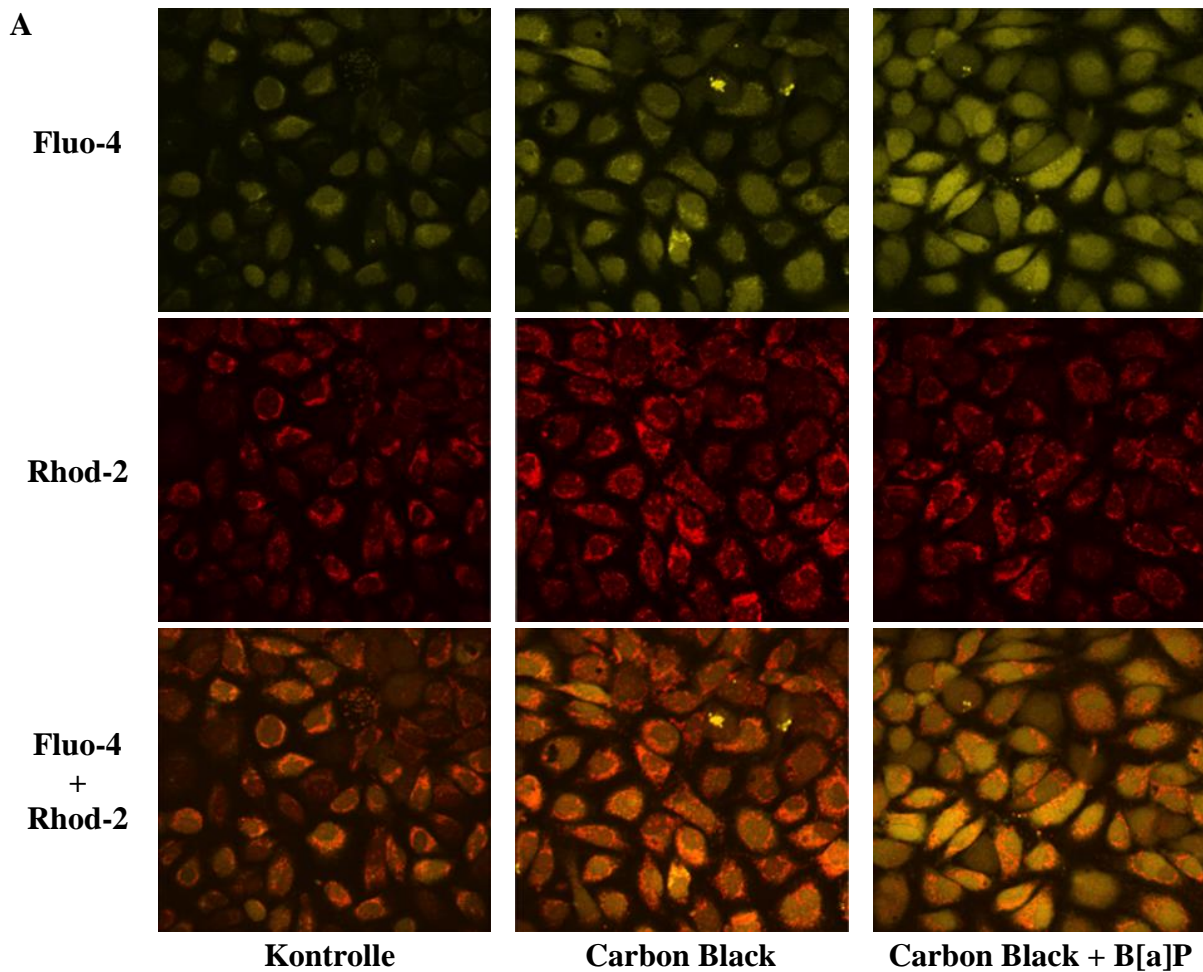


Abbildung 32: Bestimmung des intrazellulären Calciumgehalts nach Exposition gegen die Dieselußsurrogate.

Nach 14-tägiger Exposition gegen die Dieselußsurrogate wurden die Zellen mit den Calcium-Fluoreszenzindikatoren Fluo-4 und Rhod-2 inkubiert und mittels Live-Cell-Imaging am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop untersucht. (A) Fluo-4 detektiert vornehmlich das freie Calcium im Zytosol, Rhod-2 das mitochondriale. (B) Beide Indikatoren zeigten eine Erhöhung des intrazellulären Calciumgehalts. Das zytosolische Calcium erhöhte sich im Vergleich zur Kontrolle um 12 % in CB-exponierten Zellen bzw. um 21 % in CB+B[a]P-exponierten Zellen. Der mitochondriale Calciumgehalt stieg um 11 % in CB-exponierten Zellen bzw. um 16 % in CB+B[a]P-exponierten Zellen an. Die erhaltenen Werte wurden gegen die Kontrolle normalisiert (n=5; Mittelwert ±SEM). Die Sternchen zeigen den Grad der Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle an (*, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$).

Die erhaltenen Werte wurden gegen die Kontrolle normalisiert (n=5; Mittelwert ±SEM). Die Sternchen zeigen den Grad der Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle an (*, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$).

5 Diskussion

5.1 Proteomische und metabolomische Charakterisierung der endothelialen Antwort auf eine Exposition gegen Dieselrußsurrogate

Mögliche adverse gesundheitliche Auswirkungen von Expositionen gegen Nanopartikel rücken zunehmend in den Fokus wissenschaftlichen Interesses. Dabei werden nicht nur unterschiedliche Untersuchungsansätze (In-vivo- und In-vitro-Untersuchungen, epidemiologische Untersuchungen) gewählt, sondern auch eine breite Palette von Nanopartikeln mit unterschiedlichen Eigenschaften eingesetzt. Gerade der letzte Punkt (Diversität der Nanopartikel) erschwert es erheblich, einen einheitlichen Pathomechanismus für Nanopartikel zu beschreiben. Dennoch haben sich bisher bestimmte Paradigmen herausgebildet.

Der Schwerpunkt bisheriger Studien lag auf den gesundheitlichen Auswirkungen einer Partikelexposition auf das respiratorische System. Ergebnisse dieser Studien legen nahe, dass die Nanopartikel nach Aufnahme in die Zellen oxidativen Stress induzieren. Nachfolgend werden zahlreiche Signalwege aktiviert, die u. a. zu einer erhöhten Zellproliferation, zur zellulären Inflammation - einhergehend mit der Freisetzung von Entzündungsmediatoren (Zytokine) zur Rekrutierung immunologisch aktiver Zellen - sowie zur Aktivierung antioxidativer Signalwege bzw. zur Freisetzung antioxidativer Substanzen führen [94,102–105]. Darüber hinaus zeigten epidemiologische Studien eine mögliche Beteiligung von Feinstaub an der Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen an. Eine Voraussetzung dafür wäre, dass in die Lunge aufgenommener Feinstaub direkt oder indirekt mit Zellen des kardiovaskulären Systems interagieren kann. Studien zur Aufnahme von Nanopartikeln über die Lunge zeigten, dass Nanopartikel das Epithel der Lunge in vergleichsweise kurzer Zeit überwinden können und nachfolgend über das Lymphsystem oder die Blutzirkulation sekundäre Organe erreichen [18,19,103]. Bei diesen Studien translozierte ein Anteil von 1 % bis 11 % der in die Lunge eingebrachten Nanopartikel. Der Anteil bzw. die Menge an eingeatmeten Partikeln, die letztendlich in das kardiovaskuläre System übertreten, ist beim Menschen nicht bekannt und von einer Vielzahl von Faktoren wie Form, Größe oder Oberflächenchemie der Nanopartikel abhängig [21,22,103].

Die Mechanismen, über die Feinstaub und speziell Nanopartikel an der Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen beteiligt sein können, sind sehr komplex und bisher wenig erforscht. Untersuchungen an entsprechenden endothelialen In-vitro-Modellen gehen zumeist von kurzzeitigen Expositionen im µg-Bereich aus [106–109]. In der vorliegenden Arbeit

sollten daher zelluläre Effekte unter physiologischeren Bedingungen untersucht werden. Um einen Einblick in die zelluläre Wirkungsweise von Feinstaub bei niedrigen Expositionskonzentrationen zu bekommen, wurde eine Expositionsdauer von 14 Tagen sowie ein Konzentrationsbereich von 1 ng/mL bis 1000 ng/mL bzw. 100 ng/mL für die proteomischen und metabolomischen Untersuchungen gewählt. Obwohl diese Konzentrationen immer noch erheblich höher sind als diejenigen, die im menschlichen Blut vorliegen, repräsentieren sie Konzentrationen, bei denen im verwendeten Zellmodell erste toxikologische Veränderungen einsetzen. Zur Analyse zellulärer Effekte wurden proteomische und metabolomische Techniken gewählt, die durch ihren breiten analytischen Zugang den wissenschaftlichen Blick auch auf bisher nicht untersuchte Signalwege lenken.

5.1.1 Printex[®] 90-Nanopartikel und Verunreinigung mit polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAH)

Eine der primären Quellen für Feinstaub ist der Straßenverkehr, wobei Dieselruß einen Anteil von 35 % ausmachen kann. Dieselruß stellt dabei im Gegensatz zu industriell hergestellten Nanopartikeln keine „Reinsubstanz“ dar, sondern ist mit einer Vielzahl von Verunreinigungen wie Metallen (Eisen, Chrom) und organischen Schadstoffen (PAH) belastet, die schädliche Prozesse in biologischen Systemen (oxidativer Stress, Entzündung) induzieren können [110–112]. Dementsprechend wird in epidemiologischen Studien davon ausgegangen, dass Dieselruß einer der primären Schadstoffe darstellt, der für die beobachteten gesundheitlichen Auswirkungen verantwortlich ist.

Da bekannt ist, dass die einzelnen Verunreinigungen des Dieselrußes für sich genommen gesundheitsschädigend wirken (organische Verbindungen, Schwefeloxide, Stickoxide, Chloride, Ammoniumverbindungen, Metalle), wurden anstelle von Dieselruß die Surrogate Carbon Black sowie Benzo[a]pyren-beladenes Carbon Black untersucht. Benzo[a]pyren (Leitsubstanz der PAH) sollte dabei stellvertretend für die Gruppe der PAH die Kontamination von Dieselruß mit dieser Stoffgruppe simulieren. Aufgrund seiner lipophilen Eigenschaft ist B[a]P nur schlecht wasserlöslich, so dass nur die Partikel als Trägersubstanz für die zelluläre Exposition dienen. B[a]P selbst ist ein bekanntes Prokanzerogen, dessen Metaboliten (metabolische Aktivierung durch das Enzym Cytochrom P450) ein kanzerogenes Potenzial besitzen. Zu den zellulären Antworten auf die Exposition gegen B[a]P zählen die Bildung von ROS, Änderungen der Proliferation, die Apoptose sowie die Entwicklung von Entzündungsprozessen [113,114]. Ferner wird die Bildung atherosklerotischer Plaques durch Veränderungen am vaskulären Zellsystem dem B[a]P zugordnet [115].

5.1.2 Bestimmung der intrazellulären ROS-Bildung und Zellproliferation

Im Gegensatz zu einer Vielzahl experimenteller Studien, bei denen oxidativer Stress als wichtigste toxische Wirkung von Nanopartikeln beobachtet und dokumentiert wurde [116], wurde in der vorliegenden Arbeit keine vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies im DCF-Assay gemessen. Dieses auf den ersten Blick unerwartete Ergebnis kann durch eine Reihe von Faktoren begründet sein. Neben katalytischen Prozessen an der Partikeloberfläche zählt die Freisetzung von bioverfügbaren Metallen zu den wichtigsten Generierungsmechanismen für reaktive Sauerstoffspezies, da bioverfügbare Metalle dafür bekannt sind, Fenton-ähnliche Reaktionen in den Zellen zu stimulieren (Abbildung 33).

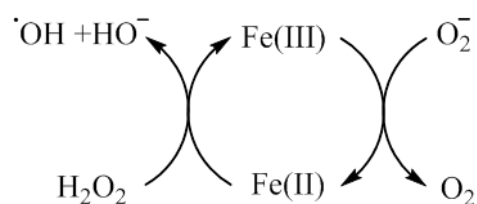


Abbildung 33: Haber-Weiss-Fenton-Reaktion.

Bei Fenton-ähnlichen Reaktionen besteht die Möglichkeit, dass Eisen gegen andere Metalle wie z. B. Zink und Kupfer ersetzt wird.

(Quelle: Coudray et al. [117], *reprinted with permission from Springer*)

Die Produktion von Carbon Black erfolgt im Gegensatz zu Dieselruß unter kontrollierten Bedingungen, um eine möglichst hohe Reinheit zu gewährleisten. Daher ist anzunehmen, dass der Gehalt an bioverfügbaren Metallen, die u. a. weitere Produktionsschritte stören können, sehr gering ist. Ferner besteht die Möglichkeit, dass der Gehalt an generierten ROS zu gering war und durch die zellulären Abwehrmechanismen maskiert wurde. Gleichwohl ist es auch denkbar, dass die Generierung von ROS einen frühen Effekt darstellt, der nur in den ersten Tagen nach Beginn der Exposition auftritt. Die Annahme, dass der Gehalt an ROS keine für die Zelle kritischen Werte überschritt, wird durch die Beobachtung gestützt, dass keine "klassischen" Stress-Proteine, wie z. B. HSPA5, HSPD1, SOD und GST, in der proteomischen Analyse detektiert wurden [118]. Zwar werden auch die Enzyme Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Enolase 1 und Aconitase, die vermehrt exprimiert wurden, mit oxidativem Stress assoziiert, sie sind jedoch ebenso in metabolischen Prozessen (Glykolyse und Citratzyklus) involviert.

Im verwendeten Modell ist die Zellproliferation ein aussagekräftiger Endpunkt, der sensibel auf die Expositionen reagierte. In der vorliegenden Arbeit beschleunigte die Exposition gegen Dieselrußsurrogate dosisabhängig die Proliferation. Vergleichbare Studien gehen davon aus, dass Nanopartikel über die Bildung von Oxidantien und durch Initiierung der Inflammation die Proliferation induzieren [25]. Die durchgeführten proteomischen Untersuchungen weisen jedoch auf eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors PPAR γ als möglichen Mechanismus

hin. Eine der zellulären Funktionen von PPAR γ ist die Modulation der Proliferation (siehe Kapitel 5.1.3.1).

Gleichwohl scheint die Beladung der Partikel mit B[a]P einen verstärkenden Einfluss auf das Zellwachstum zu haben. In der Literatur wird für B[a]P sowohl ein pro- als auch ein anti-proliferatives Potential beschrieben. B[a]P sowie seine Chinon-Metaboliten 1,6-BPQ und 3,6-BPQ stimulieren das Zellwachstum durch Aktivierung verschiedener Rezeptoren, des Estrogenrezeptors (ESR1) [119], des *epidermal growth factor receptor* (EGF-Rezeptor, EGFR) [120] und des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors (AhR) [121]. Dies könnte die verstärkte Proliferation in der CB+B[a]P-exponierten Gruppe erklären. Interessanterweise hatte die Exposition gegen eine äquivalente Dosis B[a]P (~3 ng/mL) keinen Einfluss auf die Proliferation, was die Möglichkeit eines synergistischen Effektes von B[a]P und den Partikeln nahelegt, eventuell in Form einer katalysierten (beschleunigten) Bildung von B[a]P-Metaboliten.

5.1.3 Proteomische Analyse

Anhand der Resultate der Voruntersuchungen wurde die Schwellenkonzentration definiert, ab der im untersuchten Modell erste zelluläre Reaktionen in beiden Expositionsgruppen beobachtet wurden (100 ng/mL). Diese niedrige Konzentration wurde in den nachfolgenden Versuchen verwendet, um die partikuläre Wirkung auf molekularer und zellulärer Ebene zu erfassen. Auf proteomischer Ebene war nach Langzeitexposition gegen die Dieselruß-surrogate vor allem die Expression von Proteinen, die an der Organisation des Zytoskeletts, der Proteinsynthese sowie am Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel beteiligt sind, verändert.

Da die proteomischen Daten keinen spezifischen Unterschied zwischen den angesprochenen Signalwegen in den beiden Expositionsgruppen aufzeigten, werden die nachfolgenden Resultate der beiden getesteten Partikel Carbon Black und B[a]P-beladenes Carbon Black gemeinsam diskutiert.

5.1.3.1 Modulation der Proliferation und metabolischen Adaption durch PPAR γ

Als mögliche Regulatoren auf Genebene wurden in der bioinformatischen *transcription factor binding site* (TFBS)-Analyse innerhalb der Datenbank DAVID die Transkriptionsfaktoren PPAR α und PPAR γ identifiziert. Der Aktivitäts-Assay zur Klärung der Beteiligung der Transkriptionsfaktoren an den beobachteten Effekten zeigte nur für PPAR γ eine signifikant verringerte Aktivität infolge der Exposition.

Die Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR α , β/δ und γ) sind intrazelluläre Transkriptionsfaktoren, die über Liganden (Hormone, Lipide) aktiviert werden und eine Vielzahl von Genen regulieren. Nach der Aktivierung dimerisieren die PPAR mit dem Retinoid X-Rezeptor (RXR) und translozieren in den Zellkern, wo sie an ihre spezifischen DNA-Response-Elemente (PPRE) binden, um die Transkription von Zielgenen zu starten. Die Rolle der Mitglieder der PPAR-Familie als Modulatoren der Zellproliferation, Differenzierung, Inflammation und Immunreaktion sowie ihre Beteiligung an Krankheiten wie Diabetes, Arteriosklerose und Hypertonie werden zunehmend als therapeutische Interventionsmöglichkeit betrachtet [122].

PPAR γ besitzt antiproliferative und apoptotische Eigenschaften. Als wichtiger Regulator moduliert PPAR γ die zelluläre Aufnahme und den Stoffwechsel von Lipiden und Fettsäuren und beeinflusst den Glukosehaushalt. Die Aktivierung von PPAR γ führt zu einer erhöhten Insulinsensitivität, zur Aufnahme von Glukose in die Zelle und wirkt antiatherosklerotisch sowie antiinflammatorisch [123,124]. Eine verringerte Expression des endothelialen PPAR γ führt zu einer erhöhten Serumkonzentration von freien Fettsäuren (FFA) und Triglyceriden sowie zur Verringerung des Fettsäure-Transport-Proteins CD36 in der Zellmembran [125]. Überdies führt eine verminderte PPAR γ -Aktivität im vaskulären System zu einer beschleunigten Proliferation und Zellmigration sowie zu einem Umbau der Gefäße [126].

Demzufolge kann angenommen werden, dass die verringerte PPAR γ -Aktivität in der vorliegenden Studie zu einer beschleunigten Proliferation führte. Der daraus resultierende erhöhte Energiebedarf sollte sich auf metabolomischer Ebene in veränderten Konzentrationsverhältnissen der intrazellulären Energieträger widerspiegeln.

5.1.4 Metabolomische Analyse

Endothelzellen sind in der Lage, selbst unter nahezu anaeroben Bedingungen zu wachsen, wie es beispielsweise bei der Wundheilung nötig ist. Sie gewinnen ihre Energie (ATP) nahezu vollständig durch Abbau von Glukose bzw. in der Glykolyse durch Umwandlung von Glukose in Laktat [127]. Ist die Versorgung mit exogenen Substraten nicht möglich, können Endothelzellen Lipide, Laktat und Aminosäuren, die eine hohe Oxidationsrate (Alanin, Asparagin) besitzen, als Substrat für die oxidative Phosphorylierung nutzen [128]. Die beobachteten Veränderungen, sowohl auf der Proteinebene und als auch auf Ebene der Metaboliten (verringertes Gehalt an phosphorylierten Zuckern, erhöhter Laktatgehalt), unterstützen die Annahme, dass Dieselrußsurrogate über die Abnahme der PPAR γ -Aktivität auf den Energiestoffwechsel einwirken (Abbildung 34).

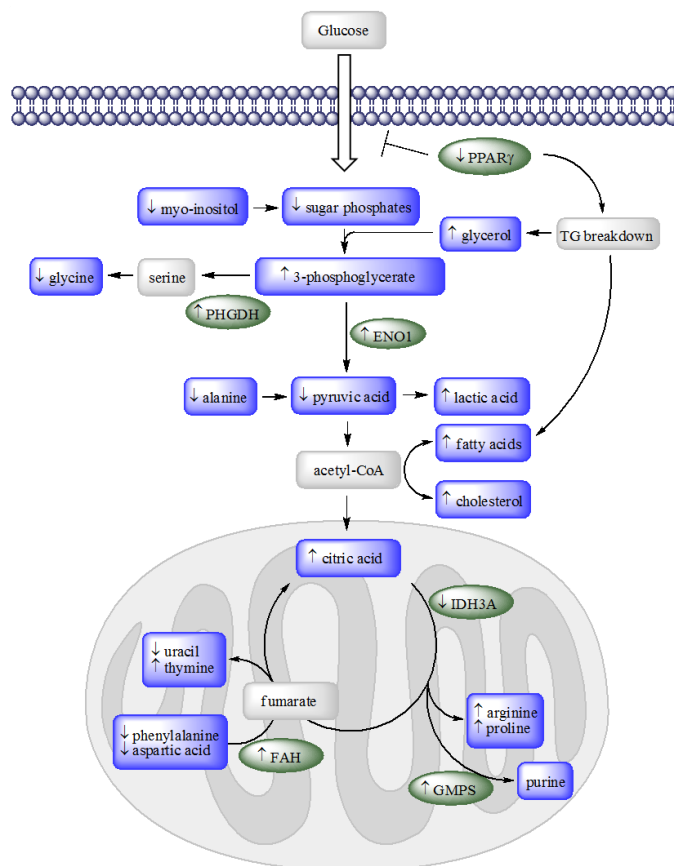


Abbildung 34: Schematische Darstellung der proteomischen und metabolischen Veränderungen nach Exposition.

Dieses Modell basiert auf den proteomischen und metabolischen Ergebnissen und illustriert die Regulationen des Energiestoffwechsels als Reaktion auf die Exposition gegen Dieselrußsurrogate. Die einzelnen Felder repräsentieren die identifizierten Metaboliten (blau) und Proteine (grün). Zwischenprodukte, die an wichtigen Stoffwechselwegen beteiligt sind, sind in Grau dargestellt. Die Regulierung der Metaboliten und Proteine wird durch Pfeile symbolisiert (↑ erhöht, ↓ erniedrigt).

Auf Proteinebene wurde die Expression von mehreren an der Glykolyse und oxidative Phosphorylierung beteiligten Proteine wesentlich verändert. Die beobachteten Veränderungen deuten auf einen erhöhten Energiebedarf infolge der erhöhten Zellteilungsrate hin. Für den vermehrten zellulären Energiebedarf spricht auch der erhöhte Laktatgehalt als Resultat einer forcierten Glykolyse.

Die metabolomische Analyse ergab überdies in den exponierten Zellen einen geringeren Gehalt an phosphorylierten Zuckern (Substrate für die Glykolyse) und einigen Aminosäuren bei gleichzeitiger Erhöhung des Gehalts an Glycerin und Fettsäuren. Diese Diskrepanz lässt sich nur durch eine gestörte Glukoseversorgung erklären. Als unmittelbare Reaktion auf den Mangel an phosphorylierten Zuckern verwenden die Zellen alternative Substrate wie Glycerin (durch Spaltung von Triglyceriden) und Aminosäuren. Entsprechend waren die Konzentrationen der Aminosäuren Glycin, Alanin, Asparagin und Phenylalanin nach der Exposition reduziert. Gerade Alanin und Aspartat sind bevorzugte Substrate für die Energieerzeugung, da sie eine hohe oxidative Rate aufweisen [128].

Obwohl Endothelzellen die meiste Energie über die Glykolyse gewinnen, steht die oxidative Phosphorylierung (Citratzyklus und Atmungskette) als zusätzliche Energiequelle zur Verfügung. Voraussetzung dafür sind jedoch vitale Mitochondrien. Im Gegensatz zu anderen Studien an Nanopartikeln, bei denen eine verschlechterte mitochondriale Vitalität anhand

eines verringerten Membranpotenzials beobachtet wurde [129], war die Vitalität der Mitochondrien in der vorliegenden Arbeit nach Exposition unverändert (Abbildung 21). Auch wurde die NADH-Dehydrogenase (NDUFV1) in erhöhtem Maße exprimiert. Dieses Protein ist ein zentraler Bestandteil der Atmungskette in den Mitochondrien und eine Hochregulation deutet auf eine funktionierende und schneller ablaufende Atmungskette hin, mit dem Resultat einer höheren Energiegewinnung. Dennoch scheint der Citratzyklus (Tricarbonsäurezyklus, TCA-Zyklus) sorgfältig reguliert zu sein. Während der metabolomischen Analyse wurde zwar ein erhöhter Gehalt an Citrat gemessen, jedoch war auf Proteomebene die mitochondriale Untereinheit der Isocitratdehydrogenase (IDH3A) herunterreguliert. Die Regulation von IDH3A erfolgt durch eine rein allosterische Hemmung, z. B. durch das Produkt α -Ketoglutarat, um den vollständigen Abbau von Isocitrat und Citrat zu vermeiden. α -Ketoglutarat selbst ist ein Vorläufer-Metabolit von Arginin und Prolin. Der Gehalt beider Metaboliten war ebenfalls nach der Exposition erhöht.

Citrat selbst hat eine doppelte Funktion in den Zellen. Einerseits ist es ein wichtiger Energiebaustein für den Citratzyklus, andererseits ist es eine wichtige Vorstufe für die Synthese von Fettsäuren und Cholesterin. Beide Lipidbestandteile sind wichtige Bausteine der Zellmembran und waren ebenfalls nach der Exposition gegenüber den Dieselrußsurrogaten erhöht. Darüber hinaus zeigten die proteomischen und metabolomischen Veränderungen auch eine erhöhte De-novo-Synthese von Intermediaten für die Proliferation. Dazu gehören Metaboliten für die Purin-Nukleotid-Synthese (Glycin, Aspartat, Ribose-5-phosphat) sowie eine erhöhte Expression des Proteins Guanosinmonophosphat-Synthase, welches an der De-novo-Synthese von Guanosin-Nukleotiden beteiligt ist.

5.1.5 Zusammenfassung I

Die Langzeitexposition von Endothelzellen gegen eine niedrige (physiologische) Konzentration von Dieselrußsurrogaten steigert die Proliferation und verändert den Energiehaushalt. Diese Antworten können zu einem großen Teil auf eine verringerte Aktivität des Transkriptionsfaktors PPAR γ zurückgeführt werden.

Der Nachweis von PPAR γ als wichtiger Regulator der beobachteten zellulären Reaktionen wurde durch die Analyse der zellulären Metaboliten bestätigt. Die Verminderung der aktiven Form von PPAR γ korreliert mit einem erhöhten Gehalt an freien Fettsäuren in den Zellen (Abbau von Triglyceriden zur Gewinnung von Energie [Glycerin] und zum Aufbau der Zellmembran [Fettsäuren]) und einem erhöhtem Energiebedarf (niedriger Gehalt an

phosphorylierten Zuckern und Pyruvat bei gleichzeitiger hoher Konzentration von Laktat und Citrat) aufgrund der erhöhten Proliferation.

In der vorliegenden Studie wurden die zellulären Änderungen nicht durch reaktive Sauerstoffspezies vermittelt. Dies wirft die Frage auf, ob das Paradigma der ROS-vermittelten Effekte als primärer Endpunkt der Nanopartikelexposition auch unter realen Bedingungen zutrifft. Nur winzige Mengen an Nanopartikeln gelangen in die systemische Zirkulation und adsorbieren überdies Plasmaproteine an ihrer Oberfläche. Daher ist es fraglich, ob solche „modifizierten“ Partikel bei extrem niedrigen Konzentrationen in der Lage sind, einen „oxidativen Burst“ auszulösen, wie es in vielen Studien postuliert wird. Möglicherweise sind es eher Nanopartikel-induzierte Änderungen von Signalkaskaden in den Zellen, die die Entstehung von Krankheiten begünstigen.

5.2 Entwicklung eines Verfahrens zur Extraktion phosphorylierter Proteine

Der Aktivitätszustand von Proteinen wird durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung gesteuert, wodurch Signale innerhalb einer zellulären Signalkette weitervermittelt werden können. Demnach sollten im Phosphoproteom einer Zelle vermehrt Proteine enthalten sein, die an den aktuellen zellulären Antworten auf eine Exposition beteiligt sind.

Daher war ein Ziel dieser Arbeit, neben dem normalen Proteom zusätzlich das Phosphoproteom mittels einer geeigneten Methode zu untersuchen. Analysen auf dem Gebiet der Phosphoproteomics werden üblicherweise mittels HPLC-MS/MS durchgeführt, jedoch stellt die Quantifizierung der Proben bei MS-basierten Methoden ein Problem dar [56,70,130]. Um diesen Mangel zu umgehen, sollte eine einfache Methode für die Isolierung von Phosphoproteinen aus komplexen Proteinmischungen entwickelt werden, die keine anspruchsvolle apparative Ausrüstung benötigt. Der einfachste Ansatz ist eine Isolierung der relevanten Proteine durch Ausfällen. Ein vielversprechender Kandidat zur Ausfällung von Phosphoproteinen ist Lanthan bzw. dessen Ionen. Lanthan ist ein bekannter Phosphatbinder, der bereits in den 1950er-Jahren zur Dephosphorylierung von Nukleotiden verwendet wurde und derzeit als Medikament zur Behandlung der Hyperphosphatämie eingesetzt wird [97–99].

In initialen Tests wurde durch die Beimischung von Lanthanionen zu Phosphoprotein-haltigen Lösungen die Eignung der Ionen zur Ausfällung der phosphorylierten Proteine getestet. Nach Zugabe der Lanthanchlorid-Lösung wurde eine sofortige Trübung der Phosphoproteine enthaltenden Probe und die Bildung eines Niederschlags beobachtet, der die Bildung eines Lanthan-Protein-Komplexes nahe legte. Da sich der gebildete Niederschlag nur bedingt sedimentieren ließ, wurde durch Zugabe von KH_2PO_4 versucht, das Volumen und das Sedimentierungsverhalten des Niederschlags zu verbessern. KH_2PO_4 sollte freie La^{3+} -Ionen durch Bildung von Lanthandihydrogenphosphat binden und nicht besetzte Koordinationsstellen im Lanthan-Protein-Komplex auffüllen. Lanthan Komplexe können bis zu 12 Koordinationsstellen besitzen, diese werden jedoch nur in Abhängigkeit von der Größe der Liganden vollständig besetzt [131]. Entsprechend war zu erwarten, dass die Proteine aufgrund ihrer Größe und sterischen Hinderung nur einen Teil der möglichen Koordinationsstellen im Komplex ausfüllen. Abbildung 35 illustriert die mögliche Interaktion zwischen Lanthanionen und Phosphoproteinen.

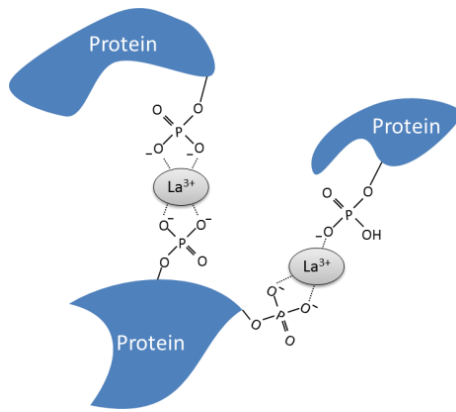


Abbildung 35: Lanthan-Protein-Komplex.

Werden Lanthansalze zu einer Phosphoprotein-haltigen Lösung zugesetzt, kommt es zur Bildung eines Lanthan-Phosphoprotein-Komplexes. Dabei besteht die Möglichkeit, dass es je nach Anzahl und Position der Phosphatreste zur Verlinkung mehrerer Proteine kommt.

(Quelle: Pink et al. [100], *reprinted with permission from Elsevier*)

Zur Optimierung der Fällungsbedingungen wurde die Bindungsspezifität des Lanthans für bestimmte Phosphatanionen (mono- oder dianionische) durch Fällung von Phosphoproteinen unter sauren (pH 4,5), neutralen (pH 7) und alkalischen (pH 8,5) Bedingungen getestet. Dies ermöglichte die Optimierung der Lysispuffer in Bezug auf den pH-Wert sowie eine Erhöhung der Ausbeute an extrahierten Phosphoproteinen. Phosphate liegen in wässrigen Lösungen in Abhängigkeit vom pH-Wert in verschiedenen ionischen Formen vor, wie in Abbildung 36 gezeigt wird.

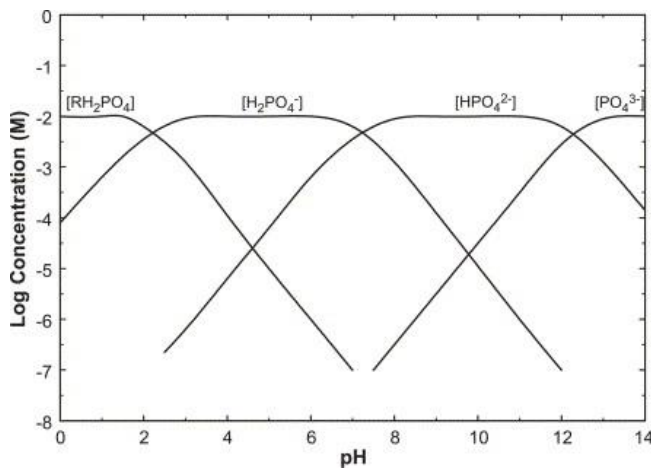


Abbildung 36: Verteilungsdiagramm verschiedener Phosphatspezies.

Das Verteilungsdiagramm (Hägg-Diagramm) zeigt die Konzentration verschiedener Phosphatspezies als Funktion des pH-Wertes (Phosphat-Konzentration = $1,0 \times 10^{-2}$ M).

(Quelle: Chen et al. [132], *reprinted with permission from Elsevier*)

Das Mengenverhältnis zwischen den einzelnen Proteinlösungen nach der Präzipitation von 0,86 : 1 : 0,65 (pH 4,5: 7,0: 8,5) deutet dabei auf eine höhere Spezifität von Lanthan für monoanionische Phosphatgruppen in Proteinen hin bzw. auf eine optimale Präzipitation bei pH 7. Dies könnte daran liegen, dass Konkurrenz- bzw. Verdrängungsreaktionen unter aggressiven Bedingungen (sehr niedriger oder hoher pH-Wert) vorherrschen. Im alkalischen Milieu beispielsweise könnte die Bildung von schwerlöslichem Lanthanhydroxid eine Konkurrenzreaktion zur Bildung von Lanthan-Protein-Komplexen sein.

5.2.1 Elution und Auftrennung der ausgefällten Proteine

Neben der Ausfällung der Phosphoproteine stellt deren Rückgewinnung bzw. Elution aus dem Pellet einen entscheidenden Schritt dar, der ein geeignetes Puffersystem erfordert. Allerdings

kann die Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösung einen Einfluss auf die anschließende Trennung der Phosphoproteine mittels Gelelektrophorese haben oder die strukturelle Integrität der Phosphoproteine beeinträchtigen bzw. zur Abspaltung des Phosphatrestes führen. Anhand dieser Kriterien wurde versucht, ein System zu finden, das die Phosphoproteine aus dem Pellet effizient eluiert und die Trennung mittels 1D-Gelelektrophorese ohne Abspaltung der Phosphatreste ermöglicht. Von den getesteten Puffern zeigten jene die höchste Ausbeute an Proteinen, die auf Basis des Lysispuffers (siehe Kapitel 3.4.1) beruhten und zusätzlich Phosphorsäure (PA-LB) oder Imidazol (ILB, siehe Tabelle 11) enthielten. Im Gegensatz dazu resultierte die Verwendung von Lysispuffer (LB) ohne Zusätze in einem niedrigen Proteingehalt, was einen hohen Verlust an Proteinen für die nachfolgenden Analysen bedeutet hätte.

Ein weiteres Kriterium für die getesteten Puffersysteme war deren Eignung für die elektrophoretische Trennung der extrahierten Proteine. Im Verlauf der Elektrophorese zeigte sich jedoch, dass nur die Imidazol-haltigen Puffer (Imidazol, Imidazol-Lysispuffer) eine Trennung der Proteine ermöglichten. Säurehaltige Elutionspuffer führten zu einer Proteinfällung während der Elektrophorese aufgrund des niedrigen pH-Werts der Proben. Dies wurde anhand der Farbänderung des Probenpuffers für die 1D-Gelelektrophorese erkannt. Der verwendete Probenpuffer beinhaltete unter anderem Coomassie G250, welches im sauren Milieu in seine neutrale Form überführt wird, erkennbar an einer Grünfärbung der Probe.

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass in Abhängigkeit von den verwendeten Elutionspuffern unterschiedliche Phosphoproteine eluiert werden. Während Imidazol bevorzugt reine Phosphoproteine (α -S1-Casein und α -S2-Casein) eluiert, werden durch die Verwendung von Imidazol-Lysispuffer (ILB) Phosphoproteine sowie phosphorylierte Glykoproteine eluiert. Auf diesen Aspekt wird in Kapitel 5.2.3 näher eingegangen.

5.2.2 Reinheitsbestimmung der extrahierten Phosphoproteine

Da in den 1950er-Jahren Lanthanionen für die Dephosphorylierung von Nukleotiden verwendet wurden [97,98], stellte sich die Frage, inwieweit DNA- bzw. RNA-Fragmente aus den Zellen präzipitiert werden. Als empfindliche Methode zur Quantifizierung und Reinheitsbestimmung von Nukleotiden und Proteinen wird die Messung der UV-Absorption bei 260 nm und 280 nm herangezogen. Das Verhältnis der beiden Wellenlängen ($A_{260/280}$) gibt dabei Aufschluss über die Reinheit der extrahierten Proben. Dabei zeigte sich, dass durch Verwendung der Lanthanfällung nur in geringem Umfang Nukleotide bzw. DNA/RNA

präzipitiert wurden. Zwar nahm die Reinheit der Proteine um $\sim 1\%$ ab, insgesamt betrug sie jedoch 95% .

5.2.3 Theoretische Betrachtung des Elutionsmechanismus

Die Lanthan-basierte Präzipitation von Phosphoproteinen ähnelt der immobilisierten Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC), jedoch verwendet sie keine stationäre Phase. Zur Eluierung von gebundenen Phosphopeptiden wird in der IMAC-Chromatographie Imidazol in geringen Konzentrationen verwendet. Es wird davon ausgegangen, dass das freie Elektronenpaar aus dem Imidazolstickstoff mit dem Bindungsmetall (Fe^{3+} , Al^{3+} , Ga^{3+} , Zr^{4+} oder Ti^{4+}) interagiert, was zur Abspaltung des gebundenen Proteins führt (Verdrängungsreaktion) [133]. Dieser Mechanismus scheint in analoger Weise während der Eluierung der Phosphoproteine aus dem Lanthan-Protein-Komplex vorzuliegen, wenn auch eine wesentlich höhere Menge an Imidazol zur Elution der Proteine benötigt wird. Dies könnte in der Stöchiometrie der Bindung von Imidazol an Lanthan begründet sein, da Lanthankomplexe dafür bekannt sind, bis zu 12 Koordinationsstellen zu besitzen (Abbildung 37) [131].

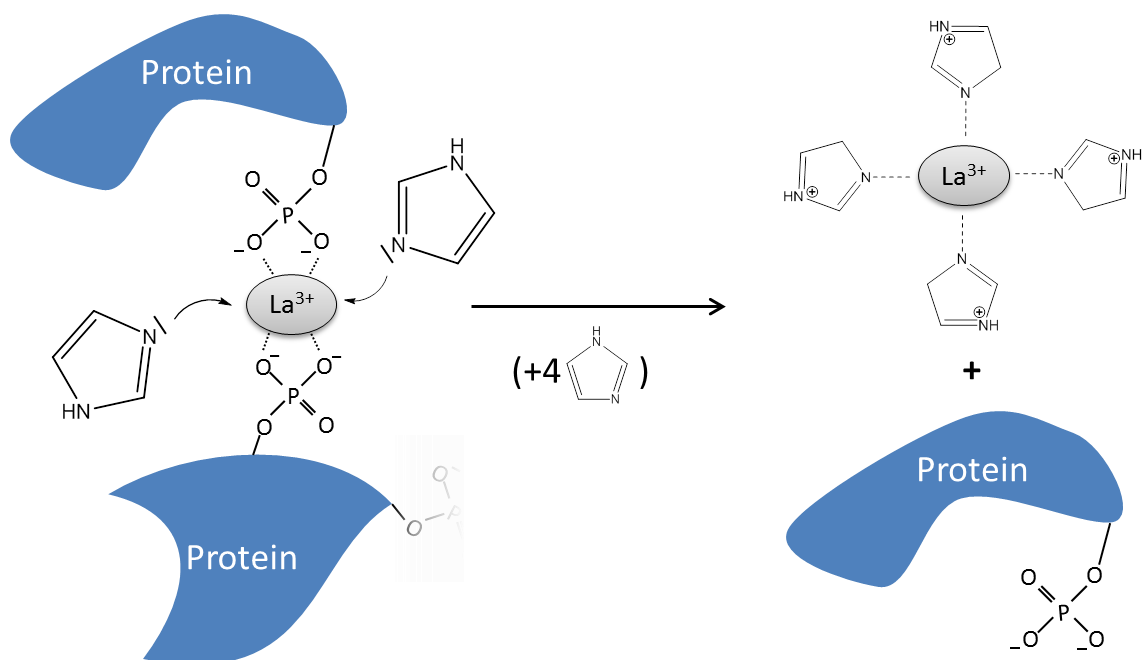


Abbildung 37: Hypothetischer Mechanismus der Proteinelution.

Durch Wechselwirkungen des freien Elektronenpaares des Imidazols mit den Lanthanionen im Niederschlag kommt es zur Umlagerung des Komplexes und zur Freisetzung (Eluierung) der Proteine.

Ferner zeigte sich, wie in Tabelle 11 dargestellt, dass nicht nur Imidazol die präzipitierten Phosphoproteine eluieren kann, sondern auch der normale Lysispuffer, wenn auch eine längere Inkubationszeit notwendig ist. Diese Beobachtung legt nahe, dass der Lysispuffer eine

Substanz enthält, die die Lanthan-Sauerstoff-Bindung (Sauerstoffe des Phosphats) beeinflusst. In Lanthan-Kristallisations-Studien (La^{3+} -Hydroxycarbonat, -phosphat und -pyrophosphat) wurde gezeigt, dass Harnstoff und Thioharnstoff die Länge der La-O-Bindung zu den Phosphatresten beeinflussen [134]. Beide Substanzen werden auch im Lysispuffer verwendet, um Wasserstoffbrückenbindungen zu stören und Proteine zu solubilisieren. Beide Effekte, die des Imidazols sowie beider Harnstoffe, scheinen sich im ILB-Puffer zu addieren, was zu einer Verringerung der Inkubationszeit und zu einer Erhöhung der Ausbeute führt. Überdies scheint dieser kombinierte Effekt auch die Eluierung von Phosphoglykoproteinen zu begünstigen. Wie sich beim Test der Elutionspuffer zeigte, werden scheinbar nicht alle Phosphoproteine durch Imidazol eluiert (Tabelle 11). Die massenspektrometrische Analyse der eluierten Proteine ergab, dass es sich bei den Imidazol-eluierten Proteinen um „reine“ Phosphoproteine handelt, während bei Verwendung der ILB-Puffers zusätzlich auch Phosphoglykoproteine eluiert wurden. Es ist anzunehmen, dass das Lanthan neben den Phosphoproteinen auch mit den Zuckerresten von Phosphoglykoproteinen eine Verbindung eingeht, möglicherweise in Form eines Komplexes, wodurch das Imidazol allein nicht mehr in der Lage ist, mit den Lanthanionen zu interagieren (Abbildung 38). Unter diesen Voraussetzungen ist anzunehmen, dass der Harnstoff und Thioharnstoff im Elutionspuffer diesen Komplex aufweiten und somit die Elution der Phosphoglykoproteine begünstigen.

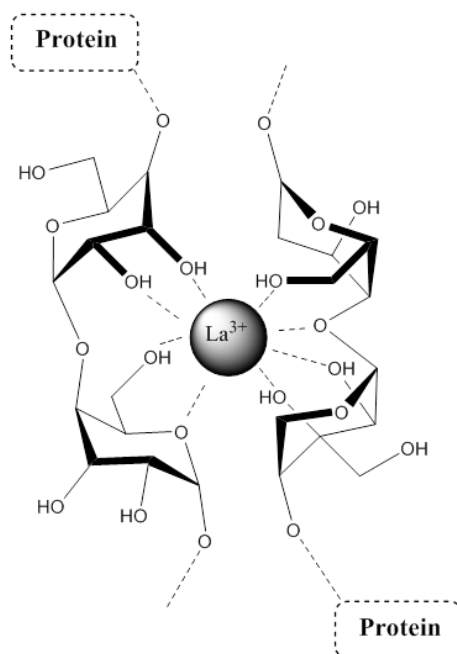


Abbildung 38: Hypothetischer Lanthan-Kohlenhydrat-Komplex.

Versuche mit verschiedenen Elutionspuffern haben gezeigt, dass Imidazol nur Phosphoproteine, jedoch im Gemisch mit Lysispuffer (ILB) auch Phosphoglykoproteine eluiert. Es ist anzunehmen, dass die zugegebenen Lanthanionen außer mit den Phosphatresten auch mit den Zuckerresten der Phosphoglykoproteine interagieren bzw. Komplexe bilden. Diese Komplexe können mitunter eine kompakte Struktur aufweisen bzw. das Lanthan abschirmen, wodurch Imidazol nicht mehr in der Lage ist, mit dem Lanthanion zu interagieren.

5.2.4 Validierung der Phosphoproteine

Zur Validierung der selektiven Extraktion von Phosphoproteinen wurden verschiedene Ansätze gewählt. Diese umfassten die Färbung der phosphorylierten Proteinen mit Pro-Q[®] Diamond, Western Blots mit immunologischer (anti-Phospho-Ser/Thr/Tyr-Antikörper) und

chemischer (Phos-Tag[®]) Detektion, sowie MALDI-ToF-MS zur Bestimmung von Phosphorylierungsstellen in Ovalbumin.

Der Goldstandard für die Gel-basierte Erkennung von Phosphoproteinen ist die Färbung der Proteine mit Pro-Q[®] Diamond. Diesem gegenübergestellt wurde ein Coomassie gefärbtes Gel nach Lanthanfällung und Elution mit ILB. Hier zeigte sich, dass die Proteinmuster im direkten Vergleich eine sehr hohe Ähnlichkeit aufwiesen, was für die selektive Fällung der phosphorylierten Proteine spricht. Ein erheblicher Nachteil der Pro-Q[®] Diamond-Färbung ist jedoch, dass der Fluoreszenzfarbstoff weiterführende Analysen wie die Identifikation der gefärbten Proteine mittels MALDI-ToF-MS behindert.

Die Interpretation von komplexen Proben in Bezug auf die Frage, ob es sich um phosphorylierte Proteine handelt oder nicht, ist schwierig. Aus diesem Grund wurden als einfachere Modelle phosphorylierte Proteine aus der Milch und aus Hühnereiern mit Lanthanionen extrahiert. Die Untersuchung der Phosphorylierung der extrahierten Proteine erfolgte mittels Western Blot, die mit Coomassie-gefärbten Proben gleichen Ursprungs verglichen wurden. Bei diesem Ansatz wurde im Detail gezeigt, dass es sich bei den extrahierten Proteinen um Phosphoproteine handelte. Beide Substanzen, Antikörper und Phos-Tag[™]-Reagenz, sind adäquate, in der Literatur verwendete Reagenzien zum Nachweis von Phosphorylierungen [135–139].

Darüber hinaus wurde auch die Phosphorylierungsstelle von extrahiertem Ovalbumin an der Aminosäure Ser69 anhand der Neutralverluste von H₃PO₄ (m/z 98) und HPO₃ (m/z 80), durch kollisionsinduzierte Dissoziation massenspektrometrisch nachgewiesen. Dies bestätigte zusätzlich, dass es sich bei den mittels Lanthanionen extrahierten Proteinen um Phosphoproteine handelte.

5.2.5 Zusammenfassung II

Durch Verwendung von Lanthanionen können Phosphoproteine aus komplexen Proteingemischen isoliert werden. Im Gegensatz zu anderen Methoden handelt es sich bei der Fällung mittels Lanthanionen um eine Single-Step-Methode, die keine anspruchsvolle apparative Ausrüstung (HPLC-MS/MS) zur Extraktion und nachfolgenden Analyse benötigt. Sie ermöglicht die gelelektrophoretische Auftrennung der Phosphoproteine, die nachfolgende Identifizierung mittels MALDI-ToF-MS sowie die Identifizierung der Phosphorylierungsstellen in einem Protein (z. B. Ser69 in Ovalbumin), entweder massenspektrometrisch oder durch Anwendung von Antikörpern, die gegen bestimmte phosphorylierte Aminosäuren gerichtet sind.

5.3 Untersuchung des Phosphoproteoms und zellulärer Angiogenesemarker nach Exposition gegen Dieselrußsurrogate

Studien, bei denen niedrige Expositionsdosen Anwendung finden, zeigen häufig nur geringe bzw. keine eindeutigen zellulären Effekte (Nekrose, Apoptose, DNA-Aberration). Gleichwohl reagieren Zellen auf einen äußeren Stimulus, u. a. durch Aktivierung spezifischer Signalwege über posttranslationale Modifikationen (PTM) von Proteinen. Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen sind solche PTM und modulieren die Aktivität von Signalwegen, weshalb ihnen eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle von zellulären Prozessen zukommt [55,56]. Beispiel einer solchen Änderung der Aktivität durch Phosphorylierung ist der in Kapitel 4.1.2.4 beschriebene Transkriptionsfaktor PPAR γ , der in phosphorylierter Form eine verringerte transkriptionelle Aktivität besitzt [140].

Da zu erwarten ist, dass während der durchgeführten 2D-Elektrophorese (Kapitel 4.1) nur ein Teil der beeinflussten Signalwege beobachtet wurde, sollte durch die Anwendung der Phosphoproteinpräzipitation mittels Lanthanionen zusätzlich das Phosphoproteom in die Untersuchung exponierter Zellen einbezogen werden.

5.3.1 Analyse des zellulären Phosphoproteoms

Phosphorylierungen von Proteinen sind ein zentrales Element in der Regulation zellulärer Funktionen. Dieser fundamentale Prozess wird durch eine Fülle von Kinasen und Phosphatasen reguliert, deren Störung zur Entstehung einer Vielzahl von Erkrankungen beitragen kann [141,142]. Die Untersuchung von Änderungen am Phosphoproteom bietet demnach die Möglichkeit, zelluläre Antworten zu beobachten, selbst dann, wenn die applizierten Dosen nicht zu zellulären Effekten (z. B. Apoptose, Nekrose, DNA-Aberration) führen.

Die Analyse des Phosphoproteoms nach Exposition endothelialer Zellen gegen 100 ng/mL Carbon Black zeigte für 22 Proteine eine Änderung der Phosphorylierung nach Exposition. B[a]P-beladenes Carbon Black änderte den Phosphorylierungsstatus von 33 Proteinen. Die beobachteten Änderungen betrafen dabei Proteine, die am Aufbau des Zytoskeletts und an der Bindung der RNA/DNA beteiligt sind, sowie Proteine, die katalytische Funktionen aufweisen. In der Analyse der Transkriptionsfaktorbindungsstellen wurden wieder Mitglieder der PPAR-Familie als zentrale Modulatoren zellulärer Effekte identifiziert. Auffallend war der veränderte Phosphorylierungsstatus verschiedener Zytoskelettproteine. So zeigten außer Mikrofilamenten (Aktinfilamente) auch Intermediärfilamente (Vimentin, Keratin) teilweise multiple

Änderungen ihrer Phosphorylierung nach Exposition gegen die Dieselrußsurrogate. Daher wurden in weitergehenden Versuchen die morphologischen und funktionellen Konsequenzen der veränderten Phosphorylierungen intensiver untersucht.

Mikrofilamente, auch Aktinfilamente genannt (F-Aktin), setzen sich aus monomerem globulären Aktin (G-Aktin) zusammen. Aktinfilamente stabilisieren die Zelle und halten Transmembranproteine, (Ionen-)Kanäle, Rezeptoren und Zelladhäsionsproteine direkt oder indirekt in Position [143,144]. Darüber hinaus sind Aktinfilamente Teil des Myosin-basierten Transportsystems von Vesikeln (Myosin V und VI) und Organellen in Nicht-Muskelzellen [145]. Die Phosphorylierung der Aktinfilamente inhibiert die Nukleation der Filamente und ist ein wichtiger Bestandteil während der Polymerisation und Reorganisation des Filamentsystems [146,147].

Intermediärfilamente (IF) sind hochkonservierte zytosolische Strukturen, die die Plasmamembran mit dem Zellkern verbinden. IF stellen eine Familie von Proteinen dar, die in sechs Typen klassifiziert werden. Keratine präsentieren dabei Typ I- (saure Keratine) und Typ II- (basische Keratine) Intermediärfilamente, Desmine Typ III, Neurofilamente Typ IV, Lamine Typ V und Nestine Typ VI [148,149]. Der Phosphorylierungsstatus von sauren Keratinen (KRT7, Typ I), basischen Keratinen (KRT10 und KRT18, Typ II) und Desminen (Vimentin, Typ III) wurde durch die Exposition geändert. Intermediärfilamente sind Regulatoren der Signaltransduktion und darüber hinaus wichtige Bestandteile der Zelladhäsion und Zellmigration. Phosphorylierungen von IF regulieren die Filamentreorganisation und sind ein notwendiger Schritt in der Depolymerisation der Filamente. Die Depolymerisation erfolgt durch gezielte Phosphorylierung an der Kopfdomäne (nicht α -Helix), am Amino-terminalen Ende der Filamentfasern [150]. Um eine erneute Polymerisation der IF-Monomere zu verhindern, müssen die Filamentmonomere durch Proteinmodifikationen, Interaktionen mit Hitzeschockproteinen (Mitglieder der HSP70-Familie) oder IF-bindende Proteine (z. B. 14-3-3) stabilisiert werden [148,151,152].

Die Phosphorylierung des Keratins spielt beispielsweise eine wesentliche Rolle bei der Steuerung vieler zellulärer Prozesse. Die Phosphorylierung von Keratin 18 tritt häufig während der Zellteilung (Mitose) auf und scheint ein wichtiger Faktor für die Regeneration der Leber zu sein [153]. Andererseits wird eine Hyperphosphorylierung von Keratin 18 und 19 im Zusammenhang mit der Apoptose diskutiert. Danach folgt im Anschluss an die Hyperphosphorylierung von KRT 18 und 19 die Spaltung beider Proteine durch Caspase 7 bzw. Caspase 3 und die Initiierung apoptotischer Prozesse durch die resultierenden Fragmente

[154]. Die phosphoproteomische Untersuchung ergab in diesem Zusammenhang, dass Caspase 7 in erhöhter Quantität phosphoryliert (inaktiv) vorlag, während die Phosphorylierung von KRT 18 verringert war. Dies suggeriert, dass die Zellen nach Exposition gegen die Dieselrußsurrogate vermehrt in einem antiapoptotischen Stadium vorlagen und demnach nur verzögert auf apoptotische Signale reagierten.

Außer den Keratinen spielt auch Vimentin eine zentrale Rolle im Zytoskelett. Die Phosphorylierung von Vimentin ist ein wichtiger Schritt zur Reorganisation des Vimentinskeletts und zur Verhinderung einer erneuten Polymerisation. Darüber hinaus wird die Phosphorylierung von Vimentin in vermehrtem Umfang während der Zellmigration und Mitose beobachtet [155]. Überdies ist gelöstes bzw. unpolymerisiertes Vimentin ein Signalmolekül, das als Chaperon für pERK1/2 fungiert und den PKC-vermittelten Abbau von β 1-Integrin reguliert [156].

Die Analyse des Phosphoproteoms ergab zusammengefasst Änderungen an Proteinen, die am Aufbau und der Struktur des Zytoskeletts beteiligt sind. In Voruntersuchungen wurde gezeigt, dass die Zellen nach Exposition vermehrt proliferieren. Jedoch deuten die multiplen Phosphorylierungen der Keratine, des Vimentins und des Aktins auf zusätzliche Veränderungen am Zytoskelett hin (ggf. strukturelle Veränderungen der Zellen), die nicht ausschließlich über eine erhöhte Proliferation erklärt werden können. Diese molekularen Modifikationen des Zytoskeletts sollten auch zu morphologischen Änderungen führen, weshalb zur weiteren Analyse das Vimentin- und Aktinzytoskelett immunohistochemisch gefärbt wurde.

5.3.2 Fluoreszenzmikroskopie des Aktin- und Vimentinzytoskeletts

Die mikroskopische Analyse des zellulären Vimentinnetzwerks zeigte keine strukturellen Veränderungen nach Exposition gegen die Dieselrußsurrogate. Jedoch ergab die Messung der Fluoreszenzintensität eine im Vergleich zur Kontrolle um ~25 % erhöhte Konzentration an Vimentin in beiden behandelten Gruppen.

Die Fluoreszenzmessung von Aktin ergab eine Erhöhung des Aktingehalts um 13 % in der Carbon Black-exponierten Gruppe bzw. um 25 % in der CB+B[a]P-exponierten Gruppe. Überdies wurde die Erhöhung des Aktingehalts auch von morphologischen Änderungen der Zellen begleitet. In beiden exponierten Gruppen wurde eine erhöhte Nukleation von Aktin an der Plasmamembran, Bildung von Stressfasern und Filopodien-gleichen Strukturen beobachtet.

Die Nukleation von Aktin sowie die Ausbildung von Stressfasern und Filopodien-gleichen Fortsätzen sind dynamische Prozesse des Aktinskeletts, die besonders während der zellulären Migration auftreten, und zwar vornehmlich bei der embryonischen Morphogenese, der Angiogenese oder der Gewebereparatur und -regeneration [157]. Reguliert werden diese strukturellen Änderungen des Aktinskeletts durch aktinbindende Proteine, insbesondere durch GTPasen der Rho-Familie, RhoA, Rac1 und Cdc42 [144,158]. Rac1 und Cdc42 regulieren die Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien nach Aktivierung durch die Protein p21-aktivierte Kinase (PAK). Filopodien dienen der Zelle als „chemische“ Sensoren, die die Zelle in Richtung der chemotropischen Signale dirigieren.

Die Aktivierung von RhoA indes führt zur Ausbildung von Stressfasern in den Zellen und erfolgt durch das Enzym *Rho-associated serine-threonine protein kinase* (ROCK). Die Funktion von Stressfasern wird kontrovers diskutiert: Einerseits scheinen Stressfasern die Zelle während der Zellmigration zu behindern (Versteifung der Zelle) bzw. die Zellmigration zu inhibieren, andererseits soll mit ihrer Hilfe die Zellmembran während der Migration „nachgezogen“ werden (Abbildung 39) [159].

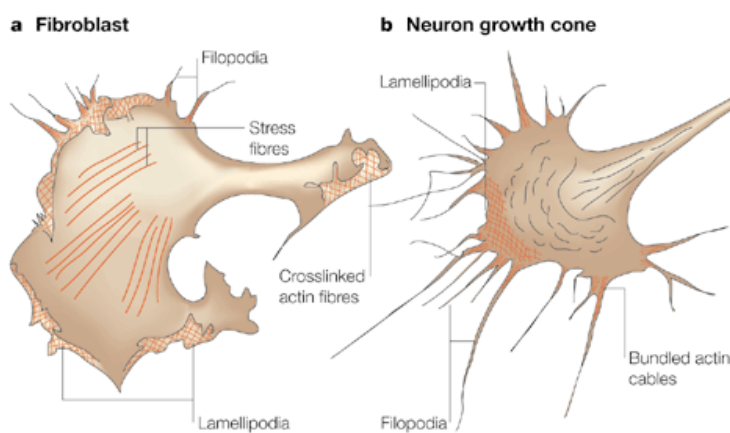


Abbildung 39: Aktinstrukturen in migrierenden Fibroblasten (a) und im neuronalen Wachstumskegel (b). Aktinstrukturen sind in beiden Zelltypen rot markiert. Dargestellt sind Filopodien, Lamellipodien und Stressfasern.

(Quelle:Luo et al. [160], reprinted with permission from Nature Publishing Group)

5.3.3 Test der zellulären Invasion, Migration und Barrierefunktion

Die beobachteten morphologischen Änderungen (Nukleation von Aktin, Stressfasern, Filopodien-gleiche Strukturen) nach Exposition gegen Dieselrußsurrogate weisen auf eine Änderung der Angiogeneseaktivität der Zelle hin. Um den Einfluss der Exposition auf die Angiogenese beurteilen zu können, wurden zwei zentrale Prozesse der Angiogenese, Invasion und Migration, sowie die Barrierefunktion untersucht.

5.3.3.1 Migration/Invasion

Diese zellulären Bewegungsprozesse werden durch chemotaktische, haptotaktische und mechanotaktische Stimuli gesteuert und schließen Zelladhäsion, Zytoskelettorganisation

und im Weiteren den lokalisierten Abbau der extrazellulären Matrix (wichtig für die Invasion) ein [157]. In beiden Tests besaßen die exponierten Zellen ein erhöhtes Potenzial zur Migration bzw. Invasion. Im Transwell-Assay war die Invasionsrate der exponierten Zellen annähernd doppelt so hoch (90 %) wie die der Kontrollzellen. Als Lockstoff zur Initiierung der Invasion diente normales Zellkulturmedium mit 10 % FCS, ausgesät wurden die Zellen auf Matrigel™ in Kulturmedium mit 2 % FCS. Der Migrationstest zeigte ein ähnliches Ergebnis. Die Zahl der wandernden (migrierten) Zellen in beiden exponierten Gruppen war um 35 % gegenüber der Kontrolle erhöht. Auch hier wurde als Lockstoff 10 % FCS verwendet, wogegen die Zellen in 6 %igem Medium ausgesät wurden.

Ein unerwartetes Ergebnis war, dass ein unterschiedlicher FCS-Gehalt in den Medien ausreichte, um die Zellen zur Invasion bzw. Migration anzuregen. Üblicherweise benötigen die Zellen VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) als Lockstoff. Einhergehend mit den strukturellen Veränderungen der Zellen ist anzunehmen, dass diese durch die Exposition gegen die Dieselrußsurrogate in eine aktivierte Form gebracht wurden, so dass schon ein geringer Stimulus für eine gerichtete Bewegung (chemotaktische Bewegung) ausreichte. Bestärkt wird diese Annahme durch das Auftreten der Filopodien-gleichen Strukturen nach allen Seiten (Abbildung 29). Diese treten üblicherweise nur in Richtung des Lockstoffs auf (Abbildung 39 b).

5.3.3.2 Barrierefunktion

Das Endothel ist die zum Gefäßlumen hin gerichtete Zellschicht in den Blutgefäßen. Sie reguliert als Barriere aktiv den Austausch von Sauerstoff, Nährstoffen und Abfallstoffen zwischen dem umgebenden Gewebe und dem Blutstrom. Dysfunktionen der endothelialen Barriere können durch inflammatorische Substanzen, Pathogene, aktivierte Blutzellen oder krankhafte Veränderungen des Endothels ausgelöst werden.

Der Übergang von Nährstoffen und Zellen aus dem Blut in das umliegende Gewebe kann auf zwei Arten erfolgen, durch die Zelle (transzellulär, Exozytose) oder zwischen den Zellen (parazellulär bzw. interzellulär) über *adherens junctions* und *tight junctions* hinweg (Abbildung 40).

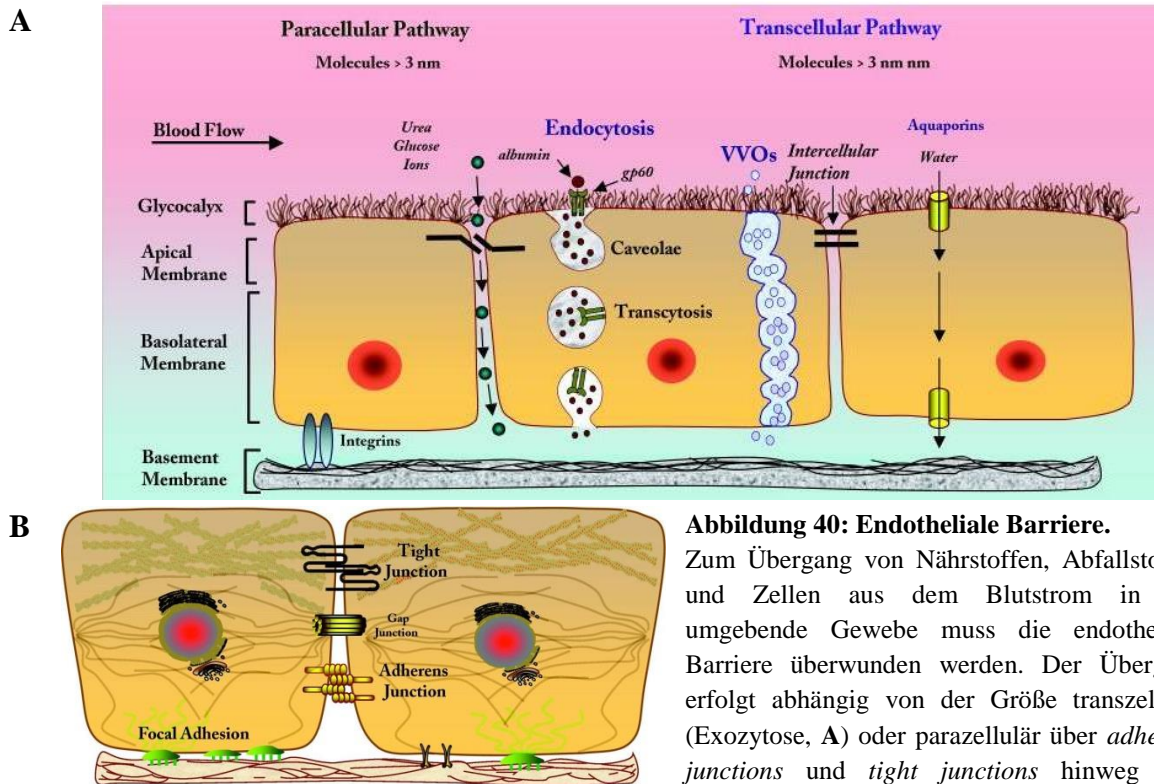


Abbildung 40: Endotheliale Barriere.

Zum Übergang von Nährstoffen, Abfallstoffen und Zellen aus dem Blutstrom in das umgebende Gewebe muss die endotheliale Barriere überwunden werden. Der Übergang erfolgt abhängig von der Größe transzellulär (Exozytose, A) oder parazellulär über *adherens junctions* und *tight junctions* hinweg (B). (VVOs: Vakuole-vesikuläre Organellen).

Quelle: Yuan et al. [161]

Der Transport erfolgt dabei größenabhängig: Während kleine Moleküle über *adherens junctions* (Porengröße ~ 3 nm) und *tight junctions* (Porengröße ~ 1 nm) die endotheliale Barriere überwinden, müssen größere Moleküle bzw. Proteine durch Endozytose transportiert werden [162–165]. Albumin beispielsweise besitzt einen hydrodynamischen Radius von 3,5 nm (TdB Consultant, Uppsala, Schweden) und wird durch Endozytose transportiert.

Die Prüfung der Barrierefunktion zeigte, dass die verwendeten Dextrane (molekulare Masse 4 kDa; extrapolierte Größe 1,5–1,9 nm) die zelluläre Barriere nur im verringerten Umfang und abhängig von ihrer Ladung passierten. Der primäre Transportweg der Dextrane sollte parazellulär, basierend auf ihrer Größe, erfolgen. Die Verringerung um ~ 24 % für positiv geladene, ~ 35 % für negativ geladene und ~ 11 % für neutral geladene Dextrane ist ein unerwartetes Ergebnis, da in Bezug zu kardiovaskulären Erkrankungen wie z. B. Atherosklerose die Zunahme der Permeabilität beschrieben wird [166,167]. Die Verringerung der Permeabilität der endothelialen Barriere wird jedoch im Zusammenhang mit einer erhöhten Stickstoffmonoxidproduktion diskutiert [168,169].

5.3.3.3 Hypothese

Wie stimulieren die beiden Dieselrußsurrogate die endotheliale Angiogenese? Grundsätzlich erfolgt die Induktion der Angiogenese durch Aktivierung zellulärer Rezeptoren wie z. B. VE-Cadherin, EDG1, Integrin-Rezeptor, VEGFR2 und Tie2 [170]. Eine "unkonventionelle"

Aktivierung kann jedoch durch Beeinflussung der Calciumhomöostase auftreten, bedingt durch die verwendeten Partikel. So ist aus verschiedenen Studien bekannt, dass Carbon Black den zytosolischen Calciumgehalt erhöhen kann [1,171,172]. Davon unabhängig wurde beschrieben, dass der Calciumeinstrom ins Zytosol die Angiogenese der Zellen, u. a. durch Änderung der Stickstoffmonoxidhomöostase, moduliert. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass durch die Inhibierung des Calciumeinstroms in die Zelle die Motilität, Adhäsion und Proliferation von Endothelzellen reduziert werden kann [173–175].

5.3.4 Intrazelluläre Bestimmung des Calciumgehalts

Zur Prüfung der Hypothese wurde der Calciumgehalt der exponierten Zellen ermittelt. Der intrazelluläre Calciumgehalt stieg nach Exposition gegen CB um 12 % und nach Exposition gegen CB+B[a]P um 16–21 % an (abhängig vom verwendeten Ca^{2+} Fluoreszenzindikator).

Das zelluläre Calciumsystem ist ein hochkonservierter Signalweg für eine Vielzahl zellulärer Vorgänge. Calcium ist dabei nicht nur ein Signalübermittler, sondern auch notwendiger Bestandteil zahlreicher Prozesse, beispielweise der Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion [174]. Stickstoffmonoxid wird als wichtiger Regulator der Zellmigration diskutiert. Die Produktion von NO erfolgt durch die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS), die in drei Isoformen vorliegt: eNOS im Endothel, iNOS in Makrophagen und Mikrogliazellen und nNOS in Neuronen. Die Aktivierung von eNOS erfolgt üblicherweise durch die Stimulierung des VEGFR-2/PI3K/Akt-PKB-Signalwegs in Endothelzellen [157], jedoch ist bekannt, dass ein verlängerter kapazitiver Calciumeinstrom ebenfalls zur Aktivierung von eNOS führen kann. Ferner wurde beobachtet, dass verschiedene Nanopartikel das Stickstoffmonoxid-Systems modulieren, ohne näher auf die involvierten Signalwege einzugehen [24,176,177]. Eine Hypothese ist daher, dass als Antwort auf die Exposition gegen Dieselrußsurrogate der intrazelluläre Calciumgehalt erhöht wird, der wiederum u. a. über NO die Angiogenese fördert.

5.3.5 Zusammenfassung III

Die Analyse des Phosphoproteoms endothelialer Zellen nach Exposition gegen die Dieselrußsurrogate Carbon Black bzw. B[a]P-beladenes Carbon Black ergab Änderungen der Phosphorylierung von Proteinen, die außer an katalytischen auch an zytoskelettalen Prozessen beteiligt sind. Die Modifikationen der zytoskelettalen Proteine wiesen auf ein erhöhtes Angiogenesepotential hin, was sich in funktionellen Tests bestätigte. So erhöhte sich der Anteil migrierender Zellen nach Exposition, außerdem zeigten diese Zellen eine vermehrte Invasionsbereitschaft. Die funktionellen Veränderungen spiegelten sich auch auf morpho-

logischer Ebene wieder, hier in der Ausbildung von Filopodien und Stressfasern sowie in einer verringerten endothelialen Permeabilität. Als möglicher Auslöser dieser zellulären Veränderungen könnte der erhöhte Gehalt an intrazellulärem Calcium infrage kommen. Calcium stellt einen wichtigen zellulären Signaltransduktor dar, der in vielen Prozessen, unter anderem an der Regulation der endothelialen Stickstoffmonoxid-Produktion, beteiligt ist. Die endotheliale NO-Produktion wird wiederum in der Literatur als wichtiger Faktor für die Zellmigration bzw. Angiogenese und als Modulator der Barrierefunktion der Endothelzellen diskutiert.

6 Zusammenfassung

Zielsetzung der Arbeit war, molekulare bzw. zelluläre Effekte an endothelialen Zellen nach Langzeitexposition gegen die Dieselrußsurrogate Carbon Black und Benzo[a]pyren-beladenes Carbon Black im Niedrigdosisbereich zu ermitteln. Dieselruß ist in Abhängigkeit vom Entstehungsort mit einer Vielzahl von Substanzen wie Übergangsmetallen (z. B. Eisen, Chrom), Salzen und organischen Verbindungen (z. B. PAH) belastet, die selbst zelluläre Effekte auslösen können. Daher sollten in dieser Arbeit die Zellen gegen die Dieselrußsurrogate Carbon Black und B[a]P-beladenes Carbon Black exponiert werden. Benzo[a]pyren (Leitsubstanz der PAH) sollte stellvertretend für die Gruppe der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe die Kontamination von Dieselruß mit dieser Stoffgruppe simulieren.

Diskutierte Mechanismen zur Entwicklung von Feinstaub-vermittelten kardiovaskulären Erkrankungen beruhen auf Experimenten, bei denen meist Ultrafeinstaubpartikel in hohen Dosen über einen kurzen Zeitraum eingesetzt wurden. Die Exposition des Menschen erfolgt im Gegensatz zu den gängigen experimentellen Studien über einen längeren Zeitraum gegen geringe Dosen. Aus diesem Grunde wurden in der vorliegenden Arbeit ein Expositionszeitraum von 14 Tagen sowie eine Exposition im Niedrigdosisbereich gewählt. Die Exposition der Endothelzellen gegen eine niedrigere bzw. physiologischere Konzentration von Dieselrußsurrogaten steigerte die Proliferation und veränderte den Energiehaushalt, jedoch nicht die Generierung von ROS. Diese Antworten ließen sich anhand der Ergebnisse der proteomischen Analyse exponierter Zellen zu einem großen Teil auf eine verringerte Aktivität des Transkriptionsfaktors PPAR γ zurückführen. Die Hypothese, dass PPAR γ ein wichtiger Regulator der beobachteten zellulären Reaktionen ist, wurde durch die gaschromatographische Analyse der zellulären Metaboliten erhärtet. So wurden die in der Literatur beschriebenen Veränderungen im Energiestoffwechsel infolge einer verminderten PPAR γ -Aktivität in der vorliegenden Arbeit anhand des Nachweises einer erhöhten intrazellulären Konzentration an freien Fettsäuren und eines durch die gesteigerte Proliferation erhöhten Energiebedarfs bestätigt.

Da zu erwarten war, dass die bereits identifizierten Proteine nicht die Gesamtheit der beeinflussten Signalwege repräsentieren, wurde zusätzlich das Phosphoproteom untersucht. Die Analyse phosphorylierter Proteine ist jedoch eine schwierige Aufgabe in Anbetracht ihres geringen Vorkommens. Die Anreicherung der Phosphoproteine schien dabei als ein vielversprechender Ansatz, verfügbare Techniken setzten jedoch hochtechnisierte Geräte voraus. Daher wurde ein Verfahren zur einfachen Anreicherung mittels Lanthanionen (La³⁺)

entwickelt, durch dessen Anwendung Phosphoproteine und Phosphoglykoproteine selektiv aus komplexen Proteingemischen isoliert werden konnten.

Die Analyse des Phosphoproteoms endothelialer Zellen nach Exposition ergab Änderungen der Phosphorylierung von Proteinen, die neben katalytischen Prozessen auch die Struktur der Zellen beeinflussten. Die Modifikationen der zytoskelettalen Proteine wiesen auf ein erhöhtes Angiogenesepotential hin, was sich in funktionellen Tests (Migration, Invasion, Barrierefunktion) bestätigte. Der Anteil migrierender Zellen sowie ihre Invasionsbereitschaft erhöhten sich nach Exposition gegen die Dieselrußsurrogate. Darüber hinaus wiesen die exponierten Zellen eine verringerte Permeabilität gegenüber geladenen und ungeladenen Substanzen (Dextrane) auf. Die funktionellen Veränderungen spiegelten sich auch auf morphologischer Ebene in der Ausbildung von Filopodien und Stressfasern wider.

Als möglicher Auslöser dieser zellulären Veränderungen kommt der erhöhte Gehalt an intrazellulärem Calcium infrage. Calcium stellt einen wichtigen zellulären Signaltransduktor dar, der an vielen Prozessen, darunter der Regulation der endothelialen Stickstoffmonoxid-Produktion, beteiligt ist. Die endotheliale NO-Produktion ist ein wichtiger Modulator der Angiogenese, die viele der beobachteten Effekte beeinflussen kann.

Die hier vorgestellten Ergebnisse beschreiben detaillierte Veränderungen des Endothels als Antwort auf eine Exposition gegen Dieselrußsurrogate. Ob und ggf. welche/s Krankheitsbild/er diese Veränderungen hervorrufen können, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar.

7 Literatur

- [1] Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 2005;113:823–39.
- [2] Holgate ST. Exposure, uptake, distribution and toxicity of nanomaterials in humans. *J Biomed Nanotechnol* 2010;6:1–19.
- [3] Sillanpää M, Hillamo R, Saarikoski S, Frey A, Pennanen A, Makkonen U, Spolnik Z, Van Grieken R, Braniš M, Brunekreef B, Chalbot M-C, Kuhlbusch T, Sunyer J, Kerminen V-M, Kulmala M, Salonen RO. Chemical composition and mass closure of particulate matter at six urban sites in Europe. *Atmospheric Environment* 2006;40, Supplement 2:212–23.
- [4] Campbell A, Oldham M, Becaria A, Bondy SC, Meacher D, Sioutas C, Misra C, Mendez LB, Kleinman M. Particulate Matter in Polluted Air May Increase Biomarkers of Inflammation in Mouse Brain. *NeuroToxicology* 2005;26:133–40.
- [5] Ghio AJ, Smith CB, Madden MC. Diesel exhaust particles and airway inflammation. *Curr Opin Pulm Med* 2012;18:144–50.
- [6] Watson AY, Valberg PA. Carbon black and soot: two different substances. *AIHAJ* 2001;62:218–28.
- [7] Frenklach M, Wang H. AROMATICS GROWTH BEYOND THE FIRST RING AND THE NUCLEATION OF SOOT PARTICLES. *Preprints of the 202nd ACS National Meeting* 1991;36:1509–16.
- [8] Zielinska B, Sagebiel J, McDonald JD, Whitney K, Lawson DR. Emission rates and comparative chemical composition from selected in-use diesel and gasoline-fueled vehicles. *J Air Waste Manag Assoc* 2004;54:1138–50.
- [9] Murphy SA, BeruBe KA, Richards RJ. Bioreactivity of carbon black and diesel exhaust particles to primary Clara and type II epithelial cell cultures. *Occup Environ Med* 1999;56:813–9.
- [10] Ghio A, Sobus J, Pleil J, Madden M. Controlled human exposures to diesel exhaust. *Swiss medical weekly* 2012;142:0.
- [11] Sobus JR, Pleil JD, Madden MC, Funk WE, Hubbard HF, Rappaport SM. Identification of surrogate measures of diesel exhaust exposure in a controlled chamber study. *Environ Sci Technol* 2008;42:8822–8.
- [12] Ganguly K, Upadhyay S, Irmeler M, Takenaka S, Pukelsheim K, Beckers J, De Angelis MH, Hamelmann E, Stoeger T, Schulz H. Impaired resolution of inflammatory response in the lungs of JF1/Msf mice following carbon nanoparticle instillation. *Respir. Res.* 2011;12.
- [13] Bakand S, Hayes A, Dechsakulthorn F. Nanoparticles: a review of particle toxicology following inhalation exposure. *Inhal Toxicol* 2012;24:125–35.
- [14] Elder A, Vidyasagar S, DeLouise L. Physicochemical factors that affect metal and metal oxide nanoparticle passage across epithelial barriers. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2009;1:434–50.
- [15] Bailey MR, Fry FA, James AC. Long-term retention of particles in the human respiratory tract. *J Aerosol Sci* 1985;16:295–305.
- [16] Bailey MR, Fry FA, James AC. The long-term clearance kinetics of insoluble particles from the human lung. *Ann Occup Hyg* 1982;26:273–90.
- [17] Kreyling WG, Scheuch G. Clearance of particles deposited in the lungs. *Particle lung interactions*, New York: Marcel Dekker: 2000, S. 323–76.

- [18] Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schurch S, Kreyling W, Schulz H, Semmler M, Im Hof V, Heyder J, Gehr P. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect* 2005;113:1555–60.
- [19] Kreyling WG, Semmler-Behnke M, Seitz J, Scymczak W, Wenk A, Mayer P, Takenaka S, Oberdörster G. Size dependence of the translocation of inhaled iridium and carbon nanoparticle aggregates from the lung of rats to the blood and secondary target organs. *Inhal Toxicol* 2009;21 Suppl 1:55–60.
- [20] Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 2006;311:622–7.
- [21] Diez Roux AV, Auchincloss AH, Franklin TG, Raghunathan T, Barr RG, Kaufman J, Astor B, Keeler J. Long-term exposure to ambient particulate matter and prevalence of subclinical atherosclerosis in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Am J Epidemiol* 2008;167:667–75.
- [22] Hoffmann B, Moebus S, Mohlenkamp S, Stang A, Lehmann N, Dragano N, Schmermund A, Memmesheimer M, Mann K, Erbel R, Jöckel KH. Residential exposure to traffic is associated with coronary atherosclerosis. *Circulation* 2007;116:489–96.
- [23] Simkhovich BZ, Kleinman MT, Kloner RA. Air pollution and cardiovascular injury epidemiology, toxicology, and mechanisms. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:719–26.
- [24] Mills NL, Törnqvist H, Robinson SD, Gonzalez MC, Söderberg S, Sandström T, Blomberg A, Newby DE, Donaldson K. Air pollution and atherothrombosis. *Inhal Toxicol* 2007;19 Suppl 1:81–9.
- [25] Araujo JA, Barajas B, Kleinman M, Wang X, Bennett BJ, Gong KW, Navab M, Harkema J, Sioutas C, Lusis AJ, Nel AE. Ambient particulate pollutants in the ultrafine range promote early atherosclerosis and systemic oxidative stress. *Circ Res* 2008;102:589–96.
- [26] Dockery DW, Luttmann-Gibson H, Rich DQ, Link MS, Schwartz JD, Gold DR, Koutrakis P, Verrier RL, Mittleman MA. Particulate air pollution and nonfatal cardiac events. Part II. Association of air pollution with confirmed arrhythmias recorded by implanted defibrillators. *Res Rep Health Eff Inst* 2005;83–126; discussion 127–148.
- [27] Pope CA, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 2002;287:1132–41.
- [28] Samet JM, Dominici F, Curriero FC, Coursac I, Zeger SL. Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. cities, 1987-1994. *N Engl J Med* 2000;343:1742–9.
- [29] Attfield MD, Schleiff PL, Lubin JH, Blair A, Stewart PA, Vermeulen R, Coble JB, Silverman DT. The Diesel Exhaust in Miners Study: A Cohort Mortality Study With Emphasis on Lung Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst* 2012;869–83.
- [30] Silverman DT, Samanic CM, Lubin JH, Blair AE, Stewart PA, Vermeulen R, Coble JB, Rothman N, Schleiff PL, Travis WD, Ziegler RG, Wacholder S, Attfield MD. The Diesel Exhaust in Miners Study: A Nested Case–Control Study of Lung Cancer and Diesel Exhaust. *JNCI J Natl Cancer Inst* 2012;104:855–68.
- [31] Delfino RJ, Sioutas C, Malik S. Potential role of ultrafine particles in associations between airborne particle mass and cardiovascular health. *Environ Health Perspect* 2005;113:934–46.
- [32] Knol AB, Hartog JJ de, Boogaard H, Slottje P, Sluijs JP van der, Lebret E, Cassee FR, Wardekker JA, Ayres JG, Borm PJ, Brunekreef B, Donaldson K, Forastiere F, Holgate ST, Kreyling WG, Nemery B, Pekkanen J, Stone V, Wichmann H-E, Hoek G. Expert elicitation on ultrafine particles: likelihood of health effects and causal pathways. *Part Fibre Toxicol* 2009;6:19.
- [33] Borm PJA, Kelly F, Künzli N, Schins RPF, Donaldson K. Oxidant generation by particulate matter: from biologically effective dose to a promising, novel metric. *Occup Environ Med* 2007;64:73–4.
- [34] Horie M, Kato H, Fujita K, Endoh S, Iwahashi H. In vitro evaluation of cellular response induced by manufactured nanoparticles. *Chem Res Toxicol* 2012;25:605–19.

- [35] Gwinn MR, Vallyathan V. Nanoparticles: Health Effects—Pros and Cons. *Environ Health Perspect* 2006;114:1818–25.
- [36] Donaldson K, Stone V. Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles. *Ann. Ist. Super. Sanita* 2003;39:405–10.
- [37] Schmid O, Möller W, Semmler-Behnke M, Ferron GA, Karg E, Lipka J, Schulz H, Kreyling WG, Stoeger T. Dosimetry and toxicology of inhaled ultrafine particles. *Biomarkers* 2009;14 Suppl 1:67–73.
- [38] Blank F, Gehr P, Rothen-Rutishauser B. In Vitro Human Lung Cell Culture Models to Study the Toxic Potential of Nanoparticles. In: Sahu SC, Casciano DA, herausgeber. *Nanotoxicity*, John Wiley & Sons, Ltd; 2009, S. 379–95.
- [39] Schmitz-Spanke S, Schipke J. Role of endothelin-1 receptors in healthy anaesthetized rabbits. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2001;28:647–50.
- [40] Schmitz-Spanke S, Schipke JD. Potential role of endothelin-1 and endothelin antagonists in cardiovascular diseases. *Basic Research in Cardiology* 2000;95:290–8.
- [41] Godleski JJ. Responses of the heart to ambient particle inhalation. *Clin Occup Environ Med* 2006;5:849–64.
- [42] Baranska P, Jerczynska H, Pawlowska Z, Koziolkiewicz W, Cierniewski CS. Expression of Integrins and Adhesive Properties of Human Endothelial Cell Line EA.hy 926. *Cancer Genomics Proteomics* 2005;2:265–9.
- [43] Emeis JJ, Edgell CJ. Fibrinolytic properties of a human endothelial hybrid cell line (Ea.hy 926). *Blood* 1988;71:1669–75.
- [44] Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1983;80:3734–7.
- [45] Edgell CJ, Haizlip JE, Bagnell CR, Packerham JP, Harrison P, Wilbourn B, Madden VJ. Endothelium specific Weibel-Palade bodies in a continuous human cell line, EA.hy926. *In Vitro Cell Dev Biol* 1990;26:1167–72.
- [46] Fields S. Proteomics. *Proteomics in genomeland*. *Science* 2001;291:1221–4.
- [47] Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 1975;26:231–43.
- [48] O’Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975;250:4007–21.
- [49] Link AJ, LaBear J. *Proteomics-Methoden*. 1. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2010.
- [50] Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 1988;60:2299–301.
- [51] Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989;246:64–71.
- [52] Knochenmuss R. Ion formation mechanisms in UV-MALDI. *Analyst* 2006;131:966–86.
- [53] Dole M, Mack LL, Hines RL, Mobley RC, Ferguson LD, Alice MB. Molecular Beams of Macroions. *J Chem Phys* 1968;49:2240–9.
- [54] Iribarne JV, Thomson BA. On the evaporation of small ions from charged droplets. *J Chem Phys* 1976;64:2287–94.
- [55] Eyrich B, Sickmann A, Zahedi RP. Catch me if you can: mass spectrometry-based phosphoproteomics and quantification strategies. *Proteomics* 2011;11:554–70.

- [56] Thingholm TE, Jensen ON, Larsen MR. Analytical strategies for phosphoproteomics. *Proteomics* 2009;9:1451–68.
- [57] Marcus K, Moebius J, Meyer HE. Differential analysis of phosphorylated proteins in resting and thrombin-stimulated human platelets. *Anal Bioanal Chem* 2003;376:973–93.
- [58] Reinders J, Sickmann A. State-of-the-art in phosphoproteomics. *Proteomics* 2005;5:4052–61.
- [59] Grimsrud PA, Swaney DL, Wenger CD, Beauchene NA, Coon JJ. Phosphoproteomics for the masses. *ACS Chem Biol* 2010;5:105–19.
- [60] Lévine A, Vannier F, Absalon C, Kuhn L, Jackson P, Scrivener E, Labas V, Vinh J, Courtney P, Garin J, Séror SJ. Analysis of the dynamic *Bacillus subtilis* Ser/Thr/Tyr phosphoproteome implicated in a wide variety of cellular processes. *Proteomics* 2006;6:2157–73.
- [61] Stasyk T, Morandell S, Bakry R, Feuerstein I, Huck CW, Stecher G, Bonn GK, Huber LA. Quantitative detection of phosphoproteins by combination of two-dimensional difference gel electrophoresis and phosphospecific fluorescent staining. *Electrophoresis* 2005;26:2850–4.
- [62] Wang M, Xiao GG, Li N, Xie Y, Loo JA, Nel AE. Use of a fluorescent phosphoprotein dye to characterize oxidative stress-induced signaling pathway components in macrophage and epithelial cultures exposed to diesel exhaust particle chemicals. *Electrophoresis* 2005;26:2092–108.
- [63] Hopper RK, Carroll S, Aponte AM, Johnson DT, French S, Shen R-F, Witzmann FA, Harris RA, Balaban RS. Mitochondrial matrix phosphoproteome: effect of extra mitochondrial calcium. *Biochemistry* 2006;45:2524–36.
- [64] Kaufmann H, Bailey JE, Fussenegger M. Use of antibodies for detection of phosphorylated proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 2001;1:194–9.
- [65] Andersson L. Recognition of phosphate groups by immobilized aluminium(III) ions. *J Chromatogr* 1991;539:327–34.
- [66] Andersson L, Porath J. Isolation of phosphoproteins by immobilized metal (Fe³⁺) affinity chromatography. *Anal Biochem* 1986;154:250–4.
- [67] Posewitz MC, Tempst P. Immobilized gallium(III) affinity chromatography of phosphopeptides. *Anal. Chem.* 1999;71:2883–92.
- [68] Zhou H, Ye M, Dong J, Han G, Jiang X, Wu R, Zou H. Specific phosphopeptide enrichment with immobilized titanium ion affinity chromatography adsorbent for phosphoproteome analysis. *J Proteome Res* 2008;7:3957–67.
- [69] Nonglaton G, Benitez IO, Guisle I, Pipelier M, Léger J, Dubreuil D, Tellier C, Talham DR, Bujoli B. New approach to oligonucleotide microarrays using zirconium phosphonate-modified surfaces. *J Am Chem Soc* 2004;126:1497–502.
- [70] Larsen MR, Thingholm TE, Jensen ON, Roepstorff P, Jørgensen TJD. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Mol. Cell Proteomics* 2005;4:873–86.
- [71] Beausoleil SA, Jedrychowski M, Schwartz D, Elias JE, Villén J, Li J, Cohn MA, Cantley LC, Gygi SP. Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 2004;101:12130–5.
- [72] Grønborg M, Kristiansen TZ, Stensballe A, Andersen JS, Ohara O, Mann M, Jensen ON, Pandey A. A mass spectrometry-based proteomic approach for identification of serine/threonine-phosphorylated proteins by enrichment with phospho-specific antibodies: identification of a novel protein, Frigg, as a protein kinase A substrate. *Mol Cell Proteomics* 2002;1:517–27.
- [73] Condina MR, Guthridge MA, McColl SR, Hoffmann P. A sensitive magnetic bead method for the detection and identification of tyrosine phosphorylation in proteins by MALDI-TOF/TOF MS. *Proteomics* 2009;9:3047–57.

- [74] Bodenmiller B, Mueller LN, Mueller M, Domon B, Aebersold R. Reproducible isolation of distinct, overlapping segments of the phosphoproteome. *Nat Methods* 2007;4:231–7.
- [75] Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol* 1998;16:373–8.
- [76] Fiehn O. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* 2002;48:155–71.
- [77] Schauer N, Steinhauser D, Strelkov S, Schomburg D, Allison G, Moritz T, Lundgren K, Roessner-Tunali U, Forbes MG, Willmitzer L, Fernie AR, Kopka J. GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. *FEBS Lett* 2005;579:1332–7.
- [78] Gika HG, Theodoridis GA, Wingate JE, Wilson ID. Within-day reproducibility of an HPLC-MS-based method for metabolomic analysis: application to human urine. *J Proteome Res* 2007;6:3291–303.
- [79] Soga T, Ohashi Y, Ueno Y, Naraoka H, Tomita M, Nishioka T. Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. *J Proteome Res* 2003;2:488–94.
- [80] Kopka J, Fernie A, Weckwerth W, Gibon Y, Stitt M. Metabolite profiling in plant biology: platforms and destinations. *Genome Biol* 2004;5:109.
- [81] Halket JM, Waterman D, Przyborowska AM, Patel RKP, Fraser PD, Bramley PM. Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *J Exp Bot* 2005;56:219–43.
- [82] Kopka J, Schauer N, Krueger S, Birkemeyer C, Usadel B, Bergmüller E, Dörmann P, Weckwerth W, Gibon Y, Stitt M, Willmitzer L, Fernie AR, Steinhauser D. GMD@CSB.DB: the Golm Metabolome Database. *Bioinformatics* 2005;21:1635–8.
- [83] Dasenbrock C, Peters L, Creutzenberg O, Heinrich U. The carcinogenic potency of carbon particles with and without PAH after repeated intratracheal administration in the rat. *Toxicol Lett* 1996;88:15–21.
- [84] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [85] Spector T. Refinement of the coomassie blue method of protein quantitation. A simple and linear spectrophotometric assay for less than or equal to 0.5 to 50 microgram of protein. *Anal Biochem* 1978;86:142–6.
- [86] Pink M, Verma N, Rettenmeier AW, Schmitz-Spanke S. CBB staining protocol with higher sensitivity and mass spectrometric compatibility. *Electrophoresis* 2010;31:593–8.
- [87] Samuel EP. The mechanism of silver staining. *J Anat* 1953;87:278–87.
- [88] Strelkov S, Von Elstermann M, Schomburg D. Comprehensive analysis of metabolites in *Corynebacterium glutamicum* by gas chromatography/mass spectrometry. *Biol Chem* 2004;385:853–61.
- [89] Ichihara K, Fukubayashi Y. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *J Lipid Res* 2010;51:635–40.
- [90] Styczynski MP, Moxley JF, Tong LV, Walther JL, Jensen KL, Stephanopoulos GN. Systematic identification of conserved metabolites in GC/MS data for metabolomics and biomarker discovery. *Anal Chem* 2007;79:966–73.
- [91] Horai H, Arita M, Kanaya S, Nihei Y, Ikeda T, Suwa K, Ojima Y, Tanaka K, Tanaka S, Aoshima K, Oda Y, Kakazu Y, Kusano M, Tohge T, Matsuda F, Sawada Y, Hirai MY, Nakanishi H, Ikeda K, Akimoto N, Maoka T, Takahashi H, Ara T, Sakurai N, Suzuki H, Shibata D, Neumann S, Iida T, Tanaka K, Funatsu K, Matsuura F, Soga T, Taguchi R, Saito K, Nishioka T. MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *J Mass Spectrom* 2010;45:703–14.
- [92] Guhe C, Föllmann W. Growth and characterization of porcine urinary bladder epithelial cells in vitro. *Am J Physiol* 1994;266:F298–308.
- [93] Rasband WS. ImageJ. <http://rsbweb.nih.gov/ij/> 2008.

- [94] Kuhlbusch TAJ, Krug HF, Nau K, [Hrsg.], Nau K, Krug HF, Kusche O, Dickerhof M, Quendt C, Fleischer T, Mühlhopt S, Paur HR, [FZKA-Autoren], U.A. NanoCare: Health related aspects of nanomaterials. 2009.
- [95] Dennis G, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* 2003;4:R60–R60.
- [96] Scaduto RC, Grotyohann LW. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys J* 1999;76:469–77.
- [97] Bamann E, Trapmann H, Fischler F. Verhalten und Spezifität von Cer und Lanthan als Phosphatase-Modelle gegenüber Nucleinsäuren und Mononucleotiden. *Biochem Z* 1954;326:89–96.
- [98] Eichhorn GL, Butzow JJ. Interactions of metal ions with polynucleotides and related compounds. 3. Degradation of polyribonucleotides by lanthanum ions. *Biopolymers* 1965;3:79–94.
- [99] Joy MS, Finn WF. Randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-titration, phase III study assessing the efficacy and tolerability of lanthanum carbonate: a new phosphate binder for the treatment of hyperphosphatemia. *Am J Kidney Dis* 2003;42:96–107.
- [100] Pink M, Verma N, Polato F, Bonn GK, Baba HA, Rettenmeier AW, Schmitz-Spanke S. Precipitation by lanthanum ions: a straightforward approach to isolating phosphoproteins. *J Proteomics* 2011;75:375–83.
- [101] Thomas PD, Kejariwal A, Campbell MJ, Mi H, Diemer K, Guo N, Ladunga I, Ulitsky-Lazareva B, Muruganujan A, Rabkin S, Vandergriff JA, Doremieux O. PANTHER: a browsable database of gene products organized by biological function, using curated protein family and subfamily classification. *Nucleic Acids Res* 2003;31:334–41.
- [102] Oberdörster G, Ferin J, Lehnert BE. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ Health Perspect* 1994;102:173–9.
- [103] Oberdörster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, Carter J, Karn B, Kreyling W, Lai D, Olin S, Monteiro-Riviere N, Warheit D, Yang H. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part Fibre Toxicol* 2005;2:8.
- [104] Oesterling E, Chopra N, Gavalas V, Arzuaga X, Lim EJ, Sultana R, Butterfield DA, Bachas L, Hennig B. Alumina nanoparticles induce expression of endothelial cell adhesion molecules. *Toxicol Lett* 2008;178:160–6.
- [105] Stoeger T, Reinhard C, Takenaka S, Schroepfel A, Karg E, Ritter B, Heyder J, Schulz H. Instillation of six different ultrafine carbon particles indicates a surface area threshold dose for acute lung inflammation in mice. *Environ Health Perspect* 2006;114:328–33.
- [106] Peters K, Unger RE, Kirkpatrick CJ, Gatti AM, Monari E. Effects of nano-scaled particles on endothelial cell function in vitro: studies on viability, proliferation and inflammation. *J Mater Sci Mater Med* 2004;15:321–5.
- [107] Gong KW, Zhao W, Li N, Barajas B, Kleinman M, Sioutas C, Horvath S, Lusic AJ, Nel A, Araujo JA. Air-pollutant chemicals and oxidized lipids exhibit genome-wide synergistic effects on endothelial cells. *Genome Biol* 2007;8:R149.
- [108] Yamawaki H, Iwai N. Mechanisms underlying nano-sized air-pollution-mediated progression of atherosclerosis: carbon black causes cytotoxic injury/inflammation and inhibits cell growth in vascular endothelial cells. *Circ J* 2006;70:129–40.
- [109] Gojova A, Guo B, Kota RS, Rutledge JC, Kennedy IM, Barakat AI. Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles: effect of particle composition. *Environ Health Perspect* 2007;115:403–9.

- [110] Jung EJ, Avliyakov NK, Boontheung P, Loo JA, Nel AE. Pro-oxidative DEP chemicals induce heat shock proteins and an unfolding protein response in a bronchial epithelial cell line as determined by DIGE analysis. *Proteomics* 2007;7:3906–18.
- [111] Schins RPF, Knaapen AM. Genotoxicity of poorly soluble particles. *Inhal Toxicol* 2007;19 Suppl 1:189–98.
- [112] Xiao GG, Wang M, Li N, Loo JA, Nel AE. Use of proteomics to demonstrate a hierarchical oxidative stress response to diesel exhaust particle chemicals in a macrophage cell line. *J Biol Chem* 2003;278:50781–90.
- [113] Chin BY, Choi ME, Burdick MD, Strieter RM, Risby TH, Choi AM. Induction of apoptosis by particulate matter: role of TNF-alpha and MAPK. *Am J Physiol* 1998;275:L942–949.
- [114] Mroz RM, Schins RPF, Li H, Drost EM, Macnee W, Donaldson K. Nanoparticle carbon black driven DNA damage induces growth arrest and AP-1 and NFkappaB DNA binding in lung epithelial A549 cell line. *J Physiol Pharmacol* 2007;58 Suppl 5:461–70.
- [115] Miller KP, Ramos KS. Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo[a]pyrene and related hydrocarbons. *Drug Metab Rev* 2001;33:1–35.
- [116] Donaldson K, Borm PJ, Castranova V, Gulumian M. The limits of testing particle-mediated oxidative stress in vitro in predicting diverse pathologies; relevance for testing of nanoparticles. *Part Fibre Toxicol* 2009;6:13.
- [117] Coudray C, Rachidi S, Favier A. Effect of zinc on superoxide-dependent hydroxyl radical production in vitro. *Biol Trace Elem Res* 1993;38:273–87.
- [118] Kültz D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu Rev Physiol* 2005;67:225–57.
- [119] Tsai KS, Yang RS, Liu SH. Benzo[a]pyrene regulates osteoblast proliferation through an estrogen receptor-related cyclooxygenase-2 pathway. *Chem Res Toxicol* 2004;17:679–84.
- [120] Burdick AD, Davis JW 2nd, Liu KJ, Hudson LG, Shi H, Monske ML, Burchiel SW. Benzo(a)pyrene quinones increase cell proliferation, generate reactive oxygen species, and transactivate the epidermal growth factor receptor in breast epithelial cells. *Cancer Res* 2003;63:7825–33.
- [121] Kalmes M, Hennen J, Clemens J, Bloemeke B. Impact of aryl hydrocarbon receptor (AhR) knockdown on cell cycle progression in human HaCaT keratinocytes. *Biol Chem* 2011;392:643–51.
- [122] Schiffrin EL, Amiri F, Benkirane K, Iglarz M, Diep QN. Peroxisome proliferator-activated receptors: vascular and cardiac effects in hypertension. *Hypertension* 2003;42:664–8.
- [123] Luconi M, Cantini G, Serio M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma): Is the genomic activity the only answer? *Steroids* 2010;75:585–94.
- [124] Picard F, Auwerx J. PPAR(gamma) and glucose homeostasis. *Annu Rev Nutr* 2002;22:167–97.
- [125] Kanda T, Brown JD, Orasanu G, Vogel S, Gonzalez FJ, Sartoretto J, Michel T, Plutzky J. PPARgamma in the endothelium regulates metabolic responses to high-fat diet in mice. *J Clin Invest* 2009;119:110–24.
- [126] Meredith D, Panchatcharam M, Miriyala S, Tsai Y-S, Morris AJ, Maeda N, Stouffer GA, Smyth SS. Dominant-negative loss of PPARgamma function enhances smooth muscle cell proliferation, migration, and vascular remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:465–71.
- [127] Peters K, Kamp G, Berz A, Unger RE, Barth S, Salamon A, Rychly J, Kirkpatrick CJ. Changes in human endothelial cell energy metabolic capacities during in vitro cultivation. The role of „aerobic glycolysis“ and proliferation. *Cell Physiol Biochem* 2009;24:483–92.
- [128] Krützfeldt A, Spahr R, Mertens S, Siegmund B, Piper HM. Metabolism of exogenous substrates by coronary endothelial cells in culture. *J Mol Cell Cardiol* 1990;22:1393–404.

- [129] Unfried K, Albrecht C, Klotz L-O, Von Mikecz A, Grether-Beck S, Schins RPF. Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms. *Nanotoxicology* 2007;1:52–71.
- [130] Neilson KA, Ali NA, Muralidharan S, Mirzaei M, Mariani M, Assadourian G, Lee A, Van Sluyter SC, Haynes PA. Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics* 2011;11:535–53.
- [131] Pevec A, Mrak M, Demsar A, Petricek S, Roesky H. Coordination number 12 in praseodymium and 11 in neodymium complexes with organofluorotitanate ligands. *Polyhedron* 2003;22:575–9.
- [132] Chen G, Tao D. Effect of solution chemistry on flotability of magnesite and dolomite. *Int J Miner Process* 2004;74:343–57.
- [133] Gutierrez R, Del Valle EMM, Galan MA. Immobilized metal-ion affinity chromatography: Status and trends. *Sep Purif Rev* 2007;36:71–111.
- [134] Onoda H, Taniguchi K, Tanaka I. Preparation and acidic properties of nano-porous lanthanum phosphate by the addition of urea. *Microporous Mesoporous Mat.* 2008;109:193–8.
- [135] Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Takiyama K, Koike T. Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Mol Cell Proteomics* 2006;5:749–57.
- [136] Kinoshita-Kikuta E, Kinoshita E, Yamada A, Endo M, Koike T. Enrichment of phosphorylated proteins from cell lysate using a novel phosphate-affinity chromatography at physiological pH. *Proteomics* 2006;6:5088–95.
- [137] Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E. Improved Phos-tag SDS-PAGE under neutral pH conditions for advanced protein phosphorylation profiling. *Proteomics* 2011;11:319–23.
- [138] Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T. Phos-tag SDS-PAGE systems for phosphorylation profiling of proteins with a wide range of molecular masses under neutral pH conditions. *Proteomics* 2012;12:192–202.
- [139] Feng J, Zhu M, Schaub MC, Gehrig P, Roschitzki B, Lucchinetti E, Zaugg M. Phosphoproteome analysis of isoflurane-protected heart mitochondria: phosphorylation of adenine nucleotide translocator-1 on Tyr194 regulates mitochondrial function. *Cardiovasc Res* 2008;80:20–9.
- [140] Burns KA, Vanden Heuvel JP. Modulation of PPAR activity via phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 2007;1771:952–60.
- [141] Hunter T. The Croonian Lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 1998;353:583–605.
- [142] Hambrecht R, Adams V, Erbs S, Linke A, Kränkel N, Shu Y, Baither Y, Gielen S, Thiele H, Gummert JF, Mohr FW, Schuler G. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2003;107:3152–8.
- [143] Fanning AS, Mitic LL, Anderson JM. Transmembrane proteins in the tight junction barrier. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:1337–45.
- [144] Lee SH, Dominguez R. Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells. *Mol Cells* 2010;29:311–25.
- [145] DePina AS, Langford GM. Vesicle transport: the role of actin filaments and myosin motors. *Microsc Res Tech* 1999;47:93–106.
- [146] Papakonstanti EA, Stournaras C. Association of PI-3 kinase with PAK1 leads to actin phosphorylation and cytoskeletal reorganization. *Mol Biol Cell* 2002;13:2946–62.
- [147] Zhai L, Zhao P, Panebra A, Guerrerio AL, Khurana S. Tyrosine phosphorylation of villin regulates the organization of the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 2001;276:36163–7.
- [148] Chang L, Goldman RD. Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:601–13.

- [149] Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 1990;60:585–95.
- [150] Izawa I, Inagaki M. Regulatory mechanisms and functions of intermediate filaments: a study using site- and phosphorylation state-specific antibodies. *Cancer Sci* 2006;97:167–74.
- [151] Windoffer R, Beil M, Magin TM, Leube RE. Cytoskeleton in motion: the dynamics of keratin intermediate filaments in epithelia. *J Cell Biol* 2011;194:669–78.
- [152] Lee JS, Zhang MH, Yun EK, Geum D, Kim K, Kim TH, Lim YS, Seo JS. Heat shock protein 27 interacts with vimentin and prevents insolubilization of vimentin subunits induced by cadmium. *Exp Mol Med* 2005;37:427–35.
- [153] Ku NO, Liao J, Omary MB. Phosphorylation of human keratin 18 serine 33 regulates binding to 14-3-3 proteins. *EMBO J* 1998;17:1892–906.
- [154] Owens DW, Lane EB. The quest for the function of simple epithelial keratins. *Bioessays* 2003;25:748–58.
- [155] Li Q-F, Spinelli AM, Wang R, Anfinogenova Y, Singer HA, Tang DD. Critical role of vimentin phosphorylation at Ser-56 by p21-activated kinase (PAK) in vimentin cytoskeleton signaling. *J Biol Chem* 2006;281:34716–24.
- [156] Bayless KJ, Johnson GA. Role of the Cytoskeleton in Formation and Maintenance of Angiogenic Sprouts. *J Vasc Res* 2011;48:369–85.
- [157] Lamalice L, Le Boeuf F, Huot J. Endothelial Cell Migration During Angiogenesis. *Circ Res* 2007;100:782–94.
- [158] Jaffe AB, Hall A. RHO GTPASES: Biochemistry and Biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005;21:247–69.
- [159] Pellegrin S, Mellor H. Actin stress fibres. *J Cell Sci* 2007;120:3491–9.
- [160] Luo L. RHO GTPASES in neuronal morphogenesis. *Nat Rev Neurosci* 2000;1:173–80.
- [161] Yuan SY, Rigor RR. Regulation of Endothelial Barrier Function. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010.
- [162] Mehta D, Malik AB. Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability. *Physiol Rev* 2006;86:279–367.
- [163] Simionescu N, Simionescu M, Palade GE. Open junctions in the endothelium of the postcapillary venules of the diaphragm. *J Cell Biol* 1978;79:27–44.
- [164] Curry F-RE. Microvascular solute and water transport. *Microcirculation* 2005;12:17–31.
- [165] Unterberg A, Wahl M, Baethmann A. Effects of bradykinin on permeability and diameter of pial vessels in vivo. *J Cereb. Blood Flow Metab* 1984;4:574–85.
- [166] Davignon J, Ganz P. Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. *Circulation* 2004;109:III–27–III–32.
- [167] Munro JM, Cotran RS. The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. *Lab Invest* 1988;58:249–61.
- [168] Hatakeyama T, Pappas PJ, Hobson RW 2nd, Boric MP, Sessa WC, Durán WN. Endothelial nitric oxide synthase regulates microvascular hyperpermeability in vivo. *J Physiol* 2006;574:275–81.
- [169] May JM, Qu Z. Nitric Oxide Mediates Tightening of the Endothelial Barrier by Ascorbic Acid. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;404:701–5.
- [170] Muñoz-Chápuli R, Quesada AR, Angel Medina M. Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:2224–43.

- [171] Stone V, Tuinman M, Vamvakopoulos JE, Shaw J, Brown D, Petterson S, Faux SP, Borm P, MacNee W, Michaelangeli F, Donaldson K. Increased calcium influx in a monocytic cell line on exposure to ultrafine carbon black. *Eur Respir J* 2000;15:297–303.
- [172] Brown DM, Stone V, Findlay P, MacNee W, Donaldson K. Increased Inflammation and Intracellular Calcium Caused by Ultrafine Carbon Black Is Independent of Transition Metals or Other Soluble Components. *Occup Environ Med* 2000;57:685–91.
- [173] Kohn EC, Alessandro R, Spoonster J, Wersto RP, Liotta LA. Angiogenesis: role of calcium-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1995;92:1307–11.
- [174] Munaron L. Intracellular calcium, endothelial cells and angiogenesis. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2006;1:105–19.
- [175] Pla AF, Grange C, Antoniotti S, Tomatis C, Merlino A, Bussolati B, Munaron L. Arachidonic Acid–Induced Ca²⁺ Entry Is Involved in Early Steps of Tumor Angiogenesis. *Mol Cancer Res* 2008;6:535–45.
- [176] Corbalan JJ, Medina C, Jacoby A, Malinski T, Radomski MW. Amorphous silica nanoparticles trigger nitric oxide/peroxynitrite imbalance in human endothelial cells: inflammatory and cytotoxic effects. *Int J Nanomedicine* 2011;6:2821–35.
- [177] Rosas-Hernández H, Jiménez-Badillo S, Martínez-Cuevas PP, Gracia-Espino E, Terrones H, Terrones M, Hussain SM, Ali SF, González C. Effects of 45-nm silver nanoparticles on coronary endothelial cells and isolated rat aortic rings. *Toxicol Lett* 2009;191:305–13.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

C-11; C-14; ...	Länge der Alkankette (Undecan, Tetradecan, ...)
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol/Liter
1D; 2D; 3D	ein-, zwei-, dreidimensional
A549	<i>Adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells</i>
ACN	Acetonitril
AM	alveoläre Makrophagen
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
B[a]P	Benzo[a]pyren
B[a]P-d12	deuteriertes Benzo[a]pyren
BisTris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BP	Bandpass
BPQ	Benzo[a]pyren-chinon
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
C18	Octadecan-modifiziertes Kieselgel
CB	Carbon Black
CB+B[a]P	Benzo[a]pyren-beladenes Carbon Black
CBB	Coomassie Brilliant Blue (G-250)
CE	Kapillarelektrophorese
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CHCA	α-Cyano-4-hydroxymethylsäure
CI	<i>Chemical ionization</i>
CID	<i>Collision-induced dissociation</i>
CRM	<i>Charge residue model</i>
Da	Dalton, atomare Masseneinheit

DAVID	<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
DCF	Dichlorfluorescein
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EI	<i>Electron impact</i>
ESI	Elektronensprayionisierung (<i>electrospray ionization</i>)
eV	Elektronenvolt
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
GC	Gaschromatographie
GC/MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
GMD	<i>Golm Metabolome Database</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
H2DCF	2',7'-Dichlordihydrofluorescein
H2DCF-DA	2',7'-Dichlordihydrofluoresceindiacetat
HAc	Essigsäure
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HPLC	<i>High-pressure liquid chromatography</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
I	Imidazol
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> , eine Einrichtung der Weltgesundheitsorganisation (WHO)
ICRP	<i>International Commission on Radiological Protection</i>
IEF	isoelektrische Fokussierung
IEM	<i>Ion evaporation model</i>
ILB	Imidazol-haltiger Lysispuffer
IMAC	<i>Immobilized metal ion affinity chromatography</i>
IPG	immobilisierter pH-Gradient

ITCN	<i>Image-based Tool for Counting Nuclei</i>
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
kV	Kilovolt
LaCl ₃	Lanthanchlorid
LB	Lysispuffer
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LP	Langpass
M	Mol/L
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
mA	Milliampere
MALDI	Matrixgestützte Laserdesorptions-Ionisierung (<i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>)
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MilliQ	Reinstwasser von Typ I
min	Minute
mind.	mindestens
mL	Milliliter
MOAC	Metalloxid-Affinitätschromatographie
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MOWSE	<i>Molecular weight search</i>
MS	Massenspektrometer
mRNA	Messenger RNA
MSTFA	N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
MW	Molekulargewicht
MWCO	<i>Molecular weight cut-off</i>
NEAA	<i>Nonessential amino acids</i>
NFκB	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i> , ein spezifischer Transkriptionsfaktor
nm	Nanometer
NP	Nanopartikel
ns	Nanosekunde

p-Wert	Signifikanzwert
PA	Phosphorsäure
PAH	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PA-LB	Phosphorsäure-haltiger Lysispuffer
PANTHER	<i>Protein Analysis Through Evolutionary Relationships</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PEG	Polyethylenglycol
PM	<i>Particulate matter</i> (Feinstaub)
PM _{0,1} ; PM _{2,5} ; PM ₁₀	Maximaler Durchmesser des Feinstaubes in Mikrometer (0,1 µm; 2,5 µm; 10 µm)
PMF	<i>Peptide-mass fingerprint</i>
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
ppm	<i>Parts per million</i>
PTFE	Polytetrafluorethen
PTM	posttranslationale Modifikation
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rcf	<i>Relative centrifugal force</i>
Rhod-2	Rhodamin 2
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i> Puffer
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	<i>Standard error of mean</i>
Ser	Serin
Ser69	Serin an der 69. Position in der Aminosäurekette
SIM	<i>Single ion monitoring</i>
SOD	Superoxiddismutase
TBS-T	<i>Tris-buffered saline</i> mit Tween 20
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

TFA	Trifluoressigsäure
TFBS	<i>Transcription factor binding site</i>
Thr	Threonin
TIC	<i>Total ion current</i>
TIFF	<i>Tagged Image File Format</i> , Bilder werden verlustfrei komprimiert
TMS	Trimethylsilyl
ToF	<i>Time-of-flight</i> , Flugzeitanalysator
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
TRITC	Tetramethylrhodamin-5(6)-isothiocyanat
Tyr	Tyrosin
UniProt	<i>Universal Protein</i>
UFP	Ultrafeinstaub (<i>Ultrafine particles</i>)
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenanteil
Vh	Voltstunden
VVOs	Vakuole-vesikuläre Organellen
W	Watt
x g	x-fache Erdbeschleunigung
λ	Wellenlänge

8.2 Identifizierte Proteine und Metaboliten

8.2.1 Proteomische und metabolomische Analyse von Endothelzellen nach Exposition gegen Dieselrußsurrogate

Tabelle 12: Identifizierte Proteine, die eine Änderung ihrer Expression ($\geq \pm 1.7$ gegen Kontrolle) nach Exposition gegen CB aufwiesen (n=10).

ID ¹	Accession No. ²	Gene ID ³	Gene name	Protein name	MOWSE Score	Regulation
ID191018	Q14764	9961	MVP	Major Vault Protein	167	-1.8227 ↓
ID191127	P21399	48	ACO1	Aconitase	225	2.45331 ↑
ID191190	Q92945	8570	KHSRP	KH-type splicing regulatory protein	300	1.98162 ↑
ID191217	Q92945	8570	KHSRP	KH-type splicing regulatory protein	267	1.87441 ↑
ID191653	P07910	3183	HNRNPC	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (C1/C2)	96	-2.06043 ↓
ID191655	P06733	13806	ENO1	Enolase 1	181	1.72611 ↑
ID191668	P60709	60	ACTB	Actin beta	70	-1.85853 ↓
ID191682	P20042	8894	EIF2S2	Eukaryotic translation initiation factor 2	138	1.92025 ↑
ID191828	P35232	5245	PHB	Prohibitin	80	-1.74416 ↓
ID192296	P02545	4000	LMNA	Lamin A/C	171	1.75262 ↑
ID192421	Q14847	3927	LASP1	LIM and SH3 protein 1	115	2.04427 ↑
ID192444	Q99439	1265	CNN2	Calponin 2	114	1.97376 ↑
ID192472	Q15056	7458	EIF4H	Eukaryotic translation initiation factor 4H	93	1.92456 ↑
ID192515	P61758	7411	VBP1	Prefoldin subunit 3 (Von Hippel-Lindau-binding protein 1)	83	1.75573 ↑
ID192519	Q8WW12	57092	PCNP	PEST proteolytic signal containing nuclear protein	101	1.87851 ↑
ID193488	P35527	3857	KRT9	Cytokeratin 9	82	1.82506 ↑
ID193657	Q92945	8570	KHSRP	KH-type splicing regulatory protein	312	2.13218 ↑
ID197887	P49821	4723	NDUFV1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 1, 51kDa	122	1.70157 ↑
ID209123	P20042	8894	EIF2S2	Eukaryotic translation initiation factor 2	116	2.2445 ↑

¹: interne ID-Nummer

²: UniProt Zugriffsnummer

³: NCBI gene ID Nummer

⁴: Protein-Scores größer 66 gelten als signifikant ($p < 0.05$)

Tabelle 13: Identifizierte Proteine mit einer veränderten Expression ($\geq \pm 1.7$ gegen Kontrolle) nach Exposition gegen CB+B[a]P (n=10).

ID ¹	Accession No. ²	Gene ID ³	Gene name	Protein name	MOWSE Score ⁴	Regulation
ID191127	P21399	48	ACO1	Aconitase	205	1.9726 ↑
ID191261	P49915	8833	GMPS	Guanine monophosphate synthetase	127	1.77018 ↑
ID191366	Q14195	1809	DPYSL3	Dihydropyrimidinase-like 3	208	1.88206 ↑
ID191367	P26368	11338	U2AF2	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 2	88	2.064 ↑
ID191389	Q9ULV4	23603	CORO1C	Coronin, actin binding protein, 1C	91	2.82933 ↑
ID191554	P35241	5962	RDX	Radixin	121	-1.74079 ↓
ID191658	P50213	3419	IDH3A	Isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha	145	-1.7244 ↓
ID192295	P11413	2539	G6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	210	1.76415 ↑
ID192298	O43175	26227	PHGDH	Phosphoglycerate dehydrogenase	126	2.66408 ↑
ID192359	P16930	2184	FAH	Fumarylacetoacetate hydrolase	122	2.19932 ↑
ID192372	P62195	5705	PSMC5	PSMC5 proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 5	179	1.92687 ↑
ID192407	P06733	13806	ENO1	Enolase 1	177	-1.87082 ↓
ID192421	Q14847	3927	LASP1	LIM and SH3 protein 1	120	1.76282 ↑
ID192560	P08686	1589	CYP21A2	Cytochrome P450, family 21, subfamily A, polypeptide 2	94	1.70715 ↑
ID192561	P02545	4000	LMNA	Lamin A/C	150	1.9661 ↑
ID198197	Q9UNZ2	55968	NSFL1C	NSFL1 (p97) cofactor (p47)	155	-1.86113 ↓
ID204400	Q15149	5339	PLEC1	Plectin	85	2.14985 ↑
ID204534	Q14315	2318	FLNC	Filamin C, gamma	66	1.75687 ↑

¹: interne ID-Nummer²: UniProt Zugriffsnummer³: NCBI gene ID Nummer⁴: Protein-Scores größer 66 gelten als signifikant (p <0.05)

Tabelle 14: Mit Methanol extrahierbare Metaboliten mit veränderter Konzentration nach 14-tägiger Exposition gegen Nanopartikel (CB bzw. CB+B[a]P) (n=4).

Retention time	Ratio CB/Control	Ratio CB+B[a]P/Control	Metabolite	Chemical class	Purity	Comment
6.43 min	-2.33	-4.32	1,1-Diethoxynonane ¹		0.60	
8.00 min	3.29	1.96	Flavan-4-ol acetate ¹	Flavone-derived alcohols	0.62	
8.19 min	-4.37	-1.24	Pyruvic acid	Organic acid	0.26	
8.64 min	4.96	3.69	Lactic acid	Organic acid	1.00	
9.12 min	2.12	-2.69	Glycolic acid ¹	Organic acid	0.8	
10.48 min	-1.29	-∞	n-Butylacetamide ¹	Organic compound	0.78	Not detected in CB+ cell extracts
10.60 min	-2.54	-1.70	Glycine	Amino acid	0.80	
11.43 min	-1.37	2.56	Ethanolamine	Amino alcohol	0.80	
12.74 min	-1.43	-1.66	beta-Alanine	Amino acid	0.85	
14.08 min	-1.52	-1.44	Benzoic acid	Organic acid	0.35	
15.29 min	3.02	10.23	Glycerol	Alcohol	0.7	
17.02 min	-1.68	-2.81	Nonanoic acid	Fatty acid	0.35	
17.13 min	-1.32	-2.62	Uracil	Pyrimidine	0.38	
17.80 min	-1.14	1.57	unknown			
18.59 min	-2.32	-1.75	Aspartic acid	Amino acid	0.40	
19.48 min	-1.12	-2.50	2-(2-Hydroxyphenyl)-4-phenyl-5,6 dihydro[h]quinazoline	Organic compound	0.79	
19.74 min	-1.32	-1.75	threo-3-OH-Aspartatic acid	Derivate of aspartic acid (amino acid)	0.44	
21.04 min	-2.16	-1.14	Phenylalanine	Amino acid	0.19	
21.75 min	3.98	3.58	Citric acid tributyl ester ¹	Organic acid	0.69	
23.79 min	1.58	1.92	Pyrophosphate	Inorganic compound	0.30	
24.06 min	5.46	7.49	threo-β-Hydroxyaspartatic acid	Derivate of aspartic acid (amino acid)	0.52	
24.31 min	1.32	-1.78	Hexandioic acid ¹	Organic acid	0.64	
29.71 min	1.65	1.36	Viburnitol (Quercitol, 5-Deoxyinositol)	Sugar derivate	0.64	
30.75 min	-1.70	-2.51	MYO-Inositol ¹	Sugar phosphate	0.77	
31.22 min	-∞	-∞	Unknown			Not detected in CB and CB+ cell extracts
31.34 min	-1.14	-1.80	Octadecan-1-ol	Alcohol	0.19	

Retention time	Ratio CB/Control	Ratio CB+B[a]P/Control	Metabolite	Chemical class	Purity	Comment
32.33 min	2.77	1.55	Octadecadienoic acid	Fatty acid	0.22	
32.36 min	-1.57	-2.17	9-(Z)-Octadecanoic acid	Fatty acid	1.00	
34.05 min	-1.64	-1.44	Ribose-5-phosphate ¹	Sugar phosphate	0.57	
34.16 min	∞	∞	Unknown			Not detected in control cell extracts
35.77 min	-2.32	-1.01	Sorbitol-6-phosphate ¹	Alcohol phosphate	0.65	
36.86 min	∞	∞	Bis(2-ethylhexyl)phthalate ¹	Organic compound	0.96	Not detected in control cell extracts
40.76 min	-1.34	-1.55	Arabinose-5-phosphate ¹	Sugar phosphate	0.72	
41.01 min	∞	∞	Unknown			Not detected in control cell extracts
42.99 min	2.11	2.41	rac-Glycerol 3-phosphoric acid ¹	Organic phosphate	0.645	
43.19 min	∞	∞	2-Acetamido-1,3-bis(TMS)-4-octadecene ¹	Amino alcohol	0.64	Not detected in control cell extracts
48.50 min	47.28	62.98	Aldosterone ¹	Steroid	0.47	

¹: identifiziert mithilfe der Datenbank massbank.jp

Tabelle 15: Mit MTBE/Hexan extrahierbare Metaboliten mit veränderter Konzentration nach 14-tägiger Exposition gegen Nanopartikel (CB bzw. CB+B[a]P) (n=4).

Retention time	Ratio CB/Control	Ratio CB+B[a]P/Control	Metabolite	Chemical class	Purity	Comment
7.46 min	1.52	1.49	2-OH-Pyridine	Organic compound	0.7	
10.35 min	1.07	- ∞	Deoxyinosine ¹	Nucleoside derivate	0.34	Not detected in CB+ cell extracts
12.64 min	1.78	-1.42	Estrone ¹	Steroid	0.35	
14.62 min	1.77	1.70	Arginine ¹	Amino acid	0.57	
15.76 min	3.80	3.64	Proline ¹	Amino acid	0.53	
24.40 min	1.88	2.05	Tetradecanoic acid methyl ester (Myristic acid)	Fatty acid	1.00	
27.52 min	2.37	2.08	n-9(Z)-Hexadecanoic acid methyl ester (Palmitic acid)	Fatty acid	0.97	
27.87 min	1.67	1.65	Hexadecanoic acid methyl ester (Palmitic acid)	Fatty acid	0.95	
28.66 min	1.98	1.58	Thymine ¹	Pyrimidine	0.47	
29.85 min	1.50	2.34	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	Fatty acid	0.82	
30.64 min	1.68	1.52	n-9(Z)-Octadecanoic acid methyl ester (Stearic acid)	Fatty acid	0.96	
31.03 min	1.78	1.62	Octadecanoic acid methyl ester (Stearic acid)	Fatty acid	0.94	
31.74 min	1.93	1.38	Phytol ¹	Alcohol	0.38	
32.79 min	1.76	2.29	Octadecanoic acid (Stearic acid)	Fatty acid	0.83	
37.57 min	- ∞	-1.16	Unknown			Not detected in CB cell extracts
39.10 min	2.42	1.91	Tetracosanoic acid methyl ester (Lignoceric acid)	Fatty acid	0.74	
41.43 min	1.66	1.22	Hexacosanoic acid methyl ester (Cerotic acid)	Fatty acid	0.67	
43.61 min	3.69	1.69	Sucrose ¹	Sugar	0.22	
43.97 min	1.55	1.73	Cholesterol	Steroid	1.00	

¹: identifiziert mithilfe der Datenbank massbank.jp

8.2.2 Entwicklung eines Verfahrens zur Extraktion phosphorylierter Proteine

Tabelle 16: In menschlichem Lebergewebe nachgewiesene Phosphoproteine [100].

Band ^a	Protein name	Accession ^b	Gene	# Phosphorylation site	Phosphorylated amino acids
1	Clathrin heavy chain 1 isoform 4	Q00610	CLTC	6	S, T, Y
2	Carbamoyl-phosphate synthase, mitochondrial	P31327	CPS1	1	S
3	Pyruvate carboxylase, mitochondrial	P11498	PC	1	Y
4	10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	O75891	ALDH1L1	1	T
5	Serum albumin	P02768	ALB	8	S, T, Y
6	Liver carboxylesterase 1	P23141	CES1	none ^{c)}	
7	Tubulin, beta	P07437	TUBB	5	S, T, Y
8	Actin, cytoplasmic 1	P60709	ACTB	7	T, Y
9	Annexin A5	P08758	ANXA5	1	Y
10	Apolipoprotein A-I	P02647	APOA1	1	S
11	Hemoglobin beta	P68871	HBB	1	Y

a) Proteinbanden wurden nach dem Zufallsprinzip auf dem 1D-Gel humaner Leberproben ausgewählt, Abbildung 27

b) UniProt Zugriffsnummer

c) keine Phosphorylierung in UniProt beschrieben, Glykoprotein

S) Serin

T) Threonin

Y) Tyrosin

Tabelle 17: In Schweine-Urothelzellen nachgewiesene Phosphoproteine.

(Quelle: Pink et al. [100])

Protein name	Accession Number ^{a)}	Gene name	# Phosphorylation sites	Phosphorylated amino acids
Filamin-B	O75369	FLNB	18	S, T, Y
14-3-3 protein zeta/delta	P63104	YWHAZ	5	S, T
Tropomyosin alpha-3 chain isoform 2	P06753	TPM3	3	S, T, Y
Actin, cytoplasmic 1	Q6QAAQ1	ACTB	8	T, Y
Annexin A5-like, partial	P08758	ANXA5	1	Y
NADH-cytochrome b5 reductase 3-like	P83686	CYB5R3	2	S, T, Y
Annexin A2	P19620	ANXA2	11	S, T, Y
Keratin, type II cytoskeletal 8	P05787	KRT8	33	S, T, Y
NADPH--cytochrome P450 reductase	P04175	POR	1	Y
Importin subunit beta-1-like	Q14974	KPNB1	1	S
Alpha-actinin-4-like	O43707	ACTN4	1	Y
Ras-related protein Rab-11A	Q52NJ1	RAB11A	none ^{b)}	
Clathrin heavy chain 1	Q00610	CLTC	6	S, T, Y
Cytochrome b5	P83686	CYB5R3	2	Y
Calpain small subunit 1	P04574	CAPNS1	none ^{c)}	
Oral-facial-digital syndrome 1 protein-like	O75665	OFD1	2	S
Stathmin isoform a	P16949	STMN1	7	S
Zinc finger protein 526-like	Q8TF50	ZNF526	none ^{c)}	
Uncharacterized protein C6orf125 homolog	Q9CQY6	CF125	none ^{c)}	
Tropomyosin 3	P06753	TPM3	3	S, T, Y
Enhancer of rudimentary homolog	P80230	ERH	none ^{b)}	
Serine/arginine-rich splicing factor 3	P84103	SRSF3	9	S

Protein name	Accession Number ^{a)}	Gene name	# Phosphorylation sites	Phosphorylated amino acids
Annexin A5-like, partial	P08758	ANXA5	1	Y
Serine/arginine-rich splicing factor 1 isoform 1	Q3YLA6	SRSF1	10	S, Y
Calumenin isoform 1	O43852	CALU	3	S, T
Vimentin-like	P02543	VIM	31	S, T, Y
Calreticulin	P28491	CALR	none ^{b), d)}	
78 kDa glucose-regulated protein	P34935	HSPA5	1	Y
Vinculin	P26234	VCL	9	S, T, Y
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	P31943	HNRNPH1	8	S, T, Y

a) UniProt Zugriffsnummer

b) Acetylierung

c) keine PTM in UniProt beschrieben

d) Glycoprotein

S) Serin

T) Threonin

Y) Tyrosin

8.2.3 Untersuchung des Phosphoproteoms und zellulären Angiogenesemarker nach Exposition gegen Dieselrußsurrogate

Tabelle 18: Phosphoproteine mit veränderter Expression ($\geq \pm 1.5$ gegen Kontrolle) nach Exposition gegen CB (n=6).

ID ¹	Accession No. ²	Gene ID ³	Gene name	Protein name	MOWSE Score ⁴	Regulation	Molecular function
ID204	Q6FI81	57019	CIAPIN1	Anamorsin	104	↑	
ID237	P55210	840	CASP7	Mature Caspase-7	81	↑	Catalytic activity
ID251	P12429	306	ANXA3	Annexin A3	112	↑	RNA / DNA binding
ID2705	P02751	2335	FN1	Fibronectin	44	↑	
ID325	P09211	2950	GSTP1	Glutathione S-transferase P1c	136	↑	Catalytic activity
ID413	Q969H8	56005	C19orf10	R33729_1; UPF0556 protein C19orf10	68	↑	
ID44	P23229	3655	ITGA6	Integrin alpha6	72	↑	
ID495	P31942	3189	HNRNPH3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	145	↑	RNA / DNA binding
ID63	Q14195	1809	DPYSL3	Dihydropyrimidinase-related protein 3 isoform 1	194	↑	Catalytic activity
ID6465	Q96SB4	6732	SRPK1	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	105	↑	Catalytic activity
ID151	O96019	86	ACTL6A	Actin-like protein 6A	74	↓	Structural molecule activity
ID166	P05783	3875	Krt18	Cytokeratin 18 (424 AA)	128	↓	Structural molecule activity
ID172	P05783	3875	Krt18	Cytokeratin 18 (424 AA)	155	↓	Structural molecule activity
ID184	P60709	60	ACTB	Actin beta	157	↓	Structural molecule activity
ID21	Q14764	9961	MVP	Major vault protein	231	↓	RNA / DNA binding
ID2193	P09211	2950	GSTP1	Glutathione S-transferase P1c	104	↓	Catalytic activity
ID252	Q9HC38	51031	GLOD4	Glyoxalase	195	↓	Catalytic activity
ID286	P63244	10399	GNB2L1	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	170	↓	
ID395	P63241	1984	EIF5A	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	75	↓	
ID4284	P46108	1398	CRK	Adapter molecule crk isoform a	77	↓	
ID61	Q14195	1809	DPYSL3	Dihydropyrimidinase-related protein 3 isoform 1	204	↓	Catalytic activity
ID634	P13639	1938	EEF2	Elongation factor 2	69	↓	RNA / DNA binding

¹: interne ID-Nummer

²: UniProt Zugriffsnummer

³: NCBI gene ID Nummer

⁴: Protein-Scores größer 66 gelten als signifikant (p < 0.05)

Tabelle 19: Phosphoproteine mit veränderter Expression ($\geq \pm 1.5$ gegen Kontrolle) nach Exposition gegen CB+B[a]P (n=6).

ID ¹	Accession No. ²	Gene ID ³	Gene name	Protein name	MOWSE Score ⁴	Regulation	Molecular function
ID1141	P60709	60	ACTB	Actin beta	155	↑	Structural molecule activity
ID1168	P09382	3956	LGALS1	Galectin-1	44	↑	
ID122	P08729	3855	KRT7	Keratin 7	258	↑	Structural molecule activity
ID124	P08729	3855	KRT7	Keratin 7	188	↑	Structural molecule activity
ID1349	P67936	7171	TPM4	Tropomyosin alpha 4	149	↑	Structural molecule activity
ID1383	P08670	7431	VIM	Vimentin	335	↑	Structural molecule activity
ID1633	P47985	7386	UQCRCF1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1	80	↑	Catalytic activity
ID165	P08670	7431	VIM	Vimentin	82	↑	Structural molecule activity
ID168	P08670	7431	VIM	Vimentin	346	↑	Structural molecule activity
ID184	P60709	60	ACTB	Actin beta	204	↑	Structural molecule activity
ID204	Q6FI81	57019	CIAPIN1	Anamorsin	104	↑	
ID21	Q14764	9961	MVP	Major vault protein	187	↑	RNA / DNA binding
ID214	P46108	1398	CRK	Adapter molecule crk isoform a	121	↑	
ID252	Q9HC38	51031	GLOD4	Glyoxalase	66	↑	Catalytic activity
ID36	P34932	3308	HSPA4	Heat shock 70 kDa protein 4	98	↑	
ID409	P61088	7334	UBE2N	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	76	↑	
ID41	Q93052	4026	LPP	Lipoma-preferred partner	69	↑	Structural molecule activity
ID426	P35080	5217	PFN2	Profilin 2	137	↑	
ID46	Q92804	8148	TAF15	TATA-binding protein-associated factor 2N	119	↑	RNA / DNA binding
ID495	P31942	3189	HNRNPH3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	145	↑	RNA / DNA binding
ID6465	Q96SB4	6732	SRPK1	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	105	↑	Catalytic activity
ID725	O60701	7358	UGDH	UDP-glucose 6-dehydrogenase isoform 2	138	↑	Catalytic activity

ID ¹	Accession No. ²	Gene ID ³	Gene name	Protein name	MOWSE Score ⁴	Regulation	Molecular function
ID96	P61978	3190	HNRNPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	134	↑	RNA / DNA binding
ID1269	P40121	822	CAPG	Macrophage-capping protein isoform 9	61	↓	Structural molecule activity
ID13	Q14764	9961	MVP	Major vault protein	86	↓	RNA / DNA binding
ID139	P49189	223	ALDH9A1	4-Trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	121	↓	Catalytic activity
ID145	P17980	5702	PSMC3	26S protease regulatory subunit 6A	156	↓	Catalytic activity
ID150	Q8NEY1	89796	NAV1	Neuron navigator 1	69	↓	
ID1501	P05783	3875	KRT18	Cytokeratin 18	93	↓	Structural molecule activity
ID23	P55072	7415	VCP	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	204	↓	
ID417	P13645	3858	KRT10	Keratin 10	138	↓	Structural molecule activity
ID69	P31040	6389	SDHA	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	103	↓	Catalytic activity
ID99	P61978	3190	HNRNPK	Heterogenous nuclear ribonucleoprotein K	95	↓	RNA / DNA binding

¹: interne ID-Nummer

²: UniProt Zugriffsnummer

³: NCBI gene ID Nummer

⁴: Protein-Scores größer 66 gelten als signifikant (p <0.05)

8.3 Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
1,4-Dithiothreitol (DTT) Bromphenolblau Glycin Agarose Ammoniumperoxodisulfat (APS) Glycerin N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) Pharmalyt 3-10	Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland
Kalibrationsstandard (MALDI-ToF-MS)	Applied Biosystems, Foster City, USA
Acrylamid-Bis solution (30 % Acrylamid, 0,4 % Bis)	BioRad, München, Deutschland
Penicillin-Streptomycin Trypsin (Zellkultur)	C-C-Pro, Neustadt, Deutschland
Borax Kaliumdihydrogenphosphat Lanthanchlorid Toluidinblau	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Benzo[a]pyren (B[a]P)	Fluka, Buchs, Schweiz
Iodacetamid (IAA)	GE-Healthcare, München, Deutschland
<i>Phosphate-buffered saline</i> (PBS)	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
1-Butanol Coomassie brilliant blue G 250 Ethanol Hexan Methanol Methyl-tert-butylether (MTBE) Phosphorsäure 85 % Toluol Trifluoressigsäure (TFA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>Fetal calf serum</i> (FCS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
DryStrip Cover Fluid	Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden
Aluminiumsulfat 18 H ₂ O	Riedel de Haën, Seelze, Deutschland Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Complete™, Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	SERVA, Heidelberg, Deutschland

Chemikalie	Hersteller
Acetonitril Ammoniumbicarbonat Dimethylsulfoxid (DMSO) Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Natriumdodecylsulfat (SDS) Sucrose Thioharnstoff Trypsin (<i>proteomic grade</i>)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Tris(hydroxymethyl-)aminomethan (Tris)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland USB Corporation, Cleveland, USA
3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonat (CHAPS) Harnstoff	USB Corporation, Cleveland, USA

8.4 Publikationsliste

Referierte Publikationen

- 2012 Pink M, Stein C, Verma N, Rettenmeier AW, Schmitz-Spanke S. **Gel-based separation of phosphoproteins in samples stored in urea/thiourea after precipitation by lanthanum chloride**, Electrophoresis; in press
- Verma N, Pink M, Frank Petrat, Rettenmeier AW, Schmitz-Spanke S. **Exposure of primary porcine urothelial cells to benzo(a)pyrene: in vitro uptake, intracellular concentration, and biological response**. Arch Toxicol 2012.
- Verma N, Pink M, Rettenmeier AW, Schmitz-Spanke S. **Review on proteomic analyses of benzo(a)pyrene toxicity**. *Proteomics* 2012.
- 2011 Verma N, Bäuerlein C, Pink M, Rettenmeier AW, Schmitz-Spanke S. **Proteome and phosphoproteome of primary cultured pig urothelial cells**. *Electrophoresis* 2011; 32: 3600–3611.
- Meyer zu Hörste M, Ströher E, Berchner-Pfannschmidt U, Schmitz-Spanke S, Pink M, Göthert JR, Fischer JW, Gulbins E, Eckstein AK. **A novel mechanism involved in the pathogenesis of Graves ophthalmopathy (GO): clathrin is a possible targeting molecule for inhibiting local immune response in the orbit**. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 1727–1736.
- Pink M, Verma N, Polato F, Bonn GK, Baba HA, Rettenmeier AW, et al. **Precipitation by lanthanum ions: a straightforward approach to isolating phosphoproteins**. *J Proteomics* 2011; 75: 375–383;
- 2010 Pink M, Verma N, Rettenmeier AW, Schmitz-Spanke S. **CBB staining protocol with higher sensitivity and mass spectrometric compatibility**. *Electrophoresis* 2010; 31: 593–598.
- in Vorbereitung Pink M, Verma N, Rettenmeier AW, Schmitz-Spanke S. **Integrated proteomic and metabolomic analysis to assess the effects of carbon black nanoparticles on energy metabolism in the human endothelial cell line EA.hy926**.
- Pink M, Verma N, Rettenmeier AW, Schmitz-Spanke S. **Carbon Black modulates the phosphoproteome of endothelial cells, leading to an altered angiogenesis**.

Poster und Vorträge

Vorträge

- 2011 **Welchen Effekt haben Ultrafeinstäube im vaskulären System? Eine proteomische Studie an humanen Endothelzellen**
Mario Pink, Albert W. Rettenmeier, Simone Schmitz-Spanke
17. Workshop „Zell- und Gewebeschädigung: Mechanismen, Protektion und Therapie“ 2011, Xanten
- 2010 **Welchen Effekt haben Ultrafeinstäube im vaskulären System? Eine proteomische Studie an humanen Endothelzellen**
Mario Pink, Albert W. Rettenmeier, Simone Schmitz-Spanke
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V. 2010, Dortmund
- 2009 **Proteomische Analyse humaner Harnblasenkarzinomzellen (RT4) nach Benzo(a)pyren-Exposition**
Mario Pink, Albert W. Rettenmeier, Simone Schmitz-Spanke
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V. 2009, Aachen

Poster

- 2012 Pink M., Stein C., Rettenmeier A. W. , Schmitz-Spanke S.,
Phosphoproteomic analysis of endothelial cells after exposure to ultra-fine particles. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2012, 385 (1), 69-69,
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) e.V., Dresden
- Verma N., Pink M., Rettenmeier A. W., Schmitz-Spanke S., **Identification of protein complexes involved in calcium and iron homeostasis after TCDD exposure.** *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2012, 385 (1), pp 99-99,
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) e.V., Dresden
- Schmitz-Spanke S. , Pink M., Jeske E. , Stempelmann K. , Rehn S. , Verma N. , Rettenmeier A. W., **Protein Expression Changes in BaP-Exposed Human Bladder Cancer Cells from Spliceosome Activation Towards Redistribution of the Cytoskeleton After Long-Term Exposure to Subacute Concentration.** *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2012, 385 (1), 83-84,
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) e.V., Dresden
- Pink M., Rettenmeier AW, Schmitz-Spanke S., **Modulation der Angiogenese durch Ultrafeinstäube – Untersuchungen an endothelialen Zellen,**
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V. 2012, Göttingen

Poster

- Stein C, Pink M, Rettenmeier AW, Schmitz-Spanke S., **Welche phosphoproteomischen Veränderungen zeigen Ultrafeinstäube in endothelialen Zellen?**, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V. 2012, Göttingen
- 2011 Pink M, Rettenmeier AW, Grandoch M, Schmitz-Spanke S., **Benzo(a)pyren-belastetes Carbon Black steigert die Sekretion und Thrombogenität endothelialer Zellen**, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V. 2011, Heidelberg
- 2010 Pink M, Rettenmeier AW, Grandoch M, Schmitz-Spanke S., **What effects have ultrafine particle in the vascular system? A proteomic study on human endothelial cells**, Toxicol Lett, 2010, 196, S273-S273, XII International Congress of Toxicology, Congress of the International Union of Toxicology (IUTOX)

8.5 Lebenslauf

Name: Mario Pink

Geburtsdatum: 02.05.1983

Geburtsort: Lutherstadt Wittenberg

Staatsangehörigkeit: deutsch

8.6 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Charakterisierung der proteomischen, metabolomischen und funktionellen Reaktionen in endothelialen Zellen nach Langzeitexposition gegen Dieselrußsurrogate ”

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Essen, im November 2012

Mario Pink

8.7 Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt Prof. Rettenmeier und Dr. Schmitz-Spanke für die Bereitstellung dieses herausfordernden und überaus interessanten Promotionsthemas, ihren fachlichen Anregungen, der fachkundigen Anleitung, ihren Ermutigungen und konstruktiven Vorschlägen sowie für die gute Betreuung während der Promotion und den mir gewährten Freiräumen bei der Bearbeitung des Themas. Ich bin sehr dankbar für ihre allseits verfügbare Hilfe und Unterstützung, die zur erfolgreichen Durchführung dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank geht an meine Kollegin Nisha Verma für all die Hilfe, die gemeinsame Arbeit, stete Freundlichkeit und das exzellente Training der englischen Sprache während all der Debatten. Die Zeit im Labor wäre ohne sie nie so interessant, amüsant und spannend gewesen.

Mein herzlichster Dank gilt ebenso Fr. Stein für die erheiternde Zusammenarbeit im Labor und die Analyse der phosphorylierten Proteine.

Mein herzlichster Dank gilt ebenso den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe Fr. Jeske, Fr. Rehn, Fr. Stempelmann, Fr. Biermann und Hr. Diedrichs für die Kultivierung und Bereitstellung der Zellen nach meinen Wünschen, der technischen Unterstützung mit den „großen“ und „kleinen“ Geräten sowie des stets heiteren Arbeitsklimas.

Darüber hinaus gilt mein Dank Dr. Petrat, Mitarbeiter im Institut für Physiologische Chemie, für die freundliche Betreuung und der fachkundige Anleitung während der Arbeit am konfokalen Lasermikroskop.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie für all die Unterstützung, die unter anderem auch zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.