

# Abschlussbericht für die Max-Buchner Forschungsstiftung

Kennziffer: 2806: Technische Nanopartikel:

Identifizierung möglicher Risiken für Mensch und Umwelt

Antragstellerin: Prof. Dr. Kristin Schirmer

Stipendiatin: Dipl.-Ing. Wibke Busch

Januar 2011

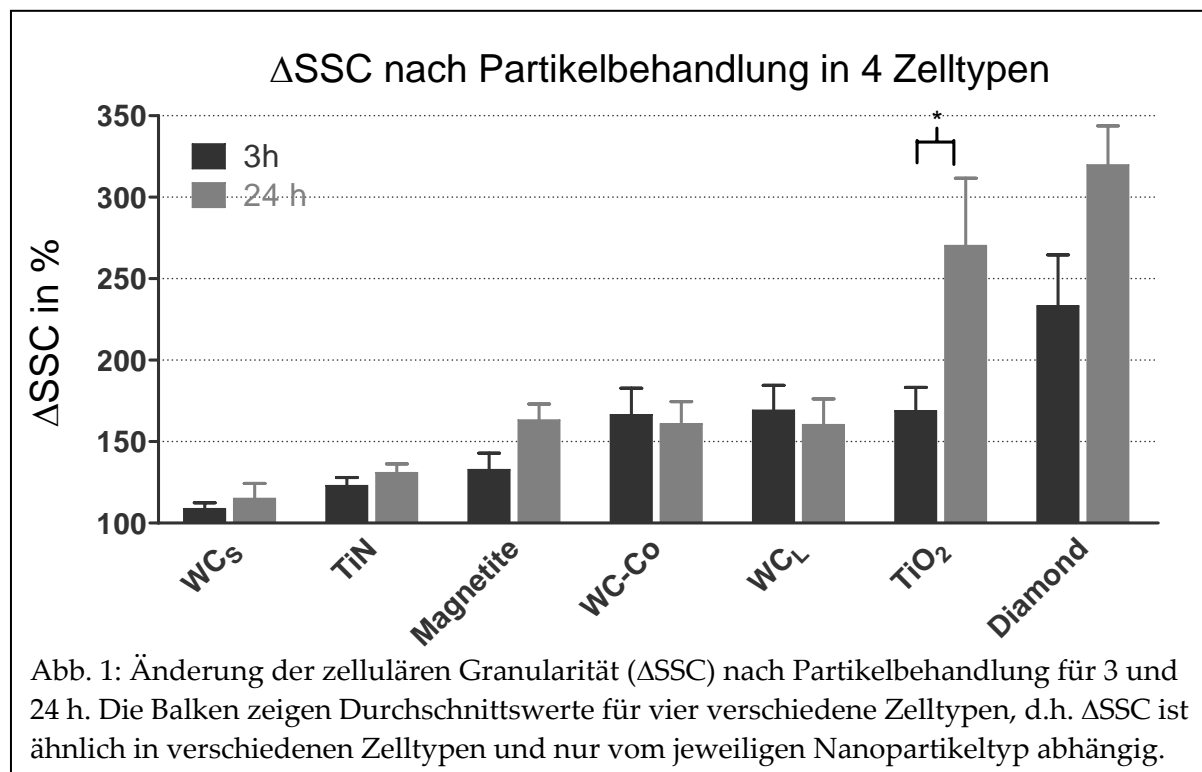
## *Forschungsvorhaben*

Die Arbeiten von Frau Wibke Busch beschäftigten sich mit der Bewertung und Charakterisierung technischer Nanopartikel im Hinblick auf deren mögliche Risiken gegenüber Mensch und Umwelt. Vorangegangene Arbeiten (Bastian et al. 2009, Kühnel et al. 2009), an denen Frau Busch wesentlich beteiligt war, lieferten die Grundlage für weiterführende Untersuchungen. In diesen Studien wurde die Wirkung zweier, in der Werkzeugherstellung bereits eingesetzter, Nanomaterialien auf verschiedene Zellen untersucht. Für die beiden Nanopartikel, Wolframcarbid (WC) und Wolframcarbid-Cobalt (WC-Co), konnte gezeigt werden, dass sich diese ähnlich verhalten wie gleiches Material im gröberen Zustand. Es wurde eine leicht toxische Wirkung der WC-Co Nanopartikel auf verschiedene Zellen gefunden, WC Nanopartikel hingegen zeigten diese Wirkung nicht. Es konnte auch gezeigt werden, dass der Einfluss von WC-Co auf die Zellvitalität nicht allein auf das darin vorhandene Cobalt zurückzuführen ist. Des Weiteren bewiesen diese Studien eindrucksvoll, dass die untersuchten Nanopartikel von allen untersuchten Zellen aufgenommen werden.

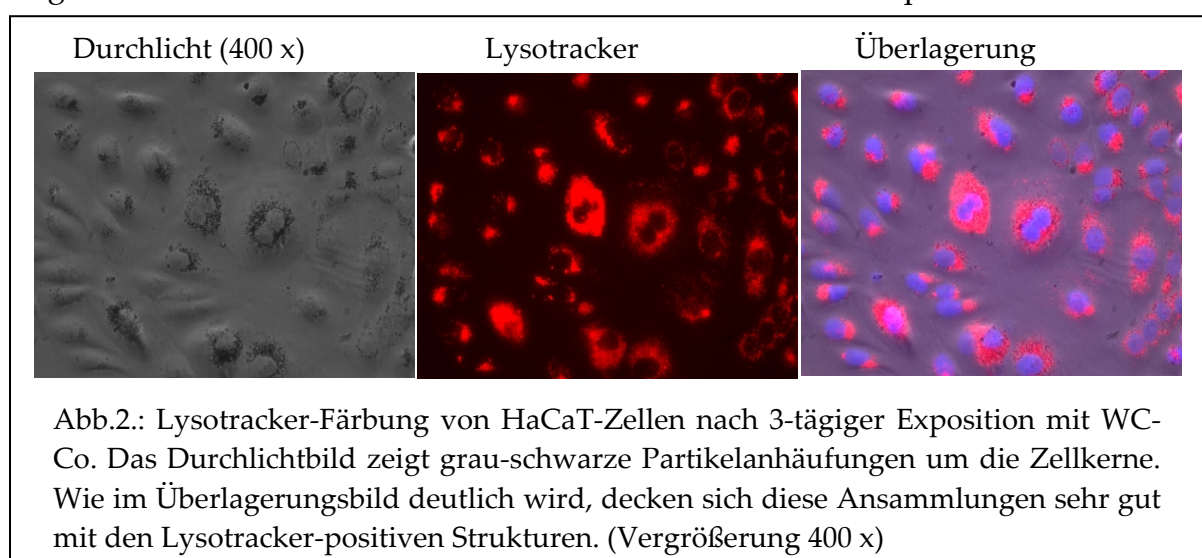
Basierend auf diesen Ergebnissen sollten im Rahmen der Promotion von Frau Busch weitere Untersuchungen zu Mechanismen der Partikelaufnahme und -wirkung durchgeführt werden. Ein Schwerpunkt war dabei die Anwendung, Anpassung und Etablierung von Methoden zum Nachweis der Partikelaufnahme in Zellen sowie zur Analyse der Genexpression in Zellen nach Partikelexposition.

## *Untersuchungen zur Partikelaufnahme in Zellen*

Um zu überprüfen, ob und in welcher Intensität die eingesetzten Partikel tatsächlich von den jeweils verwendeten Zielzellen aufgenommen werden, wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Die Durchflusszytometrie wird generell zur Zellsortierung und zur Detektion fluoreszenzmarkierter Signalproteine verwendet. Die Aufnahme der Partikel in die Zellen wurde mit Hilfe dieser Methode über eine Änderung des Seitwärtsscatters (SSC) verfolgt, einem Parameter, der durch die Granularität der Zellen bestimmt wird. Dabei weisen stark granuliert Zellen ein hohes SSC-Signal auf. Im Fall der Aufnahme der Partikel in die Zelle wurde erwartet, dass das SSC-Signal der Zellen ansteigt. Diese Annahme konnte bestätigt werden. Die Untersuchungen zur Partikelaufnahme wurden mit weiteren Nanopartikeln (WC<sub>L</sub>, WC<sub>S</sub>, WC<sub>L</sub>-Co, TiO<sub>2</sub>, TiN, Magnetit, Diamant) durchgeführt, um eine Partikelaufnahme in Abhängigkeit von Partikeleigenschaften zu untersuchen. Abb. 1 zeigt die durchschnittliche Änderung der zellulären Granularität in vier Zelllinien nach Exposition mit den verschiedenen Partikeln.



Nach 3-tägiger Inkubation von Zellen mit Nanopartikeln zeigten lichtmikroskopische Studien, dass sich die Nanopartikel in oder auf den Zellen in charakteristischen Mustern anordnen, welche eine Aufnahme in die Zellen und Ansammlung in den Lysosomen vermuten lassen. Diese Hypothese wurde mittels des Fluoreszenzfarbstoffs LysoTracker überprüft, welcher in den Lysosomen akkumuliert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit der Zelllinie HaCaT durchgeführt und zeigten übereinstimmend für alle untersuchten Partikel eine Co-Lokalisation der Partikelansammlungen mit den LysoTracker-positiven Strukturen (Abb. 2). Eine Akkumulation der Nanopartikel in den Lysosomen kann somit als wahrscheinlich angesehen werden, konnte allerdings durch elektronenmikroskopische Studien nicht explizit bestätigt werden. Ebenso sind hier die Langzeitauswirkungen unbekannt, beispielsweise ob die Partikel in den Organellen verbleiben oder wieder aus den Zellen heraus transportiert werden.



# Abschlussbericht für die Max-Buchner Forschungstiftung

Verschiedene Zellen wurden nach der Partikelexposition für die Elektronenmikroskopie fixiert und von Projektpartnern (MBZ, Dresden) weiter analysiert. In allen untersuchten Zellen konnten Partikel bzw. Partikelagglomerate im Zellplasma nachgewiesen werden, jedoch nie im Zellkern. Dabei konnten sowohl freie als auch Membran-umgebene Partikel beobachtet werden. Die Ergebnisse zur Partikelaufnahme in Zellen wurden im „Journal of Nanoparticle Research“ veröffentlicht (Busch et al. *in press*).

## *Untersuchungen zur Nanopartikel-induzierten Genexpression*

Um Gene zu identifizieren, die aufgrund von Nanopartikeln in den Zellen in ihrer Expression verändert werden, wurden Microarray-Genexpressionsstudien durchgeführt. Unter Beachtung der Ergebnisse vorangegangener Versuche zur Zytotoxizität wurde die humane Keratinozytenzelllinie HaCaT für diese Experimente ausgewählt. Die Zellen wurden mit WC und WC-Co Nanopartikeln in der jeweils höchsten Konzentration (30 bzw. 33 µg/ml bei 10% Cobalt-Anteil) behandelt. Um auch die Wirkung frei werdender Ionen zu berücksichtigen, wurden die Zellen ebenfalls mit einer entsprechenden Konzentration an CoCl<sub>2</sub> (50 µM entsprechen dem 3µg/ml Cobalt-Anteil in WC-Co) behandelt. Nach zwei verschiedenen Zeitpunkten (3h und 3d) erfolgte die Isolation der RNA. Nach Gewinnung der mRNA aus den exponierten Zellen erfolgte die Herstellung farbstoffmarkierter cRNA, welche dann auf humane Microarrays der Firma Agilent (Gesamt-Genom-Chips mit ca. 17.000 Genen pro Array) hybridisiert wurde. Dies erfolgte in biologischen 5-fach Replikaten. Über eine Fluoreszenzmessung, die mittels eines Arrayscanners erfolgte, wurden diese Microarrays quantifiziert. Es erfolgte anschließend eine umfangreiche computergestützte Datenanalyse zur Identifizierung signifikant veränderter Gene. Für diese Auswertung wurden alle Daten in 6 Behandlungsgruppen eingeteilt und mit der jeweiligen Kontrollgruppe verglichen (WC3h, WC-Co3h, CoCl<sub>2</sub>3h, WC3d, WC-Co3d, CoCl<sub>2</sub>3d). Es ergaben sich ca. 1500 Gene, deren Expressionslevel signifikant mehr als zweifach erhöht oder verringert waren im Vergleich zur Kontrolle.

Zwischen den WC-Co und CoCl<sub>2</sub>-Behandlungen wurden starke Ähnlichkeiten der veränderten Genmuster beobachtet. WC-exponierte Zellen zeigten nur geringe Veränderungen in der Genexpression im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Insgesamt scheinen fast alle Effekte, die auf Ebene der Genexpression zu beobachten waren, auf das Cobalt zurückführbar zu sein. Es konnten keine Partikel-spezifischen Genmuster detektiert werden.

# Abschlussbericht für die Max-Buchner Forschungsstiftung

Tab. 1: Anzahl der signifikant verändert exprimierten Gene nach Exposition mit Partikeln bzw. CoCl<sub>2</sub> (linker Tabellenteil: ↑ - Gen mehr als 2fach überexprimiert, ↓ - Gen mehr als 2fach unterexprimiert im Vergleich zur Kontrolle). Rechter Tabellenteil: Anzahl von gleich regulierten Genen in den einzelnen Behandlungen (rechts).

Behandlung	↑	↓	Gesamt	Behandlung	Anzahl überlappender Gene				
WC3h	26	2	28	WC3h	WC 3h				
WC-Co3h	13	24	37	WCCo3h	8	WC-Co 3h			
CoCl <sub>2</sub> 3h	242	131	373	CoCl <sub>2</sub> 3h	8	17	CoCl <sub>2</sub> 3h		
WC 3d	18	31	49	WC3d	3	2	11	WC 3d	
WC-Co 3d	141	107	248	WCCo3d	2	8	29	31	WC-Co 3d
CoCl <sub>2</sub> 3d	541	285	826	CoCl <sub>2</sub> 3d	8	15	134	19	184

Um die veränderte Genexpression bestimmten zellulären Funktionen oder Signalwegen zuordnen zu können, wurden umfangreiche Signalweg- und so genannte „Gene Set Enrichment“ - Analysen (GSEA) durchgeführt. Diese Analysen identifizierten zahlreiche Gensets und Signalwege als signifikant beeinflusst nach WC-Co und CoCl<sub>2</sub>-Exposition, z.B. Kohlenhydrat-Metabolismus, Zytoskelett, Hypoxie-Antwort und Zielgene des Transkriptionsfaktors HIF1 $\alpha$ . Eine Stabilisierung des HIF1 $\alpha$ -Proteins durch Cobalt-Ionen wurde bereits beschrieben. Die Zielgene von HIF1 $\alpha$  sind verschiedensten Gensets bzw. Signalwegen zuzuordnen, z.B. auch dem Kohlenhydrat-Metabolismus. Ein Vergleich der Expressionsmuster dieser HIF1 $\alpha$ -Zielgene ergab, dass diese sowohl nach WC-Co als auch nach CoCl<sub>2</sub>-Behandlung verändert exprimiert waren (Abb. 3).

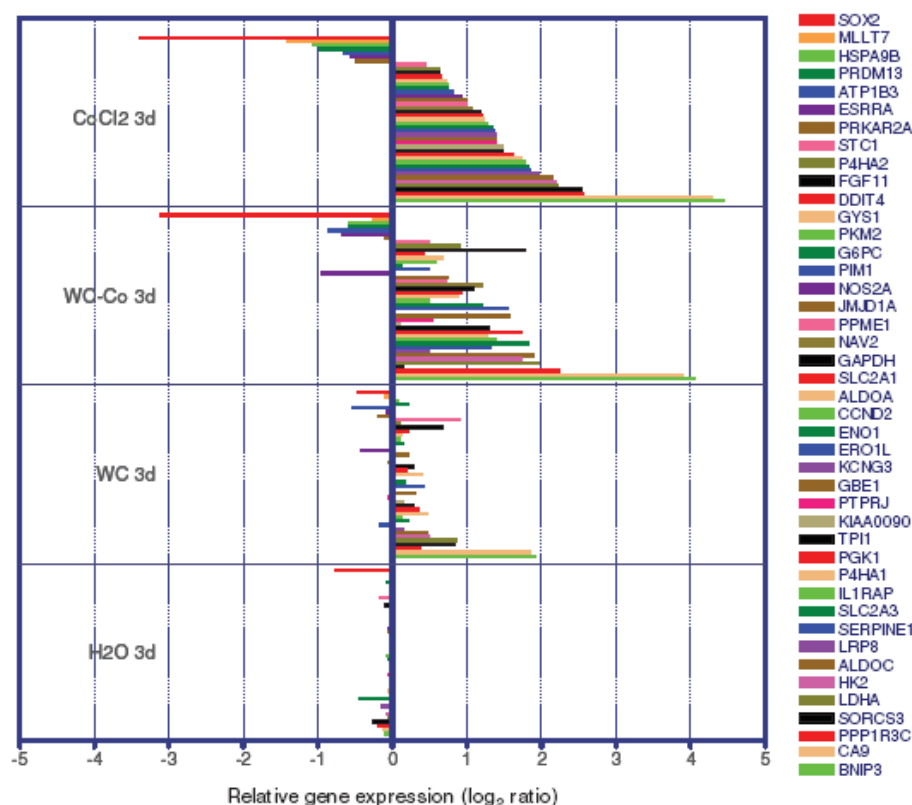


Abb. 3: Relative Genexpressionslevel bekannter HIF1 $\alpha$  – Zielgene in HaCaT Zellen, welche 3d mit WC und WC-Co Nanopartikeln sowie mit CoCl<sub>2</sub> in äquivalenten Konzentrationen behandelt wurden.

# Abschlussbericht für die Max-Buchner Forschungstiftung

Dies unterstreicht die starke Wirkung des Cobaltes in WC-Co-Nanopartikeln bei der Wirkung der Partikel auf die Zellen. Ein Vergleich der verändert exprimierten Gene von WC- und WC-Co behandelten Zellen ergab wenig übereinstimmende Gene, somit konnte kein Partikel-spezifisches Genexpressionsmuster identifiziert werden. Dieses Ergebnis überrascht insofern, als beide Partikel-Typen nachweislich in die Zellen aufgenommen werden. Die Ergebnisse dieser Microarray-Studie wurden in der Fachzeitschrift „BMC Genomics“ veröffentlicht (Busch et al. 2010).

Die Forschungsarbeit von Frau Busch leistet einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Wirkmechanismen von technischen Nanopartikeln in Zellen und wirft interessante weiterführende Fragen auf. Einer der wichtigsten Punkte dieser Arbeit ist die Erkenntnis, dass die Wirkung einzelner gelöster Substanzen bei der Wirkung von Nanopartikeln eine wesentliche Rolle spielt und unbedingt beachtet werden muss.

## Referenzen:

**Busch W.**, Bastian S., Trahorsch U., Iwe M., Kühnel D., Meißner T., Springer A., Gelinsky M., Richter V., Ikonomidou C., Potthoff A., Lehmann I., Schirmer K. (2010) Internalisation of engineered nanoparticles into mammalian cells in vitro: influence of cell type and particle uptake. *Journal of Nanoparticle Research* in press DOI: 10.1007/s11051-010-0030-3

**Busch W.**, Kühnel D., Schirmer K., Scholz S. (2010). Tungsten carbide cobalt nanoparticles exert hypoxia-like effects on the gene expression level in human keratinocytes. *BMC Genomics* 11: 65