

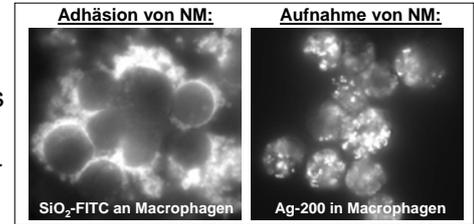
AP5: Wirkmechanismen der Toxizität von Nanomaterialien



Rainer Ossig¹, Martin Wiemann², Marlis Nern³, Elke Dopp⁴, Marc Driessen⁵, Andreas Luch⁵, Andrea Haase⁵, Peter Nollau⁶, Daniela Hahn¹, Jürgen Schnekenburger¹

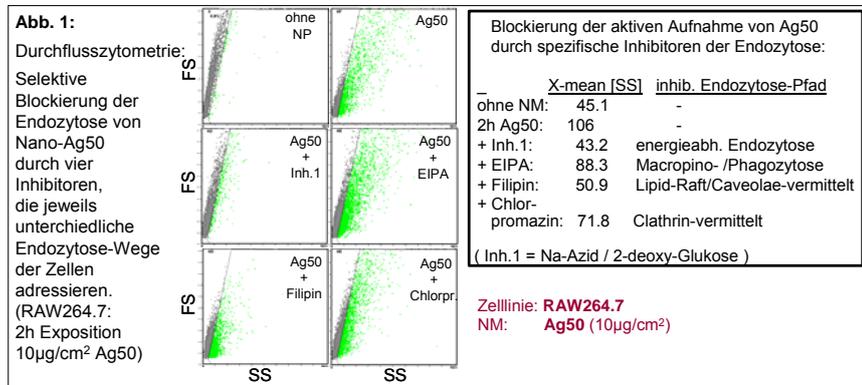
¹ Biomedizinisches Technologiezentrum, Westfälische Wilhelms-Universität, Albert-Schweitzer-Campus 1, 48149 Münster
² IBE R&D gGmbH, Mendelstr. 11, 48149 Münster
³ Bayer Pharma AG, Bayer HealthCare, Aprather Weg 18a, 42096 Wuppertal
⁴ Bayer MaterialScience AG Kaiser-Wilhelm-Allee 60, 51373 Leverkusen
⁵ Bundesinstitut für Risikobewertung, Sicherheit verbrauchernaher Produkte, Max-Dohrn-Strasse 8-10, 10589 Berlin
⁶ Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, 20246 Hamburg

Ziel des AP 5 ist die Aufklärung der Mechanismen, die der Nanopartikel (NP) induzierten Toxizität zu Grunde liegen. Dies umfasst sowohl die Analyse zellulärer Oberflächenrezeptoren und Aufnahmemechanismen als auch die Untersuchung von Schlüssel molekülen zellulärer Signalwege auf ihre Beteiligung an toxischen Effekten von Nanomaterialien mit Proteomikmethoden und genotoxische Untersuchungen.



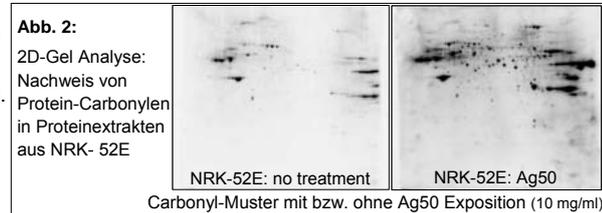
AP 5.1: Molekulare Wirkmechanismen der Nanopartikel induzierten Toxizität

- Untersuchungen der zellulären Aufnahmewege und Kompartimentierung der Nanomaterialien
- Spezifische Inaktivierung von einzelnen Bestandteilen der potentiellen Aufnahmewege mittels Inhibitoren der Endozytose und der Zytoskelettfunktion
- Kompensation der Freisetzung von ROS durch N-Acetyl-Cystein und Blockade der Ca²⁺-Freisetzung durch BAPTA
- Blockierung von Schlüsselproteinen integraler Signalwege, wie PKA, PI-3K, Src, ERK1/2 durch selektive Inhibition



AP 5.2: Identifizierung Nanopartikel induzierter Zellschädigung durch Proteinoxidation

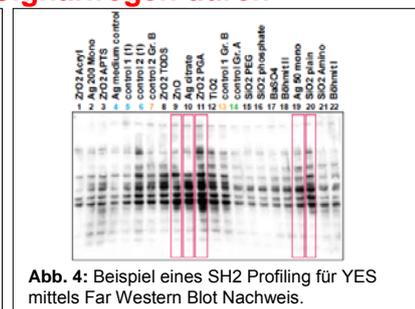
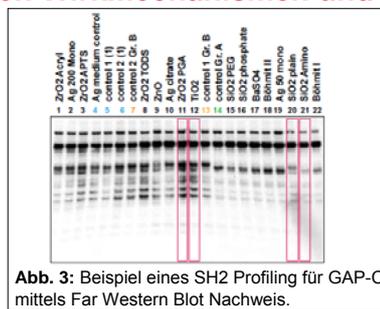
- Qualitativer Nachweis von oxidativen Proteinmodifikationen (Proteincarbonylen= Marker für oxidativen Stress) mit 1D- und 2D-Gelsystemen. Detektion nach Bindung an Dinitrophenyl-hydrazine im Immunoblot mit spezifischen Antikörpern.
- Quantitativer Nachweis von Proteincarbonylen durch ELISA-Techniken
- Identifizierung von modifizierten Proteinen mittels Affinitätschromatographie und massenspektrometrischen Analyseverfahren



AP 5.3: Identifizierung von toxikologischen Wirkmechanismen und Signalwegen durch selektive Proteomanalyse

- Untersuchung von NP induzierten Tyrosinphosphorylierungen über Src Homology Domän 2 (SH2) Profiling. Jede SH2 bindet ein spezifisches Tyrosinphosphoryliertes Peptid und kann so zur Analyse des Signalzustands der Zelle eingesetzt werden.

NRK-52E Zellen wurden mit 75 mg/ml der Nanopartikel für 24h inkubiert, ZnO und TiO₂ wurden mit 37,5 mg/ml eingesetzt. Analyse der Lysate nach Auftrennung im 1D-SDS-PAGE für alle SH2-Domänen.



AP 5.4: Vergleichende Untersuchungen zur in vitro Genotoxizität

- Genmutationstest: bakterieller Ames Test, OECD Prüfrichtlinie 471

Prüfmuster	Zytotoxisch	Ergebnis
Böhmil I (fein)	keine	nicht mutagen
Ag 200.mono	ab 110 µg pro Platte	nicht mutagen
Ag 50.mono	ab 160 µg pro Platte	nicht mutagen
SiO2 naked	keine	nicht mutagen
SiO2 Phosphat	keine	nicht mutagen
SiO2 PEG 500	keine	nicht mutagen

- Mikrokerntest: *in vitro* an V79-Zellen
 OECD Prüfrichtlinie 473

Prüfmuster	Zytotoxisch	Ergebnis
Böhmil I (fein)	schwach ab 50 µg/ml	nicht mutagen
Ag 200.mono	ab 55 µg/ml	mutagen ab 27.5 µg/ml
Ag 50.mono	ab 11 µg/ml	mutagen ab 11 µg/ml
SiO2 naked	ab 500 µg/ml	nicht mutagen
SiO2 Phosphat	schwach ab 100 µg/ml	nicht mutagen
SiO2 PEG 500	keine	nicht mutagen

- Untersuchungen zur NP induzierten Genotoxizität unter Verwendung von Kokulturmolelln aus primären Alveolarmakrophagen und Typ I bzw. Typ II Epithelzellen



Rechts: Beispiel mikroskopische Betrachtung bei Kulturrende. Dosierung: 55 µg/ml Ag200.mono .

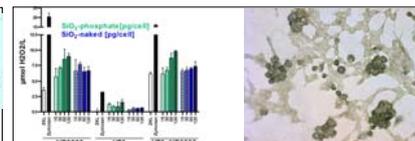


Abb. 6: Co-culture of OECD approved V79 lung fibroblasts and alveolar macrophages (NR8383)