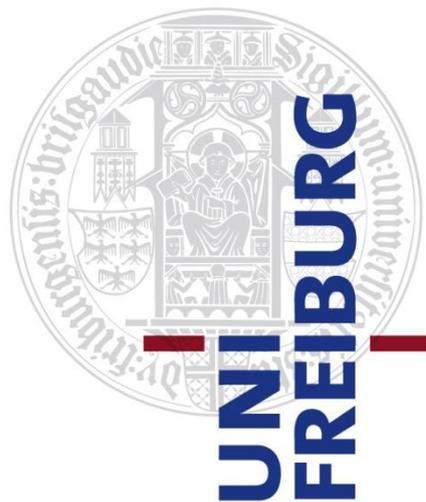


Feinstaub aus der Biomasseverbrennung und seine
Effekte auf das Transkriptom und Methylole
von
Bronchialepithelzellen und biologische Effekte auf
humane Makrophagen



INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau

vorgelegt von
Katharina Heßelbach
aus Hildburghausen

2018

Vorsitzender des Promotionsausschusses: Prof. Dr. Stefan Weber

Referentin: Prof. Dr. Irmgard Merfort

Korreferentin: Prof. Dr. Regine Süß

Drittprüfer: Prof. Dr. Stefan Günther

Datum der Promotion: 20.04.2018

Publikationen zur Arbeit

Katharina Heßelbach*, Gwang-Jin Kim*, Stephan Flemming, Thomas Häupl, Regina Dornhof, Stefan Günther, Irmgard Merfort#, Matjaz Humar#:

Disease relevant modifications of the methylome and transcriptome by particulate matter (PM2.5) from biomass combustion.

Epigenetics, **12**, 779–792 (2017)

* These authors contributed equally to this work; # both corresponding authors

Désirée Popadić*, Katharina Heßelbach*, Sigrid Richter-Brockmann, Gwang-Jin Kim, Stephan Flemming, Wolfgang Schmidt-Heck, Thomas Häupl, Marc Bonin, Regina Dornhof, Christine Achten, Stefan Günther, Matjaz Humar#, Irmgard Merfort#:

Gene expression profiling of human bronchial epithelial cells exposed to fine particulate matter (PM2.5) from biomass combustion.

Toxicology and Applied Pharmacology, Manuskript in Revision

* These authors contributed equally to this work, # both corresponding authors

Katharina Heßelbach, Regina Dornhof, Maximilian Seidl, Matjaz Humar#, Irmgard Merfort#:

Short-term exposure of PM2.5 induces a stress response in THP-1 macrophages.

Manuskript in Vorbereitung

both corresponding authors

Regina Dornhof, Anastasiya Osipova, Katharina Heßelbach, Irmgard Merfort#, Matjaz Humar#:

Extended exposure to PM2.5 from biomass combustion promotes cellular cytoprotective mechanisms and chemoresistance in bronchial epithelial BEAS-2B cells.

Manuskript in Vorbereitung,

both corresponding authors

Kurzvorträge

R. Dornhof*, K. Heßelbach*, M. Humar, I. Merfort:

Investigation on Biological Effects of Particle Emissions from Biomass Combustion.

Biocombust Projekttreffen, Max-Planck-Institut für Chemie, Mainz, 08.07.2014

* gemeinsamer Vortrag

R. Dornhof, K. Heßelbach, M. Humar, I. Merfort:

Investigation on Biological Effects of Particle Emissions from Biomass Combustion.

Biocombust Projekttreffen, Université de Haute-Alsace, Mulhouse (Frankreich), 06.03.2014

* gemeinsamer Vortrag

Posterbeiträge

K. Heßelbach; G.-J. Kim; S. Flemming; R. Dornhof; T. Häupl; S. Günther; I. Merfort; M. Humar:

Genome-wide DNA methylation profile of genes related to lung diseases by PM_{2.5} from biomass combustion.

2nd German Pharm-Tox Summit, 83rd Annual Meeting of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology (DGPT), 19th Annual Meeting of the Association of Clinical Pharmacology (VKliPha) with contribution of the AGAH, Heidelberg, 07.03.2017

K. Heßelbach; G.-J. Kim; S. Flemming; R. Dornhof; T. Häupl; S. Günther; I. Merfort; M. Humar:

Particulate matter (PM_{2.5}) from biomass combustion alters the methylation profile of genes related to cancer.

DPHG Jahrestagung, München, 05.10.2016

K. Heßelbach, G.-J. Kim, S. Flemming, R. Dornhof, T. Häupl, S. Günther, I. Merfort:

Effect of particulate matter (PM_{2.5}) from biomass combustion on genome-wide DNA methylation.

Tag der Forschung, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg,
08.07.2016

K. Heßelbach, R. Dornhof, C. Maschowski, R. Gieré, M. Humar, I. Merfort:

PM2.5 from biomass combustion induces stress related and antioxidant proteins in THP-1 macrophages.

25th Goldschmidt Konferenz, Prag (Tschechien), 17 - 21.08.2015

K. Heßelbach, R. Dornhof, C. Maschowski, R. Gieré, M. Humar, I. Merfort:

Influence of biomass combustion particles on stress related and antioxidant proteins in THP-1 macrophages.

Tag der Forschung 2015, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg,
03.07.2015

K. Heßelbach, R. Dornhof, M. Humar, I. Merfort:

Stressantwort in THP-1 Makrophagen durch Feinstaub (PM2.5) aus der Biomasseverbrennung.

(Réponse de stress dans les macrophages THP-1 par les particules fines (PM2.5) issues de la combustion de biomasse.)

Biocombust Abschlusskonferenz, Strasbourg (Frankreich), 23.04.2015

K. Heßelbach, R. Dornhof, R. Musacco Sebio, M. Humar, I. Merfort:

Particulate matter <2.5 µm from biomass combustion induces a stress response in differentiated THP-1 macrophages.

Biocombust Minikonferenz, Freiburg, 26.11.2014

Koautor bei Posterbeiträgen

R. Dornhof, K. Heßelbach, M. Humar, I. Merfort:

Long-term exposure to PM2.5 from biomass combustion in vitro induces stress proteins and reduced metabolism in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B).

25th Goldschmidt Konferenz, Prag (Tschechien), 17 - 21.08.2015

R. Dornhof, K. Heßelbach, M. Humar, I. Merfort:

Einfluss von Partikel-Emissionen aus der Biomasse-Verbrennung auf Entzündungsmarker und den Zellmetabolismus nach Kurz- und Langzeitexposition in unterschiedlichen Lungen-Zell-Modellen.

(Influence des émissions de particules de combustion de la biomasse sur les marqueurs inflammatoires et sur le métabolisme cellulaire après une exposition de courtes et de longues durées dans différents modèles de cellules pulmonaires.)

Biocombust Abschlusskonferenz, Strasbourg (Frankreich), 23.04.2015

R. Dornhof, K. Heßelbach, M. Humar, I. Merfort:

Long-term exposure to biomass combustion particles damages human bronchial epithelial cells (BEAS-2B)

Tag der Forschung 2015, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg, 03.07.201

R. Dornhof, K. Heßelbach, N. Kösel, B. Schuler, M. Könczöl, M. Humar, Irmgard Merfort:

Effect of particulate matter <2.5 µm from biomass combustion on inflammation and proliferation in lung cell model systems.

Biocombust Minikonferenz, Freiburg, 26.11.2014

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	15
2	Einleitung	18
2.1	Feinstaub aus der Biomasseverbrennung – Einflüsse auf Umwelt und Gesundheit.....	18
2.1.1	Ursachen der Feinstaubentstehung und globale Belastung.....	18
2.1.2	PM _{2.5} assoziierte Erkrankungen	20
2.1.3	Einfluss der Eigenschaften von Feinstaubpartikel auf die Toxizität.....	24
2.2	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe – PAK.....	25
2.2.1	Nomenklatur der PAK	25
2.2.2	PAK Emission in der Biomasseverbrennung.....	28
2.2.3	PAKs und assoziierte gesundheitliche Aspekte	33
2.2.4	Metabolismus der PAKs und PAKs als Biomarker.....	36
2.3	Transkriptionsfaktoren involviert in PM- und PAK-Exposition	41
2.3.1	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor – AhR.....	41
2.3.2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 – Nrf-2	45
2.3.3	Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 – HIF-1	48
2.4	Zielsetzung	52
3	Ergebnisse	54
3.1	Kurzzeitige biologische Effekte von Feinstaub aus der Biomasseverbrennung in humanen Makrophagen	54
3.1.1	Einfluss von PM _{2.5} auf die ROS Produktion und Zellviabilität von THP-1 Makrophagen.....	54
3.1.2	Einfluss von PM _{2.5} auf die CYP1A1 Genexpression	56
3.1.3	Einfluss von PM _{2.5} auf die metabolische Aktivität von THP-1 Makrophagen.....	57
3.1.4	Einfluss von PM _{2.5} auf die Aktivität von MAPK und der Proteinkinase B	58
3.1.5	Einfluss von PM _{2.5} auf die nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors Nrf-2 und dessen transkriptionelle Aktivität	60
3.1.6	Einfluss von PM _{2.5} auf den zellulären Glutathiongehalt und die Glutathionreduktase	62
3.1.7	Einfluss von PM _{2.5} auf die Hämoxygenase.....	64

3.1.8	Ultrastrukturanalyse und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von PM _{2.5} exponierten THP-1 Makrophagen.....	66
3.2	Effekte von Feinstaub (PM _{2.5}) aus der Biomasseverbrennung auf die globale Genexpression von humanen Bronchialepithelzellen	69
3.2.1	Charakterisierung des PAK-Profiles des verwendeten PM _{2.5}	69
3.2.2	Transkriptom von PM _{2.5} exponierten BEAS-2B	70
3.2.3	Induktion der Transkriptionsfaktoren AhR und HIF-1	73
3.2.4	Veränderungen der PM _{2.5} beeinflussten Genexpression durch dsRNA.....	79
3.2.5	Zusammenhang zwischen PM _{2.5} und PM _{2.5} + dsRNA induzierten hochregulierten Genen und Lungenerkrankungen	81
3.3	Einfluss von Feinstaub (PM _{2.5}) aus der Biomasseverbrennung auf das globale DNA-Methylierungs-Profil von humanen Bronchialepithelzellen	85
3.3.1	Methylom von PM _{2.5} exponierten BEAS-2B	85
3.3.2	Funktionelle Gruppierung von differentiell methylierten Genen	88
3.3.3	Einfluss des veränderten Methylierungs-Profiles auf die Genexpression	92
3.3.4	Zusammenhang zwischen durch PM _{2.5} beeinflusstem Methylom, Transkriptom und Erkrankungen	95
4	Diskussion	99
4.1	Kurzzeitige biologische Effekte von Feinstaub aus der Biomasseverbrennung in humanen Makrophagen	99
4.1.1	Einfluss von PM _{2.5} auf die Zellviabilität und die metabolische Aktivität von THP-1 Makrophagen.....	99
4.1.2	Einfluss von PM _{2.5} auf die Aktivierung verschiedener Kinasen sowie auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf-2 in THP-1 Makrophagen	103
4.1.3	PM _{2.5} vermittelte antioxidative Stressantwort via Nrf-2 in THP-1 Makrophagen	105
4.1.4	Aufnahme von PM _{2.5} in THP-1 Makrophagen und morphologische Veränderungen	107
4.2	Effekte von Feinstaub aus der Biomasseverbrennung auf die globale Genexpression von humanen Bronchialepithelzellen	110
4.2.1	PAKs des untersuchen PM _{2.5}	110
4.2.2	Beeinflussung der Transkriptionsfaktoren AhR und HIF-1 in langzeitexponierten BEAS-2B	112
4.2.3	Einfluss von dsRNA auf das Transkriptom von PM _{2.5} exponierten BEAS-2B und der Zusammenhang mit Lungenerkrankungen	114
4.3	Einfluss von Feinstaub aus der Biomasseverbrennung auf das globale DNA-Methylierungs-Profil von humanen Bronchialepithelzellen.....	116

4.3.1	Das Methylom von PM _{2.5} exponierten BEAS-2B.....	116
4.3.2	Zusammenhang zwischen Methylom und Transkriptom	117
4.3.3	Lungenerkrankungen die im Zusammenhang mit dem Methylom und Transkriptom von PM _{2.5} exponierten BEAS-2B stehen	118
5	Material und Methoden	120
5.1	Material.....	120
5.1.1	Chemikalien, Reagenzien und Zelllinien.....	120
5.1.2	Inhibitoren und Reagenzien-Kits	122
5.1.3	Verbrauchsmaterialien	123
5.1.4	Geräte	124
5.1.5	Software und Datenbanken	126
5.1.6	Lösungen und Puffer	127
5.1.7	Feinstaub	127
5.2	Methoden	129
5.2.1	Zellkultur.....	129
5.2.1.1	Verwendete Zelllinien.....	129
5.2.1.2	Subkultivierung der Zellen	130
5.2.1.3	Bestimmung der Zellkonzentration	131
5.2.1.4	Kryokonservierung von Zellen.....	131
5.2.1.5	Auftauen von Zellen	132
5.2.1.6	Ausplattieren der Zellen	132
5.2.1.7	Herstellung von Partikelkonzentrationen und Stimulation der Zellen mit Feinstaubpartikeln.....	134
5.2.1.8	Langzeitexposition von BEAS-2B	134
5.2.2	Proteinextrakte	135
5.2.2.1	Gesamtextrikte	135
5.2.2.2	Kernextrakte.....	136
5.2.3	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	137
5.2.3.1	BCA-Assay.....	137
5.2.3.2	Bradford-Assay	138
5.2.4	Western Blot-Analysen	139
5.2.4.1	SDS-PAGE	139

5.2.4.2	Transfer der Proteine	141
5.2.4.3	Blockieren, Waschen und Inkubation mit Antikörpern	143
5.2.4.4	Detektion der Proteine mit Chemilumineszenz	144
5.2.4.5	Strippen von Membranen	145
5.2.4.6	Aktivieren von Membranen	145
5.2.5	SAPK/JNK-Aktivitäts-Assay	146
5.2.6	Caspase-3/7-Aktivitäts Assay	147
5.2.7	MTT-Assay	148
5.2.8	LDH-Assay	150
5.2.9	Bestimmung des zellulären GSH-Gehalts	152
5.2.10	ARE Luciferase Assay	153
5.2.11	Fluoreszenzmikroskopie	155
5.2.12	Transmissionselektronenmikroskopie – TEM	156
5.2.13	Genexpressionsanalysen	157
5.2.13.1	RNA-Isolation	157
5.2.13.2	RNA-Gehaltsbestimmung	158
5.2.13.3	cDNA-Generierung	159
5.2.13.4	Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)	159
5.2.14	Microarray-Analysen	164
5.2.14.1	Methylom-Analyse	164
5.2.14.2	Transkriptom-Analyse	164
5.2.15	Statistische Auswertung	165
6	Literaturverzeichnis	166
7	Anhang.....	192
8	Abkürzungsverzeichnis.....	222
9	Abbildungsverzeichnis	228
10	Tabellenverzeichnis	230
11	Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
12	Danksagung.....	232

1 Zusammenfassung

Weltweit wird Biomasse in Form von Holz als Energiequelle zum Heizen oder Kochen verwendet. Besonders in den Industrieländern der westlichen Welt gewinnt diese CO₂-neutrale Energiequelle als Rohstoff zum Heizen zunehmend an Bedeutung. Bei der Verbrennung von Holz kommt es jedoch auch zur Freisetzung von Feinstaub (PM) in die Umgebungsluft. Dabei wird in den letzten Jahren vor allem Feinstaub zunehmend mit der Entstehung verschiedener Lungenerkrankungen, wie Asthma, COPD oder Infektionen der Atemwege, kardiovaskulären Erkrankungen sowie mit Krebs in Verbindung gebracht. Die biologischen Reaktionen, die der Entstehung dieser Erkrankungen zugrunde liegen, wurden bisher noch nicht hinreichend aufgeklärt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die molekularen Auswirkungen einer PM-Exposition zu untersuchen, sowohl nach kurzzeitiger Exposition von humanen Makrophagen (THP-1) als auch nach längerer Exposition von humanen Bronchialepithelzellen (BEAS-2B).

Der für diese Analysen verwendete Feinstaub stammt aus einem Biomassekraftwerk, in dem hauptsächlich Holzhackschnitzel von Weichhölzern des umliegenden Schwarzwaldes verbrannt wurden. Von dem dabei anfallendem Feinstaub wurde die alveolargängige Fraktion (PM_{2.5}) untersucht. Bekannt war bereits ein hoher Anteil an Kalium und sehr geringe Mengen an Übergangsmetallen. In Kooperation konnte die Kenntnis der Zusammensetzung um das Vorliegen von relativ geringen Mengen an gesundheitsbedenklichen polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen erweitert werden.

Die kurzzeitige Exposition von THP-1 Makrophagen mit PM_{2.5} führte zu einer signifikant erhöhten Produktion von ROS, die jedoch keine zytotoxischen Auswirkungen hatten, da diese weder zu Nekrose noch zu Apoptose führten. Die Exposition mit PM_{2.5} hatte dennoch einen Einfluss auf die Zellviabilität, da eine Verminderung der metabolischen Aktivität sowie die Aktivierung der AMPK als auch die Inhibition der bei der Translation wichtigen Elongationsfaktors eEF2 beobachtet werden konnte. Der durch PM_{2.5} vermittelte oxidative Stress führte zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen p38, JNK und ERK sowie zur Aktivierung von Akt. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass es zur nukleären Translokation und zur Aktivierung des stressinduzierten Transkriptionsfaktors Nrf-2 kam, was durch die MAP-Kinase JNK vermittelt wurde. Die Aktivierung von Nrf-2 induzierte zudem die Bildung des antioxidativen und antiinflammatorischen Proteins HO-1. Als zusätzliche Antwort auf den durch PM_{2.5} vermittelten oxidativen Stress wurde beobachtet, dass es zu einer moderaten Reduktion der GSSG-Konzentration mit einhergehender leichten Erhöhung der GSH-Konzentration kam, was vermutlich durch die Induktion der GSR verursacht wurde, da der

Gesamtgehalt an GSH gleich blieb. Zusätzlich konnte mittels TEM Analysen nachgewiesen werden, dass die PM_{2.5} Exposition zur Stimulation von THP-1 Makrophagen führte, da es zur Ausbildung vermehrter Protrusionen kam, was vermutlich zur phagozytotischen Aufnahme von PM_{2.5} führte. In den Zellen lagen die Partikel hauptsächlich in membrangebundenen Vesikeln vor, die teilweise bereits Rupturen der Membran aufwiesen, was u. a. die Freisetzung des PM_{2.5} ins Zytosol begünstigt. Zudem konnte auch die Ausscheidung von PM_{2.5}, vermutlich durch Exozytose aus den Zellen beobachtet werden. Darüber hinaus wurde auch die direkte Interaktion von PM_{2.5} mit Mitochondrien nachgewiesen sowie deren Schädigung, die sich als Schwellung und Zerstörung der Cristae äußerte.

Da die Exposition mit PM_{2.5} aus der Biomasse in vielen Regionen oft eine chronische Belastung ist, wurden BEAS-2B für längere Zeit mit PM_{2.5} exponiert und die Auswirkungen auf die globale Genexpression untersucht. Die Veränderungen auf das Transkriptom PM_{2.5} exponierter BEAS-2B wurden mit dem Affymetrix GeneChip® Human Genome HG-U133 Plus 2.0 oligonucleotide Microarray untersucht. Die Verifizierung der Daten erfolgte mittels qRT-PCR für einige ausgewählte Gene. Bioinformatische Analysen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe der pharmazeutischen Bioinformatik durchgeführt und ergaben 175 differenziell exprimierte Gene nach Exposition mit PM_{2.5}. Die Durchführung einer Gen-Ontologie (GO) Analyse zeigte, dass diese Gene vor allem in verschiedenen zellulären Prozessen, wie zellulärer Entwicklung, Metabolismus, Entzündung und Krebs, eine Rolle spielen. Die in Kooperation durchgeführte Analyse potentieller Transkriptionsfaktoren lieferte den Hinweis, dass AhR und HIF-1 eine Rolle in der PM_{2.5} induzierten Genexpression spielen. Mittels qRT-PCR konnte für die Gene *CYP1A1*, *EREG*, *GREM1*, *IL1B* und *IL6* nachgewiesen werden, dass der AhR und PAKs an der PM_{2.5} induzierten Genexpression beteiligt sind. Mittels qRT-PCR und Western Blot-Analyse konnte zudem zum ersten Mal für Verbrennungspartikel gezeigt werden, dass HIF-1 an der Induktion der Genexpression von *HMOX1* und dessen Protein HO-1 beteiligt ist.

Epidemiologische Studien ergaben, dass eine chronische PM Exposition zu einer erhöhten Anfälligkeit für Atemwegsinfektionen führte. Durch die Simulation eines viralen Infekts mittels Zugabe von dsRNA zu PM_{2.5} exponierten BEAS-2B wurden mögliche Veränderungen im Transkriptom PM_{2.5} exponierter Zellen untersucht, um Hinweise für diesen Zusammenhang zu erhalten. Eine GO zeigte, dass einige der 380 spezifischen, differentiell exprimierten Gene nach PM_{2.5} und dsRNA Exposition von BEAS-2B typisch für eine Antwort auf eine Virusinfektion sind. Zudem waren diese Gene meist herunterreguliert, was das Auftreten einer Atemwegsinfektion nach PM_{2.5} Exposition erklären würde. Zudem konnte eine durchgeführte Krankheitsontologie-Analyse zeigen, dass die Signifikanz lungenspezifischer Erkrankungen, die mit den differentiell exprimierten Genen PM_{2.5} exponierter BEAS-2B assoziiert wurden, durch die zusätzliche Exposition mit dsRNA erhöht wurde.

Von langzeitexponierten BEAS-2B wurde neben dem Transkriptom auch das Methylom mit dem Illumina Infinium® HumanMethylation450 BeadChip (450K) untersucht, um den potentiellen Einfluss von PM_{2.5} aus der Biomasse auf epigenetische Mechanismen zu untersuchen. So konnte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe der pharmazeutischen Bioinformatik gezeigt werden, dass die Exposition mit PM_{2.5} zu einer veränderten Methylierung von 1 % der untersuchten CpGs führte. Eine GO-Analyse ergab, dass Gene, die differentiell methylierte CpGs aufwiesen, eine wichtige Rolle in Signalwegen, die mit der extrazellulären Matrix, zellulären Adhäsion, der Funktion von GTPasen und der Antwort auf extrazelluläre Reize assoziiert sind, spielen. Um eine Aussage über die biologische Relevanz des veränderten Methyloms treffen zu können, wurden die Methylom-Daten mit den Transkriptom-Daten korreliert. Es wurden 152 Gene, die sowohl differentiell methylierte CpGs aufwiesen als auch differentiell exprimiert waren, erhalten. Des Weiteren zeigte die Durchführung einer Krankheitsontologie von diesen 152 Genen, dass viele dieser Gene im Zusammenhang mit Krebs und anderen lungenspezifischen und -unabhängigen Erkrankungen stehen.

Insgesamt tragen die Ergebnisse dieser Arbeit dazu bei, die molekularen Mechanismen und epigenetischen Auswirkungen, die an der Entstehung von PM_{2.5} assoziierten Lungenerkrankungen beteiligt sind, besser zu verstehen. Dabei kann die Entdeckung von potentiellen PM_{2.5}-Targetgenen ein möglicher Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen sein.

2 Einleitung

2.1 Feinstaub aus der Biomasseverbrennung – Einflüsse auf Umwelt und Gesundheit

Luftverschmutzung bezeichnet einen Vorgang, bei dem verschiedene Luftschadstoffe in die Atmosphäre abgegeben werden. Ein wichtiger Schlüsselindikator dabei ist Feinstaub.¹ Der Begriff Feinstaub (engl.: particulate matter, PM) bezeichnet eine komplexe Mischung aus festen und flüssigen Partikeln, die in der Atmosphäre über weite Distanzen transportiert werden können.² Eine Klassifizierung der Partikel kann auf unterschiedlichste Weise erfolgen, wobei eine Einteilung der Partikel nach dem aerodynamischen Durchmesser die gebräuchlichste ist.¹ PM kann so in grobe, feine und ultrafeine Partikel unterteilt werden. Grobe Partikel zeichnen sich durch einen aerodynamischen Durchmesser von $\leq 10 \mu\text{m}$ (PM_{10}) aus und entstehen meist bei Verschleißprozessen. Partikel mit einem aerodynamischen Durchmesser von $\leq 2,5 \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2,5}$) werden als fein bezeichnet und Partikel $\leq 0,1 \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{0,1}$) als ultrafein. Die Entstehung von feinen und ultrafeinen Partikeln erfolgt vor allem bei Verbrennungsprozessen.³ Auf Grund der geringen Partikelgröße werden Feinstaubpartikel sehr gut in der Atmosphäre verteilt, so dass sie über einige hundert bis tausend Kilometer transportiert werden können.⁴

2.1.1 Ursachen der Feinstaubentstehung und globale Belastung

Die Entstehung von Feinstaub kann entweder primär erfolgen, durch direkte Emission an der Quelle, z. B. bei Verbrennungsprozessen, oder er wird sekundär aus gasförmigen Vorläufersubstanzen (Schwefel-, Stickoxide oder Ammoniak) gebildet.² Entstehungsprozesse des Feinstaubes können zum einen natürlichen oder zum anderen anthropogenen Ursprungs sein. Natürliche Quellen umfassen u. a. Vulkanausbrüche, Sandstürme und Seesalz aus Gischt.⁵ Eine Hauptquelle des menschlich verursachten Feinstaubes ist der Straßenverkehr.⁵ Dabei handelt es sich u. a. um Partikel aus Verschleißprozessen, wie Fahrabrieb oder Reifenabrieb, und um Partikel, die bei der Verbrennung von Kraftstoff wie Diesel entstehen.⁶ Weitere anthropogene Feinstaubquellen sind z. B. Baustellen, Bergbau, Industrie, landwirtschaftliche Prozesse und die Verbrennung von festen Energiequellen, wie Kohle, Schweröl und Biomasse.² Die Menge an anthropogen erzeugtem Feinstaub führte sogar dazu, dass 92 % der Weltbevölkerung im Jahr 2014 in Orten lebte, in denen die WHO-Richtlinien zur Luftqualität nicht eingehalten wurden (siehe Abbildung 1). Für $\text{PM}_{2,5}$ schreibt die WHO ein Jahresmittel von $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ Luft vor.⁷ Auch die innerhäusliche Entstehung von

Feinstaub sollte nicht vernachlässigt werden. Besonders Kochprozesse, Heizen oder Bürogeräte wie Fotokopierer oder Laserdrucker sind dabei von Bedeutung.¹

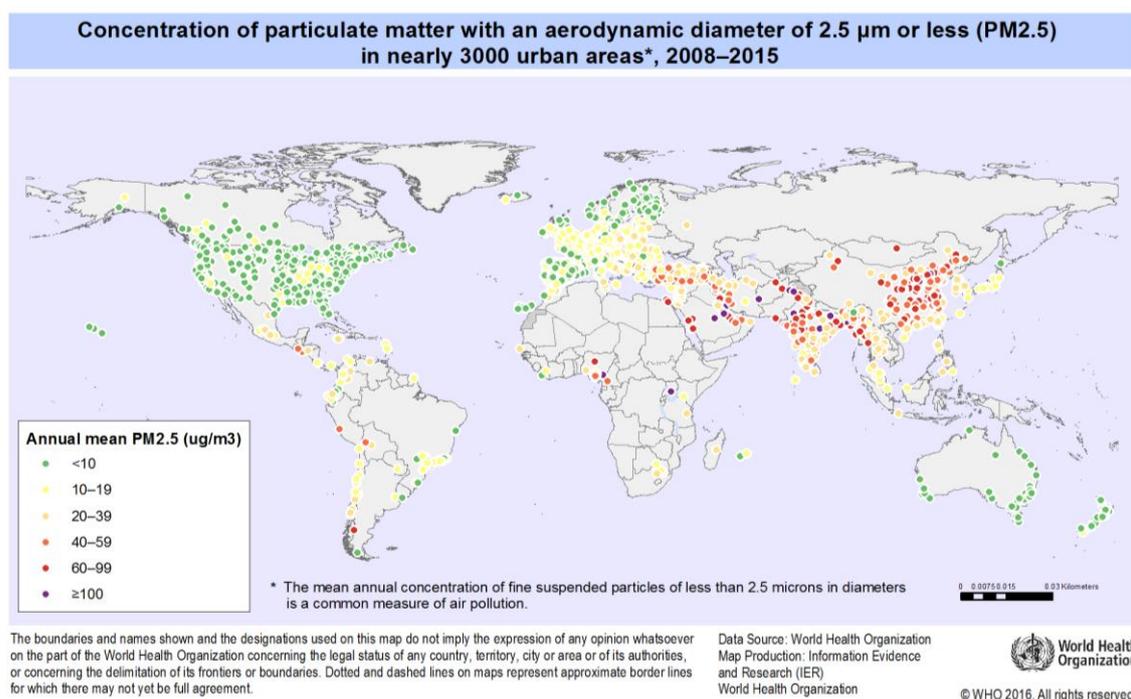


Abbildung 1: PM_{2.5}-Konzentrationen in rund 3.000 städtischen Gebieten weltweit im Zeitraum von 2008 bis 2015. Die Abbildung wurde mit Genehmigung der WHO abgedruckt: Global Health Observatory (GHO) data - environmental health[©] 2016, http://gamapservier.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_pm25_cities.png?ua=1; 05.02.2018.

Etwa 40 % aller Haushalte weltweit nutzen Biomasse zum Kochen und Heizen⁸, was besonders in Entwicklungsländern Asiens, des Nahen Ostens, Afrikas und Südamerikas ein Problem ist^{5,8,9}. In diesen Regionen kommen oft offene Feuerstellen oder einfache traditionelle Öfen zum Einsatz, die keine optimale Verbrennung der verwendeten Biomasse gewährleisten.^{8,9} Dadurch werden unvollständige Verbrennungsprozesse begünstigt, was die Emission von Feinstaub und anderen Schadstoffen begünstigt.⁸ Mit der Verwendung von einfachen Verbrennungsöfen geht oft eine mangelnde Belüftung einher, so dass zusätzlich die Exposition mit Feinstaub erhöht wird.¹⁰ Weltweit sind ca. 2,8 Millionen Menschen von häuslicher Luftverschmutzung, verursacht durch Verbrennung traditioneller Energiequellen, betroffen. Besonders Familien mit niedrigem Einkommen nutzen zum täglichen Kochen und Heizen feste Energiequellen, wie Biomasse, vor allem in Regionen, die keinen Zugang zu modernen Energiequellen haben.⁹ Biomasse, wie z. B. Holz, bietet dabei besondere Vorteile. Es ist eine überall verfügbare Ressource zu niedrigen Kosten.⁸ Der hohe Bedarf an Biomasse zur Energiegewinnung kann so zur regionalen Abholzung von Wäldern führen sowie Luftverschmutzung der Umgebungsluft verursachen, was Auswirkungen auf das globale Klima haben kann.¹¹

Auch in Haushalten mit mittlerem und höherem Einkommen in Teilen Europas, Nord Amerika und China stieg die Verwendung von Biomasse zum Heizen in den letzten Jahrzehnten an. Eine Ursache dafür ist u. a., dass die Kosten für fossile Brennstoffe in den letzten Jahren gestiegen sind.¹² Zudem hat sich die Europäische Union (EU) zum Ziel gesetzt, dass 20 % des gesamten Energiebedarfs bis 2020 mit erneuerbaren Energien gedeckt werden soll.¹³ Da Biomasse, wie Holz, zu den erneuerbaren und CO₂-neutralen Energiequellen zählt, ist dies eine weitere Ursache, warum dessen Nachfrage in letzter Zeit anstieg. Die Verwendung von Holz als Energiequelle zum Heizen ist jedoch zwiespältig. Auf der einen Seite wird zwar die Emission von Treibhausgasen reduziert, aber auf der anderen Seite steigt die Emission von gesundheitsschädlichen Stoffen, wie PM, CO und polyzyklische aromatischen Kohlenwasserstoffen.¹² Auch in Deutschland stieg in den letzten Jahren die Feinstaubemission durch die Verbrennung von Holz in häuslichen Heizsystemen an.¹⁴ Nationale Verordnungen sollen jedoch die Emission von Schadstoffen reduzieren. So schreibt in Deutschland die erste Verordnung zur Durchführung des Bundes Immissionsschutzgesetzes (1. BImSchV; Verordnung über kleine und mittlere Feuerungsanlagen) die Verwendung von modernen und effizienten Feuerungsanlagen vor um die Schadstoffemission zu reduzieren.¹⁵ Es konnte gezeigt werden, dass es unter kontrollierten und effizienten Verbrennungsbedingungen zu einer Reduktion von Schadstoffen kommt.¹⁶ So konnte die Emission von Feinstaub durch eine Automatisierung der Luftzufuhr in den Verbrennungsöfen im Vergleich zu einer manuellen Regelung um 30 % vermindert werden.⁸

2.1.2 PM_{2.5} assoziierte Erkrankungen

Luftverschmutzung führt dazu, dass verschiedene Schadstoffe, wie Feinstaub, in die Atmosphäre oder in die innerhäusliche Umgebung eingebracht werden und lebende Organismen sowie die Umwelt geschädigt werden können.¹ So wurden 2012 weltweit drei Millionen vorzeitige Todesfälle auf die Luftverschmutzung in städtischen und ländlichen Gebieten zurückgeführt (siehe Abbildung 2). Man geht davon aus, dass diese Todesfälle vor allem durch die Exposition mit Feinstaubpartikeln mit einem Durchmesser von < 10µm verursacht werden, da diese Atemwegs- und kardiovaskuläre Erkrankungen sowie Krebs hervorrufen können.⁷ Dies wurde in vielen wissenschaftlichen Studien untersucht, wobei ein Zusammenhang zwischen einer Feinstaubexposition und verschiedenen gesundheitlichen Problemen festgestellt werden konnte.¹⁷⁻¹⁹

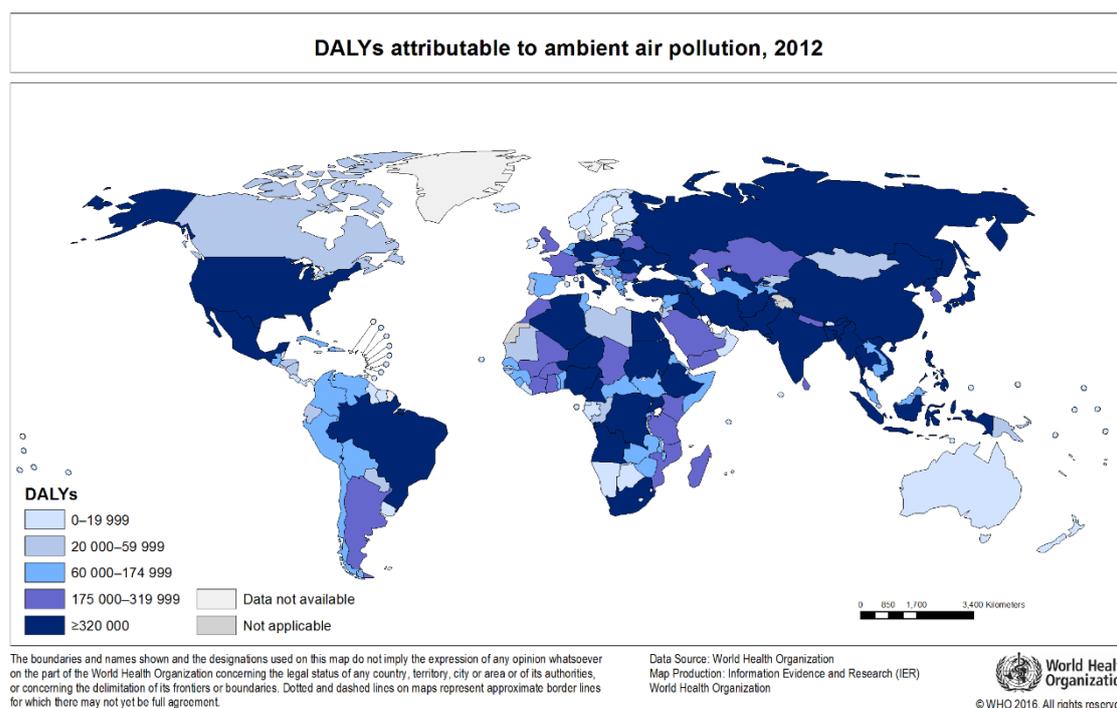


Abbildung 2: Weltweite behinderungsbereinigte Lebensjahre (engl.: disability-adjusted life years, DALYs), die auf Luftverschmutzung zurückzuführen sind, im Jahr 2012. Die DALYs werden zur Quantifizierung einer Krankheitsbelastung verwendet. Dabei spiegeln die DALYs nicht nur die verlorenen Lebensjahre durch einen vorzeitigen Tod wider, sondern auch die gelebten Jahre mit einer Krankheit oder Behinderung fließen in diesen Wert ein. Die Abbildung wurde mit Genehmigung der WHO abgedruckt: Global Health Observatory (GHO) data - environmental health[®], 2016, http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_aap_dalys_2012.png; 05.02.2018.

Gesundheitliche Aspekte, die mit Feinstaub assoziiert sind, können unterschieden werden in Atemwegserkrankungen oder in andere Erkrankungen. Zu den Erkrankungen, die die Atemwege betreffen und durch PM verursacht werden können, gehören u. a. Entzündungen der oberen und unteren Atemwege.¹⁷ So zeigte eine Studie, die über zwei Jahre Kinder in Bangladesch begleitete, dass vor allem Kinder von null bis elf Monaten an akuten Infektionen der unteren Atemwege erkrankten und dies im Zusammenhang mit einer Feinstaubexposition ($> 100 \mu\text{g}/\text{m}^3$) stand.²⁰ Eine weitere Studie, die in Montana (USA) durchgeführt wurde, tauschte herkömmliche Holzöfen gegen moderne Öfen mit niedriger PM-Emission aus. Dabei wurde untersucht, ob eine verminderte $\text{PM}_{2.5}$ -Exposition einen Einfluss auf die Atemwegsbeschwerden von Kindern hat. Es konnte gezeigt werden, dass die Reduktion von $\text{PM}_{2.5}$ durch den Austausch der Öfen zu einer Verminderung von Atemwegsinfektionen, wie grippaler Infekte, Bronchitis, Grippe oder Racheninfektionen, führte.²¹ Eine Meta-Analyse konnte ebenfalls zeigen, dass Kinder, die dem Rauch aus Biomasseverbrennungen ausgesetzt waren, dreimal mehr an akuten Atemwegserkrankungen erkrankten als Kinder, die dem Rauch von Energiequellen mit niedriger PM-Emission (Kerosin, Gas und andere) ausgesetzt waren.²² Zudem assoziierte diese Studie, dass Frauen aus ländlichen Gebieten, die mit Rauch aus Biomasseverbrennungen exponiert wurden, ein höheres Risiko

aufweisen an chronischer Bronchitis oder chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (engl.: chronic obstructive pulmonary disease, COPD) zu erkranken.²² Eine weitere Meta-Analyse zeigte ebenfalls, dass eine Exposition mit Rauch aus der Holzverbrennung zu COPD oder chronischer Bronchitis führen kann.²³ Inwieweit Feinstaub aus der Biomasseverbrennung zu einer Ausbildung oder einer Verschlechterung von Asthma führt, ist bisher noch nicht eindeutig nachgewiesen. So konnte in Erwachsenen mittleren Alters gezeigt werden, dass Holzrauch (engl.: wood smoke, WS) ebenso wie verkehrsbedingte Luftverschmutzung zu einer Verschlechterung von Asthma führt.²⁴ Auch die Untersuchungen mit guatemaltekischen Kindern stellten fest, dass die Prävalenz an Asthma zu erkranken für Kinder, in deren häuslicher Umgebung mit offenen Feuerstellen gekocht wurde, größer ist, als für Kinder in Haushalten mit optimierten Öfen, die zusätzlich noch einen Kamin besitzen.²⁵ Andere Studien konnten jedoch nur einen geringen oder keinen Zusammenhang zwischen einer PM-Exposition und der Erkrankung von Asthma erkennen.^{21,22,26}

Lungenkrebs ist eine multifaktorielle Erkrankung¹⁷, die in Industrieländern hauptsächlich durch Zigarettenrauch (engl.: cigarette smoke, CS) verursacht wird¹⁸. In Entwicklungsländern sind jedoch häufiger nichtrauchende Frauen durch Lungenkrebs betroffen, da diese, bedingt durch das Kochen mit Biomasse in offenen Feuerstellen oder einfachen Öfen, einer unmittelbaren Luftverschmutzung ausgesetzt sind.¹⁰ Auch andere Studien konnten einen Zusammenhang zwischen PM aus der Biomasseverbrennung und der Entstehung von Lungenkrebs nachweisen. So stellte eine Studie mit 62 Lungenkrebspatienten fest, dass 38,7% dieser Erkrankten Nichtraucher waren, aber WS ausgesetzt waren und es sich dabei hauptsächlich um Frauen aus ländlichen Gebieten handelt. Zu 46,7% wiesen diese Patienten ein Adenokarzinom auf.²⁷ Eine Kohortenstudie mit 914 Lungenkrebspatienten konnte ebenfalls feststellen, dass 19,4% der Erkrankten Nichtraucher waren, aber mit WS exponiert waren. Zudem konnte gezeigt werden, dass WS im Vergleich zu CS mehr mit Nichtkleinzelligem Lungenkarzinom und Adenokarzinom assoziiert war.²⁸ Auch in 113 nichtrauchenden mexikanischen Frauen, die mehr als 50 Jahre WS ausgesetzt waren, konnte ein Adenokarzinom der Lunge nachgewiesen werden.²⁹

Neben Erkrankungen, die die Lunge betreffen, kann Feinstaub auch zu weiteren Erkrankungen oder gesundheitlichen Risiken führen. So konnten mehrere Studien einen Zusammenhang zwischen der Exposition mit WS von schwangeren Frauen und einem verminderten Geburtsgewicht (< 2.500 g) ihrer Kinder feststellen.³⁰⁻³² In nahezu ländlichen Gebieten Pakistans konnte beobachtet werden, dass Neugeborene von Müttern, die Holz zum Kochen verwendeten, im Vergleich zu Müttern, die Erdgas verwendeten, durchschnittlich 82 g leichter waren. Zudem kam es bei der Verwendung von Holz in 22,7% der Fälle zu einem verminderten Geburtsgewicht, bei der Verwendung von Erdgas trat dies nur bei 15% der untersuchten Neugeborenen auf.³⁰ In Brasilien konnte ebenfalls eine retrospektive Kohortenstudie einen Einfluss von Rauch aus der Biomasseverbrennung auf das Geburtsgewicht

nachweisen. Von 6147 untersuchten Geburten wiesen 3,1 % der Neugeborenen ein vermindertes Geburtsgewicht auf. Dies konnte außerdem mit einer PM_{2.5} Exposition während des zweiten und dritten Schwangerschaftstrimesters assoziiert werden.³¹ Auch in ländlichen Gemeinden Guatemalas war das Gewicht von Neugeborenen, deren Mütter mit Holz über offenen Feuerstellen kochten, am geringsten (Geburtsgewicht durchschnittlich 63 g geringer), gefolgt von Neugeborenen, deren Mütter Öfen mit einem Kamin verwendeten. Bei der Verwendung von Gas oder Strom zum Kochen war das Geburtsgewicht am größten und das Auftreten eines verminderten Geburtsgewichts war mit 19,9 % bei der Verwendung von offenen Feuerstellen am häufigsten (Öfen mit Kamin 16,8 % und Strom/Gas 16,0 %).³²

Oft wurde auch der Einfluss von Feinstaub auf kardiovaskuläre Erkrankungen untersucht. Einige Studien untersuchten dabei PM_{2.5} verursachte Effekte auf den systolischen und den diastolischen Blutdruck. McCracken *et al.* konnten hierbei feststellen, dass der Austausch eines einfachen Ofens gegen einen verbesserten Ofen mit Kamin zu einer Reduktion des diastolischen und systolischen Blutdrucks um 3,0 bzw. 3,7 mm Hg führte.³³ Baumgartner *et al.* konnten jedoch keine signifikanten Auswirkungen nachweisen, aber Biomasseverbrennung könnte u. a. dennoch ein Risikofaktor für einen erhöhten Blutdruck darstellen.³⁴ Eine randomisierte, doppelblinde Crossover-Studie mit 14 gesunden Nichtrauchern untersuchte nach der Exposition mit verdünntem WS ($314 \pm 38 \mu\text{g}/\text{m}^3$) Auswirkungen auf die zentrale arterielle Gefäßsteifigkeit, Herzfrequenz, Blutdruck und Herzfrequenzvariabilität. Die akute Exposition mit WS führte zwar zu einer Erhöhung der Herzfrequenz, einer sofortigen Erhöhung der zentralen arteriellen Gefäßsteifigkeit und zu einer Erniedrigung der Herzfrequenzvariabilität, aber es konnte kein Einfluss auf den Blutdruck festgestellt werden.³⁵ Andere Studien konnten hingegen nur einen sehr geringen bis keinen Effekt von Feinstaub auf einen primären Herzstillstand³⁶, Myokardinfarkt³⁷ oder auf die Herzfrequenzvariabilität³⁸ belegen.

Weitere Auswirkungen, die im Zusammenhang mit Feinstaub stehen, sind Irritationen der Augen oder die Erkrankung an Katarakt. Untersuchungen in Sambia, Mosambik und Vietnam konnten zeigen, dass Irritationen der Augen, die sich in Form von tränenden oder brennenden Augen äußern, besonders bei höherer Luftverschmutzung, die während des Kochens mit festen Brennstoffen, wie Holz, entstehen, auftreten.³⁹ Eine randomisierte Studie in einem Dorf in Westindien zeigte, dass besonders die Verwendung von Holz als Energiequelle ein wichtiger Faktor in der Erkrankung an altersbedingtem grauem Star ist.⁴⁰ Auch eine Fall-Kontroll-Studie, die an der indisch-nepalesischen Grenze durchgeführt wurde, konnte beobachten, dass im Vergleich zu Biogas, flüssigem Propangas oder Kerosin bei der Verwendung von festen Brennstoffen das Risiko an Katarakt zu erkranken größer ist. Zudem war das Risiko nochmals größer, wenn die Brennstoffe in Öfen ohne Kamin verbrannt wurden als in Öfen mit Kamin.⁴¹

2.1.3 Einfluss der Eigenschaften von Feinstaubpartikel auf die Toxizität

Feinstaub aus der Umgebungsluft verschiedener Quellen stellt in der Regel ein komplexes und heterogenes Gemisch aus den unterschiedlichsten Substanzen dar. Dabei können die physikalischen und chemischen Eigenschaften des jeweiligen Feinstaubes unterschiedlich zur Toxizität beitragen. Einige wichtige Eigenschaften, wie Partikelgröße, -form, -struktur, Oberflächenreaktivität, Löslichkeit, Biopersistenz, das Vorhandensein löslicher und organischer Komponenten sowie das Vorhandensein biologischen Materials, sind daran beteiligt.^{1,3}

Die Partikelgröße hat zunächst einen ersten entscheidenden Effekt auf die Toxizität und damit auf die Gesundheit lebender Organismen.⁴² Dabei gilt grundsätzlich je kleiner die Partikel sind, umso tiefer ist die Eindringtiefe in den Organismus. Denn für sehr große Partikel ($>10\mu\text{m}$ aerodynamischer Durchmesser) stellen Mukus und Zilien einen ersten Filter dar, der die Eindringtiefe dieser Partikel in die Atemwege verhindert.¹ PM der Größe $2,5 - 10\mu\text{m}$ kann schon bis in den tracheobronchialen Raum eindringen und bei einem Durchmesser $\leq 2,5\mu\text{m}$ können die Partikel bis in Broncheolen und Alveolen vordringen, den Ort des Gasaustausches.^{43,44} Sehr kleine Partikel ($<1\mu\text{m}$) verhalten sich hinsichtlich ihres Eindringvermögens wie Gase, denn sie können bis tief in die Alveolen vordringen und dort in Kontakt mit Zellen gelangen, die in der Lage sind die Partikel aufzunehmen. Auf diese Weise können sehr kleine Partikel auch in den Blutkreislauf gelangen und sich im Organismus verteilen. $\text{PM}_{2,5}$ und $\text{PM}_{0,1}$ sind somit die Partikelfractionen, die den größten Einfluss auf die Gesundheit eines Organismus haben.¹

Auch die Partikeloberfläche bietet durch die Art ihrer Ladung oder das Vorhandensein reaktiver Gruppen toxisches Potential. So können toxische Gruppen die Bildung von zytotoxischen reaktiven Sauerstoffspezies (engl.: reactive oxygen species, ROS) fördern. Aber auch auf anderem Weg können ROS gebildet werden. So können Partikel intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren, die die Entstehung von ROS durch membranständige Oxidasen fördern. PM ist außerdem in der Lage Mitochondrien zu schädigen, was dazu führen kann, dass ROS, die während der Atmungskette gebildet werden, freigesetzt werden.³ Aber auch lösliche Übergangsmetalle, wie Eisen oder Kupfer, können über die Fenton-Reaktion zur ROS-Produktion *in vivo* beitragen.⁴⁵⁻⁴⁷

Hinsichtlich der Form sind lange ($>15\mu\text{m}$) dünne nadelförmige Fasern schädlicher als kürzere Fasern oder runde Partikel, da diese von alveolaren Makrophagen nicht vollständig aufgenommen und entfernt werden können.³ Auch das Vorhandensein von biologischem Material, wie Allergene⁴⁴ oder Endotoxine⁴⁸, kann gesundheitliche Auswirkungen haben. Des Weiteren sind lösliche Partikel, sofern sie keine toxischen Substanzen enthalten, harmloser als unlösliche Partikel, da diese länger im Organismus verbleiben und so zu einem länger anhaltenden Schaden führen können.³ Darüber

hinaus stellen auch organische Substanzen, wie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, ein gewisses Gesundheitsrisiko dar.⁴⁹

2.2 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe – PAK

Organische Bestandteile von Feinstaubpartikeln, die während Verbrennungsprozessen generiert werden, sind hauptsächlich polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK). Diese ubiquitär in der Umwelt und in fossilem Material vorkommenden Substanzen sind eine Unterklasse der polyzyklischen aromatischen Verbindungen. Diese umfassen neben den PAKs auch andere Moleküle aus mindestens zwei aromatischen Ringen, die zusätzlich in ihrer Molekülstruktur neben Wasserstoff- und Kohlenstoffatomen auch Heteroatome, wie Stickstoff-, Sauerstoff- oder Schwefelatome, bzw. verschiedene funktionelle Gruppen, wie Hydroxy-, Keto-, Nitro- oder Aminogruppen, aufweisen.⁵⁰ Im Folgenden werden nur PAKs betrachtet.

2.2.1 Nomenklatur der PAK

Der IUPAC (engl.: International Union of Applied and Pure Chemistry)-Nomenklatur folgend wird zur Benennung der PAKs das Molekül zunächst so orientiert, dass nur ein Kohlenstoffatom eines Benzolrings nach oben zeigt. Zudem wird die längste Kette an aromatischen Ringen horizontal orientiert. Doppelbindungen werden so eingezeichnet, dass der am weitesten unten links liegende Benzolring (unterer linker Quadrant) drei Doppelbindungen aufweist. Alle weiteren Doppelbindungen werden entsprechend eingezeichnet.⁵⁰ Als nächstes wird die größtmögliche Stammstruktur des Moleküls bestimmt, die in der Bezeichnung die höchste Priorität innehat.⁵¹ Die Nummerierung der Stammstruktur beginnt in der Regel mit dem obersten Kohlenstoffatom des Ringes, der am weitesten oben rechts (oberer rechter Quadrant) im Molekül liegt, und wird im Uhrzeigersinn fortgeführt.⁵⁰ Auf Grund der historischen Entstehung der PAK-Nomenklatur gibt es einige Ausnahmen von dieser Regel. So erfolgt z. B. die Nummerierung des Phenanthrens und des Anthracens gegen den Uhrzeigersinn.⁵¹ Die Nummerierung der enthaltenen Bindungen erfolgt mit lateinischen kursiv geschriebenen Kleinbuchstaben in alphabetischer Reihenfolge. Begonnen wird mit der Bindung zwischen dem ersten und zweiten Kohlenstoffatom. Die Nummerierung wird in der Regel im Uhrzeigersinn fortgesetzt.^{50,51} Als nächstes wird die Anzahl und Art der Ringsysteme und Gruppen bestimmt, die an die Stammstruktur substituiert sind. Das Molekül wird dabei möglichst so gezeichnet, dass sich die Substituenten im oberen rechten Quadranten des Moleküls befinden. Diese werden in alphabetischer Reihenfolge der Stammstruktur als Präfixe vorausgestellt. Sind mehrere gleiche Substituenten vorhanden, so werden diese mit Präfixen, die von griechischen Zahlenwörter

abgeleitet sind (di, tri, tetra, etc.), gekennzeichnet.⁵¹ Zum Beschreiben der richtigen Orientierung von Ringsubstituenten an die Stammstruktur werden die Lokanten in eckigen Klammern direkt hinter dem Präfix des entsprechenden Substituenten gesetzt und durch Kommata getrennt, außer es handelt sich um direkte Nachbarn.⁵⁰ Die Benennung von funktionellen Gruppen, z. B. Alkylgruppen, erfolgt standardmäßig nach den IUPAC-Substitutionsregeln. Dabei wird der Lokant des peripheren Kohlenstoffatoms der Stammstruktur dem Präfix des Substituenten vorausgestellt. Besteht das Molekül aus einer linear angeordneten Kette von Benzolringen so spricht man von orthoanillierten Verbindungen. Gewinkelte Moleküle werden als perianillierte Moleküle bezeichnet.⁵¹ In Abbildung 3 wird die PAK-Nomenklatur am Bsp. von Benzo[*a*]pyren nach IUPAC-Richtlinien veranschaulicht.

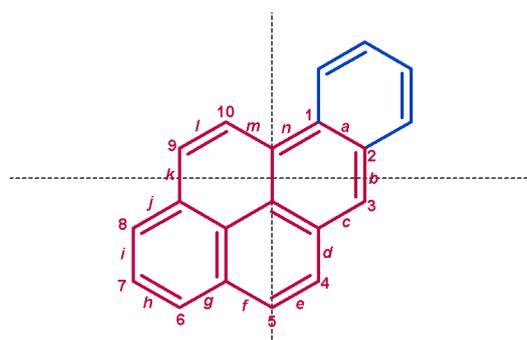
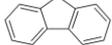
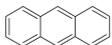
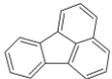
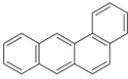
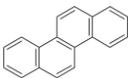
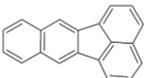
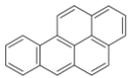
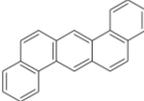
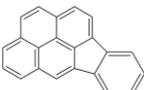


Abbildung 3: Veranschaulichung der PAK-Nomenklatur nach IUPAC-Richtlinien am Bsp. von Benzo[*a*]pyren. Die Stammstruktur Pyren ist in Rot mit entsprechender Nummerierung der Kohlenstoffatome und der Lokanten dargestellt.

Durch die vielfältigen Möglichkeiten, wie Anzahl, Position und Art der aromatischen Ringe, die miteinander anelliert sein können, ergibt sich eine große Anzahl an verschiedenen PAKs, dessen chemische und physikalischen Eigenschaften mit dem Molekulargewicht und den funktionellen Gruppen variieren. So nimmt z. B. der Dampfdruck mit zunehmenden Molekulargewicht ab. Die weltweit ubiquitär in der Umgebungsluft vorkommenden PAKs wurden als eine der ersten Luftschadstoffe als kanzerogen eingestuft.⁵² Von der amerikanischen Umweltschutzbehörde (United States Environmental Protection Agency – US EPA) wurden 16 PAKs⁵³ priorisiert (siehe Tabelle 1), da zu diesen im Vergleich zu anderen PAKs mehr Informationen vorhanden sind. Zudem sind ihre schädlichen Eigenschaften repräsentativ für die gesamte Stoffgruppe, die Wahrscheinlichkeit einer Exposition durch diese PAKs ist am größten und die vorhandenen Konzentrationen dieser 16 PAKs sind größer als die anderer PAKs.⁵²

Tabelle 1: Struktur und Eigenschaften der 16 US EPA PAKs, geordnet nach steigender Ringzahl. Die Daten für Dampfdruck und Molekulargewicht wurden aus der Datenbank PubChem⁵⁴ entnommen. Von der Internationalen Agentur für Krebsforschung (International Agency for Research on Cancer (IARC)) wurden 15 der 16 PAKs nach ihrem kanzerogenen Potential in verschiedene Gruppen eingeteilt. 1: Kanzerogen für Menschen; 2A: Wahrscheinlich kanzerogen für Menschen; 2B: Möglicherweise kanzerogen für Menschen; 3: Kanzerogenität für Menschen nicht klassifizierbar⁵⁵; n. d.: nicht definiert

Name	Abkürzung	Ringanzahl	Dampfdruck [Pa, 25 °C]	Molekulargewicht [g/mol]	Klassifizierung nach IARC ⁵⁶	Struktur
Naphthalin	NAP	2	$1,13 \times 10^1$	128,174	n. d.	
Acenaphthylen	ACY	3	$6,40 \times 10^{-1}$	152,196	n. d.	
Acenaphthen	ACE	3	3×10^{-1}	154,212	3	
Fluoren	FLU	3	8×10^{-2}	166,223	3	
Phenanthren	PHE	3	$1,61 \times 10^{-2}$	178,234	3	
Anthracen	ANT	3	8×10^{-2}	178,234	3	
Fluoranthen	FLT	4	$1,23 \times 10^{-3}$	202,256	3	
Pyren	PYR	4	$6,06 \times 10^{-4}$	202,256	3	
Benzo[<i>a</i>]anthracen	BaA	4	$2,8 \times 10^{-5}$	228,294	2B	
Chrysen	CHR	4	$8,31 \times 10^{-7}$	228,294	2B	
Benzo[<i>b</i>]fluoranthen	BbF	5	n. d.	252,316	2B	
Benzo[<i>k</i>]fluoranthen	BkF	5	$1,29 \times 10^{-7}$	252,316	2B	
Benzo[<i>a</i>]pyren	BaP	5	$7,32 \times 10^{-7}$	252,316	1	
Dibenzo[<i>a,h</i>]anthracen	DahA	5	$1,27 \times 10^{-7}$	278,354	2A	
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pyren	IcdP	6	$1,67 \times 10^{-8}$	276,338	2B	
Benzo[<i>ghi</i>]pyren	BghiP	6	$1,33 \times 10^{-8}$	276,338	3	

2.2.2 PAK Emission in der Biomasseverbrennung

PAKs entstehen insbesondere bei unvollständigen Verbrennungsprozessen von organischem Material⁵⁷, die natürlichen oder anthropogenen Ursprungs sein können⁴⁹. Zu den natürlichen Quellen zählen vor allem Waldbrände sowie Vulkaneruptionen.⁵⁸ Die Hauptquellen, die zur Emission von PAKs führen, sind jedoch anthropogenen Ursprungs und beinhalten sowohl mobile als auch stationäre Quellen.^{58,59} Mobile Quellen sind u. a. Autos, Flugzeuge und Schiffe⁵², von denen besonders Autos in städtischen Gebieten Hauptverursacher von PAK-Emissionen sind⁶⁰. Stationäre Quellen sind neben Industrie (Aluminiumschmelzwerke, Koksproduktion⁵⁸ oder Teer- und Asphaltproduktion⁵²) Energiekraftwerke, die hauptsächlich Energie durch Verbrennung von Kohle⁶¹, fossilen Brennstoffen⁵² oder Biomasse⁶² erzeugen sowie die Verbrennung von Müll⁶³ und landwirtschaftlicher Abfälle⁵². Nicht zu vergessen sind Verbrennungsöfen im häuslichen Bereich für die Energiegewinnung zum Heizen oder Kochen.⁶⁰ Dabei stehen vor allem solche im Fokus, die mit Biomasse, wie Holz, Holzpellets oder Holzhackschnitzel, betrieben werden.^{60,64} Vor allem im Winter verursacht die häusliche Holzverbrennung einen Großteil der PAK-Emission in Wohngebieten.^{60,65} Da sich die EU zum Ziel gesetzt hat 20 % des gesamten Energiebedarfs bis 2020 aus erneuerbaren Energiequellen zu beziehen¹³, wird der Bedarf an Biomassekraftstoffen in Zukunft wahrscheinlich noch zunehmen. Eine weitere häusliche Quelle, die zu PAK-Emissionen führt und vorrangig in Entwicklungsländern von Bedeutung ist, ist die Verbrennung von Biomasse, wie Holz⁶⁶, Dung⁶⁷, oder landwirtschaftlicher Abfälle^{66,68}, zum Kochen. Die Verbrennung erfolgt meist in ineffizienten Öfen oder offenen Feuerstellen in Räumen mit schlechter Belüftung.^{8,9,18,66}

Die bei der PAK-Entstehung ablaufenden Hauptmechanismen, Pyrolyse und Pyrosynthese, finden vor allem unter sauerstoffarmen Bedingungen und bei Temperaturen > 500 °C (optimal 660–740 °C) statt. Dabei werden Kohlenstoff-Wasserstoff- und Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen von Kohlenwasserstoffen gespalten und die dabei freiwerdenden Radikale kondensieren anschließend unter Dehydrierung zu einer aromatischen Ringstruktur.⁶⁹ Das so entstandene Molekül ist gegenüber erneuter thermischer Zersetzung unempfindlich.⁵² Bei einem anderen möglichen Mechanismus kommt es zunächst zu einer langsamen Diels-Alder-Kondensation mit einer nachfolgenden schnell ablaufenden Radikalreaktion und einer abschließenden ionischen Reaktion.⁷⁰ Gasförmige Kohlenwasserstoffradikale ordnen sich schnell neu an und fördern so die Entstehung und das Wachstum von PAKs. Durch die Anlagerung von Kohlenwasserstoffradikalen an niedermolekulare PAKs über die Zwischenstufe von Alkyl-PAKs kommt es zur Bildung von höhermolekularen PAKs.⁵²

Die Bildung von PAKs erfolgt bei hohen Temperaturen initial in der Gasphase.⁵² Köhlen die Temperaturen ab, so ist es möglich, dass ein Teil von ihnen an Feinstaubpartikeln adsorbieren.⁵⁸

Dabei können umso mehr PAKs an die Oberfläche kleiner Teilchen adsorbieren, je höher die spezifische Oberfläche der Partikel ist.⁷¹ Besonders kleine Teilchen mit einem aerodynamischen Durchmesser von $<2,5\ \mu\text{m}$, die hauptsächlich bei Verbrennungsprozessen entstehen³, weisen im Vergleich zu größeren Partikeln eine größere Oberfläche auf und sind so in der Lage mehr PAKs zu adsorbieren⁷¹. Die Verteilung von PAKs zwischen der Gas- und der Partikelphase ist abhängig von verschiedenen Faktoren, dabei spielt der Dampfdruck der einzelnen PAKs neben der Umgebungstemperatur, der Partikeloberfläche und der PAK-Konzentration eine wichtige Rolle.^{52,58,59} Da der Dampfdruck mit steigender Ringanzahl abnimmt (siehe Tabelle 1) befinden sich vor allem PAKs mit zwei Ringen, wie das Naphthalen (NAP) und dessen Derivate, bevorzugt in der Gasphase. Mittelschwere PAKs, die aus drei Ringen bestehen, wie Fluoren (FLU), Pyren (PYR) oder das Reten, können sowohl in der Gas- als auch in der Partikelphase vorkommen. Dahingegen sind PAKs mit einer hohen molaren Masse, mit vier und mehr Ringen, wie Fluoranthren (FLT), PYR oder Benzo[*a*]pyren (BaP), vorwiegend an Partikel adsorbiert.^{52,72}

Partikel, die während der Biomasseverbrennung entstehen, sind entweder Teil der Rostasche oder der Flugasche. Rostasche ist der Teil an festen Verbrennungsrückständen, der am Boden des Verbrennungsofens zurückbleibt, wohingegen Flugasche aus festen kleinen fein verteilten Verbrennungsrückständen besteht.^{73,74} Auf Grund der hohen Teilchendispersität kann die Flugasche zusammen mit der Gasphase in die Umgebungsluft gelangen.⁷⁵ Auf Grund der kleineren Teilchengröße der Flugasche im Vergleich zur Rostasche und der damit verbundenen größeren spezifischen Oberfläche ist es naheliegend, dass die Konzentration an PAKs in der Flugasche größer ist als in der Rostasche⁷⁴ oder auf Grund des höheren Rußanteils in der Flugasche⁷⁶. Untersuchungen von Košnář *et al.*⁷⁴ und Masto *et al.*⁶² konnten dies bestätigen. Košnář *et al.* zeigten, dass bei der Verbrennung von Weizen-, Gerstenstroh und anderer landwirtschaftlicher Ernteabfälle ca. 785-mal mehr PAKs in der Flugasche (53.800,9 ng/g gesamt PAKs) vorhanden waren als in der Rostasche (68,5 ng/g gesamt PAKs). Auch bei der Verbrennung von Holzhackschnitzeln, Pellets, Wald- und Holzabfällen konnte in der Flugasche (279,0 ng/g) im Vergleich zur Rostasche (41,1 ng/g) eine höhere Gesamtmasse an PAKs nachgewiesen werden.⁷⁴ Bei Masto *et al.* variierte der Gesamtanteil von PAKs der Flugasche aus der Biomasseverbrennung in einem Energiekraftwerk von 3,59–193 mg/kg. Auch die Rostasche zeigte hier deutlich geringere Mengen an PAKs, 0,185–2,61 mg/kg.⁶² Johansson *et al.* hingegen konnten bei der Verbrennung von Biomasse in der Rostasche (480–3590 $\mu\text{g}/\text{kg}$ gesamt PAKs) und in der Flugasche (141–4.495 $\mu\text{g}/\text{kg}$) keine Unterscheide in der PAK-Menge beider Aschen feststellen. Dabei ist jedoch zu beachten, dass Johansson *et al.* Flug- und Rostaschen aus unterschiedlichen Energiequellen und unabhängigen Verbrennungsprozessen miteinander vergleichen.⁷⁷

Bei den PAKs, die hauptsächlich in Flugaschen vorhanden sind, handelt es sich um niedermolekulare PAKs mit zwei oder drei Ringen, wie NAP, Acenaphthen (ACE), Acenaphthylen (ACY), Phenanthren (PHE) oder FLU.^{62,74,77} Rostaschen besitzen demgegenüber einen höheren Anteil an mittelschweren PAKs mit drei oder vier Ringen auf, wie PHE, PYR, FLT, Anthracen (ANT) oder Chrysen (CHR).^{62,77} Teilweise weisen auch Rostaschen einen nicht geringen Anteil an NAP auf bzw. sind leichte, mittelschwere und schwere PAKs in nahezu ähnlichen Konzentrationen vorhanden.⁷⁴ Weitere Untersuchungen zur PAK-Emission aus der Biomasseverbrennung zeigten ähnliche Emissionsprofile. Bei der Verbrennung von Torf, Gras oder Kiefer kam es insbesondere zur Freisetzung von PYR, Reten, FLT, BaP, CHR, E-Dimethylphenanthren und 1-Methylpyren, d. h. vorwiegend PAKs mit drei und vier Ringen. Je nachdem welche Biomasse verbrannt wurde, kam es zu geringen Unterschieden der einzelnen PAK-Konzentrationen. Auch die Gesamtmasse der PAKs schwankte nur innerhalb der gleichen Größenordnung, von 1,9–3 mg/kg.⁷⁸ Bei der Verbrennung von Trester-, Kiwi-, Oliven-, Platanenrückständen, Weizenstroh, und Reishülsen kam es immer zu einer deutlichen Freisetzung von Phenanthren. FLT wurde nur bei der Verbrennung von drei Biomassen (Kiwi, Olive und Reis) emittiert, ebenso NAP und ACY (Olive, Weizenstroh und Reis). Auffällig war, dass die Emission der PAKs teilweise stark temperaturabhängig war und nicht bei allen untersuchten Verbrennungstemperaturen (900, 1.000 und 1.100 °C) in gleichen Konzentrationen freigesetzt wurde.⁷⁹ Bei der Verbrennung von verschiedenen Holzbrennstoffen (Holzbrikettes, Scheitholz aus Hart- und Weichhölzern sowie Holzabfälle) bei ineffizienten Verbrennungsbedingungen in häuslichen Kachelöfen wurden ebenfalls besonders PYR, PHE und CHR freigesetzt. Zudem kam es in dieser Untersuchung zu einer auffälligen Emission von PAKs mit mehr als 4 Ringen wie Benzo[*k*]fluoranthren (BkF), Benzo[*b*]fluoranthren (BbF) und BaP. Da auch die Gesamtmasse an PAKs mit 948 mg/kg im Vergleich zu den anderen betrachteten Studien relativ hoch ist, ist zu vermuten, dass dies durch die ineffizienten Verbrennungsbedingungen verursacht wurde.⁸⁰

Einige weitere Studien untersuchten, ob es bestimmte PAK-Indikatoren gibt, anhand derer man die verbrannte Energiequelle identifizieren kann.^{65,81–83} So wurden bei der Verbrennung von Weichhölzern höhere Konzentrationen an Reten, Benzo[*ghi*]pyren (BghiP), Indeno[1,2,3-*cd*]pyren (IcdP), BaP, BkF BbF und geringere Konzentrationen an Benzo[*a*]anthracen (BaA), PHE, ANT, PYR, FLT, und CHR gefunden. Bei der Verbrennung von Harthölzern kam es hingegen zu einer vermehrten Emission von FLT, PYR, BaA und CHR.^{65,81} Bari *et al.* identifizierten Reten, FLT, PYR, ANT, BaP, BaA und CHR als Indikator-PAKs bei der Verbrennung von Holz.⁶⁵ Bei der Verbrennung von Flüssiggas wurden höhere Konzentrationen an PHE, BaA, BkF, BaP, FLT und CHR detektiert, in der Umgebungsluft von Straßenverkehr BaA, BbF, BkF, BaP und IcdP und in Straßenstaub vor allem NAP, PHE, ANT, FLU, PYR, CHR, BghiP.⁸¹ Shen *et al.* stellten bei der Verbrennung von

verschiedenen Energiequellen aus Holz und Kohle fest, dass die Emissionsprofile relativ ähnlich zueinander sind. Bei allen kam es zu einer vermehrten Freisetzung von PHE, ACY, FLT und PYR. Im Vergleich zu Kohle konnte gezeigt werden, dass es bei der Verbrennung verschiedener Energiequellen aus Holz prozentual zur emittierten Gesamtmasse an PAKs zu einer höheren Freisetzung an FLT und PYR kam.⁸² Im Allgemeinen kommt es bei der Verbrennung von Holz bzw. Biomasse zu ähnlichen Emissionsmustern wie bei anderen anthropogenen Quellen.^{60,84} Dennoch konnte Reten als Indikator für die Verbrennung von Holz identifiziert werden.^{78,81,85}

Neben der Art der verbrannten Energiequelle hat auch deren Feuchtigkeitsgehalt Einfluss auf die PAK-Emission. Einige Studien zeigen eine positive Korrelation zwischen dem Feuchtigkeitsgehalt der verbrannten Energiequelle und der Masse an freigesetzten PAKs. Bei der Verbrennung von belaubter Biomasse (höherer Feuchtigkeitsanteil) wurde im Vergleich zu Scheitholz mehr organischer Kohlenstoff freigesetzt.⁸⁶ Auch bei der Verbrennung von Reisstroh mit einem höheren Feuchtigkeitsanteil im Vergleich zu Weizenstroh wurde die gleiche Korrelation beobachtet.⁸⁷ Die Untersuchungen von Hays *et al.* zeigten ebenfalls bei der Verbrennung eines Gemisches aus Palme und Kiefer mit dem höchsten Feuchtigkeitsgehalt von 44 % die größte PAK-Emission.⁸⁸ Bei der Verbrennung von Buchenholz mit einem Feuchtigkeitsgehalt von 19 % im Vergleich zu 2 % kam es in der initialen Brandphase zu einer deutlich größeren PAK-Emission als unter regulären Verbrennungsbedingungen, unter denen sich die Situation umkehrte.⁸⁹ Chomanee *et al.* untersuchten Holz des Gummibaums mit drei verschiedenen Feuchtigkeitsgehalten (37, 70 und 74 %) und konnten ebenfalls zeigen, dass es in der ersten Verbrennungsphase mit zunehmender Feuchtigkeit auch zu einer höheren PAK-Emission kam. Die Unterschiede wurden aber immer geringer, je länger die Verbrennung andauerte.⁹⁰ Eine mögliche Ursache für die positive Korrelation zwischen Feuchtigkeitsgehalt der Energiequelle und PAK-Emission könnte sein, dass es bei einem hohen Feuchtigkeitsanteil zu unvollständigen Verbrennungen kommt. Dies wird auf Grund sinkender Verbrennungstemperaturen hervorgerufen, da mehr Energie benötigt wird um das vorhandene Wasser zu verdampfen und es so eher zu Schwelbrand kommt.⁸⁷⁻⁸⁹ Es gibt jedoch auch andere Untersuchungen, die eine negative Korrelation zwischen Feuchtigkeitsanteil und PAK-Emission feststellten.^{68,91,92} Eine mögliche Begründung dafür könnte sein, dass Wasser mit Wasserstoffradikalen zu Wasserstoff und Hydroxylradikalen reagiert und diese für einen Zerfall der PAKs verantwortlich sind.⁹³

Des Weiteren haben auch die Verbrennungsbedingungen, wie Sauerstoffkonzentration, Temperatur und Verbrennungsphase, sowie die Effizienz der Verbrennung einen großen Einfluss auf die Menge der emittierten PAKs.⁸⁴ So gilt im Allgemeinen, dass PAKs meistens bei Temperaturen zwischen 750 und 850 °C entstehen.⁵⁹ Dies zeigt sich z. B. bei der Verbrennung von Reis- und Bohnenstroh, wo eine Zunahme der Verbrennungstemperaturen von 200 auf 700 °C zu einer vermehrten

PAK-Emission führt.⁶⁸ Auch Košnář *et al.* konnten bei der Verbrennung von Weizen-, Gerstenstroh und landwirtschaftlichen Abfällen zeigen, dass es bei Temperaturen von 500 bis 750 °C zur größten Freisetzung von PAKs kam, welche im Bereich von 250 bis 500 °C und von 750 bis 1.000 °C deutlich geringer war. Bei der Verbrennung von Holzhackschnitzeln, Pellets und Waldabfällen kam es jedoch bei niedrigeren Temperaturen (250–500 °C) zu einer größeren PAK-Emission., vor allem von PAKs mit geringer molekularer Masse. Im mittleren Temperaturbereich (500–750 °C) wurden zwar weniger PAKs freigesetzt, dafür überwog der Anteil von PAKs mit hoher und mittlerer molarer Masse.⁷⁴ Die Untersuchungen von Colom-Díaz *et al.* zeigten ebenfalls den Trend, dass es bei Zunahme der Temperaturen über 900 °C (900–1.100 °C) zu einer Reduktion der freigesetzten PAKs kommt, mit Ausnahme von Olivenabfällen und Reishülsen, die ein Maximum an PAK-Emission bei 1.000 °C zeigten.⁷⁹ Zudem spielt die Effizienz der Verbrennung eine entscheidende Rolle. So kommt es bei unvollständigen⁸⁰ bzw. ineffizienten Verbrennungen⁹⁴, z. B. bei Schwelbränden mit einhergehendem Sauerstoffdefizit und flammenloser Verbrennung⁹⁵ oder in der Startphase einer Verbrennung⁷⁴, zu einer vermehrten Bildung und Emission von PAKs. So konnten Orasche *et al.* zeigen, dass ein geringerer Sauerstoffgehalt mit zunehmenden Verbrennungstemperaturen zu einer vermehrten PAK-Freisetzung führt, insbesondere PAKs mit höherer molekularer Masse, wie BaA, CHR und Benzopyrene. Bei niedrigeren Temperaturen wurden hingegen eher kleinere PAKs emittiert.⁸⁰ Lu *et al.* untersuchten bei der Verbrennung von Stroh verschiedene Sauerstoffkonzentrationen von 0 bis 100 %. Dabei zeigte sich, dass es bei einem Sauerstoffgehalt von 40 % zur größten PAK-Emission kam.⁶⁸ Im Gegensatz dazu stehen die Untersuchungen von Danielsen *et al.* Diese ergaben, dass ein höherer Sauerstoffgehalt zu einer vermehrten Bildung von PAKs führte, insbesondere zu höhermolekularen, wie CHR, BbF, BkF, BaP und IcdP. Bei niedrigeren Sauerstoffkonzentrationen kam es zu geringeren Mengen und kleineren PAKs, wie NAP, PHE, ANT, FAT und PYR.⁹⁶

Auch die Verbrennungssysteme, mit denen Biomasse verbrannt wird, beeinflussen die Entstehung von PAKs. So kann zwischen neuer und alter Technologie unterschieden werden. Wobei man unter alter Technologie hauptsächlich konventionelle Öfen versteht, die ohne neue Technologie, wie eine elektrische Verbrennungskontrolle, auskommen. Moderne Verbrennungsöfen, wie Pelletöfen oder -heizungen, verfügen über Technologien, um die Verbrennungsbedingungen zu optimieren und Emissionen zu reduzieren.⁹⁷ So konnte gezeigt werden, dass Öfen mit einem Ventilator deutlich weniger PAKs freisetzen als Öfen ohne Ventilator.⁹⁸ Auch Johansson *et al.* konnten in Untersuchungen mit konventionellen und modernen Holzheizungen sowie Pelletheizungen zeigen, dass alte Holzheizungen zu einer deutlich höheren PAK-Emission führen, als moderne Heizungen.⁹⁹ Zum gleichen Ergebnis kommen auch Happo *et al.* Auch hier zeigten konventionelle Öfen mit

Abstand die größte PAK-Emission. Die geringste PAK-Freisetzung zeigte eine Heizung, die mit Holzhackschnitzeln betrieben wurde, direkt gefolgt von einer Pelletheizung.⁶⁴

Die Art und Menge der PAK-Emission wird von vielen Faktoren, die von der Art der Energiequelle über deren physikalische und chemische Eigenschaften bis hin zu den Verbrennungsbedingungen reichen, bestimmt. Um eine Reduktion der PAK-Emission in der Biomasseverbrennung zu erreichen, ist es wichtig, dass zum einen Energiequellen verbrannt werden, die besonders günstige Eigenschaften für eine vollständige Verbrennung aufweisen, wobei auch die Verbrennungsbedingungen so gewählt werden sollten, dass eine vollständige Verbrennung gewährleistet wird. Dies kann am besten durch die Verwendung eines Ofens oder Heizung mit neuer Technologie erfolgen.

2.2.3 PAKs und assoziierte gesundheitliche Aspekte

Es ist bekannt, dass PAKs kanzerogene, mutagene und teratogene Eigenschaften besitzen. Deshalb wurden sie bereits 1976 von der EPA in die Liste der wichtigsten Schadstoffe aufgenommen.¹⁰⁰ Die Exposition mit PAKs kann auf unterschiedlichste Weise erfolgen, wobei zwischen einer beruflichen und einer nicht beruflichen Exposition unterschieden werden kann. Eine berufliche Exposition kann z. B. im Bereich der Aluminium- und Teerproduktion, in der Asphaltherstellung, der Koksofen-Industrie, als Schornsteinfeger^{101,102} oder als Feuerwehrmann¹⁰³ erfolgen. Meistens kommt es dabei zur Inhalation von PAKs. Außerhalb des beruflichen Sektors kann es zur Inhalation von PAKs durch CS^{104,105} oder Rauch von offenen Feuerstellen kommen. Zur oralen Einnahme von PAKs kommt es hauptsächlich durch das Verzehren von gegrilltem Fleisch.^{106,107} Des Weiteren kann es auch zu Hautkontakt mit PAKs durch verunreinigte Erde kommen.¹⁰⁸

PAKs, deren Aufnahme durch Inhalation, Verschlucken oder durch Hautkontakt erfolgt, werden anschließend in der Regel metabolisiert. Dabei entstehen oft elektrophile Produkte, die mit nukleophilen Zentren der DNA oder Proteinen reagieren und so zu kovalenten DNA-Addukten führen.⁶¹ Diese Schäden in der DNA können sich in einer nachfolgenden DNA-Replikation manifestieren und so als Mutation wirksam werden. Mutationen in kritischen Genen, wie Tumorsuppressoren oder Protoonkogenen, die in der Signaltransduktion, DNA-Reparatur, Zellproliferation und Zelldifferenzierung involviert sind, werden als Schlüsselereignisse in der Krebsentstehung angesehen. PAKs können durch Mutationen oder Genotoxizität zu Veränderungen des Erbgutes, oder auf epigenetischer Ebene zur Krebsentstehung führen.⁶⁰ Durch *in vitro* Untersuchungen mit humanen primären T-Lymphozyten, die mit BaP exponiert wurden, konnten DNA-Addukte, vor allem mit dem Diolepoxidmetabolit von BaP, und DNA-Doppelstrangbrüche

nachgewiesen werden. Zudem wurden oxidative DNA-Schäden beobachtet. Diese können durch ROS, die bei der Metabolisierung von PAKs entstehen, verursacht werden.¹⁰⁹ Eine weitere *in vitro* Studie exponierte normale humane bronchial Epithelzellen mit Diolepiden des CHR, 5-Methylchrysen, 6-Methylchrysen, Benzo[*g*]chrysen und Benzo[*c*]phenanthren, die in CS vorkommen können. Dabei konnte gezeigt werden, dass die untersuchten PAKs bis auf CHR zu DNA-Addukten führen und dabei bevorzugt Addukte mit Guanin bilden. Diese Addukte wurden auch in dem Tumorsuppressorgen p53 beobachtet, das in vielen Tumoren mutiert ist.¹¹⁰ *In vivo* Untersuchungen mit BaP in Mäusen zeigten ebenfalls vermehrt DNA-Addukte mit dem Diolepidmetabolit des BaP.^{111,112} Zudem wurden auch DNA-Strangbrüche, die bei der Reparatur der DNA-Addukte oder durch oxidative Schäden verursacht wurden, beobachtet.¹¹² Eine epidemiologische Studie in Thailand untersuchte DNA-Addukte in Leukozyten von 201 Freiwilligen, die in Raffinerien, der Stahlproduktion, der Petrochemie und der Zinnblechherstellung arbeiteten und so PAKs ausgesetzt waren. Die meisten DNA-Addukte konnten dabei bei Arbeitern in der Stahlproduktion und in Raffinerien nachgewiesen werden.¹¹³ Verschiedene Kohortenstudien in Europa, die verschiedene Berufsgruppen (wie Busfahrer, Arbeiter im Straßenverkehr oder Polizeibeamte), die schadstoffbelasteter Umgebungsluft ausgesetzt waren, untersuchten, konnten ebenfalls vermehrte PAK-DNA-Addukte oder Addukte mit Hämoglobin in den Probanden beobachten.¹¹⁴

Die Internationale Agentur für Krebsforschung (International Agency for Research on Cancer (IARC)) hat verschiedene Substanzen u. a. auch PAKs nach ihrem kanzerogenen Potential in Gruppen eingeteilt. Von den 16 PAKs, die in der EPA Liste der wichtigsten Schadstoffe aufgeführt sind, wurde BaP als kanzerogen und NAP, CHR, BbF, BkF, BaA und IcdP als möglicherweise kanzerogen für Menschen eingestuft (siehe Tabelle 1).^{55,56} PAKs treten jedoch in der Natur oft als komplexe Mischung verschiedener Einzelsubstanzen auf, von denen nicht alle kanzerogene Eigenschaften aufweisen. Dennoch ist es sinnvoll die komplexen PAK-Mischungen zu untersuchen, da es zu synergistischen Effekten der Einzelsubstanzen kommen kann.¹¹⁵ Vielfältige epidemiologische Studien untersuchten den Zusammenhang einer beruflichen PAK-Exposition mit dem Risiko an Krebs zu erkranken. So wurde ein erhöhtes Risiko beobachtet an Luftröhrenkrebs zu erkranken oder zu sterben.¹¹⁶ Zudem konnte gezeigt werden, dass Angestellte in der Aluminiumherstellung^{101,102,117}, Eisen- und Stahlproduktion^{102,117} und in der Kohlevergasung¹⁰² ein höheres Risiko haben an Lungen- und Blasenkrebs zu erkranken. Für Arbeiter in der Koksproduktion^{101,102}, der Rußherstellung¹⁰² und Schornsteinfeger^{101,102} zeigten hingegen nur ein erhöhtes Risiko für Lungenkrebs. Chen *et al.* konnten neben einem erhöhten Lungenkrebsrisiko bei Personen, die beruflich Öldämpfen ausgesetzt waren, auch ein erhöhtes Hautkrebsrisiko beobachten.¹¹⁸ Feuerwehrmänner hingegen wiesen ein höheres Risiko auf, an Dickdarmkrebs oder

an Hirntumoren zu erkranken. Das Risiko für Blasenkrebs war etwas geringer.¹¹⁹ Eine andere Studie, die 16.422 Feuerwehrmänner einschloss, zeigte, dass Feuerwehrmänner im Alter von 30-49 Jahre ein größeres Risiko aufwiesen an Prostatakrebs oder einem Melanom der Haut zu erkranken. Ab einem Alter von 70 Jahren stieg das Risiko an Hautkrebs (kein Melanom), multiplem Myelom, Adenokarzinom der Lunge oder Mesotheliom zu erkranken.¹²⁰ Zu beachten ist jedoch, dass Feuerwehrmänner neben PAKs auch anderen Kanzerogenen, wie Asbest, ausgesetzt sind.^{119,120} Sarigiannis *et al.* brachten auch PAKs, die an Feinstaubpartikel aus der Biomasseverbrennung adsorbiert sind, mit einem erhöhten Lungenkrebsrisiko in Verbindung.¹²¹ Auch über die Nahrung kann es zu einer Aufnahme von PAKs kommen. So wurden in zubereitetem Fleisch und Fisch oder in schwarzem Tee- oder Matezubereitungen PAKs nachgewiesen.¹²² Kamangar *et al.* konnten 21 PAKs (2,906–536 ng/g trockener Blätter) in getrockneten Mateblättern und in heißen und kalten Zubereitungen nachweisen.¹²³ Ob der Verzehr von Matezubereitungen, der vor allem in Südamerika eine lange Tradition aufweist, und den damit in Verbindung gebrachten Lungen-¹²⁴ und Blasenkrebs¹²⁵ als auch mit Karzinomen der oberen Luft- und Speisewege (Mund, Rachen, Kehlkopf und Speiseröhre)^{126,127} auf mögliche PAKs zurückzuführen ist, müssen zukünftige Untersuchungen belegen.

Auch das letale Potential von PAKs wurde oft untersucht. So konnte nachgewiesen werden, dass NAP, PHE, PYR, BaP und eine Mischung aus den einzelnen PAKs 72 h nach der Befruchtung zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der Mortalität von Zebrafischembryos führte. Zudem wurden teratogene Effekte, wie Entwicklungsstörungen in den Embryos beobachtet.¹²⁸ Auch für 11H-Benzo[*b*]fluoren, 4-Azapyren und Reten wurden teratogene Effekte in Zebrafischembryos nachgewiesen.¹²⁹ Weitere teratogene Effekte wurden durch PYR und Methylpyren in Medakaembryos (Japanischer Reisfisch) festgestellt. Es konnte hier eine Zunahme an kardiovaskulären Schäden, eine verminderte Aufnahme von Dottersackreserven und vermehrte Kiefer- und Wirbelsäulenverformungen beobachtet werden.¹³⁰ Neben den teratogenen Untersuchungen an tierischen Embryos wurden mehrere epidemiologische Studien durchgeführt, die die Auswirkungen von pränatalen PAK-Expositionen auf die Entwicklung von Föten und Kindern haben. So kann eine PAK-Exposition in einer frühen Schwangerschaftswoche zu Beeinträchtigungen des fetalen Wachstums führen.¹³¹ Auch die Untersuchungen von nichtrauchenden Schwangeren in Krakau, deren Exposition mit PAKs und PM_{2.5} im zweiten Schwangerschaftstrimester evaluiert wurde, zeigten, dass vor allem PAKs einen negativen Einfluss auf das Geburtsgewicht und die Größe der neugeborenen Kinder haben könnten.¹³² Eine Studie mit nichtrauchenden afroamerikanischen und dominikanischen Frauen in New York, zeigte ebenfalls, dass eine pränatale Exposition mit PAKs zu einer ungünstigen fetalen Entwicklung führt. Es wurde beobachtet, dass das Geburtsgewicht, die Größe und der Kopfumfang vermindert waren.¹³³ Zudem wurde bei dreijährigen Kindern festgestellt,

dass eine pränatale PAK-Exposition zu Beeinträchtigungen der kognitiven Entwicklung führen und dies Auswirkungen auf schulische Leistungen haben kann.¹³⁴ Auch die Kinder von kaukasischen Müttern in Polen, die während ihrer Schwangerschaft mit hohen PAK-Konzentrationen exponiert waren, zeigten im Alter von fünf Jahren einen verminderten IQ um 3,8 Punkte.¹³⁵ Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Exposition mit PAKs in der Schwangerschaft zu einem höheren Risiko an Neuralrohrdefekten führte.¹³⁶ Eine Studie mit schwangeren Frauen im Alter von 20 Jahren und älter, bei denen es beruflich zu einer Exposition mit hohen Konzentrationen an PAKs kam, zeigte bei ihren Kindern das vermehrte Auftreten von Gastroschisis (Bauchspalte).¹³⁷

2.2.4 Metabolismus der PAKs und PAKs als Biomarker

PAKs sind lipophile Substanzen mit geringer chemischer Reaktivität⁶⁰, die über passive Diffusion durch die Zellmembran in die Zelle gelangen können¹³⁸. Durch verschiedene Enzyme, vor allem im Endoplasmatischen Retikulum (ER), werden sie metabolisiert, um ihre Reaktivität und Polarität zu erhöhen, mit dem Ziel sie aus der Zelle auszuschleiden.⁶⁰ Der Prozess der PAK-Metabolisierung und Ausscheidung erfolgt im wesentlichen in drei Schritten. Im ersten Schritt wird die Reaktivität der PAKs durch verschiedene Enzyme erhöht, durch Bildung von elektrophilen Intermediaten, d. h. die entstandenen Metabolite tragen eine positive Ladung oder Partialladung.^{60,138} Diese werden im zweiten Schritt durch die Konjugation mit Glutathion, Uridindiphosphat (UDP), Glucuronsäure oder Sulfaten inaktiviert. Zusätzlich wird die Polarität der PAKs erhöht, um sie im dritten Schritt mit Hilfe von verschiedenen Transportern aus der Zelle auszuschleiden.^{60,139}

Die in der ersten Phase der PAK-Detoxifizierung ablaufenden Reaktionen, die unter der Beteiligung vieler verschiedener Enzyme stattfinden, können in drei Hauptwege unterschieden werden. Diese sind zum einen die Metabolisierung mittels CYP1A1/1B1 und Epoxidhydrolase (EH), zum anderen der Metabolismus durch Cytochrom P450 (CYP) Peroxidasen sowie die Metabolisierung durch Aldo-Keto-Reduktasen (AKR).¹³⁸ Zusätzlich können PAKs auch über embryonale Prostaglandinsynthasen oder Lipooxygenasen metabolisiert werden.¹⁴⁰ Generell werden dabei PAKs durch CYPs und andere Enzyme zu Phenolen, Catecholen oder Chinonen metabolisiert, die weiter zu Diolepiden, Radikalkationen oder reaktiven und redoxaktiven *o*-Chinone reagieren. All diese können dann z. B. mit der DNA reagieren.¹³⁸ Chinone können so z. B. mit dem N-7 des Guanins reagieren und so kovalente DNA-Addukte bilden, was zu Störungen der DNA-Replikation führen kann.¹⁴¹ PAKs können eine veränderte Methylierung von Genen induzieren¹⁴², was zu einer veränderten Genexpression führen und letztendlich zu einer Tumorentstehung beitragen kann.¹¹⁵ Neben der kovalenten Bindung an die DNA können PAK-Metabolite auch an Proteine binden¹⁴³ und so deren Funktion beeinträchtigen. Darüber hinaus können die redoxaktiven *o*-Chinon-Metabolite zu

einer Erhöhung von ROS führen und so indirekt die DNA, Lipide und Proteine schädigen, was ebenso zu Krebs führen kann.¹⁴⁴

Die bekanntesten PAK-metabolisierenden Enzyme sind die Cytochrome P450 Enzyme, die eine große Klasse von Arzneimitteln, Xenobiotika und Steroiden metabolisieren.¹³⁹ Dabei sind die Isoformen der CYP1-Familie, wie CYP1A1, CYP1A2 oder CYP1B1, die wichtigsten bei der PAK-Metabolisierung. Es handelt sich um Monooxygenasen, die ein Sauerstoffatom in das zu metabolisierende Molekül einbauen und so Epoxide bilden.^{138,145} CYP1A1 und 1B1 sind substratinduzierbar und können auf eine PAK-Exposition der Zelle reagieren. CYPs können nicht nur durch PAKs induziert werden. Sie werden auch über den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) reguliert. Dieser kann wiederum durch PAKs aktiviert werden (siehe Kapitel 2.3.1).¹⁴⁵ CYP1A1 und 1B1 weisen eine überlappende Substratspezifität auf, variieren jedoch in der Effektivität verschiedene Substrate zu metabolisieren. So ist auch die Metabolisierung durch CYP1A1 schneller als durch die Isoformen 1A2, 2C9, 3A4 und 2C19. Wahrscheinlich keine Rolle in der PAK-Metabolisierung spielen hingegen CYP2A6, 2B6, 2C8, 2D6, 2E1, 3A5, 3A7 und 4A11.¹³⁸ Nicht in allen Geweben sind alle CYP-Isoformen exprimiert, so ist CYP1A1, das sehr gut durch PAKs aktiviert wird, in der Lunge exprimiert^{146,147}, CYP1A2 jedoch nicht¹⁴⁷. CYP1B1 ist neben der Lunge¹⁴⁶ auch in anderen extrahepatischen Geweben exprimiert¹⁴⁸ und spielt eine wichtige Rolle bei der Metabolisierung von BaP, BaP-7,8-diol, Dibenzo[*a*]pyren, BaA, 7,12-Dimethylbenzo[*a*]anthracen-3,4-diol, 5-Methylchrysen und 2-Nitropyren¹³⁸. Des Weiteren ist CYP1B1 in vielen Tumoren überexprimiert und kann so als Tumormarker verwendet werden.¹³⁸

Das am häufigsten untersuchte PAK ist BaP¹³⁸, dessen Metabolisierung mittels CYP-Enzymen und der EH exemplarisch erklärt wird (siehe Abbildung 4). Im ersten Schritt erfolgt der Einbau eines Sauerstoffatoms mittels der Monooxygenasen CYP1A1 oder 1B1 in BaP, das so zu einem Epoxid, dem BaP-7,8-epoxid, metabolisiert wird. Im zweiten Schritt wird dieses reaktive Epoxid durch die EH zu einem Diol, dem BaP-7,8-dihydrodiol, hydrolysiert. Zum Schluss erfolgt der erneute Einbau eines Sauerstoffatoms durch CYP1A1, 1B1 oder 3A4 und aus BaP-7,8-dihydrodiol entsteht BaP-7,8-diol-9,10-epoxid (BPDE). Das elektrophile BPDE ist nun so reaktiv, dass es mit dem N7 des Guanins in der DNA ein kovalentes Addukt bildet, das BPDE-Desoxyguanosin, das zu Mutationen führen kann. Mutationen, die durch PAKs entstehen, wurden z.B. in dem Tumorsuppressoren p53 und dem Onkogen KRAS beobachtet.¹⁴⁹

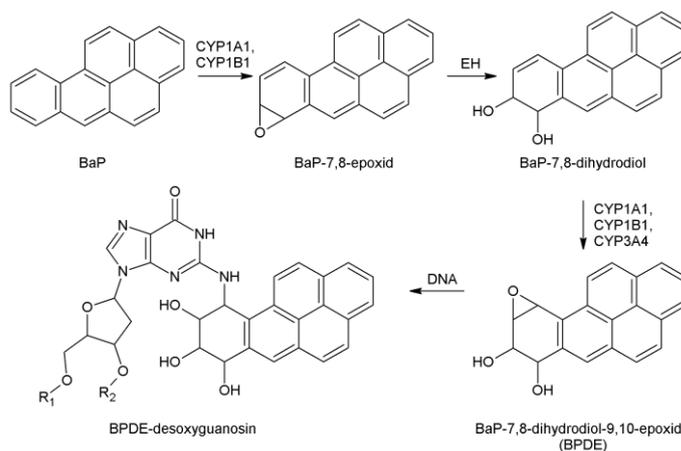


Abbildung 4: Metabolismus von Benzo[a]pyren (BaP) mittels CYP-Enzymen und der Epoxidhydrilase (EH) sowie anschließende DNA-Adduktbildung.^{138,149}

Neben der Monooxygenasefunktion können CYP-Enzyme auch Peroxidasefunktionen aufweisen.¹⁵⁰ Dabei wird eine ein-Elektronen-Oxidation katalysiert und es entsteht am Beispiel des BaP am sechsten Kohlenstoffatom ein Radikalkation (siehe Abbildung 5). Die sehr labilen Radikalkationen zeichnen sich durch eine kurze Lebensdauer aus und sind ebenfalls in der Lage Addukte mit der DNA zu bilden.¹³⁸

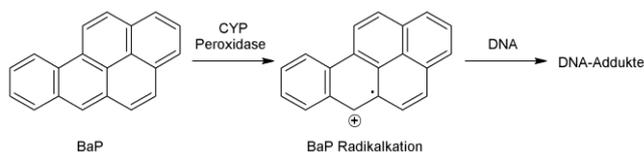


Abbildung 5: Metabolismus von Benzo[a]pyren (BaP) mittels CYP-Peroxidasen.¹⁴⁴

Eine andere Möglichkeit der PAK-Metabolisierung kann über Aldo-Keto-Reduktasen (AKR) erfolgen. Die bekanntesten AKRs aus der AKR-Superfamilie, die in diese Prozesse involviert sind, sind AKR1A1 und AKR1C1–1C4. Die AKR1A1, eine Aldehydreduktase, wird in jedem Gewebe konstitutiv exprimiert und zudem mit CYP1A1, 1B1 und der EH koexprimiert. Des Weiteren weist sie eine hohe Effektivität für die Oxidation von BaP-7,8-dihydrodiol auf.¹⁴⁴ Die AKR1C1–1C4 zeichnen sich durch eine breite Substratspezifität aus. Im Metabolismus des BaP katalysieren die AKRs die Dehydrierung von BaP-7,8-dihydrodiol zu 7,8-Dihydroxybenzo[a]pyren, einem Catechol. Obwohl AKRs bevorzugt Reduktionsreaktion katalysieren, ist in diesem Fall thermodynamisch die Oxidation zu einem aromatischen System begünstigt. Das gebildete 7,8-Dihydroxybenzo[a]pyren ist sensibel gegenüber Sauerstoff und so kommt es zu einer zweistufigen ein-Elektronen-Autooxidation, die zur Bildung eines *ortho*-Chinon, dem BaP-7,8-dion, führt (siehe Abbildung 6).¹⁵¹ Bei beiden Autooxidationsschritten kommt es zur Bildung von ROS, die wiederum DNA schädigen können und

z. B. Strangbrüche verursachen.¹⁵² Auch die reaktiven und redoxaktiven *ortho*-Chinone können mit der DNA, mRNA und Proteinen reagieren und so Schäden verursachen.¹³⁸ Bei der Anwesenheit von NAD(P)H kann das *ortho*-Chinon unter der Bildung von NAD(P)⁺ zurück reagieren zu 7,8-Dihydroxybenzo[*a*]pyren. Durch diesen Redoxkreislauf ist es möglich, dass erneut BaP-7,8-dion und zusätzlich neue ROS entstehen können und so weiter.¹⁵¹

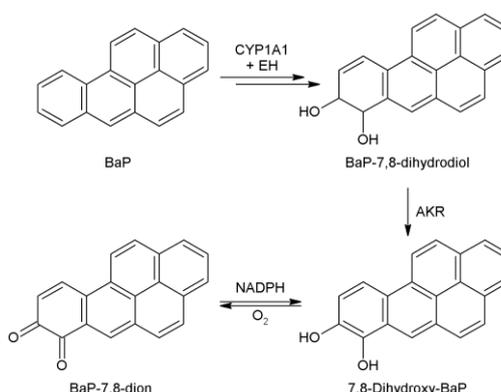


Abbildung 6: Metabolismus von Benzo[*a*]pyren (BaP) mittels Aldo-Keto-Reduktasen (AKR). Im ersten Schritt wird BaP durch CYP1A1 und einer Epoxidhydrolase (EH) zu BaP-7,8-dihydrodiol metabolisiert. Anschließend erfolgt eine AKR vermittelte Dehydrierung und es entsteht 7,8-Dihydroxy-BaP, das in einer nachfolgenden Oxidation zu BaP-7,8-dion reagieren kann. Dieses redoxaktive Chinon kann ebenfalls durch die Bildung von ROS zu oxidativen DNA-Schäden führen.¹⁴⁴

Die Mechanismen, die an der PAK-Metabolisierung beteiligt sind, stehen nicht für sich, sondern überlappen mit verschiedenen anderen Signalwegen.¹³⁹ So ist zum einen der Metabolismus der PAKs durch AKRs abhängig von der vorrausgehenden Metabolisierung durch CYP-Monooxygenasen und der EH.¹⁵¹ Zum anderen können Elektrophile und ROS, die bei der PAK-Metabolisierung entstehen, zu einer Induktion der Genexpression von Genen führen, die in ihrer Promotorregion ein antioxidatives Response Element (ARE) aufweisen¹⁵¹, u. a. AKRs selbst¹⁵³. Dies weist auf eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors Nrf-2 hin, da dieser an das ARE bindet und die Genexpression seiner Zielgene aktiviert.¹⁴⁴ So konnte gezeigt werden, dass BaP-7,8-dion auf Grund seiner Elektrophilie und Redoxaktivität zu einer Aktivierung der *AKR1C1* Genexpression führt¹⁵⁴, wahrscheinlich durch einen ARE-abhängigen Mechanismus¹⁵¹. Zudem ist BaP-7,8-dion ein starker Induktor des AhR¹⁵⁵, der neben der Genexpression der CYPs auch die Genexpression der *AKR1C1* reguliert.¹⁵¹ Zudem sind CYP1A1 und 1B1 neben der Metabolisierung der PAKs auch essentiell an der Metabolisierung des Estrogens beteiligt, was erklärt, dass PAKs zu einer Aktivierung des Estrogenrezeptors führen können.¹³⁹

Nachdem die Ausscheidung der PAKs aus der Zelle erfolgt ist, müssen PAKs sowie andere Xenobiotika noch aus dem Organismus ausgeschieden werden, was über den Urin in Form von

konjugierten PAK-Metaboliten erfolgen kann. Einer der am besten untersuchten PAK-Metabolite, der im Harn ausgeschieden wird, ist das 1-Hydroxypyren (1-OHP), ein Metabolit des Pyrens (PYR).⁶³ Dieser dient oft als Biomarker bei Untersuchungen einer PAK-Exposition, da PYR in allen natürlichen PAK-Mischungen vorkommt. Damit ist 1-OHP nicht nur ein Marker für die Exposition mit PYR, es korreliert auch mit der Gesamtmenge an PAKs aus allen Expositionswegen.⁶⁰ Das Basislevel von 1-OHP ist unter normalen Umständen gering, kann jedoch durch verschiedene Faktoren, wie Nahrung oder Luftqualität, variieren.¹⁵⁶ Liegt keine berufliche Exposition mit PAKs vor, liegt das Level von 1-OHP bei Nichtrauchern bei 0,04 µmol/mol Kreatin. Bei schwachen Rauchern steigt die Menge von 1-OHP bereits auf 0,2 µmol/mol Kreatin an, bei mittleren und starken Rauchern wurden Werte von 0,45 bzw. 1,16 µmol/mol Kreatin gemessen. Dies ist eine 5, 11, bzw. 28-fache Zunahme im Vergleich zu Nichtrauchern.¹⁵⁷ Da Kreatinin in nahezu konstanter Rate über den Urin ausgeschieden wird, wurden die ausgeschiedenen PAK-Konzentrationen auf Kreatin bezogen, was einen Vergleich zwischen verschiedenen Personen ermöglicht. Bei beruflichen Expositionen kann der Wert sogar um das 10 bis 100-fache ansteigen.⁶⁰ Eine Erhöhung von 1-OHP wurde auch in chinesischen Bauern beobachtet, verursacht durch die Verbrennung von Biomasse. Die 1-OHP Konzentrationen waren in den Bauern sogar größer als bei Arbeitern in der Koksproduktion.¹⁵⁸ Neben 1-OHP können auch die Metaboliten anderer PAKs, wie PHE, in humanen Urin nachgewiesen werden.⁶⁰

Neben Biomarkern im Urin können auch PAK-Protein-Addukte mit Serum Albumin oder mit Hämoglobin (Hb) als Marker für eine PAK-Exposition zu Rate gezogen werden.⁶⁰ So kann z.B. BPDE mit dem Sauerstoffatom der Carboxylgruppe von einem Aspartat des Hämoglobins hydrolysierbare Addukte bilden.¹⁵⁹ Als Biomarker sind auch Amino- oder Schwefeladdukte von Diolepiden mit Serum Albumin oder Hb geeignet.⁶⁰ *In vitro* Untersuchungen mit Serum Albumin zeigen auch, dass das Diolepid des BaP oder FLT Addukte mit Lysin oder Histidin bilden können.¹⁶⁰ In Untersuchungen mit Mäusen, die intraperitoneal mit BaP exponiert wurden, konnte zudem beobachtet werden, dass BPDE-Histidin-Addukte des Serum Albumin schneller gebildet werden als des Hb.⁶⁰

2.3 Transkriptionsfaktoren involviert in PM- und PAK-Exposition

Wie bereits erwähnt, kommt es durch die Exposition mit PM und den daran adsorbierten PAKs zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, deren Signalwege miteinander oder mit anderen Signalwegen interagieren können. Zu den wichtigen Signalwegen, die dabei involviert sind, gehören der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor Signalweg, der Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 Signalweg und der Signalweg des Hypoxie-induzierbaren Faktors-1.

2.3.1 Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor – AhR

Der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) ist ein Liganden induzierbarer Rezeptor und gehört zur Familie der bHLH PAS Transkriptionsfaktoren¹⁶¹, die in der Erkennung von umgebenden Veränderungen, wie des zirkadianen Rhythmus oder des Sauerstoffgradienten¹⁶², beteiligt sind. Der elementare Helix-Schleife-Helix (engl.: basic helix-loop-helix, bHLH) Bereich im AhR ist verantwortlich für die Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA und für Protein-Protein-Interaktionen. Der PAS Bereich (PER: engl. period circadian protein, ARNT: engl. AhR nuclear translocator, SIM: engl. single-minded protein) ist ebenfalls beteiligt an Protein-Protein-Interaktionen und wird zudem benötigt für die Bindung von Liganden.¹⁶¹ Der AhR wird in nahezu allen Geweben exprimiert und ist besonders in Leber, adipösem Fettgewebe und in Bronchialepithelzellen vorhanden.¹⁶³

Die Aktivität des AhR wird stark kontrolliert (siehe Abbildung 7). Bei Abwesenheit von Liganden befindet er sich als inaktiver Proteinkomplex im Zytoplasma der Zelle.¹⁶¹ An der Regulation des inaktiven AhR sind verschiedene Proteine beteiligt, u. a. das Hitzeschockprotein 90 (HSP90). Dieses bindet als Dimer¹⁶² an die bHLH und die PAS Regionen des AhR und ist zudem daran beteiligt, dass der inaktive Rezeptor im Zytoplasma verbleibt¹⁶¹. Zudem wird vermutet, dass es den C-terminalen Teil der PAS-Region des AhR so faltet, dass das Binden von Liganden ermöglicht wird.¹⁶² Neben HSP90 sind in dem Proteinkomplex, der den inaktiven AhR reguliert, zwei weitere Chaperone beteiligt, das AhR-interagierende Protein (AIP) und das Phosphoprotein p23.¹⁶² Das AIP, das auch als Ah-Rezeptor assoziiertes Protein 9 (ARA9) oder als Hepatitis-B Virus X-assoziiertes Protein 2 (XAP2) bekannt ist¹⁶⁴, interagiert mit der PAS-Region des AhR und HSP90¹⁶¹. Zudem vermittelt es die Bindung des Proteinkomplexes an ein Aktinfilament im Zytosol und verhindert die ubiquitinäre Degradation des AhR.¹⁶¹ Das Chaperon p23 ist wie HSP90 in allen Geweben exprimiert¹⁶⁴ und bindet sowohl an den AhR als auch an HSP90¹⁶¹. Durch die Assoziation des Proteinkomplexes mit dem

AhR wird dessen spontane Translokation in den Zellkern verhindert, wobei p23 zusätzlich die Heterodimerisierung mit ARNT hemmt.¹⁶¹

Der AhR kann durch eine Reihe von exogenen und endogenen Liganden aktiviert werden. Der am besten untersuchte exogene Ligand ist das 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzodioxin (TCDD), das als potentester halogenierte aromatische Kohlenwasserstoff (HAK) gilt.¹⁶⁴ Neben kanzerogenen und teratogenen Eigenschaften werden TCDD auch cardio-, hepato- und immuntoxische Eigenschaften zugeschrieben.¹⁶⁵ Aber auch PAKs, die mit PM oder WS assoziiert sind, können den AhR aktivieren.¹⁶⁶ Nach Bindung eines Liganden an den AhR kommt es zu einer Konformationsänderung des AhR¹⁶¹, aber nicht zu einer Dissoziation des AhR vom Proteinkomplex¹⁶⁷. Die Konformationsänderung des Rezeptors erlaubt die Bindung von Importin- β , ein Protein, das den Transport des AhR-Proteinkomplexes in den Zellkern kontrolliert und erleichtert.¹⁶¹ Sobald der AhR-Komplex im Zellkern angekommen ist, kommt es zur Freisetzung des AhR, wofür ARNT benötigt wird¹⁶⁷. Dieses konstitutive nukleäre Protein kann die AhR-HSP90-Interaktion erst dann unterbrechen, wenn ein Ligand an den AhR gebunden hat und wenn sich der AhR-Proteinkomplex im Zellkern befindet.¹⁶¹ Der nun entstandene Ligand-AhR-ARNT-Komplex kann nun an das Xenobiotika-Response-Element (XRE), auch bekannt als AhR- oder Dioxin-Response-Element (AHRE bzw. DRE), der DNA binden und so die Genexpression von Genen mit diesem Motiv in der Promotorregion regulieren.¹⁶⁸ Gene, die durch den AhR reguliert werden, sind u. a. involviert in den Xenobiotika-Metabolismus, wie *CYP1A1* oder *CYP1B1*.¹⁴⁹

Die Regulation des aktivierten AhR kann auf verschiedenen Wegen erfolgen, so kann zum einen der Ligand durch die AhR regulierten CYP-Enzyme metabolisiert werden, die dann unter Umständen nicht mehr in der Lage sind an den Rezeptor zu binden.¹⁶¹ Wahrscheinlich sind jedoch einige PAK-Metabolite dennoch potente AhR-Liganden.¹⁶⁹ Zum anderen kann auch der freie Rezeptor durch proteasomale Degradation abgebaut werden. Ein weiterer Mechanismus, der zur Hemmung des aktiven AhR führt, wird durch den AhR-Repressor (AhRR) vermittelt. Dessen Genexpression wird ebenfalls durch den AhR reguliert und stellt somit eine negative Rückkopplung dar.¹⁶¹ Da der AhRR im Vergleich zu AhR eine größere Affinität hat an ARNT zu binden, kann dieser AhR aus dem Komplex mit ARNT verdrängen und so die DNA-Bindung von AhR verhindern.¹⁷⁰

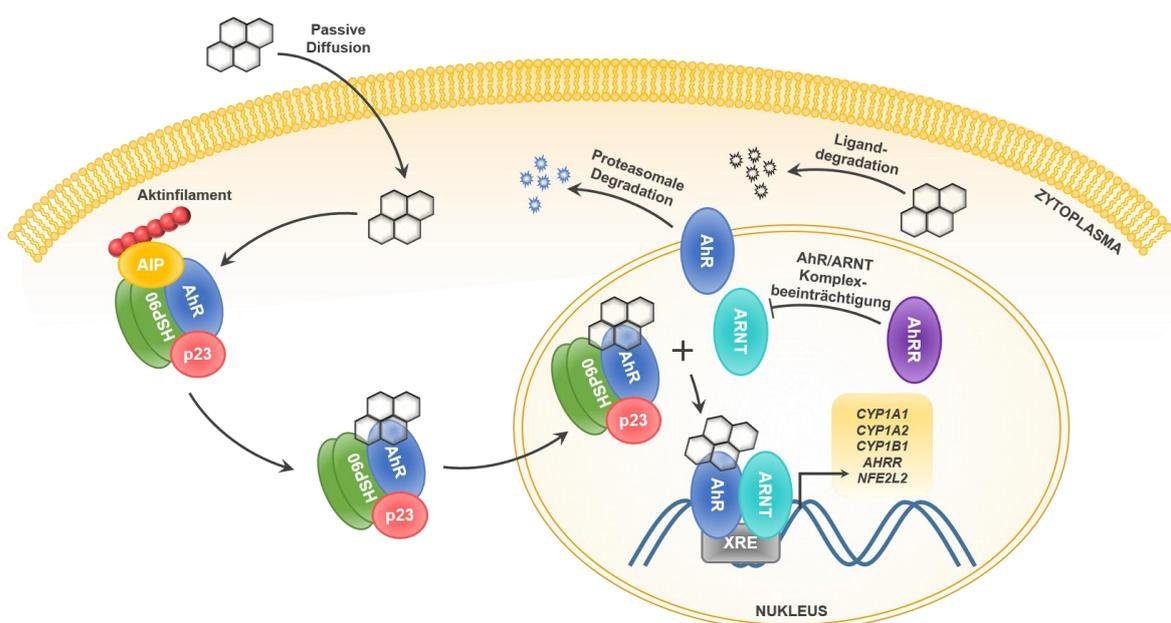


Abbildung 7: Regulation des AhR Signalwegs. Unter normalen basalen Bedingungen, wenn kein Ligand an den AhR gebunden ist, befindet sich der Transkriptionsfaktor als inaktiver Proteinkomplex im Zytoplasma. Dieser Proteinkomplex besteht aus drei Chaperonen, einem Homodimer des Hitzeschockproteins 90 (HSP90), dem AhR-interagierenden Protein (AIP) und dem Phosphoprotein p23. Durch die Assoziation des AhR mit dem Komplex wird die spontane Translokation des Transkriptionsfaktors in den Zellkern verhindert, was durch die Bindung von AIP an ein Aktinfilament zusätzlich unterstützt wird. Sobald es zur Bindung eines Liganden an den AhR kommt, erfolgt die Translokation des AhR-Protein-Komplexes in den Zellkern. Im Nukleus kommt es dann durch die Assoziation des AhR mit seinem Partnerprotein AhR nuclear translocator (ARNT) zur Freisetzung des AhR aus dem Komplex. Das Heterodimer aus AhR und ARNT kann nun an das Xenobiotika-Response-Element (XRE) der DNA binden und die Transkription verschiedener Gene regulieren. Gene, die durch den AhR reguliert werden, kodieren u. a. für Proteine die für den Metabolismus von Xenobiotika verantwortlich sind (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1), den AhR-Repressor AhRR und Transkriptionsfaktoren wie Nrf-2. Die Regulation des aktiven AhR kann auf verschiedene Weise erfolgen, zum einen kann der AhRR den AhR aus dem Heterodimer verdrängen, wodurch die transkriptionelle Aktivität des Transkriptionsfaktors unterbunden wird und zum anderen kann der AhR proteasomal degradiert werden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass es zur Degradation des Liganden kommt.¹⁶¹

Viele Effekte des AhR resultieren durch Interaktionen mit anderen Signalwegen. So kann der Xenobiotika-Response-Signalweg via des AhR z. B. mit dem Antioxidans-Response-Signalweg über Nrf-2 interagieren.¹⁷¹ Dies kann zum einen dadurch erfolgen, dass Zielgene des AhRs, wie z. B. CYPs, verschiedene Signale, wie ROS, produzieren, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf-2 führen.¹⁵¹ Zum anderen weisen einige Gene, wie *NQO1* (codiert für die NAD(P)H Chinon-Dehydrogenase 1), in ihrer Promotoregion sowohl ein XRE als auch ein antioxidative Response Element (ARE) auf. So können einige Gene durch beide Transkriptionsfaktoren reguliert werden. Zudem können beide Transkriptionsfaktoren gegenseitig ihre Genexpression regulieren.¹⁷¹ Ein anderer Signalweg, mit dem der AhR interagieren kann, ist u. a. der Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (engl., NF- κ B) Signalweg, der eine wichtige Rolle in der angeborenen und adaptiven Immunantwort spielt. Eine weitere Interaktion konnte auch mit dem Liver X receptor (engl., LXR) beobachtet werden. Dieser Transkriptionsfaktor

reguliert zum einen den Metabolismus von Cholesterol und Fettsäuren und zum anderen ist er an der Differenzierung von T-Zellen beteiligt.¹⁶¹

Die Beteiligung des AhR an der durch Feinstaubpartikel oder Holzrauch verursachten Toxizität wurde oft untersucht.^{172–174} Dabei wurde oftmals die veränderte Genexpression von *CYP1A1* als Marker einer AhR-Aktivierung genutzt.^{80,166,175} So wurde die Erhöhung der CYP1A1 Expression in A549 Zellen nach Exposition mit Holzrauchpartikeln (engl.: wood smoke particle, WSP) auf eine Aktivierung des AhR zurückgeführt. Für die Aktivierung des AhR wurden PAKs, die an Feinstaubpartikel gebunden waren, verantwortlich gemacht. Besonders dabei war auch, dass BaP allein schwächere Effekte hervorruft als der WSP-gebundene PAK-Mix. Eine Ursache dafür könnte sein, dass die Partikel als Transporteur der PAKs in die Zelle dienen und so zu einer höheren intrazellulären PAK-Konzentration führen.⁸⁰ Auch verschiedene Genexpressionsanalysen, bei denen verschiedene Zelllinien mit PM exponiert wurden, weisen auf die Beteiligung des AhR an den durch Feinstaub aktivierten molekularen Prozessen hin. So ergab eine Signalweganalyse, die auf der Basis einer Genexpressionsanalyse von BEAS-2B nach der Exposition mit PM_{2.5} aus der Umgebungsluft durchgeführt wurde, dass wahrscheinlich der AhR der aktivste Transkriptionsfaktor nach Nrf-2 ist und dies eine Antwort auf die in der Umgebungsluft vorhandenen PAKs ist.¹⁷⁶ Eine weitere globale Genexpressionsanalyse von A549 nach der Exposition mit städtischem Feinstaub ergab, dass viele Zielgene des AhR differentiell exprimiert sind und PAKs Schlüsselaktivator des AhR waren.¹⁷⁷ Auch die Genexpressionsanalyse von A549, die mit Mailänder PM_{2.5} exponiert wurden, ergab, dass viele Gene, die eine wichtige Rolle in der Antwort auf Xenobiotika spielen, verändert exprimiert waren. Zudem verursacht der Feinstaub, der im Winter gesammelt wurde, eine höhere Produktion von ROS und mehr DNA-Schäden als der Sommer-Feinstaub. Zurückzuführen ist dies wahrscheinlich auf eine Aktivierung der CYP-Enzyme, die durch partikelgebundene PAKs hervorgerufen wurde.¹⁷³ Auch die Untersuchungen mit humanen Keratinozyten konnten zeigen, dass es nach der Exposition mit städtischen PM_{2.5} zu einer Erhöhung der ROS-Produktion und einer Induktion der NADPH-Oxidase kam. Dies konnte durch die Verwendung eines AhR-Antagonisten reduziert werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die nachfolgende Induktion der Cyclooxygenase 2 (COX2) und die Produktion von Prostaglandin E2 (PGE2) AhR abhängig waren.¹⁷⁸ Auch antiapoptotische Effekte wurden mit der Aktivierung des AhR in Verbindung gebracht, was nach der Exposition von BEAS-2B mit städtischen Feinstaub beobachtet werden konnte. Vermutlich kam es zu einer AhR induzierten Expression von Genen, die die mitochondriale Membranpermeabilisierung vermindern und so apoptotische Vorgänge hemmen.¹⁷⁹ All die verschiedenen miteinander interagierenden Signalwege, die durch eine Feinstaubexposition induziert und aktiviert wurden, verweisen auf eine hohe Komplexität der ablaufenden molekularen Mechanismen.

2.3.2 Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 – Nrf-2

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der durch PM oder indirekt durch PAKs aktiviert werden kann, bzw. der durch den AhR beeinflusst werden kann, ist der nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (engl., Nrf-2). Dieser reguliert die Genexpression von basalen oder induzierbaren Genen. Die mehr als 250 Gene, die durch Nrf-2 positiv oder negativ reguliert werden¹⁸⁰, sind an vielen zellulären Prozessen, wie Detoxifizierung, Redoxhomöostase, Hämmetabolismus, Autophagie, Lipid- und Glucosemetabolismus, beteiligt¹⁸¹.

Nrf-2 gehört zur Familie der cap'n'collar basic leucin zipper (engl., CNC-bZIP) Transkriptionsfaktoren und besitzt sieben verschiedene Nrf-2-ECH homologe (Neh) Bereiche unterschiedlicher Funktion.¹⁸⁰ Der Neh1 Bereich weist die CNC-bZIP Region des Transkriptionsfaktors auf und ist verantwortlich für die Dimerisierung mit den small Maf Proteinen¹⁸² und die DNA-Bindung. Somit ist dieser Bereich essentiell für die Funktion des Transkriptionsfaktors¹⁸¹. Einer der wichtigsten Bereiche um die Aktivität von Nrf-2 negativ zu kontrollieren ist die Region Neh2. An diese bindet das Kelch ähnliche ECH-assoziierte Protein 1 (engl.: Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1), das für die negative Kontrolle des Transkriptionsfaktors und dessen Verbleib im Zytosol verantwortlich ist.¹⁸³ Neh3 ist die C-terminale Region von Nrf-2 und ist an dessen transkriptioneller Aktivierung beteiligt.¹⁸⁰ Die Bereiche Neh4 und Neh5 repräsentieren Transaktivierungsbereiche, an die Koaktivatoren binden können und so synergistisch die Rate der Gentranskription erhöhen.¹⁸⁴ Die negative Kontrolle von Nrf-2, die unabhängig von Keap1 und redoxunabhängig erfolgt, spielt sich in der Neh6 Region ab.¹⁸⁵ Die noch nicht solange bekannte Region Neh7 kann eine direkte Protein-Protein Interaktion mit der DNA-bindenden Domäne des Retinoid X Rezeptors (RXR) eingehen, was zu einer Repression der Nrf-2-Aktivität führt. Dies erfolgt durch die Hemmung der Bindung von Koaktivatoren an die Neh4 und Neh5 Region.¹⁸⁶

Um die Nrf-2 Aktivität bei Vorhandensein verschiedener Stimuli anzuschalten bzw. abzuschalten sobald die Stimuli entfernt sind, sind verschiedene Regulierungsmechanismen nötig (siehe Abbildung 8).¹⁸⁷ So wird die Aktivität von Nrf-2 unter normalen basalen Bedingungen durch das dimere Protein Keap1 gehemmt.¹⁸¹ Dafür bindet ein Homodimer von Keap1 an die Neh2 Region des Transkriptionsfaktors.¹⁸³ Dies begünstigt die Übertragung von Ubiquitin auf Nrf-2 durch den Cul3 RING-box 1 E3 Ubiquitin-Ligase Komplex¹⁸⁸, wodurch es zu einer Degradation des Transkriptionsfaktors durch das 26S Proteasom kommt¹⁸⁹. Zudem wird durch die Interaktion von Keap1 mit einem Aktin-Filament des Zytoskeletts die Translokation von Nrf-2 in den Zellkern verhindert.¹⁹⁰ Keap1 ist ein sehr Cystein reiches Protein, dessen Cysteine durch oxidativen Stress oder durch elektrophile Stimuli modifiziert werden können. Die daraus resultierende

Modifikationsänderung verhindert die Ubiquitinierung und die nachfolgende Degradation von Nrf-2, dadurch bleibt Keap1 mit Nrf-2 verbunden und neu translatiertes Nrf-2 kann im Zytosol akkumulieren.¹⁸⁷ Es kommt nun zu einer Translokation von Nrf-2 in den Zellkern¹⁸⁷, wo der Transkriptionsfaktor Heterodimere mit small musculoaponeurotic fibrosarcoma (engl., sMaf) Proteinen, MafF, MafG oder MafK, bildet¹⁸¹. Diese sind nötig, damit Nrf-2 an das antioxidative Response Element (ARE) in der Promotorregion seiner Zielgene binden kann.¹⁹¹ Gene, die ein ARE-Element in ihrer Promotorregion aufweisen, sind u. a. an einer zellulären Antwort auf oxidativen Stress beteiligt. Dazu gehören Gene, die an der Glutathion (GSH) Synthese oder der NADPH Synthese beteiligt sind. Aber auch andere Gene, die für Proteine kodieren, die z. B. im Metabolismus von Xenobiotika beteiligt sind, wie AKRs, oder im Häm-Metabolismus eine Rolle spielen, wie die Hämoxxygenase-1 (HO-1), werden von Nrf-2 reguliert.¹⁸⁰

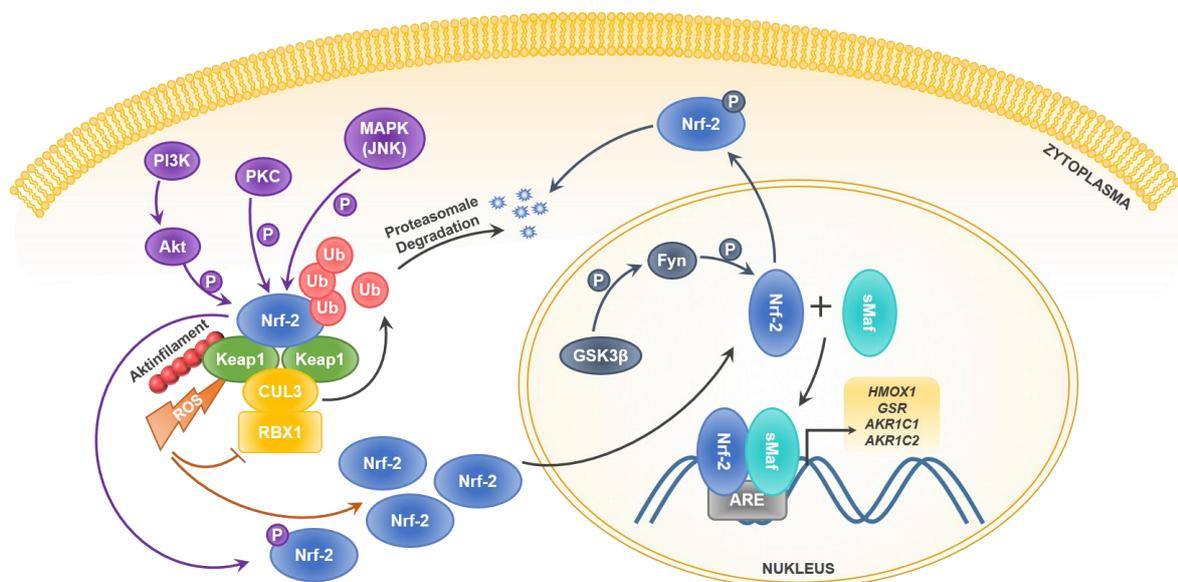


Abbildung 8: Regulation des Nrf-2 Signalwegs. Unter basalen Bedingungen liegt der Transkriptionsfaktor Nrf-2 im Zytosol in einem inaktiven Proteinkomplex vor. Dieser, gebildet aus einem Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) Homodimer und des Cul3 RING-box 1 E3 Ubiquitin-Ligase Komplex, ist verantwortlich für den Verbleib von Nrf-2 im Zytosol sowie dessen Ubiquitinierung und nachfolgender proteasomalen Degradation. Verschiedene Stimuli, wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS), können die Cysteine im Keap1 modifizieren, wodurch es zu einer Konformationsänderung von Keap1 kommt. Dadurch kann eine Ubiquitinierung und die nachfolgende Degradation von Nrf-2 nicht mehr stattfinden, wodurch Keap1 mit Nrf-2 verbunden bleibt. Die daraus folgende Akkumulation von neu synthetisiertem Nrf-2 ermöglicht die Translokation des Transkriptionsfaktors in den Zellkern. Neben diesem Regulationsmechanismus kann Nrf-2 auch von mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK), der Proteinkinase C (PKC) oder durch die Phosphatid-3-Kinase/Proteinkinase B (PI3K/Akt) reguliert werden. Diese Kinasen sind in der Lage Nrf-2 zu phosphorylieren, wodurch dieses dann aus dem Proteinkomplex freigesetzt wird und anschließend in den Zellkern translozieren kann. Im Nukleus bildet Nrf-2 ein Heterodimer mit small Maf (sMaf) Proteinen. Dieses Heterodimer ist nun in der Lage an das antioxidative Response Element (ARE) in der DNA zu binden und die Transkription verschiedener Zielgene zu aktivieren. Nukleäres Nrf-2 kann durch die Glykogen-Synthase-Kinase 3 β (GSK3 β) und dem nachgeschalteten Fyn reguliert werden. Es kommt zu einer Phosphorylierung von Nrf-2, wodurch der Transkriptionsfaktor aus dem Zellkern transportiert wird und schlussendlich degradiert wird.^{181,187}

Neben der Regulation von Nrf-2 über Keap1 gibt es auch Keap1-unabhängige Mechanismen, die Nrf-2 regulieren. So kann eine Phosphorylierung von Nrf-2 an verschiedenen Serinen, Threoninen oder Tyrosinen durch verschiedene Kinasen, wie den mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAP-Kinasen), der Proteinkinase C (PKC) oder durch den Phosphatid-3-Kinase/Proteinkinase B (PI3K/Akt) Signalweg, zu einer Dissoziation von Keap1 und zu einer Translokation von Nrf-2 in den Zellkern führen.¹⁸⁷ Eine Phosphorylierung von nukleärem Nrf-2, vermittelt durch die Glykogen-Synthase-Kinase 3 β (GSK3 β) und dem nachgeschalteten Fyn, führt hingegen zu einem Export von Nrf-2 aus dem Zellkern mit einer nachfolgenden Degradation.¹⁹² Auch durch microRNAs (miRNAs) oder durch die Interaktion mit anderen Proteinen kann die Aktivität von Nrf-2 posttranslational reguliert werden.¹⁸⁷

Neben der posttranslationalen Regulation von Nrf-2 kann auch die Transkription des Gens *NFE2L2*, das für Nrf-2 kodiert, reguliert werden.¹⁸¹ In der Promotorregion von *NFE2L2* befinden sich drei XRE-ähnliche Sequenzen, an die der AhR binden kann und so die Transkription des *NFE2L2*-Gens aktiviert.¹⁹³ Da PAKs den AhR aktivieren, kann man so auch von einer indirekten Aktivierung der *NFE2L2*-Transkription durch PAKs ausgehen.¹⁸¹ PAKs können somit auf eine zusätzliche Weise, neben der AhR-Aktivierung, ihren eigenen Metabolismus aktivieren, da Nrf-2 die Transkription von Genen reguliert, die für AKRs kodieren, die u.a. am Metabolismus der PAKs beteiligt sind (siehe Kapitel 2.2.4). Die durch AKRs entstehenden PAK-*o*-Chinone können ihrerseits als Ligand des AhR agieren.¹⁵¹ Neben dem XRE-Element in der Promotorregion des *NFE2L2*-Gens befinden sich dort auch zwei ARE-ähnliche Element. Nrf-2 kann somit seine eigene Gen-Transkription induzieren, was eine positive Rückkopplung im Nrf-2 Signalweg darstellt.¹⁹⁴ So kann eine schnellere Beseitigung von z. B. zellschädigendem oxidativen Stress erfolgen. Neben dem AhR und Nrf-2 selbst kann auch das Onkogen KRAS über c-Jun und c-Fos die Transkription von *NFE2L2* aktivieren.¹⁹⁵ Zudem enthält das Gen zusätzlich eine Bindestelle für NF- κ B.¹⁹⁶

Die Beteiligung von Nrf-2 an molekularen Prozessen, die durch eine Feinstaubexposition hervorgerufen werden, wurden häufig untersucht. So führte die Exposition von Lungenepithelzellen mit Flugaschepartikeln zu einer Akkumulation von Nrf-2 im Zellkern. Die Translokation von Nrf-2 in den Zellkern bewirkte eine Induktion der HO-1 und einen Anstieg des gesamten Glutathiongehaltes (GSH-Gehalt). Zudem wurde die Induktion der HO-1 auf die entstandenen ROS zurückgeführt, die durch Übergangsmetalle der wasserunlöslichen Fraktion gebildet wurden. HO-1 als auch GSH dienen dem zellulären Schutz vor oxidativem Stress.¹⁹⁷ Auch die Exposition von A549 Zellen mit städtischen PM_{2,5} führte über die PI3K/Akt zu einer Aktivierung von Nrf-2, was ebenfalls zu einer Induktion der antioxidativen Proteine HO-1 und NAD(P)H Chinon-Dehydrogenase 1 führte.¹⁹⁸ In A549 Zellen konnte zudem gezeigt werden, dass Nitro-PAKs, 1-Nitropyren und 3-Nitrofluoranthren, gebunden an städtischem Feinstaub zu einer Erhöhung der Nrf-2

Proteinexpression und Nrf-2 Translokation sowie der Induktion von Nrf-2 Zielgenen führte.¹⁹⁹ Ghio *et al.* konnten nachweisen, dass in BEAS-2B Zellen WSP zelluläres Eisen sequestrieren und so die zelluläre Metall-Homöostase beeinflussen. Der daraus resultierende oxidative Stress führte zur Aktivierung der MAP-Kinasen und anschließend zur Aktivierung von Nrf-2.²⁰⁰ In humanen Bronchialepithelzellen führte Feinstaub ebenfalls zu einer Translokation von Nrf-2 in den Zellkern. Verantwortlich dafür ist wahrscheinlich der Eisenanteil der Partikel. Die Aktivierung von Nrf-2 führte ebenfalls zur Expression der antioxidativen Gene *HMOX1*, *NQO1* und *GPX1* (codiert für die Glutathion Peroxidase 1). Zudem werden von Nrf-2 auch Gene reguliert, die für Proteine codieren, die den Zelltod kontrollieren, wie Bcl2, BAX und p53. Durch die Aufrechterhaltung der GSH-Spiegel wird die Redox-Homöostase reguliert was u. a. zur Hemmung der mitochondrialen Membranpermeabilität führt und so Apoptose verhindern kann. Dieser durch Nrf-2 vermittelte antiapoptotische Effekt kann zur Entstehung von Krebs beitragen.²⁰¹ Auch verschiedene Genexpressionsanalysen konnten nach Feinstaubexposition zeigen, dass es zu einer veränderten Expression von vielen Genen, die für Phase II detoxifizierende Enzyme codieren und Nrf-2-Zielgene darstellen, kommt. Die darauf folgenden Analysen der Genexpressionsdaten konnten so eine Beteiligung des Nrf-2 Signalwegs an den durch PM verursachten Prozessen voraussagen.^{176,202,203}

2.3.3 Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 – HIF-1

Für normale physiologische Vorgänge sowie einen aeroben Stoffwechsel ist es wichtig, dass die Sauerstoff-Homöostase aufrechterhalten wird. Zu einem Ungleichgewicht des Sauerstoffgehalts, also zu Sauerstoffmangel, kann es bei einigen pathologischen Prozessen und Erkrankungen, wie soliden Tumoren, Schlaganfall, Herzerkrankungen und chronischer obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) kommen.²⁰⁴ Der Hypoxie induzierbare Faktor-1 (HIF-1) ist ein Transkriptionsfaktor, der Teil komplexer molekularer Mechanismen ist, die bei vorliegendem Sauerstoffmangel (Hypoxie) zum Tragen kommen.²⁰⁵ Durch die Induktion von HIF-1 werden dabei über 60 Gene reguliert²⁰⁵, die bei der Anpassung oder beim Überleben von Zellen, Geweben oder Organen unter sauerstoffarmen (~1% O₂) oder normalen (~20% O₂) Bedingungen involviert sind²⁰⁶. Diese Gene können an Prozessen, wie Metastasierung, Angiogenese, Resistenz gegen Tumorthérapien, Zellproliferation oder Glucosemetabolismus, beteiligt sein.²⁰⁵

Der Transkriptionsfaktor HIF-1 besteht aus einem Heterodimer, dessen Untereinheiten zum einen HIF-1 α und zum anderen das konstitutiv exprimierte HIF-1 β sind.²⁰⁵ HIF-1 β ist auch bekannt als ARNT²⁰⁴, dass mit dem Liganden gebundenen AhR ein Heterodimer bildet und AhR Zielgene aktiviert¹⁶¹ (siehe Kapitel 2.3.1). Beide Untereinheiten des HIF-1 weisen wie der AhR in ihrer Struktur einen bHLH-PAS Bereich auf, der wichtig für die Heterodimerbildung von HIF-1 α und

HIF-1 β und die Bindung an das Hypoxie-Response-Element (HRE) in der DNA ist.²⁰⁴ Des Weiteren verfügen die beiden Untereinheiten noch über einen weiteren Bereich, eine transaktivierende Domäne (TAD), die für die transkriptionelle Aktivität verantwortlich ist. HIF-1 α besitzt zwei von diesen, eine am N-terminalen Ende (TAD-N) und eine am C-terminalen Ende (TAD-C), die die Koaktivatoren p300/CBP binden.²⁰⁵ HIF-1 β weist hingegen nur eine TAD Region am C-terminalen Ende auf.²⁰⁷ Zusätzlich dazu besitzt HIF-1 α eine sauerstoffabhängige Degradationsdomäne (engl.: oxygen-dependent degradation domain, ODDD) auf, die bei der sauerstoffabhängigen Regulation von HIF-1 α benötigt wird.²⁰⁴

HIF-1 α wird konstitutiv transkribiert, synthetisiert und bei normalen Bedingungen degradiert.^{208,209} Bei hypoxischen Bedingungen wird HIF-1 α durch verschiedene Signalwege kontrolliert und stabilisiert, so dass es in den Zellkern translozieren kann und dort mit HIF-1 β den transkriptionell aktiven Transkriptionsfaktor HIF-1 bildet.²⁰⁵ Die verschiedenen posttranskriptionären Modifikationen, die HIF-1 α regulieren, umfassen Hydroxylierung, Acetylierung, Ubiquitinierung und Phosphorylierung.^{205,207}

Unter normalen Bedingungen werden zwei Proline (P402 und P564) in der ODDD-Region des HIF-1 α ²⁰⁴ durch Prolyl-4-hydroxylasen (PHDs) auch bekannt als HIF-1-Prolylhydroxylase (HPH) hydroxyliert^{205,210,211}. Da diese Reaktion auf die Anwesenheit von Sauerstoff angewiesen ist, läuft dies nur unter nicht hypoxischen Bedingungen ab.^{205,211} Eine weitere Modifikationsreaktion ist die Acetylierung eines Lysins (K532), ebenfalls in der ODDD-Region, durch eine Acetyltransferase (engl.: arrest-defective-1, ARD1). Für den Ablauf dieser Reaktion ist kein Sauerstoff nötig, dennoch ist die Reaktion abhängig vom Sauerstoffgehalt, da die Expression des Gens, das für die ARD1 kodiert, nicht bei Sauerstoffmangel erfolgt.²¹² Durch die Hydroxylierung der Proline und der Acetylierung des Lysins kann das von Hippel-Lindau Protein (pVHL) an HIF-1 α assoziieren.^{212,213} Dieser Tumorsuppressor ist Teil der E3 Ubiquitin-Protein-Ligase und fördert somit die Übertragung von Ubiquitin auf HIF-1 α .²¹⁴ Dadurch wird HIF-1 α schlussendlich durch das 26S Proteasom degradiert. Unter hypoxischen Zuständen können die Hydroxylierungs- und Acetylierungsreaktionen nicht ablaufen, was zu einer Stabilisierung von HIF-1 α führt. Ein anderer HIF-1 α regulierender Mechanismus, der zwar unabhängig von pVHL abläuft, aber dennoch abhängig vom Sauerstoffgehalt ist, erfolgt durch eine Asparaginyhydroxylase²⁰⁵. FIH-1 (engl.: factor inhibiting HIF-1) hydroxyliert in einer sauerstoffabhängigen Reaktion ein Asparagin (N803) in der C-TAD Region von HIF-1 α , dadurch können die Koaktivatoren p300/CBP nicht mehr binden²¹⁵ und die nachfolgende Induktion der Genexpression ist nicht möglich.

Neben den sauerstoffabhängigen Regulationsmechanismen können auch sauerstoffunabhängige Mechanismen die Stabilität von HIF-1 α regulieren. Diese können durch Wachstumsfaktoren,

Zytokine oder durch andere Signalmoleküle aktiviert werden und zu einer Akkumulation von HIF-1 α führen.²⁰⁵ Die Signalmoleküle können zum einen die PI3K, die wiederum Akt induziert, aktivieren.²¹⁶ Akt kann dann mTOR (engl.: mechanistic target of rapamycin) aktivieren, das zum einen die p70 S6 Kinase (S6K), ein ribosomales Protein, phosphoryliert oder zum anderen den eukaryotischen Translation-initiiierende-Faktor-4E (eIF-4E) bindende Protein (4E-BPI) phosphoryliert. Durch die Phosphorylierung von 4E-BPI kann eIF-4E von diesem dissoziieren und ebenfalls, wie die S6K, zu einer Erhöhung der HIF-1 α Translation führen.²¹⁷ Zum anderen können die Signalmoleküle aber auch über die RAS/RAF/MEK/ERK-Kaskade²¹⁸ die Phosphorylierung von S6K und 4E-BPI induzieren und so ebenfalls die HIF-1 Proteinsynthese aktivieren²⁰⁵. Zudem kann ERK auch die Koaktivatoren p300/CBP phosphorylieren, was die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 erhöht.²¹⁹

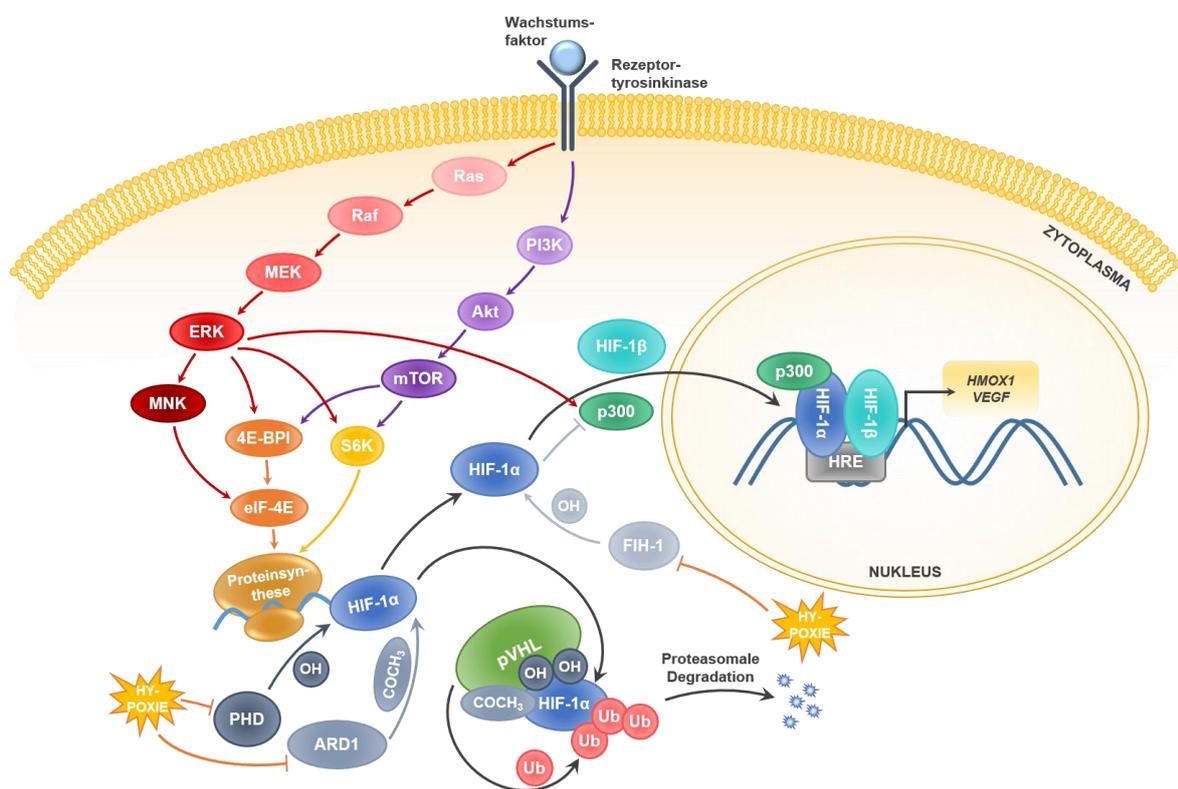


Abbildung 9: Regulation des HIF-1 Signalwegs. Unter normoxischen Zuständen wird HIF-1 α durch Prolyl-4-hydroxylasen (PHDs) hydroxyliert oder durch die Acetyltransferase ARD1 acetyliert. Dadurch kann das von Hippel-Lindau Protein (pVHL) an HIF-1 α binden, wodurch dessen Degradation begünstigt wird. Zudem kann HIF-1 α durch die Asparaginyhydroxylase FIH-1 hydroxyliert werden, was die Assoziation von Koaktivatoren (p300/CBP) und die daraus resultierende transkriptionelle Aktivität von HIF-1 α hemmt. Da diese Vorgänge direkt bzw. indirekt Sauerstoff benötigen, werden diese unter hypoxischen Zuständen unterbunden und HIF-1 α kann zusammen mit dem konstitutiv exprimierten HIF-1 β und p300 in den Zellkern translozieren. Dort kann der Transkriptionsfaktor HIF-1, Heterodimer aus HIF-1 α und HIF-1 β , an das Hypoxie-Response-Element (HRE) in der DNA binden und die Transkription verschiedener Zielgene regulieren. Auch Wachstumsfaktoren und andere Signalmoleküle können HIF-1 α regulieren. Diese können über die Ras/Raf/MEK/ERK Kaskade oder über den PI3K/Akt/mTOR Signalweg die Proteinsynthese von HIF-1 α positiv stimulieren.^{205,207}

Eine Beteiligung von HIF-1 oder Hypoxie an den durch Feinstaub aus der Umgebungsluft oder aus Verbrennungsprozessen und WSP verursachten molekularen Vorgängen wurde bisher noch nicht untersucht. Bekannt ist jedoch, dass Cobalt-Nanopartikel oder freie Cobaltionen zu einer Aktivierung von HIF-1 führen können.^{220,221} In humanen Keratinozyten verursachten Wolfram-Cobalt-Karbid Nanopartikel transkriptionelle Veränderungen, die ähnlich zu den Veränderungen von freien Cobaltionen waren. Einige Gene, die mit einem Response auf Hypoxie assoziiert sind und in der Glykolyse und der Glukoneogenese involviert sind, sind zudem Zielgene von HIF-1 und wurden verändert exprimiert.²²¹ Die Aktivierung von HIF-1 unter normalen Bedingungen wurde durch eine Stabilisierung der HIF-1 α Untereinheit durch verschiedene Metallionen²²², wie auch Cobalt²²³, verursacht. In THP-1 Zellen führten Cobalt-Nanopartikel zu einer Aktivierung von HIF-1 und zur nachfolgenden Genexpression des HIF-1 Targetgenes *VEGF*.²²⁰ Auch im Zusammenhang mit CS konnte eine Aktivierung von HIF-1 beobachtet werden.²²⁴⁻²²⁶ In A549 und BEAS-2B Zellen führte die CS vermittelte HIF-1 Aktivierung zu einem phänotypischen Shift der beiden Zelllinien. Zudem konnte gezeigt werden, dass HIF-1 an epithelial-mesenchymalen Transitions (EMT)-Prozessen beteiligt war. Diese Prozesse spielen u. a. in der Metastasierung von Tumoren und in der Migration eine Rolle. Zudem kann die EMT zu einer Matrixumbildung beitragen, was u. a. bei COPD zur Beeinträchtigung der Luftzufuhr führt.²²⁴ Ein Schlüsselereignis der COPD ist die Hypersekretion von Schleim. Ein Hauptbestandteil des Schleims der Atemwege ist das Mucin 5AC (codiert von *MUC5AC*), das von HIF-1 reguliert wird. In humanen Bronchialepithelzellen konnte nach der Exposition mit CS gezeigt werden, dass es über den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (engl.: epidermal growth factor receptor, EGFR) zu einer Aktivierung von HIF-1 mit nachfolgender Expression von *MUC5AC* kommt.²²⁵

2.4 Zielsetzung

Feinstaub (PM) ist eine ernsthafte Umweltbelastung mit gesundheitlichen Auswirkungen für lebende Organismen, wobei auch der Feinstaub, der im Zuge der Verbrennung von Biomasse entsteht, eine Rolle spielt. So konnte bereits ein Zusammenhang zwischen einer PM Exposition und verschiedenen gesundheitlichen Problemen, wie Atemwegserkrankungen, festgestellt werden. Da die krankhaften und molekularen Mechanismen, die durch eine PM Exposition verursacht werden, bisher noch nicht ausreichend untersucht sind, war es das Ziel dieser Arbeit, die kurzfristigen biologischen Auswirkungen von $PM_{2.5}$ aus der Biomasseverbrennung auf THP-1 Makrophagen sowie die Effekte auf das Methylom und das Transkriptom langzeitexponierter BEAS-2B zu analysieren.

Dafür sollte untersucht werden, welchen Einfluss $PM_{2.5}$ auf die Viabilität und metabolische Aktivität von THP-1 Makrophagen hat. Hierzu sollten verschiedene biologische Assays zum Einsatz kommen und die Auswirkungen von $PM_{2.5}$ auf die AMPK als auch den eEF2 ermittelt werden. Darüber hinaus sollte die Fähigkeit von $PM_{2.5}$ ROS in THP-1 Makrophagen zu generieren analysiert werden. Zudem standen die zellulären Reaktionen auf den durch $PM_{2.5}$ vermittelten oxidativen Stress im Fokus. Dafür sollten verschiedene Kinasen (MAP-Kinasen und Akt) sowie die Aktivität des Transkriptionsfaktors Nrf-2 untersucht werden. Auch das Nrf-2 regulierte Peptid GSH und das antioxidative Protein HO-1 sollte als Antwort auf oxidativen Stress näher betrachtet werden. Des Weiteren sollte mittels elektronen-mikroskopischer Untersuchungen die Aufnahme von $PM_{2.5}$ in THP-1 Makrophagen sowie deren morphologische Veränderungen nach einer Kurzzeitexposition ermittelt werden.

Da Luftverschmutzung durch Feinstaub und die Exposition lebender Organismen mit PM ein Umweltfaktor ist, der zu epigenetischen Veränderungen, wie Änderungen der DNA-Methylierung, führen kann, sollte der Einfluss von $PM_{2.5}$ auf das Methylom langzeitexponierter BEAS-2B untersucht werden. Darüber hinaus sollte auch der langfristige Einfluss von $PM_{2.5}$ auf das Transkriptom dieser Zellen ermittelt werden. Um die biologische Relevanz des veränderten Methyloms zu analysieren, sollte dieser Datensatz mit den Transkriptomdaten korreliert werden. Aus dieser Schnittmenge sollten Gene mittels Datenbankanalyse identifiziert werden, die im Zusammenhang mit verschiedenen lungenabhängigen und -unabhängigen Erkrankungen stehen. Da viele epidemiologische Studien bereits einen Zusammenhang zwischen einer PM Exposition und Lungenerkrankungen feststellen konnten, sollte mittels dsRNA in langzeitexponierten BEAS-2B ein viraler Infekt simuliert und bestimmt werden, welchen Einfluss dies auf das Transkriptom $PM_{2.5}$ exponierter BEAS-2B hat. Die entsprechenden Gene sollten dann anschließend zusammen mit den

differentiell exprimierten Genen PM_{2.5} exponierter Zellen auf ihre Krankheitsrelevanz untersucht werden.

Aus den Transkriptomdaten langzeitexponierter BEAS-2B sollte zunächst in Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen untersucht werden, welche Transkriptionsfaktoren bei den differentiell regulierten Genen involviert sind. Anhand von zwei ermittelten Transkriptionsfaktoren, Ahr und HIF-1, sollte die Beteiligung an der Genexpression entsprechender Gene experimentell bestätigt werden. Hierbei sollte eine mögliche Beteiligung von PAKs, deren qualitative und quantitative Zusammensetzung von einem Kooperationspartner bestimmt wurde, analysiert werden.

3 Ergebnisse

3.1 Kurzzeitige biologische Effekte von Feinstaub aus der Biomasseverbrennung in humanen Makrophagen

Es ist bekannt, dass die Exposition mit Feinstaub zu einer negativen Beeinträchtigung der menschlichen Gesundheit führt.^{1,17,227} Die pathologischen und molekularen Prozesse, die durch eine PM_{2.5} Exposition verursacht werden, sind aber immer noch nicht ausreichend untersucht. Dies gilt im Besonderen für Feinstaubemissionen aus der Biomasseverbrennung. Um hier die Kenntnisse auf molekularer Ebene zu erweitern, wurden die Auswirkungen in THP-1 Makrophagen nach einer kurzfristigen Exposition mit PM_{2.5} aus der Biomasseverbrennung untersucht.

3.1.1 Einfluss von PM_{2.5} auf die ROS Produktion und Zellviabilität von THP-1 Makrophagen

Die Produktion von ROS und der dadurch entstehende oxidative Stress spielt eine wichtige Rolle in der Partikel-Toxizität³ und kann möglicherweise eine Ursache in einigen PM induzierten Krankheiten sein²²⁸. Untersuchungen von Dr. Regina Merk (ehemals Dornhof; Manuskript in Vorbereitung) hatten gezeigt, dass nach sechsständiger Exposition mit 100 µg/ml PM_{2.5} in differenzierten und gehungerten THP-1-Zellen die Bildung von ROS induziert wurden, und dass die Menge an ROS signifikant reduziert wurde, wenn die Zellen mit den Antioxidantien BHA (100 µM) bzw. NAC (10 µM) für 1 h vorstimuliert wurden. Die ROS-Bildung wurde mit dem DCFH-DA-Assay und anschließender FACS-Analyse ermittelt. Die DCF-Fluoreszenzwerte wurden auf unbehandelte Kontrollzellen bezogen und als relative Werte dargestellt. Zum besseren Verständnis für die nachfolgenden Untersuchungen ist dieses Ergebnis in Abbildung 10A dargestellt.

Die PM_{2.5} vermittelte ROS-Produktion kann die Zellviabilität beeinflussen und Zytotoxizität verursachen^{228,229}, da die gebildeten ROS die Zellmembran schädigen und zu einem Austritt des Zytosols und schlussendlich zu Nekrose führen können²³⁰. Um abzuklären, ob eine kurzzeitige PM_{2.5} Exposition zu zytotoxischen Effekten in THP-1 Makrophagen führt, wurden gehungerte THP-1 Makrophagen mit 1, 10, 50 und 100 µg/ml PM_{2.5} exponiert. Nach 24 h wurde die Enzymaktivität der LDH im Überstand ermittelt. Als Positivkontrolle dienten unbehandelte Zellen, die vollständig mit Triton-X 100 lysiert wurden, um so die gesamte LDH-Aktivität einer Probe zu bestimmen. Die Ergebnisse der PM_{2.5} exponierten Zellen und der unbehandelten Kontrollzellen wurden zur Positivkontrolle ins Verhältnis gesetzt. Die PM_{2.5} Exposition führte nach 24 h in THP-1

Makrophagen interessanterweise nicht zu einer Zunahme, sondern zu einer schwachen aber signifikanten Abnahme der LDH-Freisetzung (siehe Abbildung 10B).

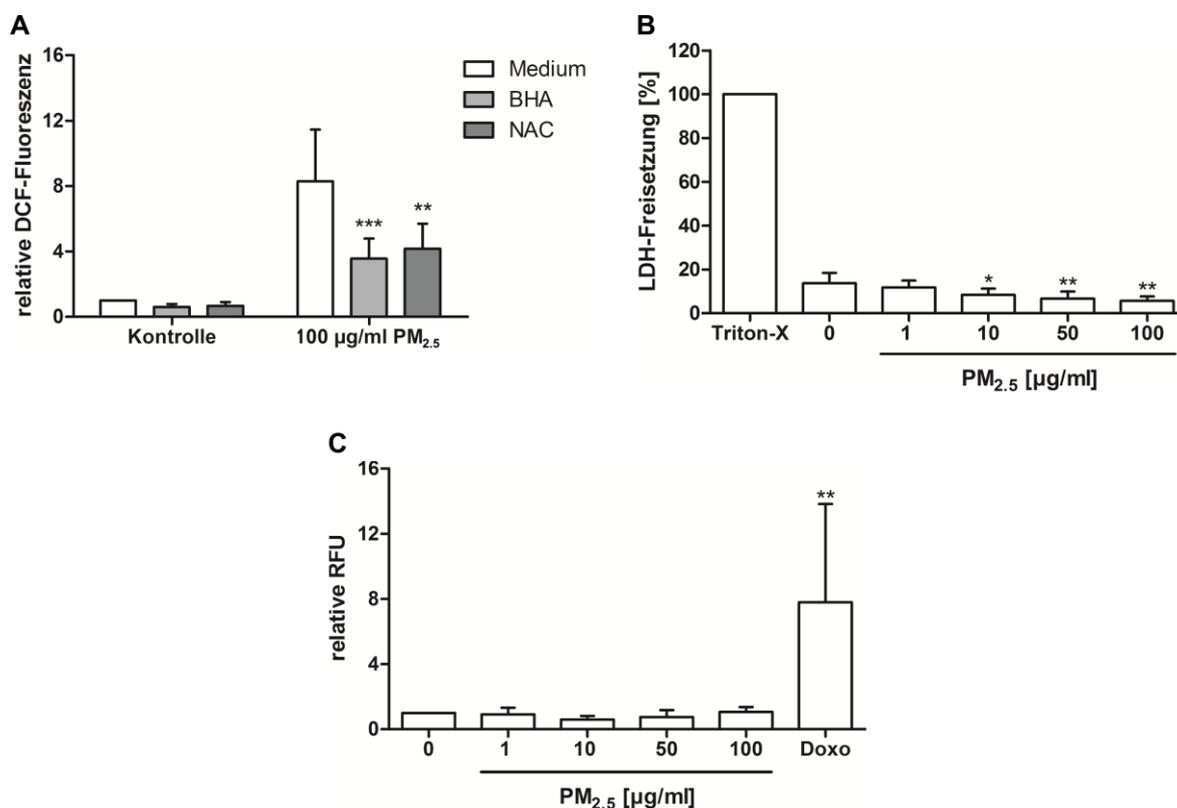


Abbildung 10: Einfluss von PM_{2.5} auf die zelluläre ROS-Bildung und der Einfluss auf die Zellviabilität von THP-1 Makrophagen. (A) Einfluss von PM_{2.5} auf die ROS-Bildung in gehungerten THP-1 Makrophagen nach einer sechsstündigen Exposition mit 100 µg/ml PM_{2.5} und der Antioxidantien BHA (100 µM) und NAC (10 µM). Die ROS-Bildung wurde mit dem DCFH-DA-Assay und der FACS-Analyse von Dr. Regina Merk (ehemals Dornhof) ermittelt (Manuskript in Vorbereitung). Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus vier unabhängigen Experimenten. (B) Einfluss von PM_{2.5} auf die Zytotoxizität von THP-1 Makrophagen. Der LDH-Assay wurde mit unbehandelten Kontrollzellen und mit PM_{2.5} (1, 10, 50 und 100 µg/ml) exponierten THP-1 Makrophagen nach 24 h durchgeführt. Von dem Überstand wurden 200 µl entnommen und mit dem Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} (LDH) analysiert. Um die Gesamtmenge an LDH pro Well zu bestimmen wurden die Zellen mit 2 % Triton-X 100 lysiert. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. (C) Einfluss von PM_{2.5} auf die Caspase-3/7 Aktivität von THP-1 Makrophagen. Gehungerte THP-1 Makrophagen wurden für 16 h mit 100 µg/ml PM_{2.5} exponiert. Als Positivkontrolle wurde Doxorubicin (5 µM; Doxo) verwendet. Die Caspase-3/7 Aktivität wurde mithilfe der enzymatischen Umsetzung von DEVD bestimmt und als RFU dargestellt. Abgebildet sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus fünf unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede wurden jeweils mittels one-way ANOVA und Bonferroni's Post-hoc-Test ermittelt und wie folgt angegeben: ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$.

Zudem wurde überprüft, ob PM_{2.5} in THP-1 Makrophagen Apoptose induzieren, was durch die Bestimmung der Enzymaktivität der Caspasen-3/7 erfolgte. Dafür wurden gehungerte THP-1 Makrophagen für 16 h mit 10, 50 und 100 µg/ml PM_{2.5} exponiert und anschließend die Caspase-3/7 Aktivität ermittelt. Als Positivkontrolle wurde Doxorubicin (Doxo; 5 µM) verwendet. Zu erkennen ist, dass die verschiedenen PM_{2.5} Konzentrationen zu keiner veränderten Caspase-3/7 Aktivität

fürten (siehe Abbildung 10C). Der untersuchte Feinstaub wies somit keine zytotoxischen Effekte in THP-1 Makrophagen auf. Diese Ergebnisse wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Christina Schwarz reproduziert.

3.1.2 Einfluss von PM_{2.5} auf die *CYP1A1* Genexpression

Es ist bekannt, dass PM aus Verbrennungsprozessen häufig PAKs enthalten.⁵⁷ Diese lipophilen Substanzen, die mit PM in den Organismus und letztendlich in die Zellen gelangen können, werden von vielen verschiedenen Enzymen metabolisiert, um deren Reaktivität und Polarität zu erhöhen um sie aus der Zelle auszuschleiden.⁶⁰ Ein Enzym, das wesentlich am Metabolismus von PAKs beteiligt ist, ist die Monooxygenase *CYP1A1*.¹⁴⁵ Neben den PAK-Metaboliten können während des PAK-Metabolismus auch ROS entstehen, die wiederum oxidativen Stress und Zellschäden verursachen können³ (siehe Kapitel 2.2.4).

Da Untersuchungen des betrachteten PM_{2.5} aus der Biomasseverbrennung ergaben, dass PAKs in geringer Konzentration vorhanden sind (siehe Kapitel 3.2.1) und PM_{2.5} in Makrophagen zu einer ROS-Bildung führten, wurde überprüft, ob PM_{2.5} die *CYP1A1* Genexpression induzierte und dies möglicherweise eine Ursache für die gebildeten ROS war. Dafür wurden gehungerte THP-1 Makrophagen mit 100 µg/ml PM_{2.5} für 24 und 30 h exponiert und anschließend mittels qRT-PCR die Genexpression der *CYP1A1* untersucht. Bereits nach 24 h konnte eine Zunahme der *CYP1A1* Expression beobachtet werden, die jedoch nicht signifikant war. Nach 30 h setzt sich dieser Trend fort, aber auch hier war der Effekt nicht signifikant (siehe Abbildung 11). Da die PAK Konzentration in PM_{2.5} hier jedoch sehr gering und die Genexpression von *CYP1A1* nicht signifikant war, ist es unwahrscheinlich, dass die Induktion der *CYP1A1* die Ursache für die gebildeten ROS in THP-1 Makrophagen ist. Es kann allenfalls eine geringe Beteiligung von *CYP1A1* vorliegen.

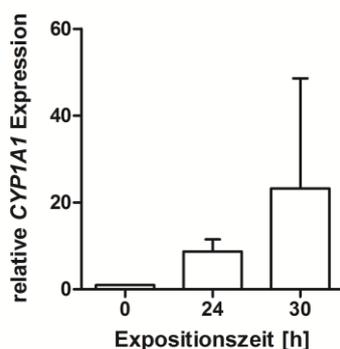


Abbildung 11: Einfluss von PM_{2.5} auf die CYP1A1 Genexpression. Untersuchungen zum Einfluss von PM_{2.5} auf die Genexpression von CYP1A1 nach 24 und 30 h. Dafür wurden gehungerte THP-1 Makrophagen für 24 bzw. 30 h mit 100 µg/ml PM_{2.5} exponiert, anschließend wurde die mRNA aus den Zellen extrahiert, in cDNA umgeschrieben und die CYP1A1 Genexpression mittels qRT-PCR bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der x-fachen Zunahme im Vergleich zu Kontrollzellen (nach 30 h) und die Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Ermittlung einer statistischen Signifikanz wurde mittels one-way ANOVA und Bonferroni's Post-hoc-Test durchgeführt.

3.1.3 Einfluss von PM_{2.5} auf die metabolische Aktivität von THP-1 Makrophagen

Da die verschiedenen PM_{2.5} Konzentrationen auf THP-1 Makrophagen keine zytotoxische Wirkung hatten, bestand weiter die Möglichkeit, dass die Zellviabilität durch PM_{2.5} beeinflusst wird. Diese kann z. B. durch Hemmung der metabolischen Aktivität negativ beeinflusst und mittels MTT-Assay untersucht werden. Dafür wurden gehungerte THP-1 Makrophagen mit 1, 10, 50 und 100 mg/ml PM_{2.5} für 24 h exponiert. Es zeigte sich eine leichte, aber dennoch signifikante Reduktion der metabolischen Aktivität ab 50 µg/ml PM_{2.5} um 10 %. Die höchste getestete PM_{2.5} Konzentration (100 µg/ml) reduzierte die Viabilität um 22 %.

Eine mögliche Ursache für die verminderte metabolische Aktivität könnte ein verminderter Energiegehalt der Zelle sein, in dem die AMP aktivierte Proteinkinase (AMPK) involviert ist. Die AMPK wird vorrangig dann aktiviert, wenn AMP bzw. ADP im Verhältnis zu ATP steigen.²³¹ Durch die AMPK werden katabolische Prozesse, die der Erzeugung von ATP dienen, gefördert, anabolische Prozesse, bei denen ATP verbraucht wird, werden hingegen gehemmt.²³² Neben einem veränderten Verhältnis von AMP bzw. ADP zu ATP führen u. a. auch oxidativer Stress zu einer Aktivierung der AMPK.²³³ Eine Aktivierung der AMPK führt u. a. auch zu einer aktivierenden Phosphorylierung der eukaryotischen Elongationsfaktor-2 Kinase (eEF2K), die wiederum den eukaryotischen Elongationsfaktor-2 (eEF2) durch eine Phosphorylierung inhibiert. Durch die Hemmung des eEF2 kommt die Proteinsynthese zum Erliegen. Neben der eEF2K kann auch die AMPK direkt den eEF2 phosphorylieren.²³⁴ Darüber hinaus können hypoxische Zustände, Stress und Calciumionen eine Inhibierung des eEF2 verursachen.^{234,235}

Der Einfluss von verschiedenen PM_{2.5} Konzentrationen (1, 5, 50 und 100 µg/ml) auf AMPK in gehungerten THP-1 Makrophagen wurde nach einer sechsstündigen Expositionszeit mittels Western Blot-Analyse untersucht (siehe Abbildung 12B). Eine Zunahme der AMPK-Phosphorylierung konnte konzentrationsabhängig beobachtet werden. Auch die inaktivierende Phosphorylierung von eEF2 konnte bei den Konzentrationen 10, 50 und 100 µg/ml nachgewiesen werden. Damit könnte die Phosphorylierung von AMPK und von eEF2 möglicherweise die Ursache für die leichte, im MTT-Assay beobachtete Reduktion der Zellviabilität sein.

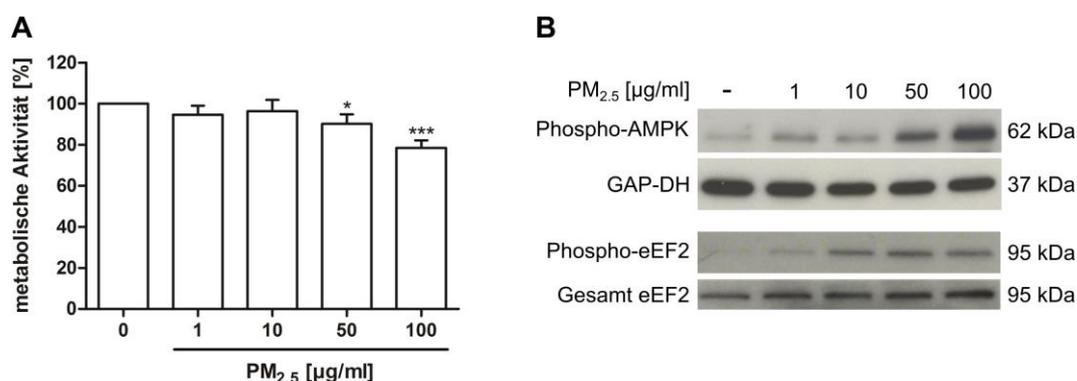


Abbildung 12: Einfluss von PM_{2.5} auf die metabolische Aktivität von gehungerten THP-1 Makrophagen. (A) MTT-Assay mit unbehandelten Kontrollzellen und PM_{2.5} exponierten THP-1 Makrophagen. Die differenzierten und gehungerten Zellen wurden für 24 h mit 100 µg/ml PM_{2.5} exponiert. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA und Bonferroni's Post-hoc-Test ermittelt, ***, $p < 0,001$; *, $p < 0,05$. (B) Untersuchungen zur konzentrationsabhängigen Phosphorylierung von AMPK an Thr172 und der inaktivierenden Phosphorylierung von eEF2 an Thr56 nach einer sechsstündigen Exposition mit 1 bis 100 µg/ml PM_{2.5} in THP-1 Makrophagen mittels Western Blot-Analyse. Bahn 1: Kontrollzellen, Bahn 2–5: THP-1 Makrophagen, die mit 1–100 µg/ml PM_{2.5} für 6 h exponiert wurden. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot von drei Experimenten.

3.1.4 Einfluss von PM_{2.5} auf die Aktivität von MAPK und der Proteinkinase B

Die mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK) ERK1/2, JNK und p38 sind Serin-Threonin-Kinasen, die an einer Reihe von zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose, zelluläres Überleben und Entzündung²³⁶ beteiligt sind. Sie werden durch eine Vielzahl an Reizen stimuliert, dazu zählen u. a. auch oxidativer Stress, UV, Zytokine, Hypoxie oder DNA-Schäden.²³⁷

Da oft beschrieben wurde, dass Partikel, die bei Verbrennungsprozessen entstehen, zu einer Aktivierung der Stresskinasen p38, JNK und ERK1/2 führen^{238,239}, wurde überprüft, ob untersuchtes PM_{2.5} aus der Biomasseverbrennung in THP-1 Makrophagen ebenfalls zu solchen Effekten führt. Dafür wurden die gehungerten Makrophagen für 6 h mit 1, 10, 50 und 100 µg/ml PM_{2.5} exponiert und die Gesamtextrakte mittels Western Blot auf die aktivierende Phosphorylierung dieser drei MAPK analysiert. Dabei konnte die Phosphorylierung von p38 und ERK1/2 direkt untersucht werden, die

Phosphorylierung der JNK wurde mit einem JNK-Aktivitäts-Assay bestimmt. Dafür wurde in einer Immunoreaktion die phosphorylierte JNK präzipitiert, die in einer anschließenden Reaktion ihr Substrat c-Jun phosphorylierte. Die Menge an phosphoryliertem c-Jun wurde dann mittels Western Blot analysiert. Zu erkennen ist, dass PM_{2.5} nach einer kurzzeitigen Exposition von 6 h zu einer konzentrationsabhängigen Phosphorylierung aller drei MAPKs führte (siehe Abbildung 13A).

Da MAPKs durch oxidativen Stress aktiviert werden können²³⁷ und PM_{2.5} zu einer ROS-Bildung in THP-1 Makrophagen führte (siehe Abbildung 10A), wurde untersucht, ob die durch PM_{2.5} gebildeten ROS für die aktivierende Phosphorylierung der MAPK verantwortlich sind. Dafür wurden gehungerte THP-1 Makrophagen, bevor sie für 6 h mit 100 µg/ml PM_{2.5} exponiert wurden, mit dem Antioxidans BHA (100 µM) vorstimuliert. Von den Zellen wurden Gesamtextrakte hergestellt, die mit Western Blot-Analysen auf die drei MAPK untersucht wurden. Die Vorstimulation der Zellen mit dem Antioxidans BHA führte nur zu einer unvollständigen Reduktion der JNK-Phosphorylierung, p38 und ERK1/2 wurden nicht beeinflusst (siehe Abbildung 13B).

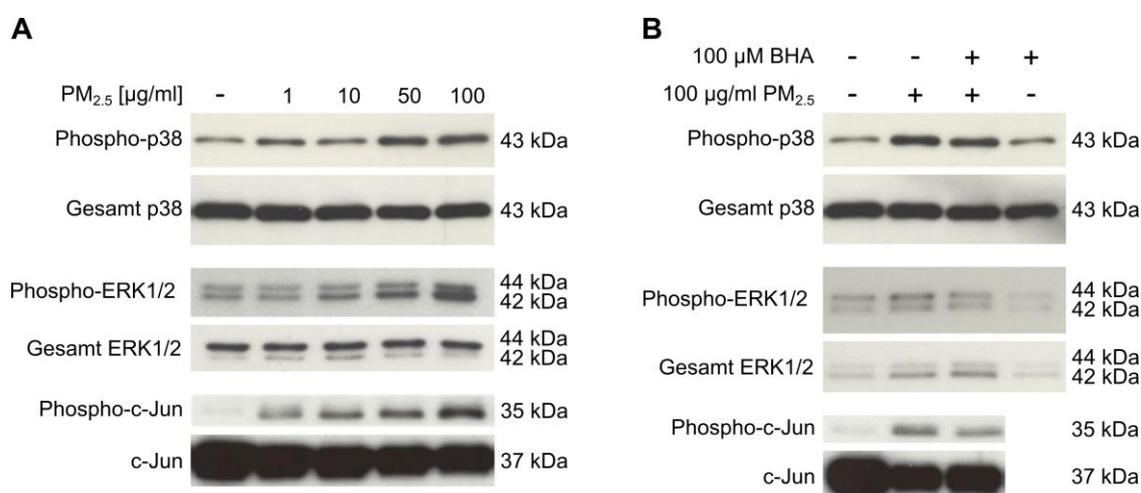


Abbildung 13: Einfluss von PM_{2.5} auf die MAPK p38, ERK1/2 und JNK nach PM_{2.5} Exposition in THP-1 Makrophagen. (A) Untersuchungen zur konzentrationsabhängigen Phosphorylierung der MAPK p38 (Thr180/Tyr182), c-Jun (Ser63) und ERK1/2 (Thr202/Thr204) nach einer sechsständigen Exposition mit 1–100 µg/ml PM_{2.5} in gehungerten THP-1 Makrophagen mittels Western Blot-Analysen. Mithilfe des SAPK/JNK Kinase Assay Kit (non-radioactive) wurde die Aktivität von JNK untersucht. Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Thr185) wurde nach einer Immunreaktion durch Agarose-Kügelchen präzipitiert. Das Ausmaß der c-Jun Phosphorylierung korreliert mit der Aktivität von JNK. Bahn 1: unbehandelte Kontrollzellen, Bahn 2–5: THP-1 Makrophagen, die mit den entsprechenden PM_{2.5}-Konzentration behandelt wurden. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot von vier (p38), drei (ERK1/2), bzw. zwei (JNK) unabhängigen Experimenten. (B) Einfluss von durch PM_{2.5} generierten ROS auf die aktivierende Phosphorylierung der MAPK p38, ERK1/2 und JNK. Gehungerte THP-1 Makrophagen wurden für 6 h mit 100 µg/ml PM_{2.5} exponiert, vorher wurden die Zellen 1 h vor PM_{2.5} Zugabe mit dem Antioxidans BHA versetzt. Bahn 1: unbehandelte Kontrollzellen, Bahn 2: Zellen die nur mit PM_{2.5} exponiert wurden, Bahn 3: Zellen die sowohl mit BHA als auch mit PM_{2.5} behandelt wurden, Bahn 4: Zellen die lediglich mit BHA exponiert wurden. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot aus drei (p38), zwei (c-Jun) bzw. einem (ERK1/2) unabhängigen/n Experiment/en.

Die Proteinkinase B, auch als Akt bekannt, ist ebenfalls eine Serin-Threonin-Kinase und folgt auf die PI3K.²⁴⁰ Die PI3K/Akt-Kaskade spielt eine wichtige Rolle in der zellulären Signaltransduktion der Tumorgenese, Angiogenese, Proliferation, dem zellulären Überleben, Zellwachstum und Metabolismus²⁴¹. Um den Einfluss von PM_{2.5} auf die Phosphorylierung der Akt zu untersuchen wurden gehungerte THP-1 Makrophagen für 6 h mit verschiedenen Konzentrationen an PM_{2.5} (1, 10, 50 und 100 µg/ml) exponiert. Die aktivierende Phosphorylierung von Akt wurde mittels Western Blot-Analysen aus Gesamtextrakten bestimmt. Bereits geringe PM_{2.5} Konzentrationen induzierten nach einer kurzzeitigen Exposition in THP-1 Makrophagen eine Phosphorylierung von Akt (siehe Abbildung 14).

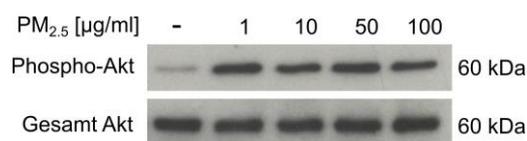


Abbildung 14: Einfluss von PM_{2.5} auf die Phosphorylierung von Akt. Western Blot-Analyse zur konzentrationsabhängigen Phosphorylierung der Akt (Ser473) nach einer sechsstündigen PM_{2.5} Exposition in Hungermedium. Bahn 1: unbehandelte Kontrollzellen, Bahn 2–5: THP-1 Makrophagen, die mit der entsprechenden PM_{2.5}-Konzentration behandelt wurden. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot von drei unabhängigen Experimenten.

3.1.5 Einfluss von PM_{2.5} auf die nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors Nrf-2 und dessen transkriptionelle Aktivität

Neben den MAPK kann auch der Transkriptionsfaktor Nrf-2 durch oxidativen Stress, verursacht z.B. durch PM unterschiedlicher Quellen, aktiviert werden.^{198,201,227,242} Da in der Literatur bereits berichtet wurde, dass Feinstaubpartikel in der Lage sind Nrf-2 sowie dessen Zielgene zu aktivieren^{3,197,243}, sollte untersucht werden, ob PM_{2.5} aus der Biomasseverbrennung ebenfalls zu einer nukleären Translokation und nachfolgenden transkriptionellen Aktivierung von Nrf-2 in THP-1 Makrophagen führt.

Dafür wurden gehungerte THP-1 Makrophagen für 20 min, 2, 6 und 24 h mit 100 µg/ml PM_{2.5} bzw. nur mit Hungermedium exponiert. Mit Hilfe von Western Blot-Analysen konnte nur in Kernextrakten ab einer Expositionszeit von 6 h Nrf-2 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 15A). Zusätzlich wurde mittels ARE Luciferase Assay überprüft, ob der Transkriptionsfaktor auch transkriptionell aktiv ist. Hierbei korreliert die Luciferaseaktivität mit der transkriptionellen Aktivität von Nrf-2. In Abbildung 15B ist die relative Luciferaseaktivität in PM_{2.5} exponierten THP-1 Makrophagen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen dargestellt. Eine vierfach höhere transkriptionelle Aktivität von Nrf-2 konnte in PM_{2.5} exponierten THP-1 nach 12 h beobachtet werden.

Die Regulation von Nrf-2 kann zum einen Keap1-abhängig, zum anderen aber auch Keap1-unabhängig mittels Phosphorylierung z. B. durch MAPK, wie der JNK erfolgen.¹⁸⁷ Welche Rolle die p38 MAPK dabei spielt, wird bisher kontrovers diskutiert.^{244,245} Da die Stresskinasen JNK und p38 in kurzzeitig exponierten THP-1 Makrophagen nach einer sechsstündigen PM_{2.5} Exposition aktiv vorlagen, wurde der Einfluss dieser MAPK auf die nukleäre Translokation von Nrf-2 mit Hilfe von Immunoblotting untersucht. Dafür wurden gehungerte THP-1 Makrophagen 30 min vor der PM_{2.5} Exposition mit pharmakologischen Inhibitoren gegen p38 und JNK stimuliert. Nur die Inhibition mit dem JNK-Inhibitor SP600125 (10 µM) (Abbildung 15C), nicht aber mit p38-Inhibitor LN950 (0,1 µM) (Abbildung 6D) reduzierte die die Translokation von Nrf-2 in den Zellkern.

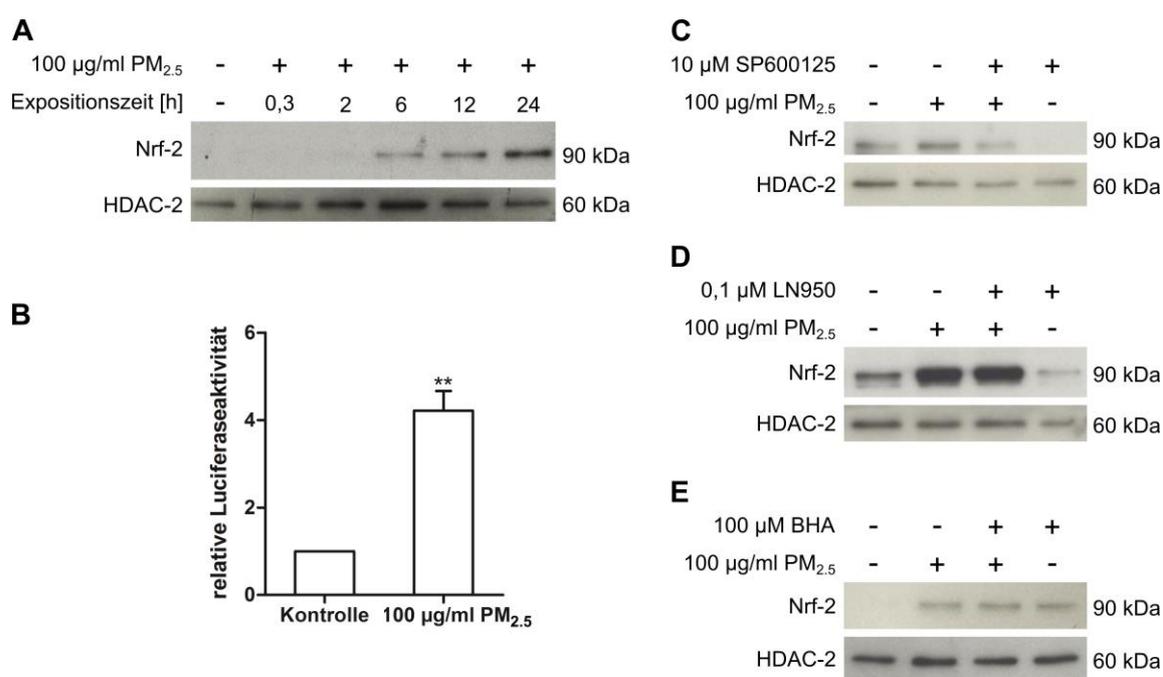


Abbildung 15: Einfluss von PM_{2.5} auf die nukleäre Translokation und transkriptionelle Aktivität des Transkriptionsfaktors Nrf-2 in gehungerten THP-1 Makrophagen. (A) Untersuchungen zur zeitabhängigen nukleären Translokation von Nrf-2 nach der Exposition mit 100 µg/ml PM_{2.5} in gehungerten THP-1 Makrophagen mittels Western Blot-Analysen. Bahn 1: Kernextrakte von unbehandelten Kontrollzellen, Bahn 2–6: Kernextrakte von PM_{2.5} exponierten THP-1 Makrophagen nach 20 min, 2, 6, 12 und 24 h. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot von drei unabhängigen Experimenten. (B) Einfluss von PM_{2.5} auf die transkriptionelle Aktivität von Nrf-2 mittels ARE Luciferase Reportergen Assay. Gehungerte THP-1 Makrophagen (1 Mill.) wurden mit dem entsprechenden Vektor transfiziert und anschließend für 12 h mit 100 µg/ml PM_{2.5} in Hungermedium exponiert. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels Student t-Test ermittelt und wie folgt angegeben: **, $p < 0,01$. Einfluss von JNK (C), p38 (D) und ROS (E) auf die nukleäre Translokation von Nrf-2 in PM_{2.5} exponierten THP-1 Makrophagen. Dafür wurden THP-1 Makrophagen 30 min (C und D) bzw. 1 h (E) vor der 12-stündigen PM_{2.5} Exposition (100 µg/ml) mit dem JNK-Inhibitor SP600125 (10 µM) (C), dem p38-Inhibitor LN950 (0,1 µM) (D) bzw. mit dem Antioxidans BHA (100 µM) (E) vorstimuliert. Dargestellt sind nukleäre Kernextrakte von unbehandelten Kontrollzellen (Bahn 1), PM_{2.5} exponierte Zellen (Bahn 2), Makrophagen, die mit PM_{2.5} und Inhibitor bzw. Antioxidans behandelt wurden (Bahn 3), und THP-1 Makrophagen, die nur mit Inhibitor bzw. Antioxidans behandelt wurden (Bahn 4). Abgebildet ist jeweils ein repräsentativer Western Blot von drei (C und D) bzw. zwei (E) unabhängigen Experimenten.

Die Keap1 abhängige Translokation von Nrf-2 in den Zellkern erfolgt durch die Modifikation von Cysteinen des Keap1, was u. a. durch ROS verursacht werden kann.¹⁸⁷ Da ROS zu einer Aktivierung der JNK führte (siehe Abbildung 13B), wurde untersucht, ob ROS auch an der Keap1 abhängigen Translokation von Nrf-2 beteiligt sind. Dafür wurden gehungerte THP-1 Makrophagen 1 h bevor diese mit 100 µg/ml PM_{2.5} exponiert wurden, mit dem Antioxidans BHA (100 µM) vorstimuliert. Ein exemplarischer Western Blot von THP-1 Kernextrakten zeigt (siehe Abbildung 15D), dass eine ROS vermittelte Keap1 abhängige Nrf-2 Translokation nicht beobachtet werden konnte.

3.1.6 Einfluss von PM_{2.5} auf den zellulären Glutathiongehalt und die Glutathionreduktase

Das Tripeptid Glutathion (GSH) ist eines der wichtigsten zellulären Antioxidantien, das an verschiedenen zellulären Funktionen, wie Proliferation, Zellteilung, Apoptose, DNA-Synthese, -Reparatur oder -Expression, beteiligt ist. Es ist eine Schlüsselsubstanz in der Abwehr von ROS bzw. reaktiven Stickstoffspezies (engl.: reactive nitrogen species, RNS). Dabei entsteht aus der reduzierten Form (GSH) die oxidierte Form Glutathiondisulfid (GSSG), das aus zwei Molekülen GSH besteht, welche über eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft sind.²⁴⁶ Das Verhältnis von GSH zu GSSG ist somit ein wichtiger Indikator für den Redoxstatus der Umgebung.²⁴⁷ Ein Mangel an GSH kann zu einer Erhöhung der durch ROS/RNS verursachten Schäden führen, Auswirkungen auf die homöostatische Kontrolle der Energieproduktion haben und zu mitochondrialer Dysfunktion führen.²⁴⁶ Zudem werden viele Enzyme, die an der Glutathionsynthese beteiligt sind, durch Nrf-2 reguliert.¹⁸⁰

Um den GSH Gehalt in PM_{2.5} exponierten THP-1 Makrophagen zu untersuchen, wurden gehungerte Zellen für 12 h mit 100 µg/ml PM_{2.5} exponiert und Proteinextrakte hergestellt. Mit dem Glutathione (GSH/GSSG/Total) Fluometric Assay Kit wurde neben dem GSH-Gehalt auch der GSSG- und der gesamte GSH-Gehalt (Summe aus GSH und GSSG) bestimmt und zwar als relativer Gehalt im Vergleich zu den Kontrollzellen (siehe Abbildung 16A-C). Nach der Exposition mit PM_{2.5} konnte eine Tendenz von einem leichten, nicht signifikant erhöhten GSH-Gehalt beobachtet werden. Der zelluläre Gehalt an GSSG wurde hingegen leicht signifikant erniedrigt. Die Menge des gesamten GSH-Gehalts blieb jedoch unverändert, was darauf hinweist, dass PM_{2.5} nicht die de novo Synthese von GSH induziert. Die unerwarteten erniedrigten GSSG- und die leicht erhöhten GSH-Level deuten möglicherweise darauf hin, dass die Reduktion von GSSG zu GSH bevorzugt abläuft, um der Zelle mehr Reduktionmittel in Form von GSH gegen PM_{2.5} gebildete ROS zur Verfügung zu stellen.

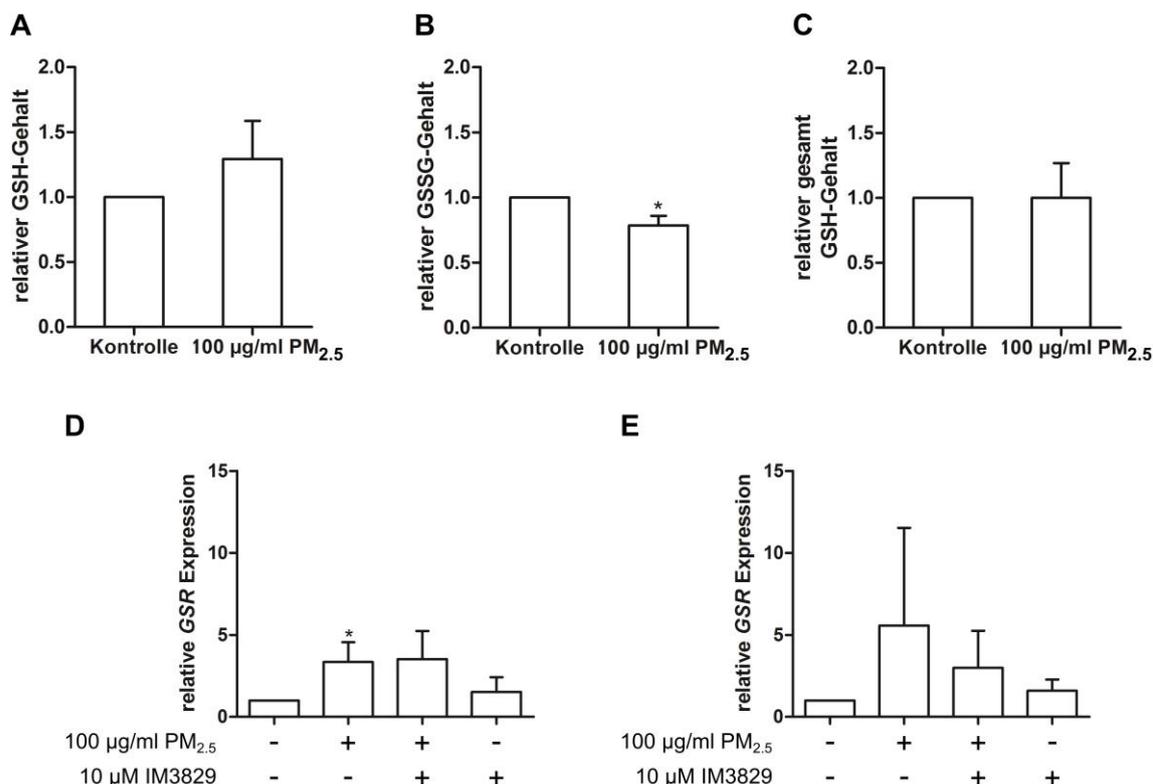


Abbildung 16: Einfluss von PM_{2.5} auf den zellulären GSH-Gehalt und die GSR Genexpression.

Untersucht wurde der Einfluss von 100 µg/ml PM_{2.5} auf den zellulären GSH- (A), GSSG- (B) und gesamten GSH-Gehalt (C) von gehungerten THP-1 Makrophagen. Die Zellen wurden für 24 h mit 100 µg/ml PM_{2.5} exponiert. Der zelluläre GSH-, GSSG- und der gesamte GSH-Gehalt wurde anschließend mit dem Glutathione (GSH/GSSG/Total) Fluometric Assay Kit bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung aus drei (A und B) bzw. vier (C) unabhängigen Experimenten. (D und E) Untersuchungen zum Einfluss von PM_{2.5} auf die Genexpression der *GSR* nach 24 h (D) und 30 h (E). Gehungerte THP-1 Makrophagen wurden für 24 bzw. 30 h mit 100 µg/ml PM_{2.5} exponiert und entsprechende Zellen 1 h vorher mit dem Nrf-2 Inhibitor IM3829 (10 µM) behandelt. Nach erfolgter Exposition wurde die mRNA aus den Zellen extrahiert, in cDNA umgeschrieben und die *GSR* Genexpression mittels qRT-PCR analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der x-fachen Zunahme im Vergleich zu Kontrollzellen und die Standardabweichung aus vier (E) bzw. drei (D) unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA und Bonferroni's Post-hoc-Test ermittelt und wie folgt angegeben: *, $p < 0,05$.

Die Reduktion von GSSG zu GSH wird durch die Glutathionreduktase (GSR) katalysiert.²⁴⁸ Um zu überprüfen, ob die veränderten GSH-Level in PM_{2.5} exponierten Zellen auf eine erhöhte Genexpression von *GSR* zurückzuführen sind, wurde die Genexpression des Gens *GSR* in PM_{2.5} exponierten THP-1 Makrophagen mittels qRT-PCR untersucht. Da *GSR* ein Nrf-2 reguliertes Gen ist²⁴⁸, wurde zudem untersucht, ob eine durch PM_{2.5} induzierte veränderte Genexpression der *GSR* durch Nrf-2 vermittelt wurde. Dafür wurden gehungerte THP-1 Makrophagen für 12 bzw. 30 h mit 100 µg/ml PM_{2.5} exponiert und der Nrf-2-Inhibitor IM3829 (10 µM) eine Stunde vor PM_{2.5} Zugabe zu den Zellen gegeben. Anschließend wurde die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR auf die *GSR* analysiert. Die Ergebnisse wurden als relative *GSR* Expression in Bezug zu Kontrollzellen berechnet und dargestellt (siehe Abbildung 16D-E). Die Exposition von THP-1 Makrophagen mit PM_{2.5} führte nach 24 h zu einer signifikant erhöhten Genexpression von *GSR*. Auch

nach 30h konnte ein Trend zu einer erhöhten *GSR* Expression festgestellt werden. Ein Einfluss von Nrf-2 auf die *GSR* Expression war jedoch nicht zu beobachten, da es bei Verwendung des Inhibitors IM3829 nicht zu einer Reduktion der *GSR* Expression kam. Die $PM_{2.5}$ vermittelte Induktion der *GSR* Genexpression könnte die erhöhten GSH- und erniedrigten GSSG-Level erklären. Die Ergebnisse zum zellulären GSH-Gehalt und der *GSR* Expression deuten darauf hin, dass GSH an der Beseitigung des durch $PM_{2.5}$ induzierten oxidativen Stress in THP-1 Makrophagen beteiligt ist.

3.1.7 Einfluss von $PM_{2.5}$ auf die Hämoxygenase

Nrf-2 ist neben der Regulation des GSH-Metabolismus noch an der Regulation weiterer antioxidativer Gene beteiligt, wie der *NQO1*, *GCL* und der *HMOX1*.²⁴⁸ Das Gen *HMOX1* codiert für die Hämoxygenase-1 (HO-1), die hauptsächlich dafür verantwortlich ist, freies Häm zu äquivalenten Mengen freier Eisenionen (Fe^{2+}), Kohlenstoffmonoxid (CO) und Biliverdin zu metabolisieren. Da freies Häm über die Fenton-Reaktion zur Entstehung von ROS- beitragen kann, erfüllt die HO-1 eine direkte zytoprotektive Funktion und verhindert zusätzlich Apoptose.²⁴⁹

Zunächst wurde die zeitabhängige Bildung der HO-1 durch die Exposition mit $100\mu\text{g/ml}$ $PM_{2.5}$ untersucht. Dafür wurden gehungerte THP-1 Makrophagen für 20 min, 2, 6, 12 und 24 h mit $PM_{2.5}$ exponiert. Von den Zellen wurden Gesamtextrakte hergestellt und mittels Western Blot auf HO-1 untersucht. Die Analysen zeigten, dass die Bildung von HO-1 zeitabhängig zunahm (siehe Abbildung 17A). Des Weiteren wurde zusätzlich noch die Regulation der HO-1 in THP-1 Makrophagen analysiert. Dafür wurden pharmakologische Inhibitoren gegen Nrf-2, JNK, p38 und Akt eingesetzt (siehe Abbildung 17B–E). Durch die Inhibition von Nrf-2 mit dem Nrf-2 Inhibitor IM3829 ($10\mu\text{M}$) und JNK durch SP600125 ($10\mu\text{M}$) konnte eine deutliche Reduktion der HO-1 Expression beobachtet werden. Im Gegensatz dazu kam es mit dem p38-Inhibitor LN950 ($0,1\mu\text{M}$) zu keiner Hemmung der HO-1 Bildung.

Auch die mögliche Induktion der HO-1 Proteinproduktion in $PM_{2.5}$ exponierten THP-1 Makrophagen durch ROS wurde mit dem Antioxidans BHA ($100\mu\text{M}$) untersucht (siehe Abbildung 17F). Wie schon bei der nukleären Translokation von Nrf-2, konnte auch hier keine Beteiligung von durch $PM_{2.5}$ gebildete ROS an der Expression der HO-1 beobachtet werden.

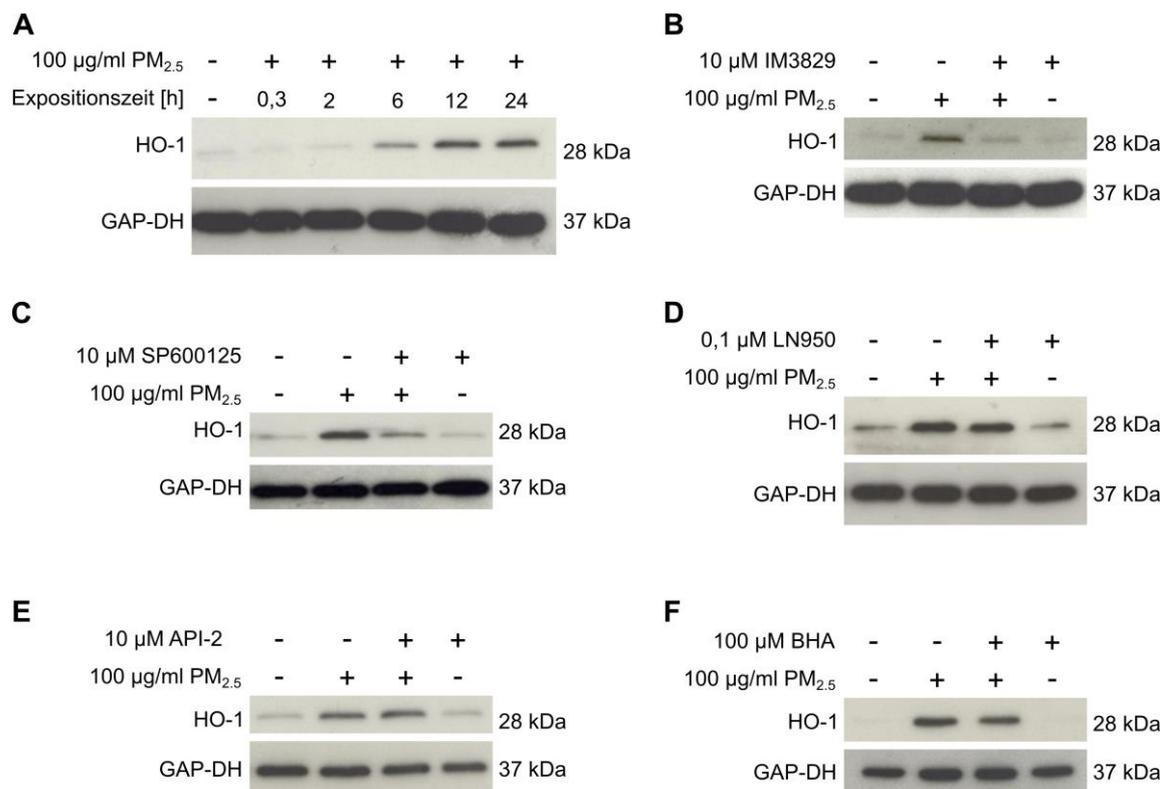


Abbildung 17: Einfluss von PM_{2.5} auf die Proteinexpression der HO-1 in gehungerten THP-1 Makrophagen. (A) Untersuchungen zur zeitabhängigen Expression der HO-1 nach der Exposition mit 100 µg/ml PM_{2.5} mittels Western Blot-Analysen. Bahn 1: Gesamtextrakte von unbehandelten Kontrollzellen, Bahn 2–6: von PM_{2.5} exponierten THP-1 Makrophagen nach 20 min, 2, 6, 12 und 24 h. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot von drei unabhängigen Experimenten. Einfluss von Nrf-2 (B), JNK (C), p38 (D), Akt (E), und ROS (F) auf die Proteinexpression von HO-1 in PM_{2.5} exponierten und gehungerten THP-1 Makrophagen. Dafür wurden die Zellen 30 min (C und D) bzw. 1 h (B, E und F) vor der PM_{2.5} (100 µg/ml) Exposition mit dem Nrf-2-Inhibitor IM3829 (10 µM) (B), dem JNK-Inhibitor SP600125 (10 µM) (C), dem p38-Inhibitor LN950 (0,1 µM) (D), dem Akt-Inhibitor API-2 (10 µM) (E) bzw. mit dem Antioxidans BHA (100 µM) (E) vorstimuliert. THP-1 Makrophagen wurden für 12 h (C, D und F) bzw. für 24 h (B und E) mit PM_{2.5} stimuliert. Bahn 1: Gesamtextrakte von unbehandelten Kontrollzellen, Bahn 2: PM_{2.5} exponierte Zellen, Bahn 3: Makrophagen, die mit PM_{2.5} und Inhibitor bzw. Antioxidans behandelt wurden, Bahn 4: THP-1 Zellen, die nur mit Inhibitor bzw. Antioxidans behandelt wurden. Abgebildet ist jeweils ein repräsentativer Western Blot von drei (B-F) unabhängigen Experimenten.

3.1.8 Ultrastrukturanalyse und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von PM_{2.5} exponierten THP-1 Makrophagen

Um die zelluläre Aufnahme von PM_{2.5} und die dadurch verursachten morphologischen Veränderungen von THP-1 Makrophagen nach einer 24-stündigen oder siebentägigen Exposition mit PM_{2.5} (100 µg/ml) zu untersuchen, wurde eine Ultrastrukturanalyse mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) durchgeführt. Dies geschah in Kooperation mit Dr. Maximilian Seidl (Institut für Klinische Pathologie, Freiburg).

Die elektronenmikroskopische Analyse des untersuchten PM_{2.5} außerhalb eines Zellulären Systems erfolgte bereits in vorhergehenden Untersuchungen. Dabei war zu erkennen, dass PM_{2.5} entweder als einzelnes Teilchen oder als Aggregate vorliegt.²⁵⁰ Bei unbehandelten Kontrollzellen (siehe Abbildung 18A und B) war zu beobachten, dass die Zelloberfläche eine glatte Struktur ohne Membranausstülpungen aufweist und keine Schädigung der Mitochondrien nachweisbar war. Nach einer kurzzeitigen (24 h) Exposition mit PM_{2.5} konnte jedoch schon eine Stimulation der Makrophagen beobachtet werden, was durch die Ausbildung von Protrusionen (Membranausstülpungen)²⁵¹ deutlich wurde und für Phagozytose charakteristisch ist (siehe Abbildung 18C). Auch das Vorhandensein von PM_{2.5} innerhalb der Zellen konnte bereits nach einer 24-stündigen Exposition nachgewiesen werden (siehe Abbildung 18D–H; schwarze Pfeile). Dabei ist zusehen, dass PM_{2.5} hauptsächlich in membranumschlossenen Vesikeln vorliegt, die teilweise mit Lysosomen zu größeren Vesikeln verschmolzen waren, von letzteren waren bereits einige ruptiert (siehe Abbildung 18D und F; weiße Pfeile). Zudem könnte es sein, dass sich PM_{2.5} auch frei im Zytoplasma der Zellen befand, was durch Ruptur der PM_{2.5}-haltigen Vesikel zustande kommen könnte. Des Weiteren kam es durch die PM_{2.5} Exposition zu einer morphologischen Veränderung der Mitochondrien, die sich in einer Schwellung und Schädigung der Cristae zeigte (siehe Abbildung 18G und H). Zudem waren Partikel auch innerhalb der Mitochondrien zu erkennen (weiße Pfeile Abbildung 18G und H)²⁵². Zusätzlich dazu konnte in Abbildung 18E und F beobachtet werden, dass sich PM_{2.5} haltige Vesikel auch an der Zelloberfläche befinden, was für eine extrazelluläre Freisetzung und zu einer Entfernung der Partikel aus der Zelle spricht (gekennzeichnet mit E). Auch die bei Wang *et al.* beschriebene Exozytose von Silbernanopartikeln²⁵³ konnte in Abbildung 18E beobachtet werden.

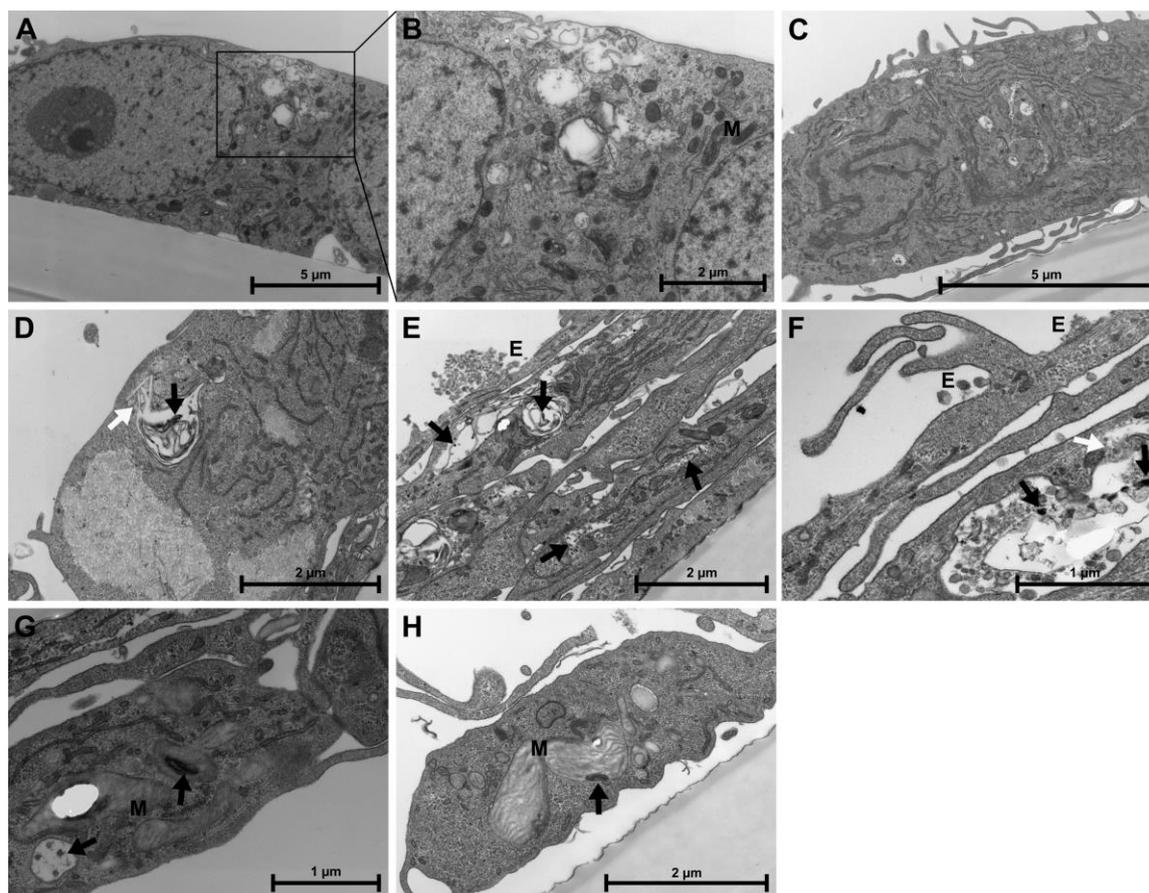


Abbildung 18: Ultrastrukturelle Analyse von PM_{2.5} exponierten THP-1 Makrophagen nach 24h. Dargestellt ist je eine repräsentative TEM-Aufnahme von unbehandelten Kontrollzellen (A und B) sowie gehungerten THP-1 Makrophagen, die mit 100 µg/ml PM_{2.5} für 24 h exponiert wurden (C–H). Schwarze Pfeile zeigen internalisierte PM_{2.5} (D–H), weiße Pfeile kennzeichnen rupturierte Vesikel (D und F), M kennzeichnet Mitochondrien (B, G und H) und E kennzeichnet Exozytose (E und F).

Auch nach 7 d wiesen die unbehandelten Kontrollstellen immer noch eine weitgehend glatte Oberfläche ohne Membranausstülpungen auf (siehe Abbildung 19A). Bei PM_{2.5} exponierten Zellen können nach 7 d mehr Protrusionen beobachtet werden als nach einer kurzzeitigen Expositionsdauer von 24 h (siehe Abbildung 19B). Zudem lässt sich erkennen, dass die Zellen deutlich mehr PM_{2.5} haltige vesikuläre Strukturen (siehe Abbildung 19B und D), zum Teil mit Doppelmembranen (siehe Abbildung 19C), aufweisen, die zudem vermehrt Rupturen zeigen (siehe Abbildung 19B). Darüber hinaus können an der Zelloberfläche Strukturen erkannt werden, die vermutlich PM_{2.5} wieder ausscheiden (Abbildung 19B). Die Schädigung der Mitochondrien ist ebenfalls nach 7 d ausgeprägter. So weisen nicht nur die geschwollenen Mitochondrien zerstörte Cristae auf, sondern nahezu alle Mitochondrien (siehe Abbildung 19E). Darüber hinaus lassen sich auch Schädigungen der äußeren mitochondrialen Membran erkennen, was nach 24 h noch nicht zu beobachten war (siehe Abbildung 19E).

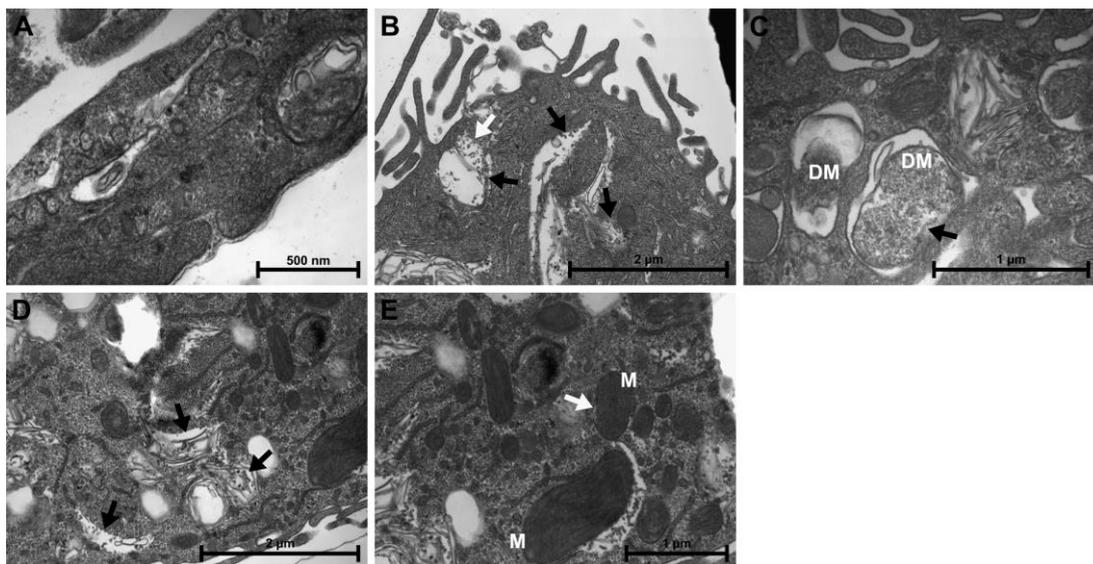


Abbildung 19: Ultrastrukturelle Analyse von PM_{2.5} exponierten THP-1 Makrophagen nach siebentägiger Exposition. Dargestellt ist je eine repräsentative TEM-Aufnahme von unbehandelten Kontrollzellen (A) sowie gehungerten THP-1 Makrophagen, die mit 100 µg/ml PM_{2.5} für 7 d exponiert wurden (B–E). Schwarze Pfeile zeigen internalisierte PM_{2.5} (B–D), weiße Pfeile kennzeichnen Mitochondrien (E), M kennzeichnet geschwollene Mitochondrien (E) und DM kennzeichnet Doppelmembran-strukturen (C).

Eine zusätzliche Bestätigung, dass es durch die Exposition mit PM_{2.5} aus der Biomasseverbrennung zu einer Schädigung der Mitochondrien in THP-1 Makrophagen kam, wurde mittels fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen erhalten (siehe Abbildung 20). Dafür wurden THP-1 Makrophagen, die für 24 h mit 100 µg/ml PM_{2.5} exponiert und mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker® Green FM (150 nM) gefärbt. 45 min nach der Färbung wurden diese sofort lebend mikroskopiert. Es konnte in unbehandelten Kontrollzellen beobachtet werden, dass die Fluoreszenz und damit die Mitochondrien über die gesamte Zelle verteilt waren (siehe Abbildung 20A). In PM_{2.5} exponierten Zellen kam es dagegen zu einer intensiveren Fluoreszenz um den Zellkern, ein Zeichen dafür, dass die Mitochondrien aufgrund Ihrer Schwellung ihre Gestalt geändert hatten und sich nicht mehr so gut anfärben ließen, sondern nur noch die um den Zellkern angeordneten.²⁵⁴

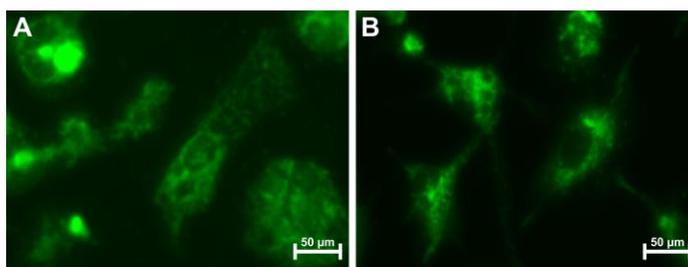


Abbildung 20: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von PM_{2.5} exponierten THP-1 Makrophagen nach 24 h. Kontrollzellen (A) und gehungerte THP-1 Makrophagen, die für 24 h mit 100 µg/ml PM_{2.5} exponiert wurden (B). Die Zellen wurden 45 min vor der Mikroskopie mit den Fluoreszenzfarbstoffe MitoTracker® Green FM (150 nM) gefärbt und anschließend direkt lebend mikroskopiert. Dargestellt ist eine repräsentative Aufnahme von drei unabhängigen Experimenten.

3.2 Effekte von Feinstaub (PM_{2.5}) aus der Biomasseverbrennung auf die globale Genexpression von humanen Bronchialepithelzellen

Es ist bekannt, dass die Exposition mit PM_{2.5} negative Effekte auf die Gesundheit der Menschen haben kann.^{1,7,17,227} Untersuchungen zu den zugrunde liegenden molekularen Mechanismen dieser Effekte sind dagegen seltener, dieses gilt besonders für PM_{2.5} aus der Biomasseverbrennung. Da eine kontinuierliche Exposition von Menschen unter kontrollierten Bedingungen über einen längeren Zeitraum nicht möglich ist, wurden humane Bronchialepithelzellen (BEAS-2B), die eine der ersten Barrieren für solche Partikel darstellen, kontinuierlich für fünf Wochen mit PM_{2.5} aus der Biomasseverbrennung exponiert. Anschließend wurde die globale Genexpression PM_{2.5} exponierter BEAS-2B untersucht. Einige epidemiologische Studien konnten zudem feststellen, dass Menschen, die über längere Zeit mit PM_{2.5} exponiert wurden, eine höhere Anfälligkeit für Infektionskrankheiten der Atemwege aufwiesen.^{22,255,256} Auf Grund des häufig viralen Ursprungs von Atemwegsinfektionen wurde in BEAS-2B Zellen zusätzlich zur PM_{2.5} Exposition mit Hilfe von doppelsträngiger RNA (dsRNA), ein Bestandteil einiger Viren, ein viraler Infekt simuliert und unter diesen Bedingungen eine Microarray-Analyse durchgeführt. Die Microarray-Analysen wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Thomas Häupl (Medizinische Klinik m. S. Rheumatologie und klinische Immunologie, Charité Universitätsmedizin Berlin) von Marc Bonin ausgeführt. Die bioinformatische Datenanalyse erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan Günther (Pharmazeutische Bioinformatik, Institut für Pharmazeutische Wissenschaften, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) durch Dr. Stephan Flemming und Dr. Gwang-Jin Kim sowie durch Herrn Dipl.-Ing. Wolfgang Schmidt-Heck (Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie – Hans-Knöll-Institut (HKI), Jena) und Désirée Popadić (Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie, Institut für Pharmazeutische Wissenschaften, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg).

3.2.1 Charakterisierung des PAK-Profiles des verwendeten PM_{2.5}

Es ist bekannt das PAKs vor allem während der unvollständigen Verbrennung von organischem Material (Biomasse) entstehen⁵⁷ und an die Oberfläche von Feinstaubpartikel adsorbieren können.² Da diese aktiven Substanzen nachgewiesenermaßen gesundheitsschädlich sind (siehe Kapitel 2.2.3), wurde zusätzlich zu den anorganischen Analysen (siehe Kapitel 5.1.7) die Art und die Menge der PAKs untersucht, die an die in dieser Arbeit verwendeten Partikel adsorbiert sind. Die Untersuchungen wurden in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Christine Achten (Institut für Geologie und Paläontologie – Angewandte Geologie, Universität Münster, Münster) von Frau Sigrid Richter-Brockmann durchgeführt. Da der PAK-Gehalt oft gering ist, wurde die Analyse mittels Gas-

Tabelle 2: PAKs und deren Konzentrationen ($\mu\text{g}/\text{kg}$) des untersuchten $\text{PM}_{2.5}$ aus der Biomasseverbrennung. Die Gesamtsumme der vorhandenen PAKs beträgt $349,83 \mu\text{g}/\text{kg}$.

PAK	$\mu\text{g}/\text{kg}$	PAK	$\mu\text{g}/\text{kg}$
Acenaphthen ^a	3,64	Naphtho[1,2- <i>b</i>]fluoranthen + Naphtho[2,3- <i>a</i>]pyren	0,93
Anthracen ^a	7,38	Fluoren ^a	4,67
Benzo[<i>a</i>]anthracen ^{a, b}	6,70	1-Methylfluoren	1,24
9-Methylanthracen	0,23	7H-Benzo[<i>c</i>]fluoren	1,73
9,10-Dimethylanthracen	<0,50	Naphthalen ^a	22,57
6-Methylbenzo[<i>a</i>]anthracen	0,84	2-Methylnaphthalen	11,44
5-Methylbenzo[<i>a</i>]anthracen	<0,50	2,6-Dimethylnaphthalen	10,63
7,12-Dimethylbenzo[<i>a</i>]anthracen	2,27	1,8-Dimethylnaphthalen	0,17
Dibenzo[<i>a, j</i>]anthracen	<0,25	Phenanthren ^a	36,01
Dibenzo[<i>a, c</i>]anthracen	<0,25	9-Methylphenanthren	11,52
Dibenzo[<i>a, h</i>]anthracen ^{a, c}	<0,25	1-Methylphenanthren	7,30
Anthanthren	<2,50	Benzo[<i>c</i>]phenanthren ^b	1,93
3-Methylcholanthren	<1,25	Pyren ^a	41,98
Chrysen ^{a, b}	15,27	1-Methylpyren	14,22
2-Methylchrysen	1,31	Benzo[<i>e</i>]pyren	12,27
6-Methylchrysen	0,12	Benzo[<i>a</i>]pyren ^{a, d}	5,29
5-Methylchrysen ^b	0,28	6-Methylbenzo[<i>a</i>]pyren	<1,25
4-Methylchrysen	<0,50	Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pyren ^{a, b}	3,86
Coronen	2,10	Naphtho[2,3- <i>e</i>]pyren	<0,38
Fluoranthen ^a	50,67	Dibenzo[<i>a, l</i>]pyren ^c	0,49
Benzo[<i>b</i>]fluoranthen ^{a, b}	12,23	Dibenzo[<i>a, e</i>]pyren	1,72
Benzo[<i>k</i>]fluoranthen ^{a, b}	2,74	Dibenzo[<i>a, i</i>]pyren ^b	0,38
Benzo[<i>ghi</i>]fluoranthen	10,15	Dibenzo[<i>a, h</i>]pyren ^b	<0,50
Naphtho[1,2- <i>k</i>]fluoranthen	<0,38	Perylen	0,73
Naphtho[2,3- <i>b</i>]fluoranthen	0,59	Benzo[<i>ghi</i>]perylen ^a	2,42
Dibenzo[<i>a, e</i>]fluoranthen	<0,38	Reten	33,43
Naphtho[2,3- <i>k</i>]fluoranthen	<0,38	Triphenylen	6,41

^a: PAKs aus der Liste der 16 PAKs der US EPA; Summe der US EPA PAKs: $215,41 \mu\text{g}/\text{kg}$; ^b entsprechend der Klassifizierung der IARC (2010) in Gruppe 2B: Möglicherweise kanzerogen für Menschen; ^c entsprechend der Klassifizierung der IARC (2010) in Gruppe 2A: Wahrscheinlich kanzerogen für Menschen; ^d entsprechend der Klassifizierung der IARC (2010) in Gruppe 1: Kanzerogen für Menschen

chromatographie (GC), gekoppelt mit einem Atmosphärendruck-Laserionisations-Massenspektrometer (APLI-MS), durchgeführt. Mit dieser Methode können PAKs bis zu einem minimalen Gehalt von 5–50 fg bestimmt werden. Insgesamt konnten 55 verschiedene PAKs detektiert werden (siehe Tabelle 2). Bei 15 dieser PAKs handelte es sich um PAKs, die von der US EPA priorisiert werden (siehe Tabelle 1). Acenaphthylen, das 16. US EPA-PAK, konnte mittels APLI nicht bestimmt werden. Die Masse aller identifizierten PAKs betrug $349,83 \mu\text{g}/\text{kg}$ und die

Masse der 15 analysierten US EPA betrug 215,14 µg/kg. Den Hauptanteil machten die PAKs Fluoranthren, Pyren, Phenanthren und Reten aus. Diese fünf PAKs stellen 46,33 % des gesamten PAK-Gehalts dar (Popadić *et al.*, Manuskript in Revision²⁵⁷).

3.2.2 Transkriptom von PM_{2.5} exponierten BEAS-2B

BEAS-2B Zellen wurden mit 100 µg/ml PM_{2.5} für fünf Wochen exponiert. Anschließend wurde die mRNA aus diesen Zellen isoliert und die globale Genexpression der Zellen mit dem Affymetrix GeneChip® Human Genome HG-U133 Plus 2.0 oligonucleotide Microarray analysiert. Zytotoxische Effekte dieser langen PM_{2.5}-Exposition konnten durch die Untersuchungen von Dornhof *et al.* ausgeschlossen werden.²⁵⁰ Von den über 20.000 untersuchten Genen wurden 175 durch PM_{2.5} differentiell im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen exprimiert (adjusted *p*-Wert < 0,01). Davon waren 78 Gene hoch- und 97 Gene herunterreguliert. Die 15 am stärksten hoch- und herunterregulierten Gene sind mit ihrem fold change in Tabelle 3 dargestellt. Alle differentiell exprimierten Gene sind in Tabelle 33 (Anhang) aufgelistet. Unter den signifikanten hochregulierten Genen sind solche, die am Metabolismus von Xenobiotika (*CYP1A1*), an Entzündungsprozessen (*IL1B*, *IL6* und *PTGS2*), an oxidativem Stress (*HMOX1* und *STC29*) sowie an der epithelial-mesenchymalen Transition (*FOXD1*)¹⁷⁵ beteiligt sind. Drei der Top fünf herunterregulierten Gene wurden im Zusammenhang mit Lungenkrebs diskutiert. Darunter ist das antitumorale und antiangiogene Gen *MMP12*^{258,259}, der Tumorsuppressor *ID4*²⁶⁰ und *TNFSF10*, auch bekannt als *TRAIL*, das den Tod von Tumorzellen fördert und die Empfindlichkeit gegenüber Chemoresistenz erhöht^{261,262}. Die Herunterregulation dieser Gene könnte einen negativen Einfluss auf Lungenkrebs und dessen Therapie zur Folge haben.

Tabelle 3: Top 15 der hoch- und herunterregulierten Gene langzeitexponierter BEAS-2B. BEAS-2B Zellen wurden kontinuierlich für fünf Wochen mit 100 µg/ml PM_{2.5} exponiert. Anschließend wurde die mRNA von PM_{2.5} exponierten Zellen und unbehandelten Kontrollzellen isoliert und cRNA Probes hergestellt. Das Transkriptom der cDNA wurde mit dem Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 oligonucleotide Microarray Chip analysiert. Die bioinformatische Analyse der erhaltenen Daten erfolgte durch Dr. Stephan Flemming und Dr. Gwang-Jin Kim. Dargestellt ist der fold change (FC) bzw. der log₂FC im Vergleich zum entsprechenden unbehandelten Kontrollgen.

Gen-symbol	Genname	PM _{2.5}		PM _{2.5} + dsRNA	
		log ₂ FC	FC	log ₂ FC	FC
<i>GREM1</i>	Gremlin 1, DAN Familie BMP-Antagonist	2,85	7,20	2,79	6,92
<i>EREG</i>	Epiregulin	2,73	6,65	2,32	5,01
<i>CYP1A1</i>	Cytochrom P450, Familie 1, Subfamilie A, Polypeptid 1	2,54	5,82	2,55	5,88
<i>IL1A</i>	Interleukin 1 alpha	2,32	5,00	1,87	3,66
<i>S100A9</i>	S100 Calcium bindendes Protein A9	2,05	4,15	2,05	4,16
<i>TGFA</i>	Transformationswachstumsfaktor alpha	2,04	4,10	2,10	4,30
<i>AREG</i>	Amphiregulin	2,03	4,10	1,67	3,18
<i>SP8</i>	Sp8 Transkriptionsfaktor	1,89	3,70	1,94	3,83
<i>SCG5</i>	Sekretogranin V (7B2 Protein)	1,83	3,56	-	-
<i>COL6A1</i>	Kollagen, Type VI, alpha 1	1,71	3,27	1,83	3,55
<i>SLC7A11</i>	Löslicher Carrier Familie 7 (anionischer Aminosäure Transporter leichte Kette, xc-System), Mitglied 11	1,69	3,24	1,48	2,79
<i>AKR1C2</i>	Aldo-Keto-Reduktase Familie 1, Mitglied C2	1,66	3,16	1,60	3,03
<i>MYO1G</i>	Myosin IG	1,61	3,04	1,96	3,90
<i>PHLDA1</i>	Pleckstrin Homologie ähnliche Domäne, Familie A Mitglied 1	1,57	2,97	1,36	2,56
<i>ITGA2</i>	Integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 Untereinheit des VLA-2 Rezeptors)	1,54	2,90	1,33	2,51
<i>TRIM22</i>	Dreigeteiltes Motiv beinhaltet 22	-1,91	0,27	-1,93	0,26
<i>VIT</i>	Vitrin	-1,92	0,26	-1,85	0,28
<i>LAMP3</i>	Lysosomal-assoziiertes Membranprotein 3	-1,94	0,26	-1,83	0,28
<i>OLFML1</i>	Olfaktomedin-ähnlich 1	-1,96	0,26	-1,80	0,29
<i>MYLK3</i>	Myosin leichte Kette Kinase 3	-1,96	0,26	-1,82	0,28
<i>PKDCC</i>	Protein Kinase enthaltende Domäne, zytoplasmatisch	-2,01	0,25	-2,09	0,23
<i>LAMA1</i>	Laminin, alpha 1	-2,05	0,24	-1,83	0,28
<i>STEAP4</i>	STEAP Familienmitglied 4	-2,06	0,24	-1,86	0,28
<i>MCC</i>	Mutiert bei kolorektalen Karzinomen	-2,26	0,21	-2,00	0,25
<i>MAMDC2</i>	MAM enthaltende Domäne 2	-2,47	0,18	-2,45	0,18
<i>TNFSF10</i>	Tumornecrosefaktor (Ligand) Superfamilie, Mitglied 10	-2,60	0,16	-2,67	0,16
<i>ID4</i>	Inhibitor der DNA-Bindung 4, dominantes negatives Helix-Loop-Helix-Protein	-2,67	0,16	-1,72	0,30
<i>MMP12</i>	Matrixmetallopeptidase 12 (Makrophagen Elastase)	-2,69	0,15	-2,32	0,20
<i>IGSF10</i>	Immunoglobulin Superfamilie, Mitglied 10	-2,75	0,15	-1,82	0,28
<i>SV2C</i>	Synaptisches Vesikel-Glykoprotein 2C	-3,70	0,08	-3,35	0,10

Um die erhaltenen Daten der Transkriptom-Analyse zu verifizieren, wurde dieselbe mRNA mittels qRT-PCR untersucht, die auch für die Transkriptom-Analyse verwendet wurde. Nachdem die mRNA in cDNA umgeschrieben wurde, wurde die Genexpression der Top drei hochregulierten Gene (*CYP1A1*, *EREG* und *GREM1*) sowie der Gene *HMOX1*, *IL1B* und *IL6*, die in wichtigen zellulären Prozessen und Signalwegen involviert sind, untersucht. Durchgeführt wurde die qRT-PCR von Désirée Popadić unter Anleitung der Autorin der vorliegenden Arbeit. In Abbildung 21 ist der fold change der verifizierten Gene aus den Microarray-Daten sowie der qRT-PCR-Analyse bezogen jeweils auf unbehandelte Kontrollzellen dargestellt. Der Pearson Korrelationskoeffizient zwischen den beiden Datensets betrug 0,92 ($p < 0,01$).

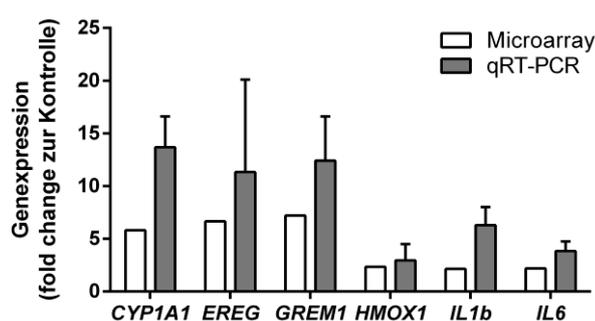


Abbildung 21: Validierung der Microarray-Daten mittels qRT-PCR. BEAS-2B Zellen wurden kontinuierlich für fünf Wochen mit 100 µg/ml PM_{2.5} exponiert. Anschließend wurde die mRNA von PM_{2.5} exponierten Zellen und unbehandelten Kontrollzellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde mittels qRT-PCR auf die Expression der entsprechenden Gene analysiert und als fold change bezogen auf unbehandelte Kontrollzellen dargestellt. Abgebildet sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die qRT-PCR wurde von Désirée Popadić unter Anleitung der Autorin der vorliegenden Arbeit durchgeführt.

3.2.3 Induktion der Transkriptionsfaktoren AhR und HIF-1

Bioinformatische Analysen zu Transkriptionsfaktorbindestellen wurden mit den PM_{2.5} induzierten differentiell exprimierten Genen von Herrn Dipl.-Ing. Wolfgang Schmidt-Heck durchgeführt. Verwendet wurde der Promoter Integration in Microarray Analysis (PRIMA) Algorithmus der Expander-Software 7.1 (EXpression ANalyzer und DisplayER) verwendet.²⁶³ Die Transkriptionsfaktoren, die Bindestellen in den hochregulierten Genen aufwiesen, sind in Tabelle 4 und die, die Bindestellen in den herunterregulierten Genen aufwiesen, in Tabelle 34 (Anhang) dargestellt. Die Analyse ergab, dass einige der hochregulierten Gene eine Bindestelle für den AhR aufweisen. Unter diesen Genen sind auch drei der am stärksten hochregulierten Gene (*AKRIC2*, *CYP1A1* und *EREG*) vertreten, von denen *AKRIC2* und *CYP1A1* am Metabolismus von Xenobiotika, wie PAKs, beteiligt sind. Da der AhR durch Chemikalien, wie PAKs aktiviert wird, und diese

nachweislich Bestandteile des untersuchten Feinstaubes sind (siehe Tabelle 2), ist es sehr wahrscheinlich, dass der AhR in BEAS-2B durch die Exposition mit PM_{2.5} aktiviert wird.

Tabelle 4: Transkriptionsfaktoren, die Bindungsstellen in den durch PM_{2.5} induzierten hochregulierten Genen in BEAS-2B aufwiesen. Dargestellt sind die statistisch signifikantesten ($p < 0,01$) Transkriptionsfaktoren und jeweils die von ihnen regulierten Gene. Die Top 15 hochregulierten Gene erscheinen in Rot.

Transkriptionsfaktor	p-Wert	Gene
ISRE [M00258]	$7,9 \times 10^{-4}$	<i>ACO1, COL13A1, DUSP4, ENTPD4, ETV4, EVI2B, FAM83B, FBXO16, FGR, G0S2, GNA13, GSAP, HMOX1, IL1B, IL6, KRT6A, LETM2, MYO1G, PNPLA1, S100A9, SCD, SLC7A11, STC2</i>
GATA-1 [M00127]	$1,0 \times 10^{-3}$	<i>ADGRE2, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, CDCP1, DUSP6, EGRI, ENTPD4, FAM83B, G0S2, IL1A, ITGA2, POPDC3, PSCA, PTGS2, PTK6, SCG5, SEMA3A, STC2, TPBG</i>
Freac-3 [M00291]	$2,0 \times 10^{-3}$	<i>AKR1C1, AKR1C2, COL13A1, COL6A1, DHRS9, DUSP4, DUSP6, EHF, EREG, ERFF1, EVI2B, FGR, GNA13, GREM1, GSAP, IL1A, LAPTM5, PAQR5, PDLIM5, PI3, PNPLA1, RDH10, S100A9, SCG5, SLC22A23, SLC7A11, SP8, STC2, TMEM156, TNXB, TSPAN12, ZNF395</i>
GR [M00192]	$2,0 \times 10^{-3}$	<i>ACO2, AKR1C1, AKR1C2, CCSAP, DUSP6, EHF, GSAP, IL1A, IL1B, IL6, JUN, KRT6A, LAPTM5, PAQR5, PSCA, S100A9, SCG5, SLC7A11, SLCO4A1, SPOCK1, STC2, TGFA, TNXB, TSPAN12</i>
NF-1 [M00193]	$2,0 \times 10^{-3}$	<i>DUSP6, EHF, EREG, ETV4, FAM83B, G0S2, GNA13, GSAP, IL6, ITGB4, JUN, KRT6A, LAPTM5, PAQR5, PHLDA1, PI3, PSCA, RDH10, SCD, TGFA, TNXB, ZNF395</i>
AhR:Arnt [M00237]	$2,0 \times 10^{-3}$	<i>AKR1C1, AKR1C2, ARNTL2, CDCP1, CYP1A1, DUSP6, EGRI, ENTPD4, EREG, FBXO16, FRMD3, G0S2, GNA13, ITGB4, JUN, PAQR5, PSCA, RDH10, SCD, SEMA3A, SERINC2, STC2, TNXB</i>
AFP1 [M00616]	$2,0 \times 10^{-3}$	<i>AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, ARNTL2, DHRS9, EGRI, EPB41L4B, ETV4, FAM83B, GNA13, IL1B, MICAL2, PTGS2, SCG5, SERINC2, SH2D2A, SLC22A23, SLC7A11, SLCO4A1, SP8, TNXB, TPBG, TSPAN12, ZNF395</i>
FOXM1 [M00630]	$2,0 \times 10^{-3}$	<i>AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, CDCP1, COL6A1, DHRS9, EHF, EPB41L4B, ETV4, EVI2B, FRMD3, G0S2, GREM1, GSAP, IL1B, MICAL2, PTGS2, SEMA3A, SH2D2A, TGFA</i>
C/EBPgamma [M00622]	$3,0 \times 10^{-3}$	<i>ACO1, AKR1C2, COL13A1, EREG, EVI2B, FAM83B, FBXO16, GREM1, GSAP, IL1B, IL6, ITGB4, MICAL2, MYO1G, PHLDA1, PI3, PTGS2, RDH10, SCD, SCG5, SEMA3A, SLC22A23, SP8, STEAP1, TMEM156, TSPAN12, ZNF395</i>
Alx-4 [M00619]	$3,0 \times 10^{-3}$	<i>ADGRE2, CYP1A1, DUSP4, EHF, EVI2B, IL1B, JUN, LETM2, PI3, SEMA3A</i>
TEF-1 [M00704]	$4,0 \times 10^{-3}$	<i>ACO1, ACOX2, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, ARLAC, ARNTL2, CCSAP, CDCP1, COL13A1, COL6A1, CYP1A1, DUSP4, DUSP6, EHF, ENTPD4, EPB41L4B, EREG, ERFF1, ETV4, EVI2B, FAM83B, FBXO16, G0S2, GNA13, GREM1, GSAP, HMOX1, IL1A, IL1B, IL6, ITGA2, ITGB4, JUN, KRT6A, LAPTM5, LETM2, MICAL2, MYO1G, PAQR5, PTGS2, PTK6, RDH10, S100A9, SCD, SCG5, SEMA3A, SERINC2, SH2D2A, SLC22A23, SLCO4A1, SP8, SPOCK1, STC2, TGFA, TNXB, TPBG, TSPAN12, ZNF395</i>

Transkriptionsfaktor	p-Wert	Gene
STAT [M00777]	$4,0 \times 10^{-3}$	<i>ARL4C</i> , <i>COL13A1</i> , <i>COL6A1</i> , <i>DUSP4</i> , <i>ETV4</i> , <i>G0S2</i> , <i>GNA13</i> , <i>GREM1</i> , <i>HMOX1</i> , <i>IL1A</i> , <i>IL1B</i> , <i>MICAL2</i> , <i>PHLDA1</i> , <i>PTK6</i> , <i>RDH10</i> , <i>SCG5</i> , <i>TPBG</i> , <i>TSPAN12</i> , <i>ZNF395</i>
GATA-1 [M00346]	$5,0 \times 10^{-3}$	<i>ACO1</i> , <i>AKR1C1</i> , <i>AKR1C2</i> , <i>AKR1C3</i> , <i>COL6A1</i> , <i>EHF</i> , <i>EREG</i> , <i>ERRF11</i> , <i>ITGA2</i> , <i>JUN</i> , <i>LETM2</i> , <i>MYO1G</i> , <i>PDLIM5</i> , <i>PSCA</i> , <i>SCG5</i> , <i>SERINC2</i> , <i>SLC7A11</i> , <i>STC2</i> , <i>TGFA</i>
Hand1:E47 [M00222]	$6,0 \times 10^{-3}$	<i>AKR1C1</i> , <i>AKR1C2</i> , <i>ARNTL2</i> , <i>CDCP1</i> , <i>DUSP4</i> , <i>EREG</i> , <i>FAM83B</i> , <i>GREM1</i> , <i>IL1B</i> , <i>PNPLA1</i> , <i>POPDC3</i> , <i>PTGS2</i> , <i>RDH10</i> , <i>SCG5</i> , <i>SLC22A23</i> , <i>TSPAN12</i> , <i>ZNF395</i>
NKX3A [M00451]	$7,0 \times 10^{-3}$	<i>ACO1</i> , <i>ADGRE2</i> , <i>AKR1C1</i> , <i>AKR1C2</i> , <i>COL6A1</i> , <i>EHF</i> , <i>ENTPD4</i> , <i>ERRF11</i> , <i>EVI2B</i> , <i>FAM83B</i> , <i>FBXO16</i> , <i>GREM1</i> , <i>GSAP</i> , <i>IL1B</i> , <i>IL6</i> , <i>LETM2</i> , <i>MYO1G</i> , <i>PHLDA1</i> , <i>POPDC3</i> , <i>PTGS2</i> , <i>SCG5</i> , <i>SEMA3A</i> , <i>SLC7A11</i> , <i>SLCO4A1</i> , <i>STEAP1</i> , <i>TMEM156</i> , <i>TNXB</i> , <i>TPBG</i> , <i>TSPAN12</i> , <i>ZNF395</i>

Der Einfluss von PM_{2.5} auf die Aktivität des AhR wurde mit verschiedenen Inhibitoren getestet, in dem die Genexpression verschiedener Targetgene über einen bestimmten Zeitverlauf untersucht wurde. Verwendet wurden drei verschiedene Inhibitoren: zum einen das α -Naphthoflavon (ANF), das die nukleäre Translokation des AhR dadurch hemmt, dass es kompetitiv die Bindung der Liganden an den AhR verhindert^{264,265}; zum anderen wurde der Inhibitor CH223191 (CH) verwendet, der die nukleäre Akkumulation des AhR unterbindet und bevorzugt mit halogenierten PAKs um den AhR konkurriert²⁶⁶ und als dritter Inhibitor wurde das 6,2',4'-Trimethoxyflavon (TMF) verwendet, das die Interaktion von PAKs mit dem AhR hemmt.²⁶⁷ Dafür wurden BEAS-2B kontinuierlich für 9, 16 und 23 d mit 100 μ g/ml PM_{2.5} exponiert. Die Zellen wurden 49 h vor der mRNA-Extraktion mit den entsprechenden Inhibitoren behandelt. Die isolierte mRNA wurde in cDNA umgeschrieben und die zeitabhängige Genexpression der Gene *CYP1A1*, *EREG*, *GREM1*, *IL1B* und *IL6* mittels qRT-PCR untersucht und auf die unbehandelte Kontrolle bezogen (siehe Abbildung 22).

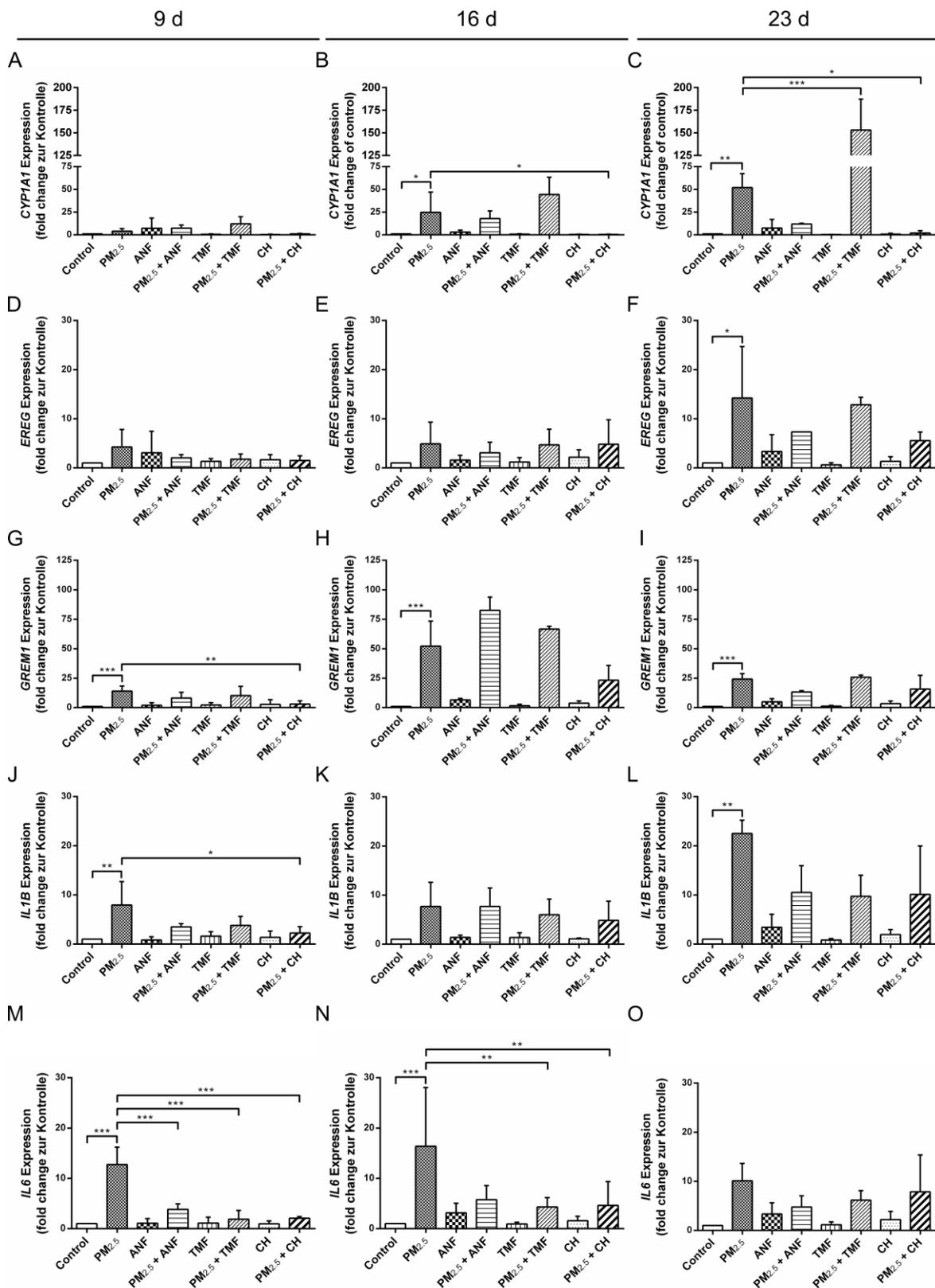


Abbildung 22: Genexpression der Gene *CYP1A1* (A–C), *EREG* (D–F), *GREM1* (G–I), *IL1B* (J–L), *IL6* (M–O) nach einer 9-, 16- oder 23-tägigen Exposition mit $PM_{2.5}$ allein oder in Kombination mit den AhR-Inhibitoren ANF, TMF und CH. Die Zellen wurden mit $100\mu\text{g/ml}$ $PM_{2.5}$ für die verschiedenen Zeiträume exponiert. Die jeweiligen AhR-Inhibitoren ($1\mu\text{M}$) wurden den Zellen 49 h vor der mRNA Isolierung zugesetzt. Anschließend folgte die Isolierung der mRNA, die Transkription in cDNA und die Analyse der

Die Expression von *CYP1A1* war nach 16 und 23 d signifikant gestiegen. Eine Hemmung der *CYP1A1* Genexpression konnte nur eindeutig für den CH Inhibitor beobachtet werden. Mit ANF konnte lediglich eine reduzierende Tendenz nachgewiesen werden und mit TMF kam es sogar zu einer signifikanten Erhöhung der Genexpression. Eine erhöhte Genexpression für *EREG* konnte erst nach 23 d gezeigt werden, die durch die Inhibitoren ANF und CH reduziert wurde, jedoch nicht signifikant. Mit der Behandlung von TMF wurde kein Effekt erzielt. Die Genexpression von *GREM1* wurde zu allen Zeitpunkten durch die Exposition mit PM_{2.5} signifikant erhöht, nach 16 d war diese jedoch am höchsten. Nur der Inhibitor CH war in der Lage diese nach 9 d signifikant zu reduzieren, nach 16 d zeigte sich hier nur eine Tendenz. *IL1B* zeigte zu allen untersuchten Zeitpunkten eine erhöhte Genexpression, die mit allen Inhibitoren nach 9 und 23 d reduziert werden konnte, signifikant aber nur mit CH nach 9 Tagen. Auch die Genexpression von *IL6* war zu allen Zeitpunkten erhöht und konnte mit allen Inhibitoren nach 9 d signifikant und für TMF und CH auch nach 16 d signifikant reduziert werden. Die Ergebnisse indizieren, dass es durch die Exposition mit PM_{2.5} zu einer Aktivierung des AhR kommt und dass die Beteiligung der PAKs in diesen Prozessen wahrscheinlich ist.

Neben dem AhR wurde in der Transkriptionsfaktoranalyse auch die Beteiligung des Transkriptionsfaktors HIF-1 vorausgesagt, dieser gehörte jedoch nicht zu den signifikanten Transkriptionsfaktoren ($p < 0,3$). Da aber die Ergebnisse des DNA-Methyloms von PM_{2.5} exponierten BEAS-2B einen Zusammenhang zwischen der Induktion von krankheitsrelevanten Signalwegen und HIF-1 zeigte, wurde untersucht, ob PM_{2.5} zu einer Aktivierung von HIF-1 führte. Dafür wurde die Genexpression des HIF-1 Targetgens *HMOX1*^{268,269} mittels qRT-PCR und Verwendung des HIF-1 α Inhibitors KC7F2 (KC) untersucht. BEAS-2B wurden kontinuierlich für 9, 16 und 23 d mit 100 μ g/ml PM_{2.5} exponiert und die Zellen 49 h vor der mRNA-Extraktion mit dem HIF-1 α -Inhibitor KC behandelt. Die relative *HMOX1* Genexpression ist zeitabhängig in Abbildung 23 dargestellt und zeigt, dass es durch PM_{2.5} nach 16 und 23 d zu einer signifikanten Erhöhung der *HMOX1* Genexpression kam, die auch durch Zugabe von KC reduziert werden konnte.

Genexpression mittels qRT-PCR. Abgebildet sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus vier (Tage 9 und 16) oder zwei (Tag 23) unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA und Bonferroni's Post-hoc-Test ermittelt und wie folgt angegeben: ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$. Erste Spalte: 9 Tage, Zweite Spalte: 16 Tage, Dritte Spalte: 23 Tage. Die Ergebnisse wurden reproduziert von Désirée Popadić.

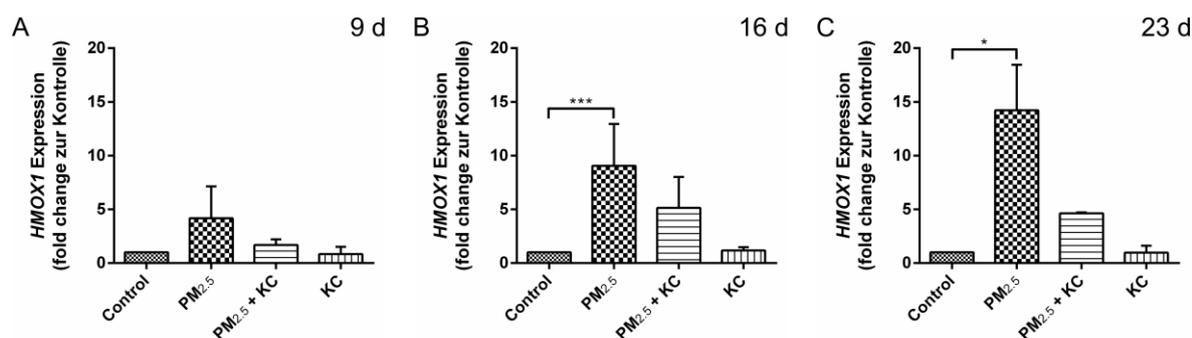


Abbildung 23: Genexpression von *HMOX1* (A–C) nach einer 9-, 16- oder 23-tägigen Exposition mit $PM_{2.5}$ allein oder in Kombination mit dem HIF-1 α -Inhibitor KC in BEAS-2B Zellen. Die Zellen wurden wie angegeben für 9 (A), 16 (B) oder 23 d (C) mit 100 μ g/ml $PM_{2.5}$ exponiert. Der HIF-1 α -Inhibitor KC7F2 (5 μ M) wurde 49 h vor der mRNA Isolierung zu den Zellen gegeben. Anschließend erfolgte die Isolierung der mRNA, die Transkription in cDNA und die Analyse der Genexpression mittels qRT-PCR. Abgebildet sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei (9 d), fünf (16 d) oder zwei (23 d) unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA und Bonferroni's Post-hoc-Test ermittelt und wie folgt angegeben: ***, $p < 0,001$; *, $p < 0,05$. Die Ergebnisse wurden reproduziert von Désirée Popadić.

Mittels Western Blot-Analysen wurde zusätzlich untersucht, ob die Exposition mit $PM_{2.5}$ zu einer Induktion der HIF-1 α Untereinheit führte. Dafür wurden BEAS-2B kontinuierlich für 8 und 15 d mit 100 μ g/ml $PM_{2.5}$ exponiert. Anschließend wurden Kernextrakte der Zellen mittels Western Blot auf HIF-1 α untersucht. In Abbildung 24A ist zu erkennen, dass es zu beiden Zeitpunkten, aber vor allem nach 8 d, zu einer vermehrten Translokation von HIF-1 α in den Zellkern von $PM_{2.5}$ exponierten BEAS-2B kam. Zusätzlich wurde auch untersucht, ob es durch $PM_{2.5}$ unter dem Einfluss von HIF-1 zu einer Induktion von HO-1, dem von *HMOX1* codierten Protein, kam. Dafür wurden BEAS-2B ebenfalls für 8 und 15 d mit 100 μ g/ml $PM_{2.5}$ exponiert und 25 h vor der Gewinnung von Gesamtextrakten mit dem HIF-1 α Inhibitor KC behandelt. Vor allem nach 8 d ließ sich eine Reduktion der HO-1 Proteinmenge durch den Inhibitor KC beobachten (siehe Abbildung 24B). Zusammen betrachtet zeigen sowohl die Ergebnisse zur Genexpression der *HMOX1* als auch der Western Blot-Analysen, dass es durch $PM_{2.5}$ zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktor HIF-1 kam und dass dieser an der $PM_{2.5}$ induzierten Expression der HO-1 beteiligt war.

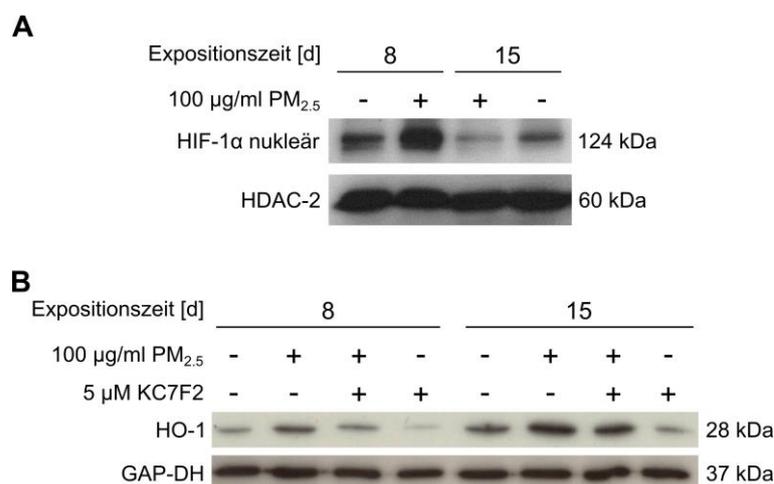


Abbildung 24: Nukleäre Translokation von HIF-1α (A) und Expression der HO-1 (B) nach einer acht- und 15-tägigen PM_{2.5} Exposition. BEAS-2B Zellen wurden 8 bzw. 15 d mit 100 µg/ml PM_{2.5} behandelt. (A) Die nukleäre Translokation von HIF-1α wurde mittels Western Blot-Analysen aus Kernextrakten ermittelt. (B) Aus Gesamtextrakten wurde die Expression des *HMOX1*-Genprodukts HO-1 sowie die Beteiligung von HIF-1 an dessen Expression durch Zusatz des HIF-1α-Inhibitor KC7F2 (5 µM) 25 h vor Herstellung des Gesamtextraktes mittels Western Blot-Analysen bestimmt. Abgebildet ist jeweils ein repräsentativer Western Blot von zwei unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse wurden reproduziert von Désirée Popadić.

3.2.4 Veränderungen der PM_{2.5} beeinflussten Genexpression durch dsRNA

Verschiedene epidemiologische Studien konnten zwischen der Exposition mit PM_{2.5} aus der Biomasseverbrennung und der Erkrankung an Atemwegsinfekten einen Zusammenhang feststellen.^{20–22,166} Deshalb wurde untersucht, in welchem Ausmaß Viruskomponenten (dsRNA) das Transkriptom von PM_{2.5} exponierten BEAS-2B beeinflussten. Dafür wurden BEAS-2B Zellen, die für fünf Wochen mit 100 µg/ml PM_{2.5} exponiert wurden, 1 h vor mRNA Isolierung mit 100 µg/ml dsRNA stimuliert, um die Gene zu erfassen, die frühzeitig nach dsRNA-Stimulation exprimiert wurden. Die isolierte mRNA wurde ebenfalls mit dem Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 oligonucleotide Microarray Chip analysiert und das Genexpressionsprofil mit demjenigen von unbehandelten Kontrollzellen verglichen ($p < 0,01$). In BEAS-2B, die ausschließlich mit dsRNA exponiert wurden, waren lediglich zwei Gene differentiell exprimiert und zwar hochreguliert (siehe Tabelle 5). Wurde das Genexpressionsprofil von PM_{2.5} und dsRNA exponierten Zellen auf das von unbehandelten Kontrollzellen bezogen, so wurden in diesen Zellen 540 Gene differentiell exprimiert und zwar 237 Gene hochreguliert und 303 herunterreguliert. Die am stärksten hoch- und herunterregulierten Gene sind in Tabelle 3 dargestellt, alle 540 Gene sind in alphabetischer Reihenfolge in Tabelle 35 (Anhang) aufgelistet. Wurde das Genexpressionsprofil von PM_{2.5} und dsRNA exponierten Zellen nicht auf die Kontrollzellen bezogen, sondern auf das von PM_{2.5} exponierten Zellen, konnten keine Gene ermittelt werden, die statistisch signifikante Unterschiede zeigten, da die Unterschiede zu gering waren.

Tabelle 5: Übersicht der analysierten Microarray-Daten nach der unterschiedlichen Behandlung von BEAS-2B-Zellen.

Gruppe 1	Gruppe 2	Alle DEGs ^a	Hochregulierte Gene	Herunterregulierte Gene
PM _{2.5}	Kontrolle	175	78	97
dsRNA	Kontrolle	2	2	0
PM _{2.5} + dsRNA	Kontrolle	540	237	303
PM _{2.5} + dsRNA	PM _{2.5}	0	0	0

^a DEG: differentiell exprimierte Gene

Um dennoch die Gene zu bestimmen, die in der Gruppe PM_{2.5} + dsRNA auf Grund der Exposition mit dsRNA exprimiert wurden, wurde ein Venn-Diagramm (siehe Abbildung 25) unter Heranziehung der Gene, die nur in PM_{2.5} exponierten BEAS-2B Zellen exprimiert wurden, erstellt. Dabei ergaben sich 15 Gene, die nur in PM_{2.5} exponierten Zellen differentiell exprimiert waren, 380 Gene, die spezifisch für die PM_{2.5} + dsRNA Gruppe waren und 160 Gene die in beiden Gruppen zu finden waren. Die 380 für PM_{2.5} + dsRNA spezifischen Gene sind in Tabelle 35 (Anhang) in Rot gekennzeichnet. Diese Gene wurden bezüglich ihrer Funktion in biologischen Prozessen mit dem Enrichr Web Servers²⁷⁰ analysiert (siehe Tabelle 6). Unter den zehn signifikantesten biologischen Prozessen sind vor allem solche, welche im Zusammenhang mit Xenobiotika, Glucuronidierung und dem Typ I Interferon Signalweg stehen. Diese 380 spezifischen Gene haben einen potentiellen Einfluss auf die Abwehr und die zelluläre Antwort auf eine Virusinfektion und sind negativ an der Regulation der viralen Replikation beteiligt.

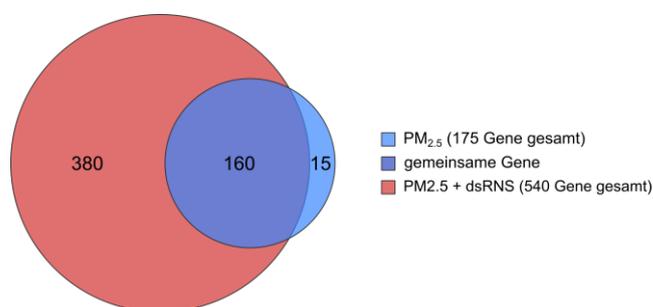


Abbildung 25: Venn-Diagramm, das die Anzahl der gemeinsamen und gruppenspezifischen Gene zwischen der PM_{2.5} und PM_{2.5} + dsRNA Gruppe darstellt. BEAS-2B Zellen wurden kontinuierlich für fünf Wochen mit 100 µg/ml PM_{2.5} exponiert und 1h vor mRNA Extraktion wurden die Zellen mit dsRNA (100 µg/ml) behandelt.

Tabelle 6: GO der 380 für PM_{2.5} + dsRNA spezifischen Gene, in langzeitexponierten BEAS-2B. Dargestellt sind die Gene, die den zehn signifikantesten biologischen Prozessen zugeordnet wurden. Die bioinformatische Analyse der Array-Daten erfolgte mittels des Enrichr Web Servers²⁷⁰ durch Désirée Popadić.

Bezeichnung	adjusted <i>p</i> -Wert	Combined Score	Gene
Glucuronidierung von Xenobiotika (GO:0052697)	2,80E-13	76,07	<i>UGT1A10; UGT1A1; UGT1A5; UGT1A4; UGT1A3; UGT1A9; UGT1A8; UGT1A7; UGT1A6</i>
Abwehrreaktion auf Viren (GO:0051607)	2,71E-08	49,06	<i>MX2; STAT2; MX1; SAMHD1; IFNL2; SLFN11; IFI16; TRIM5; OAS3; C19ORF66; IFNL3; TLR3; SERINC5; APOBEC3B</i>
Zelluläre Glucuronidierung (GO:0052695)	4,93E-07	34,55	<i>UGT1A10; UGT1A1; UGT1A4; UGT1A3; UGT1A9; UGT1A7; UGT1A6</i>
Typ-I-Interferon-Signalweg (GO:0060337)	3,86E-05	30,60	<i>OAS2; STAT1; MX2; OAS3; STAT2; MX1; HLA-F; XAF1; IFIT1; SAMHD1</i>
Reaktion auf Viren (GO:0009615)	5,92E-05	26,24	<i>FOSL1; CREBZF; IFIH1; OAS2; MX2; OAS3; MX1; AP1S1; IFI44; HMG2A; GATA3; IFIT1</i>
Negative Regulation der viralen Genomreplikation (GO:0045071)	8,50E-05	23,58	<i>PARP10; TRIM6; IFI16; OAS3; MX1; C19ORF66; IFIT1; IFNL3</i>
Retinsäure-Metabolismus (GO:0042573)	1,07E-04	23,41	<i>UGT1A1; UGT1A3; UGT1A9; UGT1A8; UGT1A7</i>
Glucuronidierung von Flavonoiden (GO:0052696)	4,93E-07	20,23	<i>UGT1A1; UGT1A3; UGT1A9; UGT1A8; UGT1A7</i>
Interferon-gamma vermittelter Signalweg (GO:0060333)	3,50E-04	18,55	<i>TRIM8; OAS2; TRIM5; STAT1; OAS3; HLA-F; GBP1; TRIM21; CD44</i>
Flavon-Stoffwechselprozesse (GO:0051552)	4,93E-07	18,18	<i>UGT1A10; UGT1A1; UGT1A9; UGT1A8; UGT1A7</i>

3.2.5 Zusammenhang zwischen PM_{2.5} und PM_{2.5} + dsRNA induzierten hochregulierten Genen und Lungenerkrankungen

Die gesundheitlichen Auswirkungen von PM_{2.5} wurden in verschiedenen epidemiologischen Studien untersucht und ein Zusammenhang mit pulmonalen Erkrankungen festgestellt.^{1,17,227} Entsprechend konnte auch die Gen-Ontologie der 380 für PM_{2.5} + dsRNA spezifischen Gene (siehe Tabelle 6) zeigen, dass einige der differentiell exprimierten Gene an der adaptiven oder spezifischen Immunantwort beteiligt sind, was die Gefahr mikrobieller Infektionen möglicherweise erhöht. Um den kausalen Zusammenhang zwischen Erkrankungen, die mit einer PM_{2.5} Exposition in Verbindung gebracht werden, und dem Transkriptom von PM_{2.5} und PM_{2.5} + dsRNA exponierten Zellen zu untersuchen, wurde eine Krankheitsontologie durchgeführt. Dafür wurde die Webapplikation WebGestalt^{271,272} unter Verwendung der Pharmacogenomics Knowledgebase (PharmGKB)-Datenbank²⁷³ verwendet. Die Analyse wurde von Herrn Dipl.-Ing. Wolfgang Schmidt-Heck durchgeführt.

Von den 100 signifikantesten Erkrankungen sind die Lungen- und lungenassoziierten Erkrankungen in Tabelle 7 dargestellt. Dabei wurden nur hochregulierte Gene betrachtet, da diese eine größere Korrelation zu Lungen- und lungenassoziierten Erkrankungen zeigten. Die hochregulierten Gene $PM_{2.5}$ + dsRNA exponierter Zellen wurden mit den gleichen Erkrankungen wie die hochregulierten Gene nur nach $PM_{2.5}$ -Exposition, assoziiert, jedoch mit höherer Signifikanz. Die Gene, die diesen Krankheiten zugeordnet wurden, sind in Tabelle 8 nur für $PM_{2.5}$ exponierte Zellen aufgelistet, da diese für $PM_{2.5}$ + dsRNA exponierte Zellen im Wesentlichen gleich waren. Krankheiten die mit einer $PM_{2.5}$ bzw. $PM_{2.5}$ + dsRNA-Exposition assoziiert wurden, waren vor allem Krebs, Infektionen, pulmonale Fibrose und obstruktive Lungenerkrankungen. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass $PM_{2.5}$ möglicherweise an der Entstehung und Entwicklung von Lungenerkrankungen beteiligt ist und dass eine mikrobielle Infektion zu einer höheren Anfälligkeit für diese Erkrankungen führen könnte.

Tabelle 7: Krankheitsontologie hochregulierter Gene nach Exposition mit $PM_{2.5}$ und $PM_{2.5}$ + dsRNA mit dem Schwerpunkt auf lungenspezifische und lungenassoziierte Erkrankungen. Lungen- und lungenassoziierte Erkrankungen wurden aus den 100 signifikantesten Krankheiten ausgewählt, die vom Webserver WebGestalt^{271,272} unter Verwendung der PharmGKB-Datenbank²⁷³ (adjusted p -Wert < 0,01) berechnet wurden. Adjusted p -Werte aus der $PM_{2.5}$ -Gruppe wurden absteigend angeordnet und die entsprechenden adjusted p -Werte aus der $PM_{2.5}$ + dsRNA-Gruppe entsprechend zugeordnet.

Krankheit	adjusted p -Wert	
	$PM_{2.5}$	$PM_{2.5}$ + dsRNA
Krebs oder virale Infektion	1,95E-07	1,52E-13
Pulmonale Fibrose	4,92E-07	3,54E-05
Pulmonale Erkrankung, chronisch obstruktiv	4,98E-07	1,01E-08
Haut- und Bindegewebserkrankungen	6,62E-07	2,89E-08
Lungenerkrankung	6,62E-07	1,74E-07
Neoplasmen	1,41E-06	3,77E-13
Epithelkarzinome	3,58E-06	7,57E-11
Nekrose	3,91E-06	3,93E-07
Neoplastische Prozesse	1,63E-05	6,07E-11
Pathologische Prozesse	1,63E-05	6,50E-09
Entzündung	1,89E-05	3,85E-05
Lungenkrebs	2,11E-05	6,26E-13
Neoplastische Metastasierung	2,42E-05	4,30E-08
Anfälligkeit für Krankheiten	2,73E-05	5,48E-12
Gram-negative bakterielle Infektionen	2,73E-05	2,94E-06
Karzinom	4,78E-05	7,94E-12
Lungenerkrankungen, obstruktiv	4,78E-05	7,20E-06
Atemwegserkrankungen	5,17E-05	6,35E-09
Chronische Erkrankung	1,00E-04	2,52E-07
Bakterielle Infektionen	1,00E-04	5,44E-06

Krankheit	adjusted <i>p</i> -Wert	
	PM _{2.5}	PM _{2.5} + dsRNA
Berufskrankheiten	3,00E-04	2,00E-04 ^a
Atemwegsinfektionen	4,00E-04	5,91E-05
Erkältung	4,00E-04	6,07E-05
Stress	6,00E-04	3,04E-06

^a: Diese Krankheit war auf Listenplatz 105 in der PM_{2.5} + dsRNA-Gruppe

Tabelle 8: Lungen- und lungenassoziierte Erkrankungen sowie die damit assoziierten hochregulierten Gene in PM_{2.5} exponierten BEAS-2B-Zellen. Lungen- und lungenassoziierte Erkrankungen wurden aus den 100 signifikantesten Krankheiten ausgewählt, die vom Webserver WebGestalt^{271,272} unter Verwendung der PharmGKB-Datenbank²⁷³ (adjusted *p*-Wert < 0,01) analysiert wurden. Adjusted *p*-Werte wurden absteigend angeordnet.

Krankheit	adjusted <i>p</i> -Wert	Gene
Krebs oder virale Infektion	1,95E-07	<i>AKR1C3, AREG, CDCP1, CYP1A1, EGR1, ERFF1, ETV4, ITGB4, JUN, PSCA, PTGS2, PTK6, STEAP1, TPBG</i>
Pulmonale Fibrose	4,92E-07	<i>GREM1, IL1A, IL1B, PI3, S100A9, TGFA</i>
Pulmonale Erkrankung, chronisch obstruktiv	4,98E-07	<i>CYP1A1, EGR1, HMOX1, IL1B, IL6, PI3, PTGS2</i>
Haut- und Bindegewebserkrankungen	6,62E-07	<i>AREG, CYP1A1, ETV4, IL1A, ITGB4, KRT6A, PTGS2, PTK6, S100A9, TNXB</i>
Lungenerkrankung	6,62E-07	<i>AREG, CYP1A1, EHF, HMOX1, IL1A, IL1B, IL6, PI3, PTGS2</i>
Neoplasmen	1,41E-06	<i>AKR1C3, AREG, CDCP1, CYP1A1, EGR1, ETV4, ITGB4, PSCA, PTGS2, PTK6, STEAP1, TGFA</i>
Epithelkarzinome	3,58E-06	<i>AREG, CDCP1, EHF, EREG, ETV4, PTGS2, PTK6, STEAP1</i>
Nekrose	3,91E-06	<i>AREG, HMOX1, IL1A, IL1B, IL6, JUN, PI3, TGFA</i>
Neoplastische Prozesse	1,63E-05	<i>AREG, CDCP1, ETV4, ITGB4, PSCA, PTGS2, STC2, TPBG</i>
Pathologische Prozesse	1,63E-05	<i>CYP1A1, ETV4, HMOX1, IL1A, IL1B, IL6, ITGA2, PSCA, PTGS2</i>
Entzündung	1,89E-05	<i>EGR1, HMOX1, IL1A, IL1B, IL6, PI3, PTGS2, S100A9</i>
Lungenkrebs	2,11E-05	<i>AKR1C1, AKR1C3, AREG, CDCP1, CYP1A1, ETV4, PTGS2</i>
Neoplastische Metastasierung	2,42E-05	<i>CDCP1, ETV4, ITGB4, PSCA, PTGS2, STC2, TPBG</i>
Anfälligkeit für Krankheiten	2,73E-05	<i>CYP1A1, HMOX1, IL1A, IL1B, IL6, ITGA2, PSCA, PTGS2, SLC22A23, TNXB</i>
Gram-negative bakterielle Infektionen	2,73E-05	<i>IL1B, IL6, PI3, PSCA, PTGS2</i>
Karzinom	4,78E-05	<i>AREG, CDCP1, CYP1A1, EGR1, ITGB4, PSCA, PTGS2, TGFA</i>
Lungenerkrankungen, obstruktiv	4,78E-05	<i>HMOX1, IL1B, IL6, PI3, PTGS2</i>

Krankheit	adjusted <i>p</i>-Wert	Gene
Atemwegserkrankungen	5,17E-05	<i>AREG, CYP1A1, HMOX1, IL1A, IL6, PI3, PTGS2</i>
Chronische Erkrankung	1,00E-04	<i>HMOX1, IL1A, IL1B, IL6, PTGS2, S100A9</i>
Bakterielle Infektionen	1,00E-04	<i>IL1A, IL1B, IL6, PI3, PTGS2</i>
Berufskrankheiten	3,00E-04	<i>CYP1A1, IL1A, IL1B, IL6</i>
Atemwegsinfektionen	4,00E-04	<i>IL1A, IL1B, IL6, PTGS2, S100A9</i>
Erkältung	4,00E-04	<i>IL1A, IL1B, IL6, PTGS2, S100A9</i>
Stress	6,00E-04	<i>AC01, AKR1C1, EGR1, HMOX1, JUN, SLC7A11</i>

3.3 Einfluss von Feinstaub (PM_{2.5}) aus der Biomasseverbrennung auf das globale DNA-Methylierungs-Profil von humanen Bronchialepithelzellen

Für die mit Feinstaub assoziierten Erkrankungen, wie z.B. Lungenerkrankungen, werden vielfach epigenetische Veränderungen verantwortlich gemacht.^{274,275} Entsprechend konnten Veränderungen im Methylierungsmuster in Gegenwart von Feinstaub aus der Umwelt beobachtet werden.^{276–278} Hierbei lag der Fokus aber meistens auf einzelne Gene, während Untersuchungen zur globalen Methylierung erst vereinzelt in jüngerer Zeit durchgeführt wurden.²⁷⁵ Um zu untersuchen in wie weit PM_{2.5} aus der Biomasseverbrennung das Methylo von Lungenzellen beeinflussen, wurden primäre humane Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) für einen längeren Zeitraum kontinuierlich mit PM_{2.5} aus der Biomasseverbrennung exponiert und Veränderungen der DNA-Methylierung analysiert. Zusätzlich wurde mittels Microarray-Analysen untersucht, ob es zu einer transkriptionellen Veränderung der hyper- bzw. hypomethylierten Gene kam. Diese Untersuchungen sollten erste Hinweise liefern, ob eine Langzeitexposition mit PM_{2.5} das globale Methylierungsmuster von BEAS-2B Zellen beeinflusst und dadurch die Entstehung von Lungenerkrankungen fördern könnte. Dabei wurden die Microarray-Analysen in der Arbeitsgruppe von Dr. Thomas Häupl (Medizinische Klinik m. S. Rheumatologie und klinische Immunologie, Charité Universitätsmedizin Berlin) von Marc Bonin ausgeführt. Die bioinformatische Datenanalyse erfolgte hauptsächlich in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan Günther (Pharmazeutische Bioinformatik, Institut für Pharmazeutische Wissenschaften, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) durch Dr. Stephan Flemming und Dr. Gwang-Jin Kim.

3.3.1 Methylo von PM_{2.5} exponierten BEAS-2B

BEAS-2B wurden für fünf Wochen mit 100 µg/ml PM_{2.5} exponiert, wodurch eine Veränderung der DNA-Methylierung, die auch in nachfolgenden Passagen auftrat, erreicht werden sollte. Die Untersuchungen von Dornhof *et al.* hatten gezeigt, dass diese lange Expositionsdauer nicht zu zytotoxischen Effekten in BEAS-2B führte.²⁵⁰ Anschließend wurde die DNA isoliert und das DNA-Methylierungsmuster des ganzen Genoms von BEAS-2B mit dem Illumina Infinium® HumanMethylation450 BeadChip (450K) untersucht. DNA-Methylierungen erfolgen durch DNA-Methyltransferasen vor allem am fünften Kohlenstoffatom des Cytosins in Cytosin-Guanin-Dinukleotiden (CpGs).

Es wurde beobachtet, dass die fünfwöchige Behandlung der Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (siehe Abbildung 26A) zu einer veränderten Methylierung von 1,29 % (5501 CpGs; $\Delta\beta < 0,02$) der annotierten CpGs führte. Die meisten dieser CpG-Stellen wiesen dabei eine Hypomethylierung auf, d.h. 77 % (4234 CpGs) der differentiell methylierten CpGs. Eine Hypermethylierung konnte hingegen nur bei 23 % (1267 CpGs) der differentiell methylierten CpGs beobachtet werden (siehe Abbildung 26B). Die hypo- und hypermethylierten CpGs wurden noch weiter differenziert betrachtet. Zum einen wurde unterschieden, in welcher Region eines Genes diese lokalisiert sind und zum anderen in welchem Abstand sich diese zu einem CpG Island befinden (siehe Abbildung 26C und D). Dabei stellt ein CpG Island eine Region der DNA dar, in dem die Dichte an CpGs statistisch erhöht ist. Die Regionen N- und S-Shore befinden sich dabei direkt angrenzend an die Island Region und die N- und S-Shelf Regionen grenzen direkt an die jeweilige Shore Region. Unter dem Bereich Open Sea versteht man einen Bereich des Genoms, in dem sich keine vermehrten Häufungen von CpGs befinden.²⁷⁹ Bei diesen Betrachtungen ist auffällig, dass sich die meisten differentiell methylierten CpGs im Gen-Body oder außerhalb eines Gens befinden bzw. im Open Sea Bereich. Von besonderem Interesse sind jedoch differentiell methylierte CpGs, die sich im Promotorbereich befinden, denn eine Hypermethylierung von CpGs im Promotor eines Gens fördert die Bindung von Methyl-CpG-bindenden Proteinen, die wiederum einen Repressorkomplex aktivieren, was zu einer Hemmung der Genexpression des entsprechenden Genes führt. Eine Hypomethylierung von CpGs im Promotorbereich führt hingegen zu einer erhöhten Genexpression.²⁸⁰ In langzeitexponierten BEAS-2B befanden sich 35 % (1501 CpGs) aller hypomethylierter CpGs in der Promotorregion eines Genes. Diese umfasst die Bereiche von 1500 bp und 200 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt (engl.: transcription start site, TSS1500 bzw. TSS200) und den 5' untranslatierten Bereich (engl.: untranslated region, 5'UTR). Hypermethylierte CpGs befanden sich zu 28 % (355 CpGs) in der Promotorregion.

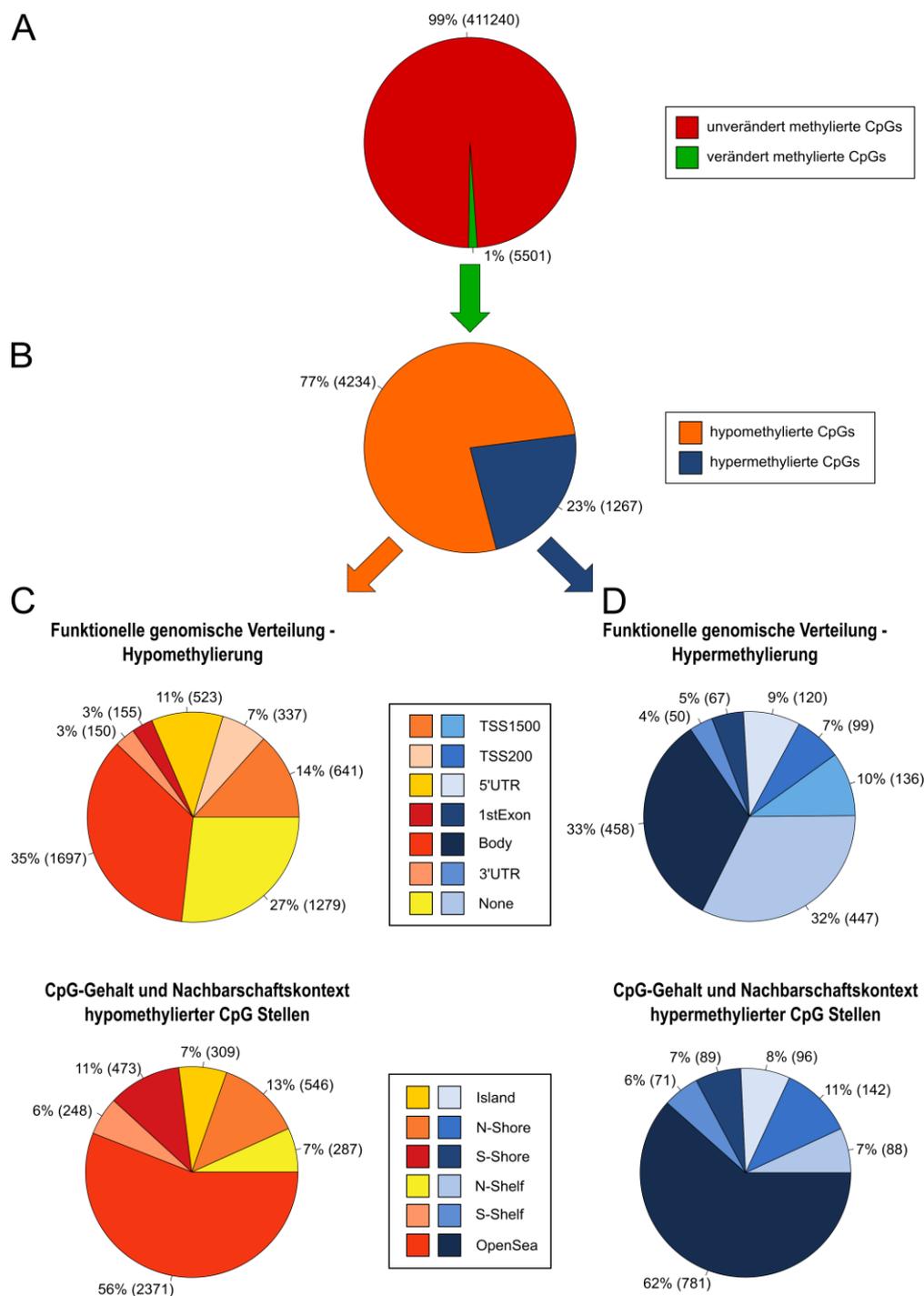


Abbildung 26: Methylom von langzeitexponierten BEAS-2B Zellen. BEAS-2B Zellen wurden kontinuierlich für fünf Wochen mit 100 µg/ml PM_{2.5} exponiert. Anschließend wurde die DNA von PM_{2.5} exponierten Zellen und unbehandelten Kontrollzellen isoliert. Das Methylom der isolierten DNA wurde mit dem Illumina HumanMethylation450 BeadChip (450K) Array analysiert. Die bioinformatische Analyse der erhaltenen Daten erfolgte durch Dr. Stephan Flemming und Dr. Gwang-Jin Kim. **(A)** Prozentsatz der differentiell methylierten CpG Stellen von PM_{2.5} exponierten BEAS-2B Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (Unterschied des $\Delta\beta > 0,02$). **(B)** Prozentsatz der hypo- und hypermethylierten CpGs. **(C)** Funktionelle genomische Verteilung von hypomethylierten CpGs bzw. im Verhältnis zur CpG Island Region. **(D)** Funktionelle genomische Verteilung von hypermethylierten CpGs bzw. im Verhältnis zur CpG island Region.

3.3.2 Funktionelle Gruppierung von differentiell methylierten Genen

Gene, die differentiell methylierte CpGs aufwiesen, wurden mittels des Enrichr Web Servers²⁷⁰ funktionell bezüglich ihrer Bedeutung in biologischen Prozessen analysiert. In Abbildung 27 sind die zwölf signifikantesten biologischen Prozesse dargestellt, die mit Genen hypo- ($p < 10^{-6}$) und hypermethylierter CpGs ($p < 10^{-4}$) assoziiert sind. Gene mit differentiell hypomethylierten CpGs sind vor allem an Prozessen der GTPase Aktivität, der regulatorischen Signaltransduktion durch Wachstumsfaktorstimulation und sauren Chemikalien beteiligt oder codieren für Proteine, die bei der Organisation extrazellulärer Strukturen eine Rolle spielen (siehe Tabelle 9). Gene, die hypermethylierte CpGs aufweisen, sind hauptsächlich beteiligt an Signalwegen, die für die Zelladhäsion und für die Bindung und den Transport von Ionen verantwortlich sind (siehe Tabelle 10).

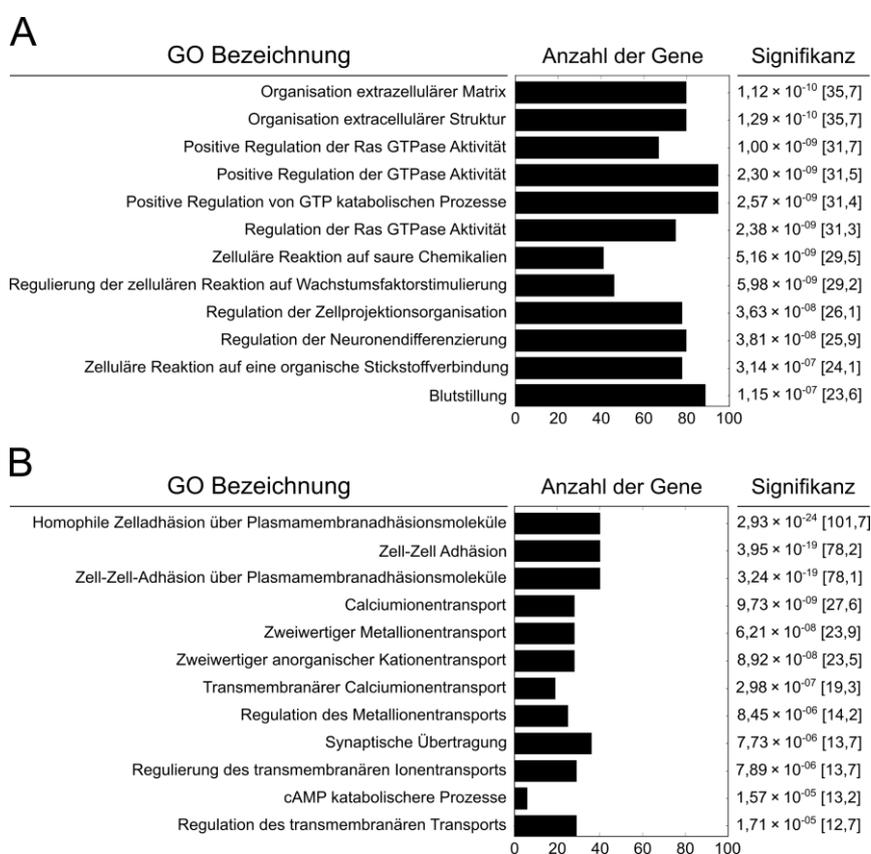


Abbildung 27: Gen-Ontologie (GO) der Gene mit hypomethylierten (A) bzw. hypermethylierten (B) CpGs von langzeitexponierten BEAS-2B Zellen. Dargestellt sind jeweils die zwölf signifikantesten biologischen Prozesse, die Anzahl der Gene, die mit diesen Prozessen assoziiert sind, sowie die p -Werte und der combined score (in Klammern). Die bioinformatische Analyse der Array-Daten erfolgte mittels des Enrichr Web Servers²⁷⁰ durch Dr. Stephan Flemming und Dr. Gwang-Jin Kim.

Tabelle 9: GO der Gene mit hypomethylierten CpGs von langzeitexponierten BEAS-2B. Dargestellt sind die Gene, die den zwölf signifikantesten biologischen Prozessen zugeordnet wurden. Die bioinformatische Analyse der Array-Daten erfolgte mittels des Enrichr Web Servers²⁷⁰ durch Dr. Stephan Flemming und Dr. Gwang-Jin Kim.

GO Bezeichnung	Hypomethylierte Gene
Organisation der extrazellulären Matrix	<i>ABI3BP, ACTNI, ADAM15, ADAM8, ADAMTS3, ADAMTS4, ADAMTSL4, AGRN, AGT, ANXA2, APBB2, APLP2, B4GALT1, B4GALT7, BCAN, BMP1, BSG, CDH1, COL16A1, COL27A1, COL4A1, COL4A2, COL6A1, COL7A1, COL8A1, COL9A3, CRISPLD2, CSGALNACT1, CTSD, CTSS, CYP1B1, DST, ELN, F11R, FBLN2, FBN1, FGF2, GFAP, HSPG2, ICAM2, ITGA11, ITGA2, ITGA3, ITGA5, ITGA7, ITGB2, ITGB3, ITGB4, ITGB5, ITGB7, LAMA3, LAMA4, LAMB1, LAMB3, LAMC1, LOXL1, LOXL2, LTBP3, LTBP4, MFAP2, MMP1, MMP16, MMP19, MMP2, MMP3, MMP7, MYO1E, NF1, NTN4, PECAM1, PRKCA, PXDN, SERPINF2, SH3PXD2B, SNCA, SPP1, SULF1, TGFB3, TIMP2, WNT3A</i>
Organisation der extrazellulären Struktur	<i>ABI3BP, ACTNI, ADAM15, ADAM8, ADAMTS3, ADAMTS4, ADAMTSL4, AGRN, AGT, ANXA2, APBB2, APLP2, B4GALT1, B4GALT7, BCAN, BMP1, BSG, CDH1, COL16A1, COL27A1, COL4A1, COL4A2, COL6A1, COL7A1, COL8A1, COL9A3, CRISPLD2, CSGALNACT1, CTSD, CTSS, CYP1B1, DST, ELN, F11R, FBLN2, FGF2, GFAP, HSPG2, ICAM2, ITGA11, ITGA2, ITGA3, ITGA5, ITGA7, ITGB2, ITGB3, ITGB4, ITGB5, ITGB7, LAMA3, LAMA4, LAMB1, LAMB3, LAMC1, LOXL1, LOXL2, LTBP3, LTBP4, MFAP2, MMP1, MMP16, MMP19, MMP2, MMP3, MMP7, MYO1E, NF1, NTN4, PECAM1, PRKCA, PXDN, SERPINF2, SH3PXD2B, SNCA, SPP1, SULF1, TGFB3, TIMP2, WNT3A, FBN1</i>
Positive Regulation der Ras GTPase Aktivität	<i>ABR, AGRN, AKAP13, AKT2, ARAP1, ARAP3, ARHGAP10, ARHGAP24, ARHGAP26, ARHGEF10, ARHGEF10L, ARHGEF16, ARHGEF3, BCAS3, DAB2IP, DENND1B, DENND2D, DENND3, DENND5A, DOCK10, EPHA2, EPS8L2, ERFF1, GRHL3, IQGAP2, ITSN1, ITSN2, KALRN, KNDC1, MCF2L, MYO9B, NET1, NF1, NGEF, NTRK1, NTRK3, OBSCN, PIN1, PLEKHG3, PLEKHG5, PLEKHG6, PLEKHG7, PREX1, RALGAPA2, RAPIGAP, RAPIGAP2, RAPIGDS1, RAPGEF1, RAPGEF4, RASA3, RASAL1, RCBTB2, RIN2, RIN3, SH3BGRL3, SIPA1L1, SPATA13, ST5, TBC1D1, TBC1D16, TBC1D2B, TBC1D4, TBC1D5, TBC1D9B, TRIO, VAV2, WNT4</i>
Positive Regulation der GTPase Aktivität	<i>ABR, ADAP1, AGAP1, AGRN, AKAP13, AKT2, ARAP1, ARAP3, ARHGAP10, ARHGAP23, ARHGAP24, ARHGAP26, ARHGDIA, ARHGEF10, ARHGEF10L, ARHGEF16, ARHGEF3, ASAP2, BCAS3, CHN2, CYTH1, CYTH4, DAB2IP, DENND1B, DENND2D, DENND3, DENND5A, DOCK1, DOCK10, DOCK5, EPHA2, EPS8L2, ERFF1, FAM13A, GNAO1, GRHL3, HMHA1, IQGAP2, IQSEC1, IQSEC3, ITSN1, ITSN2, KALRN, KNDC1, LIMS1, MCF2L, MYO9B, NET1, NF1, NGEF, NTRK1, NTRK3, OBSCN, PIN1, PLEKHG3, PLEKHG5, PLEKHG6, PLEKHG7, PLXNB2, PREX1, PSD3, RALGAPA2, RALGDS, RALGPS2, RAPIGAP, RAPIGAP2, RAPIGDS1, RAPGEF1, RAPGEF4, RAPGEFL1, RASA3, RASAL1, RCBTB2, RGS10, RGS12, RGS17, RIN1, RIN2, RIN3, SH2D3C, SH3BGRL3, SH3BP1, SIPA1L1, SPATA13, ST5, TBC1D1, TBC1D16, TBC1D2B, TBC1D4, TBC1D5, TBC1D9B, TBCD, TRIO, VAV2, WNT4</i>
Positive Regulation von GTP geregelten katabolischen Prozessen	<i>ABR, ADAP1, AGAP1, AGRN, AKAP13, AKT2, ARAP1, ARAP3, ARHGAP10, ARHGAP23, ARHGAP24, ARHGAP26, ARHGDIA, ARHGEF10, ARHGEF10L, ARHGEF16, ARHGEF3, ASAP2, BCAS3, CHN2, CYTH1, CYTH4, DAB2IP, DENND1B, DENND2D, DENND3, DENND5A, DOCK1, DOCK10, DOCK5, EPHA2, EPS8L2, ERFF1, FAM13A, GNAO1, GRHL3, HMHA1, IQGAP2, IQSEC1, IQSEC3, ITSN1, ITSN2, KALRN, KNDC1, LIMS1, MCF2L, MYO9B, NET1, NF1, NGEF, NTRK1, NTRK3, OBSCN, PIN1, PLEKHG3, PLEKHG5, PLEKHG6, PLEKHG7, PLXNB2, PREX1, PSD3, RALGAPA2, RALGDS, RALGPS2, RAPIGAP, RAPIGAP2, RAPIGDS1, RAPGEF1, RAPGEF4, RAPGEFL1, RASA3, RASAL1, RCBTB2, RGS10, RGS12, RGS17, RIN1, RIN2, RIN3, SH2D3C, SH3BGRL3, SH3BP1, SIPA1L1, SPATA13, ST5, TBC1D1, TBC1D16, TBC1D2B, TBC1D4, TBC1D5, TBC1D9B, TBCD, TRIO, VAV2, WNT4</i>

GO Bezeichnung	Hypomethylierte Gene
Hämostase	<i>ACTN1, ACTN4, AP3B1, ATP2A3, ATP2B2, ATP2B4, BCAR1, BSG, CAPZB, CD58, CDK5, CLU, DGKA, DGKB, DGKD, DGKI, DGKQ, DGKZ, DOCK1, EHD2, F10, F11R, F2RL2, F2RL3, F7, FGR, GNA15, GNAI1, GNAI2, GRB14, GRB2, GUCY1B2, HABP4, HNF4A, IRF1, IRF2, ITGA2, ITGA3, ITGA5, ITGB2, ITGB3, ITPK1, ITPR2, KCNMA1, LAT, LYN, MAFF, MAFG, MAPK3, MGLL, MMP1, MRV1, NFE2, OLR1, PDE10A, PDE9A, PDPK1, PECAM1, PIK3CA, PRKACA, PRKCA, PRKCB, PRKCE, PRKCH, PRKCZ, PROZ, RAB27A, RAC2, RAPGEF4, SCG3, SCUBE1, SELPLG, SERPINB2, SERPINF2, SH2B3, SHC1, SIRPA, SLC16A3, SLC7A11, SLC7A5, SLC7A6, SRC, STX4, TGFB3, TREM1, TUBA4A, VAV2, VCL, ZNF385A</i>

Tabelle 10: GO der Gene mit hypermethylierten CpGs von langzeitexponierten BEAS-2B. Dargestellt sind die Gene, die den zwölf signifikantesten biologischen Prozessen zugeordnet wurden. Die bioinformatische Analyse der Array-Daten erfolgte mittels des Enrichr Web Servers²⁷⁰ durch Dr. Stephan Flemming und Dr. Gwang-Jin Kim.

GO Bezeichnung	Hypermethylierte Gene
Homophile Zelladhäsion über Plasmamembranadhäsionsmoleküle	<i>CDH22, CDH26, CDH4, CDH8, CELSRI, DSCAML1, FAT3, PCDH20, PCDHA1, PCDHA10, PCDHA2, PCDHA3, PCDHA4, PCDHA5, PCDHA6, PCDHA7, PCDHA8, PCDHA9, PCDHB14, PCDHB3, PCDHGA1, PCDHGA10, PCDHGA11, PCDHGA12, PCDHGA2, PCDHGA3, PCDHGA4, PCDHGA5, PCDHGA6, PCDHGA7, PCDHGA8, PCDHGA9, PCDHGB1, PCDHGB2, PCDHGB3, PCDHGB4, PCDHGB5, PCDHGB6, PCDHGB7, PCDHGC3</i>
Zell-Zell Adhäsion	<i>CDH22, CDH26, CDH4, CDH8, CELSRI, DSCAML1, FAT3, PCDH20, PCDHA1, PCDHA10, PCDHA2, PCDHA3, PCDHA4, PCDHA5, PCDHA6, PCDHA7, PCDHA8, PCDHA9, PCDHB14, PCDHB3, PCDHGA1, PCDHGA10, PCDHGA11, PCDHGA12, PCDHGA2, PCDHGA3, PCDHGA4, PCDHGA5, PCDHGA6, PCDHGA7, PCDHGA8, PCDHGA9, PCDHGB1, PCDHGB2, PCDHGB3, PCDHGB4, PCDHGB5, PCDHGB6, PCDHGB7, PCDHGC3</i>
Zell-Zell Adhäsion über Plasmamembranadhäsionsmoleküle	<i>CDH22, CDH26, CDH4, CDH8, CELSRI, DSCAML1, FAT3, PCDH20, PCDHA1, PCDHA10, PCDHA2, PCDHA3, PCDHA4, PCDHA5, PCDHA6, PCDHA7, PCDHA8, PCDHA9, PCDHB14, PCDHB3, PCDHGA1, PCDHGA10, PCDHGA11, PCDHGA12, PCDHGA2, PCDHGA3, PCDHGA4, PCDHGA5, PCDHGA6, PCDHGA7, PCDHGA8, PCDHGA9, PCDHGB1, PCDHGB2, PCDHGB3, PCDHGB4, PCDHGB5, PCDHGB6, PCDHGB7, PCDHGC3</i>
Calciumionen-transport	<i>ATP2B2, CACNA1B, CACNA1C, CACNA1D, CACNA1I, CACNG2, CACNG5, CAMK2D, CASR, CCL3, CHRNA4, GRM7, HTR2A, LOXHD1, NMUR2, PDE2A, PLCG2, PRKCB, RYR1, RYR2, SLC24A4, SLC8A1, TMC2, TRPC3, TRPC7, TRPM1, TRPM8, TRPV4</i>
Zweiwertiger Metallionentransport	<i>ATP2B2, CACNA1B, CACNA1C, CACNA1D, CACNA1I, CACNG2, CACNG5, CAMK2D, CASR, CCL3, CHRNA4, GRM7, HTR2A, LOXHD1, NMUR2, PDE2A, PLCG2, PRKCB, RYR1, RYR2, SLC24A4, SLC8A1, TMC2, TRPC3, TRPC7, TRPM1, TRPM8, TRPV4</i>
Zweiwertiger anorganischer Kationentransport	<i>ATP2B2, CACNA1B, CACNA1C, CACNA1D, CACNA1I, CACNG2, CACNG5, CAMK2D, CASR, CCL3, CHRNA4, GRM7, HTR2A, LOXHD1, NMUR2, PDE2A, PLCG2, PRKCB, RYR1, RYR2, SLC24A4, SLC8A1, TMC2, TRPC3, TRPC7, TRPM1, TRPM8, TRPV4</i>
Transmembranärer Calciumionen-transport	<i>ATP2B2, CACNA1B, CACNA1C, CACNA1D, CACNA1I, CACNG2, CACNG5, GRM7, LOXHD1, PDE2A, RYR1, RYR2, SLC24A4, TMC2, TRPC3, TRPC7, TRPM1, TRPM8, TRPV4</i>

GO Bezeichnung	Hypermethylierte Gene
Regulation des Metallionen-transport	<i>ADCYAP1, ATP2B2, CACNA1B, CACNA1C, CACNA1D, CAMK2D, CASR, CCL3, DPP6, FGF14, GRM6, HTR2A, KCNAB1, KCNH2, KCNQ1, MYLK, PDE4B, PDE4D, PDGFRB, PLCG2, PTK2B, RYR2, SLC8A1, TRPC3, WFS1</i>
Synaptische Übertragung	<i>ADCY2, AP2A2, APBA2, CACNA1B, CACNA1C, CACNG2, CAMK2D, CDH8, CHRNA4, CNIH3, DLG2, DLGAP2, FGF14, GABRA5, GABRG3, GRM2, GRM6, GRM7, HCN1, HTR2A, HTR4, KCNA10, KCNA4, KCNAB1, KCNB1, KCNH2, KCNMA1, KCNQ1, NCALD, NPTX2, PCDHB14, PCDHB3, PRKCB, SLC1A6, TH, UNC13A</i>
Regulierung des transmembranären Ionen-transport	<i>CACNA1B, CACNA1C, CACNA1D, CACNA1I, CACNG2, CACNG5, CAMK2D, CASR, CCL3, CNIH3, DPP6, GRM6, HCN1, KCNA10, KCNA4, KCNAB1, KCNB1, KCNH2, KCNK12, KCNMA1, KCNQ1, PDE4B, PDE4D, PDGFRB, PLCG2, PTK2B, RYR2, SCN1A, SCN4A</i>
cAMP katabolische Prozesse	<i>DPYSL3, PDE11A, PDE1A, PDE2A, PDE4B, PDE4D</i>
Regulation des transmembranären Transports	<i>CACNA1B, CACNA1C, CACNA1D, CACNA1I, CACNG2, CACNG5, CAMK2D, CASR, CCL3, CNIH3, DPP6, GRM6, HCN1, KCNA10, KCNA4, KCNAB1, KCNB1, KCNH2, KCNK12, KCNMA1, KCNQ1, PDE4B, PDE4D, PDGFRB, PLCG2, PTK2B, RYR2, SCN1A, SCN4A</i>

3.3.3 Einfluss des veränderten Methylierungs-Profiles auf die Genexpression

Um eine Aussage über die biologische Relevanz der Methylo-m-Analysen langzeitexponierter BEAS-2B zu machen, wurde von ebenfalls fünfwöchig exponierten Zellen eine Transkriptom-Analyse mit dem Human Genome U133 Plus 2.0 Array durchgeführt. Die Gene mit differentiell methylierten CpGs und die Gene der Transkriptom-Analyse wurden anschließend miteinander korreliert. Dabei ergaben sich 152 individuelle Gene, die eine signifikante Kongruenz aufwiesen ($p < 0,05$; siehe Tabelle 36 und Tabelle 37). Da Hypomethylierungen meist eine erhöhte Genexpression zur Folge haben, wurde überprüft, ob das Methylierungsprofil der CpGs, die in diesen 152 Genen differentiell methyliert waren, mit der Art der veränderten Genexpression korreliert. Von 78,42 % der hypomethylierten CpGs, waren die Gene, auf denen diese CpGs lagen, überexprimiert. Für hypermethylierte CpGs konnte keine Korrelation mit den zugehörigen Genen beobachtet werden.

Die 152 differentiell methylierten und exprimierten Gene wurden ebenfalls mittels des Enrichr Web Servers²⁷⁰ funktionell bezüglich ihrer Bedeutung in biologischen Prozessen analysiert. Abbildung 28A zeigt die 14 ($p < 10^{-1}$) signifikantesten biologischen Prozesse differentiell methylierter und in der Expression herunterregulierte Gene, die besonders an den Signalwegen der Zytokinstimulation, Zellmotilität, Differenzierung und Entwicklung beteiligt sind. Die entsprechenden Gene, die diesen Prozessen zugeordnet wurden, sind in Tabelle 11 aufgeführt. Differenziell methylierte und in der Expression hochregulierte Gene spielen vor allem eine Rolle in der Antwort auf extrazelluläre Reize, wie Chemotaxis, Zellwachstum, Wundheilung, Entzündung,

Angiogenese und sind zudem an der Antwort auf fremde Partikel oder Moleküle beteiligt (siehe Abbildung 28B). In Tabelle 12 sind die differentiell methylierten und herunterregulierten Gene aufgelistet, die mit diesen 14 signifikantesten Prozessen ($p < 10^{-3}$) assoziiert wurden.

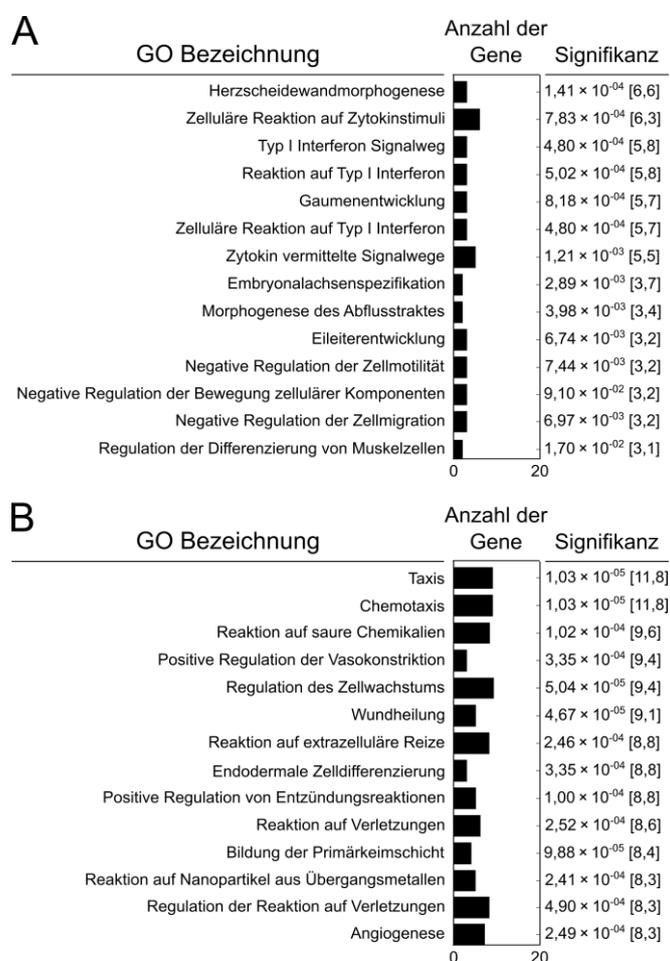


Abbildung 28: GO der differentiell methylierten und exprimierten Gene von langzeitexponierten BEAS-2B. Dargestellt sind jeweils die 14 signifikantesten biologischen Prozesse, die Anzahl der Gene, die mit diesen Prozessen assoziiert sind, sowie die p -Werte und der combined score (in Klammern). In **A** sind die herunterregulierten und in **B** die hochregulierten Gene dargestellt. Die bioinformatische Analyse der Array-Daten erfolgte mittels des Enrichr Web Servers durch Dr. Stephan Flemming und Dr. Gwang-Jin Kim.

Tabelle 11: GO der herunterregulierten und differenziell methylierten Gene von langzeitexponierten BEAS-2B. Dargestellt sind die Gene, die den 14 signifikantesten biologischen Prozessen zugeordnet wurden. Die bioinformatische Analyse der Array-Daten erfolgte mittels des Enrichr Web Servers²⁷⁰ durch Dr. Stephan Flemming und Dr. Gwang-Jin Kim.

GO Bezeichnung	Herunterregulierte Gene
Herzscheidewandmorphogenese	<i>DHRS3, HAND1, TBX3</i>
Zelluläre Reaktion auf Zytokinstimuli	<i>CARD14, IFI6, LIFR, MX2, MYLK3, OAS2</i>
Type I Interferon Signalweg	<i>IFI6, MX2^a, OAS2</i>
Reaktion auf Type I Interferon	<i>IFI6, MX2^a, OAS2</i>
Gaumentwicklung	<i>DHRS3, PKDCC, TBX3</i>
Zelluläre Reaktion auf Type I Interferon	<i>IFI6, MX2^a, OAS2</i>
Zytokin vermittelte Signalwege	<i>CARD14, IFI6, LIFR, MX2^a, OAS2</i>
Embryonalachsenspezifikation	<i>SMAD6^{a,b}, TBX3</i>
Morphogenese des Abflusstrakts	<i>DHRS3, TBX3</i>
Eileiterentwicklung	<i>HAND1, PKDCC, SMAD6</i>
Negative Regulation der Zellmotilität	<i>MCC^{a,b,c}, OLFM1, SEMA6D</i>
Negative Regulation der Bewegung zellulärer Komponenten	<i>MCC^{a,b,c}, OLFM1, SEMA6D</i>
Negative Regulation der Zellmigration	<i>MCC^{a,b,c}, OLFM1, SEMA6D</i>
Regulation der Differenzierung von Muskelzellen	<i>MYLK3, TBX3</i>

^a: hypomethyliert und herunterreguliert; ^b: krankheitsrelevant; ^c: verändert exprimiert bei Methylierung

Tabelle 12: GO der hochregulierten und differenziell methylierten Gene von langzeitexponierten BEAS-2B. Dargestellt sind die Gene, die den 14 signifikantesten biologischen Prozessen zugeordnet wurden. Die bioinformatische Analyse der Array-Daten erfolgte mittels des Enrichr Web Servers²⁷⁰ durch Dr. Stephan Flemming und Dr. Gwang-Jin Kim.

GO Bezeichnung	Hochregulierte Gene
Taxis	<i>DOCK4^{a,b}, EFNA5, EPHA2^{a,c}, FOSL1^{a,c}, HRH1, S100A8^{a,c}, S100A9^{a,c}, SEMA3A^a, SPP1^{a,c,d}</i>
Chemotaxis	<i>DOCK4^{a,b}, EFNA5, EPHA2^{a,c}, FOSL1^{a,c}, HRH1, S100A8^{a,c}, S100A9^{a,c}, SEMA3A^a, SPP1^{a,c,d}</i>
Reaktion auf saure Chemikalien	<i>ABCC2^a, AKR1C1^{a,b,c}, COL6A1^a, EGFR^{a,c}, ITGA2, PTGS2^{a,c}, PTK6^a, ZEB1^{a,c}</i>
Positive Regulation der Vasokonstriktion	<i>EGFR^{a,c}, HRH1, PTGS2^{a,c}</i>
Regulation des Zellwachstums	<i>C10ORF90, CDKN1A^{a,c,d}, DCBLD2^a, NET1^a, S100A8^{a,c}, S100A9^{a,c}, SEMA3A, SPOCK1^{a,c}, SPP1^{a,c,d}</i>
Wundheilung	<i>DCBLD2^a, ITGA2, S100A8^{a,c}, SERPINB2, TGFA^a</i>
Reaktion auf extrazelluläre Reize	<i>ALDH3A1^{a,c}, CDKN1A^{a,c,d}, EGFR^{a,c}, FOSL1^{a,c}, ITGA2, PTGS2^{a,c}, SPP1^{a,c,d}, ZEB1^{a,c}</i>
Endodermale Zelldifferenzierung	<i>COL6A1^a, COL8A1^{a,c}, LAMB3^a</i>
Positive Regulation von Entzündungsreaktionen	<i>EGFR^{a,c}, ITGA2, PTGS2^{a,c}, S100A8^{a,c}, S100A9^{a,c}</i>
Reaktion auf Verletzung	<i>DCBLD2^a, ITGA2, ITGB4, S100A8^{a,c}, SERPINB2, TGFA^a</i>
Bildung der Primärkeimschicht	<i>DUSP5^{a,d}, EPHA2^{a,c}, PRKACA^a, SOX7^{a,d}</i>

GO Bezeichnung	Hochregulierte Gene
Reaktion auf Nanopartikeln aus Übergangsmetallen	<i>EGFR^{a,c}, KCNK3, PTGS2^{a,c}, S100A8^{a,c}, S100A9^{a,c}</i>
Regulation der Reaktion auf Verletzung	<i>EGFR^{a,c}, ITGA2, NT5E^a, PTGS2^{a,c}, S100A8^{a,c}, S100A9^{a,c}, SERPINB2, SPP1^{a,c,d}</i>
Angiogenese	<i>ANPEP^a, COL8A1^{a,c}, EPHA2^{a,c}, PTGS2^{a,c}, SH2D2A^a, TGFA^a, TSPAN12^a</i>

^a: krankheitsrelevant; ^b: hypermethyliert und hochreguliert; ^c: aktiviert durch Zigarettenrauch oder PM; ^d: verändert exprimiert bei Methylierung

3.3.4 Zusammenhang zwischen durch PM_{2.5} beeinflusstem Methylom, Transkriptom und Erkrankungen

Die Exposition mit PM_{2.5} stellt ein wichtiges gesundheitliches Gefährdungspotential dar und kann die Entstehung von pulmonalen und kardiovaskulären Erkrankungen, Stoffwechselerkrankungen sowie Lungenkrebs fördern.^{1,7,17,227} Um einen kausalen Zusammenhang zwischen dem Methylom und dem Transkriptom von mit PM_{2.5} langzeitexponierten BEAS-2B Zellen und PM verursachten Erkrankungen zu identifizieren, wurde mit den 152 differenziell methylierten und exprimierten Genen eine Krankheitsontologie durchgeführt. Dazu wurden diese Gene mittels verschiedener Datenbanken analysiert. Verwendet wurde The human disease methylation database²⁸¹, The Dragon Database for Methylated Genes in Diseases²⁸² und the Human Gene Database GeneCards^{®283}. Von den 152 Genen wurden 66 Gene mit Lungenerkrankungen, hauptsächlich Lungenkrebs, assoziiert (siehe Tabelle 13). Andere Gene wurden vor allem mit Krebs anderer Organe und Gewebe sowie Herz-Kreislauf-Erkrankungen, neurologischen und entzündlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht (siehe Tabelle 7).

Die 66 Gene, die nach Datenbankanalyse in Zusammenhang mit Lungenerkrankungen standen, wurden bezüglich ihrer zellulären und molekularen Funktion eingehender mittels Literaturrecherche untersucht (siehe Tabelle 13). Viele dieser Gene sind in Tumoren hochreguliert und werden durch DNA-Methylierung reguliert. Einige dieser Gene spielen zudem eine Rolle in der Tumorsuppression und in einer besseren Prognose. Andere Gene wiederum sind involviert in der zellulären Transformation, Zellproliferation, Zellwachstum, Tumorprogression, Metastasierung, Angiogenese, Hemmung der Apoptose und in der Therapieresistenz.

Tabelle 13: Differenziell methylierte und exprimierte Gene sowie zugeordnete lungenspezifische und -lungenassoziierte Erkrankungen. Dargestellt sind die Gene mit der jeweiligen Genexpression und dem Methylierungsstatus sowie deren assoziierte Erkrankung. Die Zuordnung der Gene zu den entsprechenden Erkrankungen erfolgte mit den Datenbanken ^a: DiseaseMeth²⁸¹, ^b: GeneCard²⁸³ und ^c: Dragon Database for Methylated Genes and Diseases²⁸².

Gen	Gen-expression log2FC FC		DNA Methylierungs-status		Lungen-erkrankungen ^d			Krankheitsrelevant										
			hypomethyliert	hypomethyliert im Promotor	hypermethyliert	hypermethyliert im Promotor	Lungenkrebs	Entzündung	Fibrose	Tumor						Tumor relevant	Zelltod	
										Tumorexpression, Aktivität	Tumorsuppressor-Kandidat	Schlechte Prognose	Bösartigkeit (Stadium/Grad)	Proliferation/Tumorstadium, Zellzyklus	Tumorentstehung und -progression	Motilität (Metastasierung/Invasion)	Angiogenese	Behandlungsresistenz
AGPAT9 ^a	1,65	3,14	x	x			x				+/-		+/-					
ANPEP ^a	1,44	2,71	x	x			x				+	+			- *	+		
ANTXR2 ^a	0,80	1,74	x	x			x									+	x	
ARHGAP26 ^a	0,72	1,65	x				x				-		-	-			x	
ARID3A ^a	0,56	1,47	x				x				+							
ARNTL2 ^{a,b}	0,83	1,78	x	x			x				+	+	+	+		+		
ASPH ^c	0,56	1,48	x	x			x					+		+	+			
CD82 ^b	-0,50	0,71	x	x			x				-	+	*	-	-	-		+
CDKN1A ^{b,c}	0,51	1,42	x	x			x				+/-	+/-	+	+/-	+	+		+
CHST11 ^a	0,82	1,77	x		x		x				+	+		+	+			+/-
CLDN1 ^a	0,91	1,88	x				x				-	+		+/-	+/-		-	+
DCBLD2 ^a	1,33	2,52					x				+	+		+	+			
DHRS3 ^a	-1,08	0,47	x				x					+	*	-	-			+
DMBT1 ^b	0,60	1,52	x	x			x				-	+				+	x	
DUSP2 ^a	-1,49	0,36			x	x	x	x			-	+	+	*	*	-	-	+
DUSP5 ^a	0,79	1,73	x	x			x				x	-	-					
EGFR ^{b,c}	0,84	1,79	x				x				+		+	- *	+	+		+
EPHA2 ^b	0,61	1,53	x				x				+	+	+	+	+	+	+	-
ERRF11 ^a	1,37	2,58	x	x			x				-	+	+	*	-	-		+
FAM129A ^a	1,09	2,13	x				x				+							-
FGFR ^b	0,84	1,78	x	x			x						+/-	+		+		-
FHOD3 ^a	1,04	2,06			x		x								+		x	
FLNB ^a	0,70	1,62	x				x						+	*	-	+	*	x
FLVCR2 ^a	0,52	1,43	x				x											
FOSL1 ^a	0,89	1,85	x	x			x				+/-		+	*	+		+	-
G0S2 ^{a,c}	1,25	2,37	x	x			x				x				-			+
GJB2 ^{b,c}	1,02	2,03	x	x			x				+/-	+		+			x	
HMCN1 ^a	-0,68	0,63	x				x				-						x	
KDM4B ^a	1,10	2,15	x				x				+		+	+	- *	- *		
KRT6A ^b	1,48	2,79	x	x			x											
LAPTM5 ^c	1,21	2,32	x		x		x				-		+	*	-			+
LIFR ^b	-0,69	0,62			x	x	x				-	+	-		-	-		
LIMD1 ^{a,c}	0,71	1,64	x	x			x				-	x	+	+	*	*	-	+
LPL ^{b,c}	-0,98	0,51			x		x						+					
MAMDC2 ^b	-2,47	0,18	x				x										x	
MCC ^c	-2,26	0,21	x				x				-	+		-	-			
MEGF6 ^a	0,86	1,81	x		x		x									+		
MICAL2 ^a	1,00	2,00	x	x			x				+		+	+	+	+	+	+
MSLN ^{b,c}	-0,53	0,69			x	x	x				+		+	+	+	+	x	
MXDI ^a	0,94	1,91	x				x				+/-	x	+		-	+		-
NPAS2 ^a	0,77	1,71	x	x			x						-	-				+
NTSE ^{a,c}	1,18	2,26	x				x					- *		+	+	+	+	
PI3 ^b	1,20	2,29	x	x			x	-				+	*	-	-	-		
PPP1R14A ^{a,b}	0,84	1,79			x	x	x				-	-			+			
PTGS2 ^{b,c}	1,38	2,60	x	x			x	x			+		+	+	+	+	+	-
RAB27B ^a	0,99	1,98	x	x			x				+		+	+	+	+	+	
RNF145 ^a	-0,64	0,64	x				x											
SELIL3 ^a	0,75	1,68	x				x											

Erkrankung	Gene
Gehirn, Nervensystem	<i>DHRS3, DMBT1, EGFR, EPHA2, GNAS, HAND1, LAPTMS, NT5E, PTGS2, SCNN1A, TNFSF10</i>
Knochen	<i>CDKN1A, DOCK4, EPHA2, GNAS, MSLN, NT5E</i>
<i>Blut und Immunsystem</i>	
Vorläuferzell-Lymphoblasten-Leukämie-Lymphom	<i>CDKN1A, EFNA5, PTGS2</i>
Leukämie-Lymphom, adulte T-Zelle	<i>CDKN1A</i>
Leukämie	<i>CDKN1A, DMBT1, EPHA2, SPP1</i>
Myelodysplastisches Syndrom	<i>SOX7</i>
Hämatologische Erkrankungen	<i>ABCC2, EGFR, GNAS, LPL, MYLK, MYO1G, SDC2</i>
<i>Organe</i>	
Haut	<i>ANPEP, CD82, DAB2, EGFR, G0S2, LDLR</i>
Gebärmutterhals, Endometrium, Eierstock	<i>CYP39A1, EGFR, GJB2, MSLN, PPP2R2B, PTGS2, ZEB1</i>
Prostata	<i>ANPEP, CD82, CDKN1A, DAB2, LAMB3, LDLR, LIFR, LPL, MSLN, PTGS2, SLC15A3, SOX7, STEAP4</i>
Harnblase, Niere	<i>CD82, CLDN1, EGFR, G0S2, GNAS, HAND1, LIFR, MYLK, NT5E, PRKAG2, PTGS2, QPCT, TBX3, TNFSF10</i>
Galle	<i>EGFR, PSCA</i>
Leber	<i>ASPH, CD82, CDKN1A, EGFR, ENO3, GJB2, GNAS, HAND1, LIFR, NT5E, PTGS2, SPP1, ZEB1</i>
Darm	<i>AKR1C1, CDKN1A, DAB2, EGFR, HAND1, KDM4B, LIFR, MCC, MITF, PPP1R14A, PPP2R2B, PTGS2, SDC2, SOX7, SPP1, ST3GAL5, TBX18, ZEB1</i>
Magen	<i>DAB2, DCBLD2, DUSP5, EGFR, HAND1, KDM4B, LAMB3, MYLK, NT5E, POPDC3, PTGS2, S100A9, TBX3</i>
Speiseröhre	<i>GJB2, PTGS2, PTK6</i>
Schilddrüse	<i>GNAS, HAND1, ZEB1</i>
Wachstumsstörungen	<i>GNAS, PTGS2</i>
Entzündliche Erkrankungen	
chronische Parodontitis	<i>PTGS2</i>
<i>Helicobacter</i> -Infektionen	<i>SDC2</i>
chronische Hepatitis	<i>PTGS2</i>
Magenschleimhautentzündung	<i>EGFR, PTGS2, ZEB1</i>
Genetische Erkrankungen	
Beckwith-Wiedemann-Syndrom	<i>GNAS</i>
Albright's hereditäre Osteodystrophie	<i>GNAS</i>
Brachydaktylie	<i>GNAS</i>

4 Diskussion

4.1 Kurzzeitige biologische Effekte von Feinstaub aus der Biomasseverbrennung in humanen Makrophagen

Die Luftverschmutzung mit Feinstaub ist assoziiert mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität.⁷ Hierbei spielt auch die Entstehung von PM_{2.5} aus der Verbrennung von Biomasse, auf Grund der Bevorzugung von erneuerbaren Energiequellen in der westlichen Welt in zunehmendem Maße eine wichtige Rolle¹²⁻¹⁴. Die Folge sind Atemwegserkrankungen, kardiovaskuläre Erkrankungen oder Krebs.¹ Dabei sind die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen noch nicht hinreichend bekannt. Somit war ein Ziel der vorliegenden Arbeit durch Untersuchungen nach kurzzeitiger Exposition von humanen alveolären Makrophagen (THP-1 Makrophagen), die eine erste Abwehr gegenüber inhalierten Partikeln darstellen, die PM_{2.5} induzierten molekularen Reaktionen besser zu verstehen.

4.1.1 Einfluss von PM_{2.5} auf die Zellviabilität und die metabolische Aktivität von THP-1 Makrophagen

Ein Schlüsselereignis in der Partikeltoxizität ist die Bildung von ROS und der dadurch verursachte oxidative Stress. Diese sind nicht nur in der akuten zellulären Toxizität involviert, ihnen wird auch eine nicht unbedeutende Rolle in der Entstehung von entzündlichen Atemwegserkrankungen, Fibrose und Krebs zugeschrieben. Die vorliegenden Ergebnisse konnten zeigen, dass PM_{2.5} aus der Biomasseverbrennung nach einer kurzzeitigen Expositionsdauer von 6 h in THP-1 Makrophagen zu einer moderaten, aber signifikanten Entstehung von ROS führte, was mit den Antioxidantien NAC und BHA reduziert werden konnte. Die PM induzierte ROS-Bildung kann durch unterschiedliche Vorgänge erfolgen. So können zum einen ROS direkt durch die reaktive Partikeloberfläche entstehen, wenn diese in Kontakt mit einer wässrigen Umgebung kommt. Zum anderen können durch Partikel intrazelluläre Signalwege aktiviert werden, die z. B. membrangebundene Oxidasen induzieren.³ Eine dieser Oxidasen ist z. B. die NADPH-Oxidase (NOX), die den Elektronentransfer von NADPH auf molekularen Sauerstoff katalysiert und so zur Entstehung von Hydroperoxid-Anion (O₂^{•-}) beiträgt. Die Aktivierung der NOX wurde vor allem in phagozytierenden Zellen, wie Makrophagen und Neutrophilen beobachtet, da in diesen Zellen die Erzeugung von größeren Mengen an ROS ein Teil des mikrobiellen Abwehrmechanismus ist. Neben Mikroorganismen können aber auch andere Signale, wie Wachstumsfaktoren, Calcium oder Entzündungsmediatoren, die NOX

aktivieren.²⁸⁴ So konnte auch in murinen Makrophagen (BMM), die mit Zigarettenrauchextrakt exponiert wurden, eine NOX-abhängige ROS Bildung nachgewiesen werden.²⁸⁵ Da auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass PM_{2.5} von THP-1 Makrophagen ins Zellinnere aufgenommen werden und diese größten Teils in membrangebundenen Vesikeln vorliegen (siehe Abbildung 18 und Abbildung 19), könnte die Aktivierung der NOX hier durchaus an der Entstehung von ROS beteiligt sein, was experimentell noch belegt werden müsste.

Die Entstehung von O₂^{•-} kann zudem auch durch eine PM vermittelte Schädigung der Mitochondrien hervorgerufen werden. Darüber hinaus kann es zur Freisetzung von Übergangsmetallen, wie z. B. Eisen, Zink oder Kupfer, aus den Partikeln kommen, die mittels Fenton oder Haber-Weiss Reaktion die Entstehung von Hydroxyl-Radikalen (HO[•]) initiieren.³ Entsprechend konnten Untersuchungen, bei denen Holzpellets mit unterschiedlichem Zinkgehalt verbrannt wurden, zeigen, dass in RAW 264.7 Makrophagen die Menge an erzeugten ROS mit steigendem Zinkgehalt des verbrannten Ausgangsmaterials zunahm.²⁸⁶ In Übereinstimmung damit zeigten Analysen von Flugaschepartikeln in RAW 264.7 Makrophagen einen Anstieg von ROS, der mit dem Metallchelator Deferoxaminmesylat nahezu vollständig auf Kontrollniveau reduziert werden konnten. Da der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Feinstaub als einziges Übergangsmetall, und das auch nur in geringen Mengen, Eisen, in Form von Hematit (Fe₂O₃; 0,36%), aufwies, ist es unwahrscheinlich, dass Übergangsmetalle an der PM_{2.5} vermittelten Entstehung von ROS in THP-1 Makrophagen eine Rolle spielen. Dilger *et al.* konnten neben Metallionen aber auch Ruß, einen nicht zu vernachlässigenden Bestandteil von WSP mit einer großen spezifischen Oberfläche, für die Entstehung von ROS ausmachen.⁸⁰

Zusätzlich zu den vorher genannten Partikelbestandteilen können auch organische Substanzen, wie PAKs oder Chinone, ROS oder reaktive elektrophile Metabolite durch Redox-Zyklen oder metabolische Aktivierung generieren.³ Untersuchungen zum PAK-Gehalt des hier vorliegenden Feinstaubes führten zur Identifizierung von 55 verschiedenen PAKs mit einem Gehalt von 349,83 µg/kg PM_{2.5}, die an den Feinstaubpartikeln adsorbiert waren (siehe Tabelle 2). Andere in der Literatur beschriebene Studien weisen im Vergleich zur vorliegenden Analyse eine deutlich größere Menge an PAKs auf.^{78,80,96,287} Der geringe Gehalt an PAKs indiziert, dass die Verbrennung der Biomasse (hauptsächlich Holzhackschnitzel aus Weichhölzern) bei effizienten Verbrennungsbedingungen erfolgte, was bei einem modernen Biomasseenergiekraftwerk zu erwarten ist. Größere Mengen an PAKs entstehen vor allem bei geringen Temperaturen und ineffizienten Verbrennungsbedingungen, wie man sie häufig bei einfachen Öfen oder offenen Feuerstellen findet.^{64,74,80,121}

Die Metabolisierung von PAKs durch die CYP1-Familie und AKRs kann zur ROS Entstehung beitragen^{3,144}. Auch im Rahmen dieser Arbeit führte die kurzzeitige Exposition von THP-1 Makrophagen mit PM_{2.5} aus der Biomasseverbrennung zu einer erhöhten, aber nicht signifikanten Induktion der *CYP1A1* Genexpression nach 24 h bzw. 30 h. Übereinstimmend mit den vorliegenden Ergebnissen konnten Untersuchungen in A549 Zellen mit Mailänder Feinstaub ebenfalls zeigen, dass es zu einer Induktion der *CYP1A1* Genexpression kam.¹⁷³ Auch in THP-1 Monocyten führte die Exposition mit kalifornischen PM zu einer ROS Bildung als auch zu einer Erhöhung der *CYP1A1* Genexpression, die mit ANF, einem Inhibitor des PAK induzierbaren Transkriptionsfaktors AhR, auf Kontrollniveau reduziert werden konnte. Die Bildung von ROS konnte hingegen nicht signifikant mit ANF reduziert werden, was darauf hinweist, dass PAKs an der *CYP1A1* Genexpression beteiligt sind, jedoch nicht an der PM vermittelten ROS-Produktion.²⁸⁸ Da es in den vorliegenden Ergebnissen zu einer verspäteten Induktion von *CYP1A1* kam, ist davon auszugehen, dass CYP1A1 bzw. PAKs hier ebenso nicht maßgeblich an der ROS-Bildung beteiligt waren.

PM und die durch PM gebildeten ROS können die Zellviabilität beeinflussen und sogar Zytotoxizität verursachen^{289,290}. In der vorliegenden Arbeit ergaben sich aber keine Anzeichen eines zytotoxischen Effektes durch PM_{2.5}. Mittels des LDH-Assays konnten weder Nekrose noch Apoptose mit dem Caspase-3/7 Aktivitätsassay nachgewiesen werden. Andere Untersuchungen zu WSP zeigten dagegen, dass es zwar in A549-Zellen zu einer LDH-Freisetzung kam, nicht aber in THP-1 Zellen.²⁹¹ Die gleiche Arbeitsgruppe konnte aber bei Verwendung von anderen WSP in beiden Zelllinien keine zytotoxischen Effekte mittels LDH-Assay nachweisen.⁹⁶ Bei Dilger *et al.* führten weder WSP noch Ruß zu einer LDH-Freisetzung in A549, lediglich aber ZnO⁸⁰, das oft Bestandteil von WSP ist, im hier untersuchten PM_{2.5} jedoch nicht vorhanden ist. Eine Zunahme an apoptotischen Zellen über die Zeit konnte bei der Exposition von BEAS-2B mit Mailänder PM_{2.5} beobachtet werden. Die Menge an gebildeten ROS war ähnlich zu den vorliegenden Ergebnissen, aber bereits nach kürzerer Expositionszeit.²⁹² Bei Untersuchungen von PM aus Biomasseverbrennungen unterschiedlicher Verbrennungsbedingungen zeigten Partikel aus effizienter Verbrennung in RAW264.7 Makrophagen erst bei hohen Konzentrationen eine Zunahme an apoptotischen Zellen, während dieses bei Partikeln der intermediären und der Rauchphase bereits bei niedrigen Konzentrationen der Fall war. Interessanterweise zeigten aber nur die Partikel aus effizienter Verbrennung einen Anstieg von ROS. Diese Partikel wiesen einen höheren Gehalt an Übergangsmetallen und eine niedrigere Menge an PAKs im Vergleich zu den Partikeln ineffizienter Verbrennungsphasen auf.²⁹³ Auch Jalava *et al.* konnten zeigen, dass Partikel aus ineffizienter Verbrennung zu einer Zunahme an apoptotischen RAW264.7 Makrophagen führten im Vergleich zu Partikeln aus normalen Verbrennungsbedingungen. Auch hier wiesen die PM aus normaler Verbrennung einen größeren Gehalt an Übergangsmetallen auf im Vergleich zu den anderen Partikeln. Die Menge an PAKs war

jedoch nach beiden Verbrennungsarten ähnlich.²⁹⁴ Eine weitere Studie mit zwei verschiedenen PM, die sich im Eisengehalt unterschieden, berichtet in humanen Bronchialepithelzellen (16HBE14o-Zellen) sogar von antiapoptotischen Effekten bei den Partikeln mit geringerem Eisenanteil. Verantwortlich dafür ist laut Lovera-Leroux *et al.* das geringere Potential ROS zu bilden, die Induktion einer antioxidativen Antwort über Nrf-2 und die Induktion Zelltod kontrollierender Proteine (Bcl-2, BAX und p53).²⁰¹

Obwohl durch die hier untersuchten PM_{2.5} zytotoxische Effekte auf THP-1 Makrophagen ausblieben, waren sie dennoch in der Lage deren Zellviabilität zu beeinflussen und zwar durch eine Hemmung der metabolischen Aktivität. Mittels MTT-Assay konnte gezeigt werden, dass 50 µg/ml PM_{2.5} zu einer 10 %igen und 100 µg/ml PM_{2.5} zu einer 22 %igen Reduktion der metabolischen Aktivität führte. Andere Untersuchungen mit Mailänder PM in A549 konnten ebenfalls eine nur sehr geringe Reduktion der metabolischen Aktivität im MTT-Assay beobachten.¹⁷³ Auch Partikel aus effizienter bzw. normaler Verbrennung verursachten in RAW 264.7 Makrophagen bei geringen Konzentrationen (<150 µg/ml PM) ähnliche Effekte. Andererseits kam es bei der Exposition mit Partikeln aus ineffizienter Verbrennung zu einer größeren Reduktion der Zellviabilität.^{293,294}

Insgesamt lassen sich die erhaltenen Ergebnisse mit PM_{2.5} aus der Biomasseverbrennung sehr gut mit Daten aus der Literatur in Einklang bringen. Die geringe Menge an PAKs weist auf eine effiziente Verbrennung hin. Die ausbleibenden zytotoxischen Effekte lassen sich mit dem Fehlen von Metallionen und dem hauptsächlichlichen Vorkommen von untoxischen Sulfaten, wie von Kaliumsulfat (47%) erklären. Auch Untersuchungen von Torvela *et al.* belegen, dass das häufig in Partikeln aus der Biomasseverbrennung vorkommende Kaliumsulfat und Kaliumcarbonat, nicht aber Zinksalze untoxisch sind.²⁹⁵ Die Bildung von ROS kann durch die Zusammensetzung der hier untersuchten PM_{2.5} nicht erklärt werden.

Die verminderte metabolische Aktivität könnte auch durch eine Verringerung des zellulären Energiegehaltes bedingt sein. Ein in diese Vorgänge involviertes Protein ist die AMPK, die dann aktiviert wird, wenn es zu oxidativem Stress²³³ kommt oder das Verhältnis von AMP : ATP steigt²³¹. Durch Aktivierung der AMPK werden energieebenötigende katabolische Prozesse inhibiert²³². Ein Prozess, der viel Energie benötigt ist u. a. die Proteinsynthese, bei dem der Elongationsfaktor eEF2 im Zuge der Translation eine wichtige Rolle spielt. Die AMPK kann nun direkt oder über die eEF2K den Elongationsfaktor eEF2 phosphorylieren, wodurch dieser inhibiert wird und die Translation zum Erliegen kommt.^{234,296} Die Untersuchungen von PM_{2.5} aus der Biomasseverbrennung zeigten, dass es nach sechsständiger Exposition zu einer konzentrationsabhängigen Aktivierung der AMPK und zu einer inhibierenden Phosphorylierung des eEF2 kam. Ob im Zuge dessen auch die Proteinsynthese gehemmt wird, müssen weiterführende Untersuchungen zeigen. Eine Aktivierung der AMPK in

THP-1 Makrophagen wurde auch für CS berichtet.²⁹⁷ Diese ist aber nicht zellspezifisch, da der hier verwendete PM_{2.5} nach einer Langzeitexposition in BEAS-2B ebenfalls die AMPK aktivierte und zu einer AMPK abhängigen Inaktivierung des eEF2 führte.²⁵⁰

4.1.2 Einfluss von PM_{2.5} auf die Aktivierung verschiedener Kinasen sowie auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf-2 in THP-1 Makrophagen

Oxidativer Stress bezeichnet die Erhöhung von intrazellulären ROS. Dabei verursacht ROS nicht nur pathologische Effekte, wie die Schädigung von DNA, Proteinen oder Lipiden, sondern fungiert auch als Signalmolekül zur Aufrechterhaltung physiologischer Funktionen.^{298,299} In der Literatur wird häufig von dem hierarchischen oxidativen Stressmodell gesprochen. Dieses beschreibt, dass es bei geringem oxidativem Stress zu einer antioxidativen Antwort, bei mittlerem oxidativen Stress zu Entzündungen und bei hohem oxidativen Stress zur Zytotoxizität kommt.²⁸⁹

In der Funktion eines Signalmoleküls können ROS verschiedene Signalkaskaden, wie die PI3K/Akt-Kaskade oder die MAPK-Kaskade, aktivieren.²⁹⁸ Da PM_{2.5} aus der Biomasseverbrennung in THP-1 Makrophagen nach kurzzeitiger Exposition in der Lage war ROS zu generieren, wurde der Einfluss von PM_{2.5} auf MAPK und Akt untersucht. Die vorliegenden Ergebnisse konnten zeigen, dass es nach einer sechsstündigen Exposition der Zellen zu einer konzentrationsabhängigen Phosphorylierung der drei MAPK p38, ERK1/2 und JNK (siehe Abbildung 13) sowie bei bereits geringen Konzentrationen an PM_{2.5} zu einer Phosphorylierung von Akt kam (siehe Abbildung 14). Eine ROS abhängige Aktivierung der MAP-Kinasen konnte jedoch nur für JNK durch Verwendung des Antioxidans BHA gezeigt werden. Auch in der Literatur wurde bereits dies beschrieben, dass verschiedene PM zu einer Aktivierung von MAP-Kinasen und von Akt führte. So induzierten Flugaschepartikel ebenso eine Phosphorylierung aller drei MAP-Kinasen in RAW264.7 Makrophagen. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivierung von ERK1/2 ROS abhängig war.²³⁸ Bei Exposition von alveolaren Rattenepithelzellen (AEII) mit einem Holzrauchextrakt konnte sogar für alle drei MAP-Kinasen mit dem Antioxidans NAC eine ROS abhängige Aktivierung gezeigt werden.³⁰ Bei der Exposition von THP-1 Makrophagen mit Zigarettenrauchextrakt kam es ebenfalls zu einer Aktivierung von ERK1/2 und JNK, die jedoch nicht ROS sondern AMPK abhängig war.²⁹⁷ Da es auch in den hier vorliegenden Untersuchungen zu einer Aktivierung der AMPK kam und eine ROS abhängige Aktivierung für p38 und ERK1/2 nicht gezeigt werden konnte, ist nicht auszuschließen, dass die Aktivierung dieser beiden MAP-Kinasen AMPK abhängig ist. Ein Zusammenhang von p38 mit der AMPK konnte bereits gezeigt werden³⁰⁰. Darüber hinaus konnten Untersuchungen mit städtischem Feinstaub in BEAS-2B zeigen, dass Akt phosphoryliert wurde³⁰¹. Auch in der humanen Nabelschnurvenenzelllinie EA.hy926 konnte die

Phosphorylierung dieser Kinasen, p38, JNK, ERK1/2 und Akt, durch PM_{2.5} gezeigt werden, die in allen Fällen durch das Antioxidans NAC vollständig reduziert werden konnte.³⁰²

Neben den oben genannten Kinasen kann auch der Transkriptionsfaktor Nrf-2 durch oxidativen Stress aktiviert werden^{181,187}. Dieses ist vor allem dann nach dem hierarchischen oxidativen Stressmodell der Fall, wenn nur ein geringer oxidativer Stress vorliegt²⁸⁹. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf-2 stellt eine antioxidative Stressantwort dar, weil hierdurch die Genexpression von vielen antioxidativen und Phase II metabolisierenden Enzymen reguliert wird.¹⁸¹ So führte auch die kurzzeitige Exposition von THP-1 Makrophagen mit PM_{2.5} aus der Biomasseverbrennung zu einer nukleären Translokation und Aktivierung von Nrf-2 (siehe Abbildung 15), was in Übereinstimmung mit anderen Publikationen steht. Bei der Exposition von BEAS-2B mit Flugaschepartikeln kam es zu einer moderaten Translokation von Nrf-2 in den Zellkern¹⁹⁷. Andere Analysen mit BEAS-2B und WSP konnten ebenfalls eine Aktivierung von Nrf-2 nachweisen. Interessant dabei war, dass diese durch Ammoniumeisen(III)-citrat, was oft bei der Behandlung von Eisenmangel eingesetzt wird, deutlich reduziert werden konnte. Ghio *et al.* vermuten, dass WSP den PM aufnehmenden Zellen zelluläres Eisen entziehen, was zu einer Störung der zellulären Metallhomöostase führt. Der Verlust an essentiellen Metallen kann wiederum oxidativen Stress zur Folge haben und verschiedene biologische Prozesse, wie die Aktivierung von Nrf-2, initiieren.²⁰⁰

Die Regulation von Nrf-2 kann zum einen Keap1-abhängig durch eine ROS vermittelte Oxidation von Cysteinresten des Keap-1 oder Keap1-unabhängig durch eine Phosphorylierung von Nrf-2 durch verschiedene Kinasen erfolgen¹⁸⁷. Durch die Verwendung von pharmakologischen Inhibitoren gegen JNK und p38 konnte gezeigt werden, dass die nukleäre Translokation von Nrf-2 lediglich durch JNK vermittelt wird. Dennoch widersprechen diese Erkenntnisse nicht unbedingt der Literatur, da die Rolle von p38 bei der Aktivierung von Nrf-2 kontrovers diskutiert wird. So konnten Keum *et al.* zeigen, dass eine Phosphorylierung von Nrf-2 durch p38 nicht zu einer Dissoziation von Keap1 führt.²⁴⁴ Es konnte aber auch nachgewiesen werden, dass die Translokation von Nrf-2 in den Zellkern p38 abhängig ist.²⁴⁵ Auch in BEAS-2B führte Zigarettenrauchextrakt zu einer p38 abhängigen nukleären Translokation von Nrf-2. Die Inhibition von JNK führte zwar auch zu einer Reduktion von Nrf-2, diese fiel jedoch geringer aus als nach der Inhibition von p38. Darüber hinaus konnte bei diesen Untersuchungen auch eine ROS abhängige Erhöhung von Nrf-2 beobachtet werden.³⁰³ In der vorliegenden Arbeit konnte mit dem Antioxidans BHA dagegen keine Reduktion der nukleären Nrf-2 Translokation nachgewiesen werden.

4.1.3 PM_{2.5} vermittelte antioxidative Stressantwort via Nrf-2 in THP-1 Makrophagen

Wie oben bereits erwähnt, ist der Transkriptionsfaktor Nrf-2 an der Induktion verschiedener Phase II metabolisierender Enzyme beteiligt²⁸⁹. Es handelt sich hierbei um viele detoxifizierende Enzyme oder Proteine, die wichtig bei der Redoxhomöostase sind^{181,248}. Ein essentielles Peptid ist hier das GSH und weitere Proteine, die an der Homöostase des GSH beteiligt sind. Zudem ist GSH eines der wichtigsten zellulären Antioxidantien und eine Schlüsselsubstanz bei der Abwehr von ROS.²⁴⁶ Das Verhältnis von GSH zu GSSG gibt Auskunft über den Redoxstatus einer Zelle.²⁴⁷

So kann durch die Bestimmung des zellulären GSH-Gehalts eine weitere Aussage über den in der Zelle auftretenden oxidativen Stress getroffen werden, als durch die alleinige Ermittlung von ROS. Die vorliegenden Untersuchungen zeigten, dass es nach einer 24-stündigen Exposition mit PM_{2.5} zu einer geringen Zunahme des zellulären GSHs und einer geringen signifikanten Abnahme von GSSG kam, dass aber die Konzentration des gesamten GSH (Summe aus GSH und GSSG) unverändert blieb (siehe Abbildung 16). Zu erwarten wären eher als Zeichen einer ROS Kompensation erhöhte GSSG- und erniedrigte GSH-Konzentrationen gewesen. Letztlich deutet dieses darauf hin, dass ein oxidativer Stress bei den THP-1 Makrophagen vorliegt. Da aber der Gesamtgehalt an GSH gleich blieb, ist dieses ein Hinweis darauf, dass es durch die PM_{2.5} Exposition nicht zu einer de novo Synthese von GSH kam. In der Literatur finden sich dagegen Berichte, dass atmosphärischer PM_{2.5} in A549 Zellen³⁰⁴ und WSP in BEAS-2B und noch stärker in RAW 264.7 Makrophagen³⁰⁵ zu einer deutlichen Reduktion des GSH Gehalts führten, es wurden aber keine GSSG-Level gemessen. Untersuchungen von Sehlstedt *et al.*, bei denen gesunde Freiwillige mit WS aus der unvollständigen Verbrennung von Holzpellets unter kontrollierten Bedingungen exponiert wurden, zeigten dagegen in der bronchoalveolären Lavage eine signifikante Erhöhung von GSH, erniedrigte GSSG-Spiegel, aber auch eine signifikante Erhöhung des gesamten GSH-Gehaltes. Da weder die Induktion einer Entzündung noch die Aktivierung von xenobiotischen oder antioxidativen Enzymen beobachtet werden konnte, wird diskutiert, dass die Mobilisierung von GSH eine erste adaptive Antwort auf die WS Exposition darstellt.³⁰⁶

Da in PM_{2.5} exponierten THP-1 Makrophagen bei erniedrigten GSSG- und leicht erhöhten zellulären GSH-Konzentrationen der Gesamtgehalt an GSH gleich blieb, könnte letzteres durch Reduktion des GSSG zu GSH bedingt sein. An der enzymatischen Katalyse dieser Reaktion ist die Glutathionreduktase beteiligt²⁴⁸, das entsprechende Gen *GSR* ist ein Zielgen von Nrf-2²⁴⁸. In der vorliegenden Arbeit konnte nach einer 24-stündigen Exposition mit PM_{2.5} eine signifikant erhöhte *GSR* Expression beobachtet werden, die nach 30h, aber nicht signifikant, noch weiter zunahm (siehe Abbildung 16). Eine Erhöhung der *GSR* Expression und des *GSR* Proteins sowie von GSH konnte auch nach der Exposition von Ratten mit ultrafeinen Flammenpartikeln beobachtet werden.³⁰⁷

Im Herzgewebe von Mäusen, die mit Dieselpartikeln exponiert wurden, zeigten sich ebenfalls ähnliche Ergebnisse.³⁰⁸ Auch in alveolaren Makrophagen von mit Dieselpartikeln exponierten Mäusen kam es zu einer Erhöhung der GSR Enzymaktivität sowie zu erhöhten GSH-Spiegeln.³⁰⁹ In der hier vorliegenden Arbeit konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen der beobachteten Nrf-2 Aktivität und der Induktion der GSR Expression hergestellt werden, da der Nrf-2-Inhibitor keinen Effekt auf die *GSR* Genexpression hatte. Dies deutet darauf hin, dass die *GSR* Expression möglicherweise durch weitere Transkriptionsfaktoren reguliert wird, wie AP-1, NF- κ B, oder p53, da der Promotorbereich von *GSR* Bindestellen für diese Transkriptionsfaktoren aufweist²⁸³. Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass durch Reduktion von GSSG durch die Tätigkeit der Glutathionreduktase immer wieder GSH zur Verfügung gestellt wird, dass aber keine Neusynthese von GSH stattfindet.

Nrf-2 reguliert noch weitere antioxidative Gene, wie die *HMOX1*, die für die HO-1 codiert.²⁴⁸ Die Hauptaufgabe dieses antioxidativen und antiinflammatorischen Proteins ist es, freies Häm zu äquivalenten Mengen CO, freien Eisenionen (Fe^{2+}) und Biliverdin zu verstoffwechseln. Dabei besitzt nicht nur die HO-1 zytoprotektive Eigenschaften, sondern auch die Abbauprodukte des Häms, vor allem CO.²⁴⁹ So konnten positive Effekte des HO-1/CO-Systems auch bei verschiedenen Erkrankungen, wie Lungenentzündung, akuter Lungenschädigung, Sepsis oder pulmonaler Hypertonie, beobachtet werden. Dies geschieht vor allem durch die Hemmung bzw. Modulation von entzündlichen, apoptotischen und proliferativen Prozessen. Darüber hinaus wird auch als Funktion die Regulation der Autophagie und der mitochondrialen Homöostase diskutiert.³¹⁰ Störungen, die zu einem nicht ausreichenden Level an HO-1 führen, werden mit Altersbedingten Erkrankungen, wie Neurodegeneration, Krebs oder Makuladegeneration assoziiert.³¹¹

Auch die vorliegenden Ergebnisse in $\text{PM}_{2.5}$ exponierten THP-1 Makrophagen zeigen, dass $100 \mu\text{g/ml}$ $\text{PM}_{2.5}$ in der Lage sind nach 6 h die HO-1 Proteinmenge zu erhöhen und dass die Regulation über Nrf-2 und JNK, nicht aber durch p38, Akt oder ROS erfolgt (siehe Abbildung 17). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit denen der Nrf-2 Regulation und lassen den Schluss zu, dass die Aktivierung von Nrf-2 durch Akt unwahrscheinlich ist. Auch in BEAS-2B führten Flugaschepartikel zu einer *HMOX1* Genexpression, die mit dem Antioxidans NAC und dem p38 Inhibitor SB203580 wieder reduziert werden konnte. Es wurde zwar die nukleäre Nrf-2 Translokation nachgewiesen, aber nicht die Nrf-2 abhängige *HMOX1* Genexpression untersucht.¹⁹⁷ In humanen trachealen glatten Muskelzellen (HTSMCs) konnte der Extrakt der Partikelphase von Zigarettenrauch sowohl die Menge als auch die Aktivität von HO-1 erhöhen. Zudem konnte mittels pharmakologischer Inhibitoren und siRNA beobachtet werden, dass HO-1 durch Nrf-2 sowie durch p38 und JNK, wie Nrf-2 selbst auch, reguliert wird.³¹²

Insgesamt zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass $PM_{2.5}$ aus der Biomasseverbrennung in THP-1 Makrophagen eine antioxidative Stressantwort induziert und dass HO-1 hierbei eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Die Induktion von HO-1 könnte auch die fehlenden zytotoxischen Effekte erklären. Damit stehen die Ergebnisse im Einklang mit der Literatur. So konnte die Induktion von HO-1 bereits als Antwort auf Umwelt- oder Industrieverschmutzung nachgewiesen werden.³¹³ Vor allem Partikel, die aus der Holzverbrennung und hier besonders diejenigen, die aus der sauerstoffarmen Verbrennung erhalten wurden, riefen in THP-1 Zellen eine erhöhte Genexpression von *HMOX1* hervor.⁹⁶ Auch in humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMECs) konnte mit Partikeln, die bei der Verbrennung von Diesel entstanden, gezeigt werden, dass es zu einer Expression der HO-1 und proinflammatorischer Gene kam. Zudem führte eine zusätzliche Inhibition der HO-1 zu einer noch größeren ROS Bildung, einer erhöhten LDH-Aktivität und zu einem Anstieg von inflammatorischen Molekülen. Entsprechend wurde nach Überexpression der HO-1 ein erhöhtes zelluläres Überleben und eine verminderte Genexpression inflammatorischer Gene beobachtet.³¹⁴

4.1.4 Aufnahme von $PM_{2.5}$ in THP-1 Makrophagen und morphologische Veränderungen

Um die Aufnahme von $PM_{2.5}$ aus der Biomasseverbrennung sowie weitere $PM_{2.5}$ induzierte morphologische Veränderungen zu untersuchen wurden THP-1 Makrophagen, die für 24 h bzw. 7 d mit Feinstaub exponiert wurden, mittels Ultrastrukturanalyse weiter betrachtet. Der analysierte $PM_{2.5}$ selbst, d. h. außerhalb des extrazellulären Systems, wurde bereits in vorhergehenden Untersuchungen aufgenommen.²⁵⁰ Da die Phagozytose fremden Materials eigentlich hauptsächlich von spezifischen Zellen, wie Makrophagen oder Neutrophilen, erfolgt, sind THP-1 Makrophagen dafür besonders gut geeignet.^{315,316} So konnte bereits nach 24 h beobachtet werden, dass es in $PM_{2.5}$ exponierten Makrophagen zu einer deutlichen Ausbildung von Pseudopodien (auch als Protrusionen bezeichnet) kam, während die Zelloberfläche von Kontrollzellen weiterhin überwiegend glatt aussah (siehe Abbildung 18A–C und Abbildung 19A–B). Die Ausbildung von Protrusionen ist ein typisches Merkmal für die Phagozytose. So konnten auch andere Untersuchungen in der Literatur mit SiO_2 ³¹⁷, Eisen²⁵¹ Nanopartikeln (NP) sowie monodispersen Polypyrrol³¹⁸ zeigen, dass THP-1 Makrophagen bzw. Makrophagen von Mäusen (J774A.1) Pseudopodien ausbilden, die dann mit den Partikeln interagierten. Die Ausbildung von Membranausstülpungen konnte auch in anderen Zellen, wie BEAS-2B²⁵⁰ oder Jurkat Zellen³¹⁹, nachgewiesen werden. In der Literatur wird die Ausbildung von Protrusionen neben der Funktion für die Phagozytose, auch als natürlicher Abwehrmechanismus gegen unerwünschtes Material diskutiert.³¹⁹

Innerhalb der Zellen liegen die Partikel hauptsächlich in membrangebundenen Vesikeln vor (siehe Abbildung 18D–G). In der Literatur werden diese häufig als Endosomen oder Phagosomen

beschrieben^{251–253}. Da die Ausbildung von Protrusionen auf eine Phagozytose hindeuten, und dies in der Literatur für THP-1 Makrophagen und andere Zellen ebenso beschrieben wurde^{251,316–319}, ist davon auszugehen, dass auch in der vorliegenden Arbeit der untersuchte PM_{2.5} mittels Phagozytose in THP-1 Makrophagen aufgenommen wird und innerhalb der Zelle zunächst in Phagosomen vorliegt. Diese Phagosomen fusionieren dann im weiteren Verlauf in der Regel mit Lysosomen zu Phagolysosomen. Durch das Milieu in den Lysosomen, wie saurer pH-Wert und eine Vielzahl verschiedener hydrolytischer Enzyme, können, bis auf die biopersistenten Feinstaubpartikel, alle fremden und potentiell pathogenen Bestandteile abgebaut werden.³¹⁶ Deshalb ist davon auszugehen, dass auch in der vorliegenden Arbeit Phagosomen mit Lysosomen fusionieren. Hierfür spricht das Auftreten komplexerer Vesikel (Abbildung 18E). Dies konnte auch bei THP-1 Makrophagen nach der Exposition mit Silica-Partikeln gezeigt werden.³¹⁷ Da die lysosomale Degradation bei Feinstaubpartikeln nicht möglich erscheint³²⁰, entstehen wahrscheinlich komplexe Fusionsprodukte, wie sie in Abbildung 18D–F und Abbildung 19B und D zu erkennen sind. Der nicht ablaufende lysosomale Abbau des PM_{2.5}, könnte ein Überladen der komplexen Fusionsprodukte mit PM_{2.5} zur Folge haben, was wiederum die Ruptur der Membran dieser Vesikel begünstigt und zu einem Freisetzen von PM_{2.5} ins Zytosol führt^{316,320,321}, was auch in der vorliegenden Arbeit zu beobachten ist (siehe Abbildung 18D und F und Abbildung 19B). Durch die Ruptur der komplexen Fusionskomplexe kann es auch zu einer Freisetzung von lysosomalen Enzymen ins Zytosol kommen, was wiederum Entzündungsprozesse bis hin zu Nekrose verursachen kann.³¹⁶ Da in kurzzeitig exponierten THP-1 Makrophagen jedoch weder Apoptose noch Nekrose beobachtet werden konnte (siehe Abbildung 10), ist es unwahrscheinlich, dass die Schädigung der Vesikelmembran zu weitreichenden zytotoxischen Effekten führt. Eine mögliche Ursache hierfür könnte darin liegen, dass die Zellen die Partikel wieder ausscheiden, wie in Abbildung 18E und F zu erkennen ist. Diese Exozytose konnte auch in anderen Untersuchungen mit THP-1 Zellen und Silber-NP gezeigt werden.²⁵³

Neben der Induktion des Endo-Lysosomalen-Signalwegs gibt es in der Literatur immer mehr Hinweise darauf, dass PM bzw. NP Autophagie in den Zellen induzieren.³¹⁶ Unter normalen Bedingungen handelt es sich bei dem Vorgang der Autophagie um die Sequestrierung von Zellorganellen oder Proteinen in Doppelmembranstrukturen, die als Autophagosom bezeichnet werden. Anschließend kommt es dabei ebenso zu einer Fusion der Autophagosomen mit Lysosomen, wobei Autolysosomen entstehen. Das eingeschlossene Material in den Autolysosomen kann nun degradiert und der Zelle innerhalb von Wachstumsphasen oder in der zellulären Homöostase zur Verfügung gestellt werden.^{316,322} Induziert wird die Autophagie durch verschiedene extra- oder intrazelluläre Ereignisse, wie Stress, Hunger, oxidativer Stress oder Hypoxie.³²³ Die Induktion von Autophagie durch Silica-Partikel konnte bereits in A549 Zellen und Mausmakrophagen³²⁰ sowie in

PM_{2.5} exponierten A549 Zellen²⁵² nachgewiesen werden. Die TEM-Aufnahmen der vorliegenden Arbeit weisen nach längerer Expositionszeit ebenfalls Strukturen mit Doppelmembranen auf, bei denen es sich um ein Fusionsprodukt eines Autophagosoms mit einem PM_{2.5} haltigen Vesikel, ein Amphisom, handeln könnte (siehe Abbildung 19C). Ob hier Autophagie stattgefunden hat, muss in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden, wie z.B. durch den Nachweis von LC3B, einem typischen Autophagiemarker.

Ein weiteres Schlüsselereignis in der PM-induzierten Toxizität ist die Schädigung der Mitochondrien.^{3,324,325} Mitochondrien sind die Zellorganellen, in denen durch oxidative Phosphorylierung in der Atmungskette Energie in Form von ATP produziert und der Zelle zur Verfügung gestellt wird.³²⁶ Die Schädigung der Mitochondrien kann zum einen durch direkte Interaktion der Partikel mit den Mitochondrien erfolgen oder indirekt durch die PM-vermittelte ROS Bildung und den dadurch verursachten oxidativen Stress.^{316,327} Dabei erfolgt die unmittelbare Antwort auf Feinstaubpartikel durch die Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials, gefolgt von der Freisetzung von Cytochrom C, der Schädigung der Cristae und einer Steigerung der O₂^{•-}-Produktion. Dies kann dann letztendlich zu einer verminderten Produktion an ATP oder zur Apoptose führen.^{324,328} In Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnte beobachtet werden, dass es bereits nach 24 h zu einer deutlichen Schädigung der Mitochondrien kam (siehe Abbildung 18G und H), zu erkennen an geschwollenen Mitochondrien und ruptierten Cristae. In Übereinstimmung damit zeigten Mitotracker-Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit, dass es zu Gestaltsänderungen der Mitochondrien unter dem Einfluß von PM_{2.5} kam. Es wurden zusätzlich auch einige Partikel innerhalb der Mitochondrien nachgewiesen. Zudem konnte nach einer siebentägigen PM_{2.5} Exposition beobachtet werden, dass es zu einer Ruptur der äußeren mitochondrialen Membran kam (Abbildung 19E). Auch andere Analysen mit THP-1 Zellen und Silber-NP konnten eine Schwellung der Mitochondrien mit geschädigten Cristae nachweisen, nicht aber die Lokalisation der NP in den Mitochondrien.²⁵³ Die Lokalisation von PM konnte ebenfalls in Mitochondrien von RAW 264.7 Makrophagen³²⁹ und in A549 Zellen nachgewiesen werden²⁵². Die Beeinträchtigung der Mitochondrien in THP-1 Makrophagen durch die Exposition mit PM_{2.5} aus der Biomasseverbrennung könnte somit die verminderte metabolische Aktivität, die im MTT-Assay beobachtet wurde, und die Aktivierung der AMPK erklären (siehe Abbildung 12).

4.2 Effekte von Feinstaub aus der Biomasseverbrennung auf die globale Genexpression von humanen Bronchialepithelzellen

Die fünfwöchige Exposition von humanen Bronchialepithelzellen mit $PM_{2.5}$ aus der Biomasseverbrennung führte zu signifikanten Unterschieden in der Genexpression im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Änderungen in der Genexpression konnten zwar nur bei weniger als 1 % aller analysierten Gene beobachtet werden, dafür spielen diese Gene aber eine entscheidende Rolle in wichtigen biologischen Signalwegen. Dies zeigte auch die funktionelle Analyse der differentiell exprimierten Gene, die die hochregulierten Gene vor allem mit der Reaktion auf Xenobiotika oder Entzündung in Verbindung brachten. Herunterregulierte Gene wurden hingegen hauptsächlich mit einer Suppression der Immunantwort assoziiert. Ein Zusammenhang zwischen der Beeinflussung solcher Signalwege und einer $PM_{2.5}$ Exposition konnte auch von anderen Studien, die ebenfalls Feinstaub anthropogenen Ursprungs untersuchten, festgestellt werden. Zudem konnte eine Verbindung zu akuten Infektionen der unteren Atemwege beobachtet werden.^{173,175,330,331} Viele der am stärksten differentiell regulierten Gene, wie *GREM1*, *EREG* und *CYP1A1*, wurden bereits in anderen Untersuchungen mit städtischem Feinstaub in Verbindung gebracht¹⁷³. Die Ergebnisse der Microarray Daten von diesen Genen und anderen (*HMOX1*, *IL1B* und *IL6*³³²) wurden mittels qRT-PCR verifiziert.

4.2.1 PAKs des untersuchen $PM_{2.5}$

Feinstaub ist oft mit PAKs kontaminiert. Diese werden meist durch metabolische Reaktionen aktiviert und weisen so toxische Eigenschaften auf⁶⁰. Dadurch fördern sie die Entstehung von verschiedenen pathologischen Zuständen und letztendlich die Entwicklung von unterschiedlichsten Erkrankungen.^{49,101,121} Sie spielen somit eine Schlüsselrolle in der Partikeltoxizität.⁴⁹ PAKs kommen in der Natur oft als komplexe Mischung vor¹¹⁵ und entstehen meist bei der Verbrennung von organischem Material^{62,66-68}. Dabei haben die Art des verbrannten Rohstoffs sowie die Verbrennungsbedingungen einen direkten Einfluss auf die Zusammensetzung und den Gehalt der PAKs.⁷⁴

Die Zusammensetzung der identifizierten PAKs stimmt mit der Literatur überein^{78,96,333}, besonders mit Fichtenruß³³⁴. Mehr als 57 % der analysierten PAKs setzen sich aus Fluoranthren, Pyren, Phenanthren, Reten, Naphthalen und Chrysen zusammen. Ein hoher Anteil an Reten ist in der Literatur auch als Marker für die Verbrennung von Weichhölzern beschrieben.^{60,85,334} Der Anteil an PAKs, die auf der US EPA-Liste stehen, machen sogar mehr als 61 % aus (215,41 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Zu

bedenken ist aber, dass diese Liste nicht die am toxischsten PAKs enthalten, sondern die, die am häufigsten analysiert wurden. Die IARC³³⁵ klassifizierte dagegen die PAKs nach ihrem kanzerogenen Potential (siehe Tabelle 1 und Tabelle 2). Dementsprechend sind 12 PAKs mit kanzerogem Potential in der vorhandenen PAK-Mischung vorhanden. Sie machen 14 % (49,7 µg/kg) des gesamten PAK-Gehalts aus. Darunter ist auch BaP, das auf der US EPA-Liste das toxischste PAK ist^{336,337}. Zu beachten ist jedoch, dass andere PAKs, wie die Dibenzopyrenderivate, ein zehnfach höheres kanzerogenes Potential aufweisen können als BaP und deshalb trotz geringen Gehalts großen Einfluss auf die Toxizität haben können^{338,339}.

Es ist bekannt, dass das toxische Potential der PAKs durch die Bildung von DNA-Addukten bedingt ist, da beim Metabolismus von PAKs elektrophile Metabolite entstehen, die mit den nukleophilen Zentren der DNA reagieren können.⁶¹ Die Bildung von PAK-DNA-Addukten durch den untersuchten PM_{2.5} wurde jedoch nicht untersucht. Da in früheren Untersuchungen von Dornhof *et al.* indessen nachgewiesen werden konnte, dass es in der fünfwöchigen Exposition mit PM_{2.5} in BEAS-2B weder zur Apoptose noch zu einem Rückgang der Proliferation kam²⁵⁰, ist es eher unwahrscheinlich, dass es zur Bildung von PAK-DNA-Addukten kam. Das PAK mit dem größten Massenanteil, Fluoranthen, wird in der Literatur bezüglich seines kanzerogenen Potenzials heterogen diskutiert³⁴⁰⁻³⁴³. So zeigten einige Studien, dass dieser PAK möglicherweise sogar eine präventive Rolle innehat, wenn es um die Mutagenität von BaP geht.³⁴⁴

Wie bereits erwähnt, sind PAKs zunächst meist nicht toxisch. Ihre toxischen und kanzerogenen Eigenschaften erhalten sie meist durch eine metabolische Aktivierung, die in erster Linie dazu dienen soll PAKs hydrophiler zu machen, um sie schlussendlich aus der Zelle bzw. dem Organismus auszuschleiden.^{60,138} Bei diesen Prozessen spielen Phase I detoxifizierende Enzyme eine entscheidende Rolle.¹³⁸ Zu diesen gehören u. a. AKRs und CYPs, dessen Gene unter den 15 am stärksten hochregulierten Genen in PM_{2.5} exponierten BEAS-2B zu finden sind (siehe Tabelle 3). So wird *CYP1A1* nachweislich durch die PAKs Chrysen, Benzo[*k*]fluoranthen, Phenanthren und Pyren induziert.^{139,345-349} Von FLT ist jedoch auch bekannt, dass es Cytochrom P450 1 inhibieren kann.^{349,350} Die biologischen Eigenschaften der einzelnen PAKs sind folglich sehr heterogen, was die Beurteilung des toxischen Potentials einer PAK-Mischung schwierig gestaltet, da sowohl synergistische als auch antagonistische Effekte bei komplexen PAK-Mischungen auftreten können.^{345,348,349,351,352} Deshalb sollten PAKs aus komplexen Zusammensetzungen nicht isoliert betrachtet werden.

4.2.2 Beeinflussung der Transkriptionsfaktoren AhR und HIF-1 in langzeitexponierten BEAS-2B

Ungeachtet des geringen PAK-Gehalts des untersuchten PM_{2.5} konnte eine Induktion des Transkriptionsfaktors AhR in PM_{2.5} exponierten BEAS-2B nachgewiesen werden. Targetgene von AhR sind Phase I detoxifizierende Enzyme, wie CYP-Enzyme.³⁵³, die in den Metabolismus von Xenobiotika, zu denen auch PAKs gehören, involviert sind. PAKs induzieren auf diese Weise ihren eigenen Metabolismus. Einige alkylierte PAKs, die auch im untersuchten PM_{2.5} vorhanden waren, zeigen hohe AhR bezogene Effekte und sind in der Lage den AhR stärker zu aktivieren als die nichtalkylierte Stammstruktur.^{354–356} In der Literatur ist ebenfalls bereits beschrieben, dass Feinstaubpartikel aus der Holzverbrennung den AhR aktivieren können.^{80,175,333}

Eine durchgeführte bioinformatische Analyse auf Transkriptionsfaktor-Bindestellen der hochregulierten Gene und eine WikiPathways-Analyse bestätigten²⁵⁷, dass AhR bei der Regulation der am stärksten hochregulierten Gene eine Rolle spielt (siehe Tabelle 4). Um die Induktion des AhR näher zu untersuchen wurden PM_{2.5} exponierte Zellen zusätzlich mit verschiedenen AhR-Inhibitoren behandelt und die Genexpression einiger AhR Zielgene (*REG*, *CYP1A1*, *IL1B* und *IL6*)^{357–360} und ein weiteres PM_{2.5} induziertes Gen (*GREM1*) untersucht. Es konnte zwar eine Induktion der Gene durch PM_{2.5} beobachtet werden, aber oft fehlte eine signifikante Reduktion der Genexpression durch die verwendeten Inhibitoren. Hierfür können verschiedene Ursachen verantwortlich sein. Die einzelnen PAKs könnten in ihrer komplexen Mischung unterschiedliche biologische Aktivitäten aufweisen und deshalb zu gegensätzlichen Effekten führen.³⁶¹ Es könnten weitere Transkriptionsfaktoren beteiligt sein, da auch eine unvollständige Inhibition der untersuchten Gene beobachtet wurde. In Übereinstimmung damit konnte die Transkriptionsfaktoranalyse in einigen Genen neben der Bindestelle für den AhR auch Bindestellen anderer Transkriptionsfaktoren vorhersagen, wie z.B. für NF-κB ($p < 0,02$). Weitere Untersuchungen zur möglichen Induktion von NF-κB durch PM_{2.5} wurden von Désirée Popadić im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt. Sie konnte eine leicht erhöhte Bindung von NF-κB an die DNA von PM_{2.5} exponierten BEAS-2B nachweisen, was für eine mögliche Beteiligung von NF-κB an der PM_{2.5} induzierten Genexpression spricht.³⁶²

Da hauptsächlich der AhR-Inhibitor CH223191 zu einer Reduktion der PM_{2.5} induzierten Genexpression der hier untersuchten Gene führte und dieser hauptsächlich mit halogenierten PAKs um den AhR konkurriert²⁶⁶, kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch diese halogenierten PAKs im untersuchten Feinstaub vorhanden sind. Deren Anwesenheit wurde jedoch nicht untersucht, da

dieses analytisch nicht einfach ist. Es ist aber bekannt, dass halogenierte PAKs bei der Verbrennung von Holz entstehen können³⁶³.

Neben dem AhR wurde auch die Beteiligung des Transkriptionsfaktors HIF-1 an der PM_{2.5} induzierten Genexpression untersucht. Dieser wurde zum einen ebenfalls von der Transkriptionsfaktoranalyse vorausgesagt, wenn auch nicht signifikant ($p < 0,3$). Zum anderen zeigten die Methylom-Analysen von PM_{2.5} exponierten BEAS-2B einen Zusammenhang zwischen der Induktion von krankheitsrelevanten Signalwegen und HIF-1. Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum ersten Mal ein Zusammenhang zwischen HIF-1 und PM_{2.5} experimentell aufgezeigt werden. Durch Immunoblotting erfolgte der Nachweis, dass HIF-1 α , die induzierbare Untereinheit von HIF-1^{205,207}, im Zellkern von PM_{2.5} exponierten BEAS-2B akkumulierte. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass HIF-1 an der Genexpression der *HMOX1* als auch an dem entsprechenden Protein, der HO-1, beteiligt ist. Aktiviert wird HIF-1 durch hypoxische Zustände. Ein Zusammenhang zwischen dem PI3K/Akt/mTOR/p70S6K-Signalweg, der bei der Aktivierung der HIF-1 α Untereinheit eine Rolle spielt^{205,207}, und urbanen PM_{2.5} ist bereits bekannt³⁶⁴. Zudem konnte Dr. Regina Merk (ehemals Dornhof) im Rahmen ihrer Dissertation nachweisen, dass PM_{2.5} in langzeitexponierten BEAS-2B zu einer Aktivierung von Akt führte³⁶⁵, was in dieser Arbeit ebenso in kurzzeitexponierten THP-1 Makrophagen gezeigt werden konnte (siehe Abbildung 14). Neben der *HMOX1* werden nach den bioinformatischen Analysen weitere Gene (*LETM2*, *SH2D2A* und *CACNB2*) von HIF-1 reguliert, was durch zukünftige Experimente verifiziert werden muss.

Neben HIF-1 wird die *HMOX1* auch von Nrf-2, einem Transkriptionsfaktor, der schon des Öfteren im Zusammenhang mit PM_{2.5} beschrieben wurde, reguliert.¹⁸¹ Neben der *HMOX1* wurden weitere Gene, die durch Nrf-2 reguliert und in PM_{2.5} exponierten BEAS-2B differentiell exprimiert wurden, identifiziert. Darunter befinden sich *SLC7A11* und *AKRIC2*¹⁸¹, die zu den am stärksten hochregulierten Genen gehören. Das von *AKRIC2* codierte Protein ist am Metabolismus von Xenobiotika, wie PAKs, beteiligt¹⁴⁴. *SLC7A11* codiert für einen Cystine/Glutamat-Transporter, der in der Glutathionsynthese involviert ist³⁶⁶. Dr. Regina Merk (ehemals Dornhof) konnte ebenfalls in ihrer Dissertation nachweisen, dass es in langzeitexponierten BEAS-2B zu einer Translokation von Nrf-2 in den Zellkern und einer Nrf-2-abhängigen Proteinexpression von HO-1 kam.³⁶⁵ Diese Ergebnisse machen es wahrscheinlich, dass Nrf-2 auch an der Regulation weiterer Gene in PM_{2.5} exponierten BEAS-2B beteiligt ist. Wie bereits bei den THP-1-Makrophagen aufgeführt, ist auch in BEAS-2B Zellen die Induktion von Nrf-2 eine Antwort auf den durch PM_{2.5} verursachten oxidativen Stress²⁸⁹. Dadurch könnten Erkrankungen z.B. Lungenschädigungen verhindert werden. Es ist aber auch bekannt, dass die Induktion von Nrf-2 negative Auswirkungen haben kann, da Nrf-2 auch in der Krebsprogression und in der Chemoresistenz eine Rolle spielt^{367,368}.

4.2.3 Einfluss von dsRNA auf das Transkriptom von PM_{2.5} exponierten BEAS-2B und der Zusammenhang mit Lungenerkrankungen

Bereits vorhandene Studien deuten darauf hin, dass PM_{2.5} möglicherweise die angeborene Immunität moduliert und die Anfälligkeit für Atemwegsinfektionen durch alveoläre Makrophagen getriebene Entzündungen und der Rekrutierung von Neutrophilen erhöhen kann. Zudem kann es zur Störung der Barriereverteidigung durch Veränderungen in der Phagozytose der Alveolarmakrophagen und zur intrazellulären Zerstörung oder Hochregulation von Rezeptoren kommen, die an der Invasion von Pathogenen beteiligt sind.³⁶⁹ Bisher fehlten Untersuchungen, die den Einfluss von Pathogenen, wie Viren, auf Lungenepithelzellen analysierten.

Um dieses eingehender zu untersuchen wurden PM_{2.5} exponierte BEAS-2B zusätzlich mit dsRNA behandelt, um einen viralen Effekt zu simulieren. Gene, die durch diese zusätzliche Stimulation differentiell reguliert wurden, können vor allem mit Signalwegen von viralen Abwehrmechanismen, der viralen Genomreplikation und dem Interferon (IFN) γ vermittelten Signalweg assoziiert werden. Hierbei handelt es sich größtenteils um IFN codierende und IFN induzierbare Gene (*IFNL2*, *IFNL3*³⁷⁰, *IFI16*³⁷¹, *IFIH1*³⁷², *IFIT1*³⁷³, *MX1*, *MX2*³⁷⁴, *OAS2* und *OAS3*³⁷⁵), antivirale Gene (*IFNL2*, *IFNL3*³⁷⁰, *IFI16*³⁷¹, *MX1*, *MX2*³⁷⁴, *OAS2* und *OAS3*³⁷⁵) sowie um einen Rezeptor des erworbenen Immunsystems (*TLR3*³⁷⁶). Da diese Gene größtenteils herunterreguliert waren, erklärt dies möglicherweise die Repression des angeborenen Immunsystems und die erhöhte Anfälligkeit für Atemwegsinfekte, was bereits in PM_{2.5} exponierten Personen gezeigt werden konnte²².

Durch die zusätzliche Exposition mit dsRNA wurden neben Signalwegen des Immunsystems noch weitere Gene beeinflusst, die an den Signalwegen des Metabolismus und der Glucuronidierung von Xenobiotika beteiligt sind (siehe Tabelle 6). Dazu gehörten vor allem Gene, die für Uridin-5'-diphospho-glucuronosyltransferasen (UGT) codieren. Eine Erhöhung der UGT Aktivität in der Lunge konnte schon zuvor nach der Exposition mit Zigarettenrauch beobachtet werden³⁷⁷. Eine erhöhte UGT1A Aktivität wurde mit der vermehrten Detoxifizierung von Arzneimitteln in Verbindung gebracht³⁷⁸. Des Weiteren zeigten die vorliegenden Ergebnisse, dass unter den PM + dsRNA spezifischen Genen krebsrelevante Gene (z. B. *CTSZ*³⁷⁹ und *HMGA2*³⁸⁰) vorhanden waren sowie ein Gen (*CD44*³⁸¹), das in der Chemosensitivität involviert ist. Welche genauen Auswirkungen sich daraus ergeben, muss noch genauer untersucht werden, wobei letztlich *in vivo*-Untersuchungen wertvolle Hinweise liefern würden.

Um den Zusammenhang zwischen den gesamten differentiell regulierten Genen nach Exposition der BEAS-2B mit PM_{2.5} und möglichen Lungenerkrankungen in einem bioinformatischen Ansatz zu untersuchen, wurde mit den differentiell regulierten Genen eine Krankheitsontologie durchgeführt.

Erkrankungen, die die höchste Signifikanz zeigten, waren Krebs, pulmonale Fibrose, Infektionen und chronisch obstruktive Lungenerkrankungen (siehe Tabelle 7). Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der Literatur, da diese Erkrankungen bereits mit PM aus dem Straßenverkehr, Industrie, Zigarettenrauch^{382,383} und aus der Biomasseverbrennung^{22,384} assoziiert wurden. Zu den Genen, die mit den oben genannten Erkrankungen assoziiert waren, gehörte u. a. *GREM1*. Dieses Gen, das am stärksten hochreguliert war, wird in der Pathogenese von Lungenerkrankungen diskutiert, da das von ihm codierte Protein Gremlin 1 eine kritische Rolle in der normalen Entwicklung der Atemwege spielt³⁸⁵. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass es in der Entwicklung der pulmonalen Hypertension³⁸⁶ und pulmonalen Fibrose³⁸⁷ involviert ist. Ein weiteres hochreguliertes Gen, das eine wesentliche Rolle im angeborenen Immunsystem und im Inflammasom spielt, ist *IL1B*, das für Interleukin-1 β codiert³⁸⁸. Epiregulin, das von *EREG*, dem am zweit stärksten hochregulierten Gen, codiert wird, gehört der Familie des epidermalen Wachstumsfaktors (engl.: epidermal growth factor, EGF) an. Epiregulin ist an entzündlichen und regenerativen Prozessen beteiligt. Es spielt weiterhin eine nicht unwesentliche Rolle bei Lungenkrebs sowie im angeborenen Immunsystem³⁸⁹. Ein weiteres Mitglied der EGF-Familie ist das Amphiregulin, das durch *AREG* codiert wird. *AREG* gehört ebenfalls zu den 15 am stärksten hochregulierten Genen und ist wahrscheinlich an Krebserkrankungen beteiligt³⁸⁹. Weitere ebenfalls hochregulierte Gene, die eine prominente Rolle in Krebsprozessen spielen, sind das bereits genannte *CYP1A1*^{145,359}, und die Gene *AKR1C1*, *AKR1C2* und *AKR1C3*, die für die entsprechenden Aldo-Keto-Reduktasen codieren¹³⁸. Diese AKRs sind u. a. daran beteiligt PAKs zu metabolisieren. Die dabei entstehenden PAK-Catechole stehen mit ihren entsprechenden o-Chinonen in einem Redoxkreislauf. Die dabei auftretenden ROS können zu oxidativen Schäden bis hin zu Mutationen und schlussendlich zu Lungenkrebs führen.¹⁴⁴

Die zusätzliche Exposition von PM_{2.5} exponierten BEAS-2B mit dem mikrobiellen Stimulus dsRNA zeigte, dass die Lungenerkrankungen, die mit dem Transkriptom dieser Zellen assoziiert wurden, die gleichen waren, aber eine höhere Signifikanz aufwiesen (siehe Tabelle 7). Dies deutet eventuell darauf hin, dass die Wahrscheinlichkeit steigt, an diesen Krankheiten zu erkranken, wenn zu einer PM_{2.5} Exposition eine virale Infektion hinzukommt. Da die Stimulation der Zellen nur 1 h vor der mRNA Isolation erfolgte, wurden nur die sogenannten „early response“ Gene erfasst, die zuerst transkribiert werden. Welche Effekte nach einer längeren oder wiederholten Exposition mit dsRNA auftreten würden, ist bisher unklar, wäre aber ein interessanter Ansatzpunkt für weitere Experimente. Zudem hat dsRNA als Induktor einer mikrobiellen Infektion Grenzen, da sie eine virale Infektion nicht ganzheitlich simulieren kann. Zudem wäre es interessant zu untersuchen, in wie weit sich die globale Genexpression verändern würde, wenn man BEAS-2B, die mit dsRNA exponiert wurden, anschließend mit PM_{2.5} behandeln würde. Letztlich wäre die Durchführung von *in vivo* Studien aufschlussreich und am aussagekräftigsten.

4.3 Einfluss von Feinstaub aus der Biomasseverbrennung auf das globale DNA-Methylierungs-Profil von humanen Bronchialepithelzellen

Luftverschmutzung stellt einen Umwelteinfluss dar, der Auswirkungen auf epigenetische Mechanismen, wie DNA-Methylierung, haben kann^{280,390}. Da bisher keine umfassenden methylom- und genomweiten Studien, vor allem nicht mit PM_{2.5} aus der Biomasseverbrennung, durchgeführt wurden, wurde zum einen der Einfluss einer Langzeitexposition mit PM_{2.5} auf das Methylom von BEAS-2B untersucht, zum anderen, ob die hypo- bzw. hypermethylierten Gene eine veränderte Genexpression aufweisen. Es konnte gezeigt werden, dass die genomweiten Änderungen der DNA-Methylierung signifikante Änderungen in der Genexpression verursachten.

4.3.1 Das Methylom von PM_{2.5} exponierten BEAS-2B

DNA-Methylierungen haben dann eine größere Auswirkung auf die Genexpression, wenn sich diese Änderungen im Promotorbereich eines Gens ergeben.³⁹¹ So fördert eine Hypermethylierung von CpGs im Promotor eines Gens die Bindung von Methyl-CpG-bindenden Proteinen, die wiederum einen Repressorkomplex aktivieren, was zu einer Hemmung der Genexpression des entsprechenden Gens führt. Eine Hypomethylierung von CpGs im Promotorbereich führt hingegen zu einer erhöhten Genexpression.²⁸⁰ Es konnten jedoch nur wenige Änderungen in CpG Islands beobachtet werden, die sich zugleich im Promotor befanden. Dennoch sind auch die Methylierungsänderungen außerhalb dieser Region funktionell relevant. Entsprechend konnte gezeigt werden, dass Änderungen der DNA-Methylierungen außerhalb von CpG Islands in Promotoreregionen einen identischen Einfluss auf die Genexpression und die Entwicklung von Krankheiten haben kann.³⁹²

Die funktionelle Analyse von Genen, die hypomethylierte CpGs aufwiesen, ergab, dass diese Gene hauptsächlich mit G-Protein vermittelten Signalwegen, zellulären Strukturen und extrazellulären Interaktionen assoziiert wurden. Übereinstimmend damit konnten Untersuchungen von Dornhof *et al.* zeigen, dass es in langzeitexponierten BEAS-2B zu einer PM_{2.5} abhängigen Veränderung des Zytoskeletts und zur Ausbildung von Stressfasern kam.²⁵⁰ Dadurch könnte es zu einer Zerstörung der epithelialen Barriere der Atemwege kommen und eine systemische Verteilung von PM_{2.5} weiter begünstigen, was wiederum lungenunabhängige Erkrankungen nach sich ziehen würde³⁸³. Gene mit hypermethylierten CpGs wiesen eine signifikante Beteiligung an Ereignissen der zellulären Adhäsion auf. Ein Verlust der Zelladhäsion wird mit einigen pathogenen Zuständen, wie Krebs, zellulärer Progression, Permeabilität der zellulären Barriere und Metastasierung, verknüpft.³⁹³ Des Weiteren wurden Gene mit hypermethylierten CpGs den Prozessen der Ionenbindung und des

Ionentransports zugeordnet. Dies könnte gegebenenfalls in Beziehung zu dem hohen Salzgehalt der Partikel stehen.

4.3.2 Zusammenhang zwischen Methylom und Transkriptom

Da durch die DNA-Methylierung auch die Genexpression reguliert werden kann²⁸⁰, wurde neben dem Methylom PM_{2.5} exponierter BEAS-2B auch das Transkriptom mittels Microarray-Analysen untersucht und die Ergebnisse beider Untersuchungen miteinander korreliert. Daraus ergaben sich 152 Gene, die sowohl differentiell methylierte CpGs aufwiesen, als auch differentiell exprimiert wurden. Im Regelfall werden hypomethylierte Gene auch vermehrt exprimiert³⁹¹, was ebenso bei den vorliegenden Beobachtungen der Fall war. Gene mit hypermethylierten CpGs wurden hingegen nur weniger als zur Hälfte auch vermindert exprimiert. Nichtsdestoweniger können methylierte CpGs Hotspots für Mutationen sein, wodurch genetische Erkrankungen oder Krebs entstehen können.

Die 152 differentiell exprimierten Gene mit differentiell methylierten CpGs wurden hinsichtlich ihrer biologischen Bedeutung untersucht. Neben der Relevanz in verschiedenen biologischen Signalwegen wurden diese auch mit verschiedenen Erkrankungen assoziiert. So waren einige antivirale Gene, wie *IFI6*, ein Restriktionsfaktor der viralen Replikation³⁷¹, und *MX2*, ein IFN induziertes Gen, dessen Protein ebenfalls die virale Replikation hemmt³⁷⁴, herunterreguliert und eine virale Andockstellen (*ANPEP*³⁹⁴) hochreguliert. Mögliche Folge einer längeren PM_{2.5} Exposition könnte dementsprechend sein, dass das Auftreten von Atemwegsinfektionen wahrscheinlicher ist, was bereits bei Personen, die häuslicher Luftverschmutzung aus der Biomasseverbrennung²² oder Zigarettenrauch³⁹⁵ ausgesetzt waren, beobachtet werden konnte. Es konnten hochregulierte Gene (*CDKN1*³⁹⁶, *EGFR*³⁹⁷, *EPHA2*^{398,399}, *FOSL1*⁴⁰⁰ und *SPPI*⁴⁰¹) und ein herunterreguliertes Gen (*SMAD6*⁴⁰²) identifiziert werden, deren Proteine in der Pathogenese von COPD, Asthma, akuter und chronischer Entzündung, Atherosklerose sowie Lungenschädigung beteiligt sind. Einige dieser Gene weisen zusätzlich pleiotrope Eigenschaften auf, die dadurch zu EMT, chronischer Entzündung und einer protumorigenen Umgebung führen können.^{403,404} Wiederum andere Gene sind direkt kanzerogen, da sie die Proliferation, Invasivität, Metastasierung und Angiogenese fördern. Darüber hinaus wird eine schlechte Prognose für das Überleben von Patienten diskutiert, wenn diese Gene im Tumorgewebe und umgebenden Gewebe hochreguliert sind.

Die transkriptionelle und funktionelle Aktivierung der Gene *AKR1C1*³³¹, *ALDH3A1*⁴⁰⁵, *CDKN1*⁴⁰⁶, *COL8A1*⁴⁰⁷, *EGFR*⁴⁰⁸, *FOSL1*¹⁷³, *PTGS2*¹⁷⁵, *S100A8*⁴⁰⁹, *S100A9*³⁸⁸ und *SPPI*⁴¹⁰ wurden bereits zuvor bei der Exposition mit PM beobachtet. Unabhängig davon konnte auch die Regulation des Gens *CDKN1*⁴¹¹ durch DNA-Methylierung nachgewiesen werden. Einige hochregulierte Gene (*AKR1C1*,

DOCK4 und *SPOCK1*) wiesen hingegen hypermethylierte CpGs auf und einige herunterregulierte Gene (*MCC*, *MX2* und *SMAD6*) enthielten hypomethylierte CpGs. Dieser Widerspruch von DNA-Methylierung und Genexpression könnte darauf hinweisen, dass diese Gene nicht ausschließlich durch epigenetische Mechanismen wie DNA-Methylierung reguliert werden, sondern dass noch andere unbekannte Vorgänge daran beteiligt sein könnten.

Eine Mehrzahl von Genen wurde durch die funktionelle Analyse einer Reihe von verschiedenen biologischen Prozessen zugeordnet, was die biologische Relevanz der Gene zusätzlich unterstreicht. Auf Grund der Tatsache, dass diese Gene eine Bedeutung bei schweren Krankheiten haben, sollte ihre Rolle in weiteren Untersuchungen näher erforscht werden.

4.3.3 Lungenerkrankungen die im Zusammenhang mit dem Methylom und Transkriptom von PM_{2,5} exponierten BEAS-2B stehen

Um Einblicke zu erhalten, welche Relevanz differentiell exprimierte Gene mit differentiell methylierten CpG in der Ausbildung von verschiedenen Erkrankungen haben, wurden mit Hilfe von verschiedenen Datenbanken Untersuchungen zur Krankheits-Ontologie durchgeführt. Mehrere Gene, die zuvor mit zahlreichen biologischen Prozessen assoziiert wurden, und andere Gene wurden auch im Zusammenhang mit verschiedenen Krankheiten beschrieben. Vor allem zeigten viele Gene eine signifikante Beteiligung an der Krebsentstehung und Progression. Es scheint also, dass die Exposition mit PM_{2,5} protumorgene Bedingungen schafft, so dass aus Bronchialepithelzellen Krebszellen entstehen können. So wurden auch verschiedene Gene (z. B. *AGPAT9*⁴¹², *ANPEP*⁴¹³, *ARNTL2*⁴¹⁴, *ASPH*⁴¹⁵, *CDKN1A*²⁴⁸, *EGFR*⁴¹⁶, *PTGS2*⁴¹⁷, *SLC7A11*⁴¹⁸, *SPOCK1*⁴¹⁹ und *SPPI*⁴²⁰), die mit einer Tumorsektion und einer schlechten Prognose verknüpft sind, hochreguliert und Tumorsuppressoren (z. B. *LIFR*⁴²¹ und *MCC*⁴²²) herunterreguliert. Im Gegensatz dazu wurden andere Tumorsuppressorgene (z. B. *CLDN1*⁴²³, *LPTM5*⁴²⁴ und *LIMDI*⁴²⁵) hochreguliert, was möglicherweise eine Schutzantwort auf die PM_{2,5} induzierte Transformation ist. Andere unabhängige Untersuchungen, die in der Literatur beschrieben sind, konnten zeigen, dass die Regulation von einigen der krankheitsrelevanten Gene durch DNA-Methylierung erfolgt.⁴²⁶⁻⁴²⁹

Die meisten krankheitsrelevanten Gene wurden mit den gleichen protumorigenen Prozessen assoziiert (siehe Tabelle 13). So waren mehrere der 152 Gene differentiell exprimiert und differentiell methyliert, die im Zusammenhang mit hypoxischen Zuständen und dem Transkriptionsfaktor HIF-1 stehen (z. B. *CDKN1A*⁴³⁰, *DUSP2*⁴³¹, *EGFR*⁴³², *EPHA2*³⁹⁸, *ERRFII*⁴³³, *LIFR*⁴³⁴, *PTGS2*⁴³⁵, *SPOCK1*⁴³⁶). Da diese Signalwege mit malignen Prozessen wie Metastasierung, Angiogenese, Therapieresistenz und einer schlechten klinischen Prognose⁴³⁷⁻⁴⁴¹ verknüpft sind, sollte deren

Aktivierung und ihre pathologische Funktion während einer PM Exposition weiter erforscht werden. Neben den Genen, die im Krebsgeschehen eine Rolle spielen, wurden auch andere krankheitsrelevante Gene differentiell exprimiert und verändert methyliert, die zur Förderung von pulmonalen Entzündungen, Lungenschädigungen, Infektionen der Lunge sowie der Progression von COPD und akutes Lungenschädigungs-Syndrom beitragen (z. B. *ANPEP*⁴⁴², *EGFR*³⁹⁷, *PTGS2*⁴⁴³, *SPP1*⁴⁰¹).

Da Feinstaub aus der Biomasseverbrennung bekanntlich auch zur Entstehung von lungenunabhängigen Erkrankungen beitragen kann¹, wurden neben den Lungenerkrankungen (siehe Tabelle 13) auch andere Erkrankungen berücksichtigt (siehe Tabelle 14). So wurden die 152 Gene zusätzlich noch mit kardiovaskulären Erkrankungen, Hypertension, metabolischem Syndrom, neurologischen Störungen, chronischen Entzündungen und vor allem Krebs anderer Organe assoziiert. Auf Grund der verwendeten Bronchialepithelzellen standen jedoch Lungenerkrankungen im Fokus. Um eine Aussage über den pathogenen Einfluss in lungenunabhängigen Erkrankungen treffen zu können, sollten weitere Experimente mit anderen Zelllinien oder *in vivo* Versuche durchgeführt werden.

Bei den vorliegenden Ergebnissen muss berücksichtigt werden, dass nur eine Feinstaubfraktion (PM_{2.5}) untersucht wurde. Unter natürlichen Umständen entstehen indessen bei Verbrennungsprozessen auch größere Partikelfraktionen (PM₁₀) und kleinere Fraktionen PM_{0.1}³, wobei zu bedenken ist, dass die Fraktion PM_{0.1} in der untersuchten Fraktion PM_{2.5} enthalten ist. Des Weiteren sollte beachtet werden, dass sich die Zusammensetzung von PM aus der Biomasseverbrennung je nach Art der verbrannten Energiequelle und den Verbrennungsbedingungen unterscheiden⁴⁴⁴, was unterschiedliche Antworten der Zelle hervorruft. Darüber hinaus haben auch die eingesetzten PM_{2.5} Konzentrationen und die Expositionszeit einen direkten Einfluss auf die biologischen Prozesse, die in einer Zelle in Gang gesetzt werden. Die hier verwendete Konzentration von 100 µg/ml PM_{2.5} zeigte keinen Einfluss auf die Zellviabilität während der betrachteten Expositionszeit. Auch in anderen biologischen Studien, die ebenfalls PM untersuchten, wurde diese Konzentration verwendet⁹⁶.

Da sich inhalierter Feinstaub in Lungenparenchym ansammeln kann, sind gesundheitliche Auswirkungen durch eine PM Exposition hauptsächlich bei Personen mit wiederholter oder intensiver Belastung wahrscheinlicher. Dies ist oft der Fall, wenn Biomasse innerhäuslich in einfachen Öfen oder offenen Feuerstellen verbrannt wird, um die entstehende Wärmeenergie zum Kochen oder Heizen zu nutzen.⁹ Da immortalisierte Zelllinien und Zellkulturbedingungen keine *in vivo* Bedingungen widerspiegeln können, aber dennoch als Modell durchaus geeignet sind, wird es nötig sein, zukünftige Studien z.B. auch in Tieren durchzuführen.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Zelllinien

Tabelle 15: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie, Reagenz	Hersteller
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma, Steinheim
3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT)	Roth, Karlsruhe
AC-DEVD-AMC	Alexis, Lörrach
Aceton	Merck, Darmstadt
Albumin Fraktion V, Biotin frei	Roth, Karlsruhe
Aminocaprinsäure	Sigma, Steinheim
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Aprotinin	Sigma, Steinheim
Bacillo [®] AF	BODE Chemie, Hamburg, Germany
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Cell Lysis Buffer (10×)	Cell Signaling Technology, Danvers
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dinatriumphosphat-2-hydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
doppelsträngige RNA (dsRNA)	Sigma, Steinheim
Doxorubicin	Sigma, Steinheim
Essigsäure 100 %	Riedel-de-Haen, Seelze
Ethanol, p.a.	Merck, Darmstadt
Ethanol, technisch	Chemikalienausgabe Makromolekulare Chemie, Freiburg
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure (EGTA)	Roth, Karlsruhe
G153A and G153B (Entwickler für X-ray processing)	Agfa-Gevaert, Mortsel
G354 (Fixierer für X-ray processing)	Agfa-Gevaert, Mortsel
Glukose-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe

Chemikalie, Reagenz	Hersteller
I-Block™ Protein-Based Blocking Reagent	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Roche, Mannheim
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
MitoTracker® Deep Red FM	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
MitoTracker® Green FM	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
Mycoplasma-Off®	Minerva Biolabs, Berlin
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat (Na ₂ HPO ₄ × H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Nonidet P-40 (NP-40)	Sigma, Steinheim
Pepstatin A	Roche, Mannheim
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Steinheim
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma, Steinheim
Precision Plus Protein™ Dual Color Standard	Bio-Rad, München
Precision Plus Protein™ WesternCTM Standard	Bio-Rad, München
Quick Start™ Bradford 1 × Dye Reagent	Bio-Rad, München
Rotiphorese® Gel 30 (30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure 37 %, rauchend	Roth, Karlsruhe
Stickstoff (flüssig)	Freiburger Materialforschungszentrum, Albert-Ludwigs-University Freiburg,
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Steinheim
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Wasser, Nuklease frei	Promega, Mannheim
Wasser, RNase frei	Qiagen, Hilden
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe

Tabelle 16: Verwendete Reagenzien in der Zellkultur.

Reagenz	Hersteller
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) + GlutaMAX™ (4,5 g/l Glucose)	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
Fetales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
Penicillin-Streptomycin (500×)	Roche, Mannheim
pGL4.37[luc2P/ARE/Hygro] Vektor	Promega, Mannheim
RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) Medium + GlutaMAX™	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
StemPro® Accutase® Cell Dissociation Reagent	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
Trypanblau	Sigma, Steinheim
Trypsin-EDTA 0,05 %	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig

Tabelle 17: Verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Bezugsquelle
Zelllinie BEAS-2B	American Type Culture Collection, Manassas
Zelllinie THP-1	Leibniz-Institut DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

5.1.2 Inhibitoren und Reagenzien-Kits

Tabelle 18: Verwendete Inhibitoren.

Inhibitor	Hersteller
2-Methyl-2H-pyrazol-3-carbonsäure-(2-methyl-4-o-tolylazo-phenyl)-amid (CH223191)	Selleck Chemicals, Houston
4-(2-Cyclohexyethoxy)anilin (IM3829)	Matrix Scientific, Columbia
6,2',4'-Trimethoxyflavon (TMF)	Selleck Chemicals, Houston
API-2	Tocris Bioscience, Bristol
Butylhydroxyanisol (BHA)	Sigma, Steinheim
Dorsomorphin	Sigma, Steinheim
KC7F2	Selleck Chemicals, Houston
LN950	Prof. Laufer, Tübingen
N-Acetylcysteine (NAC)	Roth, Karlsruhe
SP600125	Prof. Laufer, Tübingen
α-Naphthoflavon (ANF)	Sigma-Aldrich, Steinheim

Tabelle 19: Verwendete Reagenzien-Kits, Primer und Sonden.

Reagenzien-Kits	Hersteller
Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 oligonucleotide microarray	Affymetrix, Santa Clara
Amersham™ ECL™ Western blotting Detektionsreagenz	GE Healthcare, Little Chalfont
Amersham™ ECL™ Prime Western blotting Detektionsreagenz	GE Healthcare, Little Chalfont
Amaya® Nucleofector™ V Kit für THP-1	Lonza, Basel
Bovine Serum Albumin Standard Set	Bio-Rad, München
Cytotoxicity Detection Kit ^{PLUS} (LDH)	Roche, Mannheim
DNeasy® Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden
Glutathion Fluorimetric Assay Kit	Biovision, Milpitas
HRP-Juice two bottle substrate plus	pjk, Kleinblittersdorf
KAPA PROBE FAST Universal	Peqlab, Erlangen
Luciferase Assay System	Promega, Mannheim
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
Primers and probes	Sigma, Steinheim
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy® Plus Mini Kit	Qiagen, Hilden
SAPK/JNK Kinase Assay Kit (Nonradioactive)	Cell Signaling, Danvers

5.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 20: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
0.2, 0.5, 1.5 und 2.0 ml Reaktionsgefäße	Roth, Karlsruhe
15 und 50 ml Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
6-, 12-, 24- und 96-Well Zellkulturplatten	Greiner, Frickenhausen
96-Well Zellkulturplatten mit halber Wellgröße	Greiner, Frickenhausen
96-Well Zellkulturplatten, schwarz	Greiner, Frickenhausen
96-Well Zellkulturplatten, schwarz mit klarem Boden	Greiner, Frickenhausen
96-Well Zellkulturplatten, weiß	Greiner, Frickenhausen
Alufolie	Roth, Karlsruhe
Amersham Hyperfilm™ ECL Chemilumineszenzfilm	GE Healthcare, Little Chalfont
Atenschutzmaske FFP-1 und FFP-3	Roth, Karlsruhe
Autoklavierband	Roth, Karlsruhe
Autoklavierbare Müllsäcke, verschiedene Größen	Roth, Karlsruhe
Autoklavierbeutel Steribest	Flero, Italien
Deckgläser für Neubauer-Kammer	Menzel, Braunschweig
Einmalpipetten 5, 10, 25 und 50 ml	Greiner, Frickenhausen

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Einmalskalpelle	Braun, Tuttlingen
Frischhaltefolie Filmpro	ECOPLA, Le Touvet
Kryo-Röhrchen	Roth, Karlsruhe
Latexhandschuhe ecoSHIELD™ PF240	Biozym, Hessisch Oldendorf
Lightcycler® 480, 96 well culture/PCR plate	Hoffmann-La Roche, Basel
Lightcycler® 480, sealing foil	Hoffmann-La Roche, Basel
Nitrilhandschuhe rotiprotect-NITRIL puderfrei	Roth, Karlsruhe
Omnitip™ pipette tips, 300 µL reload	ULPLAST, Warszawa
Overhead-Projektor-Folien	Avery-Zweckform, Oberlaindern
Parafilm	Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten 230 mm	Roth, Karlsruhe
Pinzetten, verschiedene Ausführungen	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen 10 – 200 µl	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen 0.1 – 10 µl und 100 – 5000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen, 0.1 – 10 µl und 100 – 1000 µl	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen, RNase frei, verschiedene Größen	Biozym, Hessisch Oldendorf
Protein LoBind tubes, 1.5 mL (RNase frei)	Eppendorf, Hamburg
PVDF-Membran Immobilon® FL 0,45 µm Porengröße	Millipore, Bedford
PVDF-Membran 0,45 µm Porengröße	Roche, Mannheim
Rotilabo® Blotting Papier	Roth, Karlsruhe
Rotilabo® Sterilfilter	Roth, Karlsruhe
Rotilabo® Testblättchen 6 mm	Roth, Karlsruhe
Sterican® 20G Kanüle	Braun, Melsungen
Trifill Multi Channel Pipettier-Reservoir	Camlab, Cambridge
UNITIPS Pipettenspitzen für Multipipette	Abimed, Langenfeld
Zellkulturflaschen 75 und 175 cm ²	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturinsets für 6-Wells, 4,2 cm ² (Falcon)	Corning, Amsterdam
Zellschaber 24 cm	TPP, Trasadingen

5.1.4 Geräte

Tabelle 21: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav 5075 ELV	Systec, Wettenberg
Centro LB 960	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Clean Air Sicherheitswerkbank	CleanAir Technik, Woerden
Curix 60 AGFA	Agfa-Gevaert, Mortsel
Eismaschine Hoshizaki Ice Maker	Hoshizaki Europa, Amsterdam

Gerät	Hersteller
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Ochsenhausen
Handstückzähler	Roth, Karlsruhe
Heracell CO ₂ Inkubator	Heraeus, Hanau
Heraeus™ Megafuge™ 16R Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
Infinite® 200 PRO microplate plate reader	Tecan Group, Männedorf
Integra Pipetboy	Roth, Karlsruhe
Kühlschrank	Liebherr, Ochsenhausen
Laboport® Vakuumpumpe	KNF Neuberger, Freiburg
Lightcycler® 480	Hoffmann-La Roche, Basel
Magnetrührer IKA-COMBIMAK RET	IKA Labortechnik, Staufen
Maxisafe 2020 Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
Mehrkanalpipette Discovery (50-300 µl)	Abimed, Langenfeld
Microplate Reader iMark™	Bio-Rad, München
Microplate Reader Model 550	Bio-Rad, München
Mikroskop Nikon Eclipse Ti	Nikon, Düsseldorf
Mikroskop Nikon Eclipse TS100	Nikon, Düsseldorf
Mikroskop Nikon TMS	Nikon, Düsseldorf
Mikro-Zentrifuge	Roth, Karlsruhe
Millipore-Wasseranlage (MilliQ Plus PF)	Millipore, Bedford
Mini Protean® Tetra System inkl. Zubehör	Bio-Rad, München
Mini Trans-Blot® electrophoretic transfer cell	Bio-Rad, München
Nanodrop™ 2000	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen
Nucleofector® II	Amaxa Biosystems, Köln
pH-Elektrode Inlab® Micro	Mettler Toledo, Greifensee
pH-Meter CG 825	Schott, Mainz
Pipetboy acu, Pipettierhilfe	IBS Integra Biosciences, Chur
Pipetboy pro, Pipettierhilfe	IBS Integra Biosciences, Chur
Pipetten, versch. Größen	Eppendorf, Hamburg; Gilson, Middleton
Plastikschalen	Roth, Karlsruhe
Power Supply Power Pac 200	Bio-Rad, München
Rollenmischer RM 5, Nr. 348	Karl Hecht, Sondheim
Rührfische	Roth, Karlsruhe
Stickstofftank Arpege 110 AirLiquide	KGW Isotherm, Karlsruhe
Stoppuhr	TFA Dostmann, Wertheim
ThermoForma Steri-Cycle CO ₂ Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühlschrank UF 455G (-80 °C)	Domestic Medical Systems, Luxemburg

Gerät	Hersteller
Tischzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge Eppendorf 5417R	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Rotina 35 R	Hettich, Tuttlingen
Trans-Blot SD Semi Dry Transfer-System	Bio-Rad, München
Trockenschrank T6060	Heraeus, Hanau
Ultraschallbad Sonorex Super	Bandelin, Berlin
Vortexer Genie-2	Scientific Industries, Bohemia
Vortexer LabDancer	Roth, Karlsruhe
Waagen	Mettler-Toledo, Greifensee
Wasserbad GFL 1083, schüttelbar	GFL, Burgwedel
Wasserbad HB4 digital	IKA Labortechnik, Staufen
X-Ray Kassette Rego Spezial 400	Rego, Augsburg

5.1.5 Software und Datenbanken

Tabelle 22: Verwendete Software und Datenbanken.

Software	Hersteller
ACD/ChemSketch 2012	Advanced Chemistry Development, Toronto
Cui Lab	http://www.cuilab.cn/
DiseaseMeth	http://bioinfo.hrbmu.edu.cn/diseasemeth
Dragon Database for Methylated Genes and Diseases	http://cbrc.kaust.edu.sa/ddmgd/
Excel 2013	Microsoft Corporation, Redmond
GeneCard®	http://genecards.org
GraphPad prism 5.04	GraphPad Software Inc., San Diego
Inkscape 0.91	inkscape.org
LightCycler® 480 Software 1.5.0.39	Roche Diagnostics, Risch
Microplate Manager® Software 6.3	Bio-Rad, München
miRBase	http://mirbase.org/
Nanodrop 2000/2000c 1.4.2	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
OligoArchitec™ by Sigma-Aldrich	http://www.oligoarchitect.com/
PowerPoint 2013	Microsoft Corporation, Redmond
PubMed	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
UCSC In-Silico PCR	http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr/
Word 2013	Microsoft Corporation, Redmond

5.1.6 Lösungen und Puffer

Alle Lösungen und Puffer wurden, soweit nichts anderes angegeben ist, mit Aqua purificata hergestellt. Puffer und Lösungen, die nur für bestimmte Methoden verwendet wurden, sind in Kapitel 5.2 bei den entsprechenden Methoden aufgelistet. Für die Lagerung über längere Zeit wurden von Puffern und Lösungen Stammlösungen hergestellt, die bei Gebrauch entsprechend zu Gebrauchslösungen (1×) verdünnt wurden. Puffer und Lösungen wurden, soweit nichts anderes angegeben ist, immer als Gebrauchslösung verwendet.

Tabelle 23: Zusammensetzung des Phosphat-Puffers.

Puffer	Bestandteil	Konzentration [mM]
10× Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,4	NaCl	1,37
	Na ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O	43,00
	KCl	27,00
	KH ₂ PO ₄	15,00

5.1.7 Feinstaub

Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Feinstaub wurde bei der Verbrennung von Holzhackschnitzeln in dem Biomassekraftwerk St. Peter (Bürger Energie St. Peter eG, St. Peter, Schwarzwald, Deutschland) mit einer nominalen thermischen Leistung von 1,7 MW erzeugt. Verbrannt wurden Holzhackschnitzel hauptsächlich aus Weichhölzern, wie Fichte aus den umliegenden Wäldern. Dafür dienten entrindetes Stammholz und Äste mit einem Durchmesser von ≥ 7 cm.

Die bei der Verbrennung der Holzhackschnitzel anfallende Asche wurde in Rost- und Flugasche unterschieden. Rostasche bezeichnet dabei den Rückstand, der bei der Verbrennung im Verbrennungsofen verbleibt. Die Flugasche hingegen wird in die Luft abgegeben und kann so in die Atmosphäre gelangen. Mit Hilfe eines elektrostatischen Abscheiders wurde die Flugasche gesammelt und anschließend in drei Größenbereiche fraktioniert. Die Fraktionierung erfolgte im Labor für Partikeltechnologie/Mechanische Verfahrenstechnik, Hochschule Konstanz, Technik, Wirtschaft und Gestaltung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur die Partikel mit einem aerodynamischen Durchmesser $\leq 2,5 \mu\text{m}$ untersucht, da hauptsächlich Partikel dieser Größe lungengängig sind. Der untersuchte Feinstaub wird fortan als PM_{2.5} (particulate matter mit einem aerodynamischen Durchmesser bezeichnet $\leq 2,5 \mu\text{m}$) bezeichnet.

Chemische und mineralogische Untersuchungen wurden von Christoph Maschowski im Institut für Geo- und Umweltnaturwissenschaften, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg durchgeführt. Die Untersuchungen ergaben, dass die Partikel sich in Größe, Form und chemischer Zusammensetzung unterscheiden. Hauptbestandteile der Partikel waren zu 47 % (w/w) K_2SO_4 und zu 30 % (w/w) amorphe Komponenten. Des Weiteren enthielten die Partikel Sulfate, KCl, $CaCO_3$, $CaMg(CO_3)_2$, $Ca(OH)_2$, CaO und verschiedene Silikate. Eine zusätzliche Analyse des Gehalts polycyclische aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAK) wurde von Frau Große Brinkhaus in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Achten am Institut für Geologie und Paläontologie, Angewandte Geologie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, durchgeführt.

5.2 Methoden

5.2.1 Zellkultur

Alle durchgeführten Arbeiten mit Zellen wurden bei sterilen Bedingungen unter Verwendung einer Laminar-Air-Flow Sterilbank durchgeführt. Alle dazu verwendeten Medien, Lösungen und Verbrauchsmaterialien waren ebenfalls steril. Soweit nicht anders beschrieben, wurden die Zellen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultiviert.

5.2.1.1 Verwendete Zelllinien

5.2.1.1.1 THP-1

Als *in vitro* Model um kurzzeitige Effekte von PM_{2.5} aus der Biomasseverbrennung zu untersuchen, wurde die Zelllinie THP-1 verwendet. Die Zellen wurden aus dem peripheren Blut eines ein Jahr alten Jungen mit akuter myeloischer Leukämie isoliert⁴⁴⁵ und über das Leibniz-Institut DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen in Braunschweig bezogen. Bei den monozytären THP-1 handelt es sich um eine Suspensionszelllinie, die sich mit Hilfe von Phorboldiestern zu adhären Zellen differenzieren lassen und dann Eigenschaften von Makrophagen aufweisen.⁴⁴⁶ Da THP-1 Zellen phagozytotische Eigenschaften aufweisen, sind sie gut geeignet um intrazelluläre Effekte durch PM_{2.5} zu untersuchen.

5.2.1.1.2 BEAS-2B

Für die Kurzzeit und Langzeit Untersuchungen von Feinstaub aus der Biomasseverbrennung wurden humane immortalisierte Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) verwendet, da diese ein gutes *in vitro* Model darstellen, um die Auswirkungen inhalierter Schadstoffe zu untersuchen.⁴⁴⁷ Die Zelllinie wurde von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen und stammt von verschiedenen normalen, nicht kanzerogenen Spendern. Um die Zellen zu immortalisieren, wurden sie mit dem Adenovirus SV-40 large Taq transfiziert.⁴⁴⁸ Die Nukleotidsequenzen der Primer und Sonden stammen von einer humanen Gensequenz ab.

5.2.1.2 Subkultivierung der Zellen

5.2.1.2.1 THP-1

Die humane Suspensionszelllinie THP-1 wurde in dem Medium RPMI 1640 + GlutaMAX™ unter Zusatz von 1 % Penicillin-Streptomycin und 10 % hitzeinaktiviertem FCS (Vollnährmedium) in 175 cm²-Zellkulturflaschen kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen passagiert. Dies bedeutet, dass die Zellen geteilt und das Medium gewechselt wurde. Dadurch wurde verhindert, dass es nicht zu einer Kontakthemmung mit einhergehender Minderung der Proliferationsrate kam und so eine Stressreaktion vermieden wurde. Dafür wurde das Gesamtvolumen von 25 ml Zellsuspension in ein 50 ml Röhrchen überführt. Gegebenenfalls wurden dabei mehrere Zellkulturen aus verschiedenen Flaschen, der gleichen Passage vereinigt. Die Zellen wurden nun bei 5 °C, 1.200 rpm für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das überstehende Medium von dem Zellpellet abgesaugt und danach in 15 ml frischen Vollnährmedium resuspendiert. Von 25 µl dieser Suspension wurde die Zellzahl bestimmt (siehe Kapitel 5.2.1.3) und das Volumen an Zellsuspension berechnet, das für die Überführung von einer Million Zellen in eine neue 175 cm²-Zellkulturflasche benötigt wurde. Vor Überführung der Zellen in eine neue Zellkulturflasche wurde so viel frisches Vollnährmedium vorgelegt, dass sich ein Gesamtvolumen von 25 ml ergab. Auf Grund von Alterungsprozessen, denen die Zellen ausgesetzt sind, wurden für biologische Untersuchungen nur Zellen der Passage 4 bis 15 verwendet.

5.2.1.2.2 BEAS-2B

Bei der humanen Zelllinie BEAS-2B handelt es sich um adhärenente Zellen, die überwiegend gleich kultiviert wurden. Allein durch die Wahl des Medium treten hier Unterschiede auf. BEAS-2B Zellen wurden in DMEM + GlutaMAX™ (4,5 g/l Glucose) mit 10 bzw. 5 % hitzeinaktiviertem FCS und 1 % Penicillin-Streptomycin kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurden die adhärenenten Zellen mittels einer 0,25 prozentigen Trypsin-EDTA-Lösung vom Flaschenboden gelöst. Dabei sorgt die Protease Trypsin für ein Auflösen der Proteinbrücken zwischen Zellverband und Untergrund und EDTA komplexiert zweiwertige Kationen, die zur Stabilisierung von Membranproteinen nötig sind. Um die Zellen vom Flaschenboden abzulösen wurde zunächst das alte Kulturmedium von den Zellen abgesaugt und 3 ml der Trypsin-EDTA-Lösung in die Kulturflasche gegeben. Die Zellen wurden anschließend für 5 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Trypsin-Reaktion mit Vollnährmedium gestoppt und die Zellen resuspendiert. Die entstandene Zellsuspension wurde in ein 50 ml Röhrchen überführt, dabei wurden Zellen aus mehreren Flaschen der gleichen Passage vereinigt. Nach der Bestimmung der Zellkonzentration (siehe Kapitel 5.2.1.3) wurde das Volumen an Zellsuspension berechnet, das benötigt wurde um

700.000 BEAS-2B Zellen in eine neue Kulturflasche zu überführen. Da die Zellen Alterungsprozessen unterliegen wurden nur Zellen der Passagen 4 bis 15 für biologische Untersuchungen verwendet.

5.2.1.3 Bestimmung der Zellkonzentration

Um zu gewährleisten, dass alle biologische Untersuchungen untereinander vergleichbar sind, ist es nötig vor dem Aussähen der Zellen in verschiedene Wellplatten die Zellkonzentration einer Zellsuspension zu bestimmen, da unterschiedliche Zelldichten zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können. Dafür wurden 25 µl der Zellsuspension 1:4 mit einer 0,4 prozentigen Trypanblau-Lösung verdünnt. Mit Hilfe des Trypanblaus können lebende Zellen von toten unterschieden werden, da Trypanblau die Zellmembran toter Zellen durchdringen kann, im Gegensatz zu lebenden Zellen. Dadurch erscheinen tote Zellen unter dem Lichtmikroskop dunkel gefärbt. Diese wurden bei der anschließenden Zählung nicht berücksichtigt. Von der gefärbten und verdünnten Zellsuspension wurden 10 µl auf die Neubauer-Zählkammer gegeben und unter dem Lichtmikroskop vier Quadranten ausgezählt. Die Zellzahl pro Milliliter ergab sich, indem man die durchschnittliche Anzahl der Zellen pro Quadranten mit dem Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor (10^4) multiplizierte. Die gewünschte Zellkonzentration wurde durch die Zugabe von Kulturmedium erhalten.

5.2.1.4 Kryokonservierung von Zellen

Um Zelllinien für längere Zeit zu konservieren, können diese in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert und bei Bedarf aufgetaut werden. Auf diese Weise können Zellen nahezu unbegrenzt gelagert werden, da bei Temperaturen $< 120^\circ\text{C}$ keine biochemischen Reaktionen mehr stattfinden. Die Zellen sollten möglichst zu frühen Zeitpunkten zum Einfrieren vorbereitet werden, daher wurden Zellen möglichst junger Passagen (Passage 3 bis 5) verwendet. Die Vorgehensweise ist ähnlich zu den Vorgängen, die im Kapitel 5.2.1.2 Subkultivierung beschrieben sind. Die in Suspension wachsenden THP-1 wurden aus einer T175-Zellkulturflasche in ein 50 ml Röhrchen überführt. Nach anschließender Zentrifugation bei 1.200 rpm und 4°C für 5 min wurde der Überstand über dem Zellpellet abgesaugt und die Zellen in frischem Vollnährmedium suspendiert. Adhärenz Zellen (BEAS-2B) wurden in T175-Zellkulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert. Anschließend wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen wurden mit 0,25 % Trypsin-EDTA für 5 min abgelöst. Die Reaktion wurde mit frischem Vollnährmedium gestoppt. Die nun in Suspension vorliegenden Zellen wurden in ein 50 ml Röhrchen überführt. Das weitere Vorgehen erfolgt unabhängig von der verwendeten Zelllinie gleich. Nach Bestimmung der Zellkonzentration

(siehe Kapitel 5.2.1.3) wurde eine bestimmte Menge an Zellen in ein neues 50 ml Röhrchen überführt und für 5 min bei 1.200 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand über dem Zellpellet wurde abgenommen und die Zellen wurden in 4 °C kaltem Einfriermedium zügig resuspendiert. Das Einfriermedium stellt ein Gemisch aus 90 % Vollnährmedium und 10 % kryoprotektivem DMSO dar. Das Volumen an Einfriermedium wurde so gewählt, dass eine Zellkonzentration von 2×10^6 Zellen pro Milliliter erreicht wurde. Nach Zugabe von DMSO war eine schnelle Arbeitsweise entscheidend, damit die zytotoxischen Eigenschaften des DMSO so minimal wie möglich waren. Je 1 ml Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen überführt. Um das Auftreten von Membranschäden zu vermeiden wurden die Zellen in einer Styroporbox für 24 bis 72 h bei -80 °C eingefroren. Dies ermöglichte ein schonendes und gleichmäßiges Einfrieren der Zellen, bevor diese dann in flüssigem Stickstoff für die Langzeitlagerung überführt werden konnten.

5.2.1.5 Auftauen von Zellen

Um die Zellen für nachfolgende Untersuchungen verwenden zu können, wurden diese bei Bedarf aufgetaut. Dabei war es wichtig möglichst schnell zu arbeiten, um die Auswirkungen toxischer Eigenschaften des DMSO zu verringern. Dafür wurden in ein 50 ml Röhrchen 9 ml und in eine T175-Zellkulturflasche 25 ml 37 °C warmes Vollnährmedium vorgelegt. Die Zellen wurden im Wasserbad aufgetaut und möglichst schnell in das 50 ml Röhrchen überführt, wodurch eine rasche Verdünnung des DMSO stattfand. Nachdem die Zellen abzentrifugiert wurden (1.200 rpm, 4 °C und 5 min), wurde der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 5 ml frischem Vollnährmedium suspendiert und in eine T175-Zellkulturflasche mit 25 ml Medium überführt. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach zwei Tagen wurde mit den Zellen wie in Kapitel 5.2.1.2 weiterverfahren.

5.2.1.6 Ausplattieren der Zellen

Für die Untersuchungen mit PM_{2,5} wurden die verwendeten Zellen in verschiedenen Zellkulturplatten mit unterschiedlicher Wellgröße subkultiviert. Hierzu wurden Zellkulturplatten der Formate 6, 12, 24 und 96-Well verwendet. Die Auswahl der entsprechenden Wellgröße, Zellzahl, Kulturvolumen und Dauer der Kultivierung richtete sich nach der jeweiligen Versuchsart. Um die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen mit unterschiedlichen Versuchsdesign vergleichen zu können, wurde darauf geachtet, dass die Anzahl der Zellen pro Quadratcentimeter in allen Wellformaten nahezu gleich war.

Im Folgenden sind die verwendeten Zellen mit den jeweiligen Kulturbedingungen für die entsprechenden Untersuchungen aufgeführt (siehe Tabelle 24 und Tabelle 25).

Tabelle 24: Die für THP-1 verwendeten Wellformate mit den entsprechenden verwendeten Zellzahlen, Kultur- und Expositionsvolumina.

Well-format	Fläche/Well [cm ²]	Zellzahl/Well	Kultur-volumen [μl]	Expositions-volumen [μl]	Versuch
6 Well	9,6	$1,5 \times 10^6$	3.000	6.000	Proteinextrakte, qRT-PCR, GSH-Assay, Caspase-3/7-Aktivitäts-Assay, SAPK/JNK-Aktivitäts-Assay
6 Well	9,6	$1,5 \times 10^6$	3.000	3.000	LDH-Assay
6 Well mit Insert	4,2	$0,75 \times 10^6$	2.000	3.000	Transmissionselektronenmikroskopie
12 Well	3,9	$1,0 \times 10^6$	1.250	2.500	ARE Luciferase Assay
24 Well	1,9	$0,05 \times 10^6$	1.200	1.200	Fluoreszenzmikroskopie
96 Well	0,32	$0,075 \times 10^6$	200	200	MTT-Assay

Tabelle 25: Die für BEAS-2B verwendeten Wellformate mit den entsprechenden verwendeten Zellzahlen, Kultur- und Expositionsvolumina.

Well-format	Fläche/Well [cm ²]	Zellzahl/Well	Kultur-volumen [μl]	Expositions-volumen [μl]	Versuch
6 Well	9,6	$0,1 \times 10^6$	3.000	6.000	qRT-PCR, Transkriptom-Analyse, Methylom-Analyse Proteinextrakte

Der Ablauf zum Ausplattieren der Zellen entspricht im Wesentlichen dem Ablauf, der in den Kapiteln 5.2.1.2 und 5.2.1.3 beschrieben ist. Der Unterschied besteht darin, dass die Zellen statt in Flaschen in Zellkulturplatten kultiviert wurden. Dafür wurde die entsprechende Menge an Zellen, nach dem die Zellzahl bestimmt wurde, abgenommen und, wie in Tabelle 24 und Tabelle 25 aufgeführt, ausplattiert. THP-1 Zellen wurden zudem mit 50 ng/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) für 48 h zu adhärenenten Makrophagen differenziert. Dafür wurde das PMA direkt in die auszuplattierende Zellsuspension gegeben. Um ein erfolgreiches Anwachsen der Zellen an die Welloberfläche zu gewährleisten wurde Kulturmedium mit 10 % FCS verwendet.

Die Zellen wurden für 24 h (BEAS-2B) oder 48 h (THP-1) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Anschließend wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, d. h. das Medium über den Zellen wurde entfernt und durch frisches Kulturmedium ersetzt. Dabei wurde ein Volumen an Kulturmedium verwendet, das dem halben Expositionsvolumen (siehe Tabelle 24 und Tabelle 25) entsprach. Dabei wurde gegebenenfalls über Nacht auf Hungermedium umgestellt. Hungermedium

bezeichnet dabei Kulturmedium mit lediglich 1 % Penicillin/Streptomycin ohne Zugabe von FCS. Die Verwendung von Hungermedium erfolgte um eine Grundstimulierung, die durch die im Serum enthaltenen Hormone und Wachstumsfaktoren zustande kommen kann, zu vermeiden. THP-1 Makrophagen wurden in der Regel, soweit nichts anderes angegeben ist, immer auf Hungermedium umgestellt.

5.2.1.7 Herstellung von Partikelkonzentrationen und Stimulation der Zellen mit Feinstaubpartikeln

Für die Untersuchung von Flugaschepartikeln mit einem aerodynamischen Durchmesser kleiner $2,5\ \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2.5}$) wurden die untersuchten Zellen in verschiedenen Zellkulturplatten subkultiviert. Getestet wurden die Konzentrationen 1, 10, 50 und $100\ \mu\text{g/ml}$ $\text{PM}_{2.5}$. Dafür wurde zunächst von den Feinstaubpartikeln eine Stammsuspension der Konzentration 5 mg/ml in Kulturmedium frisch hergestellt. Anschließend wurden mittels Ultraschall Partikelaggregate zerstört und die Suspension homogenisiert. Danach wurde zur besseren Handhabung eine Gebrauchssuspension hergestellt. Dafür wurde die Partikel-Stammsuspension soweit verdünnt, dass eine Partikelkonzentration erreicht wurde, die der doppelten Expositionskonzentration entsprach.

Die Partikel Gebrauchslösung wurde nun auf die Zellen gegeben. Da sich über den Zellen schon 50% des Expositionsvolumens befanden, wurde die Gebrauchslösung 1:1 verdünnt, so dass die endgültige Testkonzentration erreicht wurde. Untersucht wurden Expositionszeiten von 20 min, 1, 2, 6, 12, 24, 48 und 72 h nach $\text{PM}_{2.5}$ Zugabe. Kam es zum Einsatz von Inhibitoren, so wurden diese 1 h vor der Partikelzugabe ins halbe Expositionsvolumen zu den Zellen gegeben.

5.2.1.8 Langzeitexposition von BEAS-2B

Da es vor allem nach längerer Exposition mit Feinstaubpartikeln zu gesundheitlichen Auswirkungen oder zu epigenetischen Veränderungen kommt, wurden die humanen Bronchialepithelzellen BEAS-2B für längere Zeit kontinuierlich mit Feinstaub exponiert.

Dafür wurde Kulturmedium mit 5 % FCS gewählt, da die im Serum enthaltenen Proteine an die Partikel adsorbieren können und so die durch Feinstaub hervorgerufenen Effekte vermindern können.⁴⁴⁹⁻⁴⁵¹ Vor diesem Hintergrund erfolgte eine Reduktion des FCS auf 5 % statt wie üblich 10%. Die im FCS enthaltenen Wachstumsfaktoren und Hormone werden zum Wachstum und zur Proliferation der Zellen benötigt werden.

BEAS-2B Zellen wurden dabei in T75-Zellkulturflaschen kultiviert. Dafür wurden 700.000 Zellen in 15 ml Kulturmedium über Nacht kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium entfernt und 50 ml einer 100 µg/ml Partikelsuspension, die zuvor 15 min mit Ultraschall behandelt wurde, auf die Zellen gegeben. Bei den Kontrollzellen erfolgte ein einfacher Mediumwechsel mit 50 ml frischem Kulturmedium. Die Zellen wurden so für zwei bis drei Tage bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen mit 0,25 % Trypsin EDTA von der Flaschenoberfläche gelöst und in neuen Zellkulturflaschen weiter subkultiviert bzw. in Zellkulturplatten ausplattiert.

5.2.2 Proteinextrakte

Um die biologischen Effekte auf Proteinebene zu untersuchen, wurden von PM_{2.5} exponierten Zellen Proteinextrakte angefertigt und mittels Western Blot analysiert. Je nach Protein, welches untersucht werden sollte, wurden Extrakte unterschiedlicher Zellkompartimente angefertigt. Entscheidend war eine soweit wie möglich zügige Arbeitsweise auf Eis, um Degradationsprozesse der Proteine durch Proteasen bzw. Dephosphorylierungen durch Phosphatasen zu verhindern.

5.2.2.1 Gesamtextrakte

Für Gesamtextrakte wurden die untersuchten Zellen in 6-Well-Platten kultiviert (siehe Tabelle 24 und Tabelle 25). Die Exposition der Zellen mit PM_{2.5} erfolgte in Hungermedium. Für die Lyse der Zellen wurde der 10× Cell Lysis Buffer von Cell Signaling verwendet, der vor Gebrauch 1 : 10 mit Wasser verdünnt wurde. Dieser enthielt bereits Detergenzien sowie Protease- und Phosphataseinhibitoren.

Nach der entsprechenden Expositionszeit der Zellen mit PM_{2.5} wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 1 ml 4 °C kaltem 1× PBS gewaschen. Anschließend wurden die adhärennten Zellen mit 300 µl 1× Cell Lysis Buffer abgeschabt. Die Zellsuspension wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und mit 5-Frier-Tau-Zyklen vollständig lysiert. Dafür wurden die Extrakte für 5 min in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Nach Zentrifugation der Extrakte bei 14.000 rpm, 4 °C für 5 min wurde die Proteinkonzentration mittels BCA-Assay (siehe Kapitel 5.2.3.1) bestimmt. Die Proben wurden bis zur Analyse mittels Western Blot bei -20 °C gelagert.

Proteaseinhibitoren:	17 µg/ml Aprotinin
	0,015 mM Leupeptin
	0,021 mM Pepstatin A
	1 mM DTT
	1 mM PMSF

5.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Bei Untersuchungen, wie Western Blots oder Caspase-3/7-Aktivitätsassay, die auf der Basis von Proteinen erfolgen, musste sichergestellt werden, dass immer die gleichen Proteinmengen analysiert wurden. Nur so können verschiedene Proben miteinander verglichen werden. Dafür wurde BSA (engl.: bovine serum albumin) in der gleichen Platte, in der auch die Proteinkonzentration der Zell-Lysate untersucht wurden, als Referenz vermessen. Um die Proteinkonzentration der untersuchten Proben bestimmen zu können, wurde eine Standardreihe bekannter Konzentrationen von 0,125, 0,25, 0,5, 0,75 und 1 mg/ml BSA vermessen. Die gemessene Absorption bei der entsprechenden Wellenlänge wurde als Funktion der Proteinkonzentration dargestellt. Somit konnte durch die Absorption der untersuchten Proben die Proteinkonzentration berechnet werden. Die Absorptionsmessung der Proben sowie der Standardreihe erfolgte immer als technisches Duplikat mit anschließender Mittelwertbildung der erhaltenen Ergebnisse. Je nach verwendetem Lysepuffer, der zur Erstellung der Proteinextrakte verwendet wurde, wurde die Proteinbestimmung mittels BCA-Assay (siehe Kapitel 5.2.3.1) oder Bradford-Assay (siehe Kapitel 5.2.3.2) durchgeführt.

5.2.3.1 BCA-Assay

Die Proteinkonzentrationen von Gesamt- und Kernextrakten (siehe Kapitel 5.2.2.1 und 5.2.2.2), von Extrakten des ARE Luciferase Assays (siehe Kapitel 0) und von Extrakten des GSH-Assays (siehe Kapitel 5.2.9) wurden mit Hilfe des Pierce™ Proteinassays der Firma Thermo Scientific nach Herstellerangaben ermittelt. Der Assay läuft dabei in zwei Schritten ab. Im ersten Schritt erfolgt die Reduktion von Cu²⁺-Ionen im alkalischen Milieu durch die vorhandenen Proteine zu Cu¹⁺-Ionen (Biuret-Reaktion)⁴⁵³, die im zweiten Schritt durch zwei Moleküle Bichinonsäure (BCA) komplexiert werden (siehe Abbildung 29). Die Absorption der so entstandenen purpurfarbenen wasserlöslichen Komplexe kann bei 560 nm gemessen werden, die direkt linear (20 bis 2.000 µg/ml) zur eingesetzten Proteinkonzentration ist.

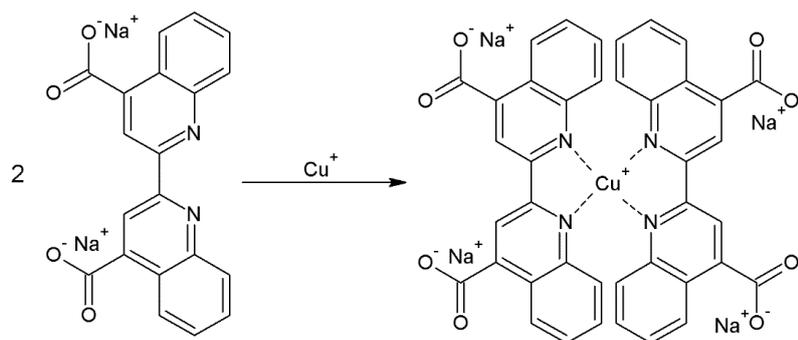


Abbildung 29: Reaktion, die während des BCA-Assays stattfindet. Proteine reduzieren im alkalischen Milieu Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{1+} -Ionen, die anschließend von 2 Molekülen Bichinonsäure (BCA) zu wasserlöslichen komplexen chelatisiert werden.

Bei der Durchführung wurden in eine 96-Wellplatte pro Well von den Proteinextrakten $2\ \mu\text{l}$ und von den BCA-Referenzlösungen $5\ \mu\text{l}$ pipettiert. Für den Nullwert der Standardreihe wurden $5\ \mu\text{l}$ Wasser vorgelegt. Im Anschluss wurden $200\ \mu\text{l}$ pro Well von der BCA-Gebrauchslösung invers dazu pipettiert. Die BCA-Gebrauchslösung wurde aus 50 Teilen BCA-Reagenz A und einem Teil BCA-Reagenz B hergestellt und bis zum Gebrauch unter Lichtausschluss vorübergehend gelagert. Nach Zugabe der BCA-Gebrauchslösung zu den Proteinextrakten wurde die Platte mit einem Deckel abgedeckt, um eine mögliche Verdunstung zu vermeiden, und bei $37\ ^\circ\text{C}$ unter Lichtausschluss für 15 min inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei $560\ \text{nm}$ mit dem Microplate Reader iMarkTM gemessen.

5.2.3.2 Bradford-Assay

Die Proteinkonzentration der Extrakte, die für den Caspase 3/7-Aktivitätsassay (siehe Kapitel 5.2.6) hergestellt wurden, wurde mit dem Quick StartTM Bradford Protein Assay von Bio Rad bestimmt. Der Assay basiert auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Reagenzes Coomassie Brilliant Blue G250.⁴⁵⁴ Unter normalen Bedingungen liegt das Reagenz als roter Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei $465\ \text{nm}$ vor. Bei Vorliegen von Proteinen kommt es im sauren Milieu zu einer Komplexreaktion des Farbstoffes mit kationischen und unpolaren Seitenketten der Proteine. Die so entstandenen blauen Komplexe weisen ein Absorptionsmaximum von $595\ \text{nm}$ auf.

In eine 96-Wellplatte wurden für die Standardreihe $5\ \mu\text{l}$ der BCA-Referenzlösungen bekannter Konzentrationen und $5\ \mu\text{l}$ Wasser als Nullwert pro Well vorgelegt und von den untersuchten Proben $2\ \mu\text{l}$ pro Well pipettiert. Anschließend wurden $250\ \mu\text{l}$ pro Well des Reagenzes invers dazu pipettiert. Nach dem Schütteln der Platte bei Raumtemperatur für 4 min bei $450\ \text{rpm}$ wurde die Absorption bei $595\ \text{nm}$ gemessen.

5.2.4 Western Blot-Analysen

Der Nachweis spezifischer Proteine oder deren Aktivierung, z.B. durch aktivierende Phosphorylierung, erfolgte mittels Western Blot-Analysen. Bei dieser semiquantitativen Methode werden zunächst die Proteine eines Proteinextraktes (siehe Kapitel 5.2.2) mittels SDS-Gelelektrophorese entsprechend dem Molekulargewicht aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen. Die zu untersuchenden Proteine können nun in einer zweistufigen Antigen-Antikörper-Interaktion mit nachfolgender Chemilumineszenz-Reaktion detektiert werden.

5.2.4.1 SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Dafür wurde das Mini PROTEAN Tetra-System von Bio Rad nach Herstellerangaben verwendet. Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergens, das Proteine denaturiert und gleichmäßig pro Masseneinheit mit einer negativen Ladung versetzt. Dadurch wird ermöglicht, dass Proteine nach ihrem Molekulargewicht mittels SDS-PAGE aufgetrennt werden können. Die Polymerisation der SDS/Acrylamid-Gele basiert auf der Vernetzung von Acrylamid- und Bisacrylamidmolekülen im Verhältnis 37,5 : 1. Dies erfolgt erst nach der Zugabe von freien Radikalen, in der vorliegenden Arbeit durch Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und dem Katalysator Tetramethylethyldiamin (TEMED). Je nach Molekulargewicht des analysierten Proteins wurden Gele mit unterschiedlicher Porengröße gewählt, die durch den Anteil an Acrylamid bestimmt werden (siehe Tabelle 26). So wurden Gele mit einem höheren Acrylamidanteil und kleineren Poren für Proteine mit größerer molekularer Masse verwendet und andersherum.⁴⁵⁵

Herstellung der Polyacrylamid-Gele

Zur Herstellung von Polyacrylamid-Gelen wurde zuerst die Lösung des Trenngels zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Die Verwendung von Isopropanol sorgte für die Bildung einer glatten Oberfläche des Trenngels und verhinderte das Austrocknen des Gels während des Polymerisationsvorgangs. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol vollständig entfernt und die Lösung des Sammelgels (siehe Tabelle 26) darüber gegossen. Um Probestaschen zu erzeugen wurde in das noch flüssige Sammelgel ein Gel-Kamm gesteckt. Nachdem auch das Sammelgel vollständig auspolymerisiert war, wurde das Gel in feuchten Tüchern bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Es wurden Gele mit einer Dicke von 1,5 mm hergestellt.

der Proteine wird durch Hitze begünstigt. Das im Ladepuffer enthaltene Bromphenolblau färbt die Proteinextrakte an, so dass man die Geschwindigkeit der Auftrennung der Proteine beobachten kann.

5 × Ladepuffer: 250 mM Tris, pH 6.8
 0.5 mM DTT
 10 % (w/v) SDS
 0.5 % (w/v) Bromphenolblau
 50 % (v/v) Glycerol

Gelelektrophorese

Die für die Gelelektrophorese verwendete Kammer wurde nach Herstellerangaben zusammengesetzt und vollständig mit Laufpuffer (1 ×) befüllt. Die vorbereiteten Proben wurden in die Probentaschen des Polyacrylamidgels pipettiert. Zusätzlich wurden 5 µl eines Proteinstandards in eine Probentasche pipettiert, um das Molekulargewicht des untersuchten Proteins abschätzen zu können. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80 bis 165 V für 65 bis 120 min. Dabei sorgte das angelegte elektrische Feld dafür, dass die negativ geladenen Proteine zur Anode wandern und entsprechend ihrer Größe aufgetrennt wurden.

5 × Laufpuffer: 150 mM Tris
 950 mM Glycin
 0,5 % (w/v) SDS

5.2.4.2 Transfer der Proteine

Nach dem die Proteine mittels SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt wurden, wurden diese auf eine Trägermembran übertragen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran mit einer Porengröße von 0,45 µm verwendet. Diese wurde vor dem Proteintransfer auf die Größe des Polyacrylamidgels zugeschnitten, 10 min in Methanol äquilibriert und anschließend viermal mit Wasser gewaschen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte der Proteintransfer nach dem Semi-Dry und nach dem Wet Verfahren.

Semi-Dry Verfahren

Es wurden zuvor sechs Filterpapiere in Blotpuffer 1, drei Filterpapiere in Blotpuffer 2 und neun Filterpapiere in Blotpuffer 3 äquilibriert. Als erstes wurden die sechs Filterpapiere aus Blotpuffer 1 auf den Boden (Anode) der Transferapparatur gelegt und mit den drei Filterpapieren aus Blotpuffer 2 überschichtet. Als nächstes folgte die äquilibrierte und gewaschene Membran. Das Sammelgel wurde

nun vom Trenngel abgetrennt und dieses nach dem Waschen in Wasser auf die Membran gelegt. Zum Schluss wurde das Gel noch mit den neun Filterpapieren aus Blotpuffer 3 überschichtet. Danach wurden mit einem Roller alle Luftblasen entfernt, da es an diesen Stellen zu keinem Stromfluss und somit zu keinem Proteintransfer kommt. Nachdem die Apparatur mit dem Deckel (Kathode) verschlossen wurde, erfolgte bei Raumtemperatur und 0,13 A für 2,5 h der Transfer der Proteine auf die Membran.

Blotpuffer 1: 0,12 M Tris pH 10,4
 20 % (v/v) Methanol

Blotpuffer 2: 0,1 M Tris pH 10,4
 20 % (v/v) Methanol

Blotpuffer 3: 0,1 M Tris pH 10,4
 20 % (v/v) Methanol
 0,4 M Aminocapronsäure

Wet Verfahren

Für das Wet Verfahren wurden zunächst zwei Schwämmchen und zwei Filterpapiere in Transferpuffer (1×) äquilibriert. Anschließend wurde ein Schwämmchen in die Transferkassette gelegt, auf die ein Filterpapier und die Membran gelegt wurden. Auf die Membran folgte das Trenngel, welches zuvor vom Sammelgel abgetrennt und in Wasser gewaschen wurde. Auf das Gel wurden zum Abschluss wieder ein Filterpapier und ein Schwämmchen gelegt. Bevor die Kassette verschlossen wurde, wurden ebenfalls vorhandene Luftblasen durch Rollen entfernt. Die geschlossene Kassette wurde in die Transferkammer gesteckt. Zusätzlich wurden ein Rührfisch und ein Kühlakku hinzugegeben, um eine gleichmäßige Verteilung der Ionen des Transferpuffers zu gewährleisten und die Temperatur möglichst konstant zu halten. Die Kammer wurde vollständig mit Transferpuffer (1×) befüllt. Der Proteintransfer erfolgte bei 4 °C und 0,4 A für 1,5 h.

5 × Transferpuffer: 125 mM Tris
 960 mM Glycin

1 × Transferpuffer: 20 % (v/v) 5 × Transferpuffer
 20 % (v/v) Methanol
 60 % (v/v) Aqua purificata

5.2.4.3 Blockieren, Waschen und Inkubation mit Antikörpern

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurde die Membran vom Gel entfernt und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Die Membran wurde mit 15 ml I-Block™-Lösung für 60 min bei Raumtemperatur auf einem Rollmischer unter ständiger Bewegung blockiert. I-Block™ ist ein Reagenz zum Blockieren von Membranen basierend auf einem hochreinen Casein-Protein, das nicht spezifische Bindungsstellen der Membran blockiert und somit den Hintergrund reduziert. Nach Entfernen der I-Block™ Lösung wurde der primäre Antikörper, der an das zu untersuchende Protein bindet, zur Membran gegeben. Die verwendeten Antikörper (siehe Tabelle 27) wurden in 10 ml I-Block™-Lösung verdünnt. Die Antigen-Antikörper-Reaktion erfolgte über Nacht bei 4 °C. Der Antikörper wurde anschließend von der Membran entfernt und zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Die Antikörperlösung konnte mehrmals verwendet werden, da die Lösung einen Antikörperüberschuss enthielt und somit nicht alle Antikörper an die Proteine gebunden wurden. Anschließend wurde die Membran viermal mit 15 ml TBST gewaschen und für 1 h mit der sekundären Antikörperlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Der sekundäre Antikörper ist gegen Speziesproteine des primären Antikörpers gerichtet. Dies ermöglicht die Verwendung einer Vielzahl von primären Antikörpern mit nur einigen wenigen sekundären Antikörpern (siehe Tabelle 28). Nach Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper wurde dieser entfernt und die Membran dreimal mit TBST und zweimal mit TBS gewaschen. So wurden Antikörper, die nicht gebunden oder unspezifisch gebunden hatten, entfernt.

Tabelle 27: Für Western Blots verwendete primäre Antikörper.

Antigen	Spezies, Klonalität	Verdünnung (0,2 % I-Block™)	Hersteller (Artikelnr.)
P-Akt	Kaninchen, monoklonal	1 : 1.000	Cell Signaling (4060)
Akt	Kaninchen, polyklonal	1 : 1.000	Cell Signaling (9272)
P-AMPK	Kaninchen, monoklonal	1 : 1.000	Cell Signaling (2535)
P-eEF2	Kaninchen, polyklonal	1 : 1.000	Cell Signaling (2331)
eEF2	Kaninchen, polyklonal	1 : 5.000	Cell Signaling (2332)
P-p44/42 MAPK (ERK1/2)	Kaninchen, polyklonal	1 : 1.000	Cell Signaling (9101)
p44/42 MAP (ERK1/2)	Kaninchen, polyklonal	1 : 1.000	Cell Signaling (9102)
GAPDH	Maus, monoklonal	1 : 2.000	Millipore (MAB-374)
HDAC2	Kaninchen, polyklonal	1 : 2.000	Abcam (ab7029)
Hif-1 α	Kaninchen, polyklonal	1 : 1.000	Cell Signaling (14179)
HO-1	Maus, monoklonal	1 : 1.000	Enzo (ADI-OSA-110)
Nrf-2	Kaninchen, polyklonal	1 : 1.000	Santa Cruz (sc-13032)
P-p38	Kaninchen, monoklonal	1 : 1.000	Cell Signaling (4511)
p38	Kaninchen, monoklonal	1 : 1.000	Cell Signaling (9212)

Tabelle 28: Für Western Blots verwendete sekundäre Antikörper.

Antigen	Spezies	Verdünnung (0,2 % I-Block™)	Hersteller (Artikelnr.)
Kaninchen	Ziege, polyklonal	1 : 2.500	Jackson Immuno Research (11-035-144)
Maus	Ziege, polyklonal	1 : 2.500	Jackson Immuno Research (115-035-146)

Tris gepufferte Salzlösung (TBS):
20 mM Tris
150 mM NaCl

Tris gepufferte Salzlösung mit Tween 20 (TBST):
20 mM Tris
150 mM NaCl
0,1 % (v/v) Tween 20

I-Block™-Lösung (in TBST):
0,2 % (w/v) I-Block™

5.2.4.4 Detektion der Proteine mit Chemilumineszenz

Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Chemilumineszenz, die durch Oxidation von Luminol zu 3-Aminophthalat und verschiedenen Nebenprodukten erzeugt wird. Katalysiert wird diese Reaktion durch die Meerrettichperoxidase, die an den sekundären Antikörper gekoppelt ist. Die Menge der freigesetzten Photonen ist dabei zur Menge des untersuchten Proteins proportional, da an eine größere Menge Protein mehr sekundärer Antikörper binden kann und so ein stärkeres Chemilumineszenzsignal erzeugt wird. Die Darstellung der freigesetzten Lumineszenz kann auf Chemilumineszenzfilmen mit anschließender Entwicklung dargestellt werden. Dabei erscheint das untersuchte Protein als schwarze Bande.

Als Detektionsreagenz wurde das Amersham™ Enhanced Chemiluminescence (ECL)™ Western Blotting Detection Reagent und dessen Prime Version verwendet. Das ECL Prime Reagenz wurde verwendet, wenn das Lumineszenzsignal bei Verwendung des ECL Reagenzes zu schwach war, da die Prime Version sensitiver ist. Das ECL Reagenz sowie auch seine Prime Version bestand aus zwei Lösungen A und B, welche im Verhältnis 1 : 1 gemischt wurden. Die mit Antikörpern inkubierte und gewaschene Membran wurde nun zwischen 2 Overhead Folien gelegt und mit 1 ml Reagenzlösung inkubiert. Nach der Entfernung des überschüssigen Reagenzes wurde ein Chemilumineszenzfilm für 1 s bis 15 min mit der Membran exponiert und anschließend in einer Dunkelkammer mit der Curix 60 AGFA Maschine entwickelt.

5.2.4.5 Strippen von Membranen

Um das erhaltene Signal des untersuchten Proteins zu normalisieren, wurde ein weiteres Protein, das in allen Zellen gleichermaßen exprimiert wird, untersucht. Dabei wurde bei Gesamtextrakten gegen GAPDH und bei Kernextrakten gegen HDAC2 normalisiert. Wurde die Phosphorylierung eines Proteins untersucht, so erfolgte die Normalisierung gegen das gleiche nicht phosphorylierte Gesamtprotein (siehe Tabelle 27). Zudem kann man mit einer Membran mehrere Targetproteine untersuchen. Dafür war es jedoch nötig, die bereits an die Membran gebundenen Antikörper zu entfernen, um eindeutig zuordenbare Signale zu erhalten. Dieser Vorgang wird als Strippen bezeichnet. Zum Strippen einer Membran gibt es verschiedene Vorgehensweisen, die unter sauren oder basischen Bedingungen erfolgen können oder in Anwesenheit von reduzierenden Substanzen. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Stripping-Puffer bei Raumtemperatur verwendet.

Unter Verwendung des Stripping-Puffer 1 wurde die Membran in einem 50 ml Röhrchen zweimal für 10 min mit 15 ml des Stripping-Puffers 1 inkubiert. Die Inkubation der Membran mit Stripping-Puffer und alle nachfolgenden Waschschriffe erfolgten auf einem Rollmischer unter ständiger Bewegung. Nach Entfernen des Stripping-Puffers wurde die Membran für 60 min alle 5 min mit 15 ml TBST gewaschen und anschließend mit 15 ml I-BlockTM-Lösung für 1 h blockiert. Anschließend wurde mit der Membran weiter verfahren wie in 5.2.4.3 beschrieben.

Stripping-Puffer 1 pH 2,2: 0,2 M Glycin
 3,5 mM SDS
 1 % (v/v) Tween 20

Wurde der Stripping-Puffer 2 verwendet, wurde die Membran als erstes für 5 min mit 15 ml TBST und anschließend für 5 min mit 15 ml Wasser gewaschen. Als nächstes wurde die Membran für 10 min mit Stripping-Puffer 2 inkubiert. Nach der Entfernung des Puffers wurde die Membran erneut mit 15 ml Wasser für 5 min gewaschen und anschließend für 1 h mit 15 ml I-BlockTM-Lösung blockiert. Alle weiteren Schritte erfolgten wie in 5.2.4.3 beschrieben.

Stripping-Puffer 2: 0,2 M NaOH

5.2.4.6 Aktivieren von Membranen

Membranen wurden nach der Detektion der Proteine möglichst luftdicht verschlossen aufbewahrt, um sie vor Austrocknung zu schützen. Falls eine Membran dennoch eintrocknete und sie für weitere Proteindetektion verwendet werden sollte, wurde sie mit Methanol für 2 min äquilibriert.

Anschließend wurde diese viermal mit Wasser gewaschen und mit 15 ml I-Block™-Lösung in einem 50 ml Röhrchen für 1 h blockiert. Alle weiteren Schritte erfolgten wie in 5.2.4.3 beschrieben.

5.2.5 SAPK/JNK-Aktivitäts-Assay

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe des SAPK/JNK Kinase Assay Kit (non-radioactive) von Cell Signaling untersucht, ob es in PM_{2.5} exponierten THP-1 Makrophagen zu einer Aktivierung der c-Jun-N-terminalen Kinase (JNK) kommt. Das Prinzip des Assays besteht darin, dass in einer Immunreaktion ein monoklonaler Antikörper, der selbst an Agarose-Kügelchen (Sephacel® Beads) gebunden ist, mit der phosphorylierten SAPK/JNK (engl.: stress-activated protein kinase/c-jun-N-terminal kinase) interagiert. Durch eine anschließende Präzipitation wird die JNK von den restlichen Proteinen eines Zellextraktes abgetrennt. Durch die nachfolgende Zugabe eines Kinasepuffers, ATP und des rekombinanten Proteins c-Jun kann die phosphorylierte JNK c-JUN phosphorylieren. Die Phosphorylierung von c-Jun ist dabei proportional zur Aktivierung der JNK und kann in einem nachfolgenden Western Blot detektiert werden.

Zur Untersuchung des Einflusses von PM_{2.5} auf die JNK-Aktivierung in THP-1 Makrophagen wurden THP-1 Zellen in einer 6-Wellplatte kultiviert (siehe Tabelle 24). Die Exposition der Zellen mit PM_{2.5} erfolgte in Hungermedium mit 1, 10, 50 und 100 mg/ml PM_{2.5} für 24 h (siehe Kapitel 5.2.1.7). Anschließend wurden, wie in 5.2.2.1 beschrieben, Gesamtextrakte der Zellen hergestellt und die Proteinkonzentration mit dem BCA-Assay (siehe Kapitel 5.2.3.1) bestimmt. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten, ebenso wie die Herstellung der Gesamtextrakte, bei 4 °C.

Für die Abtrennung der JNK aus den Gesamtextrakten wurden die Agarose-Kügelchen 1 : 1 mit Cell Lysis Buffer (1 ×) gemischt und 20 µl dieser Verdünnung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pro Probe vorgelegt. Für Untersuchungen mit THP-1 Makrophagen wurde nun das Volumen, das 200 µg Protein entsprach, in das 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend wurde das Volumen an Cell Lysis Buffer (1 ×) hinzugefügt, so dass ein Endvolumen von 200 µl erreicht wurde. Die Reaktionsgefäße wurden über Nacht bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert und anschließend für 30 s bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die phosphorylierte und damit aktivierte JNK ist nun durch eine Immunreaktion an die Agarose-Kügelchen gebunden. Im Überstand befinden sich die restlichen Proteine des Gesamtextraktes, welche abgesaugt wurden. Die Kügelchen wurden nun zweimal mit 500 µl Cell Lysis Buffer (1 ×) gewaschen und für 30 s bei 14.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Danach wurden die Kügelchen zweimal mit 500 µl Kinase Buffer (1 ×) gewaschen und für ebenfalls 30 s bei 14.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Kinase Buffer über den Kügelchen wurde abgesaugt und pro Reaktionsgefäß wurden 50 µl Kinase Buffer (1 ×), 1 µl ATP und 1 µl c-JUN

Fusion Protein hinzugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden nun für 20 min bei 30 °C und 400 rpm inkubiert. Anschließend wurde in jedes Reaktionsgefäß 25 µl SDS-Probenpuffer (5 ×) pipettiert. Die Proben wurden bis zur Verwendung für die anschließende Analyse mittels Western Blot (siehe Kapitel 5.2.4) bei -20 °C gelagert. Für die SDS-PAGE wurden je Probe 25 µl in eine Probentasche des Polyacrylamidgels pipettiert.

5.2.6 Caspase-3/7-Aktivitäts Assay

Zur Messung der Apoptose wurde in dieser Arbeit der Caspase-3/7-Aktivitäts Assay verwendet. Caspasen sind spezifische Cysteinproteasen, die Zielproteine an einer Peptidbindung C-Terminal von Aspartat schneiden und beim programmierten Zelltod, der Apoptose, eine wichtige Rolle spielen. Unter normalen nicht apoptotischen Bedingungen liegen Caspasen als inaktive Proform im Zytoplasma vor. Kommt es nun zur Apoptose, so wird durch bestimmte Effektorcaspasen die inaktive Proform geschnitten und die enzymatisch aktive Form freigesetzt.

Durch die Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität mittels eines spezifischen Substrats kann die Apoptose gemessen und quantifiziert werden. Hierfür wurde das Substrat DEVD mit der Erkennungs- und Schneidesequenz Asp-Glu-Val-Asp verwendet, welches an das Fluorophor 7-Amino-4-methyl-cumarin (AMC) gekoppelt ist. Sind die Caspasen-3 und -7 enzymatisch aktiv, schneiden sie nach der Erkennungssequenz und setzen das Fluorophor frei. Durch die nun messbare Fluoreszenz kann die Aktivität der Caspasen gemessen und quantifiziert werden, da diese zur Zunahme der Fluoreszenz proportional ist.

THP-1 Zellen wurden in 6-Wellplatten kultiviert (siehe Tabelle 24) und, wie in 5.2.1.7 beschrieben, für 16 h mit Feinstaub und gegebenenfalls mit Inhibitoren in Hungermedium exponiert. Danach wurde das Medium über den Zellen entfernt und diese mit 1 ml 4 °C kaltem PBS (1 ×) gewaschen. Die Zellen wurden in 1 ml 4 °C kaltem PBS (1 ×) abgeschabt und anschließend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation der Zellen für 5 min bei 14.000 rpm und 4 °C wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in 270 µl TOTEX Lysepuffer resuspendiert. Die vollständige Lyse der Zellen erfolgte durch fünf Frier-Tau-Zyklen. Dafür wurden die Proben für 5 min in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Wasserbad bei 37 °C wieder aufgetaut. Die Proteinextrakte wurden nun nochmals bei 14.000 rpm, 4 °C und 10 min zentrifugiert um Zellreste abzutrennen. Aus dem Überstand wurde die Proteinkonzentration mit dem Bradford-Assay (siehe Kapitel 5.2.3.2) bestimmt. Die Proben wurden direkt analysiert oder bis zur Untersuchung bei -20 °C gelagert.

In eine schwarze 96-Wellplatte wurden 90µl Assaypuffer pro Well vorgelegt und 10µl der Proteinextrakte zugegeben. Anschließend folgte zügig die Zugabe von 2µl Substratlösung (Endkonzentration 200µM). Gemessen wurde die Fluoreszenzzunahme über 30 min mit dem Fluorometer (FLUOstar OPTIMA; Extinktion 370 nm; Emission 450 nm).

Die Fluoreszenz des freigesetzten AMC's wurde als Funktion der Zeit dargestellt. Durch die Bildung einer linearen Regressionsgeraden durch alle Messpunkte konnte die Steigung (m) ermittelt werden, die ein Maß für die enzymatische Aktivität der Caspase 3 bzw. 7 ist. Die Steigung wurde nun mit der eingesetzten Proteinmenge (c) korreliert und die relative Fluoreszenz Unit (RFU) erhalten. Durch die Normierung der RFU gegen die Kontrolle konnte die relative RFU dargestellt werden.

$$RFU = \frac{m}{c}$$

TOTEX-Lysepuffer: 10 mM HEPES-KOH, pH 7,9
 350 mM NaCl
 1 % (v/v) Nonident NP-40
 1 mM MgCl₂
 0,5 mM EDTA
 0,5 mM EGTA
 20 % (v/v) Glycerin

Assaypuffer: 100 mM HEPES-KOH, pH 7,9
 2 mM DTT

Proteaseinhibitoren: 14 µg/ml Aprotinin
 5 mM DTT
 2,5 mM PMSF

5.2.7 MTT-Assay

Mit Hilfe des MTT-Assays wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Einfluss verschiedener Substanzen auf die Zellviabilität untersucht.^{456,457} Die Farbreaktion, die dem Assay zu Grunde liegt, kann dabei nur von lebenden stoffwechselaktiven Zellen durchgeführt werden, da zum Ablauf der Reaktion zelleigene Enzyme und Kofaktoren benötigt werden. Hierbei wird das gelbe wasserlösliche MTT (3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) durch eine Succinat-abhängige Dehydrogenase im Endoplasmatischen Retikulum (ER) oder in den Mitochondrien unter

Beteiligung der Kofaktoren NADH bzw. NADPH zum violetten wasserunlöslichen Formazan reduziert (siehe Abbildung 30). Dabei korreliert die metabolische Aktivität mit der Zellviabilität. Zu beachten ist jedoch, dass eine eingeschränkte metabolische Aktivität nicht zwangsläufig ein Zelltod zu Grunde liegt. Nachdem die wasserunlöslichen Formazankristalle in DMSO gelöst wurden, konnte die Absorption bei 595 nm bestimmt werden. Das Maß der Absorption ist proportional zur metabolischen Aktivität der Zellen.

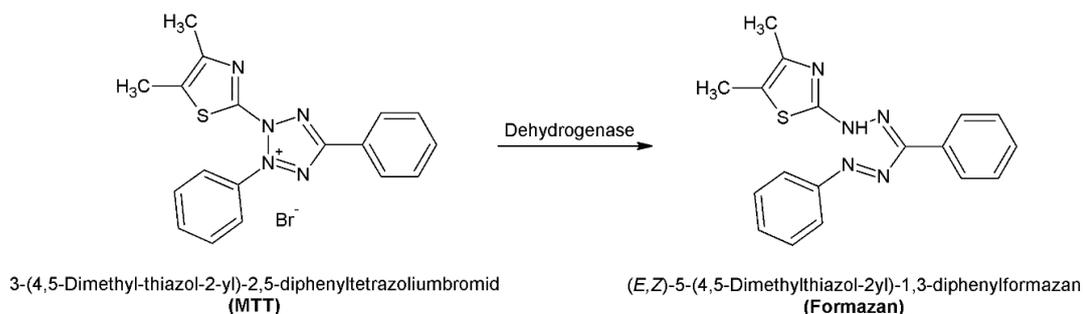


Abbildung 30: Reaktion des MTT-Assays. Gelbes wasserlösliches MTT (3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) wird in den Mitochondrien und im Endoplasmatischen Retikulum (ER) durch Succinat-abhängige Dehydrogenasen unter der Beteiligung von NADH bzw. NADPH als Kofaktoren zu Formazan reduziert.

Zur Bestimmung des Einflusses von PM_{2.5} auf die Zellviabilität von THP-1 Makrophagen wurden THP-1-Zellen in einer 96-Wellplatte kultiviert (siehe Tabelle 24) und für 24 h mit 1, 10, 50 und 100 µg/ml PM_{2.5} in Hungermedium exponiert. Von allen untersuchten Bedingungen wurden Triplikate erstellt. Nach erfolgter Inkubationszeit wurden direkt ins Medium 25 µl pro Well der MTT-Lösung (5 mg/ml) pipettiert und die Zellen für weitere 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand über den Zellen abgesaugt und die entstandenen violetten Formazankristalle in 100 µl DMSO gelöst. Die Platte wurde bei Raumtemperatur für 5 min bei 450 rpm geschüttelt um sicherzustellen, dass alle Kristalle gelöst wurden. Die Messung der Absorption erfolgte bei 595 nm im Microplate Reader iMark™. Bei der Berechnung der Zellviabilität wurden zunächst Mittelwerte von den drei Absorptionswerten eines Triplikates gebildet und anschließend die Absorption der exponierten Zellen in Bezug zur Absorption der unbehandelten Kontrollzellen gestellt und diese in Prozent angegeben.

$$\text{Zellviabilität [\%]} = \frac{\text{Absorption (Probe)}}{\text{Absorption (Kontrolle)}} \times 100$$

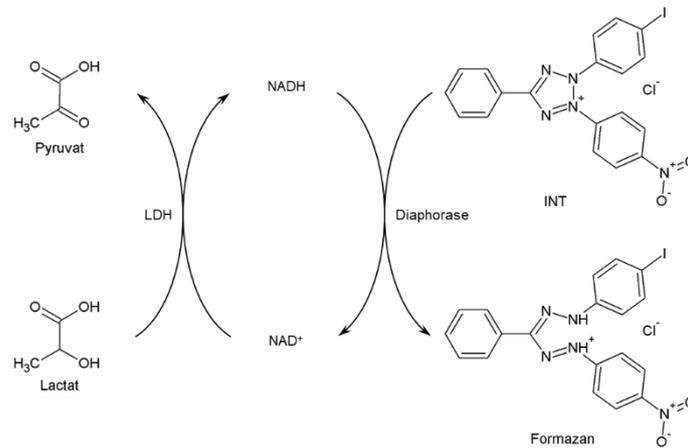


Abbildung 31: Prinzip des LDH-Assays. Die Bestimmung der LDH-Aktivität erfolgt in 2 Schritten durch eine Redoxreaktion. Im ersten Schritt katalysiert die LDH die Oxidation von Lactat zu Pyruvat, wobei NAD⁺ zu NADH reduziert wird. Als nächstes kann nun durch Oxidation von NADH zu NAD⁺ das gelbe wasserlösliche INT zu Formazan reduziert werden. Der zweite Schritt wird durch den Katalysator Diaphorase katalysiert.

Zur Untersuchung der zytotoxischen Effekte von PM_{2.5} wurden THP-1 Zellen in einer 6-Wellplatte kultiviert (siehe Tabelle 24) und mit 1, 10, 50 und 100 µg/ml PM_{2.5} in Hungermedium exponiert. Das Endvolumen nach Partikelexposition betrug 3 ml. Nach Exposition der Zellen mit PM_{2.5} für 24 h wurde vom Überstand jeder Probe und von unbehandelten Kontrollzellen 200 µl in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Um den Gesamtgehalt an LDH in einem Well zu bestimmen wurden die Zellen eines Wells mit einer zehn prozentigen Lösung von Triton-X 100 (2% Endkonzentration) vollständig lysiert und 1,3 ml davon in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Um alle Zellreste zu entfernen wurden die lysierten Zellen für 5 min bei 1.300 rpm zentrifugiert. Zusätzlich dazu wurden 200 µl Hungermedium ebenfalls in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt um vom Medium eine Hintergrundmessung durchzuführen. Von allen Proben wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. In eine 96-Wellplatte mit halber Wellgröße wurden pro Well 30 µl PBS vorgelegt. Von jeder Probe sowie den unbehandelten Kontrollzellen, den vollständig lysierten Zellen und dem Hungermedium wurden pro Well 20 µl der entsprechenden Proben dazu pipettiert. Anschließend wurden pro Well 50 µl der Reagenzlösung zugegeben und die Platte für maximal 10 min unter Lichtausschluss inkubiert. Danach wurde die Absorption bei 490 nm gemessen und von den Absorptionswerten eines Duplikates der Mittelwert gebildet. Bei der Berechnung wurde die Menge der freigesetzten LDH in Prozent angegeben und in Bezug zur Menge der lysierten Zellen gestellt.

$$\text{LDH-Freisetzung [\%]} = \frac{\text{Absorption (Probe)}}{\text{Absorption (lysierte Zellen)}} \times 100$$

Die Reagenzlösung wurde unmittelbar vor Gebrauch so weit wie möglich unter Lichtausschluss hergestellt und kurzfristig gelagert.

Reagenzlösung: 45 Teile Reagenz 2
 1 Teil Reagenz 1

5.2.9 Bestimmung des zellulären GSH-Gehalts

Eines der wichtigsten Reduktionsmittel, das Zellen zur Detoxifizierung von z. B. Radikalen oder Peroxiden zur Verfügung steht, ist das Tripeptid Glutathion (GSH). Das Thiol besteht aus den drei Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin. Um die mögliche Induktion von oxidativem Stress durch Feinstaubexposition zu untersuchen, wurde der GSH-Gehalt in THP-1 Makrophagen bestimmt. Dafür wurde das Glutathione (GSH/GSSG/Total) Fluorometric Assay Kit der Firma BioVision nach Herstellerangaben verwendet. Das Kit ermöglicht die parallele Bestimmung von GSH, GSSG (oxidierte Form von GSH) und des gesamten GSH-Gehaltes (Summe aus GSH und GSSG) einer Probe. Der Assay basiert dabei auf der Reaktion von GSH mit der stark fluoreszierenden Substanz *o*-Phthalaldehyd (OPA).

THP-1 Zellen wurden in einer 6-Wellplatte kultiviert (siehe Tabelle 24) und für 24 h mit 100 µg/ml PM_{2.5} in Hungermedium exponiert (siehe Kapitel 5.2.1.7) bzw. wurden Kontrollzellen ausschließlich das gleiche Volumen an Medium zugegeben. Alle weiteren Schritte erfolgten nun bei 4 °C. Nach erfolgter Expositionszeit wurde das Medium über den Zellen entfernt und die Zellen mit PBS (1 ×) gewaschen. Die Zellen wurden in 1 ml PBS (1 ×) abgeschabt, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 14.000 rpm und 4 °C für 5 min abzentrifugiert. Anschließend wurde das PBS über dem Zellpellet abgesaugt und das Pellet in 100 µl Glutathion Assay Buffer resuspendiert. Die vollständige Lyse der Zellen erfolgte durch fünf Frier-Tau-Zyklen. In der Zwischenzeit wurden in weitere 1,5 ml Reaktionsgefäße 20 µl Perchlorsäure vorgelegt. Zur Perchlorsäure wurden 60 µl der Proben dazu pipettiert. Die Proben wurden einige Sekunden gevortext und dann für 5 min auf Eis inkubiert. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Analyse bei Bedarf bei -20 °C gelagert. Für das weitere Vorgehen wurden die Proben eventuell auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 40 µl der Proben mit 20 µl KOH (6N) neutralisiert, für 5 min auf Eis inkubiert und für 2 min bei 14.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. In eine schwarze 96-Wellplatte wurden je Well 10 µl der Proben pipettiert, um den Gehalt an GSH und GSSG sowie den Gesamtgehalt an GSH zu bestimmen.

Bestimmung des gesamten GSH-Gehaltes

Der gesamte GSH-Gehalt einer Probe besteht aus der Summe von GSH und seiner oxidierten Form GSSG, was durch die Zugabe eines reduzierenden Reagenzes zu zwei Molekülen GSH reduziert werden kann. Dafür wurde das Probenvolumen (10 µl) durch Zugabe von 70 µl Assay Buffer auf 80 µl erhöht und nach der Zugabe von 10 µl Reducing Agent Mix die Platte für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden zu jeder Probe pro Well 10 µl OPA gegeben. Die Fluoreszenz wurde mit dem Infinite® 200 PRO microplate plate reader bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm und einer Emissionswellenlänge von 420 nm gemessen.

Zum Schluss wurde die Proteinkonzentration der Proben mit dem Pierce™ Proteinassay (siehe Kapitel 5.2.3.1) bestimmt. Die erhaltenen Fluoreszenzwerte wurden auf die Proteinkonzentration bezogen und gegen die Kontrollzellen normiert.

Bestimmung des GSSG-Gehalts

Um den GSSG-Gehalt einer Probe zu bestimmen, muss zunächst das vorhandene GSH mittels eines Quenchers entfernt werden. Dafür wurde das Probenvolumen mit 60 µl Assay Buffer auf 70 µl erhöht. Nach der Zugabe von 10 µl GSH Quencher wurde die Platte für 10 min bei RT inkubiert. Danach wurden 10 µl Reducing Agent Mix zugegeben, das neben der Reduktion von GSSG zu GSH den überschüssigen Quencher zerstört. Zu dem entstandenen GSH wurde OPA hinzugefügt und das Reaktionsprodukt, wie oben angegeben, fluorometrisch vermessen und nach Bestimmung der Proteinkonzentration der GSSG-Gehalt ermittelt.

Bestimmung des GSH-Gehaltes

Um den Gehalt an frei vorliegendem GSH zu bestimmen, wurde zu der 10 µl Probe pro Well 80 µl Assay Buffer und anschließend direkt 10 µl OPA gegeben. Die weiteren Schritte erfolgten, wie oben beschrieben.

5.2.10 ARE Luciferase Assay

Um zu untersuchen, ob eine Feinstaubexposition von THP-1 Makrophagen den Transkriptionsfaktors Nrf-2 aktiviert, wurde ein ARE Luciferase Assay durchgeführt. Dafür wurden die Zellen zunächst mit dem pGL4.37[luc2P/ARE/Hygro] Vektor von Promega transfiziert. Zur Transfektion der Zellen wurde das Amaxa® Cell Line Nucleofector® Kit V For THP-1 der Firma Lonza verwendet. Der Vektor enthält vier Kopien des antioxidativen Response-Elementes (ARE) und das synthetische Gen *luc2P*, das für die Firefly Luciferase codiert. Das Gen enthält humane Codons und ist für eine starke Genexpression optimiert. Liegt in den transfizierten Zellen nach PM_{2.5} Exposition Nrf-2 in aktiver Form vor, so kann der Transkriptionsfaktor an die ARE-Einheit binden

und so die Expression des *luc2P* Gens initiieren. Im Zytosol kann dann anschließend das exprimierte Gen in die Firefly Luciferase translatiert werden. Nach der Lyse der Zellen befindet sich die Luciferase im Zelllysate und kann in einem nachfolgenden Assay Lumineszenz erzeugen. Dafür wurde das Luciferase Assay System der Firma Promega verwendet. Die Erzeugung der Lumineszenz erfolgt durch einen Elektronenübergang bei der Oxidation von Luciferin zu Oxyluciferin, katalysiert durch die Firefly Luciferase unter der Beteiligung von ATP und Mg^{2+} (siehe Abbildung 32).

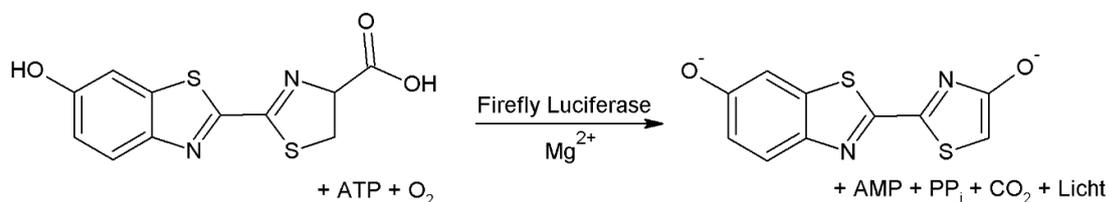


Abbildung 32: Biolumineszenzreaktion katalysiert durch die Firefly Luciferase. Luciferin wird durch die Firefly Luciferase unter Verwendung von ATP und Mg^{2+} zu Oxyluciferin oxidiert. Dabei kommt es zu einem Elektronenübergang und infolge dessen zu einer Lumineszenz.

Für die Untersuchung der transkriptionellen Aktivität von Nrf-2 wurden 4 Millionen Zellen in einer 175 cm² Zellkulturflasche mit 50 ng/ml PMA für 48 h zu Makrophagen differenziert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 15 ml StemPro[®] Accutase[®] Cell Dissociation Reagent für 40 min vom Flaschenboden gelöst.⁴⁵⁸ Die Zellen wurden zügig in ein 50 ml Röhrchen überführt und bei 4 °C und 1.200 rpm für 5 min zentrifugiert. Die Accutase[®] wurde so weit wie möglich entfernt und das Zellpellet in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Nachdem die Zellkonzentration, wie in Kapitel 5.2.1.3 beschrieben, bestimmt wurde, wurden eine Million THP-1 Makrophagen in 15 ml Röhrchen überführt und erneut für 5 min bei 2.500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Medium über dem Zellpellet wurde möglichst vollständig entfernt. Es folgte dann die Transfektion der Zellen mit dem pGL4.37[luc2P/ARE/Hygro] Vektor unter Verwendung des Amaxa[®] Cell Line Nucleofector[®] Kit V For THP-1. Dafür wurden die Zellen in 100 µl Nucleofector[®] Lösung resuspendiert. Der Zellsuspension wurden zügig 0,5 µg des Vektors zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde homogenisiert und in die im Kit enthaltene Küvette pipettiert. Es wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen vorhanden waren. Die Elektroporation erfolgte mit dem Nucleofector[®] II unter Verwendung des Programms U-001 (hohe Viabilität). Zu der Zellsuspension wurden zügig 500 µl frisches Kulturmedium gegeben und mit der im Kit enthaltenen Plastikpipette aufgenommen. Die Zellsuspension wurde vorsichtig in ein Well einer 12-Wellplatte, das bereits 1 ml Kulturmedium enthielt, getropft. Die Zellen wurden nun für 4 h bei 37 C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultiviert. So hatten die gestressten Zellen die Möglichkeit sich zu regenerieren und am Wellboden anzuhaften. Anschließend wurden die Zellen direkt für 12 h mit 100 µg/ml PM_{2,5} exponiert. Die Exposition der Zellen erfolgte in 2,5 ml Hungermedium.

Die weiteren Schritte erfolgten unter Verwendung des Luciferase Assay Systems. Dafür wurde zunächst das Luciferase Assay Reagenz hergestellt, indem das Luciferase Assay Substrat durch die Zugabe des Luciferase Assay Puffers möglichst unter Lichtausschluss gelöst wurde. Das Reagenz wurde bei -20°C gelagert. Des Weiteren wurde das Luciferase Cell Culture Lysis $5 \times$ Reagenz $1:5$ mit Aqua purificata verdünnt. Alle folgenden Schritte erfolgten bei Raumtemperaturen. Das Medium über den Zellen wurde abgesaugt und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. Nach der Zugabe von $200\mu\text{l}$ Luciferase Cell Culture Lysis $1 \times$ Reagenz wurden die Zellen abgeschabt und in ein $1,5\text{ ml}$ Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden bei 14.000 rpm für 5 min zentrifugiert und das Lysat in ein neues $1,5\text{ ml}$ Reaktionsgefäß überführt. In eine weiße 96-Wellplatte wurden pro Well $70\mu\text{l}$ des Probenlysats vorgelegt. Die Zugabe des Luciferase-Reagenzes ($100\mu\text{l}$ je Well) erfolgte direkt im Centro LB 960 Mikroplatten Luminometer. Die erzeugte Lumineszenz wurde dann mittels des rauscharmen Photomultipliers im Photon-Counting-Modus sofort für $0,5\text{ s}$ gemessen. Zum Schluss wurde mit dem BCA-Assay die Proteinkonzentration der Proben bestimmt (siehe Kapitel 5.2.3.1). Die erhaltenen Messwerte der Lumineszenz, wurden gegen die eingesetzte Proteinmenge normiert und bezogen auf unbehandelte Kontrollzellen als fold change dargestellt.

5.2.11 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine geeignete Methode um bestimmte Zellstrukturen sichtbar zu machen. Dafür werden die untersuchten Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen inkubiert, die anschließend in den zu untersuchenden Zellstrukturen akkumulieren. Durch die Einstrahlung von Fluoreszenzlicht verschiedener Wellenlängen kommt es zur Emission von Licht einer anderen höheren Wellenlänge. Die emittierte Fluoreszenz kann unter einem Fluoreszenzmikroskop beobachtet und mit einer CCD-Kamera aufgenommen werden. Für diese Methode eignen sich sowohl fixierte Präparate als auch lebende Zellen (Live Cell Imaging). In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich lebende Zellen mikroskopiert. Es ist darauf zu achten, dass alle Arbeiten möglichst lichtgeschützt erfolgen.

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde im Rahmen dieser Arbeit verwendet, um die Einflüsse einer Feinstaubexposition auf Mitochondrien von THP-1 Makrophagen zu untersuchen. Dafür wurden drei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe von Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific verwendet, die sich in ihren Anregungs- und Emissionswellenlängen unterscheiden (siehe Tabelle 29). Die zellpermeablen MitoTracker® gelangen über passive Diffusion durch die Zellmembran in die Zelle und sind in der Lage in aktiven Mitochondrien zu akkumulieren. Die Akkumulation der MitoTracker® ist abhängig vom Membranpotential der Mitochondrien. Der auf einer Rosamin-Struktur basierende MitoTracker® Red CMXRos liegt bereits in oxidiertem fluoreszierender Form vor

und kann durch seine thiolreaktive Chlormethylgruppe Konjugate mit Peptiden oder Proteinen in den Mitochondrien bilden. Der Farbstoff wird so besser in den Mitochondrien fixiert (siehe Abbildung 33).

Tabelle 29: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe zum Anfärben von Mitochondrien.

Fluoreszenzfarbstoff	Anregungs- wellenlänge [nm]	Emissionswellen- länge [nm]	Stammkonzentration [µM]	Endkonzentration [nM]
MitoTracker® Green FM	490	516	50	150

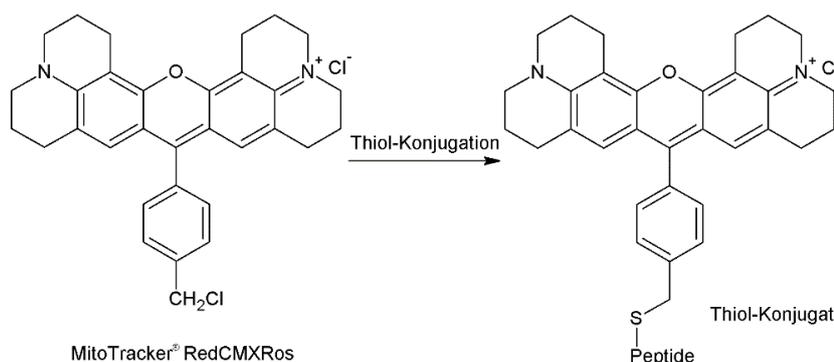


Abbildung 33: Reaktion des MitoTrackers® mit aktiven Mitochondrien. Die Chlormethylgruppe des Fluoreszenzfarbstoffes reagiert mit freien Thiolgruppen von Peptiden oder Proteinen innerhalb der Mitochondrien zu fixierbaren Konjugaten.

Für die Durchführung wurden THP-1 Zellen in einer 24-Wellplatte kultiviert (siehe Tabelle 24) und mit 100 µg/ml PM_{2.5} für 24h in Hungermedium exponiert (siehe Kapitel 5.2.1.6 und 5.2.1.7). Nach erfolgter Expositionszeit wurden die Zellen direkt mit den entsprechenden MitoTrackern® für 45 min bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit im Inkubator inkubiert. Anschließend wurden die lebenden Zellen direkt mit dem Axiovert Fluoreszenzmikroskop bei den entsprechenden Wellenlängen (siehe Tabelle 29) mikroskopiert.

5.2.12 Transmissionselektronenmikroskopie – TEM

Um die Effekte von PM_{2.5} nach kurzzeitiger Exposition auf THP-1 Makrophagen zu untersuchen, wurden von Dr. Maximilian Seidel (Institut für Klinische Pathologie, Freiburg) TEM-Aufnahmen durchgeführt. Dafür wurden zunächst in die benötigten Wells einer 6-Wellplatte pro Well 3 ml Kulturmedium mit 50 ng/ml PMA vorgelegt und anschließend 6-Well-Zellkultur-Inserts in die vorbereiteten Wells gegeben. Der Boden der Inserts besteht aus einer durchsichtigen PET-Membran mit einer Porengröße von 3 µm und einer Fläche von 4,2 cm². Auf jedes der Inserts wurden nun 0,75 Millionen THP-1 Zellen mit 50 ng/ml PMA in einem Endvolumen von 2 ml ausplattiert. Nach

dem die Zellen für 48 h zu Makrophagen differenzierten, wurden diese über Nacht auf Hungermedium umgestellt (siehe Kapitel 5.2.1.6). Anschließend wurden die Zellen für 24 h und sieben Tage mit 100 µg/ml PM_{2.5} exponiert (siehe Kapitel 5.2.1.7). Nach abgeschlossener Exposition wurde das Medium entfernt und ein Viertel der Insertmembran vorsichtig vom Insert gelöst. Die Membran wurde in einer drei prozentigen Glutaraldehydlösung bei 4 °C gelagert. Die weiteren Präparationsschritte, wie die Dehydratisierung, das Einbetten in Epoxidharz, die Herstellung von sehr dünnen Schnitten (80 nm), die Einbettung in Platingitter sowie die Kontrastierung mit Bleizitrat wurden am Institut für Klinische Pathologie, Freiburg durchgeführt. Auch die Aufnahmen mit der MORADA-Kamera (Olympus Soft Imaging System, Münster) an einem Transmissionselektronenmikroskop (FEI Thermo Fisher Scientific, München) mit angegebener Vergrößerung wurden am Institut für Klinische Pathologie, Freiburg hergestellt.

5.2.13 Genexpressionsanalysen

Für die Untersuchung der Genexpression bestimmter Gene wurde die gesamte mRNA von Zellen isoliert und anschließend in cDNA umgeschrieben. Das Ausmaß der Genexpression wurde dann mittels quantitativer Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) im LightCycler® 480 der Firma Roche bestimmt. Da die mRNA besonders sensitiv für Degradationsprozesse durch die ubiquitär vorkommende RNase ist, wurde darauf geachtet, dass alle Arbeitsschritte unter RNase freien Bedingungen und mit RNase freiem Material durchgeführt wurden. Dafür wurde der Arbeitsplatz mit 70 % Ethanol desinfiziert und stets frische und saubere Handschuhe verwendet.

5.2.13.1 RNA-Isolation

Zur Untersuchung des Einflusses von PM_{2.5} auf die Genexpression bestimmter Gene wurde zunächst von THP-1 Makrophagen und langzeitexponierten BEAS-2B die gesamte mRNA isoliert. Die Isolation der mRNA erfolgte mit dem RNeasy® Plus Mini Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben. Dafür wurden 1,5 Millionen THP-1 Zellen pro Well einer 6-Wellplatte ausplattiert und für 48 h mit 50 ng/ml PMA zu Makrophagen differenziert. Anschließend wurden die Zellen über Nacht auf Hungermedium umgestellt und dann mit 100 µl PM_{2.5} für 16, 24 und 30 h exponiert. Von PM_{2.5} langzeitexponierten BEAS-2B wurden 0,1 Millionen Zellen pro Well einer 6-Wellplatte ausplattiert. Am nächsten Tag wurde das Medium der Zellen erneuert und die Zellen direkt mit 100 µg/ml PM_{2.5} für 48 h in 5 % FCS-haltigen Medium exponiert (siehe Kapitel 5.2.1.6 und 5.2.1.7). Bei Verwendung von Inhibitoren wurden diese eine Stunde vor PM_{2.5} Zugabe zu den Zellen gegeben. Zu Kontrollzellen wurde ausschließlich das gleiche Volumen an Medium gegeben.

Nach erfolgter Exposition der Zellen mit PM_{2,5} wurde das Medium über den Zellen abgesaugt und diese mit 1 ml kaltem PBS (1 ×) gewaschen um vorhandene Medium-Reste vollständig zu entfernen. Nach vollständiger Entfernung des PBS wurden die Zellen in 350 µl RLT-Puffer, der 1 % β-Mercaptoethanol enthielt, mit einem Zellschaber abgeschabt. Die Proben wurden in ein RNase freies 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Um eine vollständige Lyse der Zellen zu erreichen wurden fünf Frier-Tau-Zyklen durchgeführt. Der homogenisierte Zellextrakt wurde auf eine genomische DNA (gDNA) Eliminator Säule gegeben und für 30 s bei 11.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Eluat, das nun gDNA frei war und die mRNA enthielt, wurde mit 350 µl 70 prozentigen Ethanol versetzt und die erhaltene Probe (700 µl) auf eine RNeasy Säule gegeben und für 30 s bei 11.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen, da die mRNA an die Membran der Säule gebunden war. Es folgte ein Waschschriff mit 700 µl RW1 Puffer und zwei Waschschriffe mit 500 µl RPE Puffer. Nach den einzelnen Waschschriffen wurde für 30 s bei 11.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert und jeweils das Eluat verworfen. Nach dem letzten Waschschriff wurde anstelle von 30 s für 2 min zentrifugiert um den Puffer möglichst vollständig zu entfernen. Um auch die letzten Pufferrückstände zu beseitigen wurde die Säule auf ein neues 2 ml Auffanggefäß gesteckt und nochmals für 1 min bei Raumtemperatur und 14.000 rpm zentrifugiert. Das Eluieren der mRNA erfolgte anschließend mit 40 µl RNase freiem Wasser in ein frisches RNase freies 1,5 ml Reaktionsgefäß. Dafür wurden auf die Säule 40 µl Wasser gegeben und für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 4 °C und 11.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Die eluierte mRNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert.

5.2.13.2 RNA-Gehaltsbestimmung

Die Konzentration der isolierten mRNA wurde mit dem NanoDrop™ 2000 der Firma Thermo Fisher Scientific bestimmt. Dafür wurde die Absorption von 2 µl Probe bei 260 nm und 280 nm gemessen. Die mRNA-Konzentration konnte über folgende Gleichung bestimmt werden, da eine Absorptionseinheit 40 ng RNA pro µl entsprechen.

$$c_{RNA} \left[\frac{ng}{\mu l} \right] = A_{260} \times 40 \left[\frac{ng}{\mu l} \right]$$

Das Verhältnis der Absorptionen der Wellenlängen 260 nm zu 280 nm gibt Auskunft über die Reinheit der Proben. Ein Verhältnis von 2,0 bis 2,1 wurde dabei als rein betrachtet. Proben, die außerhalb dieses Bereichs lagen, wiesen Verunreinigungen, wie Proteine und Phenole, auf und wurden deshalb für weitere Untersuchungen nicht verwendet.

5.2.13.3 cDNA-Generierung

Zum Umschreiben der isolierten mRNA in die komplementäre DNA (cDNA) wurde das QuantiTect® Reverse Transcription Kit von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 4 °C. Die Umschreibung der mRNA in cDNA erfolgte mit Hilfe der RNA-abhängigen DNA-Polymerase (reverse Transkriptase, RT).

In ein PCR-Reaktionsgefäß wurde das Volumen an isolierter mRNA vorgelegt, das 1 µg mRNA entsprach, und mit RNase freiem Wasser auf ein Volumen von 12 µl gebracht. Um mögliche Verunreinigungen durch gDNA zu beseitigen, wurden zu jeder Probe 2 µl gDNA wipeout Puffer pipettiert. Die Proben wurden für 2 min bei 42 °C inkubiert und danach für 3 min auf 95 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proben auf 4 °C herunter gekühlt. Zu jeder Probe wurden nun 6 µl RT-Mastermix gegeben und die Proben für 15 min bei 42 °C inkubiert. In dieser Zeit wurde die mRNA durch die RT in die komplementäre DNA umgeschrieben. Durch die Exonuklease-Aktivität der RT wird gleichzeitig das mRNA-Template zerstört. Um nach erfolgter Umschreibung in cDNA die RT zu inaktivieren, wurden die Proben für 3 min auf 95 °C erhitzt und anschließend auf 4 °C heruntergekühlt. Die Inkubation der Proben nach dem beschriebenen Temperaturprogramm erfolgte im Mastercycler® EP Gradient. Zum Schluss wurde die cDNA mit 80 µl Nuklease freiem Wasser verdünnt, so dass ein Gesamtvolumen von 100 µl vorlag.

RT-Mastermix:	4 µl Quantiscript RT Puffer (5x)
	1 µl RT Primer Mix
	1 µl Quantiscript Reverse-Transkriptase

5.2.13.4 Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (engl.: quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) ist eine molekularbiologische Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren nach dem Prinzip der normalen PCR. Im Unterschied zur normalen PCR wurde die amplifizierte DNA *in vitro* in Echtzeit gemessen. Für die qRT-PCR werden sequenzspezifische Primer, eine temperaturunempfindliche DNA-Polymerase, desoxy-Nukleotidtriphosphate (dNTPs), MgCl₂ und Fluoreszenzfarbstoffe benötigt. Mit den Fluoreszenzfarbstoffen kann die fortlaufende Reaktion in Echtzeit aufgezeichnet werden, da das freigesetzte Fluoreszenzsignal zum entstehenden PCR-Produkt proportional ist. Da jedoch keine Rückschlüsse auf die ursprünglich vorhandene Menge an DNA in der Probe gezogen werden können, liefert die Methode nur relative Werte.

Zur Generierung des Fluoreszenzsignals gibt es verschiedene Möglichkeiten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur Hydrolysesonden (TaqMan®-Sonden, Probes) verwendet. Diese Sonde besitzt

eine spezifische Nukleotidsequenz für den zu amplifizierenden Bereich, am 5'-Ende einen Reporter Fluoreszenzfarbstoff (HEX oder 6-FAM) und am 3'-Ende einen Quencher (TAMRA). Damit bilden die Markierungen HEX/TAMRA bzw. 6-FAM/TAMRA ein Reporter/Quencher-System. Im Ausgangszustand befinden sich Reporter und Quencher in direkter räumlicher Nähe zueinander, was zur Aufhebung des freigesetzten Fluoreszenzsignals führt. Dies geschieht, weil die Anregungswellenlänge des Quenchers mit der Emissionswellenlänge des Reporters übereinstimmt. Die zur Amplifizierung verwendete Taq-Polymerase weist eine 5'-3' Exonuclease-Aktivität auf und ist so in der Lage die an das Zielgen gebundene TaqMan[®]-Sonde hydrolytisch zu spalten. Daraus ergibt sich eine räumliche Trennung von Reporter und Quencher, was zur Emission eines Fluoreszenzsignals führt (siehe Abbildung 34). Dieses kann mit einem geeigneten Gerät, in der vorliegenden Arbeit mit dem LightCycler[®] 480 gemessen werden. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt nach jedem Zyklus.

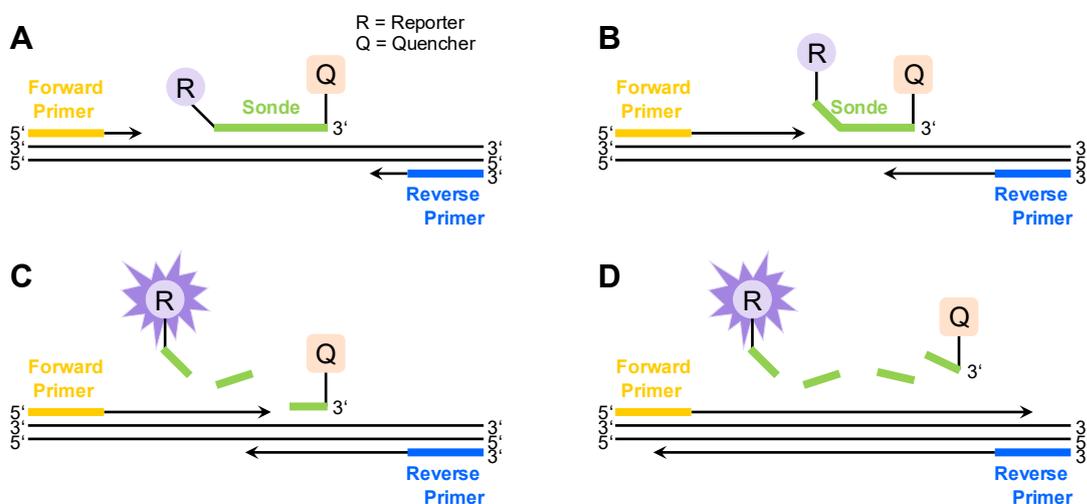


Abbildung 34: Prinzip der TaqMan[®]-Sonden in der qRT-PCR. (A) Primer und Sonde lagern sich an die entsprechende spezifische Nukleotidsequenz der cDNA an. Am 5'-Ende der Sonde befindet sich der Reporter und am 3'-Ende der Quencher. (B) Elongation des neu gebildeten DNA-Strangs und Beginn der Sondenverdrängung durch die DNA-Polymerase. (C) Durch die 5'-3'-Exonucleaseaktivität der DNA-Polymerase kommt es zum Abbau der TaqMan[®]-Sonde und zur räumlichen Entfernung des Reporters vom Quencher. (D) Vollständige Synthese des PCR-Produktes und komplett hydrolytische Spaltung der Sonde. Es kommt nun zur Emission des Fluoreszenzsignals. Abbildung nach Jacob 2003.⁴⁵⁹

Um Abweichungen der mRNA-Ausgangsmenge auszugleichen wurde eine endogene Amplifikationskontrolle, ein Referenzgen, parallel zur Amplifikation des Zielgenes ebenfalls amplifiziert und vermessen. Das Referenzgen sollte dabei stets konstant in den Zellen exprimiert werden, d. h. die Menge des exprimierten Genes sollte sich durch äußere Einflüsse und Stimuli nicht verändern. Im Rahmen dieser Arbeit wurde als Referenzgen die 18S ribosomale RNA (18S rRNA) verwendet, da dieses Gen ein etabliertes konstitutiv exprimiertes Gen ist.

Primer und Sonden Design

Die Sequenz der Primer und Sonden wurde spezifisch für ein bestimmtes Gen entworfen. Sie wurde in der Nukleotid Datenbank des National Centers for Biotechnology Information (NCBI) gesucht und anschließend wurden die Primer und Sonden online mit dem OligoArchitect™ von Sigma Aldrich geplant. Das Programm überprüft dabei automatisch, ob die ausgewählte Sequenz für die PCR geeignet ist. Dabei wird z. B. die Schmelztemperatur, die Länge, der GC-Gehalt oder die Dimer- und Haarnadelbildung überprüft. Die vorgeschlagenen Primer und Sonden wurden zusätzlich mit der UCSC In-Silico PCR auf Richtigkeit überprüft. Die Sonden wurden zusätzlich am 5'- und 3'-Ende modifiziert. Die Sonde für das Referenzgen (*RNA18S5*) wurde am 5'-Ende mit HEX Reporter versehen und die Sonden gegen das Zielgen mit dem 6-FAM Reporter. Das 3'-Ende wurde immer mit dem TAMRA Quencher modifiziert. Die entworfenen Primer und Sonden wurden anschließend von Sigma Aldrich synthetisiert. Die gefriergetrockneten Primer und Sonden wurden mit Nuklease freiem Wasser gelöst und auf 10 µM (Primer) und 5 µM (Sonde) verdünnt. Die gelösten und verdünnten Primer wurden bei -20 °C gelagert. Die Sequenzen der verwendeten Primer und Sonden sind in Tabelle 30 aufgeführt.

Tabelle 30: Nukleotidsequenzen für die untersuchten Gene mit dem LightCycler® 480.

Zielgen	Protein-name	Referenz-gen (NCBI)	Typ	Nukleotidsequenz (5'-3')
<i>CYP1A1</i>	CYP1A1	NM_000499.4	Forward Primer	GAGCACTGTCAGGAGAAG
			Reverse Primer	AGGTCCAAGACGATGTAA
			Sonde	ATGAGAACGCCAATGTCCAGC
<i>EREG</i>	Epiregulin	NM_001432.2	Forward Primer	TCAGCTATAATTCTGTTATATGAG
			Reverse Primer	CTGGTAGATGAGTGACTAG
			Sonde	CCTATGCCAACTCACGACTCCT
<i>GREM1</i>	Gremlin 1	NM_001191322.1	Forward Primer	CATGGAAGTCCCTTTTAAC
			Reverse Primer	TGGCAAACAAGAGATTAG
			Sonde	CCTCCTCCTCCTCACAATCCATC
<i>GSR</i>	Glutathion-Reduktase	NM_000637.3	Forward Primer	TTGGCGTGTTATTAAGGA
			Reverse Primer	CCACTGACCTCTATTGTG
			Sonde	CTATGTGAGCCGCCTGAATGC
<i>HMOX1</i>	HO-1	NM_002133.2	Forward Primer	CAGCTCTTTGAGGAGTTG
			Reverse Primer	GCAGAATCTTGCACTTTG
			Sonde	TGACACCAAGGACCAGAGCC
<i>IL1B</i>	IL-1β	NM_000576	Forward Primer	GTACGATCACTGAACTGC
			Reverse Primer	GTGGAGAGCTTTTCAGTTC
			Sonde	ATGGACCAGACATCACCAAGC

Zielgen	Protein-name	Referenz-gen (NCBI)	Typ	Nukleotidsequenz (5'-3')
<i>IL6</i>	IL-6	NM_001318095.1	Forward Primer	AGAAAACAACCTGAACCTT
			Reverse Primer	TGATGATTTTCACCAGGC
			Sonde	AGTCTCCTCATTGAATCCAGATTG
<i>RNA18S5</i>	18s rRNA	NR_003286.2	Forward Primer	CGGCTACCACATCCAAGG
			Reverse Primer	CGGGTCGGGAGTGGGT
			Sonde	TTGCGCGCCTGCTGCCT

qRT-PCR

Die qRT-PCR wurde im LightCycler® 480 der Firma Roche durchgeführt. Dafür wurde eine LightCycler® 480 96-Wellplatte verwendet. Von jeder Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt, deshalb wurden pro Probe 2 Wells vorbereitet. Pro Well der 96-Wellplatte wurden 23 µl Mastermix (siehe Tabelle 31) vorgelegt. Der im Mastermix enthaltene KAPA PROBE FAST Master Mix (2×) enthält bereits die Taq Hot Start DNA-Polymerase, dNTPs, MgCl₂ und Stabilisatoren. Zu den 23 µl Mastermix wurden 2 µl der zu untersuchenden cDNA Probe pipettiert. Falls die Genexpression eines Gens sehr gering war, wurde das Volumen der cDNA von 2 auf 6 µl erhöht und das Volumen des Wassers im Mastermix um 4 µl verringert. Um eine Verunreinigung oder Verdunstung des Reaktionsansatzes zu verhindern wurde die 96-Wellplatte mit einer Klebefolie versiegelt. Nach anschließendem Vortexen der Platte um den Reaktionsansatz zu homogenisieren wurde die Platte für 3 min bei 1.200rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Platte wurde nun in den LightCycler® 480 eingelegt und nach dem in Tabelle 32 dargestellten Temperaturprogramm inkubiert. Die Fluoreszenz wurde nach jedem abgeschlossenen Amplifikationszyklus gemessen.

Tabelle 31: Master Mix Zusammensetzung für qRT-PCR.

Bestandteil	Stammkonzentration	Volumen je Probe	Endkonzentration
KAPA PROBE FAST Master Mix	2×	12,500 µl	1×
RNase freies Wasser		7,750 µl	
Forward Primer Referenzgen	10 µM	0,125 µl	50 nM
Reverse Primer Referenzgen	10 µM	0,125 µl	50 nM
Sonde Referenzgen	5 µM	0,500 µl	100 nM
Forward Primer Zielgen	10 µM	0,750 µl	300 nM
Reverse Primer Zielgen	10 µM	0,750 µl	300 nM
Sonde Zielgen	5 µM	0,500 µl	100 nM

Tabelle 32: Temperaturprogramm der qRT-PCR für den LightCycler® 480.

Zyklen	Schritt	Temperatur	Dauer	Funktion
1×	Vorinkubation	95 °C	5 min	Aktivierung der Taq-Polymerase
65×	Amplifikation	95 °C	10 s	DNA-Denaturierung
		60 °C	30 s	Primerhybridisierung
		72 °C	1 s	Elongation
1×	Kühlung	40 °C	10 s	Kühlung

Quantifizierung – $\Delta\Delta Ct$ -Methode

Die relative Quantifizierung der erhaltenen Fluoreszenzwerte erfolgt nach der $\Delta\Delta Ct$ -Methode⁴⁶⁰ und wird als x-fache Expression (fold change) im Vergleich zur Kontrolle ausgedrückt. Die zum LightCycler® 480 gehörende Software ermittelt sogenannte Ct-Werte (cycle treshold). Dieser Wert beschreibt den Zeitpunkt, bei dem zum ersten Mal das Fluoreszenzsignal exponentiell gegenüber dem Hintergrundsignal ansteigt. Da die Höhe des Fluoreszenzsignals proportional zum gebildeten PCR-Produkt ist, fällt der Ct-Wert umso kleiner aus je mehr cDNA in der Probe vorhanden ist, da das erste Fluoreszenzsignal umso früher kommt, je mehr cDNA vorhanden ist. Bei der relativen Quantifizierung ist eine interne Kontrolle (Referenzgen) notwendig, gegen die die ermittelten Ct-Werte normiert werden. Die ursprüngliche Ausgangsmenge an mRNA, kann dabei jedoch nicht bestimmt werden.

Als erstes wird nun bei der $\Delta\Delta Ct$ -Methode die Differenz von den Ct-Werten des Zielgens und des Referenzgens gebildet.

$$\Delta Ct = Ct_{(\text{Zielgen})} - Ct_{(\text{Referenzgen})}$$

Im nächsten Schritt werden die ΔCt -Werte der behandelten Zellen auf die ΔCt -Werte der unbehandelten Kontrollzellen bezogen.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{behandelte Zellen})} - \Delta Ct_{(\text{unbehandelte Kontrolle})}$$

Zum Schluss wird der erhaltene Wert in folgende Formel eingesetzt, um die die x-fache Genexpression (fold change) der behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen auszudrücken.

$$\text{fold change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

5.2.14 Microarray-Analysen

5.2.14.1 Methylom-Analyse

Um die Auswirkungen einer Feinstaubexposition auf die DNA-Methylierung einer Zelle zu untersuchen, wurden BEAS-2B für 32 Tage mit 100 µg/ml PM_{2.5}, wie in Kapitel 5.2.1.8 beschrieben, kultiviert. Parallel wurden Kontrollzellen genauso behandelt, nur anstatt der Zugabe der Partikel-Suspension wurde zu den Zellen das gleiche Volumen an Kulturmedium gegeben. Nach 30 Tagen wurden pro Well 100.000 der so kultivierten Zellen in einer 6-Wellplatte ausplattiert (siehe Kapitel 5.2.1.6) und am nächsten Tag erneut mit PM_{2.5} für 48 h reexponiert (siehe Kapitel 5.2.1.7). Zusätzlich zu dieser Arbeit wurden zwei weitere unabhängige Versuche von Frau Dr. Regina Merk (ehemals Dornhof) und Herrn Dr. Matjaz Humar (Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie, Institut für Pharmazeutische Wissenschaften, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) durchgeführt. Zum Schluss wurden die DNA der so behandelten Zellen mit dem DNeasy® Blood & Tissue Kit von Qiagen von Herrn Dr. Matjaz Humar geerntet.

Die weiteren Untersuchungen mittels Illumina Infinium® HumanMethylation450 BeadChip (450K) Array der drei unabhängigen Experimente wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Thomas Häupl (Medizinische Klinik m. S. Rheumatologie und klinische Immunologie, Charité Universitätsmedizin Berlin) wurden von Marc Bonin durchgeführt. Die bioinformatische Datenanalyse erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan Günther (Pharmazeutische Bioinformatik, Institut für Pharmazeutische Wissenschaften, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) durch Dr. Stephan Flemming und Dr. Gwang-Jin Kim.⁴⁶¹

5.2.14.2 Transkriptom-Analyse

Um die Auswirkungen einer Feinstaubexposition auf die gesamte Genexpression einer Zelle zu untersuchen, wurden BEAS-2B für 32 Tage mit 100 µg/ml PM_{2.5}, wie in Kapitel 5.2.1.8 beschrieben, kultiviert. Parallel wurden Kontrollzellen genauso behandelt, nur anstatt der Zugabe der Partikel-Suspension wurde zu den Zellen das gleiche Volumen an Kulturmedium gegeben. Nach 30 Tagen wurden pro Well 100.000 der so kultivierten Zellen in einer 6-Wellplatte ausplattiert (siehe Kapitel 5.2.1.6) und am nächsten Tag erneut mit PM_{2.5} reexponiert (siehe Kapitel 5.2.1.7). Nach 48 h wurden jeweils Kontrollzellen und PM_{2.5} für 60 min mit 100 µg/ml doppelsträngiger RNA (dsRNA) stimuliert. Anschließend wurde die mRNA der Zellen, wie in 5.2.13.1 beschrieben, geerntet. Zusätzlich zu dieser Arbeit wurden zwei weitere unabhängige Versuche von Frau Dr. Regina Merk (ehemals Dornhof) und Herrn Dr. Matjaz Humar (Pharmazeutische Biologie und

Biotechnologie, Institut für Pharmazeutische Wissenschaften, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) durchgeführt.

Die weiteren Untersuchungen mittels Microarray-Analyse, der drei unabhängigen Experimente wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Thomas Häupl (Medizinische Klinik m. S. Rheumatologie und klinische Immunologie, Charité Universitätsmedizin Berlin) von Marc Bonin ausgeführt, wie das Umschreiben der mRNA in einzelsträngige cDNA. Anschließend erfolgte die Hybridisierung der fragmentierten Biotin-markierten antisense cRNA an den Affymetrix GeneChip® Human Genome HG-U133 Plus 2.0 oligonucleotide Microarray. Die bioinformatische Datenanalyse erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan Günther (Pharmazeutische Bioinformatik, Institut für Pharmazeutische Wissenschaften, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) durch Dr. Stephan Flemming und Dr. Gwang-Jin Kim.⁴⁶¹

5.2.15 Statistische Auswertung

Statistische Auswertungen der erhaltenen Daten wurden mit der Software GraphPad Prism 5 und Microsoft Excel 2013 durchgeführt. Dabei wurden die Werte als Mittelwerte mit Standardabweichung (SD) dargestellt. Der Students t-Test wurde bei Werten, die sich durch zwei unterschiedliche Behandlungen unterscheiden, verwendet. Wurden Werte, die sich aus mehr als zwei unterschiedlichen Behandlungen ergaben, analysiert, so wurde die Varianzanalyse one-way oder two-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni's Post-hoc-Test angewendet. Werte mit einem *p*-Wert <0,05 wurden als signifikant betrachtet. Zur weiteren Unterscheidung wurden *p*-Werte mit *p*<0,05 mit *, *p*-Werte mit *p*<0,01 mit ** und *p*-Werte mit *p*<0,001 mit *** gekennzeichnet.

6 Literaturverzeichnis

1. Kim, K.-H., Kabir, E. & Kabir, S. A review on the human health impact of airborne particulate matter. *Environ. Int.* **74**, 136–143 (2015).
2. World Health Organization. *Health effects of particulate matter: Policy implications for countries in eastern Europe, Caucasus and central Asia*. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe (2013). doi:10.5124/jkma.2007.50.2.175
3. Øvrevik, J., Refsnes, M., Låg, M., Holme, J. A. & Schwarze, P. E. Activation of proinflammatory responses in cells of the airway mucosa by particulate matter: Oxidant- and non-oxidant-mediated triggering mechanisms. *Biomolecules* **5**, 1399–1440 (2015).
4. Johansson, C., Norman, M. & Gidhagen, L. Spatial & temporal variations of PM10 and particle number concentrations in urban air. *Environ. Monit. Assess.* **127**, 477–487 (2007).
5. Lelieveld, J., Evans, J. S., Fnais, M., Giannadaki, D. & Pozzer, a. The contribution of outdoor air pollution sources to premature mortality on a global scale. *Nature* **525**, 367–71 (2015).
6. Srimuruganandam, B. & Shiva Nagendra, S. M. Source characterization of PM 10 and PM 2.5 mass using a chemical mass balance model at urban roadside. *Sci. Total Environ.* **433**, 8–19 (2012).
7. WHO | Ambient (outdoor) air quality and health. WHO (2016). at <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs313/en/>>
8. Carvalho, R. L., Jensen, O. M. & Tarelho, L. A. C. Mapping the performance of wood-burning stoves by installations worldwide. *Energy Build.* **127**, 658–679 (2016).
9. Bonjour, S. *et al.* Solid fuel use for household cooking: Country and regional estimates for 1980–2010. *Environ. Health Perspect.* **121**, 784–790 (2013).
10. Kurmi, O. P., Lam, K. B. H. & Ayres, J. G. Indoor air pollution and the lung in low- and medium-income countries. *Eur. Respir. J.* **40**, 239–254 (2012).
11. World Health Organization. *WHO guidelines for indoor air quality: Household fuel combustion*. World Health Organization (2014). at <http://www.who.int/iris/bitstream/10665/141496/summary_in_6_languages:http://apps.who.int/iris/handle/10665/144309/http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/141496/1/9789241548885_eng.pdf?ua=1>
12. Wilnhammer, M., Lubenau, C., Wittkopf, S., Richter, K. & Weber-Blaschke, G. Effects of increased wood energy consumption on global warming potential, primary energy demand and particulate matter emissions on regional level based on the case study area Bavaria (Southeast Germany). *Biomass and Bioenergy* **81**, 190–201 (2015).
13. Union, E. *Richtlinie 2009/28/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 23. April 2009 zur Förderung der Nutzung von Energie aus erneuerbaren Quellen und zur Änderung und anschließenden Aufhebung der Richtlinien 2001/77/EG und 2003/30/EG*. *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* **L**, 16–62 (2009).
14. Behnke, A. *Die Nebenwirkungen Der Behaglichkeit : Feinstaub aus Kamin und Holzofen*. Umweltbundesamt (2007).
15. *Erste Verordnung zur Durchführung des Bundes-Immissionsschutzgesetzes (Verordnung über kleine und mittlere Feuerungsanlagen - 1. BImSchV)*. 1–23 (2010).
16. Nussbaumer, T., Czasch, C., Klippel, N., Johansson, L. & Tullin, C. *Particulate emissions from biomass combustion in IEA countries*. 16th European biomass conference and

- exhibition* (2008).
doi:http://www.ieabcc.nl/publications/Nussbaumer_et_al_IEA_Report_PM10_Jan_2008.pdf
17. Kim, K. H., Jahan, S. A. & Kabir, E. A review of diseases associated with household air pollution due to the use of biomass fuels. *J. Hazard. Mater.* **192**, 425–431 (2011).
 18. Bruce, N., Perez-Padilla, R. & Albalak, R. Indoor air pollution in developing countries: a major environmental and public health challenge. *Environ. Heal.* **78**, 15 (2000).
 19. Sigsgaard, T. *et al.* Health impacts of anthropogenic biomass burning in the developed world. *Eur. Respir. J.* **46**, 1577–1588 (2015).
 20. Gurley, E. S. *et al.* Indoor exposure to particulate matter and the incidence of acute lower respiratory infections among children: A birth cohort study in urban Bangladesh. *Indoor Air* **23**, 379–386 (2013).
 21. Noonan, C. W., Ward, T. J., Navidi, W. & Sheppard, L. A rural community intervention targeting biomass combustion sources: effects on air quality and reporting of children's respiratory outcomes. *Occup. Environ. Med.* **69**, 354–360 (2012).
 22. Po, J., FitzGerald, J. & Carlsten, C. Respiratory disease associated with solid biomass fuel exposure in rural women and children: systematic review and meta-analysis. *Thorax* **66**, 232–239 (2011).
 23. Kurmi, O. P., Semple, S., Simkhada, P., Smith, W. C. S. & Ayres, J. G. COPD and chronic bronchitis risk of indoor air pollution from solid fuel: a systematic review and meta-analysis. *Thorax* **65**, 221–228 (2010).
 24. Bui, D. *et al.* Ambient wood smoke, traffic pollution and adult asthma prevalence and severity. *Respirology* **18**, 1101–1107 (2013).
 25. Schei, M. a *et al.* Childhood asthma and indoor woodsmoke from cooking in Guatemala. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* **14 Suppl 1**, S110–S117 (2004).
 26. Noonan, C. W. & Ward, T. J. Environmental tobacco smoke, woodstove heating and risk of asthma symptoms. *J. Asthma* **44**, 735–738 (2007).
 27. Delgado, J. *et al.* Lung cancer pathogenesis associated with wood smoke exposure. *Chest* **128**, 124–131 (2005).
 28. Arrieta, O. *et al.* Clinical and pathological characteristics, outcome and mutational profiles regarding non-small-cell lung cancer related to wood-smoke exposure. *J. Thorac. Oncol.* **7**, 1228–1234 (2012).
 29. Hernández-Garduño, E., Brauer, M., Pérez-Neria, J. & Vedal, S. Wood smoke exposure and lung adenocarcinoma in non-smoking Mexican women. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **8**, 377–83 (2004).
 30. Siddiqui, A. R. *et al.* Prenatal exposure to wood fuel smoke and low birth weight. *Environ. Health Perspect.* **116**, 543–549 (2008).
 31. Cândido da Silva, A. M., Moi, G. P., Mattos, I. E. & Hacon, S. de S. Low birth weight at term and the presence of fine particulate matter and carbon monoxide in the Brazilian Amazon: a population-based retrospective cohort study. *BMC Pregnancy Childbirth* **14**, 309 (2014).
 32. Boy, E., Bruce, N. & Delgado, H. Birth weight and exposure to kitchen wood smoke during pregnancy in rural Guatemala. *Environ. Health Perspect.* **110**, 109–114 (2002).
 33. McCracken, J. P., Smith, K. R., Díaz, A., Mittleman, M. A. & Schwartz, J. Chimney stove intervention to reduce long-term wood smoke exposure lowers blood pressure among Guatemalan women. *Environ. Health Perspect.* **115**, 996–1001 (2007).

34. Baumgartner, J. *et al.* Indoor air pollution and blood pressure in adult women living in rural China. *Environ. Health Perspect.* **119**, 1390–1395 (2011).
35. Unosson, J. *et al.* Exposure to wood smoke increases arterial stiffness and decreases heart rate variability in humans. *Part. Fibre Toxicol.* **10**, 20 (2013).
36. Levy, D. *et al.* A case-crossover analysis of particulate matter air pollution and out-of-hospital primary cardiac arrest. *Epidemiology* **12**, 193–199 (2001).
37. Sullivan, J. *et al.* Relation between short-term fine-particulate matter exposure and onset of myocardial infarction. *Epidemiology* **16**, 41–48 (2005).
38. Sullivan, J. H. Association between short term exposure to fine particulate matter and heart rate variability in older subjects with and without heart disease. *Thorax* **60**, 462–466 (2005).
39. Ellegård, A. Tears while cooking: an indicator of indoor air pollution and related health effects in developing countries. *Environ. Res.* **75**, 12–22 (1997).
40. Saha, A., Kulkarni, P. K., Shah, A., Patel, M. & Saiyed, H. N. Ocular morbidity and fuel use: an experience from India. *Occup. Environ. Med.* **62**, 66–9 (2005).
41. Pokhrel, A. K., Smith, K. R., Khalakdina, A., Deuja, A. & Bates, M. N. Case-control study of indoor cooking smoke exposure and cataract in Nepal and India. *Int. J. Epidemiol.* **34**, 702–708 (2005).
42. Brown, J. S., Gordon, T., Price, O. & Asgharian, B. Thoracic and respirable particle definitions for human health risk assessment. *Part. Fibre Toxicol.* **10**, 12 (2013).
43. Lambert, A. R., O’Shaughnessy, P. T., Tawhai, M. H., Hoffman, E. A. & Lin, C. L. Regional deposition of particles in an image-based airway model: Large-eddy simulation and left-right lung ventilation asymmetry. *Aerosol Sci. Technol.* **45**, 11–25 (2011).
44. Guarnieri, M. & Balmes, J. R. Outdoor air pollution and asthma. *Lancet* **383**, 1581–1592 (2014).
45. Diociaiuti, M. *et al.* The two PM_{2.5} (fine) and PM_{2.5–10} (coarse) fractions: Evidence of different biological activity. *Environ. Res.* **86**, 254–262 (2001).
46. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. & Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* **160**, 1–40 (2006).
47. Kadiiska, M. B., Mason, R. P., Dreher, K. L., Costa, D. L. & Ghio, A. J. In vivo evidence of free radical formation in the rat lung after exposure to an emission source air pollution particle. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 1104–1108 (1997).
48. Traversi, D., Alessandria, L., Schilirò, T. & Gilli, G. Size-fractionated PM₁₀ monitoring in relation to the contribution of endotoxins in different polluted areas. *Atmos. Environ.* **45**, 3515–3521 (2011).
49. Kim, K.-H., Jahan, S. A., Kabir, E. & Brown, R. J. C. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environ. Int.* **60**, 71–80 (2013).
50. Achten, C. & Andersson, J. T. Overview of polycyclic aromatic compounds (PAC). *Polycycl. Aromat. Compd.* **35**, 1–10 (2015).
51. Ehrenhauser, F. S. PAH and IUPAC Nomenclature. *Polycycl. Aromat. Compd.* **35**, 161–176 (2015).
52. Ravindra, K., Sokhi, R. & Grieken, R. Van. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmos. Environ.* **42**, 2895–2921 (2008).
53. USEPA. *Priority Pollutants. Code of Federal Regulations (CFR). Title 40. Chapter I. Part 423: Appendix A to Part 423* (2003). at

- <<https://www3.epa.gov/region1/npdes/permits/generic/prioritypollutants.pdf>>
54. PubChem Search. at <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/>>
 55. IARC Monographs- Classifications. at <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php>
 56. IARC. Agents Classified by the IARC Monographs , Volumes 1 – 104. *IARC Monogr.* **7**, 1–25 (2012).
 57. Uski, O. *Toxicological effects of fine particles from smallscale biomass combustion. Dissertations in Forestry and Natural Sciences* (2014).
 58. Baek, S. O. *et al.* A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Sources, fate and behavior. *Water. Air. Soil Pollut.* **60**, 279–300 (1991).
 59. Mastral, A. M. & Callén, M. S. A Review on polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) emissions from energy generation. *Environ. Sci. Technol.* **34**, 3051–3057 (2000).
 60. Boström, C.-E. *et al.* Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environ. Health Perspect.* **110**, 451–488 (2002).
 61. Lewtas, J. Air pollution combustion emissions: Characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* **636**, 95–133 (2007).
 62. Mastro, R. E. *et al.* PAHs and potentially toxic elements in the fly ash and bed ash of biomass fired power plants. *Fuel Process. Technol.* **132**, 139–152 (2015).
 63. Kamal, A., Cincinelli, A., Martellini, T. & Malik, R. N. A review of PAH exposure from the combustion of biomass fuel and their less surveyed effect on the blood parameters. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**, 4076–4098 (2015).
 64. Happonen, M. S. *et al.* Pulmonary inflammation and tissue damage in the mouse lung after exposure to PM samples from biomass heating appliances of old and modern technologies. *Sci. Total Environ.* **443**, 256–266 (2013).
 65. Bari, M. A., Baumbach, G., Kuch, B. & Scheffknecht, G. Particle-phase concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air of rural residential areas in southern Germany. *Air Qual. Atmos. Health* **3**, 103–116 (2010).
 66. Oanh, N. T. K., Albina, D. O., Ping, L. & Wang, X. Emission of particulate matter and polycyclic aromatic hydrocarbons from select cookstove – fuel systems in Asia. **28**, 579–590 (2005).
 67. Tiwari, M., Sahu, S. K., Bhangare, R. C., Ajmal, P. Y. & Pandit, G. G. Estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons associated with size segregated combustion aerosols generated from household fuels. *Microchem. J.* **106**, 79–86 (2013).
 68. Lu, H., Zhu, L. & Zhu, N. Polycyclic aromatic hydrocarbon emission from straw burning and the influence of combustion parameters. *Atmos. Environ.* **43**, 978–983 (2009).
 69. Bayram, A., Muezzinoglu, A. & Ekinci, E. PAH emissions from lignite combustion - Case study in a model fluidized bed combustor results with four types of Turkish (Soma) lignites. *Polycycl. Aromat. Compd.* **12**, 37–49 (1997).
 70. Gurjar, B. R., Molina, L. T. & Ojha, C. S. P. *Air pollution. Health and environmental impacts.* (CRC Press Taylor and Francis Group, 2010).
 71. Ravindra, K., Mittal, A. K. & Van Grieken, R. Health risk assessment of urban suspended particulate matter with special reference to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Rev. Environ. Health* **16**, 169–189 (2001).
 72. Dat, N.-D. & Chang, M. B. Review on characteristics of PAHs in atmosphere, anthropogenic

- sources and control technologies. *Sci. Total Environ.* **609**, 682–693 (2017).
73. Pitman, R. M. Wood ash use in forestry - A review of the environmental impacts. *Forestry* **79**, 563–588 (2006).
74. Košnář, Z., Mercl, F., Perná, I. & Tlustoš, P. Investigation of polycyclic aromatic hydrocarbon content in fly ash and bottom ash of biomass incineration plants in relation to the operating temperature and unburned carbon content. *Sci. Total Environ.* **563–564**, 53–61 (2016).
75. Grawe, S. *et al.* The immersion freezing behavior of ash particles from wood and brown coal burning. *Atmos. Chem. Phys.* **16**, 13911–13928 (2016).
76. Vander Wal, R. L., Jensen, K. A. & Choi, M. Y. Simultaneous laser-induced emission of soot and polycyclic aromatic hydrocarbons within a gas-jet diffusion flame. *Combust. Flame* **109**, 399–414 (1997).
77. Johansson, I. & Van Bavel, B. Levels and patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons in incineration ashes. *Sci. Total Environ.* **311**, 221–231 (2003).
78. Samburova, V. *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons in biomass-burning emissions and their contribution to light absorption and aerosol toxicity. *Sci. Total Environ.* **568**, 391–401 (2016).
79. Colom-Díaz, J. M., Alzueta, M. U., Fernandes, U. & Costa, M. Emissions of polycyclic aromatic hydrocarbons during biomass combustion in a drop tube furnace. *Fuel* **207**, 790–800 (2017).
80. Dilger, M. *et al.* Toxicity of wood smoke particles in human A549 lung epithelial cells: the role of PAHs, soot and zinc. *Arch. Toxicol.* **90**, 3029–3044 (2016).
81. Bari, M. A., Baumbach, G., Kuch, B. & Scheffknecht, G. Wood smoke as a source of particle-phase organic compounds in residential areas. *Atmos. Environ.* **43**, 4722–4732 (2009).
82. Shen, G. *et al.* Emission characteristics for polycyclic aromatic hydrocarbons from solid fuels burned in domestic stoves in rural China. *Environ. Sci. Technol.* **47**, 14485–14494 (2013).
83. Khalili, N. R., Scheff, P. A. & Holsen, T. M. PAH source fingerprints for coke ovens, diesel and, gasoline engines, highway tunnels, and wood combustion emissions. *Atmos. Environ.* **29**, 533–542 (1995).
84. Simoneit, B. R. T. *Biomass burning - A review of organic tracers for smoke from incomplete combustion. Applied Geochemistry* **17**, (2002).
85. Ramdahl, T. Retene - a molecular marker of wood combustion in ambient air. *Nature* **306**, 580–582 (1983).
86. Zhang, Y., Obrist, D., Zielinska, B. & Gertler, A. Particulate emissions from different types of biomass burning. *Atmos. Environ.* **72**, 27–35 (2013).
87. Rajput, P., Sarin, M. M., Rengarajan, R. & Singh, D. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from post-harvest biomass burning emissions in the Indo-Gangetic Plain: Isomer ratios and temporal trends. *Atmos. Environ.* **45**, 6732–6740 (2011).
88. Hays, M. D., Geron, C. D., Linna, K. J., Smith, N. D. & Schauer, J. J. Speciation of gas-phase and fine particle emissions from burning of foliar fuels. *Environ. Sci. Technol.* **36**, 2281–2295 (2002).
89. Orasche, J. *et al.* Comparison of emissions from wood combustion. Part 2: Impact of combustion conditions on emission factors and characteristics of particle-bound organic species and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-related toxicological potential. *Energy and Fuels* **27**, 1482–1491 (2013).

90. Chomanee, J., Tekasakul, S., Tekasakul, P., Furuuchi, M. & Otani, Y. Effects of moisture content and burning period on concentration of smoke particles and particle-bound polycyclic aromatic hydrocarbons from rubber-wood combustion. *Aerosol Air Qual. Res.* **9**, 404–411 (2009).
91. Shen, G. *et al.* Emissions of PAHs from indoor crop residue burning in a typical rural stove: Emission factors, size distributions, and gas-particle partitioning. *Environ. Sci. Technol.* **45**, 1206–1212 (2011).
92. Korenaga, T., Liu, X. & Huang, Z. The influence of moisture content on polycyclic aromatic hydrocarbons emission during rice straw burning. *Chemosph. - Glob. Chang. Sci.* **3**, 117–122 (2001).
93. McDow, S. R. *et al.* Combustion aerosol water content and its effect on polycyclic aromatic hydrocarbon reactivity. *Atmos. Environ.* **29**, 791–797 (1995).
94. Jenkins, B. M., Jones, a D., Turn, S. Q. & Williams, R. B. Emission factors for polycyclic aromatic hydrocarbons from biomass burning. *Environ. Sci. Technol.* **30**, 2462–2469 (1996).
95. McDonald, J. D. *et al.* Fine particle and gaseous emission rates from residential wood combustion. *Environ. Sci. Technol.* **34**, 2080–2091 (2000).
96. Danielsen, P. H. *et al.* Oxidative stress, DNA damage, and inflammation induced by ambient air and wood smoke particulate matter in human A549 and THP-1 cell lines. *Chem. Res. Toxicol.* **24**, 168–184 (2011).
97. Kocbach Bølling, A. *et al.* Health effects of residential wood smoke particles: the importance of combustion conditions and physicochemical particle properties. *Part. Fibre Toxicol.* **6**, 29 (2009).
98. Shen, G. *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons in fine particulate matter emitted from burning kerosene, liquid petroleum gas, and wood fuels in household cookstoves. *Energy and Fuels* **31**, 3081–3090 (2017).
99. Johansson, L. S. *et al.* Emission characteristics of modern and old-type residential boilers fired with wood logs and wood pellets. *Atmos. Environ.* **38**, 4183–4195 (2004).
100. Andersson, J. T. & Achten, C. Time to say goodbye to the 16 EPA PAHs? Toward an up-to-date use of PACs for environmental purposes. *Polycycl. Aromat. Compd.* **35**, 1–25 (2015).
101. Armstrong, B., Hutchinson, E., Unwin, J. & Fletcher, T. Lung cancer risk after exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: A review and meta-analysis. *Environ. Health Perspect.* **112**, 970–978 (2004).
102. Bosetti, C., Boffetta, P. & La Vecchia, C. Occupational exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons, and respiratory and urinary tract cancers: A quantitative review to 2005. *Ann. Oncol.* **18**, 431–446 (2007).
103. Navarro, K. M., Cisneros, R., Noth, E. M., Balmes, J. R. & Hammond, S. K. Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbon of wildland firefighters at prescribed and wildland fires. *Environ. Sci. Technol.* **51**, 6461–6469 (2017).
104. Shields, P. G. Molecular epidemiology of smoking and lung cancer. *Oncogene* **21**, 6870–6876 (2002).
105. Lee, H.-W. *et al.* Cigarette side-stream smoke lung and bladder carcinogenesis: inducing mutagenic acrolein-DNA adducts, inhibiting DNA repair and enhancing anchorage-independent-growth cell transformation. *Oncotarget* **6**, 33226–36 (2015).
106. Viegas, O., Novo, P., Pinto, E., Pinho, O. & Ferreira, I. M. P. L. V. O. Effect of charcoal types and grilling conditions on formation of heterocyclic aromatic amines (HAs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in grilled muscle foods. *Food Chem. Toxicol.* **50**,

- 2128–2134 (2012).
107. Lee, J. G. *et al.* Effects of grilling procedures on levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled meats. *Food Chem.* **199**, 632–638 (2016).
108. Man, Y. B. *et al.* Cancer risk assessments of Hong Kong soils contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Hazard. Mater.* **261**, 770–776 (2013).
109. Liamin, M. *et al.* Benzo[a]pyrene-induced DNA damage associated with mutagenesis in primary human activated T lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.* **137**, 113–124 (2017).
110. Smith, L. E. *et al.* Targeting of lung cancer mutational hotspots by polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 803–811 (2000).
111. Kondraganti, S. R. *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbon-inducible DNA adducts: Evidence by 32P-postlabeling and use of knockout mice for AH receptor-independent mechanisms of metabolic activation in vivo. *Int. J. Cancer* **103**, 5–11 (2003).
112. Einaudi, L. *et al.* In vivo exposure to benzo(a)pyrene induces significant DNA damage in mouse oocytes and cumulus cells. *Hum. Reprod.* **29**, 548–554 (2014).
113. Peluso, M. *et al.* DNA adduct formation among workers in a Thai industrial estate and nearby residents. *Sci Total Env.* **389**, 283–288 (2008).
114. Vineis, P. & Husgafvel-Pursiainen, K. Air pollution and cancer: Biomarker studies in human populations. *Carcinogenesis* **26**, 1846–1855 (2005).
115. Jarvis, I. W. H., Dreij, K., Mattsson, Å., Jernström, B. & Stenius, U. Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures and implications for cancer risk assessment. *Toxicology* **321**, 27–39 (2014).
116. Wagner, M. *et al.* Occupational polycyclic aromatic hydrocarbon exposure and risk of larynx cancer: A systematic review and meta-analysis. *Occup. Environ. Med.* **72**, 226–233 (2015).
117. Rota, M., Bosetti, C., Boccia, S., Boffetta, P. & La Vecchia, C. Occupational exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons and respiratory and urinary tract cancers: An updated systematic review and a meta-analysis to 2014. *Arch. Toxicol.* **88**, 1479–1490 (2014).
118. Chen, M. R., Tsai, P. J. & Wang, Y. F. Assessing inhalatory and dermal exposures and their resultant health-risks for workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contained in oil mists in a fastener manufacturing industry. *Environ. Int.* **34**, 971–975 (2008).
119. Kang, D., Davis, L. K., Hunt, P. & Kriebel, D. Cancer incidence among male massachusetts firefighters, 1987–2003. *Am. J. Ind. Med.* **51**, 329–335 (2008).
120. Pukkala, E. *et al.* Cancer incidence among firefighters : 45 years of follow-up in five nordic countries. *Occup. Environ. Med.* **71**, 398–404 (2014).
121. Sarigiannis, D. A., Karakitsios, S. P., Zikopoulos, D., Nikolaki, S. & Kermenidou, M. Lung cancer risk from PAHs emitted from biomass combustion. *Environ. Res.* **137**, 147–156 (2015).
122. Islami, F. *et al.* High-temperature beverages and foods and esophageal cancer risk - A systematic review. *Int. J. Cancer* **125**, 491–524 (2009).
123. Kamangar, F., Schantz, M. M., Abnet, C. C., Fagundes, R. B. & Dawsey, S. M. High levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in mate drinks. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **17**, 1262–1268 (2008).
124. De Stefani, E. *et al.* Mate drinking and risk of lung cancer in males: a case-control study from Uruguay. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **5**, 515–519 (1996).
125. Bates, M. N., Hopenhayn, C., Rey, O. A. & Moore, L. E. Bladder cancer and mate consumption in Argentina: A case-control study. *Cancer Lett.* **246**, 268–273 (2007).

126. Goldenberg, D., Golz, A. & Joachims, H. Z. The beverage maté: a risk factor for cancer of the head and neck. *Head Neck* **25**, 595–601 (2003).
127. Lubin, J. H. *et al.* Maté drinking and esophageal squamous cell carcinoma in South America: Pooled results from two large multicenter case–control studies. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **23**, 107–117 (2014).
128. Sogbanmu, T. O. *et al.* Lagos lagoon sediment organic extracts and polycyclic aromatic hydrocarbons induce embryotoxic, teratogenic and genotoxic effects in Danio rerio (zebrafish) embryos. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **23**, 14489–14501 (2016).
129. Hawliczek, A. *et al.* Developmental toxicity and endocrine disrupting potency of 4-azapyrene, benzo[b]fluorene and retene in the zebrafish Danio rerio. *Reprod. Toxicol.* **33**, 213–223 (2012).
130. Barjhoux, I. *et al.* Transcriptional responses and embryotoxic effects induced by pyrene and methylpyrene in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) early life stages exposed to spiked sediments. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **21**, 13850–13866 (2014).
131. Dejmek, J., Solansky, I., Benes, I., Lenicek, J. & Sram, R. J. The impact of polycyclic aromatic hydrocarbons and fine particles on pregnancy outcome. *Environ. Health Perspect.* **108**, 1159–1164 (2000).
132. Jedrychowski, W. A. *et al.* Prenatal exposure to fine particles and polycyclic aromatic hydrocarbons and birth outcomes: a two-pollutant approach. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **90**, 255–264 (2017).
133. Perera, F. P. *et al.* Effects of transplacental exposure to environmental pollutants on birth outcomes in a multiethnic population. *Environ. Health Perspect.* **111**, 201–205 (2003).
134. Perera, F. P. *et al.* Effect of prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children. *Environ. Health Perspect.* **114**, 1287–1292 (2006).
135. Edwards, S. C. *et al.* Prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and children's intelligence at 5 years of age in a prospective cohort study in Poland. *Environ. Health Perspect.* **118**, 1326–1331 (2010).
136. Wang, B. *et al.* Levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in maternal serum and risk of neural tube defects in offspring. *Environ. Sci. Technol.* **49**, 588–596 (2014).
137. Lupo, P. J. *et al.* Maternal occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: Effects on gastroschisis among offspring in the national birth defects prevention study. *Environ. Health Perspect.* **120**, 910–915 (2012).
138. Moorthy, B., Chu, C. & Carlin, D. J. Polycyclic aromatic hydrocarbons: From metabolism to lung cancer. *Toxicol. Sci.* **145**, 5–15 (2015).
139. Baird, W. M., Hooven, L. A. & Mahadevan, B. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ. Mol. Mutagen.* **45**, 106–114 (2005).
140. Miller, K. P. & Ramos, K. S. Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo[a]pyrene and related hydrocarbons. *Drug Metab. Rev.* **33**, 1–35 (2001).
141. McCoull, K. D., Rindgen, D., Blair, I. a & Penning, T. M. Synthesis and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon o-quinone depurinating N7-guanine adducts. *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 237–46 (1999).
142. Yang, P. *et al.* CpG site-specific hypermethylation of p16 INK4a in peripheral blood lymphocytes of PAH-exposed workers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **21**, 182–190 (2012).

143. Pastorelli, R. *et al.* Hemoglobin adducts of benzo[a]pyrene dilepoxide in newspaper vendors: association with traffic exhaust. *Carcinogenesis* **17**, 2389–94 (1996).
144. Penning, T. M. Human aldo-keto reductases and the metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem. Res. Toxicol.* **27**, 1901–1917 (2014).
145. Nebert, D. W. & Dalton, T. P. The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 947–960 (2006).
146. Kim, J. H. *et al.* Expression of cytochromes P450 1A1 and 1B1 in human lung from smokers, non-smokers, and ex-smokers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **199**, 210–219 (2004).
147. Saarikoski, S. T. *et al.* Localization of CYP1A1 mRNA in human lung by in situ hybridization: Comparison with immunohistochemical findings. *Int. J. Cancer* **77**, 33–39 (1998).
148. Rendic, S. & Carlo, F. J. Di. *Human cytochrome P450 enzymes: A status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors.* *Drug Metabolism Reviews* **29**, (1997).
149. Luch, A. Nature and nurture – lessons from chemical carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 113–125 (2005).
150. Hrycay, E. G. & Bandiera, S. M. Monooxygenase, peroxidase and peroxygenase properties and reaction mechanisms of cytochrome P450 enzymes. *Adv. Exp. Med. Biol.* **851**, 1–61 (2012).
151. Jin, Y. & Penning, T. M. Aldo-keto reductases and bioactivation/detoxication. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **47**, 263–292 (2007).
152. Park, J. H. *et al.* Aryl hydrocarbon receptor facilitates DNA strand breaks and 8-oxo-2'-deoxyguanosine formation by the aldo-keto reductase product benzo[a]pyrene-7,8-dione. *J. Biol. Chem.* **284**, 29725–29734 (2009).
153. Jung, K. A. *et al.* Identification of aldo-keto reductases as NRF2-target marker genes in human cells. *Toxicol. Lett.* **218**, 39–49 (2013).
154. Burczynski, M. E., Lin, H. K. & Penning, T. M. Isoform-specific induction of a human aldo-keto reductase by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), electrophiles, and oxidative stress: Implications for the alternative pathway of PAH activation catalyzed by human dihydrodiol dehydrogenase. *Cancer Res.* **59**, 607–614 (1999).
155. Jiang, H., Vudathala, D. K., Blair, I. A. & Penning, T. M. Competing roles of Aldo-Keto reductase 1A1 and cytochrome P4501B1 in benzo[a]pyrene-7,8-diol activation in human bronchoalveolar H358 cells: Role of AKRs in P4501B1 induction. *Chem. Res. Toxicol.* **19**, 68–78 (2006).
156. Srogi, K. Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Environ. Chem. Lett.* **5**, 169–195 (2007).
157. Li, H., Krieger, R. I. & Li, Q. X. Improved HPLC method for analysis of 1-hydroxypyrene in human urine specimens of cigarette smokers. *Sci. Total Environ.* **257**, 147–53 (2000).
158. Fan, R. *et al.* Biomass fuels and coke plants are important sources of human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, benzene and toluene. *Environ. Res.* **135**, 1–8 (2014).
159. Skipper, P. L. *et al.* Origin of tetrahydrotetrols derived from human hemoglobin adducts of benzo[a]pyrene. *Chem. Res. Toxicol.* **2**, 280–281 (1989).
160. Brunmark, P. *et al.* Identification of subdomain IB in human serum albumin as a major binding site for polycyclic aromatic hydrocarbon epoxides. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 880–886 (1997).
161. Stockinger, B., Meglio, P. Di, Gialitakis, M. & Duarte, H. The aryl hydrocarbon receptor:

- Multitasking in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 403–432 (2014).
162. Gu, Y.-Z., Hogenesch, J. B. & Bradfield, C. A. The PAS superfamily: Sensors of environmental and developmental signals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 519–561 (2000).
163. Tsay, J. J., Tchou-Wong, K.-M., Greenberg, A. K., Pass, H. I. & Rom, W. N. Aryl hydrocarbon receptor and lung cancer. *Anticancer Res.* **33**, 1247–1256 (2013).
164. Beischlag, T. V, Luis Morales, J., Hollingshead, B. D. & Perdew, G. H. The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **18**, 207–250 (2008).
165. Denison, M. S., Soshilov, A. A., He, G., Degroot, D. E. & Zhao, B. Exactly the same but different: Promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor. *Toxicol. Sci.* **124**, 1–22 (2011).
166. Migliaccio, C. T. *et al.* Adverse effects of wood smoke PM_{2.5} exposure on macrophage functions. *Inhal. Toxicol.* **25**, 67–76 (2013).
167. McGuire, J., Whitelaw, M. L., Pongratz, I., Gustafsson, J. A. & Poellinger, L. A cellular factor stimulates ligand-dependent release of hsp90 from the basic helix-loop-helix dioxin receptor. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 2438–2446 (1994).
168. Hankinson, O. The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **35**, 307–340 (1995).
169. Spink, D. C. *et al.* Induction of CYP1A1 and CYP1B1 by benzo(k)fluoranthene and benzo(a)pyrene in T-47D human breast cancer cells: Roles of PAH interactions and PAH metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **226**, 213–224 (2008).
170. Mimura, J., Ema, M., Sogawa, K. & Fujii-Kuriyama, Y. Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev.* **13**, 20–5 (1999).
171. Hayes, J. D., Dinkova-Kostova, A. T. & McMahon, M. Cross-talk between transcription factors AhR and Nrf2: Lessons for cancer chemoprevention from dioxin. *Toxicol. Sci.* **111**, 199–201 (2009).
172. Gualtieri, M. *et al.* Airborne urban particles (Milan winter-PM_{2.5}) cause mitotic arrest and cell death: Effects on DNA, mitochondria, AhR binding and spindle organization. *Mutat. Res.* **713**, 18–31 (2011).
173. Gualtieri, M. *et al.* Gene expression profiling of A549 cells exposed to Milan PM_{2.5}. *Toxicol. Lett.* **209**, 136–145 (2012).
174. Abbas, I. *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons within airborne particulate matter (PM_{2.5}) produced DNA bulky stable adducts in a human lung cell coculture model. *J. Appl. Toxicol.* **33**, 109–119 (2013).
175. Longhin, E. *et al.* Integrative transcriptomic and protein analysis of human bronchial BEAS-2B exposed to seasonal urban particulate matter. *Environ. Pollut.* **209**, 87–98 (2016).
176. Sun, H. *et al.* Gene expression profiling and pathway analysis of human bronchial epithelial cells exposed to airborne particulate matter collected from Saudi Arabia. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **265**, 147–157 (2012).
177. LÍbalová, H. *et al.* Global gene expression changes in human embryonic lung fibroblasts induced by organic extracts from respirable air particles. *Part. Fibre Toxicol.* **9**, 1 (2012).
178. Lee, C., Lin, Z., Hu, S. C. & Chiang, Y. Urban particulate matter down-regulates filaggrin via COX2 expression/PGE2 production leading to skin barrier dysfunction. *Nat. Publ. Gr.* 1–16 (2016). doi:10.1038/srep27995

179. Ferecatu, I. *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbon components contribute to the mitochondria-antiapoptotic effect of fine particulate matter on human bronchial epithelial cells via the aryl hydrocarbon receptor. *Part. Fibre Toxicol.* **7**, 18 (2010).
180. Hayes, J. D. & Dinkova-Kostova, A. T. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem. Sci.* **39**, 199–218 (2014).
181. Tebay, L. E. *et al.* Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease. *Free Radic. Biol. Med.* **88**, 108–146 (2015).
182. Hirotsu, Y. *et al.* Nrf2-MafG heterodimers contribute globally to antioxidant and metabolic networks. *Nucleic Acids Res.* **40**, 10228–10239 (2012).
183. Itoh, K. *et al.* Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* **13**, 76–86 (1999).
184. Katoh, Y. *et al.* Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes to Cells* **6**, 857–868 (2001).
185. McMahon, M., Thomas, N., Itoh, K., Yamamoto, M. & Hayes, J. D. Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron. *J. Biol. Chem.* **279**, 31556–31567 (2004).
186. Wang, H. *et al.* RXR α inhibits the NRF2-ARE signaling pathway through a direct interaction with the Neh7 domain of NRF2. *Cancer Res.* **73**, 3097–3108 (2013).
187. Bryan, H. K., Olayanju, A., Goldring, C. E. & Park, B. K. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochem. Pharmacol.* **85**, 705–717 (2013).
188. Kobayashi, A. *et al.* Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 7130–7139 (2004).
189. Nguyen, T., Sherratt, P. J., Huang, H. C., Yang, C. S. & Pickett, C. B. Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element: Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome. *J. Biol. Chem.* **278**, 4536–4541 (2003).
190. Kang, M.-I., Kobayashi, A., Wakabayashi, N., Kim, S.-G. & Yamamoto, M. Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 2046–2051 (2004).
191. Katsuoka, F. *et al.* Genetic evidence that small Maf proteins are essential for the activation of antioxidant response element-dependent genes genetic evidence that small Maf proteins are essential for the activation of antioxidant response element-dependent genes. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 8044–8051 (2005).
192. Jain, A. K. & Jaiswal, A. K. GSK-3 β acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2. *J. Biol. Chem.* **282**, 16502–16510 (2007).
193. Miao, W., Hu, L., Scrivens, P. J. & Batist, G. Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway: Direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes. *J. Biol. Chem.* **280**, 20340–20348 (2005).
194. Kwak, M., Itoh, K., Yamamoto, M. & Kensler, T. W. Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: Role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 2883–2892 (2002).
195. DeNicola, G. M. *et al.* Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification

- and tumorigenesis. *Nature* **475**, 106–109 (2011).
196. Rushworth, S. A. *et al.* The high Nrf2 expression in human acute myeloid leukemia is driven by NF-kappaB and underlies its chemo-resistance. *Blood* **120**, 5188–5198 (2012).
 197. Diabaté, S., Bergfeldt, B., Plaumann, D., Übel, C. & Weiss, C. Anti-oxidative and inflammatory responses induced by fly ash particles and carbon black in lung epithelial cells. *Anal. Bioanal. Chem.* **401**, 3197–3212 (2011).
 198. Deng, X., Rui, W., Zhang, F. & Ding, W. PM2.5 induces Nrf2-mediated defense mechanisms against oxidative stress by activating PIK3/AKT signaling pathway in human lung alveolar epithelial A549 cells. *Cell Biol. Toxicol.* **29**, 143–157 (2013).
 199. Shang, Y. *et al.* Airborne nitro-PAHs induce Nrf2/ARE defense system against oxidative stress and promote inflammatory process by activating PI3K/Akt pathway in A549 cells. *Toxicol. Vitro.* **44**, 66–73 (2017).
 200. Ghio, A. J. *et al.* Wood smoke particle sequesters cell iron to impact a biological effect. *Chem. Res. Toxicol.* **28**, 2104–2111 (2015).
 201. Lovera-Leroux, M. *et al.* The iron component of particulate matter is antiapoptotic: A clue to the development of lung cancer after exposure to atmospheric pollutants? *Biochimie* **118**, 195–206 (2015).
 202. Huang, Y.-C. T. *et al.* Comparison of Gene Expression Profiles Induced By Coarse, Fine, and Ultrafine Particulate Matter. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part A* **74**, 296–312 (2011).
 203. Stoeger, T. *et al.* Deducing in vivo toxicity of combustion-derived nanoparticles from a cell-free oxidative potency assay and Metabolic activation of organic compounds. *Environ. Health Perspect.* **117**, 54–60 (2009).
 204. Eskandani, M., Vandghanooni, S., Barar, J. & Nazemiyeh, H. International Journal of Biological Macromolecules Cell physiology regulation by hypoxia inducible factor-1 : Targeting oxygen-related nanomachineries of hypoxic cells. *Int. J. Biol. Macromol.* **99**, 46–62 (2017).
 205. Semenza, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 721–732 (2003).
 206. Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A. & Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 5510–5514 (1995).
 207. Masoud, G. N. & Li, W. HIF-1 α pathway : role , regulation and intervention for cancer therapy. **5**, 378–389 (2015).
 208. Kallio, P. J., Pongratz, I., Gradin, K., McGuire, J. & Poellinger, L. Activation of hypoxia-inducible factor 1 α : posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 5667–72 (1997).
 209. Salceda, S. & Caro, J. Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. *J. Biol. Chem.* **272**, 22642–22647 (1997).
 210. Bruick, R. K. & McKnight, S. L. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science (80-)*. **294**, 1337–1340 (2001).
 211. Epstein, A. C. R. *et al.* C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* **107**, 43–54 (2001).
 212. Jeong, J. W. *et al.* Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell* **111**, 709–720 (2002).

213. Ivan, M. *et al.* HIF α Targeted for VHL-Mediated Destruction by Proline Hydroxylation: Implications for O₂ Sensing. *Science* (80-.). **292**, 464–468 (2001).
214. Maxwell, P. H. *et al.* The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* **399**, 271–275 (1999).
215. Lando, D., Peet, D. J., Whelan, D. A., Gorman, J. J. & Whitelaw, M. L. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain: A hypoxic switch. *Science* (80-.). **295**, 858–861 (2002).
216. Laughner, E., Taghavi, P., Chiles, K., Mahon, P. C. & Semenza, G. L. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) synthesis: Novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 3995–4004 (2001).
217. Choi, Y. K. *et al.* Carbon monoxide promotes VEGF expression by increasing HIF-1 α protein level via two distinct mechanisms, translational activation and stabilization of HIF-1 α protein. *J. Biol. Chem.* **285**, 32116–32125 (2010).
218. Lim, J. H. *et al.* Ras-dependent induction of HIF-1 α 785 via the Raf/MEK/ERK pathway: a novel mechanism of Ras-mediated tumor promotion. *Oncogene*. **23**, 9427–9431 (2004).
219. Sang, N. *et al.* MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300. *J. Biol. Chem.* **278**, 14013–14019 (2003).
220. Samelko, L. *et al.* Cobalt-alloy implant debris induce HIF-1 a hypoxia associated responses : A mechanism for metal-specific orthopedic implant failure. *PLoS One* **8**, 1–7 (2013).
221. Busch, W., Kühnel, D., Schirmer, K. & Scholz, S. Tungsten carbide cobalt nanoparticles exert hypoxia-like effects on the gene expression level in human keratinocytes. (2010).
222. Kaczmarek, M. *et al.* Metal ions-stimulated iron oxidation in hydroxylases facilitates stabilization of HIF-1 α protein. *Toxicol. Sci.* **107**, 394–403 (2009).
223. Yuan, Y., Hilliard, G., Ferguson, T. & Millhorn, D. E. Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor- α and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor- α . *J. Biol. Chem.* **278**, 15911–15916 (2003).
224. Eurlings, I. M. J. *et al.* Cigarette smoke extract induces a phenotypic shift in epithelial cells ; involvement of HIF1 α in mesenchymal transition. *PLoS One* **9**, 1–11 (2014).
225. Yu, H., Li, Q., Kolosov, V. P., Perelman, J. M. & Zhou, X. Regulation of cigarette smoke-mediated mucin expression by hypoxia-inducible factor-1 α via epidermal growth factor receptor-mediated signaling pathways. *J. Appl. Toxicol.* **32**, 282–292 (2012).
226. Jiang, H., Zhu, Y., Xu, H., Sun, Y. & Li, Q. Activation of hypoxia-inducible factor-1 α via nuclear factor- κ B in rats with chronic obstructive pulmonary disease. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **42**, 483–488 (2010).
227. Feng, S., Gao, D., Liao, F., Zhou, F. & Wang, X. The health effects of ambient PM_{2.5} and potential mechanisms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **128**, 67–74 (2016).
228. Falcon-Rodriguez, C. I., Osornio-Vargas, A. R., Sada-Ovalle, I. & Segura-Medina, P. Aeroparticles, composition, and lung diseases. *Front. Immunol.* **7**, 3 (2016).
229. Deng, X. *et al.* PM_{2.5}-induced oxidative stress triggers autophagy in human lung epithelial A549 cells. *Toxicol. Vitro.* **27**, 1762–1770 (2013).
230. Zong, W. & Thompson, C. B. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.* **20**, 1–15 (2006).
231. Carling, D. AMPK signalling in health and disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* **45**, 31–37 (2017).
232. Herzig, S. & Shaw, R. J. AMPK: Guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 121–135 (2018).

-
233. Hardie, D. G., Ross, F. A. & Hawley, S. A. AMPK: A nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 251–262 (2012).
234. Liu, R. & Proud, C. G. Eukaryotic elongation factor 2 kinase as a drug target in cancer, and in cardiovascular and neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol. Sin.* **37**, 285–294 (2016).
235. Zhu, H. *et al.* Eukaryotic elongation factor 2 kinase confers tolerance to stress conditions in cancer cells. *Cell Stress Chaperones* **20**, 217–220 (2015).
236. Kim, E. K. & Choi, E.-J. Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. *Arch. Toxicol.* **89**, 867–882 (2015).
237. Cargnello, M. & Roux, P. P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **75**, 50–83 (2011).
238. Fritsch-Decker, S. *et al.* Regulation of the arachidonic acid mobilization in macrophages by combustion-derived particles. *Part. Fibre Toxicol.* **8**, 23 (2011).
239. Lee, T. *et al.* Wood smoke extract promotes both apoptosis and proliferation in rat alveolar epithelial type II cells: the role of oxidative stress and heme oxygenase-1. *Crit. Care Med.* **36**, 2597–2606 (2008).
240. Yang, S. X., Polley, E. & Lipkowitz, S. New insights on PI3K/AKT pathway alterations and clinical outcomes in breast cancer. *Cancer Treat. Rev.* **45**, 87–96 (2016).
241. Vivanco, I. & Sawyers, C. The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* **2(7)**, 489–501 (2002).
242. Rubio, V., Valverde, M. & Rojas, E. Effects of atmospheric pollutants on the Nrf2 survival pathway. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **17**, 369–82 (2010).
243. Wu, C. C. *et al.* Upregulation of endothelial heme oxygenase-1 expression through the activation of the JNK pathway by sublethal concentrations of acrolein. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **214**, 244–252 (2006).
244. Keum, Y. S. *et al.* Mechanism of action of sulforaphane: Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms contributing to the induction of antioxidant response element-mediated heme oxygenase-1 in human hepatoma HepG2 cells. *Cancer Res.* **66**, 8804–8813 (2006).
245. Lee, B. H., Hsu, W. H., Hsu, Y. W. & Pan, T. M. Dimerumic acid attenuates receptor for advanced glycation endproducts signal to inhibit inflammation and diabetes mediated by Nrf2 activation and promotes methylglyoxal metabolism into d-lactic acid. *Free Radic. Biol. Med.* **60**, 7–16 (2013).
246. Morris, G. *et al.* The glutathione system: A new drug target in neuroimmune disorders. *Mol. Neurobiol.* **50**, 1059–1084 (2014).
247. Aquilano, K., Baldelli, S. & Ciriolo, M. R. Glutathione: New roles in redox signalling for an old antioxidant. *Front. Pharmacol.* **5 AUG**, 1–12 (2014).
248. Gorrini, C., Harris, I. S. & Mak, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 931–47 (2013).
249. Gozzelino, R., Jeney, V. & Soares, M. P. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **50**, 323–354 (2010).
250. Dornhof, R. *et al.* Stress fibers, autophagy and necrosis by persistent exposure to PM2.5 from biomass combustion. *PLoS One* **12**, 1–20 (2017).
251. Liu, X., Xue, Y., Ding, T. & Sun, J. Enhancement of proinflammatory and procoagulant responses to silica particles by monocyte-endothelial cell interactions. *Part. Fibre Toxicol.* **9**, 1–15 (2012).
-

252. Gualtieri, M. *et al.* Winter fine particulate matter from Milan induces morphological and functional alterations in human pulmonary epithelial cells (A549). *Toxicol. Lett.* **188**, 52–62 (2009).
253. Wang, L. *et al.* Use of synchrotron radiation-analytical techniques to reveal chemical origin of silver-nanoparticle cytotoxicity. *ACS Nano* **9**, 6532–6547 (2015).
254. Buckman, J. F. *et al.* MitoTracker labeling in primary neuronal and astrocytic cultures: Influence of mitochondrial membrane potential and oxidants. *J. Neurosci. Methods* **104**, 165–176 (2001).
255. Ciencewicki, J. & Jaspers, I. Air pollution and respiratory viral infection. *Inhal. Toxicol.* **19**, 1135–1146 (2007).
256. Fick, R. B., Paul, E. S., Merrill, W. W., Reynolds, H. Y. & Loke, J. S. O. Alterations in the antibacterial properties of rabbit pulmonary macrophages exposed to wood smoke. *Am. Rev. Respir. Dis.* **129**, 76–81 (1984).
257. Popadić, D. *et al.* Gene expression profiling of human bronchial epithelial cells exposed to fine particulate matter (PM2.5) from biomass combustion. *Manuskript Revis.*
258. Dandachi, N. *et al.* Macrophage elastase induces TRAIL-mediated tumor cell death through its carboxy-terminal domain. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **196**, 353–363 (2017).
259. Decock, J., Thirkettle, S., Wagstaff, L. & Edwards, D. R. Matrix metalloproteinases: Protective roles in cancer. *J. Cell. Mol. Med.* **15**, 1254–1265 (2011).
260. Castro, M. *et al.* Multiplexed methylation profiles of tumor suppressor genes and clinical outcome in lung cancer. *J. Transl. Med.* **8**, (2010).
261. Finnberg, N. & El-Deiry, W. S. TRAIL death receptors as tumor suppressors and drug targets. *Cell Cycle* **7**, 1525–1528 (2008).
262. Spalding, A. C. *et al.* TRAIL and inhibitors of apoptosis are opposing determinants for NF-kappaB-dependent, genotoxin-induced apoptosis of cancer cells. *Oncogene* **21**, 260–271 (2002).
263. Ulitsky, I. *et al.* Expander: From expression microarrays to networks and functions. *Nat. Protoc.* **5**, 303–322 (2010).
264. Merchant, M., Arellano, L. & Safe, S. The mechanism of action of alpha-naphthoflavone as an inhibitor of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced CYP1A1 gene expression. *Arch. Biochem. Biophys.* **281**, 84–9 (1990).
265. Merchant, M., Krishnan, V. & Safe, S. Mechanism of action of alpha-naphthoflavone as an Ah receptor antagonist in MCF-7 human breast cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **120**, 179–85 (1993).
266. Zhao, B., DeGroot, D. E., Hayashi, A., He, G. & Denison, M. S. CH223191 is a ligand-selective antagonist of the Ah (dioxin) receptor. *Toxicol. Sci.* **117**, 393–403 (2010).
267. Murray, I. A. *et al.* Antagonism of aryl hydrocarbon receptor signaling by 6,2',4'-trimethoxyflavone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **332**, 135–144 (2010).
268. Komatsu, D. E. & Hadjiargyrou, M. Activation of the transcription factor HIF-1 and its target genes, VEGF, HO-1, iNOS, during fracture repair. *Bone* **34**, 680–688 (2004).
269. Lee, P. J. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J. Biol. Chem.* **272**, 5375–5381 (1997).
270. Kuleshov, M. V *et al.* Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res.* **44**, W90–W97 (2016).
271. WebGestalt (WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit). at

- <http://www.webgestalt.org/webgestalt_2013/>
272. Wang, J., Duncan, D., Shi, Z. & Zhang, B. WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. *Nucleic Acids Res.* **41**, 77–83 (2013).
 273. Whirl-Carrillo, M. *et al.* Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. *Clin. Pharmacol. Ther.* **92**, 414–417 (2012).
 274. Heerboth, S. *et al.* Use of epigenetic drugs in disease: An overview. *Genet. Epigenetics* **1**, 9–19 (2014).
 275. Panni, T. *et al.* Genome-wide analysis of DNA methylation and fine particulate matter air pollution in three study populations: KORA F3, KORA F4, and the normative aging study. *Environ. Health Perspect.* **124**, 983–990 (2016).
 276. Bellavia, A. *et al.* DNA hypomethylation, ambient particulate matter, and increased blood pressure: Findings from controlled human exposure experiments. *J. Am. Heart Assoc.* **2**, (2013).
 277. Bruniquel, D. & Schwartz, R. H. Selective, stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process. *Nat. Immunol.* **4**, 235–240 (2003).
 278. Guo, L. *et al.* Effects of short-term exposure to inhalable particulate matter on DNA methylation of tandem repeats. *Environ. Andmolecularmutagenes.* **55**, 322–335 (2014).
 279. Sandoval, J. *et al.* Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome. *Epigenetics* **6**, 692–702 (2011).
 280. Wagner, J. M. & Jung, M. Lesezeichen im Buch des Lebens. *Pharm. Unserer Zeit* **39**, 176–182 (2010).
 281. The human disease methylation database. at <<http://www.bio-bigdata.com/diseasemeth/>>
 282. Raies, A. Bin, Mansour, H., Incitti, R. & Bajic, V. B. DDMGD: the database of text-mined associations between genes methylated in diseases from different species. *Nucleic Acids Research* **43**, D879–D886 (2015).
 283. GeneCards - Human Genes | Gene Database | Gene Search. at <<http://www.genecards.org/>>
 284. Lambeth, J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 181–189 (2004).
 285. Tollefson, A. K. *et al.* Endogenous enzymes (NOX and ECSOD) regulate smoke-induced oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 1937–1946 (2010).
 286. Uski, O. *et al.* Effect of fuel zinc content on toxicological responses of particulate matter from pellet combustion in vitro. *Sci. Total Environ.* **511**, 331–340 (2015).
 287. Happo, M. *et al.* Seasonal variation in the toxicological properties of size-segregated indoor and outdoor air particulate matter. *Toxicol. Vitro.* **27**, 1550–1561 (2013).
 288. Hartigh, L. J. den *et al.* Endotoxin and polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient fine particulate matter from Fresno, California initiate human monocyte inflammatory responses mediated by reactive oxygen species. *Toxicol. Vitro.* **24**, 1993–2002 (2010).
 289. Nel, A., Xia, T., Mädler, L. & Li, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* **311**, 622–627 (2006).
 290. de Kok, T. M. C. M., Drieste, H. a L., Hogervorst, J. G. F. & Briedé, J. J. Toxicological assessment of ambient and traffic-related particulate matter: A review of recent studies. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* **613**, 103–122 (2006).
 291. Danielsen, P. H., Loft, S., Kocbach, A., Schwarze, P. E. & Møller, P. Oxidative damage to DNA and repair induced by Norwegian wood smoke particles in human A549 and THP-1 cell

- lines. *Mutat. Res.* **674**, 116–22 (2009).
292. Longhin, E. *et al.* Cell cycle alterations induced by urban PM_{2.5} in bronchial epithelial cells: characterization of the process and possible mechanisms involved. *Part. Fibre Toxicol.* **10**, 63 (2013).
293. Uski, O. *et al.* Different toxic mechanisms are activated by emission PM depending on combustion efficiency. *Atmos. Environ.* **89**, 623–632 (2014).
294. Jalava, P. I. *et al.* Effect of combustion condition on cytotoxic and inflammatory activity of residential wood combustion particles. *Atmos. Environ.* **44**, 1691–1698 (2010).
295. Torvela, T. *et al.* Reference particles for toxicological studies of wood combustion: Formation, characteristics, and toxicity compared to those of real wood combustion particulate mass. *Chem. Res. Toxicol.* **27**, 1516–1527 (2014).
296. Horman, S. *et al.* Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of elongation factor 2 and an inhibition of protein synthesis. *Curr. Biol.* **12**, 1419–1423 (2002).
297. Ko, H. K. *et al.* Regulation of cigarette smoke induction of IL-8 in macrophages by amp-activated protein kinase signaling. *J. Cell. Physiol.* **230**, 1781–1793 (2015).
298. Schieber, M. & Chandel, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.* **24**, R453–R462 (2014).
299. D’Autréaux, B. & Toledano, M. B. ROS as signalling molecules: Mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 813–824 (2007).
300. Li, J., Miller, E. J., Ninomiya-Tsuji, J., Russell, R. R. & Young, L. H. AMP-activated protein kinase activates p38 mitogen-activated protein kinase by increasing recruitment of p38 MAPK to TAB1 in the ischemic heart. *Circ. Res.* **97**, 872–879 (2005).
301. Watterson, T. L., Hamilton, B., Martin, R. S. & Coulombe, R. A. Urban particulate matter activates Akt in human lung cells. *Arch. Toxicol.* **86**, 121–135 (2012).
302. Rui, W., Guan, L., Zhang, F., Zhang, W. & Ding, W. PM_{2.5} -induced oxidative stress increases adhesion molecules expression in human endothelial cells through the ERK/AKT/NF- κ B-dependent pathway. *J. Appl. Toxicol.* 48–59 (2015). doi:10.1002/jat.3143
303. Lin, X. *et al.* Cigarette smoke extract-induced BEAS-2B cell apoptosis and anti-oxidative Nrf-2 up-regulation are mediated by ROS-stimulated p38 activation. *Toxicol. Mech. Methods* **6516**, 575–583 (2014).
304. Kubátová, A., Dronen, L. C., Picklo, M. J. & Hawthorne, S. B. Midpolarity and nonpolar wood smoke particulate matter fractions deplete glutathione in RAW 264.7 macrophages. *Chem. Res. Toxicol.* **19**, 255–261 (2006).
305. Pavagadhi, S., Betha, R., Venkatesan, S., Balasubramanian, R. & Hande, M. P. Physicochemical and toxicological characteristics of urban aerosols during a recent Indonesian biomass burning episode. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **20**, 2569–2578 (2013).
306. Sehlstedt, M. *et al.* Antioxidant airway responses following experimental exposure to wood smoke in man. *Part. Fibre Toxicol.* **7**, 21 (2010).
307. Chan, J. K. W. *et al.* Age-specific effects on rat lung glutathione and antioxidant enzymes after inhaling ultrafine soot. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **48**, 114–124 (2013).
308. Nemmar, A. *et al.* Diesel exhaust particles induce impairment of vascular and cardiac homeostasis in mice: Ameliorative effect of emodin. *Cell. Physiol. Biochem.* **36**, 1517–1526 (2015).
309. Al-Humadi, N. H. *et al.* Alteration of intracellular cysteine and glutathione levels in alveolar macrophages and lymphocytes by diesel exhaust particle exposure. *Environ. Health Perspect.*

- 110**, 349–353 (2002).
310. Constantin, M., Choi, A. J. S., Cloonan, S. M. & Ryter, S. W. Therapeutic potential of heme oxygenase-1/carbon monoxide in lung disease. *Int. J. Hypertens.* **2012**, (2012).
311. Loboda, A., Damulewicz, M., Pyza, E., Jozkowicz, A. & Dulak, J. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 3221–3247 (2016).
312. Cheng, S. E., Lee, I. T., Lin, C. C., Kou, Y. R. & Yang, C. M. Cigarette smoke particle-phase extract induces HO-1 expression in human tracheal smooth muscle cells: Role of the c-Src/NADPH oxidase/MAPK/Nrf2 signaling pathway. *Free Radic. Biol. Med.* **48**, 1410–1422 (2010).
313. Ryter, S. W., Alam, J. & Choi, A. M. K. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: From basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* **86**, 583–650 (2006).
314. Lawal, A. O., Zhang, M., Dittmar, M., Lulla, A. & Araujo, J. a. Heme oxygenase-1 protects endothelial cells from the toxicity of air pollutant chemicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **284**, 281–291 (2015).
315. Zhao, F. *et al.* Cellular uptake, intracellular trafficking, and cytotoxicity of nanomaterials. *Small* **7**, 1322–1337 (2011).
316. Stern, S. T., Adisheshaiah, P. P. & Crist, R. M. Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. *Part. Fibre Toxicol.* **9**, (2012).
317. Premshkharan, G., Nguyen, K., Zhang, H., Forman, H. J. & Leppert, V. J. Low dose inflammatory potential of silica particles in human-derived THP-1 macrophage cell culture studies – Mechanism and effects of particle size and iron. *Chem. Biol. Interact.* **272**, 160–171 (2017).
318. Kim, S. *et al.* Cytotoxicity of, and innate immune response to, size-controlled polypyrrole nanoparticles in mammalian cells. *Biomaterials* **32**, 2342–2350 (2011).
319. Tao, Z., Toms, B. B., Goodisman, J. & Asefa, T. Mesoporosity and functional group dependent endocytosis and cytotoxicity of silica nanomaterials. *Chem. Res. Toxicol.* **22**, 1869–1880 (2009).
320. Herd, H. L., Malugin, A. & Ghandehari, H. Silica nanoconstruct cellular toleration threshold in vitro. *J. Control. Release* **153**, 40–48 (2011).
321. Wan, B. *et al.* Single-walled carbon nanotubes and graphene oxides induce autophagosome accumulation and lysosome impairment in primarily cultured murine peritoneal macrophages. *Toxicol. Lett.* **221**, 118–127 (2013).
322. Klionsky, D. J. Autophagy: From phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 931–937 (2007).
323. He, C. & Klionsky, D. J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 67–93 (2009).
324. Hiura, T. S. *et al.* The role of a mitochondrial pathway in the induction of apoptosis by chemicals extracted from diesel exhaust particles. *J. Immunol.* **165**, 2703–2711 (2000).
325. Xia, T. *et al.* Quinones and aromatic chemical compounds in particulate matter induce mitochondrial dysfunction: Implications for ultrafine particle toxicity. *Environ. Health Perspect.* **112**, 1347–1358 (2004).
326. Suomalainen, A. & Battersby, B. J. Mitochondrial diseases: the contribution of organelle stress responses to pathology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2017). doi:10.1038/nrm.2017.66
327. Li, N., Xia, T. & Nel, A. E. The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced

- lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. *Free Radic. Biol. Med.* **44**, 1689–1699 (2008).
328. Upadhyay, D., Panduri, V., Ghio, A. & Kamp, D. W. Particulate matter induces alveolar epithelial cell DNA damage and apoptosis role of free radicals and the mitochondria. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **29**, 180–187 (2003).
329. Li, N. *et al.* Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ. Health Perspect.* **111**, 455–460 (2003).
330. Brody, J. S. Transcriptome alterations induced by cigarette smoke. *Int. J. Cancer* **131**, 2754–2762 (2012).
331. Zhou, Z. *et al.* Transcriptomic analyses of the biological effects of airborne PM_{2.5} exposure on human bronchial epithelial cells. *PLoS One* **10**, 1–18 (2015).
332. Kumar, R. K. *et al.* Differential injurious effects of ambient and traffic-derived particulate matter on airway epithelial cells. *Respirology* **20**, 73–79 (2015).
333. Gauggel-Lewandowski, S. *et al.* Bioavailability and potential carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons from wood combustion particulate matter in vitro. *Chem. Biol. Interact.* **206**, 411–422 (2013).
334. Achten, C., Beer, F. T., Stader, C. & Brinkhaus, S. G. Wood-specific polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) patterns in soot using gas chromatography-atmospheric pressure laser ionization-mass spectrometry (GC-APLI-MS). *Environ. Forensics* **16**, 42–50 (2015).
335. WHO - IARC. *Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans* **92**, (2010).
336. California Air Resources Board & Office of Environmental Health Hazard-Assessment. *Benzo[a]pyrene as a toxic air contaminant.* (1994). at <http://oehha.ca.gov/air/toxic_contaminants/html/benzo%5Ba%5Dpyrene.htm>
337. Greim, H. *Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe. Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten und Einstufungen.* (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008).
338. Bergvall, C. & Westerholm, R. Identification and determination of highly carcinogenic dibenzopyrene isomers in air particulate samples from a street canyon, a rooftop, and a subway station in Stockholm. *Environ. Sci. Technol.* **41**, 731–737 (2007).
339. Samburova, V., Zielinska, B. & Khlystov, A. Do 16 polycyclic aromatic hydrocarbons represent PAH air toxicity? *Toxics* **5**, 17 (2017).
340. Busby, W. F., Stevens, E. K., Martin, C. N., Chow, F. L. & Garner, R. C. Comparative lung tumorigenicity of parent and mononitro-polynuclear aromatic hydrocarbons in the BLU:Ha newborn mouse assay. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **99**, 555–563 (1989).
341. Hoffmann, D., Rathkamp, G., Nesnow, S. & Wynder, E. L. Fluoranthenes: Quantitative determination in cigarette smoke, formation by pyrolysis, and tumor-initiating activity. *J. Natl. Cancer Inst.* **49**, 1165–1175 (1972).
342. Lavoie, E. J., Cai, Z. W., Meschter, C. L. & Weyand, E. H. Tuimorigenic activity of fluoranthene, 2-methylfluoranthene and 3-methylfluoranthene in newborn CD-1 mice. *Carcinogenesis* **15**, 2131–2135 (1994).
343. Van-Duuren, B. L. & Goldschmidt, B. M. Cocarcinogenic and tumor promoting agents in tobacco carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* **56**, 1237–1242 (1976).
344. Huang, M. C., Chen, F. Y., Chou, M. T. & Su, J. G. J. Fluoranthene enhances p53 expression and decreases mutagenesis induced by benzo[a]pyrene. *Toxicol. Lett.* **208**, 214–224 (2012).

-
345. Barranco, A., Escudero, L., Sanz Landaluze, J. & Rainieri, S. Detection of exposure effects of mixtures of heavy polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish embryos. *J. Appl. Toxicol.* **37**, 253–264 (2017).
346. Hessel, S., Lampen, A. & Seidel, A. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food - Efflux of the conjugated biomarker 1-hydroxypyrene is mediated by breast cancer resistance protein (ABCG2) in human intestinal Caco-2 cells. *Food Chem. Toxicol.* **62**, 797–804 (2013).
347. Machala, M., Vondráček, J., Bláha, L., Ciganek, M. & Neča, J. Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons determined using in vitro reporter gene assay. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **497**, 49–62 (2001).
348. Martins, M. *et al.* Effects of carcinogenic versus non-carcinogenic AHR-active PAHs and their mixtures: Lessons from ecological relevance. *Environ. Res.* **138**, 101–111 (2015).
349. Vondráček, J. *et al.* Assessment of the aryl hydrocarbon receptor-mediated activities of polycyclic aromatic hydrocarbons in a human cell-based reporter gene assay. *Environ. Pollut.* **220**, 307–316 (2017).
350. Jayasundara, N., Van Tiem Garner, L., Meyer, J. N., Erwin, K. N. & Di Giulio, R. T. AHR2-mediated transcriptomic responses underlying the synergistic cardiac developmental toxicity of PAHs. *Toxicol. Sci.* **143**, 469–481 (2015).
351. Líbalová, H. *et al.* Analysis of gene expression changes in A549 cells induced by organic compounds from respirable air particles. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **770**, 94–105 (2014).
352. Totlandsdal, A. I. *et al.* The occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives and the proinflammatory potential of fractionated extracts of diesel exhaust and wood smoke particles. *J. Environ. Sci. Health. A. Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* **49**, 383–96 (2014).
353. Stockinger, B., Meglio, P. Di, Gialitakis, M. & Duarte, J. H. The aryl hydrocarbon receptor: Multitasking in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 403–432 (2014).
354. Hong, S. *et al.* Effect-directed analysis and mixture effects of AhR-active PAHs in crude oil and coastal sediments contaminated by the Hebei Spirit oil spill. *Environ. Pollut.* **199**, 110–118 (2015).
355. Hong, S. *et al.* Two years after the hebei spirit oil spill: Residual crude-derived hydrocarbons and potential AhR-mediated activities in coastal sediments. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 1406–1414 (2012).
356. Kaisarevic, S. *et al.* Effect-directed analysis of contaminated sediment from the wastewater canal in Pancevo industrial area, Serbia. *Chemosphere* **77**, 907–913 (2009).
357. DiNatale, B. C., Schroeder, J. C., Francey, L. J., Kusnadi, A. & Perdew, G. H. Mechanistic insights into the events that lead to synergistic induction of interleukin 6 transcription upon activation of the aryl hydrocarbon receptor and inflammatory signaling. *J. Biol. Chem.* **285**, 24388–24397 (2010).
358. John, K., Lahoti, T. S., Wagner, K., Hughes, J. M. & Perdew, G. H. The Ah Receptor regulates growth factor expression in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Mol. Carcinog.* **53**, 765–776 (2014).
359. Nebert, D. W., Dalton, T. P., Okey, A. B. & Gonzalez, F. J. Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J. Biol. Chem.* **279**, 23847–23850 (2004).
360. Patel, R. D., Kim, D. J., Peters, J. M. & Perdew, G. H. The aryl hydrocarbon receptor directly regulates expression of the potent mitogen epiregulin. *Toxicol. Sci.* **89**, 75–82 (2006).
-

361. Binková, B. & Šrám, R. J. The genotoxic effect of carcinogenic PAHs, their artificial and environmental mixtures (EOM) on human diploid lung fibroblasts. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **547**, 109–121 (2004).
362. Popadić, D. The effect of fine particulate matter from biomass combustion on the gene expression profile of BEAS-2B lung cells. (Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, 2017).
363. Lavric, E. D., Konnov, A. A. & De Ruyck, J. Dioxin levels in wood combustion - A review. *Biomass and Bioenergy* **26**, 115–145 (2004).
364. Su, R. *et al.* Particulate matter exposure induces the autophagy of macrophages via oxidative stress-mediated PI3K/AKT/mTOR pathway. *Chemosphere* **167**, 444–453 (2017).
365. Dornhof, R. Biologische Langzeiteffekte von Feinstaubemissionen aus der Biomasseverbrennung in humanen Bronchialepithelzellen. (Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, 2017).
366. Basak, P., Sadhukhan, P., Sarkar, P. & Sil, P. C. Perspectives of the Nrf-2 signaling pathway in cancer progression and therapy. *Toxicol. Reports* **4**, 306–318 (2017).
367. Cho, H. Y. & Kleeberger, S. R. Nrf2 protects against airway disorders. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **244**, 43–56 (2010).
368. Zhao, H., Eguchi, S., Alam, A. & Ma, D. The role of Nuclear factor-erythroid 2 related factor 2 (Nrf-2) in the protection against lung injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* [ajplung.00449.2016](https://doi.org/10.1152/ajplung.00449.2016) (2016). doi:10.1152/ajplung.00449.2016
369. Lee, A., Kinney, P., Chillrud, S. & Jack, D. A systematic review of innate immunomodulatory effects of household air pollution secondary to the burning of biomass fuels. *Ann. Glob. Heal.* **81**, 368–374 (2015).
370. Kotenko, S. V. *et al.* IFN- λ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat. Immunol.* **4**, 69–77 (2003).
371. Gariano, G. R. *et al.* The intracellular DNA sensor IFI16 gene acts as restriction factor for human Cytomegalovirus replication. *PLoS Pathog.* **8**, (2012).
372. Gitlin, L. *et al.* Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 8459–64 (2006).
373. Diamond, M. S. & Farzan, M. The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 46–57 (2012).
374. Haller, O., Staeheli, P., Schwemmle, M. & Kochs, G. Mx GTPases: Dynamine-like antiviral machines of innate immunity. *Trends Microbiol.* **23**, 154–163 (2015).
375. Lin, R.-J. *et al.* Distinct antiviral roles for human 2',5'-oligoadenylate synthetase family members against dengue virus infection. *J. Immunol.* **183**, 8035–8043 (2009).
376. Chen, N. *et al.* RNA sensors of the innate immune system and their detection of pathogens. *IUBMB Life* **69**, 297–304 (2017).
377. Villard, P. H. *et al.* Effect of cigarette smoke on UDP-glucuronosyltransferase activity and cytochrome P450 content in liver, lung and kidney microsomes in mice. *Pharmacol. Toxicol.* **82**, 74–9 (1998).
378. Strassburg, C. P., Lankisch, T. O., Manns, M. P. & Ehmer, U. Family 1 uridine-5'-diphosphate glucuronosyltransferases (UGT1A): From Gilbert's syndrome to genetic organization and variability. *Arch. Toxicol.* **82**, 415–433 (2008).
379. Akkari, L. *et al.* Combined deletion of cathepsin protease family members reveals compensatory mechanisms in cancer. *Genes Dev.* **30**, 220–232 (2016).

-
380. Wu, J. & Wei, J. J. HMGA2 and high-grade serous ovarian carcinoma. *J. Mol. Med.* **91**, 1155–1165 (2013).
381. Ajani, J. A., Song, S., Hochster, H. S. & Steinberg, I. B. Cancer stem cells: The promise and the potential. *Semin. Oncol.* **42**, S3–S17 (2015).
382. Jang, A.-S. in *Air Pollution - A Comprehensive Perspective* (ed. Haryanto, B.) 153–174 (InTech, 2012). doi:10.5772/51363
383. Upadhyay, S., Ganguly, K. & Stoeger, T. Inhaled ambient particulate matter and lung health burden. *EMJ Respir* **2**, 88–95 (2014).
384. Torres-Duque, C., Maldonado, D., Perez-Padilla, R., Ezzati, M. & Viegi, G. Biomass fuels and respiratory diseases: A review of the evidence. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **5**, 577–590 (2008).
385. Costello, C. M., Cahill, E., Martin, F., Gaine, S. & McLoughlin, P. Role of gremlin in the lung: Development and disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **42**, 517–523 (2010).
386. Costello, C. M. *et al.* Lung-selective gene responses to alveolar hypoxia: potential role for the bone morphogenetic antagonist gremlin in pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **295**, L272–84 (2008).
387. Myllärniemi, M. *et al.* Gremlin-mediated decrease in bone morphogenetic protein signaling promotes pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **177**, 321–329 (2008).
388. Rabolli, V., Lison, D. & Huaux, F. The complex cascade of cellular events governing inflammasome activation and IL-1 β processing in response to inhaled particles. *Part. Fibre Toxicol.* **13**, 40 (2015).
389. Riese, D. J. & Cullum, R. L. Eprexulin: Roles in normal physiology and cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* **28**, 49–56 (2014).
390. Brazel, A. J. & Vernimmen, D. The complexity of epigenetic diseases. *J. Pathol.* **238**, 333–344 (2016).
391. Li, E. & Zhang, Y. DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, (2014).
392. Han, H. *et al.* DNA methylation directly silences genes with non-CpG island promoters and establishes a nucleosome occupied promoter. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 4299–4310 (2011).
393. Gupta, G. P. & Massagué, J. Cancer metastasis: Building a framework. *Cell* **127**, 679–695 (2006).
394. Yeager, C. L. *et al.* Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature* **357**, 420–2 (1992).
395. Logan, J. *et al.* Brief exposure to cigarette smoke impairs airway epithelial cell innate anti-viral defence. *Toxicol. Vitro.* **28**, 1430–1435 (2014).
396. Zhou, F., Onizawa, S., Nagai, A. & Aoshiba, K. Epithelial cell senescence impairs repair process and exacerbates inflammation after airway injury. *Respir. Res.* **12**, 1–18 (2011).
397. Ingram, J. & Bonner, J. EGF and PDGF receptor tyrosine kinases as therapeutic targets for chronic lung diseases. *Curr. Mol. Med.* **6**, 409–421 (2006).
398. Cercone, M. a, Schroeder, W., Schomberg, S. & Carpenter, T. C. EphA2 receptor mediates increased vascular permeability in lung injury due to viral infection and hypoxia. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **297**, L856–63 (2009).
399. Funk, S. D. *et al.* EphA2 activation promotes the endothelial cell inflammatory response a potential role in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 686–695 (2012).
-

400. Takada, Y. *et al.* Interstitial lung disease induced by gefitinib and Toll-like receptor ligands is mediated by Fra-1. *Oncogene* **30**, 3821–3832 (2011).
401. Gela, A. *et al.* Osteopontin that is elevated in the airways during COPD impairs the antibacterial activity of common innate antibiotics. *PLoS One* **11**, 1–14 (2016).
402. Springer, J., Scholz, F. R., Peiser, C., Groneberg, D. A. & Fischer, A. SMAD-signaling in chronic obstructive pulmonary disease: Transcriptional down-regulation of inhibitory SMAD 6 and 7 by cigarette smoke. *Biol. Chem.* **385**, 649–653 (2004).
403. Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J. & Nieto, M. A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**, 871–890 (2009).
404. Vendramini-Costa, D. B. & E. Carvalho, J. Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. *Curr. Pharm. Des.* **18**, 3831–3852 (2012).
405. Lauer, F. T. *et al.* Temporal-spatial analysis of U.S.-Mexico border environmental fine and coarse PM air sample extract activity in human bronchial epithelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **238**, 1–10 (2009).
406. Reyes-Zárate, E. *et al.* Atmospheric particulate matter (PM10) exposure-induced cell cycle arrest and apoptosis evasion through STAT3 activation via PKC ζ and Src kinases in lung cells. *Environ. Pollut.* **214**, 646–656 (2016).
407. Chen, L. *et al.* Effects of cigarette smoke extract on human airway smooth muscle cells in COPD. *Eur. Respir. J.* **44**, 634–646 (2014).
408. Huang, S.-K., Zhang, Q., Qiu, Z. & Chung, K. F. Mechanistic impact of outdoor air pollution on asthma and allergic diseases. *J. Thorac. Dis.* **7**, 23–33 (2015).
409. Huang, Y.-C. T. *et al.* Fine ambient particles induce oxidative stress and metal binding genes in human alveolar macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **41**, 544–552 (2009).
410. Hamad, S. H., Schauer, J. J., Antkiewicz, D. S., Shafer, M. M. & Kadhim, A. K. H. ROS production and gene expression in alveolar macrophages exposed to PM2.5 from Baghdad, Iraq: Seasonal trends and impact of chemical composition. *Sci. Total Environ.* **543**, 739–745 (2016).
411. Teramen, H. *et al.* Aberrant methylation of p21 gene in lung cancer and malignant pleural mesothelioma. *Acta Med. Okayama* **65**, 179–184 (2011).
412. Fan, S.-H. *et al.* AGPAT9 suppresses cell growth, invasion and metastasis by counteracting acidic tumor microenvironment through KLF4/ LASS2/V-ATPase signaling pathway in breast cancer. *Oncotarget* **6**, (2015).
413. Ito, S. *et al.* Stromal aminopeptidase N expression: Correlation with angiogenesis in non-small-cell lung cancer. *Gen. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **57**, 591–598 (2009).
414. Brady, J. J. *et al.* An Arnt12-driven secretome enables lung adenocarcinoma metastatic self-sufficiency. *Cancer Cell* **29**, 697–710 (2016).
415. Ince, N., de la Monte, S. M. & Wands, J. R. Overexpression of human aspartyl (asparaginy) b-hydroxylase is associated with malignant transformation. *Cancer Res.* **60**, 1261–1266 (2000).
416. Ettinger, D. S. Clinical Implications of EGFR expression in the development and progression of solid tumors: Focus on non-small cell lung cancer. *The Oncologist* **11**, 358–373 (2006).
417. Bocca, C. *et al.* Expression of Cox-2 in human breast cancer cells as a critical determinant of epithelial-to-mesenchymal transition and invasiveness. *Expert Opin. Ther. Targets* **18**, 121–135 (2014).
418. Lewerenz, J. *et al.* The cystine/glutamate antiporter system xc⁻ in health and disease: From

- Molecular mechanisms to novel therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* **18**, 522–555 (2013).
419. Kusakabe, M. *et al.* Identification of G0S2 as a gene frequently methylated in squamous lung cancer by combination of in silico and experimental approaches. *Int. J. Cancer* **126**, 1895–1902 (2010).
420. Shojaei, F. *et al.* Osteopontin induces growth of metastatic tumors in a preclinical model of non-small lung cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **31**, 1–12 (2012).
421. Chen, D. *et al.* LIFR is a breast cancer metastasis suppressor upstream of the Hippo-YAP pathway and a prognostic marker. *Nat. Med.* **18**, 1511–1517 (2012).
422. Fukuyama, R. *et al.* Mutated in colorectal cancer, a putative tumor suppressor for serrated colorectal cancer, selectively represses β -catenin-dependent transcription. *Oncogene* **27**, 6044–6055 (2008).
423. Chao, Y.-C. *et al.* Claudin-1 is a metastasis suppressor and correlates with clinical outcome in lung adenocarcinoma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **179**, 123–133 (2009).
424. Nuylan, M., Kawano, T., Inazawa, J. & Inoue, J. Down-regulation of LAPTM5 in human cancer cells. *Oncotarget* **7**, 28320–8 (2016).
425. Sharp, T. V *et al.* LIM domains-containing protein 1 (LIMD1), a tumor suppressor encoded at chromosome 3p21.3, binds pRB and represses E2F-driven transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 16531–6 (2004).
426. Haag, T., Richter, A. M., Schneider, M. B., Jiménez, A. P. & Dammann, R. H. The dual specificity phosphatase 2 gene is hypermethylated in human cancer and regulated by epigenetic mechanisms. *BMC Cancer* **16**, 1–12 (2016).
427. Kim, M. *et al.* Epigenetic down-regulation and suppressive role of DCBLD2 in gastric cancer cell proliferation and invasion. *Mol. Cancer Res.* **6**, 222–230 (2008).
428. Cortese, R., Hartmann, O., Berlin, K. & Eckhardt, F. Correlative gene expression and DNA methylation profiling in lung development nominate new biomarkers in lung cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 1494–1508 (2008).
429. Cho, Y. G. *et al.* Promoter methylation of leukemia inhibitory factor receptor gene in colorectal carcinoma. *Int. J. Oncol.* **39**, 337–344 (2011).
430. Goda, N. *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 α is essential for cell cycle arrest during hypoxia. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 359–69 (2003).
431. Lin, S. *et al.* Suppression of dual-specificity phosphatase – 2 by hypoxia increases chemoresistance and malignancy in human cancer cells. **121**, (2011).
432. Wang, W.-M. *et al.* Epidermal growth factor receptor inhibition reduces angiogenesis via hypoxia-inducible factor-1 α and notch1 in head neck squamous cell carcinoma. *PLoS One* **10**, e0119723 (2015).
433. Saarikoski, S. T., Rivera, S. P. & Hankinson, O. Are Inducible By Hypoxia. *FEBS Lett.* **530**, 186–190 (2002).
434. Jeong, C. H. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 α inhibits self-renewal of mouse embryonic stem cells in vitro via negative regulation of the leukemia inhibitory factor-STAT3 pathway. *J. Biol. Chem.* **282**, 13672–13679 (2007).
435. Xue, X. & Shah, Y. M. Hypoxia-inducible factor-2 α is essential in activating the COX2/mPGES-1/PGE2 signaling axis in colon cancer. *Carcinogenesis* **34**, 163–169 (2013).
436. Koukourakis, M. I. *et al.* Enhanced expression of SPARC/osteonectin in the tumor-associated stroma of non-small cell lung cancer is correlated with markers of hypoxia/acidity and with

- poor prognosis of patients. *Cancer Res.* **63**, 5376–5380 (2003).
437. Lindsey, S. & Langhans, S. A. *Epidermal growth factor signaling in transformed cells. International Review of Cell and Molecular Biology* **314**, (Elsevier Ltd, 2015).
438. Miyazono, K., Ehata, S. & Koinuma, D. Tumor-promoting functions of transforming growth factor- β in progression of cancer. *Ups. J. Med. Sci.* **117**, 143–152 (2012).
439. Schmalhofer, O., Brabletz, S. & Brabletz, T. E-cadherin, β -catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **28**, 151–166 (2009).
440. Tiwari, N., Gheldof, A., Tatari, M. & Christofori, G. EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells. *Semin. Cancer Biol.* **22**, 194–207 (2012).
441. Semenza, G. L. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* **29**, 625–634 (2010).
442. Reguera, J. *et al.* Structural bases of coronavirus attachment to host aminopeptidase N and its inhibition by neutralizing antibodies. *PLoS Pathog.* **8**, (2012).
443. Park, G. Y. & Christman, J. W. Involvement of cyclooxygenase-2 and prostaglandins in the molecular pathogenesis of inflammatory lung diseases. *Young* **290**, L797–L805 (2006).
444. Cassee, F. R., Héroux, M.-E., Gerlofs-Nijland, M. E. & Kelly, F. J. Particulate matter beyond mass: recent health evidence on the role of fractions, chemical constituents and sources of emission. *Inhal. Toxicol.* **25**, 802–812 (2013).
445. Tsuchiya, S. *et al.* Establishment and characterisation of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer* **26**, 171–176 (1980).
446. Tsuchiya, S. *et al.* Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer R* **42**, 1530–1536 (1982).
447. Paur, H. R., Mülhopt, S., Weiss, C. & Diabaté, S. In vitro exposure systems and bioassays for the assessment of toxicity of nanoparticles to the human lung. *J. Consum. Prot. Food Saf.* **3**, 319–329 (2008).
448. Reddel, R. R. *et al.* SV40-induced immortalization and ras-transformation of human bronchial epithelial cells. *Int. J. Cancer* **61**, 199–205 (1995).
449. Schulze, C. *et al.* Not ready to use - overcoming pitfalls when dispersing nanoparticles in physiological media. *Nanotoxicology* **2**, 51–61 (2008).
450. Okeson, C. D., Riley, M. R. & Riley-Saxton, E. In vitro alveolar cytotoxicity of soluble components of airborne particulate matter: effects of serum on toxicity of transition metals. *Toxicol. Vitro.* **18**, 673–680 (2004).
451. Geys, J., Nemery, B. & Hoet, P. H. M. Assay conditions can influence the outcome of cytotoxicity tests of nanomaterials: Better assay characterization is needed to compare studies. *Toxicol. Vitro.* **24**, 620–629 (2010).
452. Schreiber, E., Matthias, P., Müller, M. M. & Schaffner, W. Rapid detection of octamer binding proteins with ‘mini-extracts’, prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* **17**, 6419 (1989).
453. Smith, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76–85 (1985).
454. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
455. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).

456. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63 (1983).
457. Sieuwerts, A. M., Klijn, J. G. M., Peters, H. A. & Foekens, J. A. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: How to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **33**, 813–824 (1995).
458. Maeß, M. B., Wittig, B. & Lorkowski, S. Highly Efficient Transfection of Human THP-1 Macrophages by Nucleofection. *J. Vis. Exp.* **91**, 1–9 (2014).
459. Jacob, D. Erkennung von Regulationssequenzen für die Transkription in heterologen Systemen. (2003).
460. Schmittgen, T. D. & Livak, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* **3**, 1101–1108 (2008).
461. Heßelbach, K. *et al.* Disease relevant modifications of the methylome and transcriptome by particulate matter (PM2.5) from biomass combustion. *Epigenetics* **12**, 779–792 (2017).

7 Anhang

Tabelle 33: Alle signifikant hoch- und herunterregulierten Gene von BEAS-2B, die für fünf Wochen mit PM_{2.5} exponiert wurden, in alphabetischer Reihenfolge.

Gensymbol	Genname	PM _{2.5}	
		log ₂ FC	FC
<i>ABCB1</i>	ATP-Bindungskassette, Unterfamilie B (MDR/TAP), Mitglied 1	-1,22	0,43
<i>ACO1</i>	Aconitase 1, löslich	1,05	2,08
<i>ACOX2</i>	Acyl-CoA-Oxidase 2, verzweigtkettig	1,07	2,10
<i>ADGRE2</i>	Adhäsion G-Protein-gekoppelter Rezeptor E2	1,48	2,79
<i>AKR1C1</i>	Aldo-Keto-Reduktase Familie 1, Mitglied C1	1,53	2,89
<i>AKR1C2</i>	Aldo-Keto-Reduktase-Familie 1, Mitglied C2	1,66	3,16
<i>AKR1C3</i>	Aldo-Keto-Reduktase-Familie 1, Mitglied C3	1,25	2,38
<i>ALPP</i>	Alkalische Phosphatase, plazentarisch	-0,85	0,56
<i>ALPPL2</i>	Alkalische Phosphatase, plazentarisch ähnlich 2	-0,85	0,56
<i>AREG</i>	Amphiregulin	2,03	4,10
<i>ARHGAP18</i>	Rho GTPase aktivierendes Protein 18	-0,95	0,52
<i>ARL4C</i>	ADP-Ribosylierungsfaktor ähnliches Protein 4C	1,10	2,14
<i>ARNTL2</i>	Aryl-Kohlenwasserstoff-Rezeptor nuklärer Translokator ähnliches Protein 2	0,85	1,80
<i>ATOH8</i>	Atonal homolog 8 (<i>Drosophila</i>)	-1,22	0,43
<i>C1R</i>	Komplement Komponente 1, R Teilkomponente	-1,33	0,40
<i>C4A</i>	Komplement Komponente 4A (Rodgers Blutgruppe)	-1,57	0,34
<i>C4B</i>	Komplement Komponente 4B (Chido-Blutgruppe)	-1,57	0,34
<i>C4B_2</i>	Komplement Komponente 4B (Chido-Blutgruppe), Kopie 2	-1,57	0,34
<i>CACNB2</i>	spannungsabhängiger Calcium-Kanal, beta 2 Untereinheit	-1,01	0,50
<i>CASP1</i>	Caspase 1, Apoptose-verwandte Cysteinpeptidase	-1,19	0,44
<i>CCL2</i>	Chemokin (C-C-Motiv) Ligand 2	-1,68	0,31
<i>CCSAP</i>	Centriole, Cilia und Spindel-assoziiertes Protein	0,80	1,75
<i>CDCP1</i>	CUB-Domäne, die Protein 1 enthält	0,99	1,99
<i>CFB</i>	Komplementfaktor B	-1,05	0,48
<i>CFI</i>	Komplementfaktor I	-1,65	0,32
<i>COL13A1</i>	Kollagen, Typ XIII, alpha 1	1,54	2,90
<i>COL6A1</i>	Kollagen, Typ VI, alpha 1	1,71	3,27
<i>CRB1</i>	Crumbs Familienmitglied 1, Photorezeptor Morphogenese assoziiert	-1,66	0,32
<i>CRYAB</i>	Kristallin, alpha B	-1,23	0,43
<i>CYP1A1</i>	Cytochrom P450, Familie 1, Unterfamilie A, Polypeptid 1	2,54	5,82
<i>DAB2</i>	Dab, mitogen-reagierendes Phosphoprotein, homolog 2 (<i>Drosophila</i>)	-1,63	0,32
<i>DHRS3</i>	Dehydrogenase/Reduktase (SDR-Familie) Mitglied 3	-1,08	0,47
<i>DHRS9</i>	Dehydrogenase/Reduktase (SDR-Familie) Mitglied 9	1,04	2,05

Gensymbol	Genname	PM _{2.5}	
		log ₂ FC	FC
<i>DUSP2</i>	Duale spezifische Phosphatase 2	-1,49	0,36
<i>DUSP4</i>	Duale spezifische Phosphatase 4	1,05	2,07
<i>DUSP6</i>	Duale spezifische Phosphatase 6	1,34	2,52
<i>EDIL3</i>	EGF-ähnliche Wiederholungen und Discoidin I ähnliche Domänen 3	-1,33	0,40
<i>EFNA1</i>	Ephrin-A1	-1,18	0,44
<i>EGR1</i>	Frühe Wachstumsreaktion 1	1,01	2,02
<i>EHF</i>	Ets homologer Faktor	1,00	2,00
<i>ENO3</i>	Enolase 3 (Beta, Muskel)	-1,02	0,49
<i>ENTPD4</i>	Ectonukleosidtriphosphatdiphosphohydrolase 4	0,71	1,64
<i>EPB41L4B</i>	Erythrozytenmembran-Proteinband 4.1 ähnlich 4B	0,81	1,75
<i>EPHA5</i>	EPH-Rezeptor A5	-1,36	0,39
<i>EREG</i>	Epiregulin	2,73	6,65
<i>ERRFI1</i>	ERBB-Rezeptor-Feedback-Inhibitor 1	1,37	2,58
<i>ETNPPL</i>	Ethanolaminphosphat-Phospho-Lyase	-1,16	0,45
<i>ETV4</i>	Ets Variante 4	1,17	2,25
<i>EVI2B</i>	Ecotrope Virusintegrationsstelle 2B	1,19	2,28
<i>FAM102B</i>	Familie mit Sequenzähnlichkeit 102, Mitglied B	-0,77	0,59
<i>FAM83B</i>	Familie mit Sequenzähnlichkeit 83, Mitglied B	1,26	2,40
<i>FBXO16</i>	F-Box-Protein 16	0,91	1,88
<i>FGFR2</i>	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 2	-0,97	0,51
<i>FGR</i>	FGR-Proto-Onkogen, Src-Familie Tyrosinkinase	0,84	1,78
<i>FOXD1</i>	Forkheadbox D1	1,46	2,76
<i>FRMD3</i>	FERM-Domäne enthält 3	1,41	2,65
<i>G0S2</i>	G0/G1 Schalter 2	1,25	2,37
<i>GNA13</i>	Guanin-Nukleotid-Bindungsprotein (G-Protein), alpha 13	0,98	1,98
<i>GPC5</i>	Glypican 5	-1,36	0,39
<i>GPR37</i>	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 37 (Endothelin-Rezeptor Typ B-ähnlich)	-1,33	0,40
<i>GREM1</i>	Gremlin 1, DAN-Familie BMP-Antagonist	2,85	7,20
<i>GSAP</i>	Gamma-Sekretase aktivierendes Protein	1,10	2,14
<i>HAND1</i>	Herz- und Neuralkronenderivate exprimiert 1	-1,48	0,36
<i>HELZ2</i>	Helicase mit Zinkfinger 2, Transkriptionskoaktivator	-0,91	0,53
<i>HLA-E</i>	Haupthistokompatibilitätskomplex, Klasse I, E	-0,87	0,55
<i>HMOX1</i>	Hämeoxygenase-1	1,23	2,34
<i>HSH2D</i>	Hämatopoetische SH2-Domäne enthaltend	-0,92	0,53
<i>ID2</i>	Inhibitor der DNA-Bindung 2, dominantes negatives Helix-Loop-Helix-Protein	-1,31	0,40
<i>ID2B</i>	Inhibitor der DNA-Bindung 2B, dominantes negatives Helix-Loop-Helix-Protein (Pseudogen)	-1,28	0,41

Gensymbol	Genname	PM _{2.5}	
		log ₂ FC	FC
<i>ID3</i>	Inhibitor der DNA-Bindung 3, dominantes negatives Helix-Loop-Helix-Protein	-0,85	0,56
<i>ID4</i>	Inhibitor der DNA-Bindung 4, dominantes negatives Helix-Loop-Helix-Protein	-2,67	0,16
<i>IFI35</i>	Interferon-induziertes Protein 35	-1,37	0,39
<i>IGSF10</i>	Immunglobulin-Superfamilie, Mitglied 10	-2,75	0,15
<i>IL1A</i>	Interleukin 1, alpha	2,32	5,00
<i>IL1B</i>	Interleukin 1, beta	1,09	2,14
<i>IL6</i>	Interleukin 6	1,13	2,19
<i>INSL4</i>	Insulinähnliches Peptid 4	-1,33	0,40
<i>ITGA2</i>	Integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 Untereinheit des VLA-2 Rezeptors)	1,54	2,90
<i>ITGB4</i>	Integrin, beta 4	1,34	2,53
<i>JUN</i>	Jun Proto-Onkogen	1,34	2,53
<i>KCNJ15</i>	Kalium nach innen gerichteter Kanal, Unterfamilie J, Mitglied 15	-1,44	0,37
<i>KLF9</i>	Kruppel-ähnlicher Faktor 9	-1,33	0,40
<i>KRT6A</i>	Keratin 6A	1,48	2,79
<i>LAMA1</i>	Laminin, alpha 1	-2,05	0,24
<i>LAMP3</i>	Lysosomal-assoziiertes Membranprotein 3	-1,94	0,26
<i>LAPTM5</i>	Lysosomales transmembranäres Protein 5	1,43	2,69
<i>LETM2</i>	Leucin-zipper-EF-hand enthält Transmembranprotein 2	1,52	2,86
<i>LIFR</i>	Leukämie hemmender Faktor-Rezeptor alpha	-0,73	0,60
<i>LINC00622</i>	Lange intergenische nicht-proteinkodierende RNA 622	1,03	2,04
<i>MAMDC2</i>	MAM-Domäne mit 2	-2,47	0,18
<i>MCC</i>	Mutiert bei kolorektalen Karzinomen	-2,26	0,21
<i>MICAL2</i>	Mikrotubuli-assoziierte Monooxygenase, Calponin und LIM-Domäne enthält 2	1,00	2,00
<i>MIR5193</i>	microRNA 5193	-1,17	0,44
<i>MKX</i>	Mohawk homeobox	-0,98	0,51
<i>MME</i>	Membran-Metallo-Endopeptidase	-1,08	0,47
<i>MMP12</i>	Matrix-Metallopeptidase 12 (Makrophagen-Elastase)	-2,69	0,15
<i>MMP13</i>	Matrix-Metallopeptidase 13 (Kollagenase 3)	-1,15	0,45
<i>MRC2</i>	Mannose-Rezeptor, C-Typ 2	-0,81	0,57
<i>MYLK3</i>	Myosin Leichtkettenkinase 3	-1,96	0,26
<i>MYO1G</i>	Myosin IG	1,61	3,04
<i>NEGR1</i>	Neuronaler Wachstumsregulator 1	-1,42	0,37
<i>NID2</i>	Nidogen 2 (Osteonidogen)	1,29	2,45
<i>NLRC5</i>	NLR-Familie, CARD-Domain enthält 5	-1,21	0,43
<i>NPNT</i>	Nephronectin	-1,05	0,48
<i>NPR3</i>	Natriuretischer Peptidrezeptor 3	-1,37	0,39

Gensymbol	Genname	PM _{2.5}	
		log ₂ FC	FC
<i>OLFML1</i>	Olfactomedin-ähnlich 1	-1,96	0,26
<i>PAQR5</i>	Progesterin- und Adipoq-Rezeptor-Familienmitglied V	1,10	2,15
<i>PDE3A</i>	Phosphodiesterase 3A, cGMP-inhibiert	-0,76	0,59
<i>PDLIM5</i>	PDZ und LIM Domäne 5	1,19	2,27
<i>PHLDA1</i>	Pleckstrin homology-ähnliche Domäne, Familie A, Mitglied 1	1,57	2,97
<i>PI3</i>	Peptidase-Inhibitor 3, von der Haut abgeleitet	1,20	2,29
<i>PKDCC</i>	Proteinkinase-Domäne enthaltend, zytoplasmatisch	-2,01	0,25
<i>PLXDC2</i>	Plexin-Domäne enthält 2	-1,00	0,50
<i>PNPLA1</i>	Patatin-ähnliche Phospholipase-Domäne, enthaltend 1	0,97	1,95
<i>POPDC3</i>	Popeye Domäne enthält 3	1,44	2,70
<i>PPM1L</i>	Proteinphosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ -abhängig, 1L	-1,01	0,50
<i>PPP2R2B</i>	Proteinphosphatase 2, regulatorische Untereinheit B, beta	-1,24	0,42
<i>PSCA</i>	Prostata-Stammzellen-Antigen	1,20	2,30
<i>PSMB9</i>	Proteasom (Prosom, Makroschmerz) Untereinheit, Beta-Typ, 9	-1,01	0,50
<i>PTGS2</i>	Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 2 (Prostaglandin G/H-Synthase und Cyclooxygenase)	1,38	2,60
<i>PTK6</i>	Protein-Tyrosinkinase 6	0,91	1,88
<i>PXDN</i>	Peroxidasin homolog (Drosophila)	-1,16	0,45
<i>RASGRP3</i>	RAS Guanyl freisetzendes Protein 3 (Calcium- und DAG-reguliert)	-0,93	0,53
<i>RDH10</i>	Retinol-Dehydrogenase 10 (all-trans)	0,96	1,94
<i>RHOBTB3</i>	Rho-bezogene BTB-Domäne enthält 3	-0,98	0,51
<i>S100A9</i>	S100 Calcium-Bindungsprotein A9	2,05	4,15
<i>SAMD11</i>	Sterile Alpha-Motivdomäne enthält 11	-1,08	0,47
<i>SCD</i>	Stearoyl-CoA-Desaturase (Delta-9-Desaturase)	1,20	2,30
<i>SCG5</i>	Secretogranin V (7B2-Protein)	1,83	3,56
<i>SDC2</i>	Syndekan 2	-1,18	0,44
<i>SEL1L2</i>	Sel-1 Suppressor von lin-12-like 2 (C. Elegans)	-1,33	0,40
<i>SEMA3A</i>	Sema-Domäne, Immunglobulin-Domäne (Ig), kurze Basisdomäne, sekretiert, (Semaphorin) 3A	1,05	2,07
<i>SEMA6D</i>	Sema-Domäne, Transmembran-Domäne (TM) und Zytoplasma-Domäne (Semaphorin) 6D	-1,45	0,37
<i>SERINC2</i>	Serin-Integrator 2	0,94	1,92
<i>SERPINI1</i>	Serpin-Peptidase-Inhibitor, Klade I (Neuroserpin), Mitglied 1	-1,12	0,46
<i>SFRP1</i>	Sekretiertes frizzled-verwandtes Protein 1	-0,90	0,54
<i>SH2D2A</i>	SH2-Domäne enthält 2A	1,52	2,87
<i>SIPA1L1</i>	Signalinduzierte Proliferation-assoziiert 1 wie 1	-1,11	0,46
<i>SLC12A8</i>	Gelöster Carrier Familie 12, Mitglied 8	-1,30	0,41
<i>SLC15A3</i>	Gelöster Carrier Familie 15 (Oligopeptidtransporter), Mitglied 3	-1,03	0,49
<i>SLC22A23</i>	Gelöster Carrier Familie 22, Mitglied 23	0,89	1,86

Gensymbol	Genname	PM _{2.5}	
		log ₂ FC	FC
<i>SLC27A2</i>	Gelöster Carrier Familie 27 (Fettsäure-Transporter), Mitglied 2	-0,81	0,57
<i>SLC7A11</i>	Gelöster Carrier Familie 7 (anionischer Aminosäure-Transporter leichte Kette, xc-System), Mitglied 11	1,69	3,24
<i>SLCO4A1</i>	Gelöster Carrier organische Anionen-Transporter Familie, Mitglied 4A1	1,14	2,20
<i>SMAD9</i>	SMAD Familienmitglied 9	-1,28	0,41
<i>SNAI2</i>	Snail Familie Zinkfinger 2	-1,27	0,42
<i>SP110</i>	SP110 Nuklearkörper-Protein	-1,13	0,46
<i>SP8</i>	Sp8 Transkriptionsfaktor	1,89	3,70
<i>SPINK13</i>	Serinpeptidasehemmer, Kazal Typ 13 (mutmaßlich)	-1,50	0,35
<i>SPOCK1</i>	Sparc/Osteonectin, cwcv und kazal-ähnliche Domänen Proteoglykan (testican) 1	1,04	2,05
<i>STC2</i>	Stanniocalcin 2	0,79	1,73
<i>STEAP1</i>	Sechs transmembranale Epithelantigene der Prostata 1	1,34	2,53
<i>STEAP4</i>	STEAP Familienmitglied 4	-2,06	0,24
<i>STOX2</i>	Storkhead Box 2	-1,06	0,48
<i>SV2C</i>	Synaptisches Vesikel-Glykoprotein 2C	-3,70	0,08
<i>TAP1</i>	Transporter 1, ATP-Bindekassette, Unterfamilie B (MDR/TAP)	-0,96	0,52
<i>TGFA</i>	Transformierender Wachstumsfaktor, alpha	2,04	4,10
<i>TMEM156</i>	Transmembranprotein 156	0,77	1,70
<i>TNFRSF11B</i>	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor Superfamilie, Mitglied 11b	-1,22	0,43
<i>TNFSF10</i>	Tumor-Nekrose-Faktor (Ligand) Superfamilie, Mitglied 10	-2,60	0,16
<i>TNXA</i>	Tenascin XA (Pseudogen)	0,94	1,92
<i>TNXB</i>	Tenascin XB	0,94	1,92
<i>TPBG</i>	Trophoblasten-Glykoprotein	0,93	1,91
<i>TRABD2A</i>	Trab-Domäne, die 2A enthält	-0,92	0,53
<i>TRIM22</i>	Dreiteiliges Motiv enthält 22	-1,91	0,27
<i>TSPAN12</i>	Tetraspanin 12	0,99	1,99
<i>UBA7</i>	Ubiquitin-ähnlicher Modifikator aktivierendes Enzym 7	-1,17	0,44
<i>UGT8</i>	UDP-Glykosyltransferase 8	-0,98	0,51
<i>USH1C</i>	Usher-Syndrom 1C (autosomal rezessiv, schwer)	-1,26	0,42
<i>USP18</i>	Ubiquitin-spezifische Peptidase 18	-1,46	0,36
<i>VIT</i>	Vitrin	-1,92	0,26
<i>WARS</i>	Tryptophanyl-tRNA-Synthetase	-1,11	0,46
<i>WISP2</i>	WNT1 induzierbarer Signalweg Protein 2	-1,19	0,44
<i>ZNF395</i>	Zink-Fingerprotein 395	0,91	1,88
<i>ZNF641</i>	Zink-Fingerprotein 641	-0,92	0,53

Tabelle 34: Transkriptionsfaktoren, die Bindungsstellen in den durch PM_{2.5} induzierten herunterregulierten Genen in BEAS-2B aufwiesen. Dargestellt sind die statistisch signifikantesten ($p < 0,01$) Transkriptionsfaktoren und die jeweils von ihnen regulierten Gene. Die Top 15 herunterregulierten Gene wurden in Rot angegeben.

Transkriptionsfaktor	<i>p</i> -Wert	Gene
Freac-3 [M00291]	$2,2 \times 10^{-5}$	<i>ABCB1</i> , <i>ALPP</i> , <i>ALPPL2</i> , <i>ARHGAP18</i> , <i>CCL2</i> , <i>CRB1</i> , <i>DAB2</i> , <i>EDIL3</i> , <i>EFNA1</i> , <i>EPHA5</i> , <i>ETNPPL</i> , <i>FGFR2</i> , <i>GPC5</i> , <i>ID2</i> , <i>KLF9</i> , <i>MAMDC2</i> , <i>MMP13</i> , <i>MYLK3</i> , <i>NEGR1</i> , <i>NPR3</i> , <i>PDE3A</i> , <i>PPP2R2B</i> , <i>RHOBTB3</i> , <i>SEMA6D</i> , <i>SFRP1</i> , <i>SMAD9</i> , <i>SNAI2</i> , <i>SP110</i> , <i>SPINK13</i> , <i>STOX2</i> , <i>SV2C</i> , <i>TAP1</i> , <i>TRIM22</i> , <i>UBA7</i>
ZBRK1 [M01105]	$1,6 \times 10^{-4}$	<i>ALPPL2</i> , <i>ATOH8</i> , <i>DAB2</i> , <i>DHRS3</i> , <i>DUSP2</i> , <i>EFNA1</i> , <i>ETNPPL</i> , <i>HAND1</i> , <i>ID2</i> , <i>MYLK3</i> , <i>NEGR1</i> , <i>NLRC5</i> , <i>PDE3A</i> , <i>PKDCC</i> , <i>RHOBTB3</i> , <i>SAMD11</i> , <i>STOX2</i> , <i>SV2C</i> , <i>TAP1</i> , <i>TRABD2A</i>
HMG1Y [M01010]	$3,7 \times 10^{-4}$	<i>ABCB1</i> , <i>ARHGAP18</i> , <i>ATOH8</i> , <i>CACNB2</i> , <i>CRB1</i> , <i>DAB2</i> , <i>DHRS3</i> , <i>FAM102B</i> , <i>FGFR2</i> , <i>GPC5</i> , <i>ID2</i> , <i>ID4</i> , <i>IFI35</i> , <i>KCNJ15</i> , <i>MME</i> , <i>MMP13</i> , <i>MRC2</i> , <i>NEGR1</i> , <i>NPNT</i> , <i>RASGRP3</i> , <i>SIPA1L1</i> , <i>SLC15A3</i> , <i>SMAD9</i> , <i>SNAI2</i> , <i>SPINK13</i> , <i>SV2C</i> , <i>TNFSF10</i> , <i>TRIM22</i> , <i>UGT8</i> , <i>VIT</i> , <i>ZNF641</i>
HMG_IY [M00750]	$4,2 \times 10^{-4}$	<i>ABCB1</i> , <i>ALPP</i> , <i>ARHGAP18</i> , <i>CASP1</i> , <i>CCL2</i> , <i>DAB2</i> , <i>DHRS3</i> , <i>EFNA1</i> , <i>ETNPPL</i> , <i>FAM102B</i> , <i>FGFR2</i> , <i>KCNJ15</i> , <i>LAMA1</i> , <i>MCC</i> , <i>MKX</i> , <i>MMP13</i> , <i>MRC2</i> , <i>MYLK3</i> , <i>NPR3</i> , <i>OLFML1</i> , <i>PDE3A</i> , <i>PKDCC</i> , <i>PLXDC2</i> , <i>PPM1L</i> , <i>PXDN</i> , <i>RASGRP3</i> , <i>RHOBTB3</i> , <i>SERPINI1</i> , <i>SFRP1</i> , <i>SIPA1L1</i> , <i>SLC15A3</i> , <i>SMAD9</i> , <i>TAP1</i> , <i>UGT8</i> , <i>VIT</i>
IRF-7 [M00453]	$7,3 \times 10^{-4}$	<i>ABCB1</i> , <i>ARHGAP18</i> , <i>CCL2</i> , <i>DAB2</i> , <i>EDIL3</i> , <i>ID3</i> , <i>ID4</i> , <i>IFI35</i> , <i>KLF9</i> , <i>LIFR</i> , <i>MAMDC2</i> , <i>MYLK3</i> , <i>NEGR1</i> , <i>NLRC5</i> , <i>NPR3</i> , <i>OLFML1</i> , <i>PLXDC2</i> , <i>PXDN</i> , <i>RASGRP3</i> , <i>SIPA1L1</i> , <i>SNAI2</i> , <i>SP110</i> , <i>STOX2</i> , <i>TAP1</i> , <i>TNFSF10</i> , <i>UBA7</i> , <i>UGT8</i> , <i>USH1C</i> , <i>USP18</i> , <i>VIT</i> , <i>ZNF641</i>
Freac-4 [M00292]	$8,9 \times 10^{-4}$	<i>ABCB1</i> , <i>ARHGAP18</i> , <i>CCL2</i> , <i>DAB2</i> , <i>EFNA1</i> , <i>EPHA5</i> , <i>ID2</i> , <i>ID3</i> , <i>KCNJ15</i> , <i>KLF9</i> , <i>MCC</i> , <i>MMP13</i> , <i>NPR3</i> , <i>OLFML1</i> , <i>PKDCC</i> , <i>PLXDC2</i> , <i>PPM1L</i> , <i>PPP2R2B</i> , <i>RASGRP3</i> , <i>RHOBTB3</i> , <i>SEL1L2</i> , <i>SEMA6D</i> , <i>SFRP1</i> , <i>SIPA1L1</i> , <i>SNAI2</i> , <i>SPINK13</i> , <i>STOX2</i> , <i>TRIM22</i> , <i>USP18</i>
aMEF-2 [M00403]	$1,0 \times 10^{-3}$	<i>CACNB2</i> , <i>CCL2</i> , <i>CRB1</i> , <i>EDIL3</i> , <i>ENO3</i> , <i>FAM102B</i> , <i>FGFR2</i> , <i>GPC5</i> , <i>ID3</i> , <i>ID4</i> , <i>KLF9</i> , <i>MKX</i> , <i>MME</i> , <i>NEGR1</i> , <i>NPR3</i> , <i>PDE3A</i> , <i>PPM1L</i> , <i>RASGRP3</i> , <i>SDC2</i> , <i>SEL1L2</i> , <i>SPINK13</i> , <i>TNFRSF11B</i> , <i>UGT8</i> , <i>VIT</i> , <i>WARS</i> , <i>WISP2</i> , <i>ZNF641</i>
NKX6-1 [M00424]	$1,0 \times 10^{-3}$	<i>ABCB1</i> , <i>ARHGAP18</i> , <i>CACNB2</i> , <i>CASP1</i> , <i>CFI</i> , <i>DAB2</i> , <i>EPHA5</i> , <i>FAM102B</i> , <i>HSH2D</i> , <i>ID4</i> , <i>IFI35</i> , <i>KLF9</i> , <i>LAMA1</i> , <i>LAMP3</i> , <i>MCC</i> , <i>MKX</i> , <i>MMP13</i> , <i>NEGR1</i> , <i>NPNT</i> , <i>NPR3</i> , <i>PDE3A</i> , <i>PPM1L</i> , <i>SDC2</i> , <i>SEL1L2</i> , <i>SERPINI1</i> , <i>SFRP1</i> , <i>SIPA1L1</i> , <i>SLC27A2</i> , <i>SMAD9</i> , <i>SNAI2</i> , <i>TNFRSF11B</i> , <i>TRABD2A</i> , <i>TRIM22</i> , <i>UGT8</i>
HSF [M00641]	$1,0 \times 10^{-3}$	<i>CACNB2</i> , <i>CRYAB</i> , <i>DHRS3</i> , <i>DUSP2</i> , <i>EDIL3</i> , <i>ENO3</i> , <i>FAM102B</i> , <i>GPR37</i> , <i>HAND1</i> , <i>ID3</i> , <i>LAMP3</i> , <i>MME</i> , <i>MRC2</i> , <i>PKDCC</i> , <i>PLXDC2</i> , <i>PPP2R2B</i> , <i>PXDN</i> , <i>RASGRP3</i> , <i>SEMA6D</i> , <i>SERPINI1</i> , <i>SFRP1</i> , <i>SLC12A8</i> , <i>SLC27A2</i> , <i>SV2C</i> , <i>USP18</i> , <i>VIT</i>
SRY [M00148]	$2,0 \times 10^{-3}$	<i>ABCB1</i> , <i>ALPP</i> , <i>ARHGAP18</i> , <i>ATOH8</i> , <i>CRB1</i> , <i>CRYAB</i> , <i>DAB2</i> , <i>DHRS3</i> , <i>DUSP2</i> , <i>EFNA1</i> , <i>EPHA5</i> , <i>ETNPPL</i> , <i>FGFR2</i> , <i>GPC5</i> , <i>GPR37</i> , <i>HLA-E</i> , <i>HSH2D</i> , <i>ID2</i> , <i>ID3</i> , <i>ID4</i> , <i>KCNJ15</i> , <i>KLF9</i> , <i>LAMA1</i> , <i>LIFR</i> , <i>MKX</i> , <i>MME</i> , <i>MMP13</i> , <i>MYLK3</i> , <i>NEGR1</i> , <i>NPNT</i> , <i>NPR3</i> , <i>PLXDC2</i> , <i>PPP2R2B</i> , <i>RASGRP3</i> , <i>RHOBTB3</i> , <i>SDC2</i> , <i>SEL1L2</i> , <i>SEMA6D</i> , <i>SERPINI1</i> , <i>SFRP1</i> , <i>SIPA1L1</i> , <i>SLC12A8</i> , <i>SLC15A3</i> , <i>SLC27A2</i> , <i>SMAD9</i> , <i>SP110</i> , <i>SPINK13</i> , <i>STEAP4</i> , <i>SV2C</i> , <i>TRABD2A</i> , <i>TRIM22</i> , <i>USH1C</i> , <i>VIT</i> , <i>WISP2</i> , <i>ZNF641</i>
HSF1 [M01023]	$2,0 \times 10^{-3}$	<i>ARHGAP18</i> , <i>ATOH8</i> , <i>CRYAB</i> , <i>DAB2</i> , <i>DHRS3</i> , <i>DUSP2</i> , <i>EFNA1</i> , <i>ID3</i> , <i>KCNJ15</i> , <i>LAMA1</i> , <i>MKX</i> , <i>MRC2</i> , <i>NEGR1</i> , <i>NPR3</i> , <i>OLFML1</i> , <i>PKDCC</i> , <i>PPP2R2B</i> , <i>SEMA6D</i> , <i>SFRP1</i> , <i>SLC12A8</i> , <i>SMAD9</i> , <i>SP110</i> , <i>STEAP4</i>

Transkriptionsfaktor	p-Wert	Gene
Evi-1 [M00011]	$3,0 \times 10^{-3}$	<i>ABCB1, CRB1, DHRS3, FAM102B, ID2, ID3, ID4, LIFR, MRC2, NEGR1, NPR3, PPP2R2B, SNAI2, SPINK13, SV2C, TAP1, TRIM22, UGT8, VIT, WARS</i>
Oct-1 [M00138]	$3,0 \times 10^{-3}$	<i>ABCB1, ALPPL2, ARHGAP18, CACNB2, CASP1, CRB1, DAB2, EDIL3, ENO3, EPHA5, ETNPPL, FAM102B, FGFR2, GPC5, GPR37, HLA-E, HSH2D, ID3, ID4, INSL4, KCNJ15, KLF9, LAMA1, MAMDC2, MKX, MMP13, NEGR1, NPNT, NPR3, PLXDC2, PPM1L, PPP2R2B, RASGRP3, RHOBTB3, SDC2, SEL1L2, SEMA6D, SERPIN1, SIPA1L1, SLC27A2, SMAD9, SNAI2, SP110, STEAP4, STOX2, TNFRSF11B, TNFSF10, UGT8, USP18, VIT</i>
MEIS1A:HOXA9 [M00420]	$3,0 \times 10^{-3}$	<i>CACNB2, CRB1, DUSP2, EPHA5, HLA-E, ID2, IFI35, KCNJ15, KLF9, LAMA1, MKX, MRC2, MYLK3, OLFML1, PPP2R2B, RASGRP3, SDC2, SEMA6D, SERPIN1, SIPA1L1, SNAI2, USH1C, VIT, WISP2</i>
HNF4 [M01032]	$4,0 \times 10^{-3}$	<i>ABCB1, ALPPL2, ARHGAP18, ATOH8, CCL2, CFI, CRYAB, DAB2, DHRS3, DUSP2, EDIL3, EPHA5, FAM102B, FGFR2, HELZ2, HLA-E, ID2, ID3, ID4, IFI35, INSL4, KCNJ15, KLF9, LAMA1, LIFR, MAMDC2, MCC, MKX, MME, MMP13, NEGR1, NLRC5, NPNT, NPR3, OLFML1, PDE3A, PKDCC, PLXDC2, PPM1L, PPP2R2B, PXDN, RASGRP3, RHOBTB3, SDC2, SEL1L2, SERPIN1, SFRP1, SIPA1L1, SLC15A3, SLC27A2, SMAD9, SP110, STEAP4, STOX2, SV2C, TAP1, TNFRSF11B, TNFSF10, TRABD2A, TRIM22, USH1C, VIT, WISP2</i>
RREB-1 [M00257]	$4,0 \times 10^{-3}$	<i>ALPP, ALPPL2, ATOH8, CACNB2, CCL2, CRYAB, DHRS3, DUSP2, EFNA1, EPHA5, GPR37, HAND1, HELZ2, ID2, ID4, KCNJ15, MAMDC2, MCC, MKX, MMP13, MRC2, NEGR1, NLRC5, NPR3, OLFML1, PKDCC, PLXDC2, PPP2R2B, SAMD11, SERPIN1, SFRP1, SIPA1L1, SLC12A8, SLC15A3, SMAD9, SNAI2, SP110, SV2C, TAP1, TNFRSF11B, TNFSF10, TRABD2A, TRIM22</i>
IPF1 [M00436]	$4,0 \times 10^{-3}$	<i>ABCB1, CRB1, CRYAB, DAB2, EFNA1, ETNPPL, GPR37, ID2, ID3, MCC, MKX, MME, MMP13, NPNT, PDE3A, PPM1L, PPP2R2B, RASGRP3, SDC2, SEL1L2, SLC15A3, SLC27A2, SMAD9, SPINK13, STOX2, TRIM22, VIT</i>
Brachyury [M00150]	$5,0 \times 10^{-3}$	<i>ARHGAP18, ATOH8, CACNB2, CRB1, DAB2, EFNA1, FGFR2, HAND1, HELZ2, ID3, ID4, LAMA1, MAMDC2, NPR3, PKDCC, PPM1L, PXDN, SDC2, SERPIN1, SPINK13, SV2C, TNFRSF11B, TNFSF10, TRABD2A, TRIM22</i>
PLZF [M01075]	$6,0 \times 10^{-3}$	<i>ABCB1, CACNB2, CASP1, CFI, CRB1, DAB2, EDIL3, ETNPPL, FGFR2, ID3, KCNJ15, KLF9, LAMA1, LIFR, MKX, MME, MMP13, MRC2, NLRC5, NPR3, PLXDC2, PPP2R2B, RHOBTB3, SDC2, SEL1L2, SERPIN1, SNAI2, STOX2, SV2C, TNFRSF11B, TNFSF10, TRIM22, UGT8, USH1C</i>
LEF1 [M00805]	$6,0 \times 10^{-3}$	<i>ALPP, ALPPL2, ARHGAP18, ATOH8, CACNB2, CRB1, DAB2, DHRS3, DUSP2, EDIL3, EFNA1, EPHA5, ETNPPL, FAM102B, FGFR2, GPC5, GPR37, HAND1, HELZ2, HLA-E, HSH2D, ID2, ID3, ID4, IFI35, KCNJ15, KLF9, LAMA1, LAMP3, LIFR, MAMDC2, MCC, MKX, MME, MMP13, MYLK3, NEGR1, NLRC5, NPNT, NPR3, OLFML1, PDE3A, PKDCC, PLXDC2, PPM1L, PPP2R2B, PXDN, RASGRP3, RHOBTB3, SDC2, SEL1L2, SEMA6D, SERPIN1, SFRP1, SIPA1L1, SLC27A2, SMAD9, SNAI2, SP110, SPINK13, STEAP4, TAP1, TNFRSF11B, TNFSF10, TRABD2A, TRIM22, UGT8, USH1C, VIT, WISP2</i>

Transkriptionsfaktor	p-Wert	Gene
HFH-1 [M00129]	$6,0 \times 10^{-3}$	<i>ABCBI, ARHGAP18, CRB1, DAB2, DUSP2, EDIL3, EPHA5, FGFR2, GPC5, ID2, KCNJ15, KLF9, LIFR, MCC, MME, MMP13, MYLK3, NEGR1, NPNT, NPR3, OLFML1, PPP2R2B, RASGRP3, RHOBTB3, SDC2, SFRP1, SIPA1L1, SLC15A3, SMAD9, SP110, SV2C, TNFRSF11B, TNFSF10, TRABD2A, UGT8, USH1C, WISP2</i>
FOXD3 [M00130]	$6,0 \times 10^{-3}$	<i>ABCBI, ARHGAP18, DAB2, DUSP2, FAM102B, GPC5, HLA-E, HSH2D, ID2, ID3, KCNJ15, KLF9, MAMDC2, MKX, MME, MMP13, MYLK3, NEGR1, NPNT, NPR3, PLXDC2, PPM1L, PPP2R2B, RASGRP3, SDC2, SLC12A8, SMAD9, SP110, STOX2, SV2C, TRABD2A, UGT8, USH1C</i>
Oct-1 [M00135]	$6,0 \times 10^{-3}$	<i>ABCBI, ARHGAP18, CACNB2, CCL2, CRB1, DAB2, EFNA1, ETNPPL, FAM102B, FGFR2, ID4, KCNJ15, LIFR, MAMDC2, MCC, MKX, MYLK3, PDE3A, PLXDC2, PPM1L, SEMA6D, SERPIN1, SIPA1L1, SLC12A8, SMAD9, SNAI2, SP110, STEAP4, STOX2, TNFSF10, TRABD2A, UGT8, USP18, VIT, WISP2</i>
IRF-1 [M00062]	$8,0 \times 10^{-3}$	<i>ABCBI, ATOH8, CRB1, DAB2, DUSP2, EDIL3, FAM102B, HAND1, ID2, ID4, LAMP3, NLRC5, NPR3, OLFML1, PDE3A, PLXDC2, PPP2R2B, PXDN, RHOBTB3, SFRP1, SLC15A3, SLC27A2, SMAD9, SP110, TAP1, TNFRSF11B, TRABD2A, UBA7, UGT8, USP18, WISP2</i>
RUSH-1alpha [M01107]	$8,0 \times 10^{-3}$	<i>ETNPPL, FAM102B, ID2, LAMA1, LAMP3, MMP13, MRC2, OLFML1, PPM1L, PPP2R2B, RHOBTB3, SAMD11, SIPA1L1, SMAD9, SPINK13, STEAP4, TNFSF10, TRIM22, UGT8, USP18, VIT, ZNF641</i>
ISRE [M00258]	$9,0 \times 10^{-3}$	<i>ARHGAP18, ATOH8, DAB2, EDIL3, FAM102B, HAND1, HLA-E, LAMA1, LAMP3, MKX, MME, MMP13, MRC2, NEGR1, NPNT, NPR3, OLFML1, PDE3A, PPP2R2B, SDC2, SLC15A3, SMAD9, SNAI2, STOX2, TAP1, UBA7, USP18, WARS, WISP2</i>
HNF-1 [M00132]	$9,0 \times 10^{-3}$	<i>ABCBI, ARHGAP18, CFI, DAB2, GPC5, ID2, ID3, KCNJ15, KLF9, LAMA1, MAMDC2, MKX, MMP13, MRC2, NPR3, PDE3A, PLXDC2, PPM1L, RHOBTB3, SDC2, SIPA1L1, SLC12A8, SMAD9, SP110, SPINK13, STOX2, SV2C, TAP1, TNFRSF11B, TNFSF10, UGT8, WARS</i>
FAC1 [M00456]	$9,0 \times 10^{-3}$	<i>ALPP, ALPL2, DAB2, DUSP2, EFNA1, EPHA5, FGFR2, HAND1, HLA-E, ID2, KLF9, LAMP3, MKX, MME, MMP13, MRC2, NPNT, PDE3A, PPP2R2B, RASGRP3, SDC2, SIPA1L1, SLC15A3, SMAD9, SNAI2, SP110, SPINK13, TAP1, TRABD2A, TRIM22, VIT, WARS</i>

Tabelle 35: Alle signifikant hoch- und herunterregulierten Gene von BEAS-2B, die für fünf Wochen mit PM_{2.5} + dsRNA exponiert wurden, in alphabetischer Reihenfolge. Die 380 spezifischen Gene für PM_{2.5} + dsRNA exponierte Zellen wurden in Rot angegeben.

Gensymbol	Genname	PM _{2.5} + dsRNA	
		log2FC	FC
<i>A2M</i>	Alpha-2-Makroglobulin	-0,69	0,62
<i>ABCA1</i>	ATP-Bindungskassette, Unterfamilie A (ABC1), Mitglied 1	1,51	2,86
<i>ABCB1</i>	ATP-Bindungskassette, Unterfamilie B (MDR/TAP), Mitglied 1	-1,00	0,50
<i>ABCB4</i>	ATP-Bindungskassette, Unterfamilie B (MDR/TAP), Mitglied 4	-0,79	0,58
<i>ABCC2</i>	ATP-Bindungskassette, Unterfamilie C (CFTR/MRP), Mitglied 2	0,53	1,45
<i>ACO1</i>	Aconitase 1, löslich	1,09	2,13
<i>ACOT13</i>	Acyl-CoA-Thioesterase 13	0,61	1,52
<i>ACOX2</i>	Acyl-CoA-Oxidase 2, verzweigt	1,22	2,33
<i>ACTN1</i>	Aktinin, Alpha 1	0,68	1,60
<i>ACTR2</i>	ARP2 Aktin-verwandtes Protein 2 Homolog (Hefe)	0,76	1,69
<i>ACVR1B</i>	Activin-A-Rezeptor, Typ IB	0,71	1,63
<i>ADAMTS12</i>	ADAM Metallopeptidase mit Thrombospondin Typ 1 Motiv, 12	0,75	1,69
<i>ADAMTS6</i>	ADAM Metallopeptidase mit Thrombospondin Typ 1 Motiv, 6	-1,30	0,41
<i>ADGRE2</i>	Adhäsion G-Protein-gekoppelter Rezeptor E2	1,46	2,74
<i>AFAP1L1</i>	Aktin Filament-assoziiertes Protein 1 ähnlich 1	0,70	1,63
<i>AGBL3</i>	ATP/GTP bindendes Protein ähnlich 3	-1,00	0,50
<i>AGTRAP</i>	Angiotensin-II-Rezeptor-assoziiertes Protein	0,61	1,53
<i>AHSA2</i>	AHA1, Aktivator des Hitzeschocks 90kda Protein ATPase Homolog 2 (Hefe)	-1,22	0,43
<i>AKNAD1</i>	AKNA-Domäne mit 1	0,60	1,52
<i>AKR1C1</i>	Aldo-Keto-Reduktase Familie 1, Mitglied C1	1,50	2,83
<i>AKR1C2</i>	Aldo-Keto-Reduktase-Familie 1, Mitglied C2	1,60	3,03
<i>AKR1C3</i>	Aldo-Keto-Reduktase-Familie 1, Mitglied C3	1,26	2,39
<i>ALAS1</i>	Aminolevulinat. Delta-, Synthase 1	0,70	1,63
<i>ALDH3A1</i>	Aldehyddehydrogenase 3 Familie, Mitglied A1	1,09	2,13
<i>ALPP</i>	Alkalische Phosphatase, plazentarisches	-0,92	0,53
<i>ANAPC5</i>	Anaphase fördernde Komplex-Untereinheit 5	-0,91	0,53
<i>ANKRD10</i>	Ankyrin Wiederholungsdomäne 10	-0,66	0,63
<i>ANKRD10-IT1</i>	ANKRD10 intronic Transkript 1 (Nicht-Protein-Kodierung)	-1,26	0,42
<i>ANPEP</i>	Alanyl(membran)-aminopeptidase	1,36	2,57
<i>ANTXR2</i>	Anthrax-Toxin-Rezeptor 2	1,00	2,01
<i>ANXA10</i>	Annexin A10	1,08	2,11
<i>AOX1</i>	Aldehydoxidase 1	0,95	1,93
<i>AP1S1</i>	Adaptor verwandter Proteinkomplex 1, Sigma 1 Untereinheit	1,37	2,59
<i>APOBEC3B</i>	Apolipoprotein B mRNA editierendes Enzym, katalytisches Polypeptid ähnlich 3B	-0,78	0,58
<i>AREG</i>	Amphiregulin	1,67	3,18
<i>ARGLU1</i>	Arginin und Glutamat reichhaltig 1	-0,70	0,61
<i>ARHGAP18</i>	Rho GTPase aktivierendes Protein 18	-0,89	0,54

Gensymbol	Genname	PM _{2,5} + dsRNA	
		log ₂ FC	FC
<i>ARHGAP26</i>	Rho GTPase aktivierendes Protein 26	0,70	1,63
<i>ARHGAP42</i>	Rho GTPase aktivierendes Protein 42	0,93	1,90
<i>ARHGEF2</i>	Rho/Rac-Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF) 2	0,75	1,68
<i>ARL4C</i>	ADP-Ribosylierungsfaktor ähnliches Protein 4C	1,25	2,38
<i>ARNTL2</i>	Aryl-Kohlenwasserstoff-Rezeptor nuklärer Translokator ähnliches Protein 2	0,80	1,75
<i>ASXL2</i>	Zusätzliche Geschlechtskäme ähnlich Transkriptionsregulator 2	0,61	1,52
<i>ATOH8</i>	Atonal homolog 8 (<i>Drosophila</i>)	-0,92	0,53
<i>B4GALT6</i>	UDP-Galactose: Beta-N-Acetylglucosamin Beta-1,4-Galactosyltransferase	0,93	1,91
<i>BMP2K</i>	BMP2 induzierbare Kinase	0,85	1,80
<i>C10orf90</i>	Chromosom 10 offenes Leseraster 90	0,85	1,80
<i>C12orf73</i>	Chromosom 12 offenes Leseraster 73	-0,66	0,63
<i>C19orf66</i>	Chromosom 19 offenes Leseraster 66	-1,02	0,49
<i>C1R</i>	Komplement Komponente 1, R Teilkomponente	-1,33	0,40
<i>C1S</i>	Komplement Komponente 1, S Teilkomponente	-1,25	0,42
<i>C2orf68</i>	Chromosom 2 offenes Leseraster 68	-0,89	0,54
<i>C3</i>	Komplement Komponente 3	-0,77	0,59
<i>C4A</i>	Komplement Komponente 4A (Rodgers Blutgruppe)	-1,63	0,32
<i>C4B</i>	Komplement Komponente 4B (Chido-Blutgruppe)	-1,63	0,32
<i>C4B_2</i>	Komplement Komponente 4B (Chido-Blutgruppe), Kopie 2	-1,63	0,32
<i>C4BPA</i>	Komplement Komponente 4 Bindeprotein, alpha	-1,11	0,46
<i>C4BPB</i>	Komplement Komponente 4 Bindeprotein, beta	-0,76	0,59
<i>C8orf4</i>	Chromosom 8 offenes Leseraster 4	-0,98	0,51
<i>CAND1</i>	Cullin assoziiert und Neddylierung dissoziiert 1	-0,67	0,63
<i>CASP1</i>	Caspase 1, Apoptose-verwandte Cysteinpeptidase	-1,05	0,48
<i>CASP9</i>	Caspase 9, Apoptose-verwandte Cysteinpeptidase	-0,88	0,54
<i>CCL2</i>	Chemokin (C-C-Motiv) Ligand 2	-1,26	0,42
<i>CD1D</i>	CD1d Molekül	-0,99	0,50
<i>CD44</i>	CD44 Antigen	0,68	1,61
<i>CD59</i>	CD59-Molekül, komplementäres regulatorisches Protein	-0,71	0,61
<i>CDCA7</i>	Zellteilungszyklus assoziiert 7	-0,89	0,54
<i>CDCP1</i>	CUB-Domäne, die Protein 1 enthält	0,97	1,97
<i>CDH11</i>	Cadherin 11, Typ 2, OB-Cadherin (Osteoblast)	-0,86	0,55
<i>CDYL2</i>	Chromdomain-Protein, Y-ähnlich 2	-0,60	0,66
<i>CEP68</i>	Centrosomales Protein 68kda	-0,80	0,57
<i>CFB</i>	Komplementfaktor B	-1,15	0,45
<i>CFH</i>	Komplementfaktor H	-1,23	0,43
<i>CFHR1</i>	Komplementfaktor H-verwandt 1	-1,33	0,40
<i>CFI</i>	Komplementfaktor I	-1,95	0,26
<i>CHCHD7</i>	COX23 Cytochrom C Oxidase-Baugruppe Homolog	-0,70	0,61
<i>CHD2</i>	Chromodomain-Helikase DNA bindendes Protein 2	-1,28	0,41

Gensymbol	Genname	PM _{2.5} + dsRNA	
		log2FC	FC
<i>CHST11</i>	Kohlenhydrat (Chondroitin 4) Sulfotransferase 11	0,79	1,73
<i>CHST15</i>	Kohlenhydrat (N-Acetylgalactosamin 4-Sulfat 6-O) Sulfotransferase 15	1,14	2,20
<i>CLDN1</i>	Claudin 1	1,00	2,00
<i>CMPK2</i>	Cytidinmonophosphat (UMP-CMP)-Kinase 2, mitochondrial	-1,09	0,47
<i>CNTN1</i>	Kontaktin 1	-0,86	0,55
<i>COL12A1</i>	Kollagen, Typ XII, alpha 1	-0,62	0,65
<i>COL1A1</i>	Kollagen, Typ I, Alpha 1	-0,76	0,59
<i>COL6A1</i>	Kollagen, Typ VI, alpha 1	1,83	3,55
<i>CPA4</i>	Carboxypeptidase A4	1,21	2,32
<i>CPQ</i>	Carboxypeptidase Q	-0,87	0,55
<i>CRB1</i>	Crumbs Familienmitglied 1, Photorezeptor Morphogenese assoziiert	-1,70	0,31
<i>CREBZF</i>	CREB/ATF bzip Transkriptionsfaktor	-0,75	0,59
<i>CRYAB</i>	Kristallin, alpha B	-1,01	0,50
<i>CSNK2A1</i>	Kaseinkinase 2, Alpha-1-Polypeptid	0,65	1,57
<i>CSTF3</i>	Spaltstimulationsfaktor, 3' pre-RNA, Untereinheit 3, 77kda	-0,76	0,59
<i>CTSZ</i>	Cathepsin Z	1,69	3,22
<i>CUL4A</i>	Cullin 4A	-0,68	0,62
<i>CYP1A1</i>	Cytochrom P450, Familie 1, Unterfamilie A, Polypeptid 1	2,55	5,88
<i>CYP39A1</i>	Cytochrom P450, Familie 39, Unterfamilie A, Polypeptid 1	1,69	3,23
<i>CYTOR</i>	Zytoskelett-Regulator RNA	0,77	1,71
<i>DAB2</i>	Dab, mitogen-reagierendes Phosphoprotein, homolog 2 (Drosophila)	-1,46	0,36
<i>DCBLD2</i>	Discoidin-, CUB- und LCCL-Domäne mit 2	0,88	1,85
<i>DDX6</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) Box Helikase 6	2,14	4,41
<i>DDX60L</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) Box-Polypeptid 60 ähnlich	-1,07	0,48
<i>DEDD2</i>	Death-Effektor-Domäne mit 2	0,58	1,50
<i>DHRS3</i>	Dehydrogenase/Reduktase (SDR-Familie) Mitglied 3	-1,12	0,46
<i>DHRS9</i>	Dehydrogenase/Reduktase (SDR-Familie) Mitglied 9	1,16	2,24
<i>DMBT1</i>	Gelöscht bei bösartigen Hirntumoren 1	0,60	1,52
<i>DOCK4</i>	Dedikator der Zytokinese 4	0,98	1,97
<i>DTX4</i>	Deltex 4, E3 Ubiquitin-Ligase	0,73	1,66
<i>DUSP2</i>	Duale spezifische Phosphatase 2	-1,31	0,40
<i>DUSP4</i>	Duale spezifische Phosphatase 4	0,90	1,87
<i>DUSP6</i>	Duale spezifische Phosphatase 6	1,13	2,18
<i>ECEL1</i>	Endothelin konvertierendes Enzym ähnliche 1	-1,26	0,42
<i>EDIL3</i>	EGF-ähnliche Wiederholungen und Discoidin I ähnliche Domänen 3	-1,21	0,43
<i>EFNA1</i>	Ephrin-A1	-1,04	0,49
<i>EFNA5</i>	Ephrin-A5	0,82	1,76
<i>EGR1</i>	Frühe Wachstumsreaktion 1	1,48	2,79
<i>EID3</i>	EP300 interagierender Inhibitor der Differenzierung 3	-0,84	0,56
<i>EIF4A2</i>	Eukaryotischer Übersetzungsinisierungsfaktor 4A2	-1,12	0,46
<i>EMPI</i>	Epitheliales Membranprotein 1	0,68	1,60

Gensymbol	Genname	PM _{2.5} + dsRNA	
		log2FC	FC
<i>ENAH</i>	Aktiviertes Homolog (Drosophila)	0,65	1,57
<i>ENO3</i>	Enolase 3 (Beta, Muskel)	-0,77	0,59
<i>EPB41LAB</i>	Erythrozytenmembran-Proteinband 4.1 ähnlich 4B	0,73	1,66
<i>EPC1</i>	Verstärker von Polycomb homolog 1 (Drosophila)	0,83	1,77
<i>EPHA5</i>	EPH-Rezeptor A5	-1,15	0,45
<i>ERAP2</i>	Endoplasmatisches Retikulum Aminopeptidase 2	-0,96	0,52
<i>ERCC4</i>	ERCC Exzisionsreparatur 4, Endonuklease katalytische Untereinheit	0,64	1,56
<i>EREG</i>	Epiregulin	2,32	5,01
<i>ERRF11</i>	ERBB-Rezeptor-Feedback-Inhibitor 1	0,83	1,78
<i>ETNPPL</i>	Ethanolaminphosphat-Phospho-Lyase	-1,12	0,46
<i>ETV4</i>	Ets Variante 4	1,32	2,50
<i>ETV5</i>	Ets Variante 5	0,84	1,79
<i>EVI2B</i>	Ecotrope Virusintegrationsstelle 2B	1,08	2,11
<i>FA2H</i>	Fettsäure 2-Hydroxylase	0,84	1,78
<i>FAH</i>	Fumarylacetoacetat-Hydrolase (Fumarylacetoacetase)	0,87	1,83
<i>FAM102B</i>	Familie mit Sequenzähnlichkeit 102, Mitglied B	-0,69	0,62
<i>FAM129A</i>	Familie mit Sequenzähnlichkeit 129, Mitglied A	1,01	2,01
<i>FAM167A</i>	Familie mit Sequenzähnlichkeit 167, Mitglied A	0,81	1,76
<i>FAM234B</i>	Familie mit Sequenzähnlichkeit 234, Mitglied B	0,67	1,59
<i>FAM69A</i>	Familie mit Sequenzähnlichkeit 69, Mitglied A	0,79	1,72
<i>FAM83B</i>	Familie mit Sequenzähnlichkeit 83, Mitglied B	1,33	2,52
<i>FBN2</i>	Fibrillin 2	-0,73	0,60
<i>FBXO16</i>	F-Box-Protein 16	0,65	1,56
<i>FGFR2</i>	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 2	-0,87	0,55
<i>FHOD3</i>	Formin Homologie 2 Domäne enthält 3	1,07	2,09
<i>FLNB</i>	Filamin B, beta	0,81	1,75
<i>FNI</i>	Fibronektin 1	-0,71	0,61
<i>FNDC3B</i>	Fibronektin Typ III Domäne enthält 3B	0,74	1,66
<i>FOSL1</i>	FOS-ähnliches Antigen 1	0,97	1,96
<i>FOXD1</i>	Forkheadbox D1	1,23	2,34
<i>FRMD3</i>	FERM-Domäne enthält 3	1,55	2,92
<i>FTH1</i>	Ferritin, schweres Polypeptid 1	0,68	1,61
<i>FUBP1</i>	FUSE (Far Upstream Element) bindendes Protein 1	-0,80	0,57
<i>FUS</i>	FUS RNA-bindendes Protein	-0,91	0,53
<i>G0S2</i>	G0/G1 Schalter 2	0,76	1,70
<i>GADD45B</i>	Wachstumsstillstand und DNA-Schaden-induzierbar, beta	-0,63	0,65
<i>GAREM1</i>	GRB2 assoziiert, Regler von MAPK1 Subtyp 1	1,36	2,57
<i>GAS5</i>	Wachstumsstillstand-spezifisch 5 (nicht Protein kodierend)	-0,96	0,51
<i>GATA3</i>	GATA bindendes Protein 3	-0,69	0,62
<i>GBP1</i>	Guanylat bindendes Protein 1, Interferon induzierbar	-0,95	0,52
<i>GCLC</i>	Glutamat-Cystein-Ligase, katalytische Untereinheit	0,85	1,80

Gensymbol	Genname	PM _{2.5} + dsRNA	
		log ₂ FC	FC
<i>GDPD3</i>	Glycerophosphodiester-Phosphodiesterase Domäne enthält 3	0,65	1,57
<i>GIMAP2</i>	GTPase, IMAP-Familienmitglied 2	-1,13	0,46
<i>GJB3</i>	Gap-Junction Protein, Beta 3, 31 kDa	1,05	2,08
<i>GLTP</i>	Glykolipid-Transferprotein	0,82	1,76
<i>GOLGA8A</i>	Familie Golgin A8, Mitglied A	-0,77	0,58
<i>GOLGA8B</i>	Familie Golgin A8, Mitglied B	-0,77	0,58
<i>GPAT3</i>	Glycerin-3-phosphat Acyltransferase 3	1,70	3,25
<i>GPC5</i>	Glypican 5	-1,45	0,37
<i>GPNMB</i>	Glykoprotein (transmembranär) Nmb	-0,90	0,53
<i>GPR133</i>	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 133	-0,94	0,52
<i>GPR37</i>	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 37 (Endothelin-Rezeptor Typ B-ähnlich)	-1,14	0,45
<i>GPRC5C</i>	G-Protein-gekoppelter Rezeptor, Klasse C, Gruppe 5, Mitglied C	0,60	1,51
<i>GREM1</i>	Gremlin 1, DAN-Familie BMP-Antagonist	2,79	6,92
<i>GUSB</i>	Glucuronidase, beta	-0,60	0,66
<i>GUSBP3</i>	Glucuronidase, Beta Pseudogen 3	-0,82	0,57
<i>GUSBP9</i>	Glucuronidase, Beta Pseudogen 9	-0,82	0,57
<i>HAND1</i>	Herz- und Neuralkronenderivate exprimiert 1	-1,21	0,43
<i>HCP5</i>	HLA-Komplex P5 (nicht Protein kodierend)	-0,91	0,53
<i>HELZ2</i>	Helicase mit Zinkfinger 2, Transkriptionskoaktivator	-1,06	0,48
<i>HERC4</i>	HECT- und RLD-Domäne, die E3-Ubiquitinprotein-Ligase 4 enthält	-0,68	0,62
<i>HIC2</i>	Hypermethyliert bei Krebs 2	1,13	2,19
<i>HLA-B</i>	Haupthistokompatibilitätskomplex, Klasse I, B	-0,54	0,69
<i>HLA-E</i>	Haupthistokompatibilitätskomplex, Klasse I, E	-0,79	0,58
<i>HLA-F</i>	Haupthistokompatibilitätskomplex, Klasse I, F	-0,55	0,69
<i>HMGA2</i>	Hochmobilitätsgruppe AT-hook 2	1,19	2,28
<i>HMOX1</i>	Hämeoxygenase-1	1,35	2,55
<i>HNRNPA2B1</i>	Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein A2/B1	-0,91	0,53
<i>HNRNPD</i>	Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein D (AU-reiches Element RNA-bindendes Protein 1, 37 kda)	-0,98	0,51
<i>HNRNPUL2</i>	Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein U-ähnlich 2	0,96	1,94
<i>HOTAIR</i>	HOX Transkript Antisense RNA	-1,05	0,48
<i>HOXA9</i>	Homeobox A9, microRNA 196 b	-0,94	0,52
<i>HOXD10</i>	Homeobox D10	-0,78	0,58
<i>HPGD</i>	Hydroxyprostaglandin-Dehydrogenase 15-(NAD)	1,16	2,23
<i>HRH1</i>	Histamin-Rezeptor H1	0,98	1,97
<i>HSD3B1</i>	Hydroxy-delta-5-steroid-dehydrogenase, 3 Beta- und Steroid-delta-Isomerase 1	1,11	2,16
<i>HSH2D</i>	Hämatopoetische SH2-Domäne enthaltend	-1,16	0,45
<i>HSPB11</i>	Hitzeschockprotein Familie B (klein), Mitglied 11	-0,86	0,55
<i>ID1</i>	Inhibitor der DNA-Bindung 1, dominantes negatives Helix-Loop-Helix-Protein	-0,79	0,58

Gensymbol	Genname	PM _{2,5} + dsRNA	
		log ₂ FC	FC
<i>ID2</i>	Inhibitor der DNA-Bindung 2, dominantes negatives Helix-Loop-Helix-Protein	-1,35	0,39
<i>ID2B</i>	Inhibitor der DNA-Bindung 2B, dominantes negatives Helix-Loop-Helix-Protein (Pseudogen)	-1,47	0,36
<i>ID3</i>	Inhibitor der DNA-Bindung 3, dominantes negatives Helix-Loop-Helix-Protein	-1,00	0,50
<i>ID4</i>	Inhibitor der DNA-Bindung 4, dominantes negatives Helix-Loop-Helix-Protein	-1,72	0,30
<i>IFI16</i>	Interferon, gamma-induzierbares Protein 16	-0,73	0,60
<i>IFI35</i>	Interferon-induziertes Protein 35	-1,24	0,42
<i>IFI44</i>	Interferon-induziertes Protein 44	-1,14	0,45
<i>IFIH1</i>	Interferon induziert mit Helicase C Domäne 1	-0,82	0,56
<i>IFIT1</i>	Interferon-induziertes Protein mit Tetratricopeptid-Wiederholungen 1	-0,85	0,56
<i>IFNL2</i>	Interferon, Lambda 2	-1,09	0,47
<i>IFNL3</i>	Interferon, Lambda 3	-0,92	0,53
<i>IGFBP7</i>	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor bindendes Protein 7	-0,84	0,56
<i>IGSF10</i>	Immunglobulin-Superfamilie, Mitglied 10	-1,82	0,28
<i>IL11</i>	Interleukin 11	0,77	1,70
<i>IL1A</i>	Interleukin 1, alpha	1,87	3,66
<i>IL1B</i>	Interleukin 1, beta	1,00	2,00
<i>IL24</i>	Interleukin 24	1,49	2,81
<i>IL6</i>	Interleukin 6	0,94	1,92
<i>INA</i>	Internexin neuronales Zwischenfilamentprotein, alpha	0,69	1,61
<i>INH1A</i>	Inhibin, alpha	-0,86	0,55
<i>INSL4</i>	Insulinähnliches Peptid 4	-1,49	0,36
<i>ITGA2</i>	Integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 Untereinheit des VLA-2 Rezeptors)	1,33	2,51
<i>ITGB4</i>	Integrin, beta 4	1,34	2,53
<i>ITPR1</i>	Inositol 1,4,5-triphosphat-Rezeptor, Typ 1	-0,74	0,60
<i>JAG1</i>	Jagged 1	0,89	1,85
<i>JUN</i>	Jun Proto-Onkogen	1,16	2,23
<i>JUP</i>	Junction plakoglobin	0,76	1,70
<i>KCNJ15</i>	Kalium nach innen gerichteter Kanal, Unterfamilie J, Mitglied 15	-1,38	0,38
<i>KDM5B</i>	Lysin (K)-spezifische Demethylase 5B	0,78	1,72
<i>KIAA0907</i>	Kiaa0907	-0,76	0,59
<i>KIAA1549</i>	Kiaa1549	0,89	1,86
<i>KIAA1671</i>	Kiaa1671	0,62	1,54
<i>KLF9</i>	Kruppel-ähnlicher Faktor 9	-1,23	0,43
<i>KRT17</i>	Keratin 17	0,76	1,70
<i>KRT6A</i>	Keratin 6A	1,63	3,09
<i>LAMA1</i>	Laminin, alpha 1	-1,83	0,28
<i>LAMP3</i>	Lysosomal-assoziiertes Membranprotein 3	-1,83	0,28
<i>LAP3</i>	Leucin-Aminopeptidase 3	-0,94	0,52

Gensymbol	Genname	PM _{2.5} + dsRNA	
		log2FC	FC
<i>LAPTM5</i>	Lysosomales transmembranäres Protein 5	1,36	2,56
<i>LETM2</i>	Leucin-zipper-EF-hand enthält Transmembranprotein 2	1,58	2,99
<i>LGSN</i>	Lengsin, Linsenprotein mit Glutamin-Synthetase-Domäne	-1,20	0,43
<i>LHX4-AS1</i>	LHX4 Antisense-RNA 1	-0,67	0,63
<i>LIFR</i>	Leukämie hemmender Faktor-Rezeptor alpha	-0,72	0,61
<i>LINC00472</i>	Lange intergenische nicht-proteinkodierende RNA 472	-0,83	0,56
<i>LINC00622</i>	Lange intergenische nicht-proteinkodierende RNA 622	0,91	1,88
<i>LINC00662</i>	Lange intergenische nicht-proteinkodierende RNA 662	0,92	1,89
<i>LINC00963</i>	Lange intergenische nicht-proteinkodierende RNA 963	-0,59	0,67
<i>LINC01588</i>	Lange intergenische nicht-proteinkodierende RNA 1588	0,80	1,74
<i>LMO1</i>	LIM-Domain nur 1 (Rhombotin 1)	-0,76	0,59
<i>LPAR6</i>	Lysophosphatidsäure-Rezeptor 6	-0,96	0,51
<i>LPL</i>	Lipoproteinlipase	-1,03	0,49
<i>LSM14B</i>	LSM14B, SCD6 Homolog B (S. Cerevisiae)	1,06	2,09
<i>MAMDC2</i>	MAM-Domäne mit 2	-2,45	0,18
<i>MAP1B</i>	Mikrotubuli assoziiertes Protein 1B	1,11	2,15
<i>MATR3</i>	Matrin 3	-1,05	0,48
<i>MCAM</i>	Melanom-Zelladhäsionsmolekül	-0,59	0,66
<i>MCC</i>	Mutiert bei kolorektalen Karzinomen	-2,00	0,25
<i>MCM3AP-AS1</i>	MCM3AP Antisense-RNA 1	-0,75	0,60
<i>MCTP2</i>	Mehrere C2-Domänen, transmembranär 2	-0,75	0,59
<i>MDM2</i>	MDM2 Proto-Onkogen, E3 Ubiquitin Protein-Ligase	0,67	1,59
<i>MED13L</i>	Mediator-Komplex-Untereinheit 13 ähnlich	-0,98	0,51
<i>METTL3</i>	Methyltransferase ähnlich 3	-0,94	0,52
<i>MFAP3L</i>	Mikrofibrillär-assoziertes Protein 3 ähnlich	1,12	2,18
<i>MFAP5</i>	Mikrofibrillär-assoziertes Protein 5	-1,03	0,49
<i>MICAL2</i>	Mikrotubuli-assozierte Monooxygenase, Calponin und LIM-Domäne enthält 2	1,08	2,12
<i>MIR1248</i>	MicroRNA 1248	-1,12	0,46
<i>MIR196B</i>	Homeobox A9, microRNA 196b	-0,94	0,52
<i>MIR21</i>	MicroRNA 21	-1,52	0,35
<i>MIR23A</i>	MicroRNA 23a	-0,82	0,57
<i>MIR24-2</i>	MicroRNA 24-2	-0,82	0,57
<i>MIR4435-2HG</i>	MIR4435-2 Wirtsgen (nicht Protein kodierend)	0,77	1,71
<i>MIR5193</i>	microRNA 5193	-1,00	0,50
<i>MIR612</i>	MicroRNA 612	-1,49	0,36
<i>MIR6756</i>	MicroRNA 6756	-0,59	0,66
<i>MKX</i>	Mohawk homeobox	-0,97	0,51
<i>MLLT11</i>	Myeloische/Lymphoide oder gemischt-lineare Leukämie (Trithorax homolog, Drosophila); transloziert nach, 11	1,00	1,99
<i>MME</i>	Membran-Metallo-Endopeptidase	-1,20	0,43
<i>MMP12</i>	Matrix-Metallopeptidase 12 (Makrophagen-Elastase)	-2,32	0,20

Gensymbol	Genname	PM _{2.5} + dsRNA	
		log ₂ FC	FC
<i>MMP13</i>	Matrix-Metallopeptidase 13 (Kollagenase 3)	-0,92	0,53
<i>MRC2</i>	Mannose-Rezeptor, C-Typ 2	-0,75	0,60
<i>MSH5-SAPCD1</i>	MSH5-SAPCD1 Readthrough (NMD-Kandidat)	-0,87	0,55
<i>MSI2</i>	Musashi RNA bindendes Protein 2	1,15	2,22
<i>MSLN</i>	Mesothelin	-0,84	0,56
<i>MT1F</i>	Metallothionein 1F	1,08	2,11
<i>MX1</i>	Myxovirus (Influenzavirus) Resistenz 1, Interferon-induzierbares Protein p78 (Maus)	-1,19	0,44
<i>MX2</i>	Myxovirus (Influenzavirus) Resistenz 2 (Maus)	-1,44	0,37
<i>MYLK</i>	Myosin-Leichtkettenkinase	-1,23	0,43
<i>MYLK3</i>	Myosin Leichtkettenkinase 3	-1,82	0,28
<i>MYO1G</i>	Myosin IG	1,96	3,90
<i>N4BP2L2</i>	NEDD4 bindendes Protein 2 ähnlich 2	-0,62	0,65
<i>NACA</i>	Naszierendes Polypeptid assoziierte Komplex-Alpha-Untereinheit	-0,84	0,56
<i>NAIP</i>	NLR-Familie, Apoptose-hemmendes Protein	-0,66	0,63
<i>NAV2</i>	Neuron-Navigator 2	-1,31	0,40
<i>NAV3</i>	Neuron-Navigator 3	1,48	2,79
<i>NCF2</i>	Neutrophiler zytosolischer Faktor 2	1,41	2,65
<i>NEAT1</i>	Nuclear paraspeckle assembly Transkript 1 (Nicht Protein kodierend)	-1,49	0,36
<i>NEDD9</i>	Neuronale Vorläuferzelle exprimiert, entwicklungsstechnisch herunterreguliert 9	-1,06	0,48
<i>NEGR1</i>	Neuronaler Wachstumsregulator 1	-1,35	0,39
<i>NET1</i>	Neuroepitheliale Zelltransformation 1	0,76	1,69
<i>NEURL1B</i>	Neuralisierte E3-Ubiquitin-Protein-Ligase 1B	-0,70	0,62
<i>NFE2L2</i>	Nuklearfaktor, Erythroid 2-wie 2	0,65	1,57
<i>NHSL1</i>	NHS-ähnlich 1	1,33	2,51
<i>NID2</i>	Nidogen 2 (Osteonidogen)	1,19	2,28
<i>NLRC5</i>	NLR-Familie, CARD-Domain enthält 5	-1,12	0,46
<i>NORAD</i>	Nicht-kodierende RNA aktiviert durch DNA-Schäden	0,84	1,79
<i>NPAS2</i>	Neuronale PAS-Domäne Protein 2	0,74	1,67
<i>NPR3</i>	Natriuretischer Peptidrezeptor 3	-1,40	0,38
<i>NPTX1</i>	Neuronales Pentraxin I	-0,82	0,57
<i>NR4A3</i>	Nukleare Rezeptorunterfamilie 4, Gruppe A, Mitglied 3	-0,92	0,53
<i>NRP1</i>	Neuropilin 1	0,91	1,88
<i>NRXN3</i>	Neurexin 3	-1,34	0,40
<i>NSMCE4A</i>	Nicht-SMC Element 4 Homolog A (S. Cerevisiae)	-1,33	0,40
<i>NT5C3A</i>	5'-Nukleotidase, zytosolisch IIIA	-0,93	0,53
<i>NT5E</i>	5'-Nukleotidase, ecto (CD73)	1,14	2,20
<i>OAS2</i>	2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase 2, 69/71 kDa	-1,13	0,46
<i>OAS3</i>	2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase 3, 100 kDa	-0,90	0,53
<i>OLAH</i>	Oleoyl-ACP-Hydrolase	-1,16	0,45

Gensymbol	Genname	PM _{2.5} + dsRNA	
		log ₂ FC	FC
<i>OLFML1</i>	Olfactomedin-ähnlich 1	-1,80	0,29
<i>OR7E14P</i>	Olfaktorischer Rezeptor, Familie 7, Unterfamilie E, Mitglied 14 Pseudogen	1,09	2,12
<i>PAK2</i>	P21-Protein (Cdc42/Rac)-aktivierte Kinase 2	0,62	1,53
<i>PAPLN</i>	Papilin, proteoglykanähnliches sulfatiertes Glykoprotein	-0,94	0,52
<i>PAQR5</i>	Progesterin- und Adipoq-Rezeptor-Familienmitglied V	1,18	2,26
<i>PARP10</i>	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-Familie, Mitglied 10	-0,86	0,55
<i>PARP12</i>	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-Familie, Mitglied 12	-0,67	0,63
<i>PARP9</i>	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-Familie, Mitglied 9	-1,02	0,49
<i>PCBD2</i>	Pterin-4 alpha-Carbinolamin-Dehydratase/Dimerisierungskofaktor des Hepatozyten-Kernfaktors 1 alpha (TCF1) 2	-0,60	0,66
<i>PCF11</i>	PCF11-Spaltung und Polyadenylierungsfaktor-Untereinheit	-0,91	0,53
<i>PDCD5</i>	Programmierter Zelltod 5	-1,18	0,44
<i>PDE3A</i>	Phosphodiesterase 3A, cGMP-inhibiert	-0,62	0,65
<i>PDGFA</i>	Plättchen-abgeleiteter Wachstumsfaktor alpha-Polypeptid	0,72	1,64
<i>PDK4</i>	Pyruvatdehydrogenasekinase, Isozym 4	0,63	1,55
<i>PDLIM5</i>	PDZ und LIM Domäne 5	0,86	1,81
<i>PHIP</i>	Pleckstrin Homologie Domäne interagierendes Protein	-0,90	0,54
<i>PHLDA1</i>	Pleckstrin homology-ähnliche Domäne, Familie A, Mitglied 1	1,36	2,56
<i>PI3</i>	Peptidase-Inhibitor 3, von der Haut abgeleitet	1,17	2,24
<i>PI4K2B</i>	Phosphatidylinositol 4-Kinase Typ 2 beta	-0,63	0,65
<i>PID1</i>	Phosphotyrosin-Wechselwirkungsdomäne, enthaltend 1	0,75	1,69
<i>PKDCC</i>	Proteinkinase-Domäne enthaltend, zytoplasmatisch	-2,09	0,23
<i>PLEC</i>	Plectin	0,75	1,68
<i>PNISR</i>	PNN-interagierendes Serin/Arginin-reiches Protein	-0,74	0,60
<i>PNPLA1</i>	Patatin-ähnliche Phospholipase-Domäne, enthaltend 1	1,11	2,15
<i>PNPT1</i>	Polyribonukleotid Nukleotidyltransferase 1	-0,97	0,51
<i>POLR2J</i>	Postmeiotische Segregation erhöht 2 Pseudogen, Polymerase (RNA) II (DNA gerichtet) Polypeptid J, 13.3 kDa	-1,00	0,50
<i>POLR2J2</i>	Polymerase (RNA) II (DNA gerichtet) Polypeptid J2	-1,00	0,50
<i>POLR2J3</i>	Polymerase (RNA) II (DNA gerichtet) Polypeptid J3	-1,00	0,50
<i>PON3</i>	Paraoxonase 3	-0,95	0,52
<i>POPDC3</i>	Popeye Domäne enthält 3	1,44	2,71
<i>PPM1L</i>	Proteinphosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ -abhängig, 1L	-0,85	0,56
<i>PPP1R10</i>	Proteinphosphatase 1, regulatorische Untereinheit 10	0,71	1,64
<i>PPP1R14A</i>	Proteinphosphatase 1, regulatorische (Inhibitor) Untereinheit 14A	0,80	1,74
<i>PPP1R15A</i>	Proteinphosphatase 1, regulatorische Untereinheit 15A	0,76	1,69
<i>PPP2R2B</i>	Proteinphosphatase 2, regulatorische Untereinheit B, beta	-0,97	0,51
<i>PPP2R3A</i>	Proteinphosphatase 2, regulatorische Untereinheit B", alpha	0,62	1,53
<i>PRDM1</i>	PR-Domain mit 1, mit ZNF-Domain	0,95	1,93
<i>PRG4</i>	Proteoglykan 4	-0,68	0,62
<i>PRKD3</i>	Protein kinase D3	-1,05	0,48

Gensymbol	Genname	PM _{2.5} + dsRNA	
		log2FC	FC
<i>PRPF4B</i>	Pre-mRNA-Bearbeitungsfaktor 4B	-1,01	0,50
<i>PSCA</i>	Prostata-Stammzellen-Antigen	1,22	2,32
<i>PSG4</i>	Schwangerschaftsspezifisches Beta-1-Glykoprotein 4	-1,04	0,49
<i>PSMB9</i>	Proteasom (Prosom, Makroschmerz) Untereinheit, Beta-Typ, 9	-0,85	0,55
<i>PTGS2</i>	Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 2 (Prostaglandin G/H-Synthase und Cyclooxygenase)	1,14	2,21
<i>PXDN</i>	Peroxidasin homolog (<i>Drosophila</i>)	-1,16	0,45
<i>QPCT</i>	Glutaminyl-Peptid-Cyclotransferase	-1,45	0,37
<i>RAB11FIP5</i>	RAB11-Familie interagierendes Protein 5 (Klasse I)	0,57	1,49
<i>RASGRP3</i>	RAS Guanyl freisetzendes Protein 3 (Calcium- und DAG-reguliert)	-0,84	0,56
<i>RASSF5</i>	Ras assoziierte (ralgds/AF-6) Domain Familienmitglied 5	0,84	1,79
<i>RBM4</i>	RNA-bindendes Motiv Protein 4	-0,83	0,56
<i>RDH10</i>	Retinol-Dehydrogenase 10 (all-trans)	1,05	2,07
<i>RFTN1</i>	Raftlin, lipid raft left 1	-0,94	0,52
<i>RHOBTB3</i>	Rho-bezogene BTB-Domäne enthält 3	-1,05	0,48
<i>RHOF</i>	Ras homologes Familienmitglied F (in Filopodien)	0,64	1,56
<i>RIMKLB</i>	Ribosomale Modifikation Protein randähnliches Familienmitglied B	-1,24	0,42
<i>RLF</i>	Neu arrangierte L-myc-Fusion	0,57	1,48
<i>RNF145</i>	Ringfingerprotein 145	-0,66	0,63
<i>RNF182</i>	Ringfingerprotein 182	-1,10	0,47
<i>RNF213</i>	Ringfingerprotein 213	-1,13	0,46
<i>RPAIN</i>	RPA interagierendes Protein	-1,03	0,49
<i>RPS24</i>	Ribosomales Protein S24	-1,27	0,42
<i>RREB1</i>	Ras reagierendes Element bindendes Protein 1	0,67	1,59
<i>RSPO3</i>	R-Spondin 3	1,43	2,70
<i>RTP4</i>	Rezeptor (chemosensorisch) Transporterprotein 4	-1,48	0,36
<i>RUNX3</i>	Laufbezogener Transkriptionsfaktor 3	0,59	1,50
<i>S100A9</i>	S100 Calcium-Bindungsprotein A9	2,05	4,16
<i>SAMD11</i>	Sterile Alpha-Motivdomäne enthält 11	-1,11	0,46
<i>SAMD9L</i>	Sterile Alpha-Motivdomäne mit 9-ähnlich	-1,07	0,48
<i>SAMHD1</i>	SAM-Domäne und HD-Domäne 1	-1,12	0,46
<i>SAPCD1</i>	Suppressor APC-Domäne mit 1	-0,87	0,55
<i>SCARA3</i>	Scavenger-Rezeptor Klasse A, Mitglied 3	-0,61	0,66
<i>SCD</i>	Stearoyl-CoA-Desaturase (Delta-9-Desaturase)	1,11	2,16
<i>SDC2</i>	Syndekan 2	-1,13	0,46
<i>SDC3</i>	Syndekan 3	0,57	1,49
<i>SEL1L2</i>	Sel-1 Suppressor von lin-12-like 2 (<i>C. elegans</i>)	-1,20	0,43
<i>SEL1L3</i>	Sel-1 Suppressor von lin-12-like 3 (<i>C. elegans</i>)	0,85	1,80
<i>SEMA3A</i>	Sema-Domäne, Immunglobulin-Domäne (Ig), kurze Basisdomäne, sekretiert, (Semaphorin) 3A	0,90	1,86
<i>SEMA6D</i>	Sema-Domäne, Transmembran-Domäne (TM) und Zytoplasma-Domäne (Semaphorin) 6D	-1,47	0,36

Gensymbol	Genname	PM _{2.5} + dsRNA	
		log ₂ FC	FC
<i>SENP5</i>	SUMO1/Sentrin spezifische Peptidase 5	0,55	1,47
<i>SEPSECS-AS1</i>	SEPSECS antisense RNA 1 (Kopf an Kopf)	-0,63	0,65
<i>SERINC2</i>	Serin-Integrator 2	1,03	2,04
<i>SERINC5</i>	Serin-Integrator 5	0,95	1,94
<i>SERPINB2</i>	Serpin-Peptidase-Inhibitor, Klade B (Ovalbumin), Mitglied 2	0,85	1,80
<i>SERPINE2</i>	Serpin-Peptidase-Inhibitor, Klade E (Nexin, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1), Mitglied 2	0,78	1,72
<i>SERPINI1</i>	Serpin-Peptidase-Inhibitor, Klade I (Neuroserpin), Mitglied 1	-1,22	0,43
<i>SFRP1</i>	Sekretiertes frizzled-verwandtes Protein 1	-0,64	0,64
<i>SFXN1</i>	Sideroflexin 1	-0,84	0,56
<i>SH2B3</i>	SH2B-Adapter Protein 3	0,98	1,97
<i>SH2D2A</i>	SH2-Domäne enthält 2A	1,77	3,41
<i>SH3BGRL3</i>	SH3-Domäne bindendes Glutamat-reiches Protein ähnlich 3	0,84	1,79
<i>SH3RF3</i>	SH3-Domäne mit Ringfinger 3	0,61	1,53
<i>SH3TC2</i>	SH3-Domäne und Tetratricopeptid wiederholend 2	0,59	1,50
<i>SHB</i>	Src Homologie 2 Domäne, die Adapterprotein B enthält	0,62	1,54
<i>SIPA1L1</i>	Signalinduzierte Proliferation-assoziiert 1 wie 1	-0,82	0,57
<i>SLAIN2</i>	SLAIN-Motivfamilie, Mitglied 2	0,71	1,64
<i>SLC12A8</i>	Gelöster Carrier Familie 12, Mitglied 8	-1,06	0,48
<i>SLC15A3</i>	Gelöster Carrier Familie 15 (Oligopeptidtransporter), Mitglied 3	-0,86	0,55
<i>SLC18A1</i>	Gelöster Carrier Familie 18, Mitglied A1	0,59	1,51
<i>SLC20A1</i>	Gelöster Carrier Familie 20 (Phosphat-Transporter), Mitglied 1	0,80	1,74
<i>SLC22A23</i>	Gelöster Carrier Familie 22, Mitglied 23	0,87	1,83
<i>SLC22A3</i>	Gelöster Carrier Familie 22 (organischer Kationen-Transporter), Mitglied 3	-1,07	0,48
<i>SLC27A2</i>	Gelöster Carrier Familie 27 (Fettsäure-Transporter), Mitglied 2	-0,60	0,66
<i>SLC48A1</i>	Gelöster Carrier Familie 48 (Häm-Transporter), Mitglied 1	1,12	2,17
<i>SLC7A11</i>	Gelöster Carrier Familie 7 (anionischer Aminosäure-Transporter leichte Kette, xc-System), Mitglied 11	1,48	2,79
<i>SLCO4A1</i>	Gelöster Carrier organische Anionen-Transporter Familie, Mitglied 4A1	1,13	2,19
<i>SLF1</i>	SMC5-SMC6 Komplexlokalisierungsfaktor 1	-0,90	0,53
<i>SLFN11</i>	Schlafen Familienmitglied 11	-0,71	0,61
<i>SLFN5</i>	Familienmitglied Schlafen 5	-0,94	0,52
<i>SMAD9</i>	SMAD Familienmitglied 9	-1,25	0,42
<i>SMAGP</i>	Kleines Zelladhäsionsglykoprotein	1,05	2,06
<i>SMARCA2</i>	SWI/SNF-bezogener, matrixassoziiertes, aktinabhängiger Chromatinregulator, Unterfamilie A, Mitglied 2	0,69	1,61
<i>SMOC1</i>	SPARC-bezogene modulare Calciumbindung 1	1,33	2,51
<i>SNAI2</i>	Snail Familie Zinkfinger 2	-1,36	0,39
<i>SNHG1</i>	Kleines nukleoläre RNA-Wirtsgen 1 (nicht Protein kodierend)	-0,73	0,60
<i>SNORA4</i>	Kleine nukleoläre RNA, H/ACA-Box 4	-1,12	0,46
<i>SNORA63</i>	Kleine nukleoläre RNA, H/ACA-Box 63	-1,12	0,46

Gensymbol	Genname	PM _{2.5} + dsRNA	
		log ₂ FC	FC
<i>SNORA81</i>	Kleine nukleoläre RNA, H/ACA-Box 81	-1,12	0,46
<i>SNORD2</i>	Kleine nukleoläre RNA, C/D-Box 2	-1,12	0,46
<i>SNORD22</i>	Kleine nukleoläre RNA, C/D-Box 22	-0,73	0,60
<i>SNORD25</i>	Kleine nukleoläre RNA, C/D-Box 25	-0,73	0,60
<i>SNORD26</i>	Kleine nukleoläre RNA, C/D-Box 26	-0,73	0,60
<i>SNORD27</i>	Kleine nukleoläre RNA, C/D-Box 27	-0,73	0,60
<i>SNORD28</i>	Kleine nukleoläre RNA, C/D-Box 28	-0,73	0,60
<i>SNORD29</i>	Kleine nukleoläre RNA, C/D-Box 29	-0,73	0,60
<i>SNORD30</i>	Kleine nukleoläre RNA, C/D-Box 30	-0,73	0,60
<i>SNORD31</i>	Kleine nukleoläre RNA, C/D-Box 31	-0,73	0,60
<i>SNORD44</i>	Kleine nukleoläre RNA, C/D-Box 44	-0,96	0,51
<i>SNORD47</i>	Kleine nukleoläre RNA, C/D-Box 47	-0,96	0,51
<i>SNORD74</i>	Kleine nukleoläre RNA, C/D-Box 74	-0,96	0,51
<i>SNORD76</i>	Kleine nukleoläre RNA, C/D-Box 76	-0,96	0,51
<i>SNORD77</i>	Kleine nukleoläre RNA, C/D-Box 77	-0,96	0,51
<i>SNORD79</i>	Kleine nukleoläre RNA, C/D-Box 79	-0,96	0,51
<i>SNORD80</i>	Kleine nukleoläre RNA, C/D-Box 80	-0,96	0,51
<i>SNORD81</i>	Kleine nukleoläre RNA, C/D-Box 81	-0,96	0,51
<i>NTB1</i>	Syntrophin, beta 1 (Dystrophin-assoziiertes Protein A1, 59 kDa, Basiskomponente 1)	0,82	1,76
<i>SNX10</i>	Sortierung Nexin 10	0,82	1,76
<i>SNX18</i>	Sortierung Nexin 18	0,92	1,90
<i>SNX5</i>	Sortierung Nexin 5	-0,73	0,60
<i>SOX7</i>	SRY (Geschlechtsbestimmungs Region Y)-Box 7	1,12	2,17
<i>SP110</i>	SP110 Nuklearkörper-Protein	-1,08	0,47
<i>SP8</i>	Sp8 Transkriptionsfaktor	1,94	3,83
<i>SPARC</i>	Sekretiertes Protein, sauer, cysteinreich (Osteonectin)	-1,05	0,48
<i>SPINK13</i>	Serinpeptidasehemmer, Kazal Typ 13 (mutmaßlich)	-1,54	0,34
<i>SPOCK1</i>	Sparc/Osteonectin, cwcv und kazal-ähnliche Domänen Proteoglykan (testican) 1	1,05	2,06
<i>SPRED1</i>	Sprossenbezogene, EVH1-Domäne enthält 1	0,82	1,77
<i>SPRY2</i>	Sprouty homolog 2 (Drosophila)	0,64	1,56
<i>SREK1</i>	Spleißen von regulatorischem Glutamin/Lysin-reichem Protein 1	-0,77	0,59
<i>SRSF5</i>	Serin/Arginin-reicher Spleißfaktor 5	-0,57	0,67
<i>SSTR1</i>	Somatostatin-Rezeptor 1	0,83	1,77
<i>STAT1</i>	Signalwandler und Aktivator der Transkription 1, 91kda	-1,14	0,45
<i>STAT2</i>	Signalwandler und Aktivator der Transkription 2, 113 kDa	-1,02	0,49
<i>STEAP1</i>	Sechs transmembranale Epithelantigene der Prostata 1	1,21	2,32
<i>STEAP4</i>	STEAP Familienmitglied 4	-1,86	0,28
<i>STOX2</i>	Storkhead Box 2	-1,06	0,48
<i>SV2C</i>	Synaptisches Vesikel-Glykoprotein 2C	-3,35	0,10
<i>SWI5</i>	SWI5 Rekombinationsreparatur homolog (Hefe)	0,61	1,53

Gensymbol	Genname	PM _{2.5} + dsRNA	
		log2FC	FC
<i>TAF15</i>	TAF15 RNA Polymerase II, TATA Box bindendes Protein (TBP)-assoziierter Faktor, 68 kDa	-1,03	0,49
<i>TAP1</i>	Transporter 1, ATP-Bindekassette, Unterfamilie B (MDR/TAP)	-0,91	0,53
<i>TCF7L2</i>	Transkriptionsfaktor 7-like 2 (T-Zell-spezifisch, HMG-Box)	0,69	1,62
<i>TDP2</i>	Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 2	0,68	1,60
<i>TDRD7</i>	Tudor-Domäne enthält 7	-0,81	0,57
<i>TECR</i>	Trans-2,3-Enoyl-CoA-Reduktase	-0,61	0,65
<i>TGDS</i>	TDP-Glukose 4,6-Dehydratase	-0,93	0,52
<i>TGFA</i>	Transformierender Wachstumsfaktor, alpha	2,10	4,30
<i>THBD</i>	Thrombomodulin	0,79	1,73
<i>THUMPD3-ASI</i>	THUMPD3 Antisense-RNA 1	-0,65	0,64
<i>TIA1</i>	Zytotoxisches TIA1-Granulat-assoziertes RNA-Bindungsprotein	-0,64	0,64
<i>TKT</i>	Transketolase	0,84	1,79
<i>TLR3</i>	Toll-like Rezeptor 3	-1,13	0,46
<i>TLR4</i>	Toll-like-Rezeptor 4	0,88	1,84
<i>TM2D1</i>	TM2-Domäne enthält 1	-0,88	0,55
<i>TMEM156</i>	Transmembranprotein 156	0,84	1,79
<i>TNFRSF11B</i>	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor Superfamilie, Mitglied 11b	-1,10	0,47
<i>TNFRSF19</i>	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Superfamilie, Mitglied 19	-0,89	0,54
<i>TNFRSF21</i>	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Superfamilie, Mitglied 21	1,15	2,21
<i>TNFSF10</i>	Tumor-Nekrose-Faktor (Ligand) Superfamilie, Mitglied 10	-2,67	0,16
<i>TNRC18</i>	Trinukleotidwiederholung enthält 18	0,67	1,59
<i>TNXA</i>	Tenascin XA (Pseudogen)	0,85	1,80
<i>TNXB</i>	Tenascin XB	0,85	1,80
<i>TPBG</i>	Trophoblasten-Glykoprotein	0,87	1,82
<i>TRABD2A</i>	Trab-Domäne, die 2A enthält	-0,85	0,55
<i>TRANK1</i>	Tetratricopeptidwiederholung und Ankyrinwiederholung, enthält 1	-0,89	0,54
<i>TRIB3</i>	Tribbles Pseudokinase 3	0,75	1,69
<i>TRIM21</i>	Dreiteiliges Motiv enthält 21	-0,94	0,52
<i>TRIM22</i>	Dreiteiliges Motiv enthält 22	-1,93	0,26
<i>TRIM5</i>	Dreiteiliges Motiv enthält 5	-1,04	0,49
<i>TRIM6</i>	Dreiteiliges Motiv enthält 6	-0,85	0,56
<i>TRIM8</i>	Dreiteiliges Motiv enthält 8	0,93	1,90
<i>TSPAN12</i>	Tetraspanin 12	0,72	1,65
<i>TSPAN14</i>	Tetraspanin 14	0,70	1,63
<i>TXNIP</i>	Thioredoxin interagierendes Protein	-0,95	0,52
<i>U2AF1</i>	U2 kleiner nukleärer RNA-Hilfsfaktor 1	-0,71	0,61
<i>U2SURP</i>	U2 snRNP-assozierte SURP-Domäne, die folgendes enthält	-0,60	0,66
<i>UBA7</i>	Ubiquitin-ähnlicher Modifikator aktivierendes Enzym 7	-1,00	0,50
<i>UBASH3B</i>	Ubiquitin-assozierte und SH3-Domäne, die B enthält	1,00	1,99
<i>UBQLN1</i>	Ubiquilin 1	0,88	1,84

Gensymbol	Genname	PM _{2.5} + dsRNA	
		log ₂ FC	FC
<i>UGGT2</i>	UDP-Glukose Glykoprotein Glucosyltransferase 2	-0,70	0,61
<i>UGT1A1</i>	UDP-Glucuronosyltransferase 1-Familie, Polypeptid A1	0,98	1,97
<i>UGT1A10</i>	UDP-Glucuronosyltransferase 1-Familie, Polypeptid A10	0,94	1,91
<i>UGT1A3</i>	UDP-Glucuronosyltransferase 1-Familie, Polypeptid A3	1,00	2,00
<i>UGT1A4</i>	UDP-Glucuronosyltransferase 1-Familie, Polypeptid A4	0,94	1,91
<i>UGT1A5</i>	UDP-Glucuronosyltransferase 1-Familie, Polypeptid A5	1,00	2,00
<i>UGT1A6</i>	UDP-Glucuronosyltransferase 1-Familie, Polypeptid A6	0,94	1,92
<i>UGT1A7</i>	UDP-Glucuronosyltransferase 1-Familie, Polypeptid A7	0,94	1,91
<i>UGT1A8</i>	UDP-Glucuronosyltransferase 1-Familie, Polypeptid A8	0,98	1,97
<i>UGT1A9</i>	UDP-Glucuronosyltransferase 1-Familie, Polypeptid A9	0,98	1,97
<i>UGT8</i>	UDP-Glykosyltransferase 8	-0,82	0,57
<i>UPK3BL</i>	Uroplakin 3B-ähnlich	-1,00	0,50
<i>USH1C</i>	Usher-Syndrom 1C (autosomal rezessiv, schwer)	-0,92	0,53
<i>USP18</i>	Ubiquitin-spezifische Peptidase 18	-1,24	0,42
<i>VCAN</i>	Versican	1,02	2,03
<i>VEGFC</i>	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor C	0,84	1,79
<i>VIT</i>	Vitrin	-1,85	0,28
<i>VMP1</i>	Vakuole Membranprotein 1	-1,52	0,35
<i>WARS</i>	Tryptophanyl-tRNA-Synthetase	-0,84	0,56
<i>WFS1</i>	Wolfram-Syndrom 1 (Wolframin)	0,59	1,51
<i>WISP2</i>	WNT1 induzierbarer Signalweg Protein 2	-1,22	0,43
<i>WNT5A</i>	Wingless-Typ MMTV-Integration Site Family, Mitglied 5A	0,64	1,56
<i>XAF1</i>	XIAP-assoziiertes Faktor 1	-1,14	0,45
<i>ZC3H12D</i>	Zinkfinger CCCH-Typ enthält 12D	-1,46	0,36
<i>ZCCHC24</i>	Zinkfinger, CCHC-Domäne enthält 24	0,69	1,61
<i>ZFP36</i>	ZFP36 Ringfingerprotein	0,73	1,66
<i>ZNF207</i>	Zink-Fingerprotein 207	-1,07	0,48
<i>ZNF395</i>	Zink-Fingerprotein 395	0,63	1,55
<i>ZNF831</i>	Zink-Fingerprotein 831	-0,94	0,52
<i>ZXDC</i>	ZXD Familie Zinkfinger C	0,68	1,60

Gen	Gen-expression		CpG-Gehalt und Nachbarschaftskontext																									
	logFC	FC	N_Shelf			N_Shore			Island		S_Shore			S_Shelf			Open Sea											
NAV2	-1,53	0,35									-0,07	-0,05							-0,06	-0,11	-0,04	-0,04						
NCKAP5	-1,16	0,45																	0,07	-0,07								
NET1	0,68	1,61				-0,02																						
NEURLIB	-0,78	0,58						0,03																				
NPAS2	0,77	1,71									-0,20	-0,09										-0,11						
NTSE	1,18	2,26																				-0,08						
OAS2	-1,04	0,49																				-0,12						
OLFM1	-0,84	0,56				-0,03																						
OLEML1	-1,96	0,26																				0,07						
PARP12	-0,68	0,62	-0,06																									
PDE1A	-0,90	0,54																				0,16						
PDLIM5	0,99	1,99						0,03																				
PI3	1,20	2,29																				-0,07						
PKDCC	-2,01	0,25																				0,24	0,04	0,08	0,14			
PNPLA1	0,97	1,95																				-0,13	-0,10	-0,03				
PPP1R14A	0,84	1,79				0,03																						
PPP2R2B	-1,24	0,42				0,08																						
PRDM1	0,72	1,65									-0,09																	
PRKACA	0,77	1,71									-0,09																	
PRKAG2	0,54	1,45																				-0,17	-0,10	-0,08	-0,08	-0,08	-0,03	
PSCA	1,20	2,30																				-0,03						
PTGS2	1,38	2,60									-0,09	-0,07																
PTK6	0,91	1,88						-0,04	-0,05																			
PXDN	-1,16	0,45																				-0,07	-0,06	-0,08	-0,09	-0,03		
RAB27B	0,99	1,98																				-0,04						
RALGPS2	0,68	1,61				-0,09																						
RNF145	-0,64	0,64																				-0,07						
S100A8	1,78	3,44																				-0,02						
S100A9	2,05	4,15																				-0,03	-0,09	-0,06	-0,02	-0,02	-0,06	
SCNN1A	-0,82	0,57				-0,03																						
SEL1L3	0,75	1,68																				-0,11						
SEMA3A	0,95	1,94																				-0,27						
SEMA6D	-1,45	0,37																				0,07						
SERINC2	0,94	1,92																				-0,09						
SERINC5	0,89	1,85																				-0,08						
SERPIN2	1,29	2,45																				-0,07						
SH2B3	0,93	1,90				-0,05					-0,10																	
SH2D2A	1,52	2,87									-0,08	-0,05	-0,12	-0,05	-0,08	-0,11												
SIPA1L1	-0,92	0,53																				-0,03						
SLC15A3	-1,03	0,49									-0,03																	
SLC22A23	0,89	1,86				-0,04																0,06	-0,06					
SLC39A14	0,48	1,39																				-0,19						
SLC7A11	1,58	2,99																				-0,13						
SLCO4A1	1,14	2,20																				-0,06						

8 Abkürzungsverzeichnis

Physikalische Größen

A	Absorption
c	Proteinmenge
c	Konzentration
m	Steigung
RFU	relative Fluoreszenz Unit
λ	Wellenlänge

Einheiten

A	Ampere
bp	Basenpaar
g	Gramm
h	Stunde(n)
l	Liter
M	molar
m	Meter
min	Minute(n)
N	Normalität
rpm	revolutions per minute: Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde(n)
V	Volt
W	Watt

Vorsilben

G	Giga	10^9
M	Mega	10^6
k	Kilo	10^3
c	Zenti	10^{-2}
m	Milli	10^{-3}
μ	Mikro	10^{-6}
n	Nano	10^{-9}
p	Pico	10^{-12}
f	Femto	10^{-15}

Nukleotide

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

Aminosäuren

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

1-OHP	1-Hydroxypyren
ACE	Acenaphthen
ACY	Acenaphthylen
ANT	Anthracen
BaA	Benzo[<i>a</i>]anthracen
BaP	Benzo[<i>a</i>]pyren
BbF	Benzo[<i>b</i>]fluoranthen
BghiP	Benzo[<i>ghi</i>]pyren
BkF	Benzo[<i>k</i>]fluoranthen
BPDE	Benzo[<i>a</i>]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid
CHR	Chrysen
DahA	Dibenzo[<i>a,h</i>]anthracen
FLT	Fluoranthen
FLU	Fluoren

IcdP	Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pyren
NAP	Naphthalin
PHE	Phenanthren
PYR	Pyren

Weitere

3'UTR	3' untranslatierter Bereich (engl.: 3' untranslated region)
4E-BPI	eIF-4E bindende Protein
5'UTR	5' untranslatierter Bereich (engl.: 5' untranslated region)
ADP	Adenosindiphosphat
AhR	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
AHRE	AhR-Response-Element
AhRR	AhR-Repressor
AIP	AhR-interagierendes Protein
AKR	Aldo-Keto-Reduktasen
Akt	Proteinkinase B
AMC	7-Amino-4-methyl-cumarin
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP aktivierte Proteinkinase
ANF	α -Naphthoflavon
ANOVA	Analysis of variance
APLI-MS	Atmosphärendruck-Laserionisations-Massenspektrometer
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARA9	Ah-Rezeptor assoziiertes Protein 9
ARD1	Acetyltransferase (engl.: arrest-defective-1)
ARE	antioxidatives Respons-Element
ARNT	AhR nuclear translocator (engl.)
ATCC	American type culture collection
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bichinonsäure
BEAS-2B	humane immortalisierte Bronchialepithelzellen
BHA	Butylhydroxyanisol
bHLH	elementare Helix-Schleife-Helix (engl.: basic helix-loop-helix)
BImSchV	Bundes-Immissionsschutzverordnungen
BSA	Bovines Serumalbumin
CaMg(CO ₃) ₂	Dolomit
cDNA	komplementäre DNA (engl.: complementary DNA)
CH	2-Methyl-2H-pyrazol-3-carbonsäure-(2-methyl-4-o-tolylazo-phenyl)-amid (CH223191)
CNC-bZIP	cap'n'collar basic leucin zipper (engl.)
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung (engl.: chronic obstructive pulmonary disease)
COX2	Cyclooxygenase 2
CpG	Cytosin-Guanin-Dinukleotid
CS	Zigarettenrauch (engl.: cigarette smoke)
Ct	cycle treshold
CYP	Cytochrom P450
DALYs	behinderungsbereinigte Lebensjahre (engl.: disability-adjusted life years)

DEG	differentiell exprimierte Gene
DEVD	Aminosäuresequenz aus Asparaginsäure-Glutaminsäure-Valin-Asparaginsäure
DMEM	Dulbeccos's Modified Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
Doxo	Doxorubicin
DRE	Dioxin-Respons-Element
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eEF2	eukaryotischen Elongationsfaktor-2
eEF2K	eukaryotischen Elongationsfaktor-2 Kinase
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (engl.: epidermal growth factor)
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (engl.: epidermal growth factor receptor)
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
EH	Epoxidhydrolase
eIF-4E	eukaryotischen Translation-initiierende-Faktor-4E
EMT	epithelial-mesenchymalen Transitions
ER	Endoplasmatischen Retikulum
EU	Europäische Union
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum (engl.: fetal calf serum)
Fe ₂ O ₃	Hematit
FIH-1	factor inhibiting HIF-1 (engl.)
GAP-DH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC	Gaschromatographie
gDNA	genomische DNA
GO	Gen-Ontologie
GSH	Glutathion
GSK3 β	Glykogen-Synthase-Kinase 3 β
GSR	Glutathionreduktase
GSSG	Glutathiondisulfid
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
HAK	halogenierte aromatische Kohlenwasserstoff
Hb	Hämoglobin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF-1	Hypoxie induzierbare Faktor-1
HO•	Hydroxyl-Radikalen
HO-1	Hämoxygenase-1
HPH	HIF-1-Prolylhydroxylase
HRE	Hypoxie-Respons-Element
HRP	Meerrettichperoxidase (engl.: horseradish peroxidase)
HSP90	Hitzeschockprotein 90
IARC	Internationale Agentur für Krebsforschung (engl.: International Agency for Research on Cancer)

IFN	Interferon
IL	Interleukin
IM3829	4-(2-Cyclohexyethoxy)anilin
INT	2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid
IQ	Intelligenzquotient
IUPAC	International Union of Applied and Pure Chemistry
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
KC	KC7F2
Keap1	Kelch ähnliches ECH-assoziierte Protein 1 (engl.: Kelch-like ECH-associated protein 1)
LDH	Lactatdehydrogenase
LXR	Liver X receptor (engl.)
MAP-Kinasen	mitogen-aktivierte Protein Kinasen
Mg	Magnesium
Mill.	Million
miRNA	microRNA
mRNA	Messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
mTOR	mechanistic target of rapamycin (engl.)
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
NAC	N-Acetylcysteine
NADH	Nicotinamidadeninukleotid
NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphat
NCBI	National Centers for Biotechnology Information (engl.)
Neh	Nrf-2-ECH homolog
NF- κ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (engl.)
NOX	NADPH-Oxidase
NP	Nanopartikeln
NP-40	Nonidet P-40
Nrf-2	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (engl.)
O ₂ ^{•-}	Hyperoxid-Anion
ODDD	sauerstoffabhängige Degradationsdomäne (engl.: oxygen-dependent degradation domain)
OPA	o-Phthalaldehyd
p38	P38-mitogenaktivierte Proteinkinase
PAK	polycyclische aromatischer Kohlenwasserstoffe
PAS	PER-ARNT-SIM
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (engl.: Phosphate buffered saline)
PER	period circadian protein (engl.)
PGE2	Prostaglandin E2
PharmGKB	Pharmacogenomics Knowledgebase
PHDs	Prolyl-4-hydroxylasen
Phospho	phosphoryliert
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PM	Feinstaub (engl.: particulate matter)
PM _{0,1}	Partikel mit einem aerodynamischen Durchmesser von $\leq 0,1 \mu\text{m}$
PM _{2,5}	Partikel mit einem aerodynamischen Durchmesser von $\leq 2,5 \mu\text{m}$
PM ₁₀	Partikel mit einem aerodynamischen Durchmesser von $\leq 10 \mu\text{m}$

PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRIMA	Integration in Microarray Analysis
PVDF	Polyvinylidenfluorid
pVHL	von Hippel-Lindau Protein
p-Wert	Signifikanzwert
qRT-PCR	quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (engl.: quantitative real-time polymerase chain reaction)
RNA	Ribonucleic Acid
RNS	reaktiven Stickstoffspezies (engl.: reactive nitrogen species)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl.: reactive oxygen species)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rRNA	ribosomale RNA
RT	reverse Transkriptase
RXR	Retinoid X Rezeptors
S6K	p70 S6 Kinase
SAPK	stress aktivierte Proteinkinase
SD	Standard deviation
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SIM	single-minded protein (engl.)
sMaf	small musculoaponeurotic fibrosarcoma (engl.)
TAD	transaktivierende Domäne
TBS	Tris gepufferte Salzlösung (engl.: Tris buffered saline)
TBST	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween 20 (engl.: Tris buffered saline with Tween 20)
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzodioxin
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	Tetramethylethylendiamin
THP-1	humane monozytäre Zelllinie
TMF	6,2',4'-Trimethoxyflavon
Tris (-HCl)	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (-Hydrochlorid)
TSS	Transkriptionsstartpunkt (engl.: transcription start site)
UDP	Uridindiphosphat
UGT	Uridin-5'-diphospho-glucuronosyltransferasen
US EPA	amerikanischen Umweltschutzbehörde (engl.: United States Environmental Protection Agency)
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (engl.: United States of America)
UV	Ultraviolett
WHO	World Health Organization
WS	Holzrauch (engl.: wood smoke)
WSP	Holzrauchpartikeln (engl.: wood smoke particle)
XAP2	Hepatitis-B Virus X-assoziiertes Protein 2
XRE	Xenobiotika-Respons-Element

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	PM _{2.5} -Konzentrationen in rund 3.000 städtischen Gebieten weltweit im Zeitraum von 2008 bis 2015.	19
Abbildung 2:	Weltweite behinderungsbereinigte Lebensjahre (engl.: disability-adjusted life years, DALYs), die auf Luftverschmutzung zurückzuführen sind, im Jahr 2012... ..	21
Abbildung 3:	Veranschaulichung der PAK-Nomenklatur nach IUPAC-Richtlinien am Bsp. von Benzo[<i>a</i>]pyren.	26
Abbildung 4:	Metabolismus von Benzo[<i>a</i>]pyren (BaP) mittels CYP-Enzymen und der Epoxidhydrolase (EH) sowie anschließende DNA-Adduktbildung.....	38
Abbildung 5:	Metabolismus von Benzo[<i>a</i>]pyren (BaP) mittels CYP-Peroxidasen.	38
Abbildung 6:	Metabolismus von Benzo[<i>a</i>]pyren (BaP) mittels Aldo-Keto-Reduktasen (AKR). ..	39
Abbildung 7:	Regulation des AhR Signalwegs.	43
Abbildung 8:	Regulation des Nrf-2 Signalwegs.....	46
Abbildung 9:	Regulation des HIF-1 Signalwegs.....	50
Abbildung 10:	Einfluss von PM _{2.5} auf die zelluläre ROS-Bildung und der Einfluss auf die Zellviabilität von THP-1 Makrophagen.	55
Abbildung 11:	Einfluss von PM _{2.5} auf die <i>CYP1A1</i> Genexpression.....	57
Abbildung 12:	Einfluss von PM _{2.5} auf die metabolische Aktivität von gehungerten THP-1 Makrophagen.	58
Abbildung 13:	Einfluss von PM _{2.5} auf die MAPK p38, ERK1/2 und JNK nach PM _{2.5} Exposition in THP-1 Makrophagen.	59
Abbildung 14:	Einfluss von PM _{2.5} auf die Phosphorylierung von Akt.	60
Abbildung 15:	Einfluss von PM _{2.5} auf die nukleäre Translokation und transkriptionelle Aktivität des Transkriptionsfaktors Nrf-2 in gehungerten THP-1 Makrophagen.	61
Abbildung 16:	Einfluss von PM _{2.5} auf den zellulären GSH-Gehalt und die <i>GSR</i> Genexpression... ..	63
Abbildung 17:	Einfluss von PM _{2.5} auf die Proteinexpression der HO-1 in gehungerten THP-1 Makrophagen.	65
Abbildung 18:	Ultrastrukturelle Analyse von PM _{2.5} exponierten THP-1 Makrophagen nach 24 h.	67
Abbildung 19:	Ultrastrukturelle Analyse von PM _{2.5} exponierten THP-1 Makrophagen nach siebentägiger Exposition.	68
Abbildung 20:	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von PM _{2.5} exponierten THP-1 Makrophagen nach 24 h.	68
Abbildung 21:	Validierung der Microarray-Daten mittels qRT-PCR.	73

Abbildung 22: Genexpression der Gene <i>CYP1A1</i> (A–C), <i>EREG</i> (D–F), <i>GREM1</i> (G–I), <i>IL1B</i> (J–L), <i>IL6</i> (M–O) nach einer 9-, 16- oder 23-tägigen Exposition mit PM _{2.5} allein oder in Kombination mit den AhR-Inhibitoren ANF, TMF und CH.	76
Abbildung 23: Genexpression von <i>HMOX1</i> (A–C) nach einer 9-, 16- oder 23-tägigen Exposition mit PM _{2.5} allein oder in Kombination mit dem HIF-1 α -Inhibitor KC in BEAS-2B Zellen.	78
Abbildung 24: Nukleäre Translokation von HIF-1 α (A) und Expression der HO-1 (B) nach einer acht- und 15-tägigen PM _{2.5} Exposition.....	79
Abbildung 25: Venn-Diagramm, das die Anzahl der gemeinsamen und gruppenspezifischen Gene zwischen der PM _{2.5} und PM _{2.5} + dsRNA Gruppe darstellt.	80
Abbildung 26: Methylom von langzeitexponierten BEAS-2B Zellen.	87
Abbildung 27: Gen-Ontologie (GO) der Gene mit hypomethylierten (A) bzw. hypermethy- lierten (B) CpGs von langzeitexponierten BEAS-2B Zellen.	88
Abbildung 28: GO der differentiell methylierten und exprimierten Gene von langzeit- exponierten BEAS-2B.	93
Abbildung 29: Reaktion, die während des BCA-Assays stattfindet.	138
Abbildung 30: Reaktion des MTT-Assays.....	149
Abbildung 31: Prinzip des LDH-Assays.	151
Abbildung 32: Biolumineszenzreaktion katalysiert durch die Firefly Luciferase.	154
Abbildung 33: Reaktion des MitoTrackers [®] mit aktiven Mitochondrien.	156
Abbildung 34: Prinzip der TaqMan [®] -Sonden in der qRT-PCR.....	160

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Struktur und Eigenschaften der 16 US EPA PAKs, geordnet nach steigender Ringzahl.	27
Tabelle 2:	PAKs und deren Konzentrationen ($\mu\text{g}/\text{kg}$) des untersuchten $\text{PM}_{2.5}$ aus der Biomasseverbrennung.	70
Tabelle 3:	Top 15 der hoch- und herunterregulierten Gene langzeitexponierter BEAS-2B.	72
Tabelle 4:	Transkriptionsfaktoren, die Bindungsstellen in den durch $\text{PM}_{2.5}$ induzierten hochregulierten Genen in BEAS-2B aufwiesen.	74
Tabelle 5:	Übersicht der analysierten Microarray-Daten nach der unterschiedlichen Behandlung von BEAS-2B-Zellen.	80
Tabelle 6:	GO der 380 für $\text{PM}_{2.5}$ + dsRNA spezifischen Gene, in langzeitexponierten BEAS-2B.	81
Tabelle 7:	Krankheitsontologie hochregulierter Gene nach Exposition mit $\text{PM}_{2.5}$ und $\text{PM}_{2.5}$ + dsRNA mit dem Schwerpunkt auf lungenspezifische und lungenassoziierte Erkrankungen.	82
Tabelle 8:	Lungen- und lungenassoziierte Erkrankungen sowie die damit assoziierten hochregulierten Gene in $\text{PM}_{2.5}$ exponierten BEAS-2B-Zellen.	83
Tabelle 9:	GO der Gene mit hypomethylierten CpGs von langzeitexponierten BEAS-2B.	89
Tabelle 10:	GO der Gene mit hypermethylierten CpGs von langzeitexponierten BEAS-2B.	91
Tabelle 11:	GO der herunterregulierten und differenziell methylierten Gene von langzeitexponierten BEAS-2B. Dargestellt sind die Gene, die den 14 signifikantesten biologischen Prozessen zugeordnet wurden.	94
Tabelle 12:	GO der hochregulierten und differenziell methylierten Gene von langzeitexponierten BEAS-2B.	94
Tabelle 13:	Differenziell methylierte und exprimierte Gene sowie zugeordnete lungen-spezifische und -lungenassoziierte Erkrankungen.	96
Tabelle 14:	Lungenunabhängige Erkrankungen sowie die dazu assoziierten differenziell methylierten und exprimierten Gene von langzeitexponierten BEAS-2B.	97
Tabelle 15:	Verwendete Chemikalien und Reagenzien.	120
Tabelle 16:	Verwendete Reagenzien in der Zellkultur.	122
Tabelle 17:	Verwendete Zelllinien.	122
Tabelle 18:	Verwendete Inhibitoren.	122
Tabelle 19:	Verwendete Reagenzien-Kits, Primer und Sonden.	123
Tabelle 20:	Verwendete Verbrauchsmaterialien.	123

Tabelle 21: Verwendete Geräte	124
Tabelle 22: Verwendete Software und Datenbanken.	126
Tabelle 23: Zusammensetzung des Phosphat-Puffers.	127
Tabelle 24: Die für THP-1 verwendeten Wellformate mit den entsprechenden verwendeten Zellzahlen, Kultur- und Expositionsvolumina.....	133
Tabelle 25: Die für BEAS-2B verwendeten Wellformate mit den entsprechenden verwendeten Zellzahlen, Kultur- und Expositionsvolumina.....	133
Tabelle 26: Zusammensetzung von Polyacrylamid-Gelen für SDS-PAGE.....	140
Tabelle 27: Für Western Blots verwendete primäre Antikörper.....	143
Tabelle 28: Für Western Blots verwendete sekundäre Antikörper.	144
Tabelle 29: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe zum Anfärben von Mitochondrien.	156
Tabelle 30: Nukleotidsequenzen für die untersuchten Gene mit dem LightCycler® 480.	161
Tabelle 31: Master Mix Zusammensetzung für qRT-PCR.....	162
Tabelle 32: Temperaturprogramm der qRT-PCR für den LightCycler® 480.....	163
Tabelle 33: Alle signifikant hoch- und herunterregulierten Gene von BEAS-2B, die für fünf Wochen mit PM _{2.5} exponiert wurden, in alphabetischer Reihenfolge.	192
Tabelle 34: Transkriptionsfaktoren, die Bindungsstellen in den durch PM _{2.5} induzierten herunterregulierten Genen in BEAS-2B aufwiesen.....	197
Tabelle 35: Alle signifikant hoch- und herunterregulierten Gene von BEAS-2B, die für fünf Wochen mit PM _{2.5} + dsRNA exponiert wurden, in alphabetischer Reihenfolge.	200
Tabelle 36: Differenziell exprimierte Gene nach fünfwöchiger PM _{2.5} -Exposition von BEAS-2B mit differentiellen Methylierungsstellen gemäß funktioneller genomischer Verteilung.	214
Tabelle 37: Differenziell exprimierte Gene nach fünfwöchiger PM _{2.5} -Exposition von BEAS-2B mit differentiellen Methylierungsstellen gemäß CpG-Gehalts und Nachbarschaftskontexts.	218

Diese Seite steht der online Version nicht zur Verfügung, da sie persönliche Daten enthält.

12 Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Irmgard Merfort am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg. An erster Stelle gilt mein Dank Frau Prof. Dr. Irmgard Merfort, die die Erstellung dieser Arbeit erst ermöglichte. Ein besonderer Dank gilt auch ihrer stetigen Diskussionsbereitschaft in wissenschaftlichen und methodischen Fragen und ihren wertvollen Anregungen und Ratschlägen sowie der Möglichkeit, an mehreren wissenschaftlichen Kongressen und Fortbildungen teilnehmen zu dürfen.

Des Weiteren gilt mein Dank Frau Prof. Dr. Regine Süß für Ihre Bereitschaft, die Betreuung und Begutachtung meiner Doktorarbeit als Korreferentin zu übernehmen, sowie Herrn Prof. Dr. Stefan Günther für die Übernahme der Funktion des Drittprüfers.

Insbesondere bedanke ich mich bei folgenden Personen:

- Dr. Matjaz Humar für die sehr gute Einarbeitung in die laborrelevanten Vorgänge sowie für die vielen sehr wertvollen Ratschläge und Diskussionen der Ergebnisse,
- Prof. Dr. Stefan Günther, Dr. Stephan Flemming und Dr. Gwang-Jin Kim für die Durchführung der bioinformatischen Analysen,
- Herrn Dipl.-Ing. Wolfgang Schmidt-Heck für die Durchführung der bioinformatischen Analysen,
- Frau Prof. Dr. Christine Achten und Frau Sigrid Richter-Brockmann für die Durchführung der PAK-Analyse,
- Dr. Maximilian Seidl und Frau Freudenberg für die Präparation der Zellen und anschließende Durchführung der TEM-Aufnahmen,
- Prof. Dr. Chris Meisinger für die Bereitstellung der MitoTracker® Fluoreszenzfarbstoffe,
- Dr. Regina Merk für die Bestimmung der ROS in THP-1 Makrophagen und die Bereitstellung des Ergebnisses,
- Désirée Popadić für die Reproduktion von Westernblot-Analysen, qRT-PCR Analysen sowie für die bioinformatische Analyse der Transkriptomdaten,
- dem Biocombust-Team für die wertvollen Diskussionen und Anregungen,
- Interreg für die finanzielle Unterstützung des Biocombust-Projektes.

Ich bedanke mich recht herzlich bei allen bestehenden und ehemaligen Kollegen der AG Merfort und der AG Bechthold für das freundliche und kollegiale Arbeitsklima und die stets erholsamen

Mittagspausen. Im Besonderen danke ich Dr. Regina Merk, Désirée Popadić und Lara Rubarth für den Austausch von laborrelevanten und -irrelevanten Themen sowie allen Bachelor-, Master-, Diplomstudenten und Praktikanten für ihr Interesse und Mitwirken an dieser Arbeit. Barbara Schuler danke ich für die Zusammenarbeit im Labor und Bettina Siedle für die angenehme Zeit und die gute Zusammenarbeit bei der Betreuung des PBO/I Praktikums. Ebenso möchte ich mich bei Désirée Popadić, Tina Wardecki und Mirjam Bernhardt für die Korrektur meiner Arbeit bedanken.

Im besonderen Maße möchte ich mich bei meinen Eltern, meiner Familie und meinem Freund Alexander Schwarz für die nie endende Unterstützung, Motivation, Geduld und Zuversicht bedanken, die es ermöglicht haben, diese Arbeit anzufertigen.