

# **Aufbau humaner 3D *in vitro* Testsysteme zur Risikobewertung von Nanomaterialien**

Von der Fakultät für Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität Stuttgart  
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

**Martina Hampel**

aus Ellwangen

Hauptberichter: Prof. Dr. H. Brunner  
Mitberichter: Prof. Dr. P. Scheurich

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juli 2009



## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst und lediglich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe.

Stuttgart, März 2009

Martina Hampel





**Meiner Familie**



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>7</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>11</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>14</b>
<b>Summary .....</b>	<b>18</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>21</b>
1.1 Nanotechnologie.....	21
1.1.1 Einsatzmöglichkeiten von Nanomaterialien .....	22
1.1.2 Herstellung synthetischer Nanopartikel .....	24
1.1.3 Charakterisierung von Nanopartikeln .....	25
1.2 Nanotoxikologie .....	29
1.3 Dermale Exposition von Nanopartikeln.....	31
1.3.1 Aufbau und Funktion der Haut.....	31
1.3.2 Gefährdungspotential von Nanopartikeln für die Haut .....	33
1.4 Inhalative Exposition.....	35
1.4.1 Aufbau und Funktion der Luftröhre .....	35
1.4.2 Gefährdungspotential der Nanopartikel für den Respirationstrakt .....	37
1.5 Entwicklung dreidimensionaler Modelle durch das Tissue Engineering ...	38
1.5.1 Einsatz von Bioreaktoren zum Aufbau dreidimensionaler Gewebemodelle..	
.....	38
1.5.2 Einsatz dreidimensionaler <i>in vitro</i> Modelle als Testsysteme.....	39
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	41
<b>2 Material .....</b>	<b>43</b>
2.1 Zellmaterial.....	43
2.2 Getestete Nanomaterialien und Referenzstoffe.....	44
2.3 Chemikalien.....	44
2.4 Medien, Puffer und Lösungen für die Zellkultur .....	48
2.4.1 Zellkulturmedien .....	48
2.4.2 Puffer.....	49
2.4.3 Lösungen für die Zellbiologie.....	50
2.4.4 Lösungen für die Immunhistochemie und Histologie .....	51
2.4.5 Puffer und Lösungen für die molekularbiologischen Anwendungen .....	52

2.5	Antikörper .....	53
2.6	Verwendete Kit-Systeme .....	54
2.6.1	Nachweis von Funktionen und Entzündungsmarkern.....	54
2.6.2	RNA-Isolation, PCR und Genexpressionsanalyse.....	55
2.7	Verwendete Oligonukleotide für die MESSAGE-Technologie .....	55
2.8	Verbrauchsmaterial .....	56
2.9	Laborgeräte .....	57
<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>60</b>
3.1	Zellisolation .....	60
3.1.1	Isolation primärer humaner Keratinozyten.....	60
3.1.2	Isolation primärer humaner Fibroblasten .....	60
3.1.3	Isolation primärer humaner Trachea-Epithelzellen .....	60
3.2	Kultivierung der Zellen.....	61
3.2.1	Steriles Arbeiten an einer Laminar-Flow.....	61
3.2.2	Subkultivierung der Zellen .....	61
3.2.3	Zellzählung und Vitalitätstest.....	62
3.3	Herstellung des Kollagen-Trägermaterials .....	63
3.3.1	Gewinnung von Kollagen Typ 1 aus dem Rattenschwanz.....	63
3.3.2	Herstellung der azellularisierten Kollagenmatrix (BioVaSc) aus dem Schweine-dünndarm.....	63
3.4	Aufbau der dreidimensionalen Modelle .....	65
3.4.1	Aufbau des 3D-Hautmodells.....	65
3.4.2	Aufbau des 3D-Tracheamodells .....	66
3.5	Herstellung der Nanopartikel-Dispersion .....	68
3.5.1	Durchführung nanotoxikologischer Versuche an Monolayer-kulturen in Inserts.....	69
3.5.2	Durchführung nanotoxikologischer Versuche an Monolayer-kulturen in Well-Platten .....	69
3.5.3	Durchführung nanotoxikologischer Versuche an 3D-Gewebe-modellen ..	70
3.6	Charakterisierung der Zellen mittels Immunhistochemie .....	70
3.6.1	Herstellung von Paraffinschnitten.....	70
3.6.2	Herstellen von Cytospots.....	71
3.6.3	Kultivierung und Fixierung von Zellen in Chamber slides.....	71
3.6.4	Antikörperfärbung.....	72

---

3.6.5	Messung von Entzündungsmarkern mittels eines Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) und FlowCytomix.....	73
3.6.6	Durchführung des Laktat-Dehydrogenase (LDH)-Assays.....	74
3.7	Charakterisierung der Zellen mittels histologischer Färbungen.....	75
3.7.1	Hämalaun-Eosin-Färbung .....	75
3.7.2	Movat-Pentachromfärbung .....	75
3.7.3	Alcianblau-Färbung .....	76
3.8	Fixierung von Gewebeschnitten für das Rasterelektronen-mikroskop.....	77
3.9	Untersuchung des Hautmodells mittels Raman-Spektroskopie.....	78
3.10	Untersuchung möglicher toxischer Einflüsse mittels Genexpressionsanalyse .....	78
3.10.1	Isolation der Gesamt-RNA aus Keratinozyten .....	79
3.10.2	Konzentrations- und Qualitätsbestimmung der Gesamt-RNA .....	80
3.10.3	Synthese der cDNA .....	80
3.10.4	Synthese der dsDNA.....	81
3.10.5	Aufreinigung der DNA-Fragmente .....	82
3.10.6	Restriktionsverdau und Fällung der dsDNA.....	82
3.10.7	Adapter-PCR I (Suppressions-PCR) .....	82
3.10.8	Adapter-PCR II (Spezifische PCR).....	84
3.10.9	Zweidimensionale Auftrennung der cDNA.....	85
3.10.10	Detektion, Auswertung und Identifikation der cDNA- Fragmente .....	86
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>88</b>
4.1	Aufbau eines 3D-Tracheamodells .....	88
4.1.1	Verwendung primärer humaner Trachea-Epithelzellen .....	88
4.1.2	Untersuchung relevanter Zelllinien zum Aufbau eines 3D-Tracheamodells . .....	94
4.1.3	Statische Kultivierung der hTEZ und der Zelllinien auf der BioVaSc .....	97
4.1.4	Dynamische Kultivierung der Zellen .....	103
4.2	Untersuchungen zur Einschätzung des Gefährdung-potentials von Nanomaterialien .....	110
4.2.1	Dispergierung und Charakterisierung von Nanomaterialien .....	110
4.2.2	Einsatz des 3D Tracheamodells als Testsystem .....	112
4.3	Aufbau und Einsatz der 3D Hautmodelle.....	115
4.3.1	Monolayer Versuche an verschiedenen Hautzelltypen.....	115

---

4.4	Messung freigesetzter Entzündungsmarker an Keratinozyten-und HaCaT-Monolayerkulturen .....	118
4.4.1	Messung freigesetzter Entzündungsmarker in der Keratinozyten-Monolayerkultur .....	118
4.4.2	Messung freigesetzter Entzündungsmarker an der HaCaT-Monolayerkultur .....	121
4.5	Aufbau der 3D-Hautmodelle mit primären Keratinozyten und der Zelllinie HaCaT .....	123
4.5.1	Das 3D-Hautmodell als Testsystem .....	124
4.6	Relevanz neuer Methoden zur Untersuchung der Nano-toxizität .....	133
4.6.1	Genexpressionsanalysen mit der MESSAGE-Technologie .....	133
4.6.2	Genexpressionsanalysen an Monolayerkulturen mit primären Keratinozyten.....	134
4.6.3	Einsatz der Raman-Spektroskopie .....	142
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>147</b>
5.1	Aufbau eines 3D-Tracheamodells .....	147
5.2	Entwicklung eines Bioreaktors zur dynamischen Kultivierung der Zellen	151
5.3	Untersuchungen zur Einschätzung des Gefährdungspotentials von Nanomaterialien.....	154
5.3.1	Dispergierung und Charakterisierung von Nanomaterialien .....	154
5.3.2	Untersuchung der Nanotoxizität am 3D-Tracheamodell.....	156
5.3.3	Untersuchungen der Nanotoxizität am 3D-Hautmodell.....	157
5.4	Relevanz neuer Methoden zur Untersuchung der Nano-toxizität .....	163
5.4.1	Globale Genexpressionsanalysen .....	163
5.4.2	Raman-Spektroskopie .....	168
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>171</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>181</b>
	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>184</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>186</b>
	<b>Publikationen .....</b>	<b>187</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>190</b>

## Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
°C	Grad Celsius
µg	Mikro Gramm
µl	Mikro Liter
A	Adenin
AFM	Atomkraftmikroskop (atomic force microscop)
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
BA	Blauasbest
BET	Brunauer-Emmett-Teller-Methode (Methode zur Berechnung der spezifischen Oberfläche)
bidest.	bidestilliert
BioVaSc	Biological Vascularized Scaffold
BPE	Bovines Hypophysenextrakt
BSA	Bovines Serumalbumin, Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
Calu-3	Lungenkarzinom-Zelllinie
CB	Carbon Black
cDNA	Komplementäre DNA, die bei der reversen Transkriptase von RNA entsteht
CNT	Carbon Nanotubes
d.h.	das heisst
Da	Dalton
DAPI	4', 6-Diamino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecos Modified Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
dsDNA	Doppelsträngige DNA (double stranded DNA)
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extrazelluläre Matrix (extra cellular matrix)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ESCA	Photoelektronenspektroskopie (electron spectroscopy for chemical analysis)

---

FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (fluorescence activated cell sorting)
FCS	Fötale Kälberserum (fetal calf serum)
FHTE	Fötale Humane Trachea-Epithelzellen
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
g	Gramm
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung (gravity)
GA-1000	Gentamycin
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HaCaT	Humane Keratinozyten Zelllinie
HBE	Humane Bronchiale Epithelzellen
HCl	Salzsäure
HE	Hämalaun-Eosin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HGF	Hepatozyten Wachstumsfaktor (hepatocyte growth factor)
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
HRP	Meerrettichperoxidase (horse radish peroxidase)
hTEZ	Humane Trachea-Epithelzellen
Hz	Hertz
i.e.	lat. id est, mit anderen Worten
IL	Interleukin
kb	Kilobase (=1000 Basenpaare)
KBM	Keratinzyten Basal Medium
KCl	Kalziumchlorid
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
M	Mol
MEM	Minimum Essential Medium
MEMr II	Differenzierungsmedium für humane Trachea-Epithelzellen
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
Mio	Million
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mol	Molar
MWCNT	Multiwalled Carbon Nanotube
Na	Natrium
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information



---

OT	Objektträger
P	Passage
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
Pot.	Potential
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Drehzahl pro Minute (rounds per minute)
RS	Raman Spektroskopie
s	Sekunde (second)
sh.	siehe
sog.	sogenannte
SSC	Seitwärtsstreulicht (side scatter)
ssDNA	Einzelsträngige DNA (single stranded DNA)
SWCNT	Single walled Carbon Nanotubes, einwandige Kohlenstoffnanoröhrchen
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TiO <sub>2</sub>	Titandioxid
TR	Trachea Reaktor
U	Einheit (unit)
u.U.	unter Umständen
V	Volt
v/v	Volumenprozent (volume/volume)
w/v	Gewichtsprozent (weight/volume)
XPS	Röntgeninduzierte Photoelektronenspektroskopie (X-ray photoelectron spectroscopy)
z.B.	zum Beispiel

## Zusammenfassung

Die Nanotechnologie stellt eine der Schlüsseltechnologien dieses Jahrhunderts dar. Ihr wird insbesondere in der Synergie zu den Biowissenschaften ein hohes Potential für die Entwicklung neuer Produkte in den Materialwissenschaften, aber auch für das Gesundheitswesen zugeschrieben. Parallel zu der Erschließung neuer Möglichkeiten, die die Nanotechnologie bietet, müssen jedoch Fragen zu Sicherheitsaspekten seitens der Wissenschaft frühzeitig gestellt und auf wissenschaftlicher Basis intensiv erforscht werden, um eventuell auftretende Risiken rechtzeitig erkennen und berücksichtigen zu können.

Die zurzeit noch am häufigsten eingesetzte Untersuchungsmethode zur Testung einer möglichen Toxizität synthetischer Nanopartikel ist die Verwendung zweidimensionaler *in vitro* Zellkulturen. Zum Einsatz kommen hier Zelllinien, primäre Zellen werden noch selten eingesetzt. Die Versuchsansätze entsprechen damit jedoch nicht den Bedingungen im menschlichen Körper. Eine der *in vivo* Situation nähere und damit exaktere *in vitro* Untersuchungsmöglichkeit des Risikopotentials stellt der Einsatz dreidimensionaler Zell-Testsysteme dar. Mit diesen Modellen lassen sich die Strukturen von Körperbarrieren *in vitro* nachbilden, nanoskalige Partikel toxikologisch untersuchen und so die Ergebnisse auf den menschlichen oder tierischen Organismus übertragen. Insbesondere im Bereich der Nanotoxikologie ist die Verifizierung einer möglichen Penetration und Absorption der Partikel durch die Körperbarrieren wichtig. Der Respirationstrakt und die Haut stellen dabei die beiden wesentlichen potentiellen Eintrittspforten für Nanopartikel dar.

In dieser Arbeit wurden daher humane Luftröhre (*Trachea*) und Haut als dreidimensionale *in vitro* Testsysteme aufgebaut und eine mögliche Toxizität der Nanomaterialien *Carbon Black*, *Multiwalled Carbon Nanotubes* und *Titandioxid* untersucht.

Der Aufbau des 3D-Hautmodells war am Fraunhofer IGB bereits etabliert und besteht im Wesentlichen aus zwei Schichten: den dermalen Anteil bilden Fibroblasten, die in ein Kollagengel eingegossen werden. Die Epidermis ist aus Keratinozyten aufgebaut, die auf dieses Gel aufgesetzt werden. Diese bilden durch eine entsprechende Kultivierung mit Medium und Luftkontakt die für die Barrierefunktion wichtige Hornschicht aus. Eingesetzt wurden für dieses Modell sowohl primäre humane Keratinozyten und Fibroblasten, als auch die Keratinozyten-Zelllinie HaCaT. Parallel

wurden zusätzlich vergleichende Studien an zweidimensionalen Keratinozyten- und HaCaT-Zellkulturen durchgeführt, da sie im Bereich der Nanotoxikologie bislang noch als Standardtestsyste eingesetzt werden, obwohl sie nicht die Barrierestruktur der Haut *in vivo* widerspiegeln. Die entsprechenden Nanopartikel wurden auf die Monolayerkulturen und Hautäquivalente aufgetragen und die Modelle anschließend mittels Histologie, ELISA, sowie FACS ausgewertet.

Versuche an zweidimensionalen Zellkulturen zeigten deutliche Unterschiede zwischen den eingesetzten Keratinozyten und der Zelllinie HaCaT. Bei der Zelllinie konnte nur Interleukin 8 als Entzündungsmarker gemessen werden, während primäre Zellen, neben Interleukin 8 auch Interleukin 6, den Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (G-CSF), sowie das Monozyten Entzündungsprotein 1alpha (MIP-1alpha) sezernierten. Damit wiesen die primären Zellen eine eindeutig höhere Reaktion bzw. verbesserte Zell-Zell-Kommunikation auf, als die Zelllinie HaCaT. Die entsprechenden Kontrollen zeigten, dass auch das für die Feinverteilung von Nanopartikeln eingesetzte Dispergierungsmittel DMEM/FCS selbst immer eine hohe Expression von Entzündungsmarkern verursachte, deshalb wurde für die Versuche an den 3D-Hautmodellen ein weiteres Dispergierungsmittel getestet und verstärkt Nanomaterial in Pulverform eingesetzt.

Versuche an dreidimensionalen Hautmodellen zeigten keine erkennbare Penetration der Partikel, die sich meist als Agglomerate auf der Hornschicht absetzten. Es konnten Interleukin 6 und 8 als spezifische Entzündungsmarker identifiziert werden, die sowohl im Hautmodell mit primären Keratinozyten als auch in den Hautmodellen mit der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT nachweisbar waren. Die Zelllinie sekretierte jedoch eine bis zu 10fach höhere Konzentration der Entzündungsmarker und zeigte damit eine überschießende Stressreaktion auf die Nanopartikel.

Neben der Haut stellt der Respirationstrakt eine sehr wichtige Barriere in Bezug auf die Nanotoxikologie dar. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war daher der Aufbau eines dreidimensionalen *in vitro* Tracheamodells, mit dem sich Inhalationsstudien von Nanomaterialien durchführen lassen. Die Isolation und Differenzierung humaner Trachea-Epithelzellen aus humanen Biopsaten konnte im Rahmen dieser Arbeit etabliert werden. Durch die Neuentwicklung und Optimierung eines Differenzierungsmediums ließen sich primäre Zellen in 2D-Zellkulturen gezielt zur Ausbildung funktioneller Zilien anregen, die für die mucoziläre Reinigungsfunktion der Trachea essentiell sind. Gleichzeitig wurde ein Bioreaktor entwickelt, mit dem

sich zum einen die Zellkultur mit Nährmedium versorgen, zum anderen aber auch die Respiration, i.e. der periodische Luftstrom, nachstellen lässt. Da humanes Material nicht immer in ausreichender Menge zur Verfügung steht und die Isolation sowie Proliferation der Zellen von der neoadjuvanten Behandlung der Spenderpatienten abhängt, wurde parallel auch die Etablierung des Modells mit der Lungenkarzinom-Zelllinie (Calu-3) durchgeführt. Diese zeigte unter dynamischer Kultivierung erstmals eine hochprismatische Morphologie, ein Zeichen für eine Polarisierung der Zellen und damit der Ausbildung einer intakten Barrierestruktur, die im Zusammenhang mit der Kultivierung dieser Zelllinie in der Literatur bislang nicht beschrieben wurde. Gleichzeitig waren tracheaspezifische Marker für schleimproduzierende Becherzellen, ziliotragende Epithel-Zellen, sowie Tight Junctions nachweisbar. Erste nanotoxikologische Versuche wurden mit Carbon Black-Pulver im Tracheareaktor bereits durchgeführt, zeigten aber in einem LDH-Assay keine nanotoxikologisch relevanten Tendenzen.

In der Literatur wird die Problematik bei der Auswertung nanotoxikologischer Untersuchungen im Zusammenhang mit der Verwendung klassischer Untersuchungsmethoden, wie dem MTT-, LDH- oder WST-1-Test beschrieben. Sie sind zum einen nur auf Monolayer-Kulturen ausgelegt und zum anderen im Bereich der Nanotoxikologie nicht anwendbar. Kohlenstoffbasierte Nanopartikel interagieren mit den Proteinen aus den Assays und erzeugen dadurch falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse wie bereits durch verschiedenste Arbeitsgruppen belegt werden konnte. Dies macht eine Auswertung der Tests oder Vergleiche verschiedener Studien unmöglich.

Ein Teilaspekt dieser Arbeit war daher die Etablierung neuer Methoden zur Testung der Nanotoxizität, so konnte die globale Genexpressionsanalyse an primären Keratinozyten mittels der am Fraunhofer IGB etablierten MESSAGE-Technologie untersucht werden. Bereits bei der Untersuchung eines Viertels des Transkriptoms waren Unterschiede der Expressionsmuster der behandelten Proben und der Referenz zu sehen. Spezifische Marker der Keratinozyten, die für die Ausbildung der schützenden Hornschicht zuständig sind, wie z.B. SPRR4 und KLK7, wurden grundsätzlich bei den mit Nanomaterialien behandelten Proben herabreguliert. Die Zellen, die mit Titandioxid in Kontakt gebracht wurden, zeigten zusätzlich im Vergleich zu den mit Carbon Black oder Carbon Nanotube behandelten Zellen eine Einschränkung der Zellproliferation, sowie Adhäsion. Bei den mit Carbon Nanotube

behandelten Zellen konnten Genexpressionsmuster identifiziert werden, die für eine Einschränkung des Zellzyklus und ein Defizit in der Quervernetzung von Kollagenstrukturen sprechen, sodass auch hier von einer Schädigung der Barrierestruktur ausgegangen werden kann.

Als weitere Untersuchungsmethode zur Untersuchung der Nanotoxizität wurde die nichtinvasive Raman-Spektroskopie eingesetzt. Mit ihr konnten nach der Behandlung der 3D-Hautmodelle mit den verschiedenen Nanomaterialien bereits unterschiedliche Reaktionen der Zellen nachgewiesen werden. Durch die Raman-Spektroskopie lassen sich Fingerprints, die eine grobe Gruppierung der toxikologischen Belastung der Zellen ermöglichen, erstellen. Die einzelnen Zellen können dann im Anschluss durch Genexpressionsanalysen detaillierter untersucht werden. Diese Methode sollte daher in der Nanotoxikologie für ein schnelles Vorscreening behandelter 3D-Gewebemodelle noch weiter etabliert werden.

Die globale Genexpressionsanalyse und die Raman-Spektroskopie konnten damit als neu etablierte Methoden manifestiert und sollten als innovative Werkzeuge für die Nanotoxikologie weiterentwickelt werden. Da die gesunde Haut eine gute Barrierfunktion aufweist, sollten weitere 3D-Gewebemodelle als organnahe Systeme für eine bessere Übertragbarkeit der Testergebnisse auf den menschlichen Organismus eingesetzt und im Bereich der Nanotoxikologie zur Untersuchung der Penetration von Körperbarrieren gezielt untersucht werden.

## Summary

The nanotechnology is one of the key technologies of the 21<sup>st</sup> century. It shows a great potential for the development of new products in the material science but also in the field of health care. Parallel to the chances, potential risks have to be further investigated.

The most current investigation method to analyse mostly toxicity of synthetic nanoparticles is the use of two-dimensional *in vitro* cell cultures. However cell lines are used for these studies, partially primary cells are also applied. Indeed, these tests do not correspond to the conditions in the human body. Hence, a more exact *in vitro* investigation of the risk potential is the application of three-dimensional test systems. With these models body barrier structures can be simulated *in vitro* and can be examined the nanoscaled particle toxicology. Particularly in the area of nanotoxicology the verification of a possible penetration and absorption of the particles through the body barriers is important. Skin and respiratory tract show both essential entry gates for nanoparticles.

Hence, in this work the human skin and the human airtube (*trachea*) were built up as three-dimensional *in vitro* test systems and the possible toxicity of the nanomaterials *carbon black*, *multiwalled carbon nanotubes* and titanium dioxide was examined.

The construction of the skin model was well established in the Fraunhofer IGB. The model exists basically of two layers: the dermal portion is formed by fibroblasts which are embedded into a collagen gel. The epidermis consists of keratinocytes which were seeded to this gel. By a suitable cultivation with medium and contact to the air the horny layer (*stratum corneum*), which is important for the barrier function, was developed. Primary human keratinocytes and fibroblasts as well as the keratinocyte-cell line HaCaT were used in this model. In addition comparative studies were carried out with two-dimensional cell cultures of HaCaT and primary keratinocytes, because these cells were still used for the standard test systems. Nanoparticles were applied on the monolayer cell cultures and skin models and afterwards examined by histology, ELISA and FACS analysis.

Tests with two-dimensional cell cultures showed clear differences between keratinocytes and the HaCaT. The cell line could only produce interleukin 8 as an inflammation marker, whereas the primary cells, besides interleukin 8, also showed the expression of interleukin 6, the granulocyte colony-stimulation factor (GCSF) as

well as the monocyte inflammation protein 1alpha (MIP-1alpha) which accounts for a better cell to cell communication. The dispersion medium DMEM/FCS always caused a high expression of stress markers. Therefore another dispersion medium and also the powder of the test substances have been used in tests with the 3-D skin model. Tests with the 3-D skin models showed no recognizable penetration of the particles which are mostly distributed as an agglomerate on the cornified layer. The inflammation markers interleukin 6 and 8 could be identified as specific markers in the skin models with primary keratinocytes as well as with the cell line HaCaT. The cell line produced up to 10-times higher concentrations of the inflammation markers and showed therefore a stronger reaction to nanoparticles.

The respiratory tract has also an important barrier function. Hence, another main focus was the construction of a three-dimensional *in vitro* trachea model. Therefore the isolation and differentiation of human trachea-epithelium cells was established first. In monolayer cultures primary cells could be stimulated to proliferation and by the development and optimization of a differentiation medium to form cilia which play an essential role for the mucociliary clearance in the trachea.

At the same time a new bioreactor was developed. In which both the cells could be supplied with cell culture medium and also the respiration could be simulated. Human material is not always available in sufficient amount. However it is at advantage to be able to manufacture the model fastly and in greater numbers as possible. Therefore the model was established parallely with the lung carcinoma cell line (Calu-3). These cells showed for the first time a highly prismatic morphology under dynamic cultivation. Specific markers of the trachea for goblet cells, ciliary epithelium cells as well as tight junctions were detectable. First nanotoxicological tests were carried out with carbon black in the trachea reactor, however, these tests showed no toxicological trends.

Present methods of investigation of toxicity, like the MTT-, LDH- or WST-1 test, are designed only for monolayer-cultures and are not applicable in the area of nanotoxicology. Carbon-based nanoparticles can interact with the proteins of these assays and generate wrongly positive or negative results. As already documented by various scientists.

Hence, one aspect of this work was the establishment of new methods for testing nanotoxicity, so the genetic expression analysis could be examined in primary keratinocytes by the MESSAGE technology established in the Fraunhofer IGB.

Already with the investigation of one quarter of the transcriptomes differences in expression patterns of the treated samples and the reference could be detected. Different specific markers of the keratinocytes, which are important for the development of the horny layer and therefore for the barrier function of the skin, for example SPRR4 and KLK7, were down regulated in the samples treated with nanomaterials. The cells which were in contact with titanium dioxide showed compared to treated cells with carbon black or multiwalled carbon nanotubes, a restriction of cell proliferation and adhesion. For the cells treated with Carbon Nanotubes a gene expression profile could identified, which showed restrictions in the cell cycle and a deficit to crosslink collagen structures.

With the Raman spectroscopy which was used for the investigation of nanotoxicity, different reactions of the cells have already appeared after treatment with different nanomaterials. This method should be used for a quick screening in the nanotoxicology. Special fingerprints developed with the Raman spectroscopy could afford the classification of treated cells. This method should be better established in the nanotoxicology in the future.

The genetic expression analysis and the Raman spectroscopy have been confirmed as new established methods and should be further developed as innovative tools for the nanotoxicology. Because the healthy skin shows a good barrier function, also other 3-D tissue models, which are similar to the organs of the human body, should be used in nanotoxicology for the determined analysis of body barrier structures.



# 1 Einleitung

## 1.1 Nanotechnologie

Die Nanotechnologie ist eine der Schlüsseltechnologien des 21. Jahrhunderts mit grossem wirtschaftlichem Potential. Als Querschnittstechnologie verbindet sie das Wissen aus verschiedenen Bereichen miteinander und wird in absehbarer Zeit alle Branchen durchdringen.

Als Vater der Nanotechnologie gilt Richard Feynman, der 1959 in einem Vortrag erstmals auf das Vorhandensein kleinster Partikel hinwies: „There's plenty of room at the bottom“. Der Begriff der „Nanotechnologie“ dagegen wurde von Norio Taniguchi 1974 zum ersten Mal gebraucht, allerdings bezeichnete seine Definition lediglich die Veränderung von Materialien auf molekularer Ebene. Erst mit der Entwicklung von Elektronenstrahl- und Atomkraftmikroskopen in den 80er Jahren konnten atomare Einheiten aufgelöst und dargestellt werden. Der Grundstein zur Erforschung und gezielten Nutzung nanoskaliger Strukturen sowie deren Anwendung in der Wissenschaft und Technik waren gelegt. Die Nanotechnologie, wie wir sie heute kennen, wird allerdings etwas breiter definiert. So wird auch die Herstellung von Nanomaterial auf chemischem oder mechanischem Weg mit eingeschlossen, auch wenn keine atomgenaue Bearbeitung vorliegt. Als Nanomaterialien werden daher auch konventionelle Materialien in Kombination mit Nanostrukturen bezeichnet.

Die „Technologie der kleinsten Teilchen“ befasst sich mit Strukturen, die im Wesentlichen zwischen 1 und 100 nm klein sind. Durch ihre Größe erhalten die Partikel im Vergleich zu Partikeln desselben Stoffes im Mikro- oder Makroformat neuartige Eigenschaften und machen sie somit interessant für die Entwicklung neuer Produkte und Prozesse [Zhao 2007]. Eine wesentliche Rolle spielt hierbei die vergrößerte Oberfläche gegenüber den Volumeneigenschaften. Je kleiner die Partikel werden, desto größer wird ihre Oberfläche im Vergleich zum Volumen, wodurch quantenphysikalische Effekte zunehmend berücksichtigt werden müssen. Nanopartikel können somit veränderte mechanische, optische, elektrische, magnetische oder katalytische Eigenschaften im Vergleich zu größeren Partikeln desselben Stoffes aufweisen [Zhao 2007, Oberdörster 2005, Donaldson 2004].

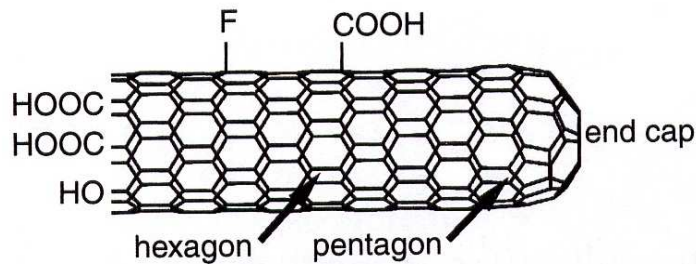
Schon jetzt werden in rund 400 Produkten, die auf dem Weltmarkt erhältlich sind, Nanotechnologien eingesetzt [Project on Emerging Nanotechnologies 2006]. Gleichzeitig ist aber auch durch die erhöhte Produktion und den vermehrten Einsatz

in den verschiedensten Produkten ein erhöhtes Risiko für Mensch und Umwelt denkbar [Calvin 2003, Dagani 2003]. Insgesamt liegt das Weltmarktvolumen von Produkten, bei denen die Nanotechnologie einen wesentlichen Beitrag zur Wettbewerbsfähigkeit liefert, derzeit bei ca. 100 Mrd. €, mit steigender Tendenz [Luther 2006a].

Zur Einschätzung der Gefährdungspotentiale synthetisch hergestellter Nanopartikel müssen daher die Expositionsmöglichkeiten sowie die toxikologischen Aspekte untersucht werden. Da sich die physikalischen und chemischen Eigenschaften je nach Größe der Nanopartikel und Stoffklasse auch unterscheiden, müssen alle Partikel nach ihren Eigenschaften einzeln im Rahmen einer Risikoanalyse bewertet werden. Deshalb machen vergleichbare Toxizitätsstudien auch eine genaue Standardisierung, Kategorisierung und Charakterisierung von Nanomaterialien zwingend erforderlich. Ohne sie lassen sich die unterschiedlichen Ergebnisse aus den einzelnen Studien nicht miteinander vergleichen und machen sie somit für eine gezielte Risikoabschätzung nutzlos.

### **1.1.1 Einsatzmöglichkeiten von Nanomaterialien**

Wichtige Anwendungsfelder der Nanotechnologie sind unter anderem die Computertechnik und die Elektronik mit einer gezielten Miniaturisierung von Geräten und Speichermedien durch den Einsatz elektrisch leitfähiger Carbon Nanotubes (CNT). Als neuer Werkstoff werden die CNT bereits Kunststoffen beigemischt und verleihen diesen u.a. mehr Stabilität (z.B. Tennisschlägern) oder machen sie elektrisch leitfähig. Die Kohlenstoffröhrchen zeichnen sich durch eine hohe Strombelastbarkeit (ca. 1000 Mal höher als bei Kupferdrähten), eine sehr gute Wärmeleitfähigkeit und eine sehr hohe Zugfestigkeit aus (31fach höher als Stahl) [Yacobson 1997].



**Abbildung 1** Schematische Abbildung eines einwandigen Carbon Nanotube, mit funktionellen Gruppen [Alexander 2007]

In den Materialwissenschaften können durch entsprechende Oberflächenbehandlungen mit Nanopartikeln für Textilien, Holz und Metall neuartige Eigenschaften, wie z.B. Selbstreinigung oder Kratzfestigkeit erreicht werden. Textilien lassen sich so leichter reinigen, Baumaterial wie Fensterglas oder Dachziegel und Autolacke weisen einen selbstreinigenden Lotoseffekt auf. Silber-Nanopartikel werden u.a. für antimikrobielle Beschichtungen in Kühlschränken, Staubsaugern oder auch Wundverbänden eingesetzt. In der Medizin sollen Nanopartikel als zielgerichtete Wirkstoffträger oder in Zusammenhang mit neuen Diagnose- und Therapieverfahren, z.B. in der Krebsforschung, Anwendung finden. Man verspricht sich durch das nanoskalige Format eine bessere Aufnahme in die Zellen [Bianco 2005, Pantarotto 2004]. Die Nanotechnologie lässt aber auch Innovationen in den Bereichen Abwasser- und Umwelttechnik durch den Ersatz problematischer Stoffe und die umweltgerechte Umgestaltung industrieller Prozesse mit Hilfe von Nanomaterialien erwarten [Turner 2007, Yang 2006b].

Nanomaterialien verleihen aber auch Materialien und Stoffen neuartige Eigenschaften. Durch seinen hohen Brechungsindex weist das Titandioxid ein großes Färbe- und Deckvermögen auf und stellt damit das bedeutendste Weißpigment dar. Als Lebensmittelzusatzstoff E 171 findet es auch Anwendung in Zahnpasta und Hustenbonbons. Sphärische Titandioxid-Nanopartikel werden aufgrund ihrer photokatalytischen Eigenschaft zur Herstellung selbstreinigender Oberflächen eingesetzt. Da Titandioxidpartikel kleiner 50 nm farblos sind und dennoch das UV-Licht sehr gut reflektieren, werden sie häufig in Kosmetika und Sonnencremes als „unsichtbarer“ UV-Schutz eingesetzt.

Das Carbon Black (Industrieruß) ist ein Werkstoff, der durch eine unvollständige Verbrennung oder Verschwelung von Kohlenwasserstoffen in großen Mengen hergestellt wird. Es entsteht ein schwarzer pulverförmiger und unlöslicher Feststoff.

Eingesetzt wird Carbon Black zum einen als Leitruß in der Elektronikindustrie, zum anderen als Pigment für Druckerfarbe, Tusche, Lacke oder Kunststoffe und bei der Produktion von Autoreifen.

### 1.1.2 Herstellung synthetischer Nanopartikel

Synthetische Nanopartikel werden im Gegensatz zu ultrafeinen Partikeln industriell hergestellt und haben eine definierte Größenverteilung und chemische Zusammensetzung. Ultrafeine Partikel sind zwar ebenfalls kleiner als 100 nm, entstehen aber auf natürliche Weise und werden somit unbeabsichtigt freigesetzt, z.B. durch Vulkanausbrüche, Waldbrände, Zigaretten, Kerzenbrand, Reifenabrieb, etc.. Synthetische Nanopartikel können dagegen gezielt nach zwei verschiedenen Ansätzen hergestellt werden. Bei der sogenannten „top-down“ Technik werden aus größeren Materialbausteinen durch Ätzen, Mahlen oder einer anderen mechanischen Bearbeitung Nanopartikel, wie z.B. Titandioxid ( $\text{TiO}_2$ ) und Carbon Black (CB) gewonnen. Eine andere Technik stellt die „bottom-up“ Methode dar. Hier werden Atom für Atom oder Molekül für Molekül entweder durch eine „self assembly“, wie z.B. bei den CNT oder eine „positional assembly“ Synthese aufgebaut [Vohrer 2007, The Royal Society 2004]. Beim „self-assembly“ ordnen sich die einzelnen Atome oder Moleküle eigenständig durch ihre natürlichen Eigenschaften zu Grundeinheiten. Angewendet wird dieses Verfahren z.B. bei der Herstellung der Multi-walled CNT (MWCNT). Dagegen werden beim „positional assembly“ die exakten Positionen durch äußeres Einwirken vorgegeben, ein weitaus aufwändigerer Vorgang, der noch nicht industriell eingesetzt wird [Haas 2007]. Bei den Kohlenstoffnanoröhren setzen sich die einzelnen Kohlenstoffatome in einer wabenartigen Struktur zu Sechsecken zusammen und bilden Röhren aus. Die MWCNT verfügen dabei im Gegensatz zu einwandigen Kohlenstoffnanoröhren (Single walled Carbon Nanotubes, SWCNT) über mehrere Wände, die zwiebelschalenartig übereinander liegen. Der Abstand zwischen den einzelnen Wänden beträgt dabei ca. 0,34 nm [Alexander 2007].

Die Herstellung der CNT kann auf drei unterschiedliche Arten erfolgen: Bogenentladung, Laserablation und chemische Gasphasenabscheidung (chemical vapor deposition, CVD) [Popov 2004]. Die gängigste Methode der Herstellung ist dabei die CVD, bei der neben Hitze (ca. 600-1000°C) und einer Kohlenstoffquelle (Methan, Acetylen, Benzen oder Kohlenstoffmonoxid) auch verschiedene Katalysatoren zum Einsatz kommen [Alexander 2007]. Ein Substrat wird in einem

Vakuum auf etwa 600-1000°C erhitzt und dann mit dem kohlenstoffhaltigen Gas überschichtet. Durch die chemische Reaktion werden aus der Gasphase die Feststoffkomponenten abgeschieden.

Bei der Bogenentladung werden zwei Grafit Elektroden auf wenige Millimeter zusammen gebracht und eine Bogenentladung gezündet. Der Kohlenstoff verdampft dabei zu einem heißen Plasma und es entstehen Kohlenstoffröhrchen.

Eine weitere Herstellungsmethode ist die Laserablation. Dabei werden Laserpulse in einem Argongas auf Grafit Elektroden geschossen und so ein Kohlenstoffgas erzeugt, wobei wiederum Carbon Nanotubes entstehen.

Bei der Herstellung der Carbon Nanotubes werden auch Katalysatoren eingesetzt, die die Länge, den Durchmesser und die Wachstumszeit beeinflussen können. Für die Toxikologie spielen die metallischen Rückstände der eingesetzten Katalysatoren, wie Kobalt, Nickel, Eisen und Molybdän eine wichtige Rolle.

### **1.1.3 Charakterisierung von Nanopartikeln**

Aufgrund der Größenverhältnisse spielen die Gesetze der Quantenphysik eine wichtige Rolle und verleihen den Materialien im Nanoformat besondere Eigenschaften. Da gleichzeitig davon ausgegangen werden muss, dass diese neuartigen physikalischen und chemischen Eigenschaften auch eine entscheidende Rolle auf die biologischen Effekte haben [Oberdörster 2005], ist eine genaue Charakterisierung der synthetischen Nanopartikel unerlässlich. In Versuchen mit SWCNT konnten eingedrungene Nanoröhrchen in Zellen detektiert werden [Porter 2007]. Im Idealfall sollte daher jeder Toxizitätsversuch durch eine genaue Partikelcharakterisierung begleitet werden, um die verschiedenen Studien miteinander vergleichen zu können. Mit einer Abnahme der Partikelgröße ist immer eine Zunahme der biologischen Aktivität verbunden, d.h. Partikel im Nanoformat sind eher in der Lage in biologische Gewebe einzudringen und mit den Zellen zu interagieren [Donaldson 2004, Shvedova 2003]. Wie die Aufnahme der Nanopartikel in die Zellen erfolgt, ist dabei noch unklar, möglicherweise spielt die Ladung der Partikel eine wichtige Rolle [Rothen-Rutishauser 2006]. Die Aufnahme durch Endozytose oder Phagozytose Mechanismen scheinen dabei nicht, wie bisher angenommen, die typischen Aufnahmewege zu sein, vielmehr werden Diffusionsmechanismen als mögliche Aufnahmewege in die Zelle gesehen [Kopatz 2004]. Da jedoch für viele Materialien im Nanoformat keine Oberflächen-

Charakterisierung vorliegt, ist diese im Zusammenhang mit der Nanotoxikologie dringend erforderlich.

Zur gezielten Charakterisierung der Nanomaterialien werden verschiedene Methoden eingesetzt (Tabelle 1). Aber auch hier, wie im Bereich der Toxizitätstests, herrscht noch ein Defizit an geeigneten Methoden. Entscheidend dabei ist auch, dass die Partikel sowohl direkt nach der Produktion, nach der Verarbeitung, aber auch nach der Verwendung in Toxizitätstests charakterisiert werden müssen, um zu untersuchen, wie und ob sich die Partikel durch unterschiedliche Behandlungen verändern. Oftmals eignet sich jedoch nicht jede Methode gleichermaßen. So lassen sich z.B. Partikel in einer Dispersion nicht mehr mit den Methoden charakterisieren, mit denen sie zuvor in trockenem Zustand untersucht wurden. Auch die Charakterisierung von Partikeln in Aerosolen erfordert andere Methoden.

**Tabelle 1** Mögliche Analysetechniken zur Charakterisierung von Nanomaterialien, nach Zuin et al., 2007

	Analysetechniken							
	REM	AFM	DIC, FLM	Zeta- Pot.	XPS	RS	BET	HPLC
Größenverteilung	•• ■ ▲	•• ■ ■	■					• ■ ■
Oberfläche							••	
Form	•• ■ ▲	•• ■ ■ ▲	■					
Chem. Zusammensetzung						•		•
Reinheit					•	•		
Oberflächen- funktionalisierung					••	•		• ■
Oberflächenladung				•• ■				
Aggregationszustand	•• ■ ▲	•• ■	■					
Kristallstruktur	• ▲					•		
Porosität							••	

**Anmerkung:** Die Abkürzungen sind im Abkürzungsverzeichnis aufgelistet

**Legende:**

- einsetzbar für die Charakterisierung von Partikeln nach der Produktion oder vor der Anwendung
- teilweise einsetzbar, liefert Informationen zu Partikeln direkt nach der Produktion oder vor der Anwendung
- einsetzbar für Dispersionen mit Nanopartikeln in biologischen Flüssigkeiten
- einsetzbar für die Charakterisierung von Nanopartikeln nach dem Auftragen auf biologisches Gewebe
- ▲ einsetzbar für die Charakterisierung von Nanopartikeln in Aerosolen

In Tabelle 1 ist nur ein Ausschnitt der möglichen Analyseverfahren aufgelistet, welche für die Charakterisierung von Nanopartikeln durchgeführt werden können. Größe und Form lassen sich mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) untersuchen, allerdings müssen die zu untersuchenden Partikel elektrisch leitfähig

sein. Sind sie das nicht, können sie mit einer dünnen Gold- oder Platinschicht überzogen werden, was aber zu einer Veränderung der Partikel führt. Für eine Untersuchung im Fluoreszenzmikroskop müssen die zu untersuchenden Nanomaterialien zuvor durch das Anhängen eines Fluoreszenzmarkers manipuliert werden und entsprechen damit nicht mehr dem ursprünglichen Material. Eine spezielle Vorbereitung der Nanopartikel ist dagegen für das Phasenkontrastmikroskop nicht erforderlich, Gewebeschnitte können hier direkt untersucht werden. Durch die geringe Größe der Nanopartikel ist eine genaue Auswertung der Daten jedoch nicht möglich, denn vermeintlich ins Gewebe eingedrungene Partikel können von histologischen Artefakten nicht immer eindeutig unterschieden werden.

Für die Messung des elektrischen Potentials (Zetapotential) ist die Herstellung einer stabilen Nanopartikel-Dispersion notwendig, da die Partikel in der Dispersion möglichst nicht agglomerieren sollten und auch das Dispergierungsmittel einen Einfluss auf die Messung haben kann. Einfacher und verlässlicher ist dagegen die Röntgenstrahlen-Photonenspektroskopie (XPS), mit der die chemische Oberflächenzusammensetzung qualitativ ermittelt werden kann. Daneben bietet auch die Raman-Spektroskopie (RS) die Möglichkeit, qualitativ die Zusammensetzung organischer Strukturen über die Schwingung der Bindungen zu ermitteln. Die Brunauer-Emmett-Teller (BET) Methode liefert bei festen Nanomaterialien eine Aussage über die Größe der Oberfläche [Zuin 2007].

Problematisch ist die Charakterisierung von Nanopartikeln in Flüssigkeiten, da es hier keine standardisierten Methoden gibt. Die Partikel werden unterschiedlich dispergiert und es werden sowohl verschiedene Dispergierungsarten, wie Ultraschall oder Rühren, als auch unterschiedliche Dispergierungsmittel eingesetzt, die ebenfalls einen Einfluss auf das Verhalten der Partikel in der Dispersion oder auf spätere Toxizitätstests haben können [Rothen-Rutishauser et al., 2006; Brunner et al., 2006]. Charakteristika von Nanomaterialien können sich durch die Herstellung einer Dispersion verändern. Fakt ist, dass Nanopartikel in Dispersion mit der Zeit zur Aggregation neigen, allerdings ist dies immer von den jeweiligen Partikeln und weiteren Faktoren, wie Konzentration, Oberflächenfunktionalisierung, Temperatur, pH-Wert etc. abhängig [Zuin 2007]. Für eine grundlegende Charakterisierung muss



daher auch die Stabilität der Dispersion berücksichtigt werden, was sich für einige Nanopartikel, wie z.B. auch die CNT, schwierig gestaltet [Paredes 2004].

## 1.2 Nanotoxikologie

Mit dem Einsatz der Nanotechnologie entwickelte sich parallel der Bereich der Nanotoxikologie, da zunehmend die Frage aufgeworfen wurde, inwieweit nanoskalige Materialien über Eigenschaften verfügen, die gesundheits- oder umweltschädlich sein könnten. Donaldson et al. prägten deshalb 2004 den Begriff der Nanotoxikologie mit der Idee, dass sich Partikel mit nanoskaligem Format anders verhalten als größere Partikel des gleichen Stoffes [Donaldson 2004]. Aufgrund der besonderen physikalischen Eigenschaften müssen bei der Betrachtung einer möglichen Toxizität von Partikeln aus unterschiedlichen Materialien diese getrennt voneinander betrachtet werden [Oberdörster 2005, Donaldson 2004]. Das verwendete Material und seine Verarbeitung spielen dabei eine wichtige Rolle und müssen bei der Untersuchung der Toxizität immer berücksichtigt werden. Die Nanotoxikologie unterscheidet sich dabei von den Einflussfaktoren wesentlich von der bisher untersuchten „klassischen Toxikologie“. Einfache Dosis-Wirkungsbeziehungen können nicht aufgestellt werden, vielmehr müssen chemische und physikalische Merkmale in die Toxizitätsbetrachtung mit einfließen (vgl. Tabelle 2) [Zhao 2007]. Eine enge interdisziplinäre Zusammenarbeit ist daher zwingend notwendig, da neben verschiedenen Methoden zur Charakterisierung der Nanopartikel auch neue Methoden etabliert und eingesetzt werden müssen.

**Tabelle 2** Vergleich der Einflussfaktoren auf die klassische Toxikologie und Nanotoxikologie nach Yuliang Zhao und Hari Singh Nalwa.

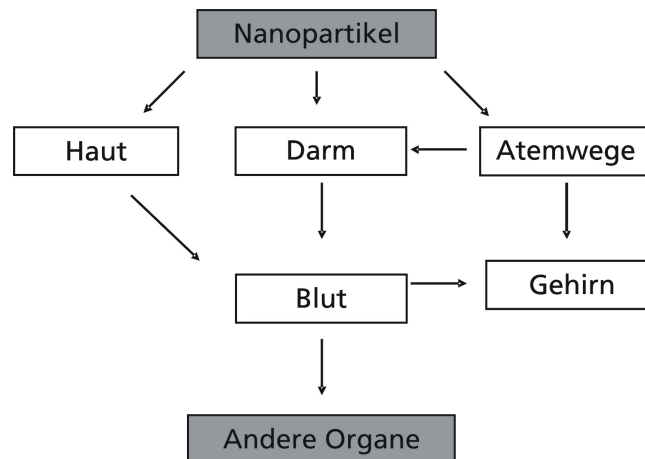
<b>Klassische Toxikologie</b>	<b>Nanotoxikologie</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Masse</li> <li>▪ Konzentration</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Größe, Masse</li> <li>▪ Konzentration</li> <li>▪ Form</li> <li>▪ Struktur</li> <li>▪ Oberfläche</li> <li>▪ Oberflächenfunktionalisierung</li> <li>▪ Ladung der Oberfläche</li> <li>▪ Chemische Zusammensetzung</li> <li>▪ Aggregationszustand</li> <li>▪ Kristallstruktur</li> <li>▪ etc.</li> </ul>

Zur Ermittlung möglicher Risiken ist es wichtig herauszufinden, ob während der Herstellung oder durch eine mögliche spätere Freisetzung aus den Produkten synthetische Nanopartikel in den menschlichen Organismus gelangen können und dort mit Zellen wechselwirken oder einfach im Körper verteilt, transferiert, akkumuliert oder ausgeschieden werden (Abbildung 2).

Drei Wege sind demnach denkbar, durch die der Mensch in Kontakt mit Nanopartikeln treten könnte [Monteiro-Riviere 2006]:

- Berufsbedingter Kontakt zu Nanopartikeln (Produktion, Entsorgung)
- Umweltbedingter Kontakt (durch in die Umwelt gelangte Partikel)
- Anwendungsbedingter Kontakt (durch Abnutzung oder Verwendung von Materialien, die Nanomaterialien beinhalten, z.B. Lebensmittel, Kosmetika, etc.)

Bereits durch ihre Größe und den damit verbundenen Quanten-Effekten zeigen Nanopartikel in Zusammenhang mit biologischen Systemen neue Eigenschaften, die so bisher mit vergleichbaren Stoffen im Mikro- oder Makroformat nicht aufgetreten sind. Oberdörster et al. und Elder et al. konnten in Versuchen mit Ratten zeigen, dass Nanopartikel über den olfaktorischen Nerv bis ins Gehirn gelangen können [Oberdörster 2004, Elder 2006]. Denkbar ist auch, dass nicht die Partikel direkt einen toxischen Effekt ausüben, sondern vielmehr Träger sind für Katalysator- oder sonstige chemischen Rückstände aus den Herstellungsprozessen, die dann im Organismus ihre giftigen Eigenschaften entfalten [Lam 2006, Muller 2006]. So werden bei der Synthese von MWCNT z.B., je nach Herstellungsprozess, verschiedene Katalysatoren, wie Eisen, Cobalt, Nickel oder Molybdän eingesetzt, die bereits für ihre toxischen Eigenschaften bekannt sind. Eine weitere Möglichkeit der Wechselwirkung sehen Forscher in der Adsorption von Proteinen an Nanopartikel, die eine Formänderung der Proteine und somit auch eine Immunantwort auslösen könnte [Lynch 2006]. Die Fähigkeit der Nanopartikel, Proteine zu adsorbieren, zeigte sich auch bei der Verwendung herkömmlicher Toxizitätsassays, die in Kombination mit Nanomaterialien eine Ergebnisinterpretation unmöglich machen [Monteiro-Riviere, Inman 2006]. Daher ist die Etablierung neuer Methoden im Bereich der Nanotoxikologie zwingend notwendig.



**Abbildung 2** Mögliche Expositionsrouten von Nanopartikeln in den menschlichen Körper

### 1.3 Dermale Exposition von Nanopartikeln

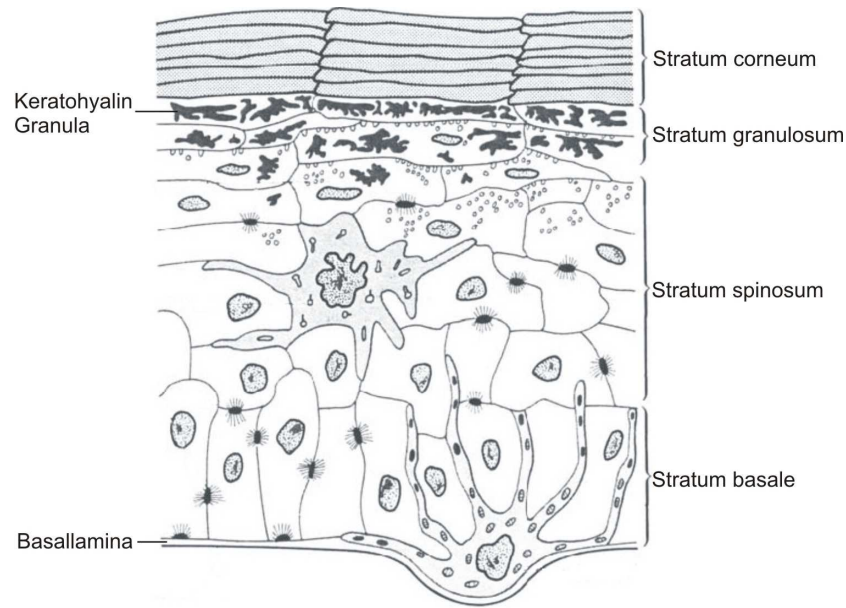
Durch den vermehrten Einsatz von Nanopartikeln in Kosmetika oder auch die luftgetragene Ablagerung von Nanopartikeln auf der Haut spielt die dermale Exposition von Nanopartikeln eine wichtige Rolle.

#### 1.3.1 Aufbau und Funktion der Haut

Mit einer Fläche von bis zu 2 m<sup>2</sup> und einem Gewicht von 4 - 10 kg stellt die Haut das größte Organ des menschlichen Körpers dar, gleichzeitig erfüllt sie wichtige Funktionen. Als Sinnesorgan dient sie der Wahrnehmung von Berührung, Schmerz, Hitze, Kälte und anderen Reizen der Außenwelt, daneben reguliert sie die Körpertemperatur und den Wasserhaushalt des Organismus. Eine besonders wichtige Rolle spielt aber der Schutz des Körpers vor schädlichen Umwelteinflüssen.

Die Haut lässt sich in 3 funktionelle Schichten unterteilen: die Oberhaut (*Epidermis*), die Lederhaut (*Korium* oder *Dermis*) und die darunterliegende Unterhaut (*Subcutis*).

Die Epidermis ist ca. 0,03-1 mm dick und stellt die äußerste Hautschicht dar [Alonso 2003]. Sie enthält keine Blutgefäße und besteht aus einem mehrschichtigen verhornten Plattenepithel, welches hauptsächlich aus Keratinozyten aufgebaut ist. Diese liegen dabei in unterschiedlichen Differenzierungsstadien vor, die sich physiologisch und immunhistologisch in der Anzahl und Funktion ihrer Organellen unterscheiden [Junqueira 2005].



**Abbildung 3** Schematischer Aufbau der Epidermis nach Benninghoff

Alle Keratinozyten gehen dabei aus einer Basalzellschicht (*Stratum basale*) hervor. In dieser einfachen Zellschicht werden ständig neue Zellen gebildet und stetig in Richtung Oberfläche geschoben (Abbildung 3). Auf dem Weg dorthin verlieren die Keratinozyten ihr Zytoplasma, den Zellkern und die Zellorganellen. Diese werden nach und nach durch den Hornstoff Keratin ersetzt. Auf der Hautoberfläche bilden die verhornten Keratinozyten das *Stratum corneum*, die Hornschicht, welche die eigentliche Trennschicht zwischen dem Körper und der Außenwelt darstellt. Die Hornschicht verleiht der Haut ihre wasserabweisende Eigenschaft und bildet gleichzeitig eine sich ständig erneuernde Barriere zum Schutz vor schädigenden Umwelteinflüssen. Neben diesen Schutzfunktionen zählt die Haut außerdem zum Immunsystem und verfügt über ein Haut-assoziiertes lymphatisches Gewebe (**skin-associated lymphoid tissue, SALT**) [Bos 1990]. Zu diesem System gehören die Keratinozyten, Langerhans-Zellen, assoziierte Lymphknoten der Haut und auch T-Lymphozyten-Subpopulationen der Epidermis. Die Keratinozyten spielen eine wichtige Rolle in Bezug auf die epidermale Immunität. Irritationen oder durch andere Zellen freigesetzte Zytokine induzieren eine Aktivierung der Keratinozyten, die ihrerseits ebenfalls Zytokine, Chemokine und verschiedene Interleukine oder Interferon sezernieren [Knopf, Wollina 1990].

Die Dermis weist in den unterschiedlichen Körperregionen unterschiedliche Schichtdicken auf. Während sie an den Hand- und Fußsohlen bis zu 2,4 mm dick sein kann, ist sie z.B. an den Augenlidern lediglich 0,3 mm dünn. Die Dermis verleiht der Haut einerseits Reißfestigkeit, andererseits gibt die Kombination aus kollagenen und elastischen Fasern der Haut eine gewisse Stabilität und macht sie damit gleichzeitig auch dehnbar.

Zwischen der Epidermis und Dermis befindet sich die Basalmembran. Sowohl die Fibroblasten der Dermis als auch die Keratinozyten der Epidermis synthetisieren Komponenten der Basalmembran [Woodley 1991, Clark 1984]. Hierbei handelt es sich vorwiegend um Kollagen Typ V, Typ VII, Laminin, Fibronectin und Proteoglykane.

### 1.3.2 Gefährdungspotential von Nanopartikeln für die Haut

Obwohl die Haut einer der wichtigsten Expositionsrouten für Nanopartikel darstellt, fehlen Daten zu einer möglichen kutanen Gefährdung nach der Exposition bei der Produktion, der Anwendung oder der Entsorgung der Nanomaterialien bislang noch völlig. Allein schon durch ihre Größe bietet die Haut eine enorme Expositionsfläche für Nanopartikel. Da Nanopartikel zunehmend in Kosmetika, Shampoos, Sonnenschutzmitteln, etc. eingesetzt werden, muss eine mögliche dermale Aufnahme diskutiert werden. Gleichzeitig könnten sich luftgetragene Nanopartikel (z.B. am Arbeitsplatz) auf der Haut ablagern. Durch den Kontakt und einer damit verbundenen möglichen Absorption von Nanopartikeln ist die Entstehung von Hautkrebs, Hautirritationen oder von systemischen Effekten möglich [Monteiro-Riviere 2006].

Die Haut bietet zum einen eine gute Expositionsfläche für Nanopartikel, zum anderen stellt sie jedoch auch eine sehr effektive Körperbarriere dar. Nanopartikel, die sich auf der Haut ablagern, müssen zunächst einmal die Hornschicht (*Stratum corneum*) penetrieren, um die lebenden epidermalen Zellen zu erreichen und so eine toxische Reaktion in den unteren Zellschichten auszulösen [Monteiro-Riviere 2006]. In einer Studie von Lademann et al., (1999) wurde die Penetration von Titandioxid-Partikeln in die lebende humane Epidermis gemessen. Auch nach Langzeitversuchen konnten lediglich im oberen Teil der Epidermis, dem *Stratum corneum*, Partikel nachgewiesen werden. Eine neuere Studie von Ryman-Rasmussen et al. (2006) zeigte dagegen, dass bei Schweinen Quantum dots mit einem Durchmesser von 4,5-12 nm sogar bis

in die Dermis gelangen können. Ein Eindringen von Nanopartikeln in tiefere Hautschichten ist über die Epidermiszellen oder durch Schweißdrüsen, Haarfollikel und durch sensorische Nervendigungen denkbar [Oberdörster 2005].

Anatomisch gesehen gibt es drei mögliche Absorptionsrouten durch die Haut [Monteiro-Riviere 1991]:

- I) Interzellulär (zwischen den einzelnen Zellen hindurch)
- II) Transzellulär (durch die Zellen hindurch)
- III) Transappendageal (durch die Haar-Follikel oder Schweißdrüsen)

Ob Nanopartikel allerdings durch diese Routen zu lebenden Zellen vordringen können, ist bislang ungeklärt, da entsprechende Untersuchungen zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen [Peter 2005]. Bei Partikeln wie Zink oder Titandioxid, welche in Haut- und Sonnenschutzprodukten Anwendung finden, konnte eine Penetration durch die Hornschicht der Kaninchenhaut nachgewiesen werden [Landsdown 1997]. Eine hohe Absorptionsrate wurde dabei für wässrige und ölige Partikel festgestellt. In der Pharmakologie werden bereits Lipid-Nanopartikel und Liposomen speziell für das erleichterte Einschleusen und die verbesserte Bioverfügbarkeit von Medikamenten (drug delivery) über die Haut entwickelt [Monteiro-Riviere 2005]. Ein mögliches Risikopotential liegt im direkten Kontakt der Partikel zu den Zellen und die Verteilung der Nanopartikel über den Blutstrom im gesamten Organismus. Daneben können jedoch auch gestresste Keratinozyten als Immunozyten reagieren und so Zytokin-Kaskaden auslösen, die dann zu allergischen Reaktionen oder Hautirritationen führen, ohne dass eine Penetration stattfinden muss [Monteiro-Riviere 2005]. Zahlreiche Studien beschäftigen sich daher mit der Untersuchung der Zytotoxizität, der dermatologischen Gefährdung und dem hautreizenden Potential von Nanopartikeln. Auch ist die Frage, inwieweit eine geschädigte Haut gefährdet ist, noch offen und muss ebenfalls genau untersucht werden.

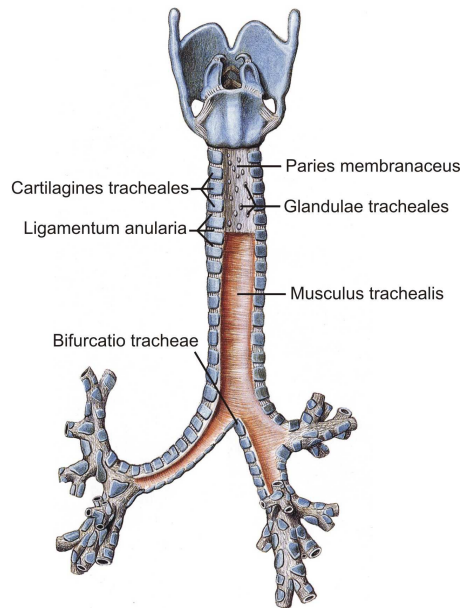
## 1.4 Inhalative Exposition

Die inhalative Resorption von luftgetragenen Nanopartikeln wird als wichtigster Expositionspfad angesehen [Zhao 2007]. Gleichzeitig wird dieser Aufnahmeweg auch als besonders gefährlich eingestuft, da Partikel mit einer Größe kleiner 2,5  $\mu\text{m}$  von den Flimmerhärchen nicht wirksam zurückgehalten werden [Zhao 2007]. Kleine Partikel können daher tief in den Respirationstrakt bis zu den Alveolen eindringen. In diesem Bereich ist durch den stattfindenden Gasaustausch die Grenzschicht zwischen Lunge und Blutkreislauf sehr dünn und ein Eindringen von Nanopartikeln durch diese Barriere scheint daher als sehr wahrscheinlich [Heyder 2002].

Da die Nanopartikel dazu neigen, Agglomerate zu bilden, kann sicherlich ein Großteil der eingeatmeten Partikel über den natürlichen Reinigungsmechanismus der unteren Atemwege gebunden und entfernt werden [Fubini 2007]. Allerdings muss auch hier untersucht werden, inwiefern der Kontakt von Partikeln mit den Zellen eine irritative Wirkung haben könnte oder die Partikel etwa in der Lage sind, die Barriere der Epithelzellen zu durchdringen.

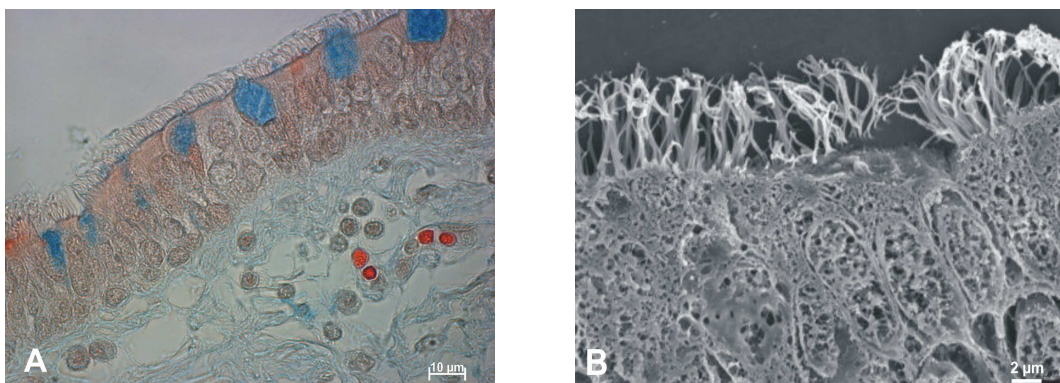
### 1.4.1 Aufbau und Funktion der Luftröhre

Die Luftröhre (*Trachea*) ist ein muskulöser, ca. 11 cm langer Schlauch, der den Kehlkopf (*Larynx*) mit den Bronchien verbindet (Abbildung 4). Um ein Kollabieren des Muskelschlauchs beim Einatmen zu verhindern, wird dieser durch 16-20 nach dorsal geöffneten Knorpelspannen stabilisiert. Zwischen den einzelnen Spangen liegt elastisches Bindegewebe, das die Luftröhre auch in Längsrichtung dehnbar macht.



**Abbildung 4** Anatomischer Aufbau der Luftröhre [Sobotta 2000]

Entsprechend den oberen Atemwegen ist auch das Lumen der Trachea mit einem Epithel aus mehrreihigen Zellen ausgekleidet. Dieses respiratorische Epithel besteht zum einen aus zilientragenden Epithelzellen und zum anderen aus schleimproduzierenden Becherzellen (Abbildung 5). Die Becherzellen kleiden die Atemwege mit einer Schleimschicht aus, der die Zellen schützt und Partikel bindet, während die Zilien des Flimmerepithels für einen metachronen Zilienschlag Richtung Rachenraum sorgen.



**Abbildung 5** Aufnahmen des humanen respiratorischen Epithels: (A) Movat-Pentachrom Färbung, blau gefärbt sind die Becherzellen, (B) Aufnahme der zilientragenden Zellen mit dem Raster-elektronenmikroskop

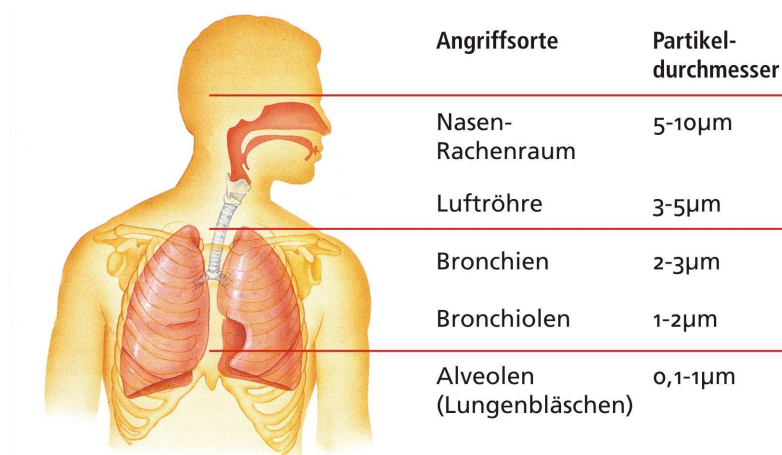
Diese zwei sich ergänzenden Komponenten bilden den natürlichen Reinigungsmechanismus der Atemwege, die sogenannte „Mukoziliäre Clearance.“ Partikel, die in die unteren Atemwege gelangen, können so durch den Schleim



gebunden und über den ziliaren Transport aus dem Respirationstrakt entfernt werden. Die Luftröhre stellt somit nach dem oberen Respirationstrakt eine zweite Barriere für eingedrungene Partikel dar (Abbildung 6).

#### 1.4.2 Gefährdungspotential der Nanopartikel für den Respirationstrakt

Studien mit ultrafeinen Partikeln aus Verbrennungsprozessen zeigten bei längerfristiger Exposition eine Schädigung des Herz-Kreislauf-Systems [Nemmar 2002]. Gleichzeitig konnte nachgewiesen werden, dass hier die Toxizität ultrafeiner Partikel mit der Teilchengröße korreliert [Peter 2005]. Versuche mit Ratten ergaben, dass nach Langzeitexposition mit Carbon Black und Titandioxid Entzündungen, Lungenfibrosen und auch Krebs verursacht werden können [Oberdörster et al. 1999b, 1999a, 1992].



**Abbildung 6:** Schema des Abscheidegrads von Partikeln und Aersolen, nach Tortora und Derrickson

Partikel der verschiedenen Größenfraktionen werden an unterschiedlichen Stellen des Respirationstrakts herausgefiltert, wobei die oberen und Teile der unteren Atemwege mit der mukoziliären Clearance einen besonderen Reinigungsmechanismus aufweisen. Denkbar ist allerdings auch das Auftreten von Entzündungsreaktionen in diesen Bereichen, ausgelöst durch oxidativen Stress, sollten die Zellen des Respirationstrakts für einen längeren Zeitraum mit Nanopartikeln in Kontakt stehen [Dick 2003]. In Bezug auf die Reaktion von Nanopartikeln auf die Zellen des Alveolarbereichs wurden bereits mehrere Studien durchgeführt, meist jedoch an Ratten oder mit diversen Zelllinien [Rehn 2003, Veronesi 2005]. Teilweise wurden dabei in Bezug auf die Carbon Nanotubes Vergleiche zur toxischen Wirkung des Asbests gezogen [Poland 2008, Brunner 2006]

## 1.5 Entwicklung dreidimensionaler Modelle durch das Tissue Engineering

Der Bereich des Tissue Engineering ist heute ein wichtiger Bestandteil der biomedizinischen Forschung. Ziel dieses Forschungsgebietes ist dabei die Geweberekonstruktion aus humanen oder tierischen Zellen, bei dem die Zellen ihre Funktionalität nicht verlieren und daher entsprechende gewebespezifische Eigenschaften analog *in vivo* ausbilden können. Als organoide, also organähnliche Systeme, können sie dann in der Transplantationsmedizin verwendet werden, um geschädigtes oder zerstörtes Gewebe zu ersetzen [Skalak 1988]. Alternativ können diese Systeme als Testsysteme eingesetzt werden und stellen eine gute Ersatzmethode bzw. Ergänzung zum Tierversuch dar. Man verspricht sich gleichzeitig durch die an die *in vivo* Situation angepasste Kultivierung der Zellen auch eine bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen. Für erste Beurteilungen neuer Medikamente oder Chemikalien liefern diese Modelle aussagekräftige Ergebnisse und ermöglichen als kompakte bioartifizielle Systeme das molekulare Targeting, die Aufklärung komplexer molekularer und zellbiologischer Zusammenhänge und Vorgänge innerhalb und zwischen den Zellen [Maurer 1994].

### 1.5.1 Einsatz von Bioreaktoren zum Aufbau dreidimensionaler Gewebemodelle

Es ist erwiesen, dass sich dreidimensional kultivierte Zellen besser zur biologischen Grundlagenforschung eignen, als einfache Monolayerkulturen [Abbott 2003]. *In vivo* erhalten die Zellen durch verschiedenste Einflussfaktoren, wie Zytokine, Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren, aber auch biomechanische Stimuli, wie Druck, Scherstress oder elektrische Impulse Signale für die Ausbildung ihrer Funktionen.

Der Einsatz von Bioreaktoren ermöglicht eine kontrollierte und standardisierte Kultivierung von Zellen auf einer entsprechenden Matrix [Wendt 2008]. Dabei sollen durch sie in erster Linie die natürlichen *in vivo* Stimuli der jeweiligen kultivierten Zellen nachgeahmt werden und so eine gezielte Differenzierung bewirken. Im Hinblick auf die Entwicklung eines Trachea-Bioreaktors sollte daher die Luftströmung durch die Respiration berücksichtigt werden.

### 1.5.2 Einsatz dreidimensionaler *in vitro* Modelle als Testsysteme

Im Bereich der Nanotechnologie stellen die dreidimensionalen Gewebemodelle ein geeignetes Testsystem dar, um die Ergebnisse aus Versuchen mit Monolayer-Zellkulturen und aus Tierversuchen zu interpretieren und zu verknüpfen.

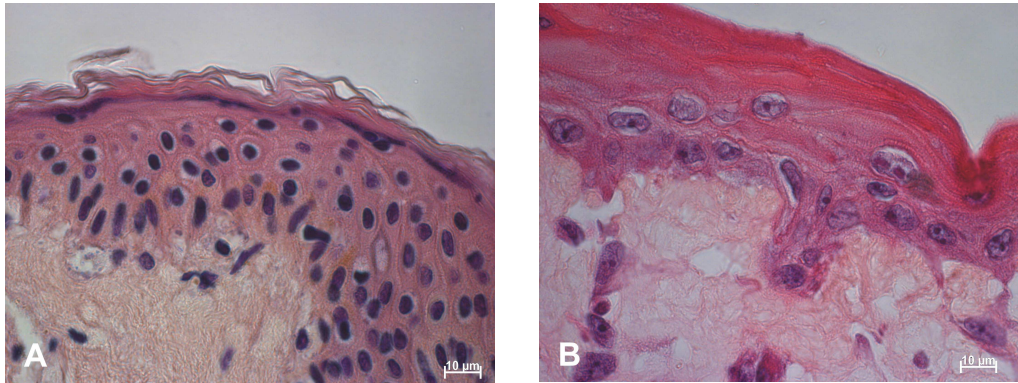
In Versuchen mit Monolayer-Zellkulturen werden Nanopartikel in direkten Kontakt mit Zellen gebracht. Auch dies entspricht nicht den natürlichen Bedingungen, denn ob und wie die Partikel mit den Zellen in Kontakt treten, kann nur aufgeklärt werden, wenn diese auch in der Lage sind, Körperbarrieren zu durchdringen. Gleichzeitig werden in den durchgeführten Versuchen oftmals Zelllinien oder immortalisierte Zellen verwendet, sodass hier wiederum kein direkter Vergleich zum lebenden Organismus möglich ist, da diese Zellen nicht mehr über dieselben Eigenschaften verfügen, wie primäre Zellen des menschlichen Körpers [Brunner 2006, Soto 2005, Pantarotto 2004].

Dagegen kann in Tierversuchen zwar die Wirkung der Nanopartikel auf einen Gesamtorganismus untersucht werden, der tierische Organismus unterscheidet sich jedoch vom menschlichen, sodass die Ergebnisse nicht direkt übertragen werden können. In der Ratte, dem bevorzugten Versuchstier, sind nach der Inhalation von Nanopartikeln mehr Entzündungsreaktionen und andere Symptome feststellbar als in größeren Säugetieren, wie Hunden, Affen oder auch dem Menschen [Nikula 2001 und 1997, Snipes 1996]. Problematisch ist dabei auch die Versuchsauslegung, da den Tieren viel zu hohe Dosen intratracheal verabreicht werden, die in keinem Verhältnis zu natürlich vorkommenden Aerosolen stehen und dadurch größtenteils ein Ersticken der Tiere bewirken. Gerade die oft als Versuchstiere herangezogenen Ratten erwiesen sich sehr sensitiv gegenüber einer CNT-Inhalation und eine Extrapolation auf den Menschen ist somit nicht ohne weiteres möglich [Fiorito 2006].

Für den Aufbau dreidimensionaler Testsysteme werden größtenteils primäre Zellen eingesetzt, die durch eine physiologische Kultivierung ihre zellspezifischen Eigenschaften und Funktionen nicht verloren haben. Vorteil dieser Gewebemodelle ist durch die Verwendung primärer Zellen eine bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen. An ihnen lassen sich gezielt Prozesse an einzelnen Körperbarrieren untersuchen, störende oder beeinflussende Signale aus dem restlichen Organismus, wie z.B. im Tierversuch, können somit ausgeblendet werden.

### 1.5.2.1 Barrierestrukturen des *in vitro* Hautmodells

Der Einsatz dreidimensionaler Zellmodelle ermöglicht im Gegensatz zu den Monolayer-Zellkulturen die Nachbildung von Körperbarrieren (Abbildung 7).



**Abbildung 7** Vergleich der (A) humanen Haut mit (B) dem 3D-Hautäquivalent

Das 3D-Hautmodell wird als eine zweilagige organotypische Kokultur aus humanen Keratinozyten und Fibroblasten mit einem Kollagen aufgebaut [Green 1977]. Das Kollagen bildet mit den Fibroblasten den dermalen Anteil, die Epithelzellen werden auf diese Schicht ausgesät und bilden durch die „air-liquid“ Kultivierungsmethode eine mehrschichtige Epidermis aus [Menon 1997]. Durch diese Kultivierungsmethode lässt sich die Reifung und Ausdifferenzierung der Keratinozyten und damit die Ausbildung des *Stratum corneum* gezielt induzieren. Die Ausbildung der Hornschicht ist für die Nachahmung der Barrierefunktion essentiell, denn so lassen sich, nicht nur im Hinblick auf die Nanotoxikologie, effiziente Studien durchführen. Daneben ist es notwendig, dass die Epithelzellen im Modell auch eine geschlossene Zellbarriere ausbilden. Die Zell-Zell-Kontakte (Tight Junctions) umgürten die Zellen und schließen die Zellzwischenräume. Es entsteht eine parazelluläre Diffusionsbarriere, die die Zellpolarität erhält und die Diffusion wasserlöslicher Moleküle durch die Zellschicht verhindert [Alberts 2001]. Substanzen oder Partikel treffen so in erster Instanz auf die Hornschicht, müssen dann jedoch entsprechend der Echthaut als zweite Instanz die Epithelzellbarriere überwinden.

### 1.5.2.2 Barrierestrukturen des *in vitro* Tracheamodells

Bislang gibt es noch keine dreidimensionalen Tracheamodelle auf Basis einer biologischen Trägerstruktur, die in einem Bioreaktorsystem unter Simulation der Atmung kultiviert werden. Für den Aufbau eines funktionellen Tracheamodells müssen die Zellen gezielt differenziert werden, d.h., die eingesetzten Zellen müssen in der Lage sein, den natürlichen Reinigungsmechanismus (= mukoziliäre Clearance) nachzubilden. Die Flimmerepithelzellen können bis zu 300 Zilien pro Zelle ausbilden, die mit einer Frequenz von 15 Hz schlagen. Dieser Mechanismus stellt eine effektive Barriere der Atemwege dar. Durch Mucussekretierende Becherzellen werden eingeatmete Partikel gebunden und durch den metachronen Zilienschlag der Flimmerepithelzellen aus der Trachea befördert. Die Ausbildung von Becherzellen und zilientragenden Epithelzellen stellt damit eine wesentliche Barrierefunktion dar. Daneben ist ebenfalls die Ausbildung einer geschlossenen Epithelzellschicht als parazelluläre Diffusionsbarriere in Form der Tight Junctions notwendig.

Nur durch eine breitgefächerte und abgestimmte Untersuchung von Nanomaterialien wird es möglich sein, realistische Aussagen über potentielle Risiken der einzelnen Partikel treffen zu können. Ein wichtiger und gezielter Schritt in diese Richtung ist dabei der Vergleich von *in vitro* Monolayer-Versuchen, Tierversuchen und Versuchen an dreidimensionalen *in vitro* Gewebemodellen.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Diese im Rahmen des vom BMBF und Wing (Werkstoffinnovationen für Industrie und Gesellschaft) geförderten Projekts TRACER (Toxicological risk assessment of carbon nanomaterials) durchgeführte Arbeit gliederte sich in 2 Aspekte:

Ein Ziel war die Entwicklung eines dreidimensionalen Tracheamodells, um auch die wichtigste Körperbarriere in Bezug auf die Nanotoxikologie, den Respirationstrakt, simulieren und für Inhalationsstudien einsetzen zu können. Für den Aufbau des Tracheamodells waren die Etablierung der Isolation und Kultivierung der primären humanen Trachea-Epithelzellen aus Biopsaten sowie deren physiologische Kultivierung in einem speziellen Bioreaktorsystem notwendig. Ein entsprechender Bioreaktor wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt und eingesetzt. Die Zellen

sollten durch eine dynamische Kultivierung ihre funktionellen Eigenschaften (mukoziliäre Clearance) nicht verlieren. Exemplarisch konnte in Bezug auf die Nanotoxikologie nach dem Aufbau des 3D-Tracheamodells ein Versuch zur Untersuchung einer möglichen Penetration von Nanopartikeln durchgeführt werden. Ein weiteres Ziel war die Etablierung aussagekräftiger Methoden zur Risikoanalyse von Nanomaterialien am bereits bestehenden Hautmodell. Ein solches Modell wurde am Fraunhofer IGB bereits entwickelt und patentiert [DIN Iso 10933-5]. Mit dem etablierten Hautmodell sollten neue Methoden zur Untersuchung der Nanotoxikologie evaluiert werden, da sich Methoden zur toxikologischen Untersuchung aus den Monolayerkulturen nicht einfach auf die dreidimensionalen Modelle übertragen lassen und für die Testung proteinadsorbierender kohlenstoffbasierter Nanopartikel nicht geeignet sind.

Der Einsatz des Haut- und Tracheamodells, die den natürlichen Körperbarrieren der menschlichen Haut und Luftröhre nachempfunden sind, soll eine bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den menschlichen Organismus und eine bessere Vergleichbarkeit zu Versuchen an Monolayer-Zellkulturen und Tierversuchen gewährleisten.

Untersucht wurde zum einen Titandioxid, das bereits in Kosmetikprodukten eingesetzt wird. Daneben wurden auch zwei verschiedene Arten von Kohlenstoff-Nanopartikeln eingesetzt. Neben den Partikeln des Carbon Black wurden röhrenförmige Nanopartikel, die so genannten Kohlenstoff-Nanoröhren (Carbon Nanotubes, CNT), untersucht. Durch ihre Faserform werden die Kohlenstoff-Nanoröhren oftmals mit Asbest verglichen. Auch wenn der Ausgangsstoff ein anderer ist, stellt sich doch die Frage, welche Auswirkungen diese Fasern im Nanoformat auf den menschlichen Körper haben könnten und stellen damit momentan ein sehr brisantes Forschungsthema auf dem Gebiet der Nanotoxikologie dar.

## 2 Material

### 2.1 Zellmaterial

Primäre Fibroblasten und Keratinozyten wurden aus humanem Präputium isoliert. Die Biopsate wurden von Spendern (0-8 Jahre) am Olga Hospital in Stuttgart entnommen und zur Verfügung gestellt. Der Transport des Gewebes erfolgte in DMEM mit 1% Gentamycin. Nach der Operation sollte die Isolation der Zellen möglichst rasch erfolgen (Lagerung maximal 2 Tage bei 4°C).

Biopsate der humanen Luftröhre dienten zur Isolation primärer Trachea-Epithelzellen und stammten aus Operationen der Klinik Schillerhöhe. Als Transportmedium wurde MEM mit 1% Penicillin-Streptomycin verwendet. Die Lagerung der Proben erfolgte bei 4°C, die Isolation der Zellen sollte innerhalb von 4 Tagen nach der Operation erfolgen.

Zur Gewinnung der biologischen Matrix, wurden porcine Jejunumsegmente verwendet. Diese wurden in der Abteilung Experimentelle Medizin der Universitätsklinik Tübingen unter sterilen Bedingungen deutschen Landrasseschweinen (15-25 kg) entnommen. Bis zur Aufarbeitung lagerte der Darm maximal einen Tag in phosphatgepufferter Salzlösung.

Die Entnahmen der tierischen und humanen Biopsate wurden durch die Ethikkommission der Uniklinik Tübingen, bzw. durch das Regierungspräsidium Tübingen genehmigt.

#### **Neben den primären Zellen wurden auch Zelllinien eingesetzt:**

**Tabelle 3** Eingesetzte Zelllinien

<b>Zelllinie</b>	<b>Herkunft der Zellen</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Calu-3	Humanes Lungenkarzinom	ATCC (HTB 55)
HBE	Humane Bronchiale Epithelzellen (immortalisierte Zellen)	California Pacific Medical Center Research Institute/Kalifornien (USA)
FHTE	Fötale Humane Trachea Epithelzellen	
HaCaT	Humane Keratinozyten Zelllinie	DKFZ/Heidelberg

## 2.2 Getestete Nanomaterialien und Referenzstoffe

**Tabelle 4** Eingesetzte Nanomaterialien

Testmaterial	Hersteller	Bestellnummer	Merkmale
Titandioxid P25	Evonik/Frankfurt	Lot. 4165061998	anorganisch
Carbon Black	Evonik/Frankfurt	CH-000122 (14 nm) Lot. 000124	organisch
Multiwalled Carbon Nanotubes	FutureCarbon GmbH/Bayreuth	Lot. 060007-LA-MW-1000	organisch
Blauasbestfasern (Krokydolith)	Frenzelit-Werke GmbH/Himmelkron	-	anorganisch

## 2.3 Chemikalien

**Tabelle 5** Eingesetzte Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Bestellnummer	Lagerung
Acrylamid/Bis-Lösung(30%; 37, 5:1)	Bio-Rad/München	161-0100	RT
Advantage®2 Polymerase Mix (1 rxns/µl)	TAKARA Bio Inc. (Clontech)/Saint-Germain-en-Laye France	639201	-20°C
Alcianblau	Sigma Aldrich/München	A-5268	RT
Antibody Diluent	Dako/Hamburg	S3022	2-8°C
Apo-Transferrin	Sigma Aldrich/München	T4382	2-8°C
Aquatex	Merck/Darmstadt	1.08562.0050	RT
BD PrimeScript™ (200 U/µl)	TAKARA Bio Inc. (Clontech)/Saint-Germain-en-Laye France	2680A	-20°C
Beta-Mercaptoethanol	Roth/Karlsruhe	4227.3	RT
Bouins Reagenz	Sigma-Aldrich/München	HAT 101128	RT
Bovines Fibronektin	Invitrogen/Karlsruhe	33010-018	-20°C
Bovines Serum Albumin (zum Blocken)	Sigma Aldrich/München	A9647	2-8°C
Brilliantcrocein R	Chroma/Münster	1B 109	RT
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O)	Merck/Darmstadt	2382	RT
CASY®-clean	Schärfe-System/Reutlingen	43008	2-8°C
CASY®-ton	Schärfe-System/Reutlingen	43001	RT
Cholesterol solution	Sigma Aldrich/München	S5442	2-8°C
Chondroitin-4-sulfat	Sigma Aldrich (Fluka)/München	27042	2-8°C
Chondroitin-6-sulfat	Sigma Aldrich (Fluka)/München	27043	2-8°C



<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Lagerung</b>
Dako Cytomation antibody diluent	Dako/Hamburg	S3022	2-8°C
Dako Cytomation EnVision+System labelled polymer – HRP anti mouse	Dako/Hamburg	K4007	2-8°C
Dako Cytomation peroxidase blocking reagent	Dako/Hamburg	S2023	2-8°C
Dako Cytomation Target Retrieval Solution Citrat pH 6	Dako/Hamburg	S2369	2-8°C
Dako Cytomation Target Retrieval Solution Citrat pH 9	Dako/Hamburg	S2367	2-8°C
Dako EnVision™ Detection system Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse	Dako/Hamburg	K5007	2-8°C
Delimiting Pen	Dako/Hamburg	S2002	2-8°C
D-Glucose	Merck/Darmstadt	8337.1000	RT
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich/München	D2438	RT
Dispase	Invitrogen/Karlsruhe	17105-041	2-8°C
DMEM Pulver	Invitrogen/Karlsruhe	52100-021	2-8°C
dNTP Set (4x100 µmol)	Fermentas GmbH/St. Leon-Rot	R0182	-20°C
Eosin B	Sigma Aldrich/München	861006	RT
Epidermal Growth Factor (EGF)	Sigma Aldrich/München	E9644	-20°C
Essigsäure	Merck/Darmstadt	1.00056.1000	RT
Ethanol 96%	Roth/Karlsruhe	K928.3	RT
Ethanol für Molekularbiologie	Roth/Karlsruhe	9065.1	RT
FACS ®-Clean	Becton Dickinson/Heidelberg	340345	RT
FACS ®-Flow	Becton Dickinson/Heidelberg	342003	RT
FACS ®-Rinse	Becton Dickinson/Heidelberg	340346	RT
Fötales Kälberserum (FCS) für Zellkulturmedien	Invitrogen/Karlsruhe	10270-106 Lot. 41F1361K	-20°C/2-8°C
Fötales Kälberserum (FCS) zur Disersionsherstellung	Invitrogen/Karlsruhe	10270-106 Lot. A64905-0786	-20°C/2-8°C
Fungizone	Invitrogen/Karlsruhe	15290-026	-20°C
Gentamycin	Invitrogen/Karlsruhe	15710	2-8°C
Glutardialdehyd	Sigma Aldrich (Fluka)/München	49629	2-8°C
Glykogen (20 mg/ml)	Fermentas GmbH/St. Leon-Rot	R0561	-20°C
Hepatocyte growth factor (HGF)	Sigma Aldrich/München	H1404	-20°C

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Lagerung</b>
HEPES	Roth/Karlsruhe	9105.3	2-8°C
Hydrocortison	Sigma Aldrich/München	H6909	-20°C
Insulin solution human	Sigma Aldrich/München	I9278	2-8°C
Isomount®	LABOnord/Tempemars (B)	05547535	RT
Isopropanol	Merck/Darmstadt	-	RT
Kaliumchlorid (KCl)	Merck/Darmstadt	4936.5000	RT
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck/Darmstadt	4873.1000	RT
Kollagenase NB4	Serva/Heidelberg	17454	2-8°C
Korsolex® AF	Bode Chemie/Hamburg	PZN: 8532038	RT
L-Glutamin	Biochrom/Berlin	K0283	-20°C
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O)	Merck/Darmstadt	5833	RT
Mayer's Häkalaunlösung	Merck/Darmstadt	1.09249.2500	RT
Mayers Häkalaunlösung	Merck/Darmstadt	1.09249.2500	RT
MEM Amino acid solution 50x	Sigma Aldrich/München	M5550/100 ml	2-8°C
Minimum essentiell Medium MEM (Fertiglösung)	Sigma-Aldrich/München	M4655	2-8°C
Molekularbiologisches Wasser	Roth/Karlsruhe	T143.2	2-8°C
Natrium Pyruvat	Sigma Aldrich/München	S8636	2-8°C
Natriumacetat	Merck/Darmstadt	6268.1000	RT
Natriumchlorid (NaCl)	Roth/Karlsruhe	3957.1	RT
Natriumdesoxycholat Monohydrat	Roth/Karlsruhe	3884.2	RT
Natrium- Ethyldiamintetraessigsäure Na-EDTA Salz	Sigma Aldrich/München	E-1644	RT
Natriumhydrogencarbonat	Roth/Karlsruhe	8551.1	RT
Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O)	Merck/Darmstadt	6580.1000	RT
Natriumhydroxidplätzchen (NaOH)	Merck/Darmstadt	1.06482.1000	RT
Non essential amino acids solution 100x	Sigma Aldrich/München	M7145	2-8°C
Paraffin	LABOnord/Tempemars (B)	F097200	RT
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen/Karlsruhe	3879	-20°C
Peroxidase-Blocking Solution	Dako/Hamburg	S2023	2-8°C
Phosphorwolframsäure	Sigma Aldrich/München	P4006	RT
Platinum® Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	Invitrogen/Karlsruhe	11304-011	-20°C

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Lagerung</b>
Restriktionsendonuklease (Rsal 10 U/μl)	New England Biolabs/Frankfurt, Main	R0167L	-20°C
Roti®-Histofix	Roth/Karlsruhe	P087.3	RT
Roticlear®	Roth/Karlsruhe	A538.1	RT
Saffron du Gatinais	Sigma Aldrich/München	S8381	RT
Säurefuchsin	Serva/Heidelberg	21915	RT
SyBR® Gold /10 000x)	Invitrogen/Karlsruhe	S11494	-20°C
T4-DNA Ligase (400 U/μl)	New England Biolabs/Frankfurt, Main	M0202L	-20°C
Taq DNA Polymerase (4 U/μl)	L. Schalwyk, ICRF/London	*	-20°C
Target Retrieval Solution Citrate pH 6	Dako/Hamburg	S2369	2-8°C
Target Retrieval Solution pH 9,0	Dako/Hamburg	S2367	2-8°C
TEMED	Bio-Rad/München	161-0861	RT
Transcriptor High Fidelity	Roche/Mannheim	05091284001	-20°C
Transferrin	Sigma Aldrich/München	T1147	-20°C
Triiod-L-thyronin sodium salt	Sigma Aldrich/München	T5516	-20°C
Tris Hydrochloride	Sigma Aldrich/München	T-5941/500 G	RT
Trizma base	Sigma Aldrich/München	T6066/500 G	RT
Trypsin 10x	Invitrogen/Karlsruhe	15400	-20°C
Tween 20	Merck/Darmstadt	822184	RT
Versene	Invitrogen/Karlsruhe	15040	2-8°C
Xylol	Roth/Karlsruhe	9713.3	RT

\*die Taq-Polymerase wurde von Ekkehard Hiller isoliert und zur Verfügung gestellt [Isolation nach Pluthero 1993]

## 2.4 Medien, Puffer und Lösungen für die Zellkultur

### 2.4.1 Zellkulturmedien

Alle zu verwendenden Medien, Lösungen, Puffer und sonstige Materialien müssen steril eingesetzt werden, bzw. durch entsprechende Methoden sterilisiert werden.

**Tabelle 6** Eingesetzte Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen

<b>Trachea-Epithelzell Medium (MEMr II)</b>	
MEM	ad 100 ml
Insulin	5 µg/ml
Hydrocortison	1 µl/ml
EGF	0,5 ng/ml
HGF	0,1 ng/ml
L-Glutamin	1 ml
Nicht essentielle Aminosäuren	0,5 ml
Essentielle Aminosäuren	0,5 ml
Apo-Transferrin	5 µg/ml
Vitamin Lösung	1 ml
Triiod-L-Thyronin	2 ng/ml
Glucose	1 ml

<b>Fibroblasten/HaCaT Medium (DMEMr)</b>	
DMEM (13,38 g/l DMEM + 3,70 g/l NaHCO <sub>3</sub> )	ad 100ml
FCS	10 ml
Gentamycin (nur bei Bedarf)	1 ml

<b>Keratinozyten Medium (KBMr)</b>	
KBM	ad 500 ml
GA-1000	0,5 µg/ml
Hydrocortison	0,5 µg/ml
Insulin	5 µg/ml
BPE	4 µl/ml
EGF	50 ng/ml

<b>Airlift Medium</b>	
KBM	ad 500 ml
GA-1000	0,5 µg/ml
Hydrocortison	0,5 µg/ml
Insulin	5 µg/ml
CaCl <sub>2</sub>	1,88 mM

**FHTE/HBE Medium**

MEM	ad 100 ml
FCS	10 ml
L-Glutamin	1 ml

**Calu-3 Medium**

MEM	ad 100 ml
FCS	10 ml
Natrium-Pyruvat	1 ml
Nicht essentielle Aminosäuren	1 ml

**2.4.2 Puffer**

Tabelle 7 Eingesetzte Puffer

**PBS (pH 7,2)**

NaCl	140 mM
KCl	2 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	8,5 mM
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 1000 ml

**PBS<sup>+</sup> (pH 7,2)**

NaCl	140 mM
KCl	2 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	8,5 mM
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,5 mM
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,9 mM
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 1000 ml

**PBS/EDTA (pH 7,2)**

NaCl	140 mM
KCl	2 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	8,5 mM
Na-EDTA Salz	0,5 mM
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 1000 ml

**2,5%ige Glutardialdehydlösung in Salzlösung (pH 7,3)**

Glutardialdehydlösung	2,5% (v/v)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,45 g
NaHPO <sub>4</sub>	7,6 g
NaCl	4,8 g
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 1000 ml

**2.4.3 Lösungen für die Zellbiologie****Tabelle 8** Eingesetzte Lösungen für die Zellbiologie**Azellularisierungs-Lösung**

Natriumdesoxycholat	45g
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 2000 ml

**Gelneutralisationslösung**

2-fach konzentriertes DMEM	235,5 ml
3 M HEPES-Lösung	7,5 ml
5 mg/ml Chondroitin-4-sulfat-Lösung	1,25 ml
5 mg/ml Chondroitin-6-sulfat-Lösung	1,25 ml
FCS	7,5 ml

**Trypsin/EDTA**

Trypsin	5 g/l
EDTA- 4Na	2 g/l
NaCl	8,5 g/l
Versene (1:5000)	10 ml Trypsin/EDTA auf 100 ml Versene

**3 M HEPES-Lösung (pH 7,8)**

HEPES	3,574 g
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 10 ml

**Fibronectin Beschichtungslösung für FHTE/HBE Kultivierung**

DMEM	88 ml
FCS	10 ml
Kollagen (3 mg/ml)	1 ml
Bovines Fibronectin (1 mg/ml)	1 ml

<b>Lösung</b>	<b>Ansatz</b>
Kollagenlösung	Kollagen (5,5 mg/ml) in 0,1%iger Essigsäure
Beschichtungskollagenlösung	Kollagen (500 µg/ml) PBS <sup>-</sup>
Kollagenase	500 Units/ml
Fibronectin	Lyophilisat 50 µg/ml in H <sub>2</sub> O bidest.
Dispase	2 Units/ml

#### 2.4.4 Lösungen für die Immunhistochemie und Histologie

**Tabelle 9** Eingesetzte Lösungen für die Immunhistochemie und Histologie

<b>Lösung</b>	<b>Ansatz</b>
<b>Fixierungsreagenz Bouins</b>	0,9% Pikrinsäure 9% Formaldehyd 5% Essigsäure
<b>Eosin B</b>	100 ml 1% Eosinlösung +1 Tropfen Eisessig
<b>Differenzierungsalkohol</b>	13,7 ml 1M HCl + 200 ml 50% Ethanol
<b>Alcianblau</b>	1 g Alcianblau + 1 ml konzentrierte Essigsäure + 100 ml H <sub>2</sub> O bidest.
<b>Eisenhämatoxylin</b>	<b>Lösung A:</b> 1 g Hämatoxylin + 100 ml 96% Ethanol (lösen unter erwärmen, bis die Farbe rotbraun erscheint) <b>Lösung B:</b> 2,48 g Eisen-2-Chlorid Hexahydrat + 100 ml H <sub>2</sub> O bidest. <b>Gebrauchslösung:</b> Lösung A und B zu gleichen Teilen mischen
<b>Brilliant Crocein-Säurefuchsin</b>	<b>Lösung A:</b> 0,1 g Brilliant Crocein R + 0,5 ml konzentrierte Essigsäure + 99,5 ml H <sub>2</sub> O bidest. <b>Lösung B:</b> 0,1 g Säurefuchsin + 0,5 ml konzentrierte Essigsäure + 99,5 ml H <sub>2</sub> O bidest. <b>Gebrauchslösung:</b> 8 Teile Lösung A und 2 Teile Lösung B mischen
<b>Saffron du Gatinais</b>	6 g Saffron du Gatinais + 100 ml 100% Ethanol 48 h bei 50°C extrahieren in einem luftdichten Gefäß
<b>Alkalischer Alkohol</b>	10 ml Ammoniumhydroxid (Na <sub>4</sub> OH) + 90 ml 96% Ethanol

<b>Lösung A (pH 7,5)</b>	
Tris HCL	65,3 g
Trizma base	11,8 g
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 500 ml

<b>Lösung B</b>	
NaCl	146,1 g
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 500 ml

<b>CaCl<sub>2</sub>-Lösung</b>	
CaCl <sub>2</sub>	8,5 g
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 50 ml

<b>Tris-Waschpuffer (2-3 Wochen bei 2-8°C haltbar)</b>	
Lösung A	200 ml
Lösung B	60 ml
CaCl <sub>2</sub> -Lösung	4 ml
BSA (zum Blocken)	2 g
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 2 l

## 2.4.5 Puffer und Lösungen für die molekularbiologischen Anwendungen

**Tabelle 10** Eingesetzte Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie

<b>Lösung</b>	<b>Ansatz</b>
50 x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)	2 M Tris +1 M 100%ige Essigsäure +50 mM EDTA in H <sub>2</sub> O bidest.
10 x NEB-Puffer (NEB)	100 mM Bis Tris Propane-HCl (pH 7,0) + 10 mM MgCl <sub>2</sub> + 10 mM Dithiothreitol
10 x NEB T4-DNA Ligase Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,5) + 10 mM MgCl <sub>2</sub> + 10 mM Dithiothreitol + 1 mM ATP + 25 µg/ml BSA
10 x Thermopol-Puffer, detergentfrei (pH 8,8)	10 mM KCl + 10 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 20 mM Tris-HCl + 2 mM MgSO <sub>4</sub>
1% Agaroselösung	1% Agarose in TAE-Puffer in der Mikrowelle erhitzen, bis die Lösung klar ist
10% Ammoniumpersulfat (APS)	10% (w/v) APS in H <sub>2</sub> O bidest.



## 2.5 Antikörper

Tabelle 11 Eingesetzte Antikörper

Antigen	Bestellnr.	Hersteller Bestellnr.	Verdünnung Demaskierung	Lagerung
Beta-Tubulin	T4026	Sigma Aldrich/München	1:200	-20°C
FoxJ1 (Anti-HFH-4)	Clone 3-19 05-837	Upstate/Lake Placid (USA)	1:500	-20°C
Gastric-Mucin	Clone 45M1 M5293	Sigma- Aldrich/München	1:1000	-20°C
Villin	VI616C01	DCS Innovative Diagnostik Systeme/Hamburg	1:100	2-8°C
ZO-1 Tight Junction- associated Polypeptide	33-1500	Zymed® Laboratories Invitrogen/Karlsruhe	1:200	-20°C
Zytokeratin 18	Clone DC 10 M7010	Dako/ Hamburg	1:200	2-8°C
Zytokeratin 5/6	Clone D5/16 B4 M7237	Dako/Hamburg	1:200	2-8°C

Isotypkontrolle	Hersteller	Bestellnr.	Lagerung
Negativ Control Mouse IgG1	Dako/Hamburg	X0931	2-8°C
Rabbit Immunglobulin	Dako/Hamburg	X0903	2-8°C

Sekundär-Antikörper	Spezifität	Hersteller	Bestellnr.	Lagerung
EnVision+- System	Anti mouse	Dako/Hamburg	K4007	2-8°C
EnVision+- System	Anti mouse/rabbit	Dako/Hamburg	K5007	2-8°C

## 2.6 Verwendete Kit-Systeme

### 2.6.1 Nachweis von Funktionen und Entzündungsmarkern

**Tabelle 12** Eingesetzte Test-Kits

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnr.</b>	<b>Lagerung</b>
Quantikine Human IL-1alpha ELISA	R&D Systems(R)/Wiesbaden-Nordenstadt	DLA50	2-8°C
Quantikine Human IL-1beta ELISA	R&D Systems(R)/Wiesbaden-Nordenstadt	DLB50	2-8°C
Human IL-1beta-ELISA Ready Set Go	NatuTec (eBioscience)/Frankfurt	88-7010-88	2-8°C
Human IL-4 ELISA Ready Set Go	NatuTec (eBioscience)/Frankfurt	88-7046-88	2-8°C
Human IL-6 ELISA Ready Set Go	NatuTec (eBioscience)/Frankfurt	88-7066-88	2-8°C
Human IL-8 ELISA (Core Kit)	KOMA BIOTECH/Seoul, Korea Bestellung über NatuTec	K0131216	2-8°C Alliquots bei -20°C
FlowCytomix Comboplex 12plex	BenderMed Systems/Wien	BMS899-12FF	2-8°C
FlowCytomix Simplex-Kit IL-10	BenderMed Systems/Wien	BMS8215FF	2-8°C
FlowCytomix Simplex-Kit MIP-1alpha	BenderMed Systems/Wien	BMS82029FF	2-8°C
FlowCytomix Simplex-Kit IL-8	BenderMed Systems/Wien	BMS8204FF	2-8°C
FlowCytomix Simplex-Kit G-CSF	BenderMed Systems/Wien	BMS82001FF	2-8°C
FlowCytomix Simplex-Kit IL-6	BenderMed Systems/Wien	BMS8213FF	2-8°C
FlowCytomix Simplex-Kit IL-4	BenderMed Systems/Wien	BMS8225FF	2-8°C
FlowCytomix Simplex-Kit IL-1beta	BenderMed Systems/Wien	BMS8224FF	2-8°C
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche/Mannheim	1 644 793	Angaben des Herstellers beachten!

## 2.6.2 RNA-Isolation, PCR und Genexpressionsanalyse

**Tabelle 13** Eingesetzte Kitsysteme für die Molekularbiologie

Bezeichnung	Firma	Bestellnummer	Lagerung
RNA® Mini Kit	Quiagen/Hilden	74104	RT
QIAquick PCR Purification Kit	Quiagen/Hilden	28106	2-8°C
RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies/Waldbronn	5067-1511	2-8°C

## 2.7 Verwendete Oligonukleotide für die MESSAGE-Technologie

Alle Primer stammten von der Firma Thermo Scientific und wurden in einer Konzentration von 10 µM eingesetzt.

**Tabelle 14** Eingesetzte Primer für die MESSAGE-Technologie

Primer	Sequenz (5'-3')	Reinheit
Adapter Primer AP1	TGTAGCGTGAAGACGACAGAA	HPLC
A2-Sau3a	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	HPLC
SMART_dM	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGG	HPLC
SMART T13 (VN)	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTTTTTTTTTTTTTTVN	HPLC
Long_Oligo_Rsal	GCGTGAAGACGACAGAAAGGGCGTGGTGCGGAGG GCGGT	HPSF
Short_Oligo_Rsal	ACCGCCCTCCGC	HPSF
Ad_non_extended	AGGGCGTGGTGC GGAGGGCGGT	HPSF
SMART-T13_AA	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTTTTTTTTTTTTTTAA	HPLC
SMART-T13_AC	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTTTTTTTTTTTTTTAC	HPLC
SMART-T13_AG	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTTTTTTTTTTTTTTAG	HPLC
SMART-T13_AT	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTTTTTTTTTTTTTTAT	HPLC
SMART-T13_CA	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTTTTTTTTTTTTTTCA	HPLC
SMART-T13_CC	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTTTTTTTTTTTTTTCC	HPLC
SMART-T13_CG	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTTTTTTTTTTTTTTCCG	HPLC
SMART-T13_CT	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTTTTTTTTTTTTTTCT	HPLC
SMART-T13_GA	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTTTTTTTTTTTTTTGA	HPLC
SMART-T13_GC	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTTTTTTTTTTTTTTGC	HPLC
SMART-T13_GG	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTTTTTTTTTTTTTTGG	HPLC
SMART-T13_GT	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTTTTTTTTTTTTTTGT	HPLC
SMART_dM_AT	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGGAT	HPLC
SMART_dM_TC	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGGTC	HPLC
AdE_GA-Rsal	AGGGCGTGGTGC GGAGGGCGGTCCGA	HPLC
AdE_GC-Rsal	AGGGCGTGGTGC GGAGGGCGGTCCGC	HPLC
AdE_GG-Rsal	AGGGCGTGGTGC GGAGGGCGGTCCGG	HPLC
AdE_GT-Rsal	AGGGCGTGGTGC GGAGGGCGGTCCGT	HPLC

## 2.8 Verbrauchsmaterial

**Tabelle 15** Verbrauchsmaterial

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Chirurgischer Faden Silkam®	Braun Melsungen A/Melsungen
Combitips für Multipette	Eppendorf/Hamburg
Deckgläser	Menzel-Gläser/Braunschweig
Easy-Load® Pipettenspitzen 100 µl, 200 µl und 1000 µl	Greiner/Frickenhausen
Einmalhandschuhe, Safestein PFE	Kimberley-Clark/Zaventem,B
Einmalpipetten Cellstar®	Greiner/Frickenhausen
Eppendorf Cups	Eppendorf/Hamburg
Folienschlauch PE	NeoLab/Heidelberg
Gewebekulturflaschen Cellstar®, 25 cm <sup>2</sup> und 75 cm <sup>2</sup>	Greiner/Frickenhausen
Gewebekulturplatten, 6-well und 24-well	Greiner/Frickenhausen
Inserts für 12 Well (Porengröße 1,0 µm) und 24 Well (Porengröße 0,4 µm)	Greiner/Frickenhausen
Kryoröhrchen 1,8 ml	Nunc/Wiesbaden
Lab Tek® Chamber-slides, 8-well	Nunc/Wiesbaden
Objektträger mit Mattrand	Menzel/Braunschweig
Petrischalen: 60 mm, 94 mm, 145 mm	Greiner/Frickenhausen
Probenzählgefäße	Sarstedt/Nümbrecht
Safe-Lock-Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2,2 ml	Eppendorf/Hamburg
SafenSeal-tips Premium 2,5 µl, 10 µl und 20 µl	Biozym Scientific GmbH/Oldendorf
Sterilfilter, Rotrand 0,2 µm	Schleicher&Schuell/Dassel
Sterilfilter, Sterivex GS 0,22 µm	Millipore/Eschborn
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner/Frickenhausen

## 2.9 Laborgeräte

**Tabelle 16** Laborgeräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Analysenwaage Precisa 405M-200A	Sartorius/Göttingen
Autoklav GE 66	Getinge/Rastatt
Autoklavispa FEDEGARI FVS/3	Fedegari/Albuzzano (I)
Begasungsbrutschrank BBD 6220	Heraeus/Hanau
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies/Waldbronn
Camilla hochauflösende Digitalkamera (3500-2300)	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH/Straubenhardt
Dispenser Seripettor	Brand/Wertheim
Einbettautomat Citadell 1000	Shandon/Frankfurt a. M.
Einbettzubehör	Shandon/Frankfurt a. M.
Eismaschine	Ziegra/Isernhagen
Elektrophorese Power Supply (EPS 301)	Amersham GmbH/Freiburg
Eppendorf Zentrifuge 5415R	Eppendor/Hamburg
Eppendorf Zentrifuge 5810 R	Eppendorf/Hamburg
Erlenmeyerkolben, Bechergläser	Schott-Glas/Mainz
FACS Calibur	Beckton Dickinson/Heidelberg
Färbetröge	Assistent/Sondheim
Folienschweißgerät	Melag/Berlin
Fotometer Spekol 1200	Analytik Jena AG/Jena
Glasplatten für Gele	BioRad/München
Heißluftsterilisator ST-5050	Heraeus/Hanau
Heizblock (Digi-Block®-JR)	neoLab/Heidelberg
Heizplatte Störk Tronic	Medax/Kiel
Kugelmühle MM200	Retsch/Haan
Kühlschrank FKU 1800	Liebherr/Ochsenhausen
Laborfeinwaage Precisa 4000C	Sartorius/Göttingen
Laborflaschen mit Gewinde Duran <sup>®</sup> , versch. Größen	Schott-Glas/Mainz
Laserscanner FLA-5100	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH/Straubenhardt
Liquidblocker Super PapPen	Daido Sangyo/Tokyo, J
Magnetrührer IKAMAG-RCT mit Heizung	IKA-Labortechnik/Staufen i. Br.
Mehrkanalpipette	Eppendorf/Hamburg
Messpipetten für Gewebekultur, versch. Größen	Hirschmann/Eberstadt
Messzylinder, versch. Größen	Brand/Wertheim

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Mikrotiterplattenreader Spectra Thermo	Tecan/Maennedorf, CH
Multifunktionsuhr, elektronisch	neoLab/Heidelberg
Multipette Plus	Eppendorf/Hamburg
Nikon Mikroskop Diaphot	Nikon/Düsseldorf
Paraffin-Gießgerät Störk Tronic	Medax/Kiel
Partikelzählgerät CASY-1	Schärfe System/Reutlingen
pH-Meßgerät	Pharmacia Fine Chemicals/Freiburg
Pipetboy acu	Integra Biosciences/Fernwald
Plastik-Bechergläser, versch. Größen	Brand/Wertheim
Präparierbesteck	Assistent/Sondheim
Protean II xi System	Lauda DR.R. Wobser GmbH & Co KG/Lauda-Königshofen
Protean Plus Dodeca Cell (2.D)	Lauda DR.R. Wobser GmbH & Co KG/Lauda-Königshofen
Puffer Rezirkulations Pumpe	Lauda DR.R. Wobser GmbH & Co KG/Lauda-Königshofen
Raman Spektroskop für biologische Analysen: Olympus IX 81	Olympus/Hamburg
HoloSpec 1.3	Kaiser/Michigan (USA)
Laser Df-Beam 785	Toptica/Gräfelfing
Raman Spektroskop für chemische Analysen: NTegra Spectra	NT-MDT/Hueckelhoven
Rasterelektronenmikroskop LEO 1430VP	Zeiss/Jena
Rotationsmikrotom RM 2145 für Paraffinschnitte	Leica/Nussloch
Schlauchpumpe für Sterilfiltrationsanlage XX-80-202-30	Millipore/Eschborn
Schüttler Polymax 1040	Heidolph/Kelheim
Septophag 22	Hesse/Emmerich
Sterilbank Hera Safe	Heraeus/Hanau
Stickstoffbehälter für Langzeitkonservierung GT 330	L'air Liquide-D.M.C./Champigny-sur Marne, F
Thermocycler (MJ Research Peltier Thermal Cycler PTC-200)	BioRad/München
Thermostat Ultra Temp	Julabo/Seelbach
Tiefkühlschrank ULT 1786 (-80°C)	Revco/Asheville, USA
Tischautoklav Typ 24	Melag/Berlin
TMS	Nikon/Düsseldorf
Ultraschallgerät Sonorex Super RK 510H	Bandelin Electronic/Berlin
Ultrathurax, Miccra-D8	Art-Labortechnik/Müllheim
Universalwärmeschrank (U)	Memmert/Schwabach
Vacuboy	Technomara AG/Fernwald

---

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Vakuum manifold	BenderMed Systems/Wien
Vakuumpumpe MZ 2C	Vacubrand/Wertheim
Varipetten, versch. Größen	Eppendorf/Hamburg
Wasseranlage, Super Q	Millipore/Eschborn
Wasserbad für Paraffinschnitte	Medax/Kiel
Wasserbad WTEvar 3185	Assistent/Sondheim
Zeiss Mikroskop Axiovert 200M	Zeiss/Jena

---

## **3 Methoden**

### **3.1 Zellisolation**

#### **3.1.1 Isolation primärer humaner Keratinozyten**

Das Praeputium muss zunächst aus dem Transportmedium in eine sterile Petrischale überführt und zweimal mit PBS<sup>+</sup> gespült werden. Anschließend sind Blutreste, sowie Fett- und andere Gewebereste zu entfernen und die Gewebestücke erneut 2-mal mit PBS<sup>+</sup> zu spülen. Anschließend wird das Biopsat in kleine Stücke zerteilt, mit 2,0 U/ml Dispase-Lösung überschichtet und bei 4°C über Nacht verdaut. Am nächsten Tag lassen sich die Epidermis und Dermis voneinander trennen. Aus dem epidermalen Anteil werden die Keratinozyten isoliert, aus dem dermalen Anteil die Fibroblasten (vgl. 3.1.2).

Zur Isolation der Keratinozyten wird die Epidermis in einer separaten Petrischale gesammelt, sehr klein zerhackt und mit einer Trypsin/EDTA-Lösung für 18 min im Brutschrank inkubiert. Die Enzymreaktion anschließend mit FCS abstoppen, gut resuspendieren, um die Zellen zu vereinzeln und 5 min bei 1000 rpm zentrifugieren, den Überstand verwerfen, das Pellet je nach Größe mit KBMr resuspendieren und in einer entsprechenden Zellkulturflasche aussäen.

#### **3.1.2 Isolation primärer humaner Fibroblasten**

Zur Isolation der Fibroblasten wird der dermale Anteil des Praeputiums verwendet. Die Dermisstücke werden nach dem Verdau mit Dispase (vgl. 3.1.1) in einer separaten Petrischale gesammelt, zerkleinert und mit einer 500 U/ml Kollagenase-Lösung für 45 min bei im Brutschrank inkubiert. Die Zellsuspension gut resuspendieren, um die Zellen zu vereinzeln und dann 5 min bei 1000 rpm zentrifugieren. Den Überstand verwerfen und das Pellet einmal mit DMEM-Medium waschen, erneut zentrifugieren und das Pellet anschließend in einer entsprechenden Zellkulturflasche aussäen.

#### **3.1.3 Isolation primärer humaner Trachea-Epithelzellen**

Die Isolation primärer humaner Trachea-Epithelzellen erfolgt aus Trachea- und Bronchus-Biopsaten mittels einer Auswaxmethode. Dazu werden 6-Well Platten



mit 500 µg/ml Kollagen Typ 1 aus der Ratte beschichtet. Nach Erhalt der Biopsate werden diese zunächst mit MEM gewaschen, mit einem Skalpell eröffnet und das respiratorische Epithel mit einer Pinzette abgezogen. Das Epithel wird anschließend mit einem Skalpell in kleine Stücke (ca. 2 mm<sup>2</sup>) zerteilt und in die beschichteten Wells der Zellkulturplatte gesetzt. Nach kurzem Antrocknen der Gewebestücke werden sie vorsichtig mit dem Trachea-Epithelzellmedium betropft. Alle 3 bis 4 Tage wird ein Medienwechsel durchgeführt und die Gewebestücke nach 7 Tagen entfernt. Nach 14 bis 21 Tagen bilden die Zellen in den Wells einen konfluenten Monolayer und können für Versuche verwendet werden.

## **3.2 Kultivierung der Zellen**

### **3.2.1 Steriles Arbeiten an einer Laminar-Flow**

Alle Zellkulturarbeiten sind steril unter einer Laminar-Flow-Werkbank vorzunehmen. Die Zellkulturansätze werden bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Je nach Zellart ist 1- bis 2-mal pro Woche eine mikroskopische Kontrolle, in deren Rahmen das Kultivierungsmedium gewechselt wird, durchzuführen. Wenn die Monolayer-Kultur, je nach Zellart, zu 70 – 90 % konfluent gewachsen ist, ist eine Subkultivierung durchzuführen.

### **3.2.2 Subkultivierung der Zellen**

Die Subkultivierung wird an die unterschiedlichen Zelltypen angepasst:

#### **Keratinocyten, Trachea-Epithelzellen, HBE und FHTE**

Die Subkultivierung wird bei 70 - 80%iger Konfluenz durchgeführt. Der Zelllayer wird 2-mal mit PBS/EDTA überschichtet und für jeweils 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird 0,25% ige Trypsin/EDTA zugegeben und die Zellen für 1 - 3 min bei 37°C inkubiert (dieser Schritt kann bei Trachea-Epithelzellen auch weggelassen, wenn sich die Zellen bereits vollständig gelöst haben). Der enzymatische Ablösevorgang wird unter dem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert und kann u. U. durch vorsichtiges Klopfen am Flaschenboden beschleunigt werden.

Die Trypsin/EDTA-Reaktion ist durch die Zugabe von 1 % FCS abzustoppen. Die Zellen können anschließend abgenommen, in einem Falcon-Röhrchen gesammelt

und bei 1000 rpm für 5 min pelletiert werden. Zuvor sind 100 µl Zellsuspension für die Zellzählung im Casy-Partikelzählgerät einzusetzen. Das durch die Zentrifugation gewonnene Zellpellet wird in einer entsprechenden Menge Zellkulturmedium aufgenommen und  $10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> in eine Zellkulturflasche ausgesät.

### **Fibroblasten, HaCaT und Calu-3**

Der Zelllayer wird 1-mal mit PBS/EDTA gewaschen und anschließend mit einer 0,25% igen Trypsin/EDTA-Lösung für 3 min bei 37°C inkubiert. Der enzymatische Ablösevorgang wird unter dem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert und kann u. U. durch vorsichtiges Klopfen am Flaschenboden beschleunigt werden. Das Abstoppen des Ablöseprozesses erfolgt durch die Zugabe von 1 % FCS. Die Zellsuspension wird in einem Falcon-Röhrchen gesammelt und 100 µl davon für die Zellzählung am Casy eingesetzt. Die Zellsuspension ist bei 1000 rpm für 5 min zu zentrifugieren. Das Zellpellet ist im entsprechenden Zellkulturmedium zu resuspendieren und die Zellen in einer Konzentration von  $4 \times 10^5$  Zellen/ml auszusäen.

### **3.2.3 Zellzählung und Vitalitätstest**

Aus der Zellsuspension werden 100 µl entnommen und mit 10 ml Casyton<sup>®</sup> (isotone Elektrolytlösung) in einem Casy-Zählröhrchen verdünnt.

Die Zellzählung erfolgte elektronisch nach dem Widerstandsprinzip mit dem Zellzählgerät CASY 1, dies geschieht über eine Messkapillare. Sobald eine Zelle in die Messkapillare eindringt, entsteht ein elektrischer Puls über die Widerstandsänderung. Die entstandenen Impulse sind nach Größe differenziert, dabei ist die jeweilige Pulsfläche zum Zellvolumen proportional. Die angegebene Größenverteilung bietet wichtige Informationen über den Zustand der gemessenen Zellen, da sowohl zwischen Zelltrümmern als auch zwischen toten und vitalen Zellen unterschieden werden kann. Gemessen werden jeweils 3 x 400 µl der Zellsuspension. Daraus ist der Mittelwert zu berechnen. Die entsprechende Verdünnung ist jeweils in das Ergebnis mit einzubeziehen.

### 3.3 Herstellung des Kollagen-Trägermaterials

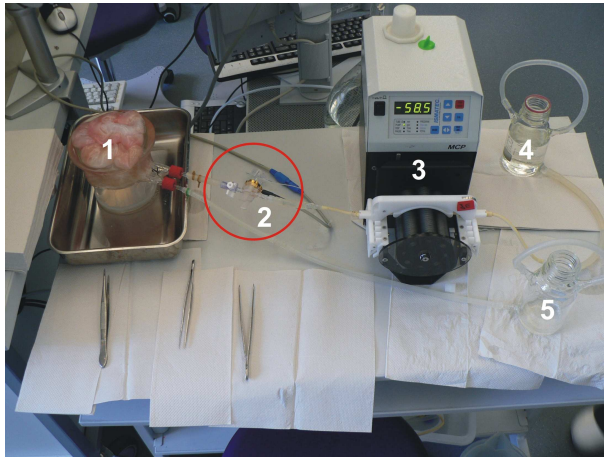
#### 3.3.1 Gewinnung von Kollagen Typ 1 aus dem Rattenschwanz

Zur Gewinnung des Kollagen Typ 1 werden Rattenschwänze verwendet. Dazu müssen die Rattenschwänze zunächst mit 70%igem Ethanol desinfiziert, anschließend die Sehnenfasern herauspräpariert und mit Essigsäure bei 4 - 8°C für 5 - 7 Tage gelöst werden. Anschließend wird die Konzentration des Kollagens auf 6 mg/ml eingestellt.

Das Kollagen wurde freundlicherweise von Herrn Schandar und Frau Mester zur Verfügung gestellt, die die Isolation regelmäßig durchführen.

#### 3.3.2 Herstellung der azellularisierten Kollagenmatrix (BioVaSc) aus dem Schweinedünndarm

Zur Explantation der BioVaSc (**B**iological **V**ascularized **S**caffold) werden deutsche Landrasseschweine von 15 - 25 kg eingesetzt. Die Tiere werden heparinisiert und unmittelbar vor der Explantation durch eine Überdosis Narkotika getötet. Dann sind Darmabschnitte im Bereich zwischen Jejunum und Duodenum mit sichtbarer Arterie und Vene frei zu präparieren und die Blutgefäße mit Braunülen zu versehen. Das versorgte Darmsegment muss mit einer 0,9%igen NaCl-Lösung gespült und anschließend das Darmlumen und weitere abführende Gefäße so abgebunden werden, dass ein ca. 50 - 80 cm langes Stück mit erhaltenem Gefäßsystem, arteriellem Zufluss und venösem Rückfluss, verbleibt. Der Transport der BioVaSc erfolgt in einem verschlossenen Plastikbehälter auf Eis in PBS<sup>-</sup> mit 1 % Gentamycin. Die Azellularisierung sollte am Tag der OP erfolgen, spätestens aber einen Tag danach, dann ist eine ausreichende Spülung der BioVaSc mit PBS<sup>-</sup> im Anschluss an die Explantation durchzuführen.



**Abbildung 8** Aufbau des Pumpsystems zur Azellularisierung der BioVaSc.

- (1) BioVaSc ist in einem Glasgefäß durch die Braunülen an das Pumpsystem angeschlossen
- (2) Drucksensor zur Regulation des Pumpdrucks
- (3) Rollerpumpe
- (4) Vorratsgefäß für die Azellularisierungslösung
- (5) Abfallgefäß für die abfließende Azellularisierungslösung

Derselbe Aufbau wird auch für die anschließenden Spülvorgänge verwendet.

Vor der Azellularisierung ist die BioVaSc mit PBS<sup>-</sup> ausreichend zu spülen, um Blut- und Kotreste zu entfernen. Anschließend erfolgt die Spülung des Darmsegments mit Natriumdesoxycholat über die Braunülen. Insgesamt wird mit einem Volumen von 2 l bei einem Perfusionsdruck von 80 - 100 mmHg gespült, wobei auch etwas Lösung in das Darmlumen gegeben werden muss, um auch hier eine optimale Zelllyse zu gewährleisten. Nach der Azellularisierung ist die BioVaSc mit mindestens 5 Litern einer 0,9%igen NaCl-Lösung und dann mit 4 l PBS<sup>-</sup> zu spülen. Auch bei den anschließenden Spülvorgängen muss ein Perfusionsdruck von 80 - 100 mmHg eingehalten werden.



**Abbildung 9** (A) Schweinedünndarm vor dem Azellularisierungsvorgang, (B) Schweinedünndarm während der Azellularisierung, die Braunülen wurden an ein Schlauchsystem angeschlossen, welches das Natriumdesoxycholat kontinuierlich mit gleich bleibendem Druck durch die Gefäße pumpt, (C) Darmmatrix nach der Azellularisierung (BioVaSc), alle porcinen Zellen wurden entfernt, übrig bleibt ein weißes Kollagengerüst.

Nach den abschließenden Spülvorgängen erscheint die verbliebene Darmmatrix weiß, die Serosa kann nun abgezogen und die Blutgefäße können abgetrennt

werden. Die azellularisierte BioVaSc ist dann in kleinere Stücke zu zerteilen und bei 4°C in sterilem PBS<sup>-</sup> auf einem Schüttler zu waschen. Dabei ist das PBS<sup>-</sup> alle 4 - 8h auszutauschen. Im Anschluss muss die BioVaSc in frisches steriles PBS<sup>-</sup> überführt und über Nacht bei 25kGray sterilisiert werden. Nach der Gamma-Sterilisation und der Überführung in frisches steriles PBS<sup>-</sup> lässt sich die Kollagenmatrix bei 4°C lagern.

### **3.4 Aufbau der dreidimensionalen Modelle**

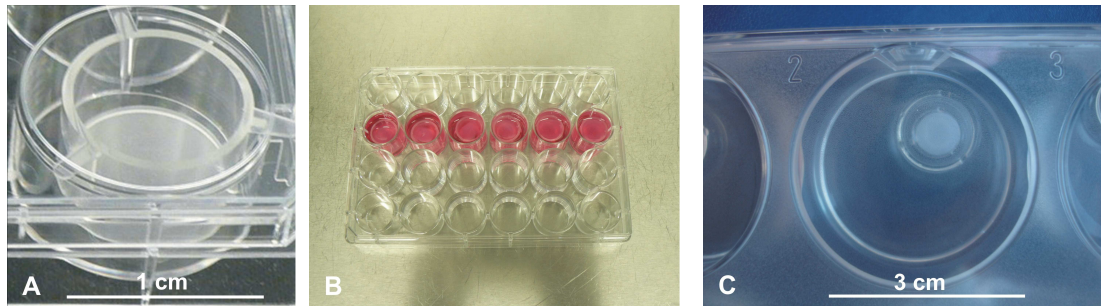
Für die Durchführung der Toxizitäts- und Biokompatibilitätstests wurden dreidimensionale Gewebemodelle eingesetzt. Diese wurden aus einem entsprechenden Trägermaterial und den entsprechenden Zellen aufgebaut und unter gewebetypischen Bedingungen kultiviert.

#### **3.4.1 Aufbau des 3D-Hautmodells**

Das Hautmodell ist aus primären Fibroblasten in einer Typ 1-Kollagenmatrix und darauf ausgesäten primären Keratinozyten aufgebaut. Das zu verwendende Kollagen und die Gelneutralisationslösung werden in Falcon-Röhrchen vorgelegt und auf Eis gestellt.

Die Fibroblasten sind wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben abzulösen und die Zellen einer Konzentration von 80 000 Zellen/400 µl Gelgießlösung zu resuspendieren, die Gelgießlösung setzt sich dabei 2:1 aus Kollagen-Typ 1 und der Gelneutralisationslösung zusammen. Mit Hilfe einer Multistep-Pipette werden zügig und luftblasenfrei jeweils 400 µl in die Inserts einer 24-Well Platte gegossen. Anschließend erfolgt eine Inkubation der Gele für 10 min im Brutschrank, um die Gele gelieren zu lassen. Nach dem Ausgelieren wird jedes Well mit 1,5 ml DMEM mit 10 % FCS versetzt und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag ist das Medium vorsichtig abzusaugen und jedes Gel mit 25 µl Fibronectin zu beschichten. Die Gele müssen dann erneut für 30 min im Brutschrank inkubiert werden. Während dieser Zeit erfolgt das Ablösen der Keratinozyten, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben. Pro Gel werden  $1 \times 10^5$  Zellen aufgesät, dazu sind die Keratinozyten in KBMr-Medium mit 5 % FCS zu resuspendieren. Nach anschließender Inkubation der Gele im Brutschrank für 45 min werden diese mit demselben Medium submers gesetzt, d.h. die Gele werden vollständig mit Medium bedeckt. Innerhalb von 6 - 7 Tagen wird die Konzentration des FCS im Medium von 5 % auf 0 % reduziert. Nach dieser Zeit sind die Gele luftexponiert (Airlift-

Kultivierung) weiterzukultivieren und können nach 14 - 16 Tagen für Versuche verwendet werden. Um den korrekten Aufbau der Hautgele zu gewährleisten, ist nach 9 Tagen Airlift-Kultivierung ein Gel mit Histofix zu fixieren, in Paraffin einzubetten und der fertige Schnitt mit Hämalaun/Eosin zu färben.

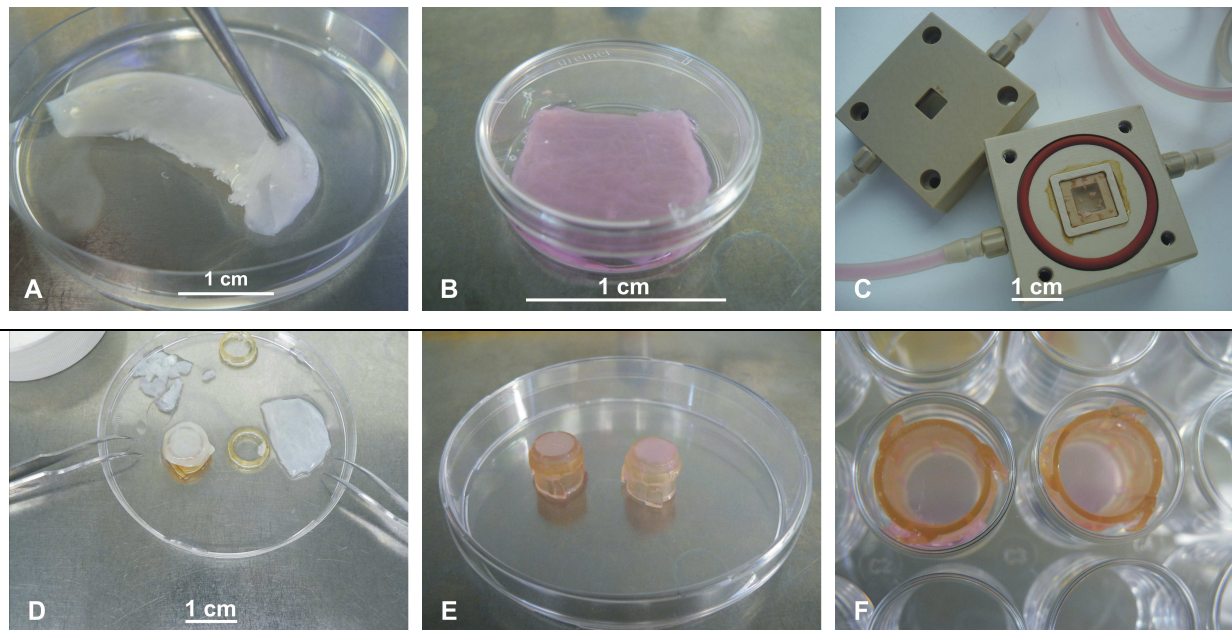


**Abbildung 10** Kultivierung der 3D-Hautmodelle in 24-Well Inserts: (A) verwendete PET-Inserts, (B) Hautgele bei submerser Kultivierung, d.h. sie sind noch vollständig mit Medium überdeckt, um die Proliferation der Keratinozyten zu gewährleisten, (C) Hautgel bei der Airlift-Kultivierung, die Gele erhalten nur noch von basal Medium, apikal hat das Hautmodell Luftkontakt, damit die Keratinozyten differenzieren und eine Hornschicht ausbilden können.

### 3.4.2 Aufbau des 3D-Tracheamodells

Zum Aufbau des Tracheamodells werden die Zellen auf die azellularisierte BioVaSc aufgesiedelt. Dazu sind die azellularisierten und sterilen Darmstücke zuvor in dem entsprechenden Medium zu inkubieren, um die Adhäsion von Proteinen aus dem Zellkulturmedium an der Kollagenmatrix zu gewährleisten. Sowohl bei der Insert- als auch bei der Matrixbesiedelung werden pro  $\text{cm}^2$  Fläche jeweils 500 000 primäre Fibroblasten und  $1 \times 10^6$  primäre Trachea-Epithelzellen oder maximal 500 000 Calu-3 Zellen ausgesät. Die Fibroblasten sind wie in 3.2.2 beschrieben abzulösen und in maximal 100  $\mu\text{l}$  Medium auf die Lumenseite der zugeschnittenen BioVaSc aufzusäen. Anschließend sind die Zellen für 24 h im Brutschrank zu inkubieren.





**Abbildung 11** (A) Azellularisierte BioVaSc vor der Besiedelung mit Zellen, (B) mit Fibroblasten besiedelte BioVaSc zur dynamischen Kultivierung im Bioreaktor. Die rötliche Farbe der BioVaSc entsteht durch den Farbstoff Phenolrot, der dem Fibroblastenmedium zugesetzt ist. (C) Bioreaktor zum Aufbau des dreidimensionalen Tracheamodells, die BioVaSc wird mit einem kleinen Rahmen eingespannt, (D) eingespannte BioVaSc in Zellkronen zur statischen Kultivierung des Tracheamodells, (E) bereits eingespannte und mit Fibroblasten besiedelte BioVaSc in Zellkronen, (F) statische Kultivierung der Zellkronen in einer 24-Well Platte, die Zellen erhalten basolateral Medium und haben apikalen Luftkontakt.

Nach 24 h Inkubation wird die Matrix, bzw. das Insert umgedreht und die Oberseite mit den Trachea-Epithelzellen oder Calu-3 Zellen besiedelt. Anschließend ist nochmals eine statische Kultivierung bei 37°C im Brutschrank für 24 h durchzuführen. Während die Inserts nach diesem Kultivierungsschritt auch weiterhin statisch kultiviert werden, ist die BioVaSc in den sterilen Trachea-Bioreaktor zu überführen und unter dynamischen Bedingungen zu kultivieren.

Die Drehzahl der Pumpe für die Luftzufuhr sollte dabei auf 28,7 U/min alternierend eingestellt sein, das entspricht einer Frequenz von 0,1 Hz und 0,6 V. Die Pumpendrehzahl für den Medienkreislauf ist auf 5 U/min einzustellen.

### 3.5 Herstellung der Nanopartikel-Dispersion

Für die Untersuchung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen müssen die Nanopartikel in einer bestimmten Konzentration auf die Zellen, bzw. die Gewebemodelle aufgetragen werden. Dazu sind Dispersionen der Nanopartikel mit DMEM und 10%igem FCS nach folgendem Protokoll herzustellen:

**Tabelle 17** Einzelne Arbeitsschritte zur Herstellung der Nanopartikel-Dispersionen

<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Bemerkung</b>
Einwiegen von jeweils 5 mg Probenmaterial in ein Probengefäß aus Glas	Das Probenmaterial ist elektrostatisch, daher möglichst vorsichtig in die Gläschen einfüllen, um Staubbildung zu vermeiden.
Probengefäße mit Alufolie verschließen Im Hitzesterilisationsschrank bei 160°C trockener Hitze für mindestens 3 h, am besten aber über Nacht	Weißer Schraubdeckel der Probengefäße müssen separat autoklaviert werden (im Dampfsterilisator bei 2 bar für 25 min)
Abkühlen der Proben	
Zugabe von jeweils 10 ml Dispergierungsmittel (DMEM + 10% FCS)	Das Dispergierungsmittel schon vorher komplett ansetzen (wichtig: die entsprechende Charge FCS wegen der Vergleichbarkeit verwenden) Ab hier müssen die Proben unter der Sterilbank weiterverarbeitet werden.
Zur Homogenisierung der Referenzproben, werden Blausasbestfasern für 30 Sekunden mit dem Ultrathruax zerkleinert	Die Aufsätze für den Ultrathruax müssen vor der Verwendung mit 70%igem Ethanol sterilisiert werden.
Alle Probengefäße anschließend mit den weißen Schraubdeckeln verschließen und 2 Mal für 15 min im Ultraschallbad behandeln.	Die Gläschen so einspannen, dass sie keinen Kontakt zum Gefäßrand des Ultraschallbads haben und ein Drittel des Probengefäßes im Wasser liegt. Wasserbad bezüglich der Temperatur zwischen den Ultraschallbehandlungen kontrollieren, ggf. mit Eis kühlen.

Nach den Dispergierungsschritten können die sterilen Proben in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 2 - 8°C gelagert werden, die Konzentration pro Probe beträgt 500 µg/ml.



### **3.5.1 Durchführung nanotoxikologischer Versuche an Monolayerkulturen in Inserts**

Zur Untersuchung freigesetzter Entzündungsmediatoren werden primäre Keratinozyten und HaCaT-Zellen in Inserts ausgesät, um eine Trennung der apikal zugegebenen Nanopartikel und der basal abgenommenen Medienprobe zu erreichen. Es sind 12-Well Inserts einzusetzen, auf die jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen ausgesät und für 24 h bei 37°C bis zur Verwendung für den Versuch inkubiert werden. Vor dem Versuch muss das Zellkulturmedium basal mit 500 µl frischem Medium erneuert und das Zellkulturmedium apikal komplett entfernt werden. Die zu testenden Nanopartikelpulver sind mit einer Pasteurpipette apikal direkt auf die Zellen aufzustäuben. Von den Dispersionen und Referenzsubstanzen in Lösung werden jeweils 200 µl apikal auf die Zellen aufgetragen. Zu untersuchen sind Dispersionen und Pulver von Carbon Black, Carbon Nanotubes und Titandioxid. Eingesetzte Negativkontrollen sind die jeweils eingesetzten Zellkulturmedien, Keratinozytenbasalmedium und das DMEM mit 10%igem FCS, Positivkontrolle stellt 0,1%iges SDS dar.

Alle Proben sind bei 37°C für 24 h bis 48 h zu inkubieren, anschließend ist basal eine Probe des Zellkulturmediums von 150 µl zu ziehen und bis zur weiteren Untersuchung bei -20°C zu lagern. Die Zellen werden mit Histofix für 30 min fixiert, in Paraffin eingebettet und Schnitte sowie Übersichtsfärbungen mit Hämalaun/Eosin angefertigt.

### **3.5.2 Durchführung nanotoxikologischer Versuche an Monolayerkulturen in Well-Platten**

Für die Untersuchungen des nanotoxikologischen Effekts durch die Genexpressionsanalyse werden die primären Keratinozyten in einer Zelldichte von  $2 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung in eine 12-Well Platte ausgesät. Bei einer Konfluenz von 80 – 90 % können die Kulturen für die Versuche eingesetzt werden. Das Medium ist dafür abzunehmen und durch jeweils 500 µl der zu untersuchenden Dispersion und zusätzlich 500 µl frischem Zellkulturmedium zu ersetzen. Die eingesetzten Proben und Inkubationszeiten entsprechen denen aus den Versuchen mit Monolayerkulturen in Inserts.

### 3.5.3 Durchführung nanotoxikologischer Versuche an 3D-Gewebe- modellen

Zur Untersuchung der Toxizität von Nanopartikeln an den 3D-Gewebe-  
modellen, werden pro Modell jeweils 50 µl der zu testenden Dispersionen und  
Referenzsubstanzen mit einer Eppendorfpipette aufgetropft. Die Nanomaterialpulver  
sind wie auch in den Monolayerversuchen mit einer Pasteurpipette aufzustäuben. Die  
Inkubation ist für 24 h bis 48 h bei 37°C durchzuführen.

## 3.6 Charakterisierung der Zellen mittels Immunhistochemie

### 3.6.1 Herstellung von Paraffinschnitten

Nach der Versuchsdurchführung, sowie zur Kontrolle des Modellaufbaus ist zu  
verschiedenen Zeitpunkten die Fixierung von Haut- und Tracheamodellen  
durchzuführen. Die Zellmodelle werden dazu aus den Zellkulturplatten, bzw. den  
Bioreaktoren genommen und in einer separaten Platte mit Histofix für minimal 1 h bei  
RT fixiert und anschließend 2 - 6 h in Leitungswasser gewässert. Das Einbetten der  
Proben erfolgt anschließend in einem Einbettautomaten (Tabelle 18).

**Tabelle 18** Programm des Einbettautomaten

<b>Lösung</b>	<b>Zeit [h]</b>
Leitungswasser I	1
Leitungswasser II	1
70% Ethanol (v/v)%	1
90% Ethanol (v/v)%	1
96% Ethanol (v/v)%	1
Isopropanol I	1
Isopropanol II	1
Xylol/Isopropanol 1:1	1
Xylol I	1
Xylol II	1
Flüssiges Paraffin I	3
Flüssiges Paraffin II	3

Nach dem Einbetten müssen die Proben in flüssigem Paraffin in Metallschalen geblockt und anschließend mit dem Mikrotom in 3 µm dünnen Schnitten auf Glasobjektträger gezogen werden. Vor der Verwendung der Schnitte für eine histologische oder immunhistologische Färbung ist eine Entparaffinierung durchzuführen (Tabelle 19), um die entsprechenden Bindungsstellen der Zellen für die Farbstoffe oder Antikörper frei zu legen. Vor dem Beginn der Entparaffinierung sind die Objektträger für 30 min bei 60°C zu lagern, um ein Schmelzen des Paraffins zu bewirken.

**Tabelle 19** Die einzelnen Schritte der Entparaffinierung

<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Zeit [min]</b>
Roticlear I	10
Roticlear II	3
96% Ethanol I	2
96% Ethanol II	2
70% Ethanol	2
50% Ethanol	2

### **3.6.2 Herstellen von Cytospots**

Zur Herstellung von Cytospots werden die Zellen zuerst, wie in 3.2.2 beschrieben, passagiert und gezählt. Dann erfolgt die Herstellung einer Verdünnung mit PBS<sup>-</sup>, je nach Zelltyp ist eine Konzentration von ca.10 000 - 100.000 Zellen/ml einzustellen. Je 200 µl davon werden in eine Shandon Cytospotapparatur mit Objektträger (OT), Cytofunnel und Filterkarte eingefüllt und im Cytospin bei 500 U/min für 10 min zentrifugiert. Die fertigen Spots lassen sich nach 30 min Lufttrocknung bei -20°C lagern.

### **3.6.3 Kultivierung und Fixierung von Zellen in Chamber slides**

Für den Nachweis von Zell-Zell-Kontakten wurden 5 000 – 10 000 Zellen pro Kammer in 8-Well Glas-Chamber slides ausgesät und nach 3 – 4 Tagen Kultivierung fixiert. Das Zellkulturmedium ist dazu vorher abzunehmen und durch eine 1:1 Mischung Aceton/Ethanol zu ersetzen. Die Zellen werden anschließend für 5 min bei

RT fixiert, das Fixierreagenz abgenommen und die slides entweder direkt gefärbt oder in Alufolie eingeschlagen bei -20°C aufbewahrt.

### **3.6.4 Antikörperfärbung**

Bei der Antikörperfärbung können gezielt spezifische Zellstrukturen nachgewiesen werden. Die Zellen lassen sich somit eindeutig charakterisieren und auf bestimmte funktionelle Zellbestandteile, auf ihre Differenzierung oder Zellkontakte hin untersuchen. Die Antikörperfärbung wird mit dem EnVision Kit von Dako an fixierten Zellen, bzw. Gewebeschnitten durchgeführt. Ein Primärantikörper bindet dabei spezifisch an Antigene der Zellen. Anschließend wird ein Sekundärantikörper zugegeben, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist und an diesen bindet. Durch nachfolgende Zugabe eines Chromogens kommt es zu einem Farbumschlag, der die Antikörperbindung sichtbar macht. Eine Gegenfärbung der Zellkerne kann, je nach Antikörperfärbung, mit einem Fluoreszenzfarbstoff mit 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) oder bei einer Färbung mit Meerrettich-Peroxidase (Horse radish peroxidase, HRP) mit Hämalaun durchgeführt werden.

Je nach Antikörper ist eine Demaskierung der Epitope vorzunehmen, d.h. zunächst müssen Paraffinschnitte nach Tabelle 19 entparaffiniert und anschließend evtl. nochmals im Dampfgarer hitzebehandelt werden, um die Epitope freizulegen. Diese Behandlungsschritte variieren je nach Antikörper und sind in den einzelnen Datenblättern angegeben. Alle Antikörper wurden vor der Verwendung an den Gewebemodellen an Schnitten der nativen Gewebe getestet.

**Tabelle 20** Einzelne Schritte der Antikörperfärbung mit dem Dako EnVision System

<b>Lösung</b>	<b>Zeit [min]</b>	<b>Bemerkung</b>
Peroxidase Blocker	5	Blocken unspezifischer Bindungsstellen
Waschpuffer	2	Spülen
Primärantikörper (ca. 50 µl/Schnitt)	30-60	Spezifische Bindung des ersten Antikörpers
Waschpuffer	3x2	Spülen
HRP gekoppelter Sekundärantikörper	30	Bindung des zweiten Antikörpers
Waschpuffer	3x2	Spülen
Chromogen Substratpuffer (mit verdünnt)	5 (mit 1/50)	Färbung
H <sub>2</sub> O dest.	1	Spülen
Hämalaun	kurz	Gegenfärbung
H <sub>2</sub> O dest.	-	Unter fließendem Wasser spülen, bis Wasser klar ist
Leitungswasser	5	Bläuen
70% Ethanol	kurz	Entwässern
96% Ethanol	2	Entwässern
96% Ethanol	2	Entwässern
Isopropanol I	5	Entwässern
Isopropanol II	5	Entwässern

Alle Schritte sind bei Raumtemperatur (RT) durchzuführen. Für die Inkubation der Peroxidase und der Antikörper sind die Objektträger jeweils in eine feuchte Kammer zu legen. Anschließend können die Schnitte mit Isomount® und einem Deckglas eingedeckt werden.

### 3.6.5 Messung von Entzündungsmarkern mittels eines Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) und FlowCytomix

Die Menge an gebildeten Entzündungsmarkern, bzw. Zytokinen, die in Stresssituationen von den Zellen produziert und ausgeschüttet werden, kann in den Zellkulturüberständen mittels ELISA bestimmt werden. Hierzu werden 96-Well Platten verwendet, die mit den jeweiligen Antikörpern beschichtet sind, welche die entsprechenden Antigene aus dem Überstand binden können. Nach dem Abwaschen nicht gebundener Proteine wird ein Sekundär-Antikörper aufgetragen,

der wiederum an das Antigen bindet. Der Sekundär-Antikörper ist mit einem Enzym gekoppelt, welches anschließend ein zugegebenes Chromogen in ein farbiges Endprodukt umsetzt.

Die zu testenden Zellkulturüberstände werden den Zellkulturen und organotypischen Kulturen bei den jeweiligen Versuchen nach 24 h und 48 h entnommen und bei -20°C eingefroren. Zum einen wurden für den Nachweis von IL-1alpha, IL-1beta, IL-4, IL-6 und IL-8 Instant-ELISA-Kits der Firma BenderMed, aber auch Ready-SET-Go-Kits der Firma eBioscience verwendet.

Desweiteren wurde auch mit einem Multiplex-System der Firma BenderMed gearbeitet. Mit diesem System können gleichzeitig verschiedene Interleukine über FACS gemessen werden. Das Testprinzip entspricht dabei dem eines herkömmlichen Sandwich-ELISA, mit der Ausnahme, dass sich die zu testenden Antigene an Kugeln mit den entsprechenden Antikörpern binden. Diese können später über ihre Größe und Fluoreszenz im FACS gemessen werden. Die Durchführung des Tests findet auch in einer speziellen 96-Well Platte statt. Am Ende des Tests werden die einzelnen Proben in FACS-Röhrchen überführt und gemessen.

### **3.6.6 Durchführung des Laktat-Dehydrogenase (LDH)-Assays**

Das Absterben von Zellen in einer Kultur kann über eine Quantifizierung der Membranschädigung bestimmt werden. Dabei lässt sich die Konzentration des zytosolischen Enzyms LDH im Medienüberstand messen. LDH ist ein ubiquitäres Enzym, welches bei Membranschädigung sofort ins Kulturmedium abgegeben wird. Die gemessene Enzymaktivität im Medium ist direkt proportional zu der Anzahl der lysierten Zellen. Das LDH kann dabei im Zellkulturmedium über zwei Enzymreaktionen gemessen werden. Im ersten Schritt reduziert die freigesetzte Laktat-Dehydrogenase  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}/\text{H}^+$  durch die gleichzeitige Oxidation von Laktat zu Pyruvat. In der zweiten enzymatischen Reaktion werden über den Katalysator Diaphorase, 2 Protonen (H) von  $\text{NADH} + \text{H}^+$  auf das gelbe Tetrazolium-Salz INT (2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazolium Chlorid) übertragen. Dieser Schritt reduziert INT zu rotem Formazan, welches photometrisch gemessen werden kann.

Zur Untersuchung des LDH-Gehalts wurde der Cytotoxicity Detection Test der Firma Roche nach dem im Kit beiliegenden Protokoll durchgeführt (2.6.1).

## 3.7 Charakterisierung der Zellen mittels histologischer Färbungen

### 3.7.1 Hämalaun-Eosin-Färbung

Zur Übersichtsdarstellung von Schnitten aus den aufgebauten Gewebeäquivalenten wird eine Hämatoxylin-Eosin Färbung durchgeführt. Der Farbstoff Hämalaun wird aus natürlichem Hämatoxylin hergestellt. Hämalaun färbt alle sauren, bzw. basophilen Moleküle (Zellkerne, DNA, raues Endoplasmatisches Retikulum) blau an, alle basischen, bzw. acidophile Strukturen (Zellplasmaproteine) werden dagegen rot angefärbt. Die Objektträger mit Paraffinschnitten müssen zunächst, wie in Tabelle 19 beschrieben, entparaffiniert werden.

**Tabelle 21** Einzelne Arbeitsschritte der Hämalaun-Eosin Färbung

Lösung	Zeit [min]	Bemerkung
Hämalaun	8	Färben
H <sub>2</sub> O bidest.	3	Überschüssige Färbelösung entfernen
HCl-Alkohol	0,5	Differenzieren
H <sub>2</sub> O bidest.	1	Spülen
Warmes Leitungswasser	5	Bläuen
Eosin	1	Gegenfärben der Kerne
H <sub>2</sub> O bidest.	3	Überschüssige Färbelösung entfernen
70% Ethanol	1	Differenzieren
96% Ethanol	2	Entwässern
96% Ethanol	2	Entwässern
Isopropanol I	5	Entwässern
Isopropanol II	5	Entwässern

Anschließend können die Schnitte mit Isomount® und einem Deckglas eingedeckt werden.

### 3.7.2 Movat-Pentachromfärbung

Zur Herstellung von Übersichtsschnitten nativer humaner Trachea wurde mit Paraffinschnitten dieses Gewebes eine Movat-Pentachromfärbung durchgeführt. Zellkerne sind anschließend blauschwarz, das Zytoplasma rot, Kollagen gelb, mineralisiertes Knorpelgewebe blau-grün, saure Glykosaminglykane hellblau und

Muskelgewebe orange eingefärbt. Die Objektträger mit Paraffinschnitten müssen zunächst, wie in Tabelle 19 beschrieben, entparaffiniert werden.

**Tabelle 22** Einzelne Arbeitsschritte der Movat-Pentachromfärbung

<b>Lösung</b>	<b>Zeit [min]</b>	<b>Bemerkung</b>
Alcianblau	10	Färben
H <sub>2</sub> O bidest.	5	Spülen, hydratisieren
Alkalischer Alkohol	60	Fixierung des Alcianblau
H <sub>2</sub> O bidest.	5	Spülen unter fließendem Wasser
Eisenhämatoxylin	10	Färben
H <sub>2</sub> O bidest.	1	Spülen unter fließendem Wasser
Leitungswasser	15	Wässern
Brilliant Crocein Säure- fuchsin	30	Färben
0,5% Essigsäure	kurz	Spülen
5% Phosphorwolframsäure	15	Differenzieren
0,5% Essigsäure	5	Spülen (OT leicht schwenken)
96% Ethanol	2x5	Spülen
Saffron du Gatinais	60	Färben
70% Ethanol	1	Entwässern
96% Ethanol	2	Entwässern
96% Ethanol	2	Entwässern
Isopropanol I	5	Entwässern
Isopropanol II	5	Entwässern

Anschließend können die Schnitte mit Isomount® und einem Deckglas eingedeckt werden.

### 3.7.3 Alcianblau-Färbung

Mit der Alcianblau-Färbung lassen sich in histologischen Schnitten durch elektrostatische Wechselwirkungen des im Farbstoff enthaltenen Kupfers mit Mucopolysacchariden und Glucosaminoglykanen diese im Schnitt blau anfärben. Die Objektträger mit Paraffinschnitten müssen zunächst, wie in Tabelle 19 beschrieben, entparaffiniert werden.



**Tabelle 23** Einzelne Schritte der Alcianblau-Färbung bei pH 2,5

<b>Lösung</b>	<b>Zeit [min]</b>	<b>Bemerkung</b>
3% Essigsäure	3	Spülen
Alcianblau pH 2,5	30	Färben
3% Essigsäure	1	Spülen
H <sub>2</sub> O bidest.	1	Spülen
Kernechtrot	5	Färben
H <sub>2</sub> O bidest.	1	Spülen
96% Ethanol	2	Entwässern
96% Ethanol	2	Entwässern
Isopropanol I	5	Entwässern
Isopropanol II	5	Entwässern

Anschließend können die Schnitte mit Isomount® und einem Deckglas eingedeckt werden.

### 3.8 Fixierung von Gewebeschnitten für das Rasterelektronenmikroskop

Um Aufnahmen von Gewebeschnitten mit dem Rasterelektronenmikroskop machen zu können, müssen die Schnitte und Gewebestücke zuvor speziell entwässert werden. Paraffinschnitte sind zuvor zu entparaffinieren.

**Tabelle 24** Fixierungsschritte von Schnitten oder Geweben mit Glutardialdehyd für das REM

<b>Lösung</b>	<b>Zeit [min]</b>	<b>Bemerkung</b>
2,5%ige Glutardialdehydlösung	30 min - 8 h	Die Fixierungszeit der Probe variiert je nach Dicke des Gewebes/Schnittes
25 % Ethanol	5 min – 8 h	Auswaschen des Glutardialdehyd
50 % Ethanol	5 min – 8 h	Auswaschen des Glutardialdehyd
75 % Ethanol	5 min – 8 h	Auswaschen des Glutardialdehyd
96 % Ethanol	5 min – 8 h	Auswaschen des Glutardialdehyd

Anschließend die Proben lufttrocknen lassen.

### 3.9 Untersuchung des Hautmodells mittels Raman-Spektroskopie

Mit der Raman-Spektroskopie lassen sich Proben mit einer hohen Auflösung (unter 1  $\mu\text{m}$ ) charakterisieren. Zum einen findet diese Methode Anwendung im Bereich der Materialcharakterisierung, zum anderen wird sie aber immer mehr auch im Bereich der biologischen Anwendungen, wie der Untersuchung von Bakterien oder Zellen, eingesetzt. Durch die Wechselwirkung von eingestrahlttem Laserlicht mit Molekülen in einer Probe lassen sich durch die Frequenzverschiebung des zurückgestreuten Lichts (= Raman-Spektrum) einzelne Moleküle detektieren. Dabei ergeben sich für die einzelnen Moleküle charakteristische Fingerprints. Die Vorteile im Bereich der biologischen Anwendungen liegen in einer zerstörungsfreien und markerunabhängigen Methode, die auch zur Untersuchung von Hautmodellen in Kontakt mit Nanopartikeln versuchsweise eingesetzt wurde.

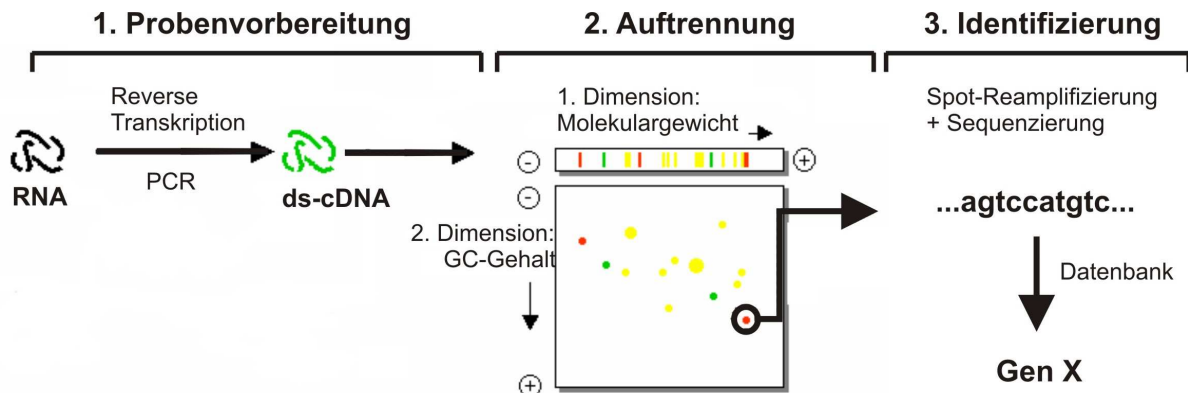
Die zu untersuchenden Substanzen werden mit einer Pasteurpipette auf die Hautgele aufgestäubt. Nach 24 h Inkubation der Gele im Brutschrank muss das Nanomaterial-Pulver mehrmals durch Spülen mit PBS<sup>-</sup> entfernt werden, dann sind die Gele aus den Inserts zu nehmen und auf einen Glasobjektträger zu setzen. Die Untersuchung im Raman-Spektroskop fanden mit einem 785 nm Diodenlaser statt und wurden freundlicherweise von Frau Dreiling durchgeführt.

### 3.10 Untersuchung möglicher toxischer Einflüsse mittels Genexpressionsanalyse

In Genexpressionsanalysen wird die genetische Information mit biochemischen und molekularbiologischen Methoden untersucht. Dabei können sowohl qualitative Aussagen über die Genaktivität als auch quantitative Aussagen über verschiedene Gene gemacht werden. Im Hinblick auf die Nanotoxizität besteht so die Möglichkeit, durch ein breites Screening an Genen, die Gene heraus zu filtern, die durch den Kontakt der Zellen mit den Nanopartikeln verstärkt oder vermindert reguliert werden.

Durch die am Fraunhofer IGB entwickelte **M**ultidimensional **E**lectrophoretic **S**ystem of **S**eparation for the **A**nalysis of **G**ene **E**xpression (=MESSAGE) Technologie [Lindemann 2006] ist es möglich, die differenzielle Genexpression in einem Genom zu untersuchen. Die Grundlage bildet dabei ein zweidimensionales Gelsystem, in

dem komplexe cDNA-Proben durch Gelelektrophorese hochauflösend getrennt werden.



**Abbildung 12** Prinzip der vergleichenden Genexpressionsanalyse MESSAGE (modifizierte Abbildung nach BIOSpektrum 2006)

Bereits 1 µg des zu untersuchenden Materials reicht aus, um zunächst doppelsträngige cDNA zu synthetisieren, die dann mittels der **Polymerase Chain Reaction (=PCR)** amplifiziert werden können. Anschließend wird eine zweidimensionale Gelelektrophorese durchgeführt. Hier wird in einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel zunächst die spezifische cDNA in der 1. Dimension nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. In einer zweiten Auftrennung erfolgt dann die Trennung nach dem GC-Gehalt, wobei das Gel einen zunehmenden Denaturierungsgrad aufweist. Anschließend lassen sich die Gele mit Fluoreszenzfarbstoffen, wie z.B. SYBR Gold anfärben und so cDNA-Fragmente in Form einzelner Spots visualisieren. Die Spots können gezielt gepickt, reamplifiziert und sequenziert werden; so lassen sich die Gene herausfiltern, die eine verstärkte oder verminderte Genexpression aufweisen (Abbildung 12).

Die Genexpressionsanalysen wurden im Rahmen einer von mir betreuten Masterarbeit durchgeführt.

### 3.10.1 Isolation der Gesamt-RNA aus Keratinozyten

Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgt mit dem RNeasy Mini Kit von Quiagen nach dem Isolationsprotokoll des Herstellers. Bei der Isolation der RNA aus dem Keratinozyten-Monolayer in einer 12-Well Zellkulturplatte sind die Zellen zunächst mit PBS<sup>-</sup> zu spülen und werden anschließend mit jeweils 350 µl RLT-Puffer und einem Zellschaber manuell abgelöst. Die Homogenisierung erfolgt durch mehrmaliges Auf-

und Abziehen einer Spritze mit Injektionsnadel (0,9 mm). Die Weiterverarbeitung ist, wie in Tabelle 25 beschrieben, durchzuführen. Wichtig ist die Verwendung von RNase freiem Wasser, um eine Denaturierung der RNA und DNA zu verhindern.

**Tabelle 25** Durchführung der Isolation von Gesamt-RNA nach dem Protokoll des Herstellers

<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Durchführung</b>
1	Lysat wird mit dem selben Volumen 70 % Ethanol vermischt
2	Lysat-Ethanol-Gemisch auf eine RNeasy Mini-Säule auftragen und für 15 Sekunden bei 8000 g zentrifugieren
3	Zugabe von 700 µl RW1 Puffer auf die Mini-Säule und erneutes Zentrifugieren für 15 Sekunden bei 8000 g
4	Waschen der Säule mit 500 µl RPE-Puffer, 15 Sekunden zentrifugieren bei 8000 g
5	Waschen der Säule mit 500 µl RPE-Puffer, 15 Sekunden zentrifugieren bei 8000 g
6	Elution der RNA mit 30 µl RNase freiem Wasser, 1 min zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit
7	Die eluierte RNA kann bei -80°C gelagert werden

### 3.10.2 Konzentrations- und Qualitätsbestimmung der Gesamt-RNA

Zur Konzentrations- und Qualitätsbestimmung der isolierten RNA wird der Bioanalyser 2100 von Agilent Technologies in Kombination mit dem RNA 6000 Nano Kit verwendet. Die Messung basiert auf der Kapillarelektrophorese, d.h., die Nukleinsäuren werden über Mikrofluidtechnik elektrophoretisch aufgetrennt. Die Durchführung des Tests erfolgt nach den Angaben des Herstellers, die Auswertung wird mit der 2100 Expert Software des Bioanalyzers durchgeführt.

### 3.10.3 Synthese der cDNA

Zunächst muss die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben werden. Dies erfolgt durch die sogenannte Erststrangsynthese mit einem modifizierten Protokoll des SMART™ cDNA Library Construction Kit von BD Bioscience. Hierfür werden 1 - 3 µl RNA eingesetzt, die RNA-Gesamtkonzentration muss 1 µg betragen. Die RNA wird mit jeweils 1 µl eines 10 µM SMART\_dM Primer und SMART\_T13\_VN versetzt und mit DEPC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 5 µl aufgefüllt. Zur Denaturierung der

RNA-Sekundärstruktur wird der Ansatz für 2 min bei 72°C auf einem Heizblock inkubiert und danach sofort auf Eis gestellt. Anschließend werden 2 µl 5 x Erststrang Puffer, 1 µl 100 mM DTT, 1 µl 10 mM dNTP-Mix und 1 µl des Enzyms PrimeScript Reverse Transkriptase zugegeben und der Ansatz vorsichtig gemischt. Die Enzymreaktion der Reversen Transkriptase erfolgt bei 42°C für 1 Stunde und wird durch die Überführung auf Eis abgestoppt. Nun kann die cDNA in einer Long Distance PCR (LD-PCR) zu einer Doppelstrang DNA (dsDNA) synthetisiert werden.

### 3.10.4 Synthese der dsDNA

Die Synthese der dsDNA wird unter der Verwendung des BD Advantage™ 2 Polymerase Mixes durchgeführt. Dieser besteht aus der Platinum™ Taq-DNA Polymerase in Kombination mit BD TaqStart™ Antikörper und der Proofreading Polymerase.

Der Ansatz für die LD-PCR setzt sich folgendermaßen zusammen:

**Tabelle 26** Ansatz für die LD-PCR

Lösung	Menge
Erststrang-cDNA	10 µl
H <sub>2</sub> O	72 µl
10 x Advantage 2 PCR Puffer	10 µl
dNTP-Mix (10mM)	2 µl
A2Sau3A-Primer (µM)	4 µl
50 x Advantage 2 Polymerase Mix	2 µl

Nach einer guten Durchmischung des Ansatzes kann dieser für die LD-PCR eingesetzt werden. Diese beginnt mit einem Heißstart und läuft nach dem Protokoll in Tabelle 27 ab.

**Tabelle 27** Protokoll der LD-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Bemerkung
1	95°C	20 sec	Denaturierung der Sekundärstruktur der Einzelstrang-cDNA (ss-cDNA) und der an die DNA gebundenen Antikörper
2	95°C	5 sec	
3	68°C	6 min	Hybridisierung der Oligonukleotide und Elongation der cDNA

Schritt 2 und 3 werden noch 4 Mal wiederholt, sodass genügend dsDNA synthetisiert wird.

### **3.10.5 Aufreinigung der DNA-Fragmente**

Die Aufreinigung der DNA-Fragmente ist mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach dem Protokoll des Herstellers durchzuführen.

### **3.10.6 Restriktionsverdau und Fällung der dsDNA**

Mit einem Restriktionsenzym kann die DNA an definierter Stelle geschnitten und die DNA-Fragmente dann weiter untersucht werden. Für den Restriktionsverdau wird hier das Enzym *RsaI* verwendet. In einem 120 µl Ansatz werden 90 µl des DNA-Eluats mit 12 µl 10 x NEB Puffer 1 µl und 12 µl 10 x BSA gemischt und nach der Zugabe von 30 U der Restriktionsendonuclease *RsaI* für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgt die Fällung der DNA durch die Zugabe von 0,1 Volumen Natriumacetat (pH 5,3), 6 µl Glykogen und 4 Volumen 100% Ethanol (auf -80°C gekühlt) bei -80°C für 2 Stunden. Die ds-cDNA-Fragmente lassen sich durch eine Zentrifugation bei 16 060 g, 4°C für 25 min pelletieren und anschließend für 5 min lufttrocknen. Das Pellet ist dann in 10 µl H<sub>2</sub>O aufzunehmen und kann für die Adapterligation eingesetzt werden.

### **3.10.7 Adapter-PCR I (Suppressions-PCR)**

Die Adapter-PCR dient der selektiven Amplifizierung der 3' Fragmente der *RsaI*-verdauten cDNA-Fragmente, die zuvor durch eine Ligation mit einem entsprechenden Bindungsstück verknüpft wurden.

### **Synthese des Adapter-Stocks (Adapter-*RsaI*)**

Für die Synthese eines 20 µM Adapter-Stocks werden jeweils 20 µl des 100 µM Long Oligo *RsaI*- und des 100 µM Short Oligo *RsaI*-Primers mit 10 µl 10 x NEB\_T4-DNA-Ligase Puffer versetzt und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt. Durch die Inkubation des Ansatzes bei 95°C für 3 min und einer Abkühlungsphase über Nacht hybridisieren die komplementären Nukleotidsequenzen zu doppelsträngigen Adaptern, welche für die Ligation der *RsaI* verdauten ds-cDNA eingesetzt werden können.

### Ligation des Adapter-Stocks

Für die Ligation werden zu den 10 µl ds-cDNA, die mit *RsaI* verdaut wurde, 2 µl 10 x NEB\_T4-DNA Ligase Puffer und 1 µl T4-DNA-Ligase zugegeben und mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Der Ansatz ist gut zu mischen und über Nacht bei 16°C zu inkubieren. Die Aktivität der Ligase wird durch die Inkubation des Ansatzes bei 65°C für 10 min inaktiviert und anschließend mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt. Anschließend ist der Ansatz mittels des QIAquick PCR Purification Kits aufzureinigen und mit 60 µl Elutionspuffer zu eluieren. Aus diesem Pool können in der Adapter-PCR I die 3' Fragmente selektiv amplifiziert werden.

Zur Durchführung der Adapter-PCR I wird der PCR-Ansatz nach Tabelle 28 pipettiert.

**Tabelle 28** PCR-Ansatz für die Adapter-PCR I

Lösung	Menge
Eluat der adapterligierten ds-cDNA	4 µl
10 x PCR-Puffer	10 µl
MgCl <sub>2</sub>	3 µl
dNTP-Mix (5 mM)	2 µl
H <sub>2</sub> O	77,4 µl
SMART_T13_VN Primer (10 µM)	1 µl
Adapterprimer AP1	1 µl
<i>Taq</i> Polymerase	1,6 µl

Durch eine Zyklusoptimierung wird die optimale Zykluslänge der Adapter PCR I bestimmt und dann folgendes PCR-Programm durchgeführt:

**Tabelle 29** Programm der Adapter-PCR I

Schritt	Temperatur	Zeit
1	95°C	5 sec
2	65°C	30 sec
3	72°C	1 min

} x Zyklen

Im Anschluss an die Adapter-PCR I wird der Ansatz 1:30 mit Wasser verdünnt und kann dann für die Adapter-PCR II eingesetzt werden.

### 3.10.8 Adapter-PCR II (Spezifische PCR)

Bei der spezifischen PCR werden spezielle Oligonukleotide, die so genannten „Anchored Primer“, eingesetzt, die sich mit 2 Basen in der Zielsequenz verankern. Mit dem Adapterprimer AdE\_NN\_Rsal (5'-AGGGCGTGGTGCGGAGGGCGG-TCCNN-3') sind 16 Primervarianten möglich, wobei N die Base A, G, C oder T repräsentieren kann. Von der 3' terminalen Seite werden die spezifischen SMART\_T13\_VN-Primer (5'-GCGAGTCGACCGTTTTTTTTTTTTTTVN-3') eingesetzt, sodass vom 3'-Ende 12 Primervarianten möglich sind. Das V kann die Basen A, G oder C und N die Basen A, C, G oder T repräsentieren. Durch eine entsprechende Primerkombination können somit 192 Subpopulationen der cDNA Fragmente amplifiziert werden, die sich dann als Pool oder einzeln analysieren lassen.

Für die Adapter-PCR II wird der PCR-Ansatz nach Tabelle 30 pipettiert und nach dem PCR-Programm in Tabelle 31 amplifiziert. Die Zykluslänge muss zuvor erneut durch eine Zyklusoptimierung bestimmt werden.

**Tabelle 30** PCR-Ansatz für die Adapter-PCR II

Lösung	Menge
cDNA aus der Adapter-PCR I, 1:30 mit Wasser verdünnt	10 µl
10 x PCR-Puffer	10 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	3 µl
dNTP-Mix (5 mM)	4 µl
H <sub>2</sub> O	65,5 µl
SMART_T13_VN Primer (10 µM)	2,5 µl
AdE_NN_Rsal (10 µM)	1 µl
Taq Polymerase	20 U

**Tabelle 31** Programm der Adapter-PCR II

Schritt	Temperatur	Zeit
1	95°C	5 sec
2	65°C	30 sec
3	72°C	1 min

} x Zyklen



Nach der PCR werden die einzelnen Subpopulationen als 1/8 des Transkriptoms mit der zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert. Zuvor sind die Proben jedoch aufzureinigen und aufzukonzentrieren.

Zu den gepoolten Proben wird 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,3) und 2,5 Volumen kalte 100%igen Ethanol (-20°C) zugegeben und gut gemischt. Die Fällung der cDNA ist bei -20°C über Nacht und die Pelletierung bei 13 000 g bei 4°C für 25 min durchzuführen. Das getrocknete Pellet wird anschließend in 100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und eine Aufreinigung mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach Protokoll durchgeführt. Die Elution der gereinigten DNA erfolgt mit 30 µl Wasser.

### **3.10.9 Zweidimensionale Auftrennung der cDNA**

Die cDNA-Fragmente werden in der ersten Dimension nach ihrem Molekulargewicht und in der zweiten Dimension nach dem GC-Gehalt aufgetrennt.

#### **Auftrennung nach dem Molekulargewicht**

Für die Auftrennung in der ersten Dimension wird ein nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel mit einem Gehalt von 10 % Acrylamid verwendet. Die Geldimensionen betragen 0,1 cm x 16 cm x 16 cm. Für ein Gel werden 28 ml Acrylamidlösung mit 0,001 Volumen TEMED und 0,1 Volumen APS gemischt und in die vorbereitete Gelkammer eingegossen, für die Taschen wird ein Kamm mit 15 Zähnen verwendet. Nach einer Stunde ist das Gel auspolymerisiert und der Kamm kann entfernt werden. Die Taschen sind 1-mal mit TAE-Puffer zu waschen und mit den Proben zu beladen. Zuvor müssen die Proben mit 6 x GLD 1:5 verdünnt werden. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei Raumtemperatur in 1 x TAE-Laufpuffer bei einer Spannung von 200 V für 4,75 h.

#### **Auftrennung nach dem GC-Gehalt**

Für die Auftrennung in der zweiten Dimension wird ein denaturierender Gradient benötigt. Hierfür sind die Gele mit einem speziellen Gradientenmischer (BioRad) zu gießen. Für 8 Gele werden insgesamt 230 ml Denaturierungslösung benötigt. Dazu müssen in einem Messzylinder die höher konzentrierte Denaturierungslösung (55 % Denaturant und 8 % Acrylamid) und die niedrig konzentrierte Lösung (25 % Denaturant und 8 % Acrylamid) vorgelegt werden. Zu den Lösungen müssen jeweils 163 µl TEMED und 1630 µl 10 % APS zugegeben, die beiden Lösungen anschließend gut gemischt, in den Gradientenmischer eingefüllt und die Gele dann in

die vorbereitete Apparatur gegossen werden. Zur Bildung einer glatten Kante ist am oberen Rand etwa 1 cm Platz zu lassen, der dann vor dem Auspolymerisieren mit H<sub>2</sub>O-gesättigtem n-Butanol gefüllt wird. Bevor die erste Dimension aufgebracht wird, muss das Butanol vorsichtig abgewaschen werden.

Die Spuren der ersten Dimension werden in voller Länge ausgeschnitten, mit einer Overheadfolie auf das auspolymerisierte Denaturierungsgel aufgetragen und mit einer 1%igen Agaroselösung überschichtet. Die elektrophoretische Auftrennung ist dann bei konstanter Temperatur von 60°C in 1 x TAE- Laufpuffer bei 100 V für 16 h durchzuführen. Der kontinuierliche Denaturierungsgradient verläuft dabei parallel zur Elektrophoreserichtung.

### **3.10.10 Detektion, Auswertung und Identifikation der cDNA-Fragmente**

Nach der Auftrennung in der zweiten Dimension werden die Gele für eine Stunde mit SYBR<sup>®</sup> Gold-1 in 1 x TAE-Puffer (1:10 000-Verdünnung) gefärbt. Die Färbung ermöglicht eine Visualisierung der DNA-Fragmente als Punkte, die mit einem Laserscanner bei einer Anregung von  $\lambda = 473 \text{ nm}$  sichtbar werden. Zur Quantifizierung wird das Softwareprogramm Delta-2D von DECODON verwendet.

Zur Identifizierung der einzelnen cDNA-Fragmente müssen diese gepickt und in einer PCR erneut amplifiziert werden, anschließend kann eine Sequenzierung erfolgen, die eine genaue Einordnung der Fragmente ins Genom ermöglicht.

Das Picken der einzelnen Spots aus den Gelen erfolgt auf einem UV-Tisch des Camilla-Dokumentationssystems bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 312 \text{ nm}$ . Dazu wird eine Glaskapillare verwendet, die zuvor auf eine 1 ml Einwegspritze gesteckt und mit 50  $\mu\text{l}$  Wasser befüllt wurde. Ausgestochene Fragmente werden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 65°C über Nacht eluiert. Am nächsten Tag wird dann eine PCR mit dem Ansatz nach Tabelle 32 durchgeführt und nach dem Programm in Tabelle 33 amplifiziert.

**Tabelle 32** Ansatz der PCR der gepickten Spots zur späteren Sequenzierung

Lösung	Menge
Eluat	10 µl
10 x Thermopol-Puffer	10 µl
dNTP-Mix (5 mM)	2 µl
Ad_non_extended-Primer (10 µM)	1 µl
H <sub>2</sub> O	74,5 µl
SMART_T6 Primer (10 µM)	1 µl
Taq Polymerase (20 U)	1,5 µl

**Tabelle 33** Programm der PCR zur Amplifizierung der gepickten Spots

Schritt	Temperatur	Zeit
1	95°C	5 sec
2	65°C	30 sec
3	72°C	1 min

} x Zyklen

Die amplifizierten cDNA-Fragmente sind anschließend auf ihre Qualität hin zu überprüfen und anschließend aufzureinigen. Zur Qualitätskontrolle werden die Ansätze auf ein 1%iges Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetragen und bei 120 V und 400 mA für 30 min elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proben sind anschließend mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufzureinigen und jeweils in 30 µl Elutionspuffer zu eluieren.

Die cDNA-Fragmente werden dann zur Sequenzierung versendet (GATC). Die sequenzierten 3' terminalen ds-cDNA-Fragmente sind dann durch die Suche homologer Sequenzen in der Datenbank am National Center for Biotechnology Information (NCBI) mit dem Algorithmus Nukleotid-Nukleotid Blast durchzuführen. Als eindeutig identifizierte Fragmente werden alle Sequenzen betrachtet, die einen e-value (expected value) kleiner  $10^{-6}$  aufweisen.

## 4 Ergebnisse

Die Haut und der Respirationstrakt sind die wesentlichen Schutzbarrieren des menschlichen Körpers gegenüber Umwelteinflüssen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden humane *in vitro* Gewebemodelle dieser Schutzbarrieren eingesetzt, um das Gefährdungspotential synthetischer Nanomaterialien zu untersuchen. Der Aufbau eines 3D Gewebemodells der Atemwege (Trachea) sowie die Entwicklung eines entsprechenden Bioreaktors erfolgten im Rahmen der vorliegenden Arbeit.

In Bezug auf das 3D-Hautmodell konnte auf ein in der Abteilung bereits etabliertes Gewebemodell zurückgegriffen werden. Zur Testung des Gefährdungspotentials und Etablierung neuer Methoden wurden die Versuche zunächst an Monolayerkulturen durchgeführt.

### 4.1 Aufbau eines 3D-Tracheamodells

Neben dem Aufbau und Einsatz eines 3D-Hautmodells wurde mit der Lungen-Zelllinie Calu-3 ein 3D-Tracheagewebemodell aufgebaut und daran erste nanotoxikologische Untersuchungen durchgeführt.

#### 4.1.1 Verwendung primärer humaner Trachea-Epithelzellen

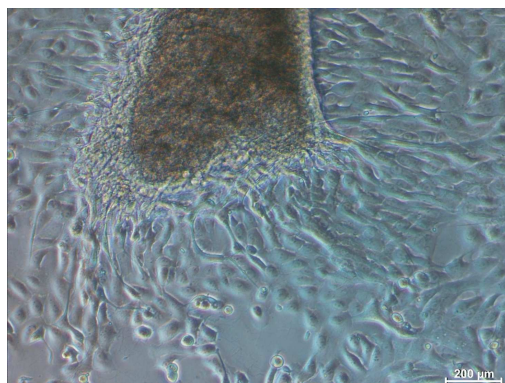
Parallel wurden primäre humane Trachea-Epithelzellen zum Aufbau eines 3D-Tracheamodells isoliert, charakterisiert und deren Kultivierung optimiert.

##### 4.1.1.1 Isolation primärer humaner Trachea-Epithelzellen (hTEZ)

Die Isolation der humanen Trachea-Epithelzellen erfolgte durch eine Auswaxsmethode aus humanen Biopsaten. Dazu war es notwendig, die Well Platten mit 500 µg/ml Kollagen Typ I zu beschichten, nur dann hafteten die Gewebestücke am Wellboden und die Zellen konnten proliferieren.

Nach 7 Tagen waren erste Zellen aus dem Gewebestück ausgewachsen (Abbildung 13), nach 14 bis 20 Tagen konnten die Zellen dann für Versuche eingesetzt oder passagiert werden.

Insgesamt wurden mit dieser Methode Zellen aus 64 Biopsaten verschiedener Patienten isoliert, wobei die Zahl der auswachsenden Zellen je nach Patient variierte (Tabelle 34). Das Alter der Patienten lag zwischen 37 bis 78 Jahren.



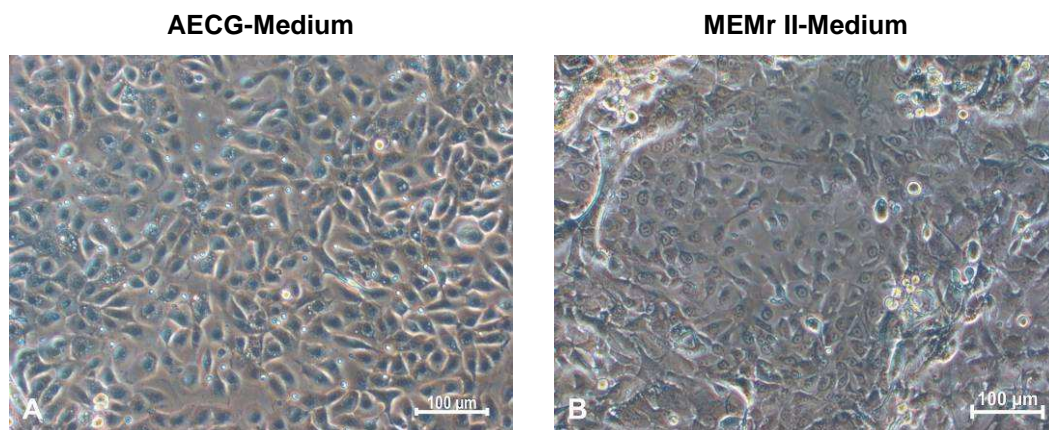
**Abbildung 13** (A) Phasenkontrastaufnahme humaner TEZ, die nach 7 Tagen aus einem Gewebestück ausgewachsen sind

**Tabelle 34** Anzahl eingesetzter Biopsate für die Zellisolation und erzielte Zellausbeute

Gesamtzahl der Biopsate	Sehr gute Isolation	Sehr schlechte Isolation	Keine Isolation möglich
64	23	33	9
	(> 1 Mio Zellen/Isolation)	(< 250 000 Zellen/Isolation)	

#### 4.1.1.2 Optimierung des Zellkulturmediums

Zur Verbesserung der Proliferation und vor allem der Differenzierung der Zellen wurde das Zellkulturmedium an die Bedürfnisse der Zellen adaptiert. Im Vordergrund stand dabei die für die mucoziliäre Clearance wichtige Ausbildung zilientragender und schleimproduzierender Zellen. Mit dem käuflichen Airway Epithelium Cell Growth Medium (AECG) zeigten die hTEZ zwar die typische kubische Form der Epithelzellen, eine Ausbildung von Zilien in den proliferierten Zellen konnte jedoch nicht herbeigeführt werden (Abbildung 14 A). Auf Basis des Minium Essential Mediums wurde daher ein neues Medium (MEMr II) mit verschiedenen Zusätzen entwickelt (6.4.1). Für die Ausbildung und Aktivität von Zilien zeigte sich die Zugabe des Hepatozyten Wachstumsfaktors (HGF) als notwendig. Bei Differenzierungsversuchen ohne diesen Faktor konnte keine Zilienaktivität beobachtet werden (Tabelle 35).



**Abbildung 14** Phasenkontrastaufnahme humaner Trachea-Epithelzellen (A) kultiviert mit AECG-Medium, (B) Kultivierung in MEMr II Zellkulturmedium

Die Verwendung des MEMr II führte gleichzeitig zu einer Veränderung der Zellmorphologie. Diese zeigte sich durch teilweise rundere und kleinere Zellen oder aber langgestrecktere Zellen, die oft eine starke Zilienentwicklung und -aktivität aufwiesen (Abbildung 14 B). Die Zellen bildeten nur Zilien aus, wenn sie nach der Isolation mit dem Differenzierungsmedium kultiviert wurden. Die Zilienbewegung konnte nur unter dem Mikroskop beobachtet werden, auf den Bildern (Abbildung 14) sind die Zilien nicht zu erkennen.

**Tabelle 35** Anzahl der Biopsate aus denen hTEZ mit mikroskopisch erkennbarer Zilienaktivität isoliert werden konnten

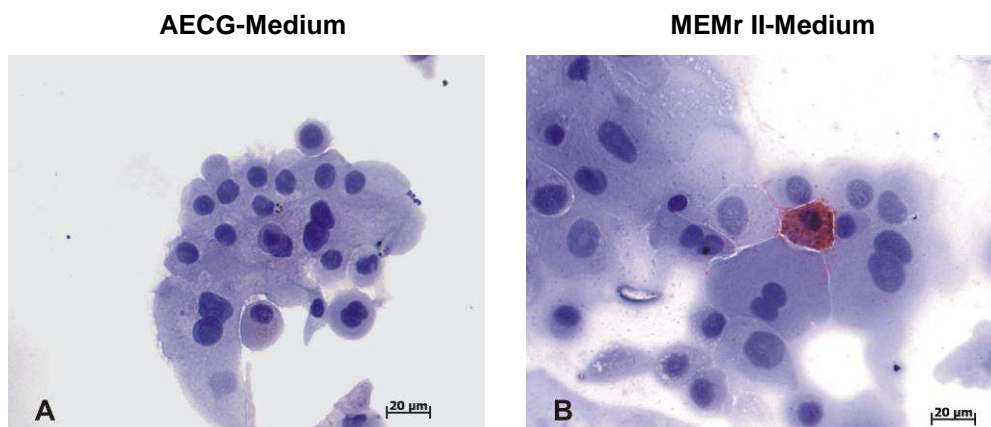
	Anzahl der Kultivierungsversuche (=n)	Ausbildung funktioneller Zilien bei hTEZ aus n Biopsaten
Kultivierung in AECG-Medium	24	0
Kultivierung in MEMr II-Medium	24	8

#### 4.1.1.3 Charakterisierung der humanen Trachea-Epithelzellen nach der Kultivierung im Monolayer

Zum Aufbau eines 3D-Tracheamodells ist es notwendig, dass die isolierten Zellen funktionell sind, d.h. sie müssen *in vitro* in der Lage sein, wichtige Zellcharakteristika für eine funktionierende Barrierestruktur und die mucoziliäre Clearance auszubilden. Die Charakterisierung wurde über spezifische immunhistologische Marker zunächst an Monolayerkulturen etabliert.

##### Nachweis von Becherzellen

Über einen Anti-Gastric-Mucin-Antikörper wurde zunächst die Ausbildung schleimproduzierender Becherzellen untersucht.



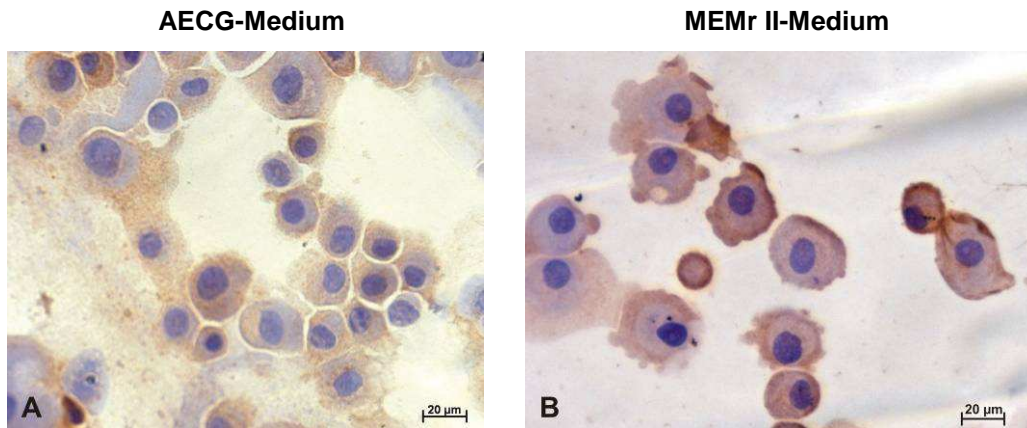
**Abbildung 15** Immunhistochemischer Nachweis von Becherzellen (Anti-Gastric-Mucin): (A) hTEZ, die mit AECG-Medium kultiviert wurden (B) hTEZ nach der Kultivierung im Differenzierungsmedium

Eine positive Färbung zeigte sich nur vereinzelt bei den hTEZ, die nach der Isolation mit dem Differenzierungsmedium MEMr II kultiviert wurden (Abbildung 17 B).

##### Nachweis zilientragender Zellen

Zum Nachweis zilientragender Zellen in den Monolayerkulturen wurde ein Antikörper gegen das beta-Tubulin eingesetzt. Dieses kommt verstärkt in den Zilien vor und lässt sich somit spezifisch anfärben.



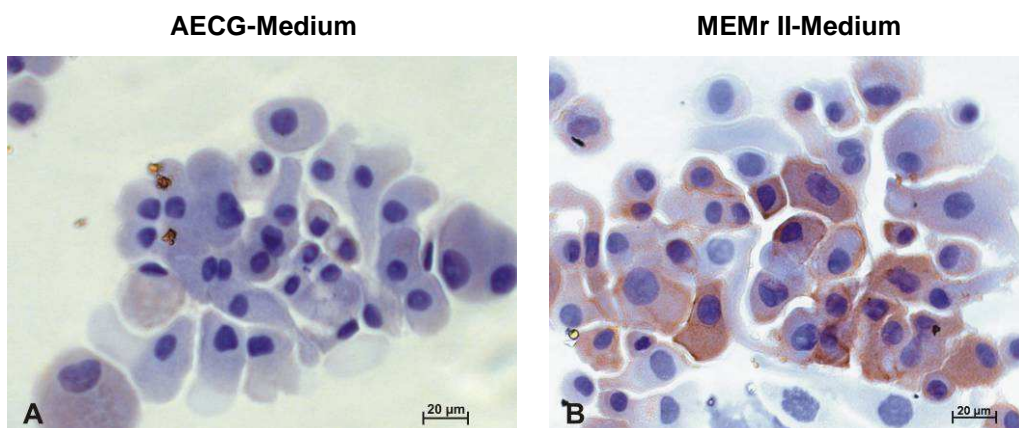


**Abbildung 16** Immunhistochemischer Nachweis von zilientragenden Zellen (Anti-beta-Tubulin): (A) hTEZ, die mit AECG-Medium kultiviert wurden, (B) hTEZ nach der Kultivierung im Differenzierungsmedium MEMr II

Sowohl die in AECG als auch die in MEMr II kultivierten Zellen zeigen eine positive Färbung, sind also in der Lage, Zilien auszubilden (Abbildung 18). Eine Zilientätigkeit konnte jedoch mikroskopisch nur bei Kultivierung der Zellen in MEMr II nachgewiesen werden.

### Nachweis von Tight Junctions

Mit dem Antikörper gegen die Tight Junctions (*Zonula occludens*) lassen sich enge Zellkontakte nachweisen, die für einen funktionierenden Gewebeverband und die Ausbildung einer Barriere essentiell sind.



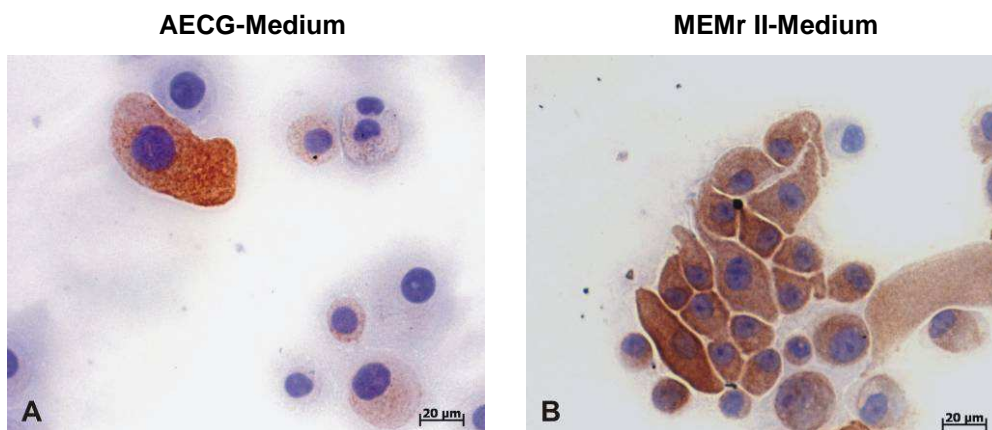
**Abbildung 17** Immunhistochemischer Nachweis von Tight Junctions (Anti-Zonula Occludens): (A) hTEZ, die mit AECG-Medium kultiviert wurden, (B) hTEZ nach der Kultivierung im Differenzierungsmedium MEMr II



Die in AECG-Medium kultivierten Zellen zeigten nur eine leichte, die Zellen im Differenzierungsmedium dagegen eine starke Färbung, d.h., sie sind in der Lage, Zell-Zell-Kontakte auszubilden (Abbildung 17).

### Nachweis von Zytokeratin 18

Zytokeratin 18, ein Intermediärfilament, kommt verstärkt in Zellen des Respirationstrakts vor, die bereits ausdifferenziert sind.



**Abbildung 18** Immunhistochemischer Nachweis von ausdifferenzierten Zellen (Anti-Zytokeratin 18): (A) hTEZ, die mit AECG-Medium kultiviert wurden, (B) hTEZ nach der Kultivierung im Differenzierungsmedium MEMr II

Die in AECG-Medium kultivierten hTEZ zeigten eine schwächere, die in MEMr II-Medium kultivierten Zellen eine stärkere positive Färbung.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die in dem optimierten Zellkulturmedium MEMr II kultivierten hTEZ mehr Marker ausbilden konnten (Tabelle 36) als im AECG-Medium.

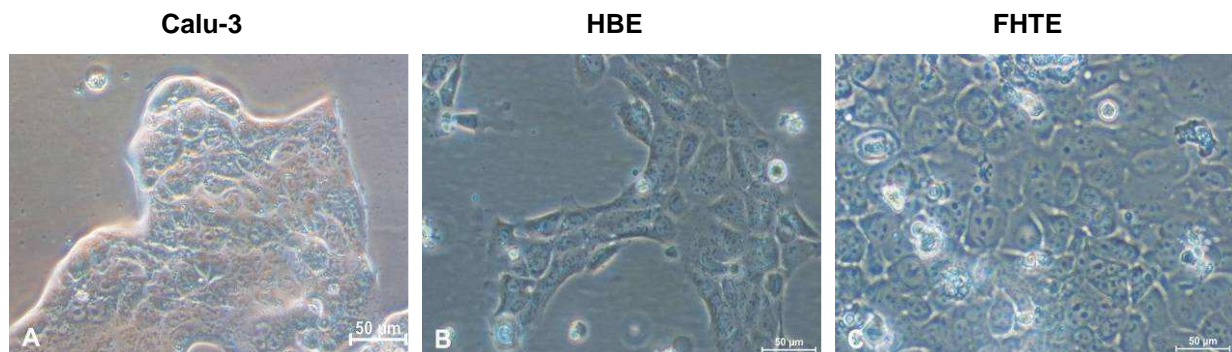
**Tabelle 36** Vergleich der ausgebildeten Zellmarker nach der Kultivierung der isolierten Trachea-Epithelzelle in AECG-Medium und MEMr II-Medium (- = keine Färbung, + = spezifische Färbung)

Untersuchte Zellmarker zum Nachweis von:	Eingesetztes Kultivierungsmedium	
	Kultivierung in AECG-Medium	Kultivierung in MEMr II-Medium
Becherzellen	-	+
Zilientragende Zellen	+	+
Tight Junctions	-	+
Differenzierte Zellen	+	+

## 4.1.2 Untersuchung relevanter Zelllinien zum Aufbau eines 3D-Tracheamodells

### 4.1.2.1 Kultivierung der Zelllinien

Humane Biopsate waren nur begrenzt verfügbar und lieferten je nach Spender auch sehr unterschiedliche Zellzahlen (Tabelle 34). Aus diesem Grund wurden auch die humane Lungenkarzinom-Zelllinie Calu-3, die immortalisierten humanen bronchialen Epithelzellen (HBE) und die fötalen humanen Trachea-Epithelzellen (FHTE) für die Eignung zum Aufbau eines Tracheamodells untersucht.



**Abbildung 19** Phasenkontrastaufnahme von Monolayerkulturen der 3 getesteten Zelllinien: (A) Lungencarcinom-Zelllinie Calu-3, (B) immortalisierte humane bronchiale Epithelzellen (HBE), (C) immortalisierte fötale humane Trachea-Epithelzellen.

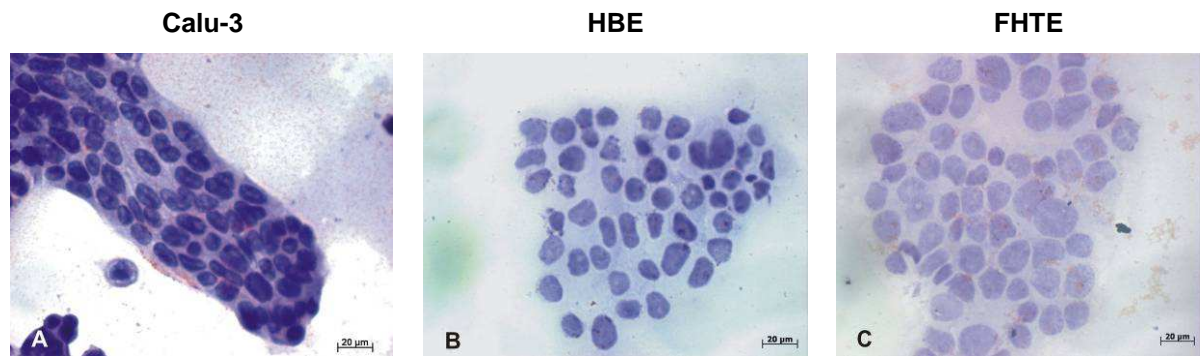
Während die Calu-3 und die FHTE eine kubische Zellform aufweisen, zeigen die HBE in der Monolayerkultur eher eine lang gestreckte Zellmorphologie.

### 4.1.2.2 Charakterisierung der Zelllinien nach der Kultivierung im Monolayer

Die Zelllinien sollten ebenfalls in der Lage sein, die für eine funktionelle Trachea wichtigen Zellmarker auszubilden. Die Expression der oben beschriebenen Marker wurde auch für die Zelllinien untersucht.

#### Nachweis von Becherzellen

Cytospots der Zelllinien wurden mit dem Anti-Gastric-Mucin-Antikörper auf die Fähigkeit zur Bildung von Becherzellen hin untersucht.

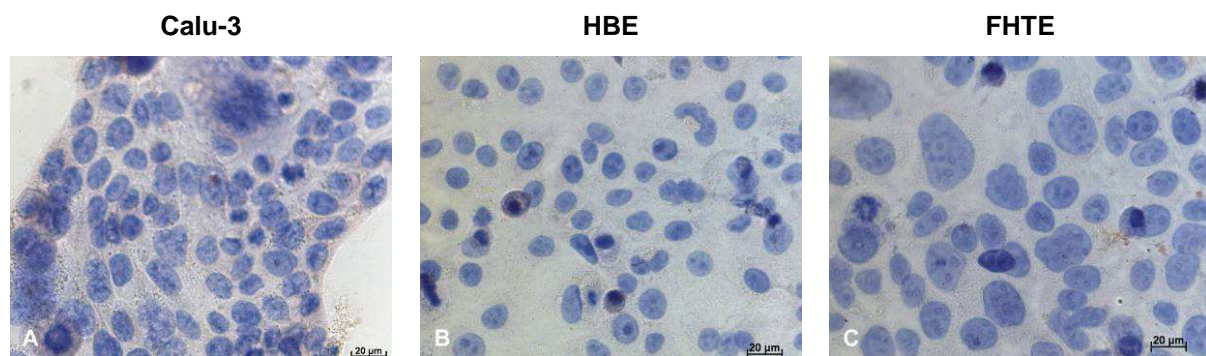


**Abbildung 20** Immunhistochemischer Nachweis von Becherzellen (Anti-Gastric Mucin): (A) Calu-3, (B) HBE, (C) FHTE

Für den Anti-Gastric-Mucin-Antikörper konnte für alle getesteten Zelllinien keine spezifische Färbung nachgewiesen werden. Die Zelllinien zeigten nach der Kultivierung im Monolayer keine Bildung mucinsekretierender Becherzellen (Abbildung 20).

### Nachweis zilientragender Zellen

Es wurde eine Antikörperfärbung gegen das beta-Tubulin zum Nachweis vorhandener zilientragender Zellen durchgeführt.

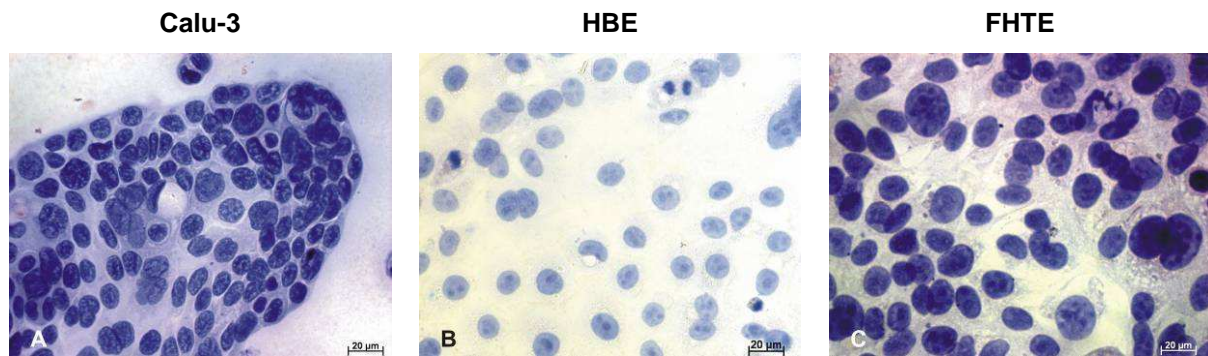


**Abbildung 21** Immunhistochemischer Nachweis zilientragender Zellen (Anti-beta-Tubulin): (A) Calu-3, (B) HBE, (C) FHTE.

Alle 3 Zelllinien wiesen nach der Kultivierung als Monolayerkultur keine Expression des zilienspezifischen Markers beta-Tubulin auf (Abbildung 21).

### Nachweis der Tight Junctions

Zum Nachweis von Zell-Zell-Kontakten, die für eine geschlossene Barriere wichtig sind, wurden Zellen der 3 Zelllinien mit einem Antikörper gegen die Tight Junctions (*Zonula Occludens*) gefärbt.

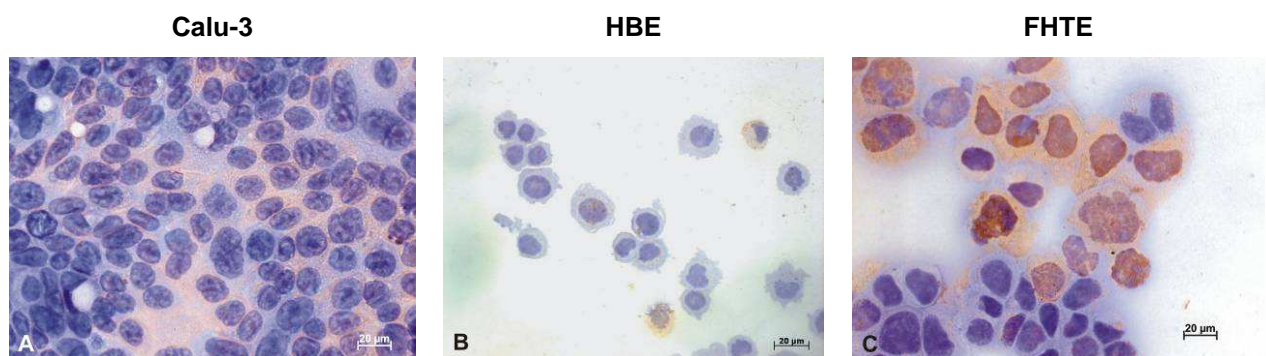


**Abbildung 22** Immunhistochemischer Nachweis von Tight Junctions (Anti-Zonula Occludens): (A) Calu-3, (B) HBE, (C) FHTE

Bei der Färbung von Monolayerkulturen mit dem Anti-Zonula-Occludens-Antikörper konnten keine Tight Junctions nachgewiesen werden. Alle 3 Zelllinien zeigten keine Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten (Abbildung 22).

### Nachweis von Zytokeratin 18

Nach der Kultivierung der Zelllinien im Monolayer wurden diese mit einem Antikörper gegen das Zytokeratin 18 gefärbt. Dieser Marker kommt verstärkt in Zellen des Respirationstrakts vor, die bereits ausdifferenziert sind.



**Abbildung 23** Immunhistochemischer Nachweis von ausdifferenzierten Zellen (Anti-Zytokeratin 18): (A) Calu-3, (B) HBE, (C) FHTE

Die FHTE zeigten im Vergleich zu den Calu-3 und den HBE eine spezifische Färbung gegen das Zytokeratin 18.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Zelllinien in der Monolayerkultur nicht in der Lage waren, die für den Aufbau eines Tracheamodells wichtigen Marker zu exprimieren.



**Tabelle 37** Vergleich der ausgebildeten Zellmarker nach der Kultivierung der Zelllinien Calu-3, HBE und FHTE im Monolayer (- = keine Färbung, + spezifische Färbung)

Untersuchte Zellmarker zum Nachweis von:	Eingesetzte Zellen		
	Calu-3	HBE	FHTE
Becherzellen	-	-	-
Zilientragende Zellen	-	-	-
Tight Junctions	-	-	-
Differenzierte Zellen	-	-	+

Alle 3 Zelllinien zeigten im Gegensatz zu den primären humanen Zellen bei den immunhistochemischen Färbungen, mit Ausnahme der FHTE bei Zytokeratin 18, keine spezifischen Färbungen.

Durch die Anpassung der Kultivierungsbedingungen an die physiologischen Bedingungen der Zellen *in vivo* durch eine statische Kultivierung auf einer Matrix sollte dieser Effekt auf die Zellen weiter untersucht werden.

#### 4.1.3 Statische Kultivierung der hTEZ und der Zelllinien auf der BioVaSc

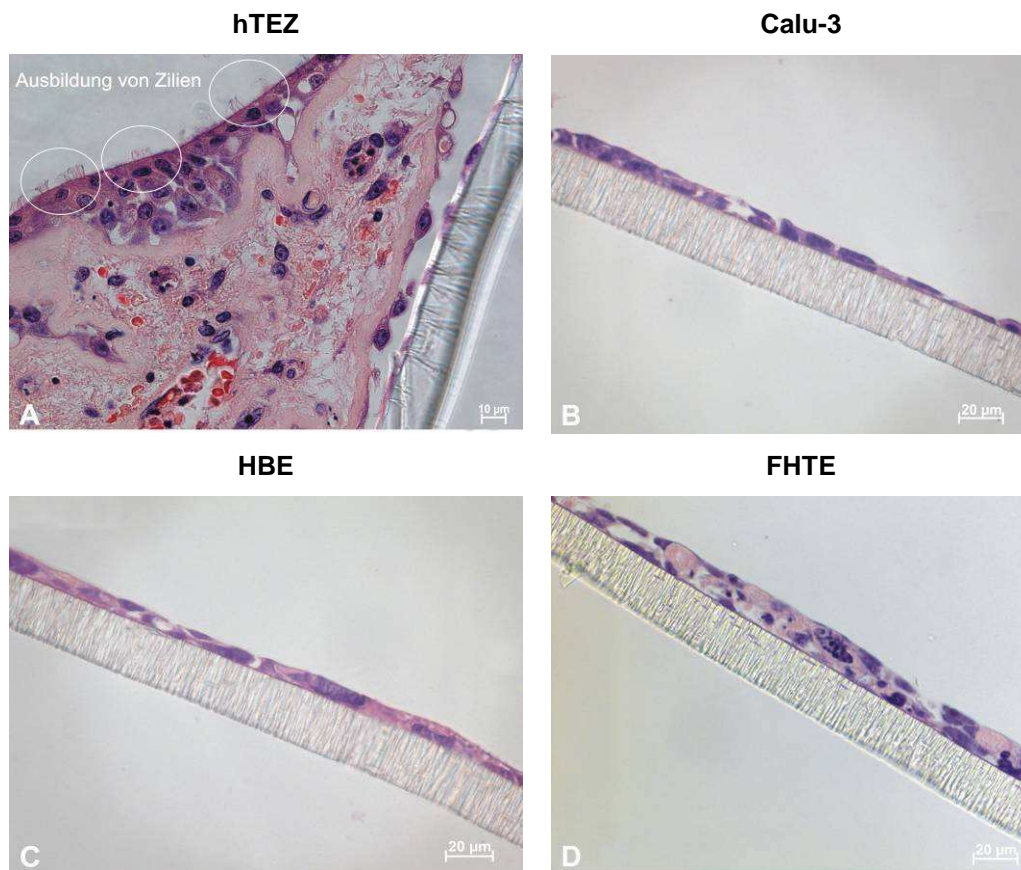
Für die Etablierung eines dreidimensionalen Trachea Gewebemodells erfolgte die Entwicklung von Airlift-Kulturverfahren der Zellen auf einer Trägerstruktur. Die Zellen erhalten in dieser Kultivierungsform apikalen Luft- und basalen Medienkontakt.

##### 4.1.3.1 Optimierung der Kultivierungsparameter

Als Trägermaterial kam eine azellularisierte Kollagen basierte Matrix (BioVaSc, Biological Vascularized Scaffold) und vergleichend PET-Inserts mit einer Porengröße von 0,1 µm zum Einsatz. Als Bewertungskriterium wurde die Zellmorphologie herangezogen. Die Zellen sollten auf dem Trägermaterial eine hochprismatische Morphologie entsprechend den nativen humanen Trachea-Epithelzellen ausbilden.

Der Aufbau statischer Kulturen erfolgte mit primären Tracheaepithelzellen (hTEZ), der Zelllinie Calu-3, immortalisierten humanen Bronchialzellen (HBE) und immortalisierten humanen fötalen Trachea-Epithelzellen (FHTE).

Für das Wachstum der primären humanen Trachea-Epithelzellen hatte sich die Beschichtung der Kulturoberfläche mit Kollagen als ideal herausgestellt. Deshalb wurden auch die Inserts für die Besiedelung mit den primären hTEZ mit Kollagen beschichtet, während sich dies für die eingesetzten Zelllinien als nicht notwendig erwies.

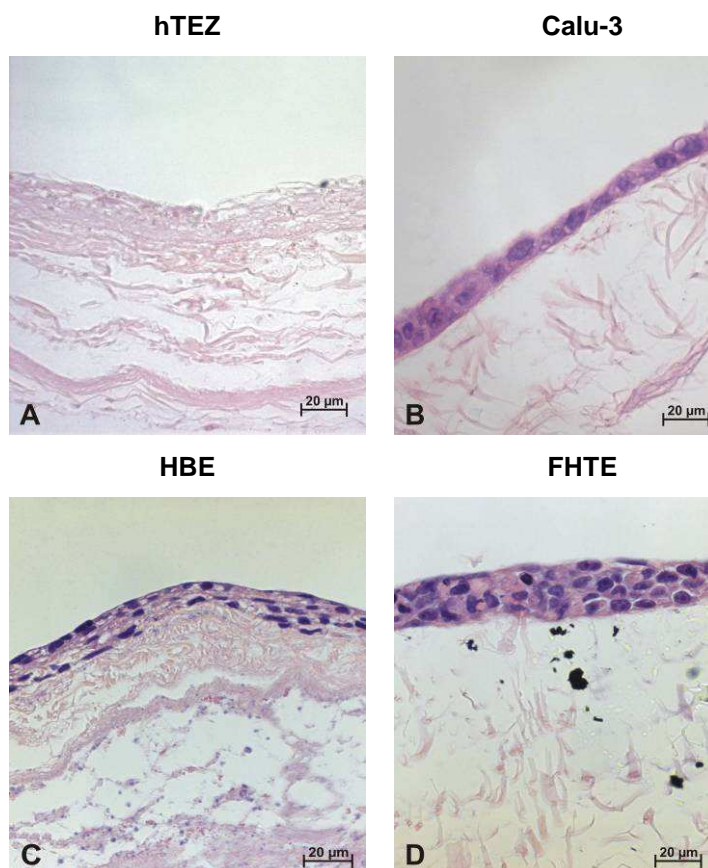


**Abbildung 24** HE-Färbung statischer Kulturen auf Inserts: (A) hTEZ auf einem kollagenbeschichteten Insert, (B) Calu-3, (C) HBE, (D) FHTE

Die hTEZ zeigten in der statischen Kultur ein hochprismatisches Wachstum und die Ausbildung von Zilien (Abbildung 24 A). Gleichzeitig sind auch Zellen in die Kollagenmatrix der Insertbeschichtung eingewandert. Eine ähnlich gute Proliferation und Differenzierung konnte jedoch nur in 5% der Versuche reproduziert werden.

Die Besiedelung der PET-Inserts mit den Zelllinien (Abbildung 24 B-D) zeigte zwar immer einen konfluenten Zellrasen, jedoch kein hochprismatisches Wachstum der Zellen. Die FHTE (Abbildung 24 D) zeigten außerdem eine gute Proliferation und wuchsen trotz der gleichen ausgesäten Zellmengen teilweise übereinander, während die Calu-3 und HBE nur eine Zellschicht ausbildeten.

Bei der Besiedelung der BioVaSc entwickelte sich nur bei den Zelllinien ein geschlossener Zellrasen (Abbildung 25 B-D). Die hTEZ konnten nicht auf der biologischen Trägerstruktur adhären oder proliferieren (Abbildung 25 A). Die HBE und FHTE (Abbildung 25 A, B) zeigten auf der BioVaSc eine gute Proliferation und wuchsen in mehreren Schichten übereinander. Die Zellen waren jedoch abgeflacht und zeigten kein hochprismatisches Wachstum. Die Calu-3 (Abbildung 25 C) dagegen bildeten trotz gleicher ausgesäter Zellmenge nur eine Zellschicht aus und wiesen bereits ein hochprismatisches Wachstum auf.



**Abbildung 25** HE-Färbung statischer Kulturen auf der BioVaSc: (A) hTEZ, (B) Calu-3, (C) HBE, (D) FHTE

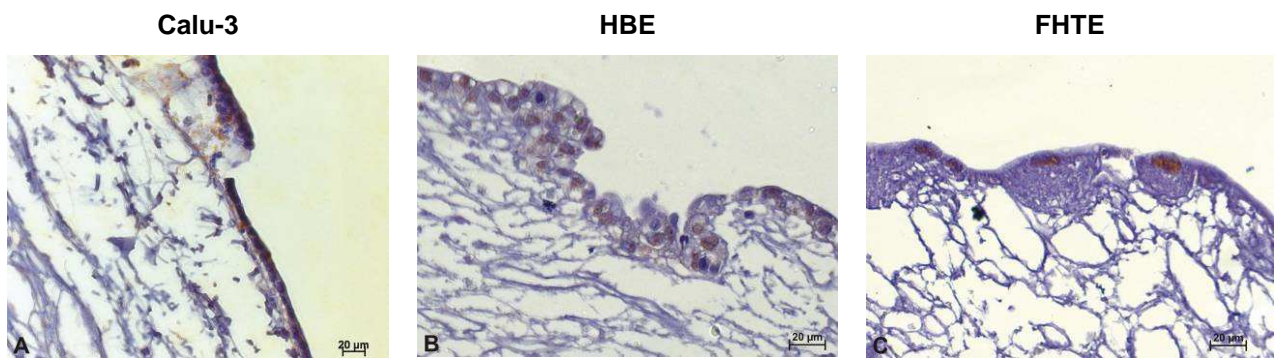
Alle drei Zelllinien konnten erfolgreich auf der BioVaSc aufgesiedelt und statisch kultiviert werden. Als optimale Zellzahl zur Besiedelung der BioVaSc mit den Zelllinien wurden 500 000 Zellen eingesetzt, bei niedrigeren Zellzahlen konnte keine Besiedelung nachgewiesen werden.

Zur Etablierung des Tracheamodells als Testsystem wurde deshalb mit den Zelllinien weitergearbeitet.

#### 4.1.3.2 Charakterisierung der Zelllinien nach statischer Kultivierung

Wie bereits die Monolayerkulturen wurden auch die Zellen der statischen Kultivierung auf der BioVaSc immunhistologisch auf die Ausbildung der Markerproteine für Becherzellen, zilientragende Zellen, Zell-Zell-Kontakte und differenzierte Zellen charakterisiert (Abbildung 26).

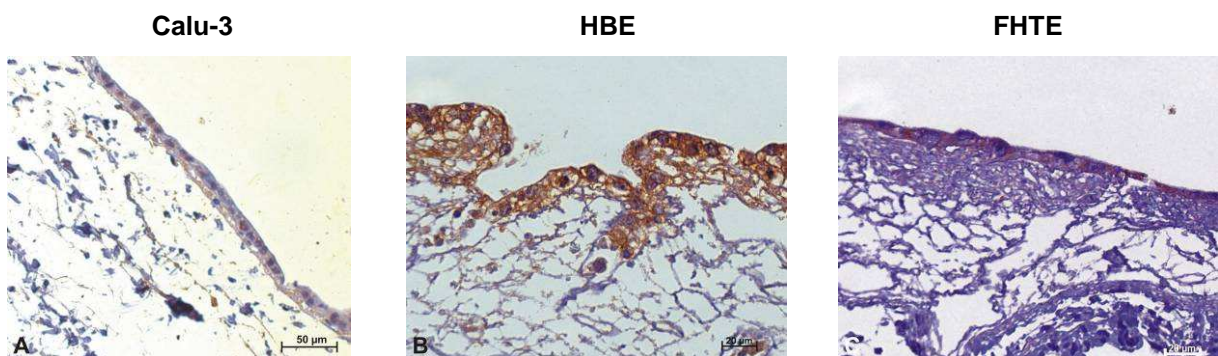
#### Nachweis von Becherzellen



**Abbildung 26** Immunhistochemischer Nachweis von Becherzellen (Anti-Gastric Mucin): (A) Calu-3 (B), HBE, (C) FHTE

Alle 3 Zelllinien zeigten auf der BioVaSc die Ausbildung von Becherzellen. Während die Calu eine starke Färbung vieler Zellen aufwies (Abbildung 26 A), bildeten die HBE und FHTE nur vereinzelt Becherzellen (Abbildung 26 B, C), die jedoch ebenfalls stark angefärbt wurden. Die FHTE zeigten eine eingeschränkte Proliferation, es waren daher nur vereinzelt Zellen erkennbar.

#### Nachweis zilientragender Zellen

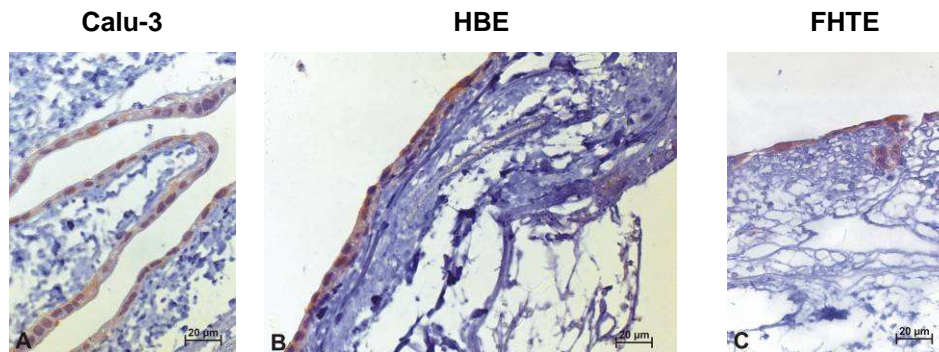


**Abbildung 27** Immunhistochemischer Nachweis zilientragender Zellen (Anti-beta-Tubulin): (A) Calu-3, (B) HBE, (C) FHTE



Die Zelllinien zeigten sich alle positiv für den Marker beta-Tubulin gegen zilientragende Zellen. Während die Calu-3 eine schwache Färbung aufwiesen (Abbildung 27 A), wurden die HBE und FHTE stärker angefärbt.

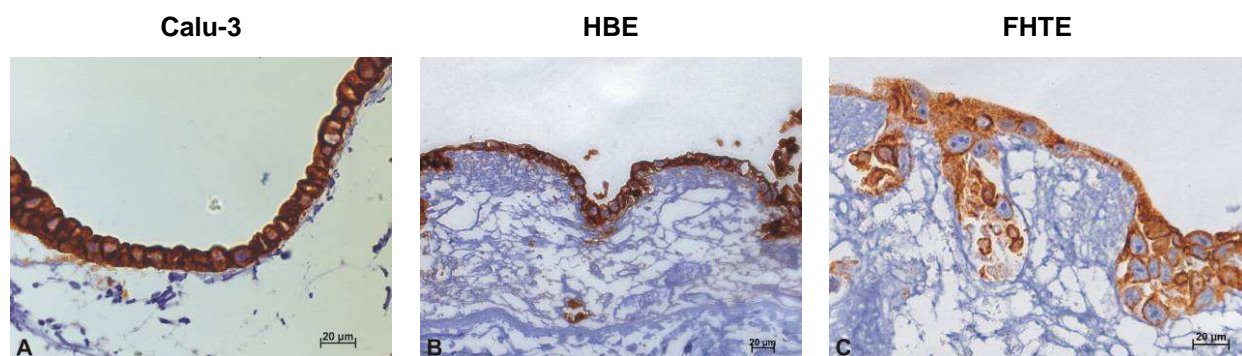
### Nachweis von Tight Junctions



**Abbildung 28** Immunhistochemischer Nachweis von Tight Junctions (Anti-Zonula Occludens): (A) Calu-3, (B) HBE, (C) FHTE

Alle 3 Zelllinien zeigten die Bildung von Zell-Zell-Kontakten (Abbildung 28 A-C) durch eine leichte Braunfärbung an. Die FHTE waren nur sehr vereinzelt auf der BioVaSc gewachsen und bildeten keinen geschlossenen Monolayer (Abbildung 28 C).

### Nachweis von Zytokeratin 18



**Abbildung 29** Immunhistochemischer Nachweis von ausdifferenzierten Zellen (Anti-Zytokeratin 18): (A) Calu-3, (B) HBE, (C) FHTE

Calu-3 und HBE zeigten einen geschlossenen Monolayer auf der BioVaSc und zeigten eine starke Färbung ausdifferenzierter Zellen (Abbildung 29 A, B). Die FHTE

zeigten eine sehr gute Proliferation und ebenfalls eine starke positive Färbung ausdifferenzierter Zellen (Abbildung 29 C).

**Tabelle 38** Ausgebildete Zellmarker nach der Kultivierung der Zelllinien Calu-3, HBE und FHTE im Monolayer im Vergleich zur statischen Kultivierung auf der BioVaSc

(- = keine Färbung, + = spezifische Färbung)

Untersuchte Zellmarker zum Nachweis von:	Kultivierung im Monolayer			Statische Kultivierung auf der BioVaSc		
	Calu-3	HBE	FHTE	Calu-3	HBE	FHTE
Becherzellen	-	-	-	+	+	+
Zilientragende Zellen	-	-	-	+	+	+
Tight Junctions	-	-	-	+	+	+
Differenzierte Zellen	-	-	+	+	+	+

Im Gegensatz zur Kultivierung der Zellen im Monolayer zeigten die Zellen nach der statischen Kultivierung eine positive Reaktion auf alle untersuchten Marker (Tabelle 38). Die Zelllinien wiesen eine Expression der Marker für mucinsekretierende Becherzellen, die Ausbildung zilientragender Zellen, ausgeprägte Zell-Zell-Kontakte und ausdifferenzierte Zellen auf.

Die Kultivierung der Zellen mit Luftkontakt zeigte damit eine positive Entwicklung der Zellen, die durch diesen Stimulus mehr Marker ausbilden konnten.

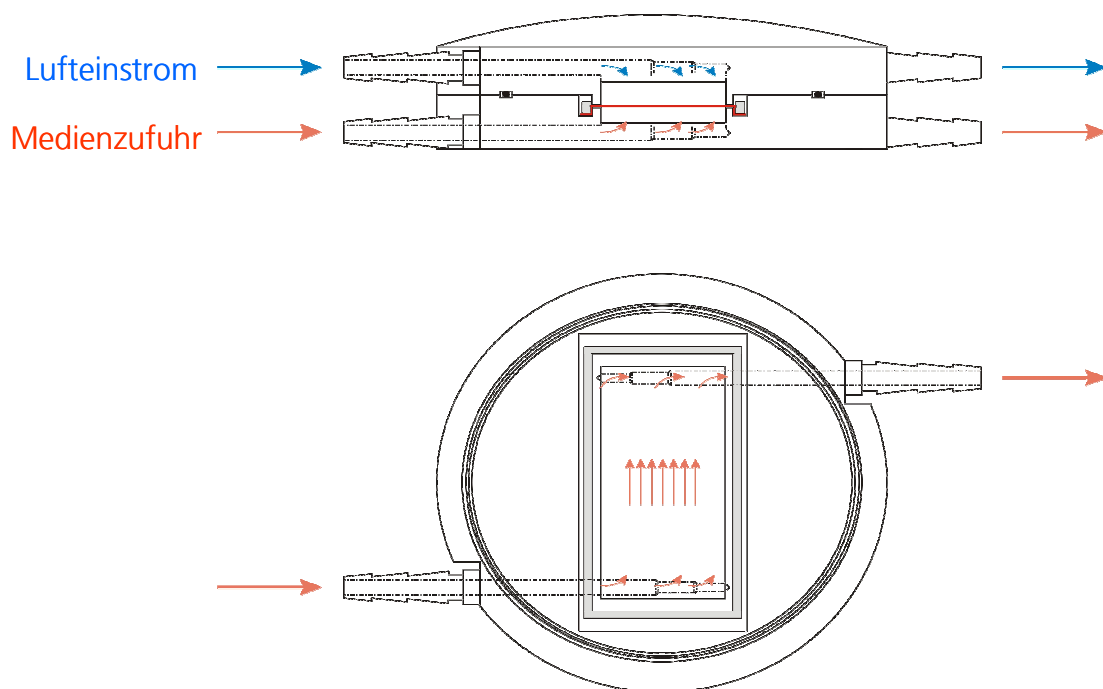
Ein weiterer Verfahrensschritt bestand in der Simulation von physiologischen Reizen während der *in vitro* Kulturbedingungen. Dies erfolgte durch die Entwicklung eines speziell konzipierten Bioreaktors, der zum einen die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und zum anderen eine mechanische Stimulation der Trachea-Epithelzellen durch eine Luftströmung gewährleisten sollte.

## 4.1.4 Dynamische Kultivierung der Zellen

### 4.1.4.1 Entwicklung eines Bioreaktors zur Simulation der Atmung

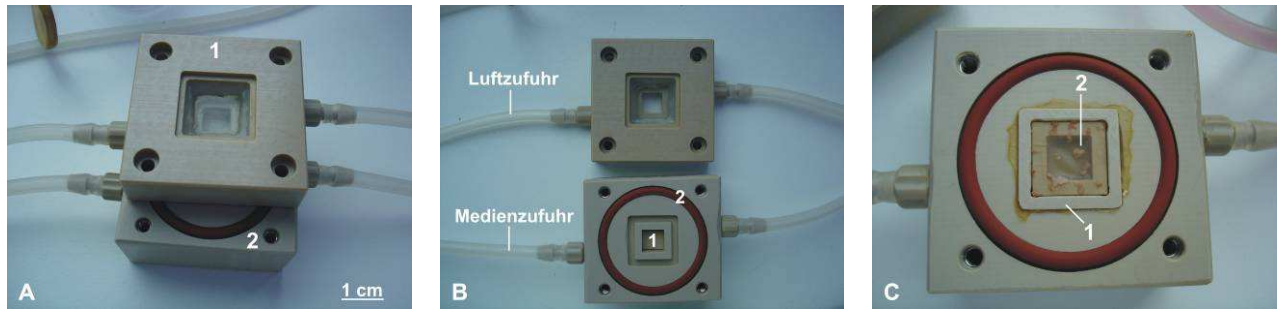
Zur gezielten Stimulation der Zellen wurden mit den 3 Zelllinien weitere Kultivierungsversuche in einem neu entwickelten Bioreaktorsystem unter dynamischer Kultivierung durchgeführt.

Der entwickelte Bioreaktor besteht aus 2 Kammereinheiten (Abbildung 30) mit einer effektiven Besiedelungsfläche von  $1 \text{ cm}^2$  und einem Kammervolumen von  $0,5 \text{ cm}^3$ .



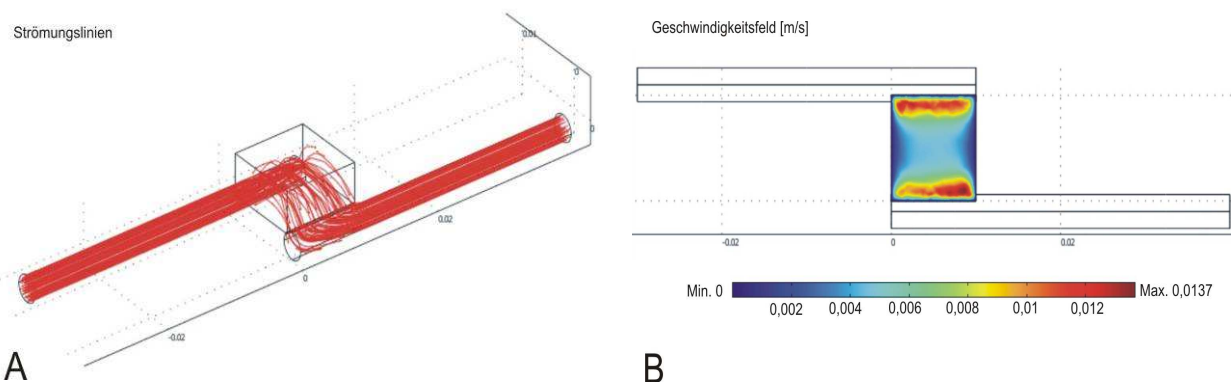
**Abbildung 30** Schemazeichnung des Trachea-Bioreaktors

Die beiden Kammersysteme werden durch das Einspannen eines Trägermaterials (BioVaSc) für die Zellen räumlich voneinander getrennt (Abbildung 31 B). Der obere Teil des Reaktors sorgt für die mechanische Stimulation der epithelialen Zellen, indem durch ein zuführendes Schlauchsystem Luft wie bei der Inspiration und Expiration der Atmung über die Zellen geführt wird (Abbildung 31 A). Die untere Kammer dient der Versorgung der Zellen mit Zellkulturmedium (Abbildung 34 B).



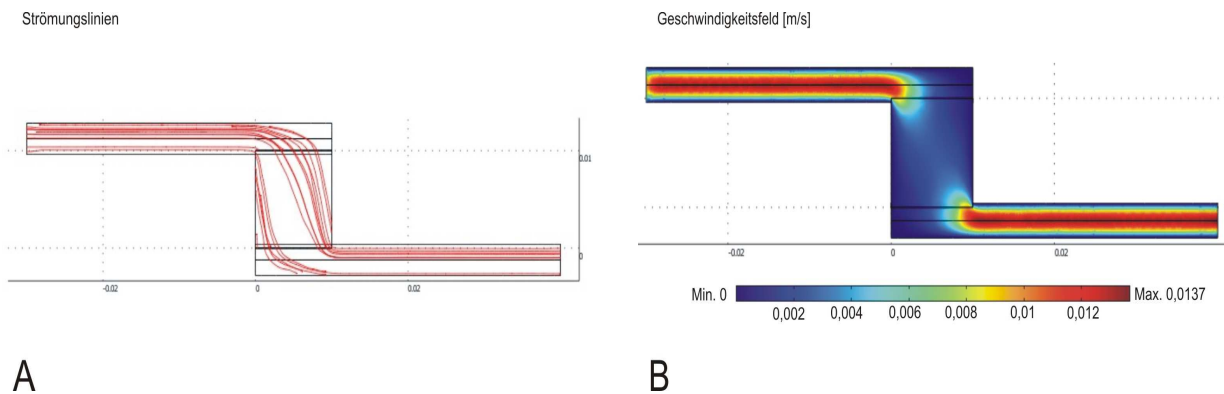
**Abbildung 31** Aufbau des Bioreaktors zur Simulation der Atmung : (A) Obere (1) und untere (2) Kammer des Systems, die nach dem Einspannen der BioVaSc mit den aufgesiedelten Zellen miteinander verschraubt werden, (B) die einzelnen Kammern mit den zuführenden Schläuchen, (1) Aussparung, in die die BioVaSc eingespannt wird, (2) Dichtring. (C) mit einem Rahmen (1) eingespannte und so fixierte BioVaSc (2).

Zugeführte Luft und das Zellkulturmedium werden laminar über die Zellen geleitet (Abbildung 30). In Abbildung 32 ist der Fluss des Zellkulturmediums in Strömungslinien dargestellt. Das Medium strömt mit einer Geschwindigkeit von 4 m/s durch das untere Kammersystem. Durch eine breite Einströmöffnung und den flachen Eintrittswinkel werden Turbulenzen vermieden und eine gleichmäßige mechanische Stimulation der Zellen ermöglicht (Abbildung 32 B).



**Abbildung 32** Simulation des einströmenden Mediums in den Bioreaktor: (A) Strömungslinien, (B) Strömungsgeschwindigkeit im Kammersystem

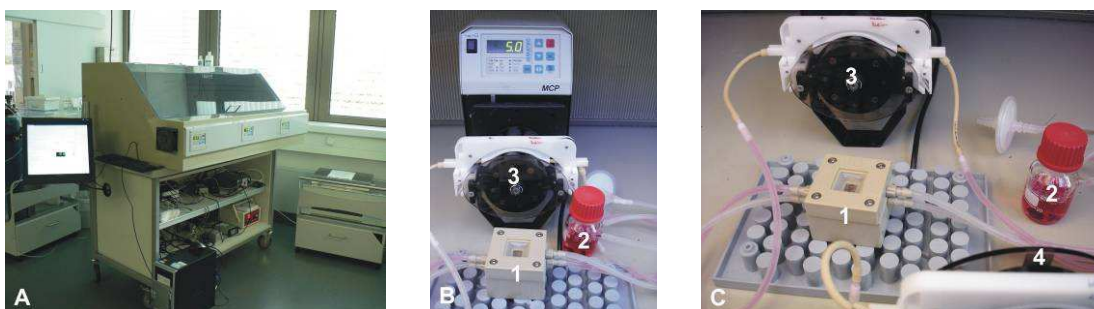
Die Respiration zur Stimulation der Zellen wurde mit einer Durchströmung der oberen Kammer mit einer Geschwindigkeit von 2 ml Luft / sec nachgestellt. Insbesondere bei der mechanischen Stimulation sollten Turbulenzen vermieden werden und eine gleich bleibende mechanische Beanspruchung der Zellen in der gesamten Kammer erfolgen (Abbildung 33).



**Abbildung 33** Simulation der einströmenden Luft in die obere Kammer des Bioreaktors: (A) Strömungslinien, (B) Strömungsgeschwindigkeit im Kammer-System.

Das System wurde in einen Brutschrank mit eingebauten Rollerpumpen überführt, (Abbildung 34 A) die Schläuche über Reiter in die Rollerpumpen eingehängt und das System über einen Computer gestartet und gesteuert.

Der Bioreaktor kann parallel an 2 Rollerpumpen angeschlossen werden (Abbildung 34 C). Eine Pumpe übernimmt dabei die Versorgung der Zellen mit dem Zellkulturmedium, indem sie es mit einer konstanten Drehzahl von 5 U/min durch die untere Kammer pumpt. Das entspricht einem Fluss von 3,8 ml Medium / min. Der Druck wurde dabei nicht gemessen, es sollte lediglich eine kontinuierliche Versorgung der Zellen mit dem Zellkulturmedium sichergestellt werden.



**Abbildung 34** (A) Mobiler Brutschrank zur Kultivierung der Bioreaktorsysteme, (B, C) Rollerpumpen (3,4) mit angeschlossenem Trachea-Bioreaktor (1) und Schottflasche mit Zellkulturmedium (2).

Eine zusätzliche Rollerpumpe wird sinusförmig mit einer Amplitude von 28,7 U/min und einer Frequenz von 10 pro Minute angesteuert und sorgt damit für die mechanische Stimulation der Epithelzellen durch einen Luftstrom. Die Fördermenge an Luft, die in einer Minute über die Zellen geleitet werden konnte, betrug damit 20 ml. Umgerechnet auf die Fläche von 1 cm<sup>2</sup> im Reaktor mit Zellen, die so

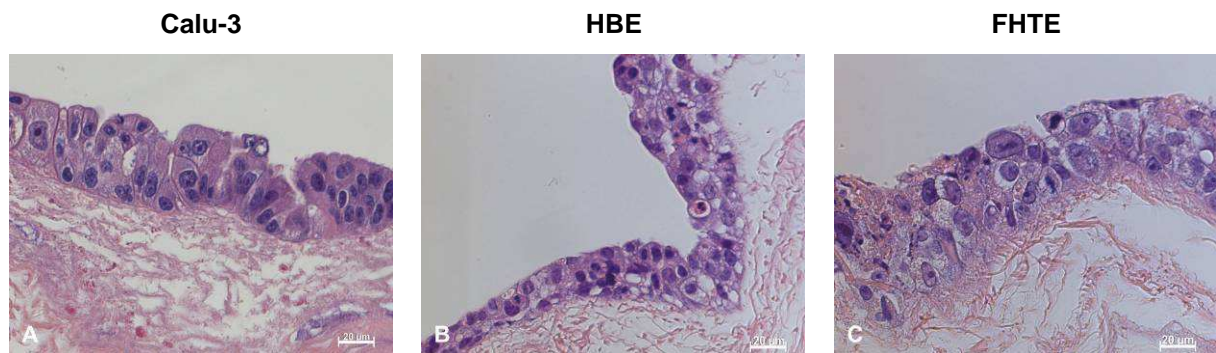


mechanisch stimuliert werden soll, entspricht diese Menge der Hälfte des Atemzugvolumens eines Erwachsenen in Ruhe.

Die Luft wird direkt aus dem Inkubationsschrank mit einer Temperatur von 37°C durch einen Sterilfilter eingesaugt, zur Anfeuchtung zunächst durch die Zellkulturvorratsflasche und dann über die Zellen geleitet.

#### 4.1.4.2 Dynamische Kultur zur Etablierung des Trachea Gewebemodells

Alle 3 Zelllinien wurden dynamisch auf der BioVaSc für 1 Woche unter den oben genannten Bedingungen kultiviert. Insgesamt wurden 30 Tracheamodelle im Bioreaktor aufgebaut.



**Abbildung 35** HE-Färbung dynamisch kultivierter Zelllinien auf der BioVaSc: (A) Calu-3, (B) HBE, (C) FHTE

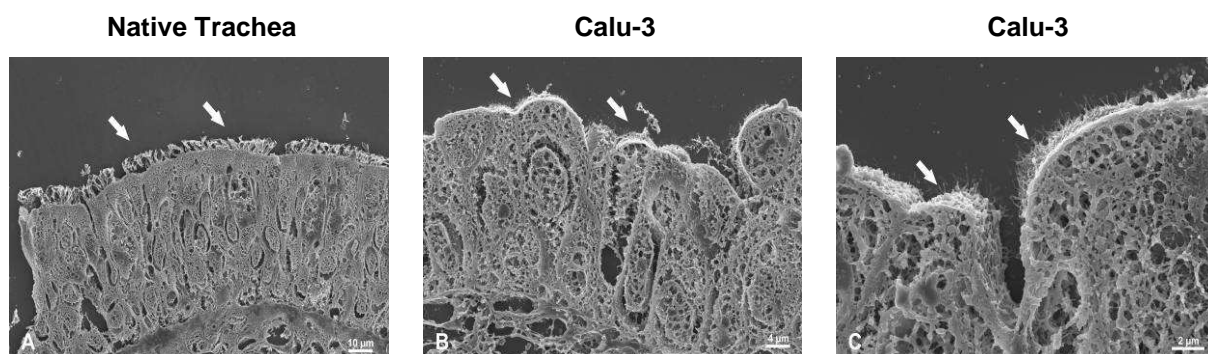
Nur die Calu-3-Zelllinie zeigte nach der dynamischen Kultivierung ein hochprismatisches Zellwachstum (Abbildung 35) und wies damit eine den nativen Trachea-Epithelzellen ähnliche Morphologie auf (Abbildung 36). Die immortalisierten Zellen HBE und FHTE bildeten zwar einen geschlossenen Zelllayer und zeigten eine gute Proliferation, bildeten jedoch keine hochprismatischen Zellen.



**Abbildung 36** HE-Färbung: (A) native humane Trachea-Epithelzellen, (B) dynamisch kultivierte Calu-3 Zellen

Da sich die Zellen hochprismatisch entwickelt hatten (Abbildung 36 B) und sich im Phasenkontrastmikroskop nicht klar erkennen ließ, ob es sich um bei den aufgelagerten Strukturen um Zilienansätze handelte, wurde über das REM zusätzlich die Ausbildung ziliärer Strukturen untersucht (Abbildung 37).

Ein Vergleich der dynamisch kultivierten Calu-3 auf der BioVaSc (Abbildung 37 B, C) mit Trachea-Epithelzellen der humanen Luftröhre (Abbildung 37 A) zeigte keine Ausbildung ziliärer Strukturen auf den Calu-3-Zellen, wie sie im Flimmerepithel vorkommen.

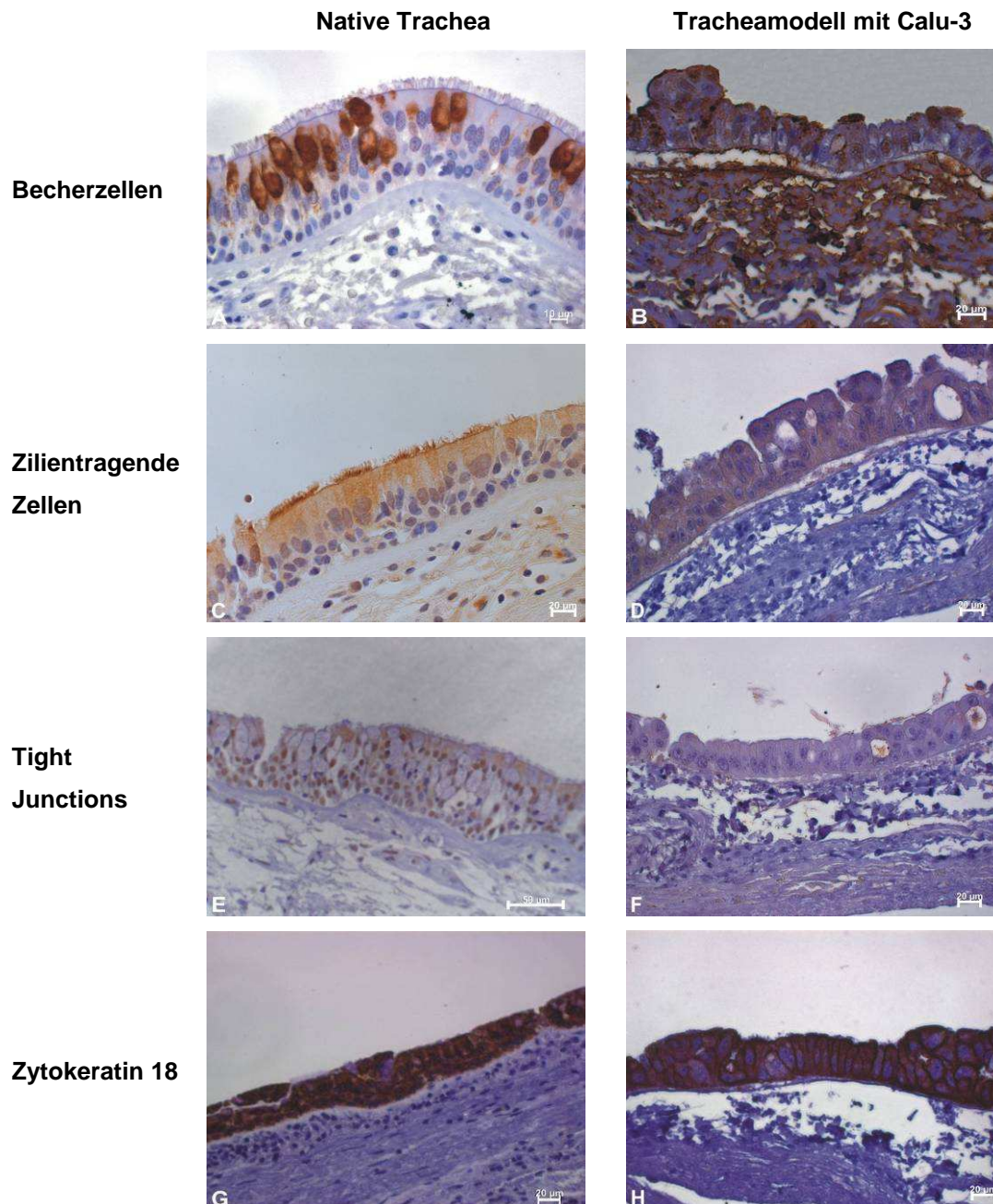


**Abbildung 37** REM-Aufnahmen: (A) nativer humane Trachea-Epithelzellen, (B, C) dynamisch kultivierter Calu-3 auf der BioVaSc. Die Pfeile markieren die Lage der Zilien auf den Epithelzellen.

Aufgrund der hochprismatischen Morphologie, die die Calu-3 unter der dynamischen Kultivierung ausbildeten und die der Morphologie der humanen Trachea-Epithelzellen entspricht, wurden die weiterführenden Experimente mit dieser Zelllinie durchgeführt.

#### 4.1.4.3 Charakterisierung der Zelllinie Calu-3 nach der dynamischen Kultivierung

Getestet wurden Marker, die bereits auch in der Monolayerkultur und in der statischen Kultivierung untersucht worden waren.



**Abbildung 38** Immunhistochemischer Nachweis der nativen humanen Trachea-Epithelzellen im Vergleich zu dynamisch kultivierten Calu-3 auf der BioVaSc: (A, B) Nachweis von Becherzellen (Anti-Gastric Mucin), (C-D) Nachweis zilientragender Zellen (Anti-FoxJ1), (E, F) Nachweis der Tight Junctions (Anti-Zonula Occludens), (G, H) Nachweis differenzierter Zellen (Anti-Zytokeratin 18)



Becherzellen konnten in den dynamischen Kulturen der Calu-3 nicht spezifisch nachgewiesen werden, sowohl die BioVaSc, als auch die Calu-3-Zellen zeigten eine Braunfärbung (Abbildung 38 B). Positiv verliefen dagegen die Färbungen gegen zilientragende Zellen, hier wurden die Calu-3 leicht angefärbt (Abbildung 38 D). Der Nachweis der Tight Junctions (Abbildung 38 F) zeigte ebenfalls nur sehr leicht gefärbte Zellen, obwohl diese eine geschlossene Zellschicht und ein hochprismatisches Wachstum zeigten.

Beim Nachweis differenzierter Zellen (Abbildung 38 H) zeigten die Calu-3 eine sehr starke Färbung. Morphologisch zeigten die Zellen immer einen geschlossenen Zelllayer und hatten sich hochprismatisch entwickelt. In Tabelle 39 ist die statische vergleichend zur dynamischen Kultivierung dargestellt, wobei in der statischen Kultivierung alle untersuchten Marker nachgewiesen werden konnten. In der dynamischen Kultivierung dagegen konnten nur die zilientragenden und differenzierten Zellen spezifisch nachgewiesen werden.

**Tabelle 39** Ausgebildete Zellmarker nach der statischen und dynamischen Kultivierung der Zelllinie Calu-3 auf der BioVaSc (- = keine Färbung, + = spezifische Färbung, -/+ = leichte Färbung)

	<b>Statische Kultivierung</b>	<b>Dynamische Kultivierung</b>
<b>Untersuchte Zellmarker zum Nachweis von:</b>	Calu-3	Calu-3
Becherzellen	+	-/+
Zilientragende Zellen	+	+
Tight Junctions	+	-/+
Differenzierte Zellen	+	+

## **4.2 Untersuchungen zur Einschätzung des Gefährdungspotentials von Nanomaterialien**

### **4.2.1 Dispergierung und Charakterisierung von Nanomaterialien**

Zur Untersuchung des Gefährdungspotentials von Nanomaterialien müssen Dosis-Wirkungsverhältnisse erstellt werden. Dies setzt die Herstellung stabiler Dispersionen der zu testenden Probenmaterialien mit definierten Konzentrationen und einheitlichen Partikelgrößen voraus.

Als Dispergierungsmittel für die verwendeten Nanomaterialien wurde in der vorliegenden Arbeit das Zellkulturmedium DMEM mit einem 10%tigen Gehalt an FCS ausgewählt. Diese Entscheidung beruhte zum einen darauf, dass das Dispergierungsmittel für die geplanten zellbasierten Testungen keinen zellschädigenden Effekt aufweisen sollte. Zum anderen fand eine Abstimmung des Dispergierungsmittels der 3 BMBF geförderten Konsortien TRACER, INOS und NanoCare zur Risikobewertung von Nanomaterialien statt, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

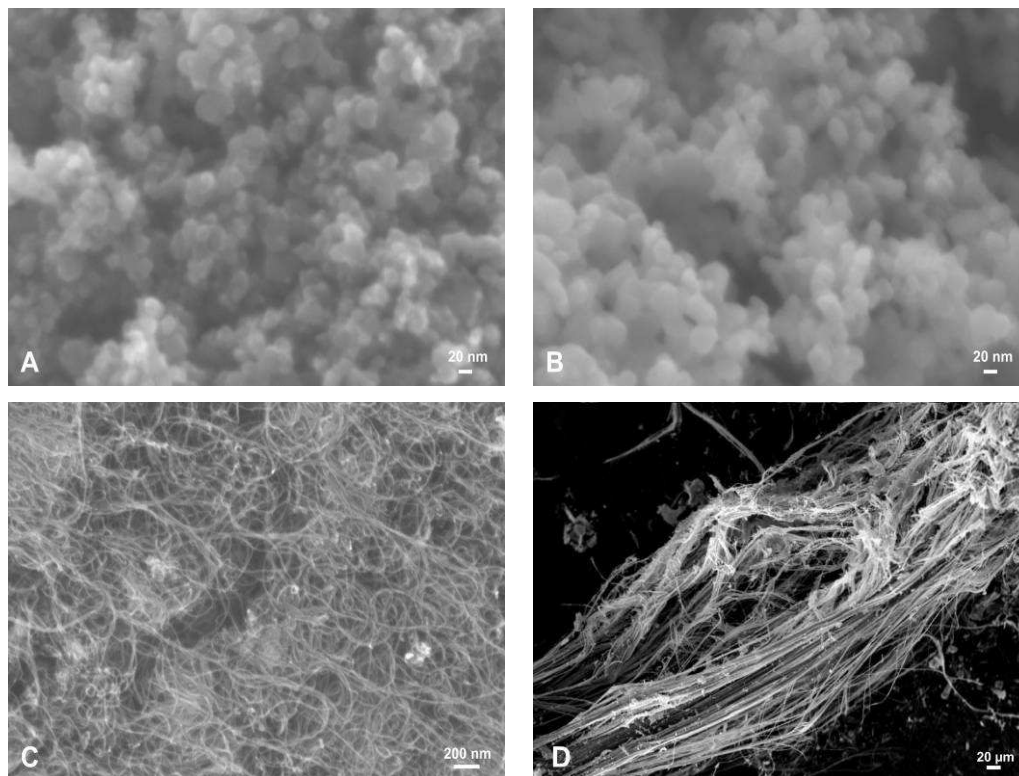
Für die Herstellung der Dispersionen wurden jeweils 5 mg des Probenmaterials Carbon Black (Abbildung 39 A), Multiwalled Carbon Nanotube (Abbildung 39 C), Titandioxid (Abbildung 39 B), und Blauasbest (Bild nicht gezeigt), als Kontrollmaterial mit bekanntem Gefährdungspotential, in ein Glasgefäß eingewogen.

Es schloss sich eine Sterilisation der Materialien bei 160°C über Nacht an. Am nächsten Tag wurden jeder Probe jeweils 10 ml Dispergierungslösung zugegeben. Die Blauasbestfasern mussten zur Zerkleinerung für 30 Sekunden mit dem Ultrathurax behandelt werden.

Bei der Herstellung der Dispersionen wurden alle Proben 2 Mal für jeweils 15 s im Ultraschallbad inkubiert, um eine Homogenisierung der Dispersionen zu erreichen. Vorhandene größere Agglomerate sollten somit in kleinere gespalten und idealerweise eine Nanopartikel-Dispersion generiert werden. Rein optisch zeigten sich aber auch nach der Ultraschallbehandlung größere Agglomerate in den Dispersionen, die sich nach 1 h durch eine Reagglomeration der Partikel Carbon Black und den Carbon Nanotubes noch verstärkte. Dabei war es unerheblich, ob die Proben bei Raumtemperatur oder 4°C gelagert wurden. Das Titandioxid und das

Blauasbest bildeten keine Agglomerate, setzen sich ab und bildeten bei einer Lagerung von 24 h ein Pellet. Vor Verwendung der Proben für die Versuche wurden die Dispersionen daher für 10 s gevortext.

Die Partikelgrößen konnten mit dem REM charakterisiert werden. Aufnahmen der Proben mit dem Rasterelektronenmikroskop können jedoch nur in trockenem Zustand durchgeführt und nicht leitende Stoffe, wie z.B. das Titandioxid, mussten mit Platin beschichtet werden. Durch die Agglomeratbildung der Materialien auch im trockenen Zustand war nur eine Abschätzung der Größen einzelner Partikel möglich (Abbildung 39).



**Abbildung 39** Aufnahmen der Nanomaterialien mit dem Rasterelektronenmikroskop. (A) Carbon Black Partikel, (B) Titandioxid Partikel, (C) Multiwalled Carbon Nanotubes, (D) Blauasbest-Fasern (Bildquelle: [www.enius.de/schadstoffe/Krokydololith.html](http://www.enius.de/schadstoffe/Krokydololith.html))

Für das Carbon Black (Abbildung 39 A) konnten Partikel detektiert werden, die eine Größe von 20 - 50 nm aufwiesen, der Hersteller machte keine Angaben zur Partikelgröße. Die Titandioxid Partikel zeigten eine durchschnittliche Größe von 20 nm (Abbildung 39 B), laut Herstellerangaben beträgt sie 25 nm. Die Multiwalled Carbon Nanotubes wiesen im Gegensatz zu den beiden anderen untersuchten Nanomaterialien eine faserförmige Struktur auf (Abbildung 39 C). Im Durchmesser

können die Röhren 10 - 100 nm messen, die Länge kann von wenigen nm bis in den  $\mu\text{m}$ -Bereich variieren. Eindeutigere Längenangaben sind durch die starke Agglomeration nicht möglich. Das Blauasbest (Abbildung 39 D) kann einen Durchmesser von 100 nm und mehr aufweisen, je nachdem, ob sich mehrere Fasern zusammengelagert haben. Da sich die Fasern der Länge nach aufspalten können, variiert der Durchmesser, die Länge kann bis in den mm-Bereich reichen.

Neben der Bestimmung der Größe der einzelnen Partikel konnte auch mittels der BET-Methode die spezifische Oberfläche der Nanomaterialien ermittelt werden (Tabelle 40).

**Tabelle 40** Ermittlung der spezifischen Oberfläche mittels BET

<b>Untersuchte Substanz</b>	<b>Gemessene spezifische Oberfläche [<math>\text{m}^2/\text{g}</math>]</b>
Titandioxid	49,287
Carbon Nanotubes	153,824
Carbon Black	313,084

Eine Messung der Partikelgrößenverteilung durch die Photonenkorrelations-spektroskopie (PCS) war im Zusammenhang mit der Verwendung des DMEM und FCS als Dispergierungsmittel und der starken Agglomeration unmöglich.

Auch eine Messung des elektrischen Potentials der Partikel (Zetapotential) war nicht möglich, da durch die Dispergierung der Partikel in DMEM mit FCS keine stabile Dispersion hergestellt werden konnte.

Weitere Untersuchungen zur effizienten Charakterisierung dispergierter Nanomaterialien müssen daher angestrebt werden.

#### **4.2.2 Einsatz des 3D Tracheamodells als Testsystem**

Da die Calu-3-Zellen mit der Ausbildung der hochprismatischen Morphologie den Zellen der humanen Trachea stark ähnlich sind, wurden die Calu-3 zum Aufbau mehrerer Tracheamodelle zur Testung der Nanotoxizität eingesetzt.

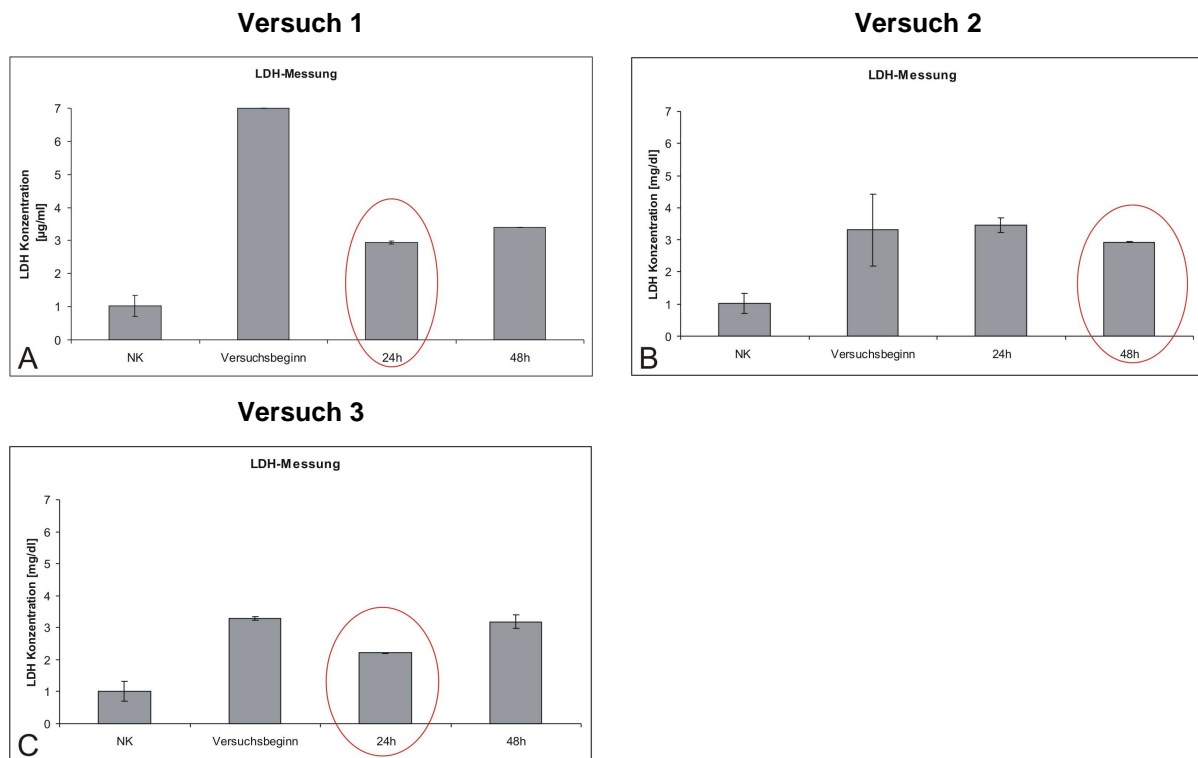
Getestet wurde das Referenzmaterial Carbon Black (CB) in Pulverform (Abbildung 40).



**Abbildung 40** Nanotoxikologischer Versuch: (A) Negativkontrolle, hier wurde kein Carbon Black aufgestäubt, (B, C) Tracheamodell mit aufgestäubten CB Partikeln.

Entsprechend den Hautmodellen lagerten sich die aufgestäubten Carbon Black Partikel in Agglomeraten auf den Zellen ab. Penetrierte Partikel konnten mit dem Phasenkontrastmikroskop nicht erkannt werden. Mittels eines Laktat-Dehydrogenase (LDH)-Assays wurden die nach 24 h und 48 h abgenommenen Medienüberstände aus 3 Versuchen untersucht. Mit dem LDH-Test lassen sich abgestorbene Zellen über die Membranschädigung quantitativ nachweisen, da das im Cytoplasma vorhandene Enzym LDH bei einer Zerstörung der Zellmembran in den Medienüberstand abgegeben wird.

Als Negativkontrolle wurde jeweils das zur Kultivierung verwendete Calu-3-Zellkulturmedium mitgemessen. Das vor dem Versuchsbeginn im Bioreaktor vorhandene Medium nach einer Kultivierungsdauer von 1 Woche wurde ebenfalls abgenommen und untersucht, bevor es für die nanotoxikologischen Tests erneuert wurde.



**Abbildung 41** LDH-Messung nach der Durchführung nanotoxikologischer Tests mit Carbon Black an 3 aufgebauten Tracheamodellen (A-D) (n = 3)

NK = Negativkontrolle (Zellkulturmedium), Versuchsbeginn = Zellkulturmedium nach 1 Woche Kultivierung der Calu-3-Zellen im Bioreaktor, 24 h = 24 h nach Versuchsbeginn abgenommenes Zellkulturmedium, 48 h = 48 h nach Versuchsbeginn abgenommenes Zellkulturmedium

In Versuch 2 und 3 (Abbildung 41) wiesen die Werte des Zellkulturmediums nach 1 Woche Kultivierung jeweils 3  $\text{mg/dl}$  auf und es kann davon ausgegangen werden, dass die Zellen in beiden Versuchen gleich gut proliferierten, bzw. ein gleicher Anteil der Zellen in diesem Zeitraum abgestorben war. In Versuch 1 dagegen war der Wert zu Versuchsbeginn mehr als doppelt so hoch (Abbildung 41). Es waren demnach viel mehr Zellen nach 1 Woche abgestorben als vergleichsweise in den Reaktoren der Versuche 2 und 3.

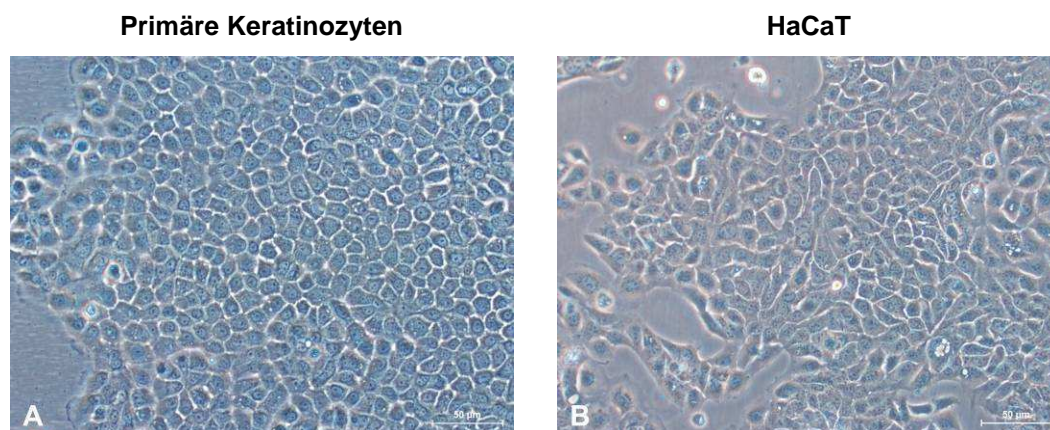
Nach Zugabe des Carbon Black Pulvers zeigten alle Versuche (Abbildung 41) mit 2-3  $\text{mg/dl}$  gemessenes LDH vergleichbare Werte. Während sich 48 h nach Versuchsbeginn in Versuch 1 und 3 ein Anstieg des LDH-Wertes zeigte, fiel der Wert in Versuch 2 ab.

### 4.3 Aufbau und Einsatz der 3D Hautmodelle

In der vorliegenden Arbeit wurden die Ergebnisse zum Gefährdungspotential von Nanopartikeln an Monolayer-Zellkulturen mit den Daten aus 3D-Gewebemodellen vergleichend untersucht und neue Messmethoden für die Nanotoxikologie etabliert. Für die Tests kamen sowohl primäre Keratinozyten als auch die Zelllinie HaCaT zum Einsatz.

#### 4.3.1 Monolayer Versuche an verschiedenen Hautzelltypen

Zum Aufbau von Monolayerkulturen wurden primäre Keratinozyten, isoliert aus humanem Hautbiopsiematerial, und die Keratinozyten-Zelllinie HaCaT eingesetzt. Zur Etablierung von Standardtest für die Toxizitätsstudien in der Nanotoxikologie wurden zunächst Versuche an Monolayerkulturen durchgeführt. Die Zellkulturen wurden dazu in Inserts aufgebaut, um eine Trennung der apikal in die Inserts zugegebenen Nanopartikel und der basal entnommenen Proben zu gewährleisten.

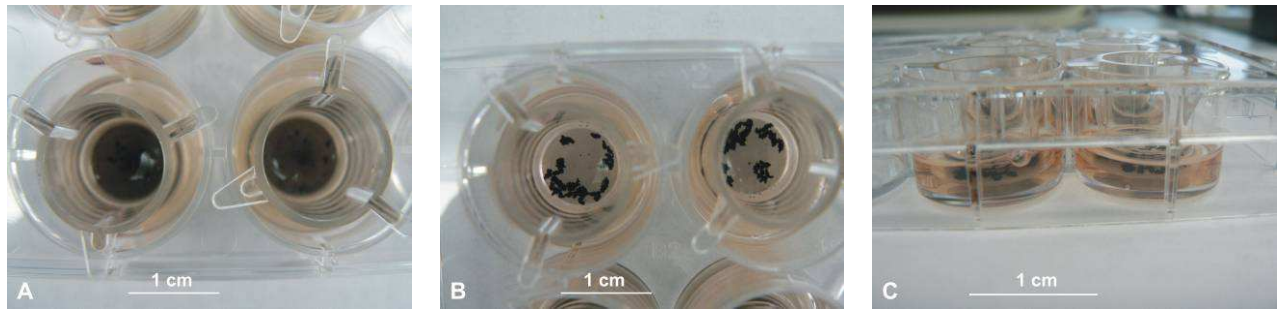


**Abbildung 42** Phasenkontrastaufnahmen von Monolayerkulturen in Zellkulturflaschen:

(A) primäre humane Keratinozyten, (B) Zelllinie HaCaT

Da die Inserts nicht mikroskopierbar waren, wurden zur Überprüfung der Konfluenz parallel Zellen in entsprechende Well-Platten ausgesät und darin die Konfluenz überwacht.

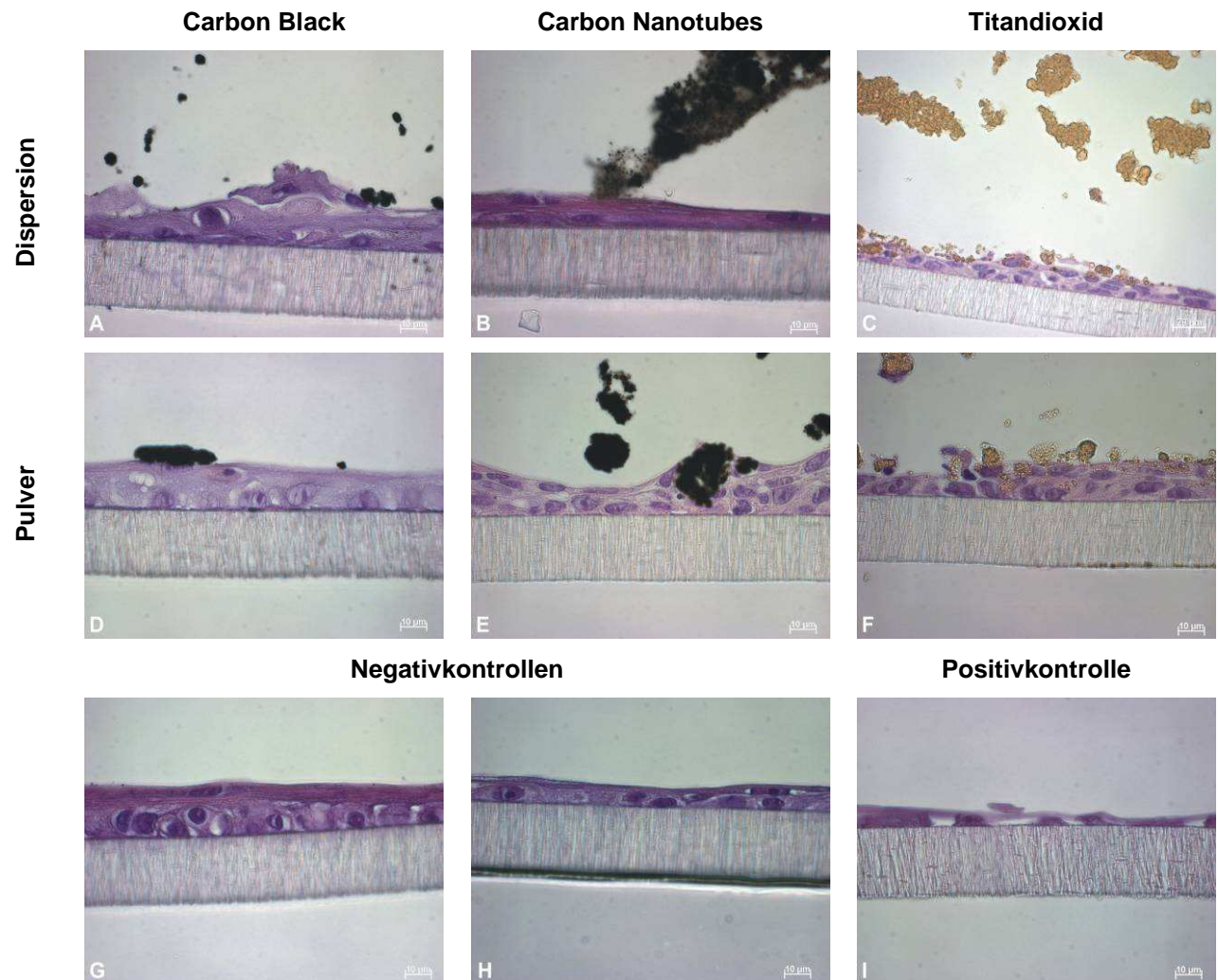
Die Zellen bildeten konfluente Zellschichten auf den Inserts und unterschieden sich morphologisch nur geringfügig voneinander. Während die primären Keratinozyten eine kubische Zellform ausbildeten (Abbildung 42 A), wuchsen die HaCaT auch teilweise in länglichere Zellformen (Abbildung 42 B). Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat für die Versuche eingesetzt.



**Abbildung 43** Hänge-Inserts mit Zellen und darauf aufgetragenen Proben (A) CNT-Dispersion, (B) CNT-Pulver, (C) Inserts in der Seitenansicht, hier ist die basolaterale Versorgung mit Medium zu erkennen.

Für die Versuche wurden die Dispersionen und Pulver apikal auf die Zellschicht gegeben (Abbildung 43) und entsprechend inkubiert. Am Versuchsende wurden die Zellen fixiert und Schnitte angefertigt. Exemplarisch sind hier die Versuche mit den primären Keratinozyten gezeigt.





**Abbildung 44** HE-Färbung der Inserts mit primären Keratinozyten und aufgetragenen Proben: (A) Dispersion Carbon Black (CB), (B) Dispersion Multiwalled Carbon Nanotubes (CNT), (C) Dispersion Titandioxid, (D) Pulver CB, (E) Pulver CNT, (F) Pulver Titandioxid, (G) Negativkontrolle Keratinozytenbasalmedium (KBMr), (H) Negativkontrolle DMEM/FCS, (I) Positivkontrolle SDS

Im Phasenkontrastmikroskop konnten keine in Zellen penetrierten Partikel festgestellt werden. Das untersuchte Nanomaterial zeigte stets die Bildung von Agglomeraten (Abbildung 44 A-F), die sich auf den Zellen ablagerten. Eine direkte Wirkung der Partikel auf die Zellen ließ sich durch diese Methode nicht feststellen. Die Negativkontrolle KBMr (Abbildung 44 G) zeigte einen gut ausgebildeten Monolayer der Keratinozyten. Bei der Negativkontrolle DMEM/FCS (Abbildung 44 H) war ebenfalls ein geschlossener Monolayer erkennbar. Keratinozyten, die jedoch mit SDS als Positivkontrolle behandelt worden waren, wurden geschädigt und der geschlossene Zelllayer hatte sich aufgelöst (Abbildung 44 I). Primäre Keratinozyten und die Zelllinie HaCaT zeigten in den durchgeführten Versuchen vergleichbare Ergebnisse.

Da histologisch keine Aussage über einen möglichen Einfluss der Nanopartikel getroffen werden konnte, wurden in weiteren Tests Entzündungsmarker gemessen, um die Reaktion der Zellen auf den Kontakt zu Nanopartikel-Agglomeraten zu untersuchen.

#### **4.4 Messung freigesetzter Entzündungsmarker an Keratinozyten- und HaCaT-Monolayerkulturen**

Zum Nachweis exprimierter Entzündungsmediatoren wurden ELISA-Tests eingesetzt. Für eine parallele Untersuchung mehrerer Marker gleichzeitig erwies sich die Verwendung eines Multiplex-Tests und die anschließende Auswertung über das FACS als geeignet.

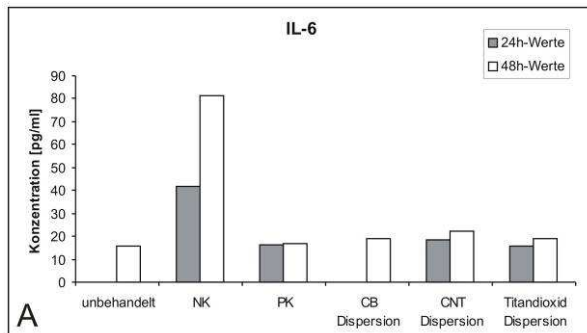
##### **4.4.1 Messung freigesetzter Entzündungsmarker in der Keratinozyten-Monolayerkultur**

Mit den Medienüberständen aus den zuvor am Monolayer durchgeführten Tests wurde eine FlowCytomix-Analyse durchgeführt, bei der die folgenden Entzündungsmarker gemessen werden konnten: das Monozyten-Entzündungs-Protein 1alpha (MIP-1alpha), das Chemokin 8 (IL-8), der Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (G-CSF), das Interleukin 6 (IL-6) und das Interleukin 4 (IL-4).

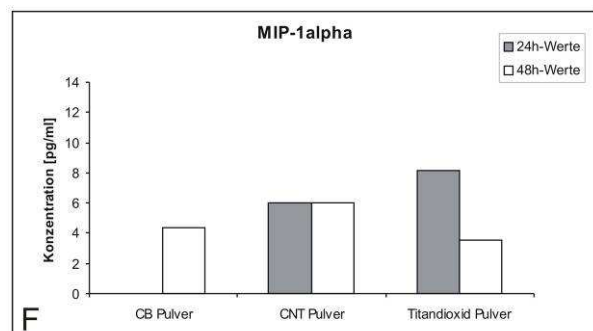
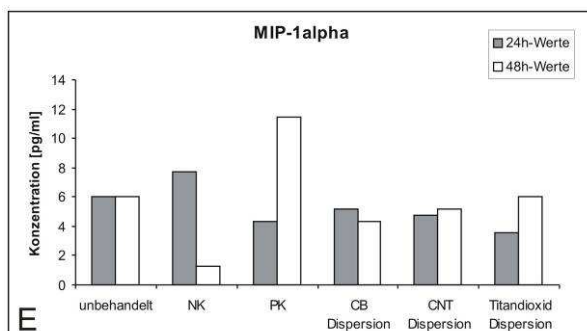
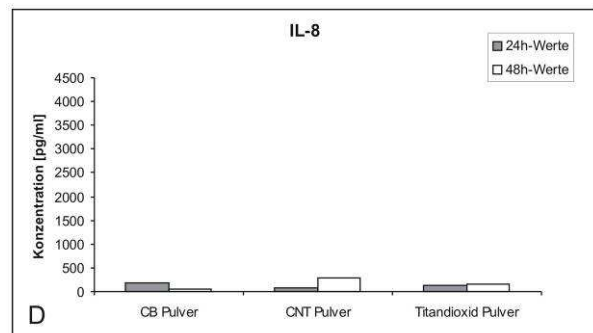
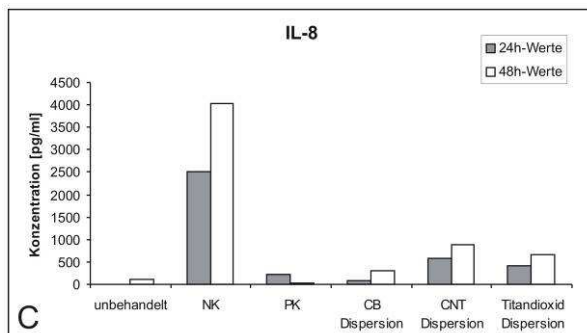
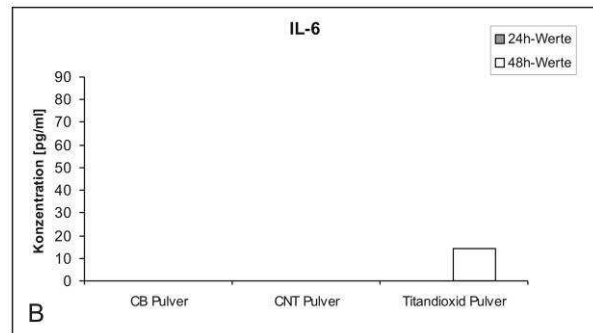
Da die Messungen nur einmal ( $n = 1$ ) durchgeführt wurden, handelt es sich bei den angegebenen Werten um Absolutwerte, eine Standardabweichung wurde nicht berechnet.

## Vergleich der Entzündungsreaktionen der primären Keratinozyten auf die aufgetragenen Dispersionen und Pulver

### Dispersionen 500 µg/ml



### Aufgestäubte Pulver



**Abbildung 45** Messung verschiedener Entzündungsmarker an Keratinozyten-Monolayerkulturen:

(A, B) IL-6-Messung, (C, D) IL-8 Messung, (E, F) MIP-1alpha Messung. (n = 1)

Unbehandelt = Keratinozytenbasalmedium (KBM), NK = Dispergierungsmittel DMEM/FCS,

PK = Positivkontrolle (SDS), CB = Carbon Black, CNT = Carbon Nanotubes

In Abbildung 45 waren die immer sehr hohen Werte der Negativkontrolle DMEM mit 10%igem FCS auffallend.

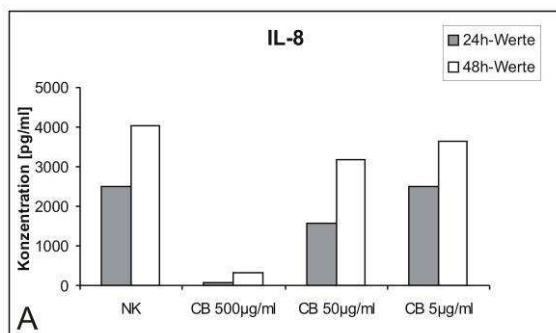
Die Positivkontrolle zeigte bei den gemessenen Marker IL-6 und IL-8 niedrigere Werte als die Negativkontrolle (Abbildung 45 A, C). Die Pulver zeigten ebenfalls für das IL-6 und IL-8 niedrigere Werte als für die getesteten Dispersionen. Nur bei dem Marker MIP-1alpha waren die gemessenen Werte für die Dispersionen und Pulver vergleichbar (Abbildung 45 E, F)

Ebenfalls nachgewiesen werden konnten die Marker IL-4 und G-CSF (Bild nicht gezeigt), die jedoch nur in geringen Mengen exprimiert wurden.

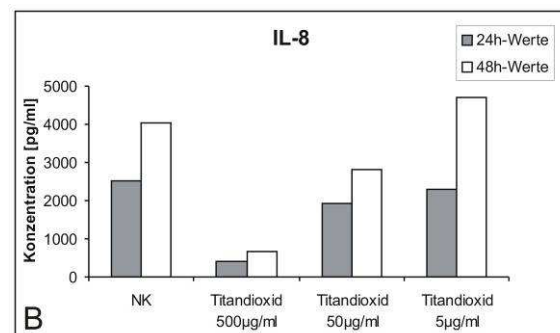
Im gleichen Versuchsansatz wurde auch getestet, ob sich eine Konzentrationsänderung der Dispersionen auf die Zellreaktionen auswirkt. Beispielhaft wurden Carbon Black und Titandioxid in jeweils 3 unterschiedlichen Konzentrationen getestet (500 µg/ml, 50 µg/ml und 5 µg/ml).

### Vergleich unterschiedlicher Konzentrationen der Dispersionen auf exprimierte Entzündungsmarker der primären Keratinozyten

#### Carbon Black (5-500 µg/ml)



#### Titandioxid (5-500 µg/ml)



**Abbildung 46** Messung des Entzündungsmarkers IL-8 nach dem Auftragen unterschiedlicher Konzentrationen an Carbon Black (A) und Titandioxid (B) NK = Dispergierungsmittel (DMEM/FCS), CB = Carbon Black. (n = 1)

Beispielhaft sind hier die Ergebnisse der Messung des Entzündungsmarkers IL-8 gezeigt, gemessen werden konnten daneben auch die Marker IL-6, MIP-1alpha und G-CSF. Die Messung von IL-8 24 h und 48 h nach dem Auftragen verschiedener Konzentrationen an CB und Titandioxid zeigten linear ansteigende Werte von der höchsten zur geringsten eingesetzten Konzentration (Abbildung 46). Die Messwerte für das IL-6 zeigten den gleichen Verlauf. Generell waren die gemessenen Werte der geringsten eingesetzten Konzentrationen vergleichbar mit der Interleukin-Expression der Negativkontrollen.

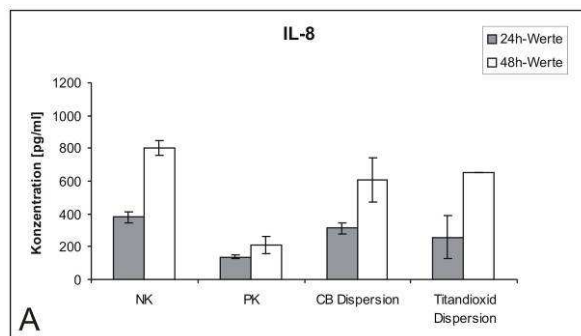
MIP-1alpha und G-CSF waren bei den Monolayerkulturen mit primären Keratinozyten zwar messbar, wiesen aber für die geringsten getesteten Konzentrationen nicht wie bei IL-6 und IL-8 die höchsten messbaren Werte auf. Problematisch war immer die Reaktion der Zellen auf die Negativkontrolle (DMEM/FCS), welches als Dispergierungsmittel eingesetzt wurde. Die hier gemessenen Werte lagen grundsätzlich sehr hoch.

#### 4.4.2 Messung freigesetzter Entzündungsmarker an der HaCaT-Monolayerkultur

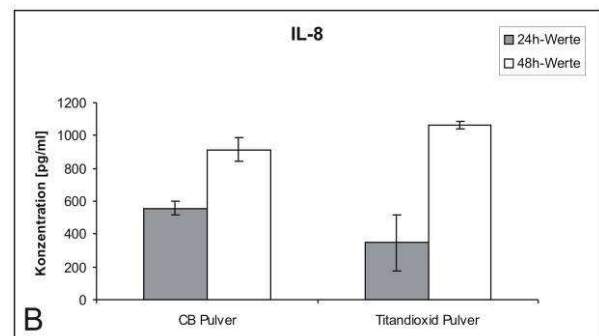
Mit den HaCaT-Monolayerkulturen wurden beispielhaft das Carbon Black und Titandioxid untersucht. Als Negativkontrolle diente in diesem Versuch das DMEM/FCS, welches neben der Verwendung als Dispergierungsmittel auch als Zellkulturmedium für die Zelllinie eingesetzt wurde.

##### Entzündungsreaktion der Zelllinie HaCaT auf die aufgetragenen Dispersionen und Pulver

###### Dispersionen (500 µg/ml)



###### Aufgestäubte Pulver



**Abbildung 47** Messung von IL-8 an HaCaT-Monolayerkulturen: (A) Testung von Dispersionen, (B) Testung von Pulver. (n = 3)

NK = Dispergierungsmittel DMEM/FCS, PK = Positivkontrolle (SDS), CB = Carbon Black

Als Entzündungsmarker konnte in dem Versuch mit den HaCaT-Monolayern nur das IL-8 detektiert werden.

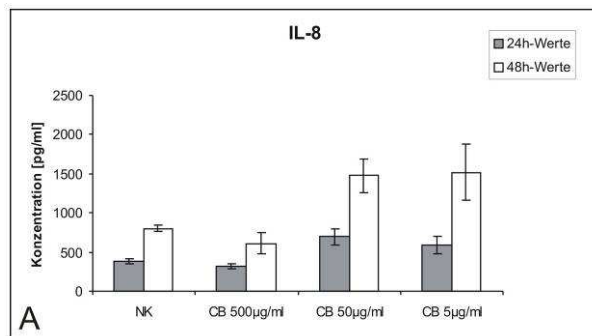
In Abbildung 47 zeigt die Negativkontrolle (DMEM/FCS) wieder im Vergleich zu den getesteten Proben hohe Werte, während die Positivkontrolle (SDS) den geringsten Anstieg an ausgeschleusten Entzündungsmediatoren verursachte.

Die Dispersionen und auch die Pulver wiesen immer nach 48 h einen Anstieg auf. Wie die primären Keratinozyten, zeigten auch die HaCaT nach dem Auftragen des reinen Dispergierungsmittels bereits einen Anstieg des Markers IL-8.

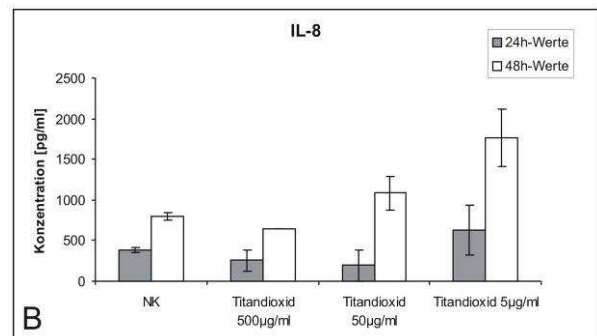
Daneben wurden ebenfalls unterschiedliche Konzentrationen an Carbon Black und Titandioxid untersucht (je 500 µg/ml, 50 µg/ml und 5 µg/ml), um einen möglichen Zusammenhang zwischen den Konzentrationen und den ausgeschleusten Entzündungsmarker zu untersuchen.

### Vergleich unterschiedlicher Konzentrationen der Dispersionen auf exprimierte Entzündungsmarker der Zelllinie HaCaT

#### Carbon Black (5-500 µg/ml)



#### Titandioxid (5-500 µg/ml)



**Abbildung 48** Messung des Entzündungsmarkers IL-8 nach dem Auftragen unterschiedlicher Konzentrationen an (A) Carbon Black und (B) Titandioxid. (n = 3) NK = Dispergierungsmittel (DMEM/FCS), CB = Carbon Black

Die gemessenen IL-8 Konzentrationen zeigten auch hier eine steigende Tendenz hin zur geringsten dispergierten Konzentration (Abbildung 48). Deutlich wird dies in den gemessenen Werten nach 48 h. Die Tendenz der IL-8 Konzentrationen entspricht den Konzentrationen, die auch bei den IL-8 Messungen der Proben aus dem Keratinozyten-Monolayer Versuch gemessen wurden. Bei den Konzentrationen von 5 und 50 µg/ml fällt jedoch auf, dass vor allem die nach 48 h gemessenen Werte eine deutlich höhere Expression an IL-8 aufweisen als die Negativkontrolle DMEM/FCS.

Im Vergleich der Versuche an Monolayerkulturen mit primären Keratinozyten und der Zelllinie HaCaT initiierte das Dispergierungsmittel grundsätzlich die Expression von Entzündungsmakern. Diese lagen vor allem in den Versuchen an primären Keratinozyten viel höher als die Werte der untersuchten Proben. Die Expression von IL-8 der Keratinozyten lag dabei mit bis zu 4000 pg/ml um den Faktor 5 höher als die gemessenen Werte der Zelllinie.

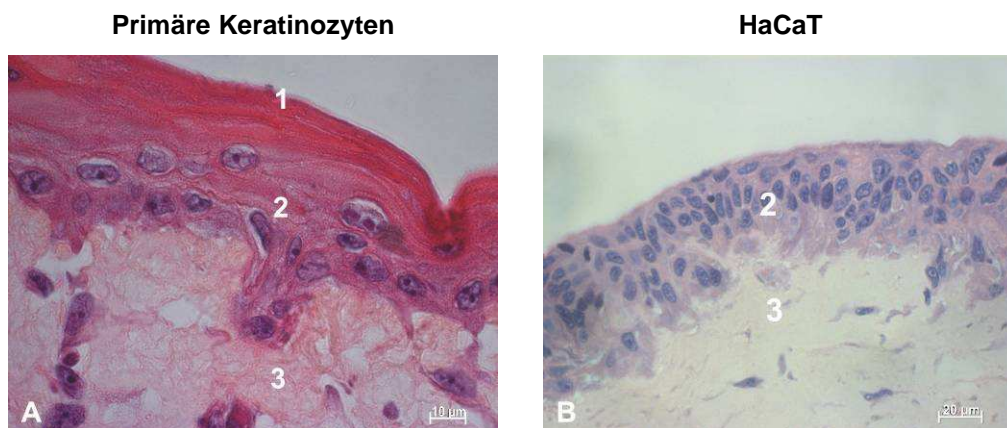
Da ein direkter Kontakt der Nanopartikel und Nanopartikel-Dispersionen *in vivo* nur stattfinden kann, wenn die Partikel auch bis zu den einzelnen Zellen vordringen und mit ihnen in Kontakt treten, wurden 3D-Hautmodelle aufgebaut. An ihnen sollte untersucht werden, wie die Zellen in ihrer natürlichen Umgebung mit vorhandenen Barrierschichten, wie z.B. der Hornschicht, auf die Partikel reagieren.



#### 4.5 Aufbau der 3D-Hautmodelle mit primären Keratinozyten und der Zelllinie HaCaT

Als komplexeres Testsystem wurden 3D-Hautmodelle zur Testung des Risikopotentials von Nanomaterialien aufgebaut und eingesetzt.

Der Aufbau der Gele vor dem Einsatz als Testsystem wurde jeweils an Tag 9 der Airlift-Kultivierung durch eine HE-Färbung kontrolliert (Abbildung 49).

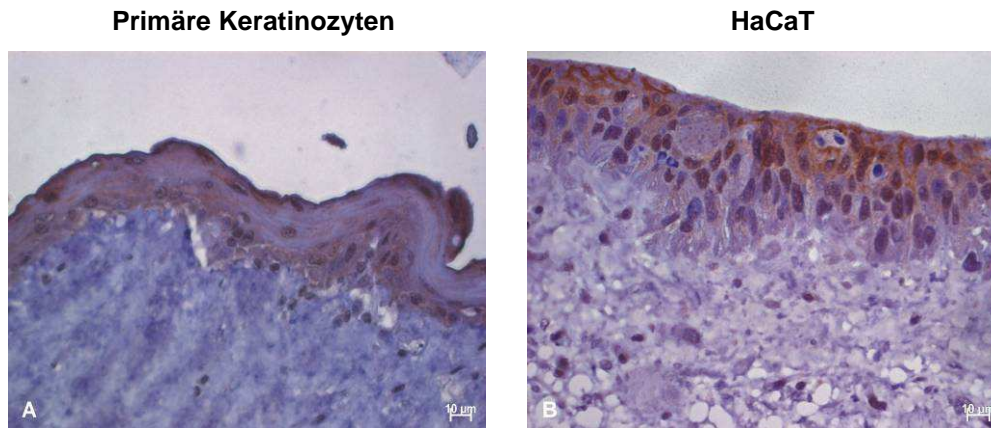


**Abbildung 49** HE-Färbung der 3D-Hautmodelle: (A) aufgebaut mit primären Keratinozyten, (B) aufgebaut mit der Zelllinie HaCaT. (1) Stratum corneum (Hornschicht), (2) Epidermis, (3) Dermis mit Fibroblasten.

Die 3D-Hautmodelle mit primären Keratinozyten zeigten in ihrem Aufbau die Ausbildung einer Hornschicht, die Epithelzellen proliferierten jedoch nicht so stark, sodass im Vergleich zur der Zelllinie HaCaT weniger Zelllagen vorhanden waren (Abbildung 49 A).

Da die Zelllinie generell eine stärkere Proliferation aufwies als die primären Zellen, war die epidermale Schicht stärker ausgeprägt und verfügte über mehrere Zellschichten. Allerdings sind die HaCaT-Zellen nicht in der Lage, eine Hornschicht auszubilden und verfügen damit nicht über diese wichtige Barrierestruktur (Abbildung 49 B).

Neben der Hämalaun-Eosin-Färbung wurden deshalb auch die Tight Junctions über eine Antikörperfärbung spezifisch angefärbt. Die *Zonula occludens* (tight junctions) bilden eine undurchlässige Kontaktzone zwischen benachbarten Epithelzellen. Für die Verwendung der Hautmodelle muss diese Barrierefunktion als Zeichen eines funktionellen Gewebeverbandes vorhanden sein.



**Abbildung 50** Immunhistochemischer Nachweis der Tight Junctions (Anti-Zonula Occludens) bei aufgebauten Hautmodellen: (A) mit primären Keratinozyten, (B) mit der Zelllinie HaCaT

Sowohl die Hautmodelle mit primären Zellen als auch die Gele mit der Zelllinie HaCaT zeigten eine Ausbildung der Tight Junctions (Abbildung 50). Das Vorhandensein dieses Gewebeverbandes auch bei der Zelllinie zeigte eine geschlossene Zellbarriere an, sodass diese Hautgele trotz fehlender Hornschicht ebenfalls als Testsysteme eingesetzt werden konnten.

#### 4.5.1 Das 3D-Hautmodell als Testsystem

Zur Untersuchung der Toxizität verschiedener Nanomaterialien wurden Hautmodelle mit primären Keratinozyten und der Zelllinie HaCaT aufgebaut und zunächst mit den hergestellten Dispersionen oder direkt mit dem Pulver in Kontakt gebracht. Anschließend wurde eine mögliche Penetration von Partikeln oder auftretende Schädigungen der Zellen histologisch entsprechend den Monolayerkulturen untersucht. Die Konzentration der Dispersionen betrug immer 500 µg/ml.

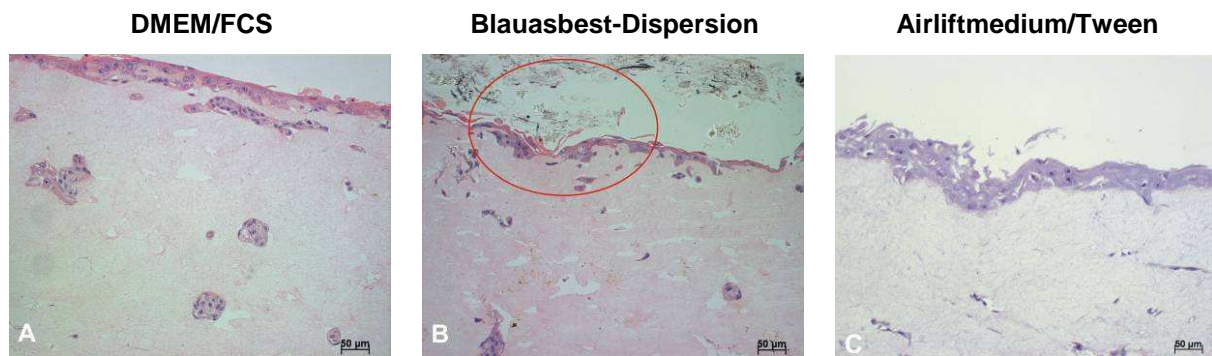
##### 4.5.1.1 Untersuchungen der Referenzsubstanzen an 3D-Hautmodellen mit primären Keratinozyten

Für alle Versuche wurden entsprechende Referenzsubstanzen mitgeführt, die als Negativ- oder Positivkontrollen dienen sollten. Als eine Negativkontrolle wurde DMEM/FCS eingesetzt, welches auch als Dispergierungsmittel für die Nanopartikel Verwendung fand. Weitere Negativkontrollen waren das Airliftmedium, welches bei der Kultivierung der Hautgele eingesetzt wurde und das Airliftmedium mit Tween. Letzteres wurde als alternatives Dispergierungsmittel für das DMEM/FCS getestet,



da dieses in den Monolayerversuchen stets sehr hohe Werte an exprimierten Entzündungsmarkern zeigte.

Als Positivkontrolle wurde Blauasbest (BA) eingesetzt, da hier der zellschädigende Effekt bekannt ist und oftmals ein Vergleich der röhrenförmigen Carbon Nanotubes mit Asbest gezogen wird.

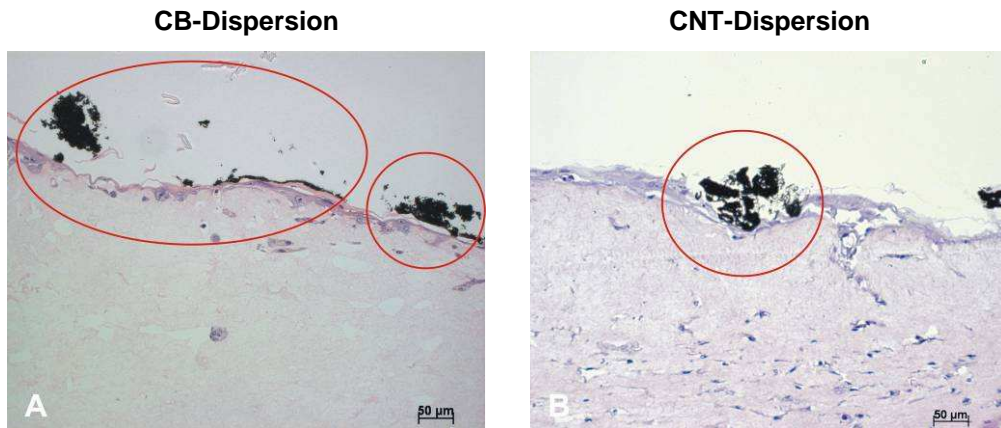


**Abbildung 51** HE-Färbung von 3D-Hautmodellen aufgebaut mit primären Keratinozyten, die mit verschiedenen Referenzsubstanzen in Kontakt gebracht wurden: (A) DMEM mit 10% FCS, (B) Blauasbest-Dispersion, (C) Airliftmedium / Tween

Die Hautgele unterschieden sich im Aufbau und der Dicke der Epidermis voneinander, welche zwischen 10-150 µm variierte. Das DMEM/FCS (Abbildung 51 A), das Airliftmedium (Abbildung 51 B) und auch die getestete Blauasbest-Dispersion (Abbildung 51 C) zeigten keine sichtbare zellschädigende Wirkung auf die Keratinozyten der mikroskopierten Hautgele.

#### 4.5.1.2 Untersuchung der Nanopartikel-Dispersionen an 3D-Hautmodellen mit primären Keratinozyten

Untersucht wurden Dispersionen der Nanomaterialien Carbon Black (CB), der Carbon Nanotubes (CNT) und des Titandioxids. Als Dispergierungsmittel wurde das Airliftmedium mit Tween eingesetzt. Abbildung 52 zeigt beispielhaft 2 Schnitte von Hautmodellen, die mit Nanopartikel-Dispersionen behandelt wurden. Exemplarisch wurden die Versuche mit Carbon Black und den Multiwalled Carbon Nanotubes durchgeführt.



**Abbildung 52** HE-Färbung von 3D-Hautmodellen aufgebaut mit primären Keratinozyten, die mit verschiedenen Nanopartikel-Dispersionen in Kontakt gebracht wurden: (A) Carbon Black-Dispersion (CB), (B) Multiwalled Nanotube-Dispersion (CNT)

Sowohl bei den Hautgelen, die mit einer CB-Dispersion als auch bei denen, die mit einer CNT-Dispersion behandelt wurden, war keine Penetration von Partikeln in die Epidermis erkennbar (Abbildung 52). Dabei war es unerheblich, welches Dispergierungsmittel verwendet wurde. Beispielhaft sind hier nur die Schnitte der Hautgele gezeigt, welche mit einer Dispersion behandelt wurden, die mit Pulver behandelten Hautmodelle zeigten histologisch dasselbe Bild.

Auffallend war immer eine starke Bündelung der CNT, die sich als kleine Agglomerate auf der epidermalen Schicht ablagerten (Abbildung 52 B). Das Carbon Black dagegen war feiner verteilt und bildete kleinere Aggregate, die sich ebenfalls auf der Epidermis ablagerten (Abbildung 52 A).

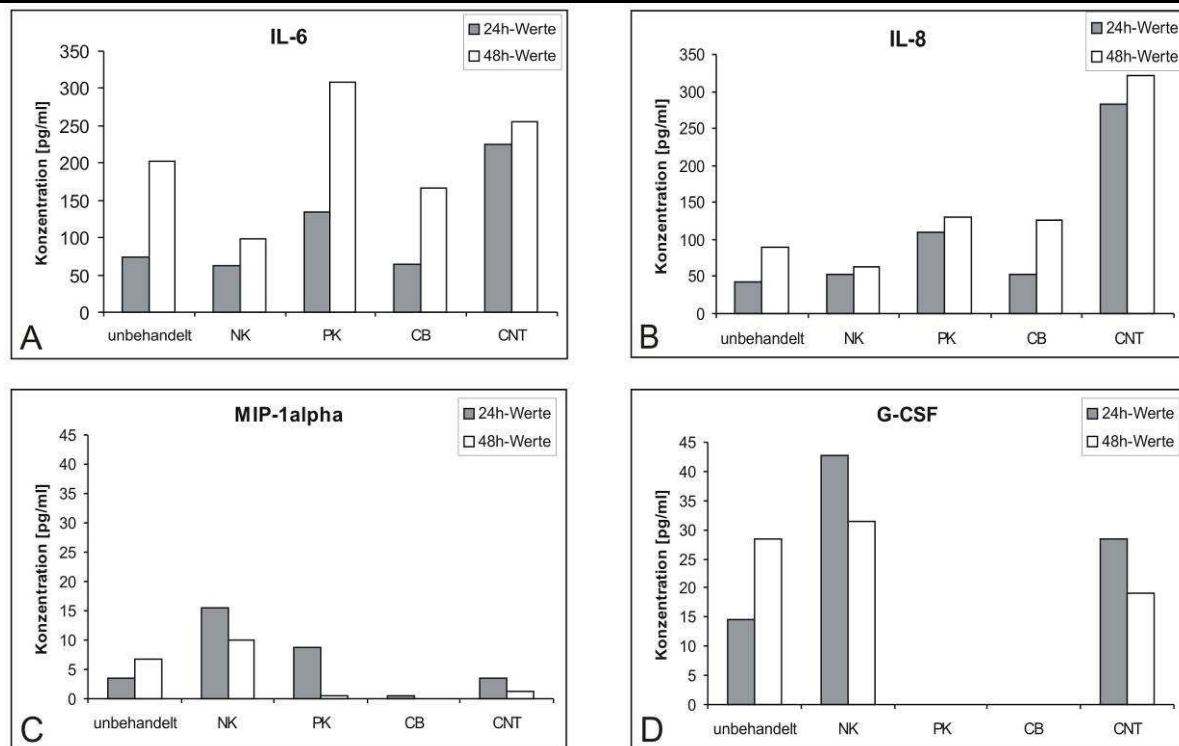
Da sich histologisch keine Veränderungen der Zellen feststellen ließen, wurden die Medienüberstände, die bei allen Versuchen entnommen worden waren, auf Entzündungsmarker untersucht.

#### 4.5.1.3 Messung freigesetzter Entzündungsmarker an 3D-Hautmodellen mit primären Keratinozyten

Da die Epidermis eine effektive Barriere darzustellen scheint und histologisch keine penetrierten Partikel detektiert werden konnten, wurde untersucht, ob die Zellen nach 24 h bis 48 h Kontakt mit den Nanopartikeln Entzündungsmarker ausschleusen. Zur Untersuchung verschiedener Marker wurde eine Multiplex-Analyse durchgeführt.

Gemessen wurden die Entzündungsmarker entsprechend der getesteten Marker in den Versuchen mit Monolayerkulturen. Da sich das Dispergierungsmittel DMEM/FCS als nicht geeignet herausgestellt hatte, wurde das Airliftmedium mit Tween 80 als Dispergierungsmittel verwendet und diente somit als Negativkontrolle (NK). Parallel wurden die Überstände unbehandelter Hautgele untersucht.

### Vergleich der Entzündungsreaktionen des Dispergierungsmittels Airliftmedium/Tween an Hautgelen mit primären Keratinozyten



**Abbildung 53** Messung von Entzündungsmarkern nach dem Auftragen unterschiedlicher Dispersionen auf Hautgele mit primären Keratinozyten: (A) IL6-Messung, (B) IL-8-Messung, (C) MIP-1alpha-Messung, (D) G-CSF-Messung. (n = 1)

Unbehandelt = Airliftmedium, NK = Dispergierungsmittel Airliftmedium/Tween, PK = Positivkontrolle (Blauasbest), CB = Carbon Black, CNT = Carbon Nanotubes

Auffallend waren die bei IL-6 und IL-8 gemessenen höheren Werte für die Positivkontrolle im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Negativkontrollen zeigten dabei gleich hohe Werte, wie die unbehandelten Hautgele (Abbildung 53 A, B).

Die aufgetragene Carbon Black-Dispersion unterschied sich in der Expression von IL-6 und IL-8 kaum von der Negativkontrolle (Abbildung 53 A, B). Einen starken Anstieg der gemessenen Entzündungswerte zeigte sich dagegen nach dem Auftrag der CNT-Dispersion. Während der Wert des IL-6 über der gemessenen

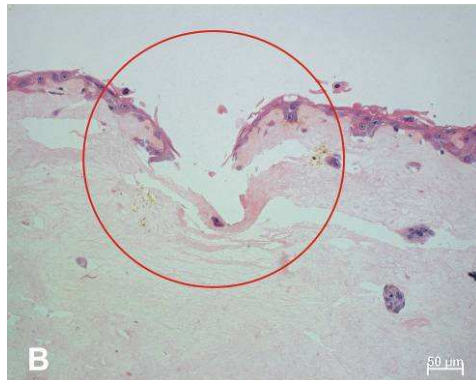
Negativkontrolle lag, unterschied er sich nur gering von der Positivkontrolle (Abbildung 53 A). Bei IL-8 dagegen lag der gemessene Wert um das Doppelte höher als der gemessene Wert der Positivkontrolle (Abbildung 53 B).

Die Marker MIP-1alpha und G-CSF konnten in den Hautgelen mit primären Keratinozyten ebenfalls nachgewiesen werden (Abbildung 53). Sie zeigten jedoch für die Negativkontrollen im Vergleich zu den Dispersionen sehr hohe Werte, während die Positivkontrolle nur eine geringe (Abbildung 53 C) oder keine Expression der Marker verursachte (Abbildung 53 D).

#### 4.5.1.4 Einsatz einer neuen Positivkontrolle

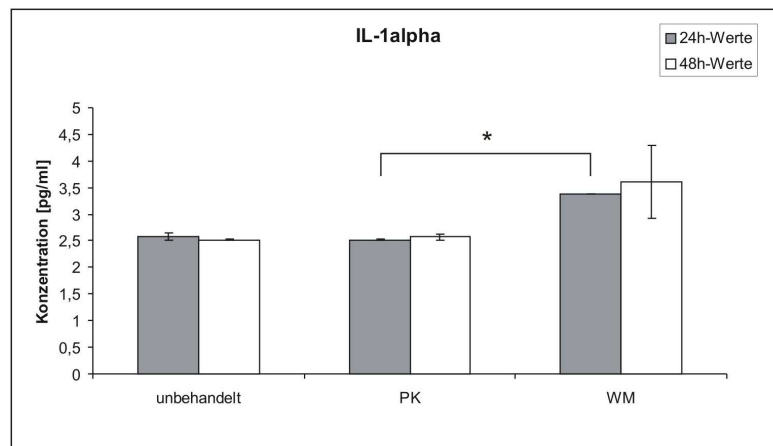
Da sich das Blauasbest als Positivkontrolle im Zusammenhang mit den Hautgelen widersprüchliche Ergebnisse lieferte, wurde für weitere Versuche an 3D-Hautmodellen zunächst untersucht, ob ein verwundetes Hautmodell (= Wundmodell, WM) als Positivkontrolle in weiteren Tests eingesetzt werden kann.

Im Schnitt lässt sich der Einschnitt mit der geschädigten Epidermis gut erkennen (Abbildung 54).



**Abbildung 54** HE-Färbung eines 3D-Hautmodells aufgebaut mit primären humanen Keratinozyten, das durch einen Schnitt verwundet wurde.

Unter Stresssituationen wird von den Keratinozyten IL-1alpha gebildet und löst eine Entzündungsreaktion aus, durch die auch weitere Zellen stimuliert werden. Als Positivkontrolle wurden daher in diesem Versuch Hautgele mit Schnitten gezielt verwundet, um eine Expression von IL-1alpha auszulösen. Bei der Negativkontrolle blieb das Hautgel unbehandelt.



**Abbildung 55** Vergleich der IL-1alpha-Konzentrationen aus 3 Hautmodellen: unbehandeltes Hautgel, Positivkontrolle (=PK) mit Blauasbest behandelt, verwundetes Hautgel (= Wundmodell, WM). Die Expression von IL-1alpha des Wundmodells unterscheidet sich dabei signifikant von der Positivkontrolle ( $p < 0,05$ ). ( $n = 3$ )

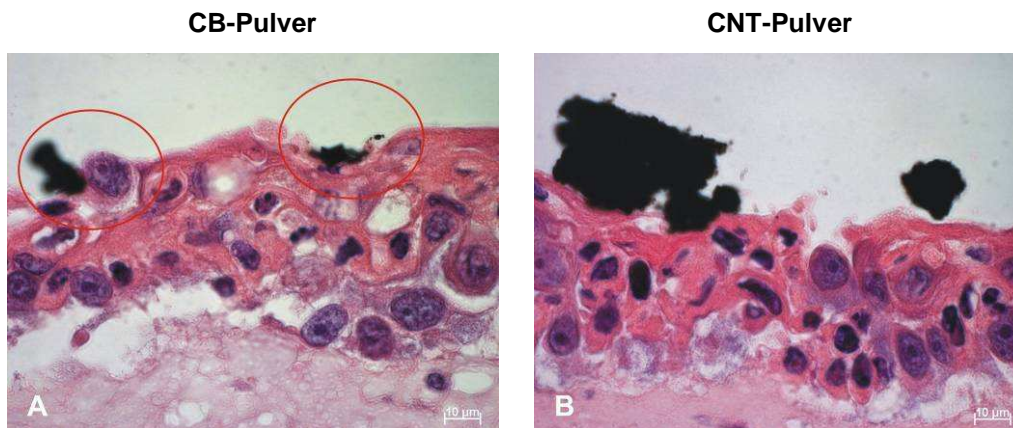
Die Expression von IL-1alpha liegt für die Positivkontrolle genauso hoch, wie für die unbehandelte Negativkontrolle. Im Vergleich dazu zeigte das Wundmodell einen signifikanten Anstieg des exprimierten IL-1alpha und wurde daher für die folgenden Versuche an Hautmodellen mit der Zelllinie HaCaT als Positivkontrolle eingesetzt (Abbildung 55).

#### 4.5.1.5 Untersuchungen der Referenzsubstanzen an 3D-Hautmodellen mit der Zelllinie HaCaT

Die zu untersuchenden Nanomaterialien wurden nur aufgestäubt und nicht mehr dispergiert, um den reinen Effekt der Nanopartikel auf die Zellen zu untersuchen. Als Negativkontrolle wurde ein unbehandeltes Hautgel herangezogen, als Positivkontrolle diente ein durch Schnitte verwundetes Hautgel (= Wundmodell, WM).

#### 4.5.1.6 Untersuchung der Nanopartikel-Pulver an 3D-Hautmodellen mit der Zelllinie HaCaT

Neben den Referenzen wurden die Pulver von Carbon Black (CB) und den Multiwalled Carbon Nanotubes (CNT) untersucht.



**Abbildung 56** HE-Färbung von 3D-Hautmodellen aufgebaut mit der Zelllinie HaCaT, die mit verschiedenen Nanopartikel-Pulvern in Kontakt gebracht wurden: (A) Carbon Black (CB), (B) Multiwalled Nanotube-Dispersion (CNT)

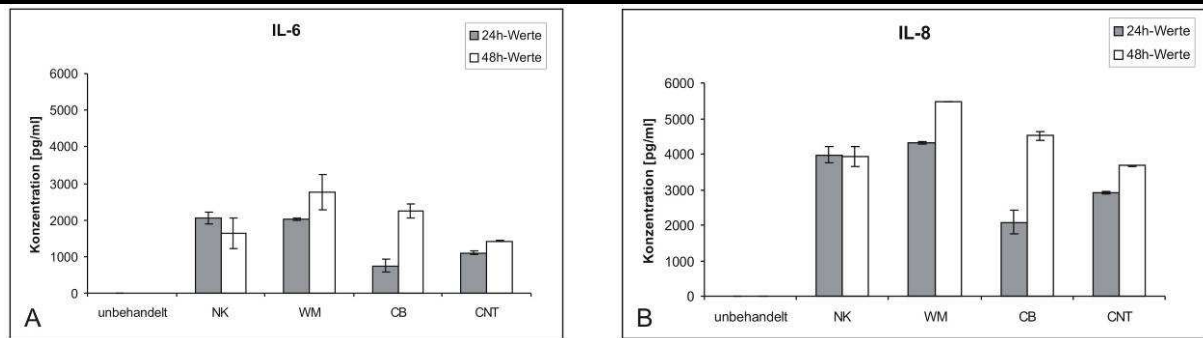
Wie bereits bei den Hautmodellen mit primären Keratinozyten, konnten auch bei den Hautgelen mit der Zelllinie HaCaT histologisch keine in die Epidermis penetrierten Partikel detektiert werden. Auch aus diesen Versuchen wurden die Medienüberstände auf exprimierte Entzündungsmarker hin untersucht.

#### **4.5.1.7 Messung freigesetzter Entzündungsmarker der 3D-Hautmodelle aufgebaut mit der Zelllinie HaCaT**

Da die Hautmodelle trotz der Verwendung der Zelllinie HaCaT mit demselben Airliftmedium kultiviert wurden, wie auch die Hautgele mit primären Keratinozyten, wurde als zusätzliche Negativkontrolle (=NK) das Dispergierungsmittel DMEM/FCS auf die Gele getropft. Auch hier sollte nochmals der Effekt des reinen Dispergierungsmittels auf die Zelllinie untersucht werden, da die HaCaT in der Monolayerkultur auch mit DMEM und 10%igem FCS kultiviert wurden.



### Entzündungsreaktion von Hautgelen mit aufgestäubten Nanopartikeln:



**Abbildung 57** Messung der Entzündungsmarker nach dem Auftragen der verschiedenen Proben: (A) IL-6-Messung, (B) IL-8-Messung. (n = 3) Unbehandelt = Airliftmedium, NK = Dispergierungsmittel DMEM/FCS, WM = Wundmodell, CB = Carbon Black, CNT = Carbon Nanotubes

Gemessen werden konnten nur die Marker IL-6 und IL-8. Das MIP-1alpha und G-CSF, wie in den Hautmodellen mit primären Zellen, konnten nicht nachgewiesen werden. Auffällig war, dass die Hautmodelle, die nicht behandelt wurden, keine Expression von Entzündungsmarkern zeigten (Abbildung 57). Hautmodelle, die jedoch mit dem Dispergierungsmittel DMEM/FCS betroffen wurden, zeigten immer eine hohe vergleichbare Expression der Marker entsprechend dem Wundmodell, welches als Positivkontrolle eingesetzt wurde (Abbildung 57).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die primären Keratinozyten mit einem breiteren Spektrum an exprimierten Entzündungsfaktoren auf das Dispergierungsmittel DMEM/FCS und auf die getesteten Partikel reagierten, während die HaCaT verstärkt nur IL-6 und IL-8 ausschütteten (Tabelle 41). Problematisch ist daher der Einsatz des Dispergierungsmittels DMEM/FCS, da vor allem die primären Keratinozyten sehr stark darauf reagierten und so erhöhte gemessene Interleukinwerte nicht eindeutig den Partikeln zugeordnet werden konnten. Die HaCaT-Zellen im Monolayer reagieren dagegen nicht so stark auf das Dispergierungsmittel. Umgekehrt verhält es sich dagegen in den 3D-Hautmodellen. hier reagierten die Hautgele mit der HaCaT-Zelllinie mit einer bis zu 10fach höheren Expression von Entzündungsmarkern, wenn zuvor die Kultivierung im serumfreien Airliftmedium stattfand.

In Tabelle 41 sind die einzelnen Ergebnisse aus den Versuchen mit den Monolayerkulturen und den 3D-Hautmodellen aus primären Keratinozyten und der Zelllinie HaCaT zusammengefasst.

**Tabelle 41** Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Monolayerkulturen und 3D-Hautmodellen mit primären Keratinozyten und der Zelllinie HaCaT in Bezug auf das Dispergierungsmittel

Eingesetzte Dispergierungsmittel:	Monolayerkulturen		3D-Hautmodelle	
	Primäre Keratinozyten	HaCaT	Primäre Keratinozyten	HaCaT
DMEM/FCS	Ungeeignet, da die Zellen sehr stark darauf reagieren	Geeignet, da das Dispergierungsmittel dem Zellkulturmedium entspricht	Nicht getestet	Starke Reaktion der Zellen auf das Dispergierungsmittel (nach vorheriger Kultivierung mit Airliftmedium)
Airliftmedium/Tween	Nicht getestet	Nicht getestet	Hat bei der Messung von IL-6 und IL-8 keinen Effekt. MIP-1alpha und G-CSF werden stark exprimiert	Nicht getestet
<b>Messbare Entzündungsmarker</b>	IL-6 IL-8 MIP-1alpha  v.a. verstärkte Bildung von IL-8	IL-8 Die IL-8-Konzentrationen sind im Vgl. zu den primären Zellen um das 2fache reduziert	IL-6 IL-8 MIP-1alpha G-CSF	IL-6 IL-8 Die Interleukin-Konzentrationen liegen im Vgl. zu den Hautmodellen mit primären Keratinozyten um das 5fache höher.



## **4.6 Relevanz neuer Methoden zur Untersuchung der Nanotoxizität**

Mikroskopische Untersuchungen sowohl der Zellen im Monolayer als auch der komplexen 3D-Modelle gaben keinen Aufschluss über die Reaktion der Zellen nach dem Kontakt zu den aufgetragenen Nanomaterialien. Rein morphologisch ließen sich keine Veränderungen feststellen, es besteht jedoch die Möglichkeit, dass die Zellen durch einen längeren Kontakt mit den Partikeln geschädigt werden, bzw. diese eine Stresssituation für die Zellen darstellen. Es konnten jedoch deutliche Unterschiede der Sensitivität der primären Zellen und der Zelllinie in der Monolayerkultur und der 3D-Kultivierung der Hautmodelle beim Nachweis von Entzündungsmarkern detektiert werden.

Eindeutige Aussagen zur Toxizität der Nanomaterialien konnten allerdings nicht gemacht werden, da auch die eingesetzten Dispergierungsmittel eine entzündungsauslösende Wirkung auf die Zellen ausübten. Daher wurde versucht, neue Methoden für die Untersuchung der Nanotoxizität zu etablieren.

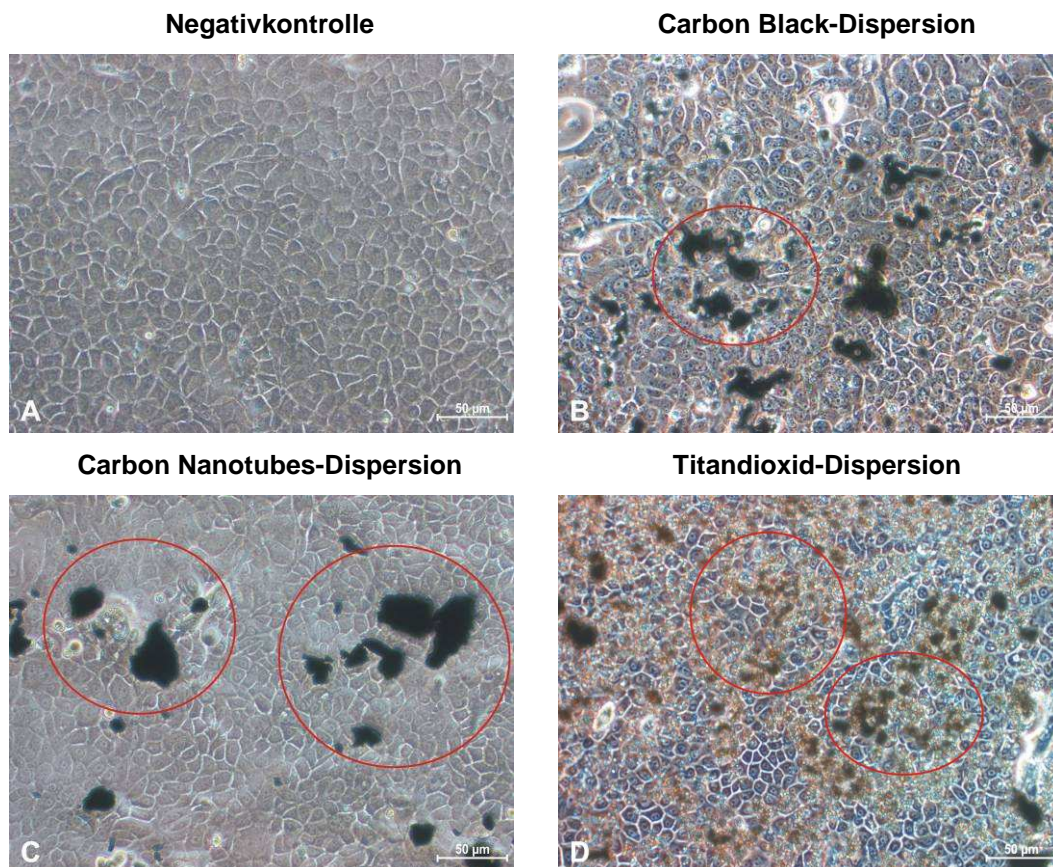
### **4.6.1 Genexpressionsanalysen mit der MESSAGE-Technologie**

Mit einer Genexpressionsanalyse lassen sich mögliche Veränderungen der Zellen bereits auf RNA-Ebene untersuchen, also bereits zu einem Zeitpunkt, an dem die Proteine noch nicht synthetisiert und ausgeschleust wurden. Da noch nicht bekannt ist, welche Prozesse dabei ablaufen und welche Signalkaskaden dabei involviert sein könnten, lassen sich mit einer globalen Genexpressionsanalyse die Genexpressionsmuster unbehandelter Zellen mit denen behandelter Zellen vergleichen und so eine „Genkarte“ erstellen, die es ermöglicht, einzelne transkribierte Gene (m-RNA) zu detektieren und später gezielt als Marker nachzuweisen.

Da die Zelllinie-HaCaT im 3D-Hautmodell bei der Untersuchung exprimierter Entzündungsmarker bereits eine überschießende Reaktion aufwies und sich damit gravierend von der Reaktion der primären Zellen unterschied, wurden im Rahmen der Genexpressionsanalysen nur die primären Keratinozyten untersucht.

#### 4.6.2 Genexpressionsanalysen an Monolayerkulturen mit primären Keratinozyten

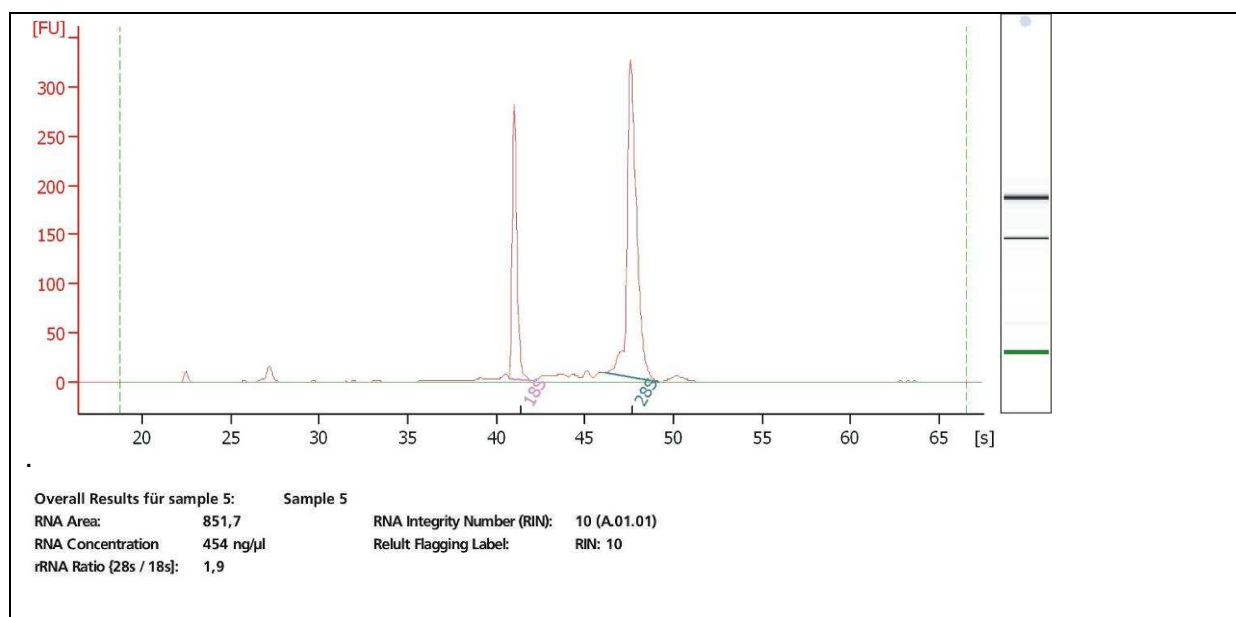
Zur Etablierung der Methode wurden zunächst Versuche mit Monolayerkulturen der primären Keratinozyten durchgeführt, die eine spätere Übertragung auf das 3D-Hautmodell ermöglichen sollten.



**Abbildung 58** Phasenkontrastaufnahme eines unbehandelten Keratinozyten-Monolayers (A) im Vergleich zu Keratinozyten, die mit verschiedenen Dispersionen behandelt wurden: (B) Carbon-Black, (C) Carbon-Nanotubes, (D) Titandioxid

Nach 24 h Inkubation der primären Keratinozyten mit den verschiedenen Nanomaterialien fiel primär vor allem die starke Agglomeratbildung der verschiedenen Nanopartikel in der Dispersion auf (Abbildung 23 B, C und D). Die Zellen zeigten in ihrer Adhärenz und Morphologie keine Schädigung oder Beeinflussung durch die Inkubation mit den Partikeln. Zur Isolation der RNA wurden die Monolayerkulturen zunächst mehrmals mit PBS<sup>-</sup> gewaschen, um die Partikel zu entfernen. Diese hafteten jedoch teilweise so stark an den Zellen oder auch an der Zellkulturplatte, dass sie nicht komplett entfernt werden konnten.

Die RNA wurde isoliert und ihre Qualität sowie Konzentration im Agilent Bioanalyzer bestimmt (Abbildung 59).



**Abbildung 59** Messung der RNA-Qualität und Quantität im Agilent Bioanalyzer

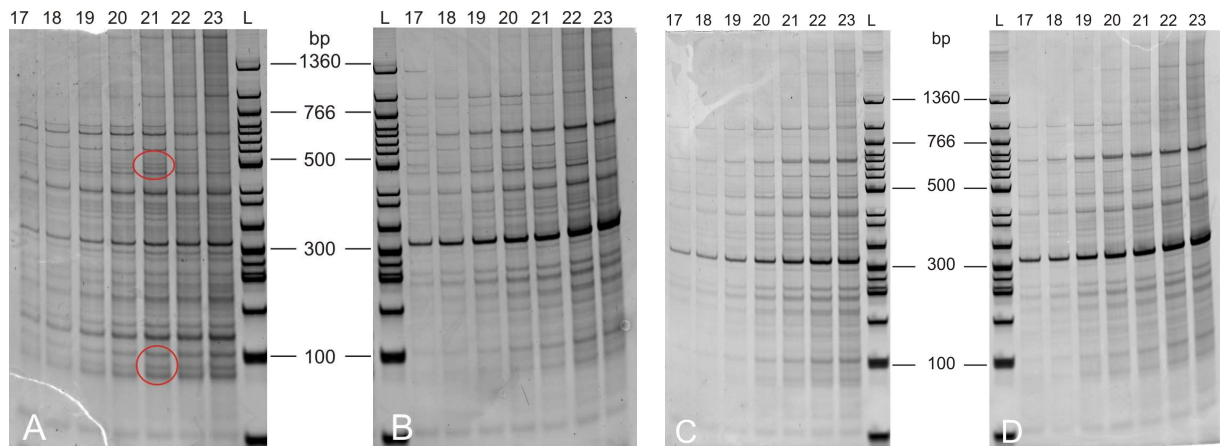
**Tabelle 42** Gesamt-RNA-Konzentrationen und Qualität der isolierten Proben

Probe	Konzentration der Gesamt-RNA [ng/µl]	Qualität (= RNA Integrity Number, RIN*)
DMEM + 10% FCS 1	487	9,80
Carbon Black 1	632	9,80
Multiwalled Carbon Nanotubes 1	454	10,0
Titandioxid 1	359	9,90

\*RIN-Nummer von 10 entspricht sehr guter Qualität

Die isolierte RNA zeigte eine sehr gute Qualität (Tabelle 42). Die RIN-Werte lagen bei 9,80-10,0, während die Konzentrationen in einem Bereich von 359-632 ng/µl lagen und somit für das MESSAGE-System eingesetzt werden konnten.

Bei der Zyklusoptimierung für die Adapter-PCR II erwiesen sich 21 Zyklen als optimal für ein ausgeglichenes Verhältnis von Ankerprimern und Transkripten (Abbildung 60).



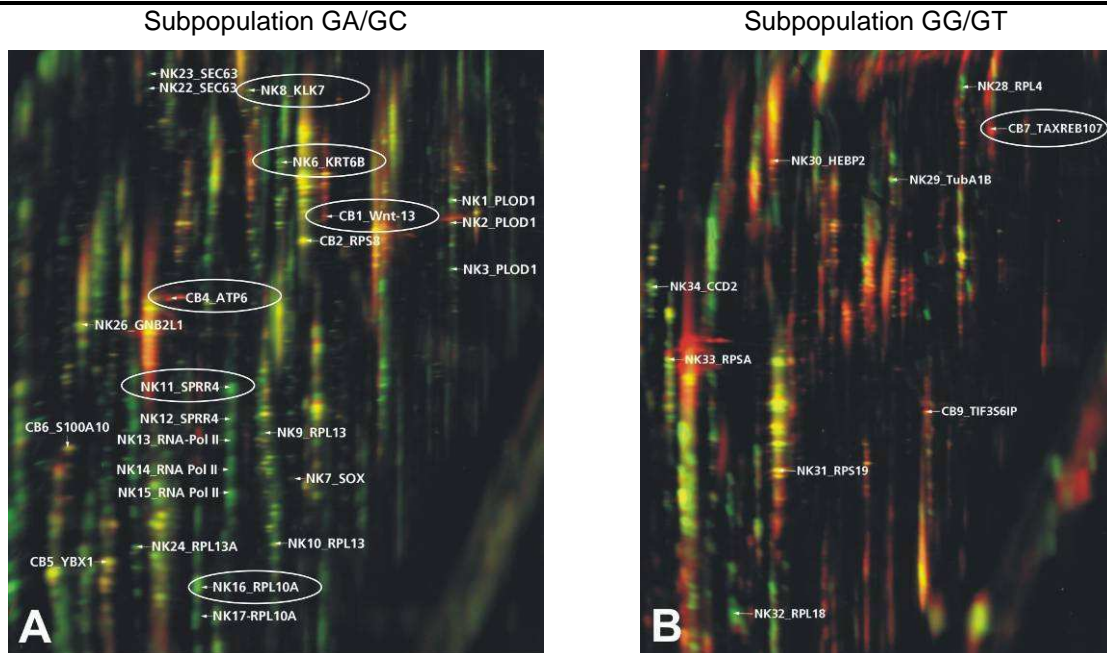
**Abbildung 60** Zyklusoptimierung der spezifischen PCR. 6%ige Polyacrylamidgele, SYBR-Gold gefärbt, die Länge der Basenpaare wird durch einen 50bp Marker angegeben. Dargestellt sind die Zyklen 18 bis 23: (A) Negativkontrolle, (B) mit Carbon Black behandelte Probe, (C) mit Carbon Nanotubes behandelte Probe, (D) Probe, die mit Titandioxid behandelt wurde.

Es konnten kleine Unterschiede im Bandenmuster der einzelnen Proben detektiert werden. Die Negativkontrolle zeigte im Vergleich zu den anderen Proben zusätzlich zwei Banden auf Höhe von 500 bp. Auch sind nochmals zwischen 100 bp und 150 bp zwei weitere Banden erkennbar, die bei den anderen Proben ebenfalls nicht vorhanden waren.

Anschließend erfolgte die Amplifizierung von 48 Subpopulationen mit den spezifischen SMART\_T13\_VN- und den AdE\_RsaI\_NN-Primern. Von den 48 Subpopulationen wurden 24 Populationen gepoolt.

Eine Falschfarben-Überlagerung macht unterschiedlich exprimierte Spots erkennbar (Abbildung 61). Differentiell regulierte Spots der Negativkontrolle erscheinen als grüne, die der behandelten Probe dagegen als rote Spots. Gelbe Spots zeigen eine Regulation in beiden Proben an.

## Falschfarbenüberlagerung der Negativkontrolle mit der Carbon Black behandelten Probe

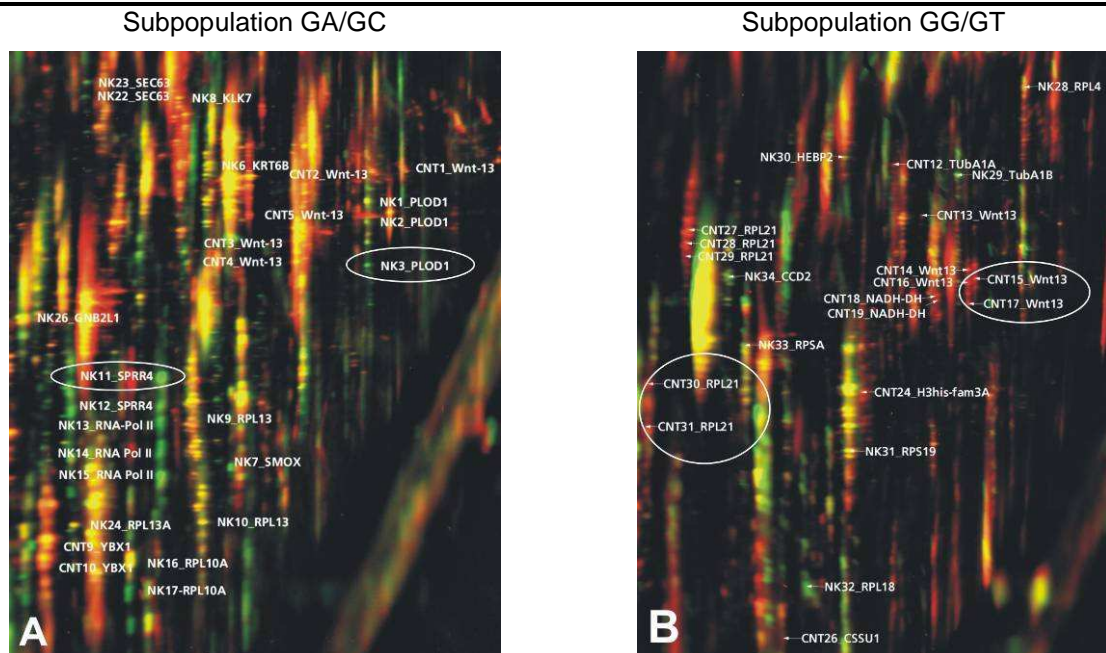


**Abbildung 61** Bild einer Falschfarben-Überlagerung der Transkriptomanalyse von (A) Negativkontrolle (DMEM/FCS) mit Carbon Black (Subpopulationen GA/GC), (B) Negativkontrolle mit Carbon Black (Subpopulationen GG/GT)

Bei den mit Carbon Black behandelten Keratinozyten wurden im Vergleich zu den Zellen der Negativkontrolle einige Gene vermindert exprimiert (z.B. grüne Spots: NK11\_SPRR4, NK8\_KLK7 und NK16\_RPL10A). Daneben gab es nur wenige Marker, die durch die Behandlung der Keratinozyten differentiell reguliert wurden (z.B. rote Spots: CB\_TAXREB 107, CB1\_Wnt-13 oder CB4\_ATP6).

Vergleicht man nun die Übereinanderlagerungen der Subpopulationen GA/GC mit GG/GT, so lassen sich auch hier Unterschiede erkennen. In der Subpopulation GG/GT der mit Carbon Black behandelten Zellen (Abbildung 61 B) traten verstärkt erhöhte Genregulationen auf (mehr rote Spots).



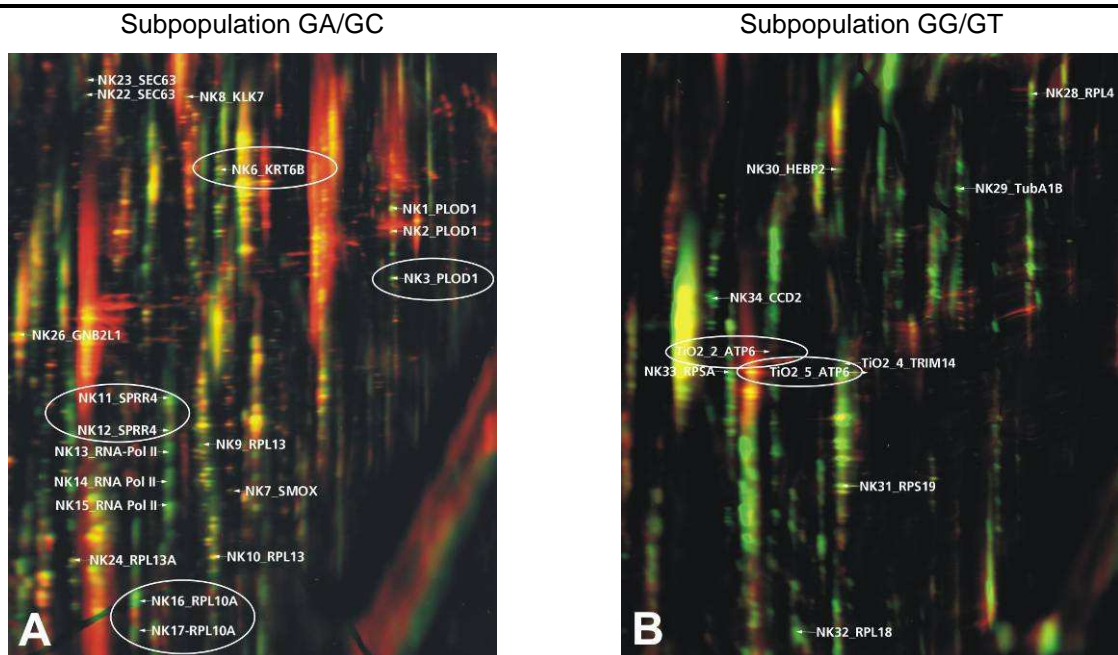
**Falschfarbenüberlagerung der Negativkontrolle mit der Carbon Nanotube behandelten Probe**


**Abbildung 62** Bild der Transkriptionsanalyse von (A) Negativkontrolle mit Carbon Nanotubes, (Subpopulationen GA/GC), (B) Negativkontrolle mit Carbon Nanotubes (Subpopulationen GG/GT)

Im Vergleich zeigten sich zwischen den mit CNT behandelten Zellen und denen der Negativkontrolle (Abbildung 62) viele konstitutiv regulierte Gene (z.B. rote Spots: CNT15/17\_Wnt13, CNT30/31\_RPL21). Aber auch hier gab es vereinzelt geringer exprimierte Gene bei den mit Nanotubes behandelten Zellen (z.B. grüne Spots: NK12\_SPRR4, NK3\_PLOD1).

Daneben gab es bei der Subpopulation GG/GT der mit CNT behandelten Zellen (Abbildung 62 B) mehr hochregulierte Gene (mehr rote Spots) als bei der Subpopulation GA/GC derselben Probe.

### Falschfarbenüberlagerung der Negativkontrolle mit der Titandioxid behandelten Probe



**Abbildung 63** Falschfarben-Überlagerung der Transkriptomanalyse von (A) Negativkontrolle mit Titandioxid (Subpopulationen GA/GC), (B) Negativkontrolle mit Titandioxid (Subpopulationen GG/GT)

Im Vergleich zwischen den Zellen, die mit Titandioxid behandelt wurden und der Negativkontrolle wurden viele Marker geringer exprimiert (grüne Spots: NK6\_KRT6B, NK3\_PLOD1, NK11/12\_SPRR4 und NK16/17\_RPL10A). Als Gene der behandelten Zellen, die differentiell reguliert werden, konnten nur sehr wenige eindeutig identifiziert werden (z.B. rote Spots: TiO<sub>2</sub>\_2/5\_ATP6). Die Subpopulation GG/GT wies im Vergleich zu GA/GC eine weniger differentielle Genregulationen auf (mehr grüne Spots).

Die einzelnen Gele einer Subpopulation von Titandioxid Carbon Black, den Carbon Nanotubes und der Negativkontrolle zeigten ansonsten ein identisches Spotmuster.

Zur Überprüfung der relativen cDNA-Abundanzen wurde anschließend die Intensität und Größe der Spots im Verhältnis zur Gesamtintensität und der Gesamtgröße aller Spots verglichen und daraus das Verhältnis der Genregulation von behandelten zu nicht behandelten Keratinozyten berechnet. Die schließlich gestochenen und identifizierten Spots sind in Tabelle 43 aufgeführt, gleichzeitig wird die Regulation der Gene in den einzelnen Proben in Bezug auf die Negativkontrolle als Ratio angegeben.

**Tabelle 43** Identifizierung und differentielle Regulation der gepickten Spots

Spot- Bezeichnung	Funktion des Genbereichs	Ratio CB/NK	Ratio CNT/NK	Ratio TiO <sub>2</sub> /NK
CB2_RPS8	Komponente der 40S Untereinheit	-1,275	-9,970	-3,583
CB5_YBX1	Positive Regulierung des Zellzyklus, Zellproliferation und Krebsentstehung	-1,271	1,229	-4,689
CNT9_YBX1	Positive Regulierung des Zellzyklus, Zellproliferation und Krebsentstehung	1,220	1,364	-1,782
CNT10_YBX1	Positive Regulierung des Zellzyklus, Zellproliferation und Krebsentstehung	1,333	2,278	-1,121
CB6_S100A10,02	Zellzyklus, Progression, Differenzierung	1,127	1,510	-1,397
CB7_TAXREB107	Ähnlich zu TAXREB 10, verwandt mit RPL6	5,986	1,449	-1,160
CB9_TIF3S6IP	Translationsinitiationsfaktor 3, Untereinheit E-interagierendes Protein	1,975	3,537	-2,782
CB1_Wnt-13	Differenzierung, Krebsentstehung	3,699	2,650	2,594
CNT1_Wnt-13	Differenzierung, Krebsentstehung	1,422	1,159	-1,307
CNT2_Wnt-13	Differenzierung, Krebsentstehung	3,092	1,601	3,811
CNT3_Wnt-13	Differenzierung, Krebsentstehung	2,847	4,858	4,943
CNT4_Wnt-13	Differenzierung, Krebsentstehung	2,338	3,204	3,465
CNT5_Wnt-13	Differenzierung, Krebsentstehung	3,699	2,650	2,594
CNT14_Wnt-13	Differenzierung, Krebsentstehung	6,242	6,810	1,846
CNT15_Wnt-13	Differenzierung, Krebsentstehung	6,885	13,760	-1,057
CNT16_Wnt-13	Differenzierung, Krebsentstehung	7,624	15,181	2,440
CNT17_Wnt-13	Differenzierung, Krebsentstehung	14,440	18,053	-1,305
CNT12_TubA1A	Cytoskelett, Gerüstprotein	-1,419	1,602	-2,173
CNT18_NADH- DH	Elektronentransportkette	3,543	4,571	-1,187
CNT19_NADH- DH	Elektronentransportkette	4,919	5,087	1,436
CNT24_H3his- fam3A	Protein der Histon H3 Familie	1,373	1,742	-1,265
CNT26_CSSU1	Calcium abhängige Cysteinprotease; Aktivierung kann durch oxid. Stress ausgelöst werden	1,472	1,043	1,090
CNT27_RPL21	Komponente der 60S Untereinheit von Ribosomen der L21E Familie	2,555	2,517	2,029
CNT28_RPL21	Komponente der 60S Untereinheit von Ribosomen der L21E Familie	2,881	2,503	1,946
CNT29_RPL21	Komponente der 60S Untereinheit von Ribosomen der L21E Familie	8,383	4,028	3,794
CNT30_RPL21	Komponente der 60S Untereinheit von Ribosomen der L21E Familie	2,907	1,933	2,350
CNT31_RPL21	Komponente der 60S Untereinheit von Ribosomen der L21E Familie	3,212	2,219	2,029



Spot- Bezeichnung	Funktion des Genbereichs	Ratio CB/NK	Ratio CNT/NK	Ratio TiO <sub>2</sub> /NK
NK1_PLOD1	Lysylhydroxylase, Crosslinken von kollagenähnlichen Strukturen	-2,910	-3,328	-2,933
NK2_PLOD1	Lysylhydroxylase, Crosslinken von kollagenähnlichen Strukturen	1,602	-3,255	1,134
NK3_PLOD1	Lysylhydroxylase, Crosslinken von kollagenähnlichen Strukturen	-3,107	-20,871	-6,841
NK6_KRT6B	Differenzierung des einfachen und stratifizierten Epithels	-5,021	-3,600	-5,729
NK7_SOX	Polyaminoxidase	-2,536	-22,369	-2,286
NK8_KLK7	Abschilferung der Haut	-2,649	-1,226	-2,974
NK9_RPL13	Komponente der 60S Untereinheit von Ribosomen der L13E Familie	-2,984	-1,750	-6,905
NK10_RPL13	Komponente der 60S Untereinheit von Ribosomen der L13E Familie	-2,084	-2,281	-3,065
NK11_SPRR4	Früher Differenzierungsmarker der Keratinozyten	-8,484	-13,000	-15,602
NK12_SPRR4	Früher Differenzierungsmarker der Keratinozyten	-5,156	-8,750	-6,360
NK13_RA-Pol II	Untereinheit von RNA Polymerase II, Synthese der mRNA	-6,307	-12,839	-2,256
NK14_RA-Pol II	Untereinheit von RNA Polymerase II, Synthese der mRNA	-9,330	-20,660	-14,650
NK15_RA-Pol II	Untereinheit von RNA Polymerase II, Synthese der mRNA	-7,003	-10,233	-17,462
NK16_RPL10A	Komponente der 60S Untereinheit von Ribosomen der L1P Familie	-3,729	-2,082	-22,571
NK17_RPL10A	Komponente der 60S Untereinheit von Ribosomen der L1P Familie	-4,788	-22,471	-5,835
NK22_SEC63	Posttranslationale Proteintranslokation in das ER	-4,088	1,058	-2,862
NK23_SEC63	Posttranslationale Proteintranslokation in das ER	-4,577	-3,694	-3,675
NK24_RPL13A	Komponente der 60S Untereinheit von Ribosomen der L13P Familie	-3,536	-2,461	-4,233
NK26_GNB2L1	G Protein beta	-1,186	-2,753	-2,453
NK28_RPL4	Komponente der 60S Untereinheit von Ribosomen der L4E Familie	-6,904	1,897	1,465
NK29_TubA1B	Cytoskelett, Gerüstprotein	-1,907	-3,367	-4,890
NK30_HEBP2	Hämbindendes Protein	2,431	-1,442	-1,360
NK31_RPS19	Komponente der 40S Untereinheit von Ribosomen der S19E Familie	1,030	-1,422	-2,178
NK32_PRL18	Komponente der 60S Untereinheit von Ribosomen der L18E Familie	-12,478	-6,209	-2,138

Spot- Bezeichnung	Funktion des Genbereichs	Ratio CB/NK	Ratio CNT/NK	Ratio TiO <sub>2</sub> /NK
NK33_RPSA	Laminin Rezeptor	-1,211	-3,345	-20,205
NK34_CCD2	Cyclin D2, eine regulierende Untereinheit von CDK4/CDK6, im Zellzyklus bei G1/S Übergang	-2,355	-3,298	-13,267
TiO <sub>2</sub> _4_TRIM14	Nicht determiniert, kommt in cytoplasmatischen Körpern vor	1,222	1,143	1,620
CB4_ATP6	ATP-Synthese	9,829	5,084	10,475
TiO <sub>2</sub> _2_ATP6	ATP-Synthese	12,637	1,563	1,594
TiO <sub>2</sub> _5_ATP6	ATP-Synthese	9,958	16,385	7,935

Die identifizierten Spots haben unterschiedliche Aufgaben in der Zelle, teilweise handelt es sich dabei um Proteine, die eine Funktion bei der Differenzierung der Keratinozyten ausüben, wie z.B. WNT13, SPRR4 oder KRT6B. Daneben wurden auch Proteine der Zellatmung (z.B. ATP6) und der Zelladhäsion (GNB2L1, RPSA) identifiziert.

In allen drei Proben im Vergleich zur Negativkontrolle zeigen die Differenzierungsmarker SPRR4 und KRT6B eine sehr geringe Expression. Als konstitutive Transkripte konnten dagegen TRIM14 und CSSU1 identifiziert werden. Daneben war das Gen SOX um den Faktor -22 im Vergleich der mit CNT behandelten Probe zur Negativkontrolle nach unten reguliert. Bei den Titandioxid-behandelten Proben war das Gen RPSA auffällig um den Faktor -20 nach unten reguliert. Gleichzeitig gab es auch Gene, die innerhalb einer Probe unterschiedlich stark reguliert waren und sich keiner speziellen Behandlung der Zellen zuordnen ließen, z.B. WNT13, RPL21 oder PLOD1.

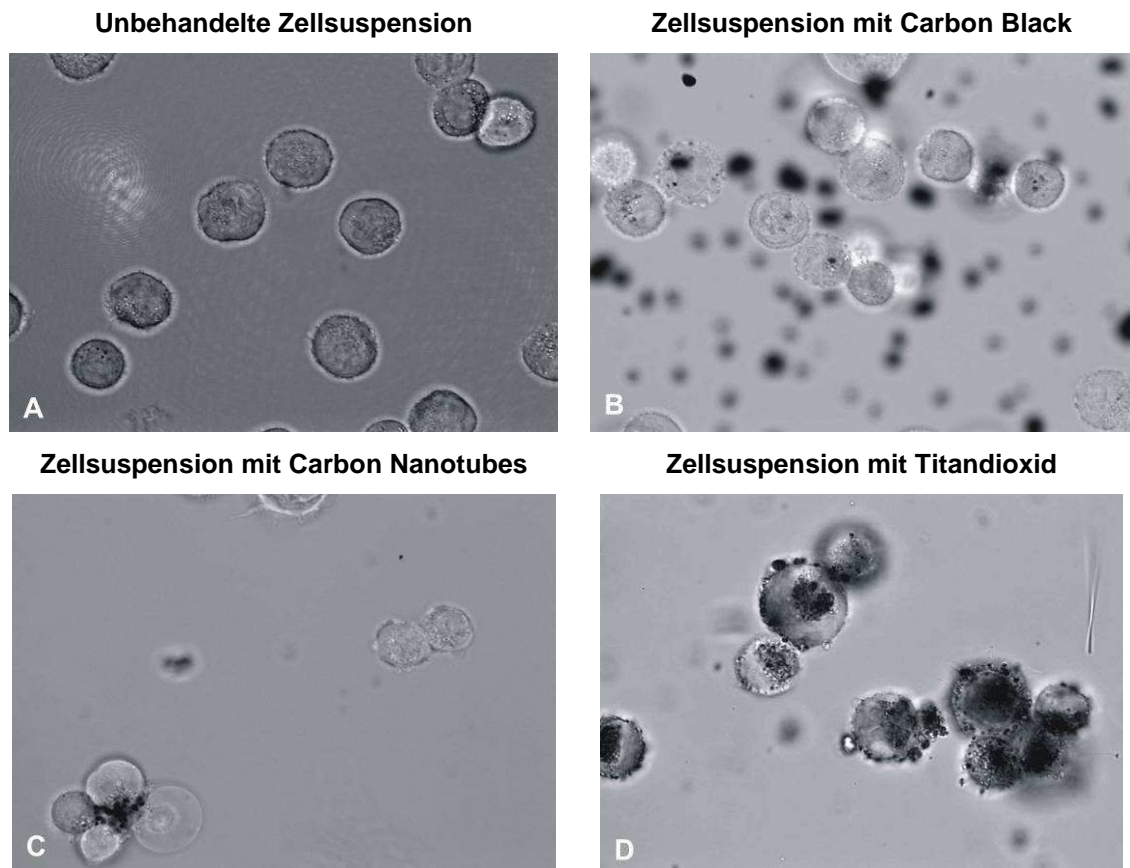
### 4.6.3 Einsatz der Raman-Spektroskopie

Als weitere Methode, um mögliche Zellveränderungen durch den Kontakt mit Nanopartikeln zu erfassen, wurde die nicht invasive Raman-Spektroskopie eingesetzt.

#### 4.6.3.1 Untersuchungen von Monolayerkulturen mit dem Raman-Spektroskop

Eine Untersuchung mit Nanopartikeln behandelte Monolayerkulturen als Zellsuspensionen über die Raman-Spektroskopie war nicht möglich. Die trotz mehrerer durchgeführter Waschschriffe noch enthaltenen und zum Teil an Zellen

agglomerierten Partikel machten die Auswertung der Messungen unmöglich (Abbildung 64).



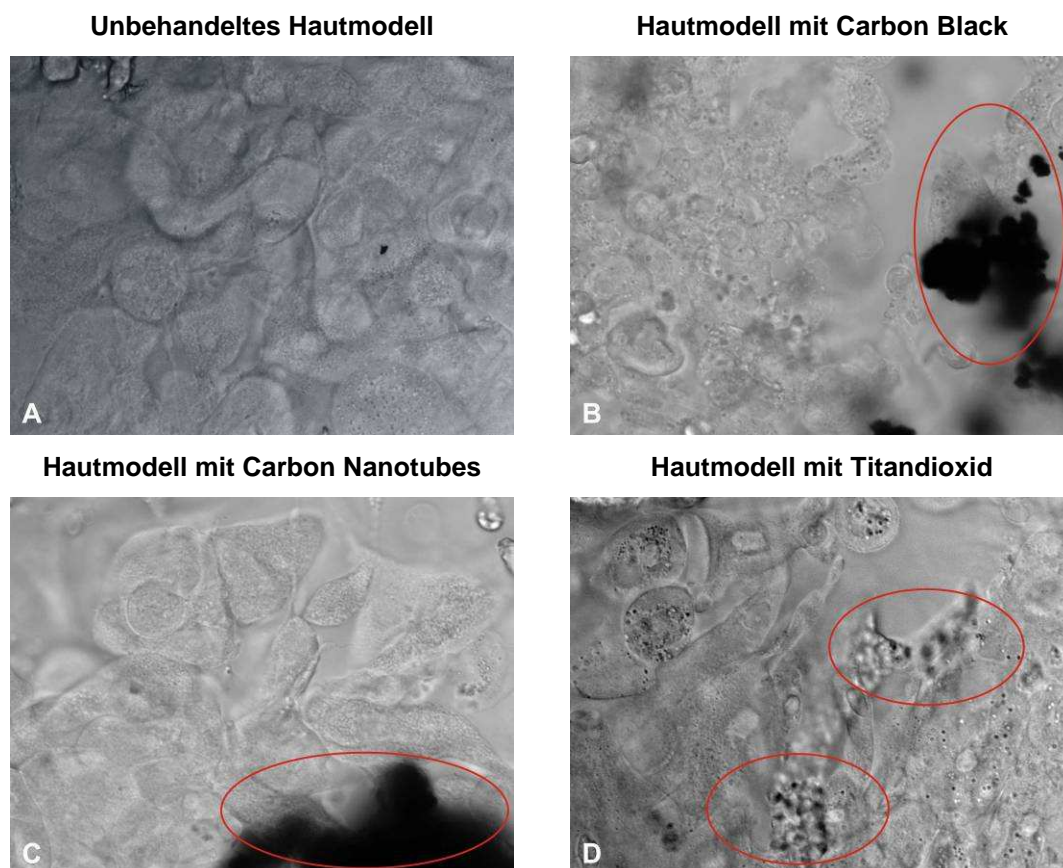
**Abbildung 64** Phasenkontrastaufnahme von Zellen der Lungenkarzinom-Zelllinie A549 in einer Zellsuspension in Kontakt mit verschiedenen Nanopartikeln: (A) unbehandelt, (B) Carbon Black, (C) Carbon Nanotubes, (D) Titandioxid (600fache Vergrößerung)

Kohlenstoffhaltige Partikel wie das Carbon Black oder die Carbon Nanotubes absorbierten die Laserenergie und erhitzen sich somit sehr stark. Als Folge zerplatzten die Zellen. Das Titandioxid dagegen streute das Laserlicht sehr stark, sodass nur Spektren mit sehr hohen Rausch/Signal-Verhältnissen erzeugt werden konnten.

#### 4.6.3.2 Untersuchung von 3D Hautmodellen mit dem Raman-Spektroskop

Da die Untersuchung der mit Nanomaterialien behandelten Einzelzellen nicht möglich war, wurden im Anschluss auch Versuche an 3D Hautmodellen mit aufgestäubten Nanopartikeln durchgeführt. Für diesen Versuch wurden jeweils Hautmodelle mit primären Keratinozyten und mit der Zelllinie HaCaT aufgebaut.

Unbehandelte Hautgele ließen sich mit behandelten Hautgelen über die Frequenzverschiebungen des zurückgestreuten Lichts miteinander vergleichen. Wichtig war, dass aufgetragene Nanomaterial-Dispersionen oder Pulver mit PBS vor der Messung so gut wie möglich abgespült wurden, damit der Laserstrahl nicht zu sehr streute. Dadurch, dass die Zellen fest in dem Hautmodell verankert waren und daher nicht als Einzelzellen vorlagen, konnten gezielt Zellen ausgewählt werden, die untersucht werden sollten, sodass Zellen an denen noch zu viele Partikel hafteten, gemieden werden konnten und dadurch auch keine Zellschädigung stattfand.



**Abbildung 65** Phasenkontrastaufnahme von primären Keratinozyten der mit unterschiedlichen Proben behandelten Hautmodelle: (A) unbehandelte, (B) Carbon Black, (C) Carbon Nanotubes, (D) Titandioxid (600fache Vergrößerung)

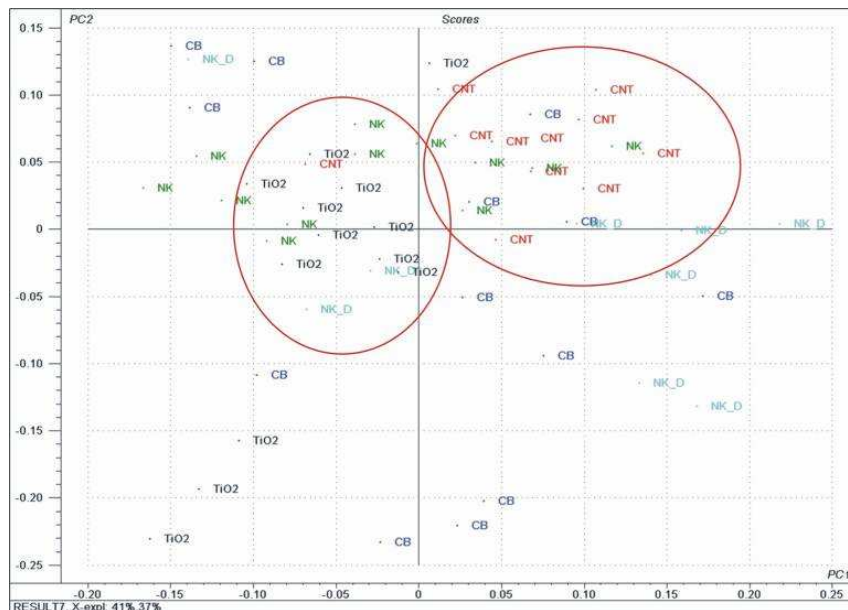
Abbildung 65 zeigt beispielhaft Ausschnitte der untersuchten Hautmodelle, aufgebaut mit primären Keratinozyten. Die rot umrandeten Bereiche zeigen Pulverrückstände auf den Zellen.

Mit dem Raman-Spektroskop konnten die verschiedenen Spektren der Zellen mit unterschiedlichem Probenauftrag aufgenommen werden.

Zunächst wurden die Proben der Hautmodelle mit den primären Keratinozyten getestet und vermessen. Anhand der gemessenen unterschiedlichen Frequenzen ließen sich die einzelnen Proben in Gruppen unterteilen (Abbildung 66), die Zellen schienen unterschiedlich auf die verschiedenen Materialien zu reagieren.

Dennoch zeigt die Messung hier nur eine Tendenz an, die im Bereich der Nanotoxikologie durchaus eine zusätzliche Kontrolle darstellen kann, um die Wirkung von Nanomaterialien auf Zellen und Gewebe zu bewerten.

#### Hautmodelle aufgebaut mit primären Keratinozyten



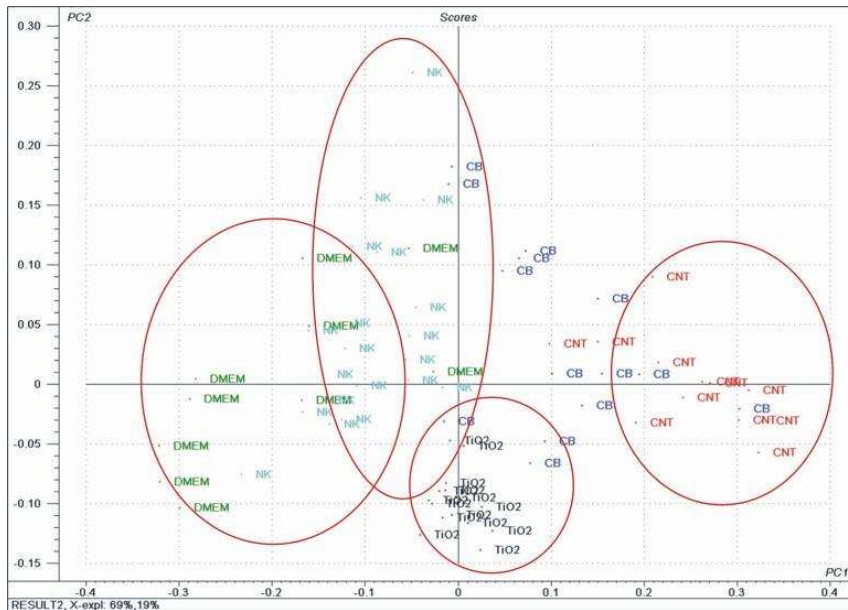
**Abbildung 66** Score Plot der Messdaten aus den Versuchen an Hautmodellen mit primären Keratinozyten. Die Hautgele wurden behandelt mit den Pulvern: CNT (= Carbon Nanotubes), CB (= Carbon Black), TiO<sub>2</sub> (= Titandioxid), NK = (unbehandeltes Hautgel) und NK\_D (= mit dem Dispergierungsmittel DMEM/FCS betroffenes Hautgel)

Es sind teilweise Gruppierungen der CNT- und Titandioxid-behandelten Zellen erkennbar, d.h., die Zellen schienen unterschiedlich auf die Materialien zu reagieren (Abbildung 66).

Die Messungen lieferten einheitliche Spektren, allerdings zeigte sich durch die Gelstruktur der Hautmodelle ein hohes Signal/Rauschverhältnis.

In einem weiteren Versuch wurde das Hautmodell mit der HaCaT-Zelllinie aufgebaut und dieselben Proben aufgetragen und vermessen. Auch hier wurde die Messung zweimal zeitversetzt durchgeführt.

### Hautmodelle aufgebaut mit der Zelllinie HaCaT



**Abbildung 67** Score Plot der Messdaten aus den Versuchen an Hautmodellen mit der Zelllinie HaCaT. Die Hautgele wurden behandelt mit den Pulvern: CNT (= Carbon Nanotubes), CB (= Carbon Black), TiO<sub>2</sub> (= Titandioxid), NK (= unbehandeltes Hautgel) und DMEM (= mit dem Dispergierungsmittel DMEM/FCS betroffenes Hautgel)

Abbildung 66 zeigt den Score Plot der Messungen aus den Versuchen an Hautmodellen, aufgebaut mit der Zelllinie HaCaT. Die mit den unterschiedlichen Proben behandelten Zellen zeigen teilweise eindeutige Gruppierungen, v.a. die mit Titandioxid und Carbon Nanotubes behandelten Zellen. Die mit Carbon Black behandelten Zellen bildeten keine abgegrenzte Gruppe und auch die mit DMEM/FCS behandelten Zellen lagen gestreut. Anhand der Gruppierungen lässt sich erkennen, dass bei den gleich behandelten Zellen diese auch nach der Behandlung gleich reagieren.

Die Raman-Spektroskopie scheint geeignet, um die Wirkung von Nanomaterialien zu untersuchen. Allerdings konnten nur adhärente Zellen untersucht werden, Zellsuspensionen in Kombination mit kohlenstoffhaltigen Partikeln ließen sich nicht untersuchen. Die Zellen zeigten jedoch nach der Behandlung mit den verschiedenen Materialien unterschiedliche Score Plots, es kann also davon ausgegangen werden, dass die Zellen auch entsprechend unterschiedlich auf die Partikel reagieren.



## 5 Diskussion

Die rasch voranschreitende Entwicklung neuer Materialien im Bereich der Nanotechnologie und die damit verbundenen möglichen gesundheitlichen Risiken machen eine Etablierung neuer Testsysteme und Methoden im Bereich der Nanotoxikologie erforderlich [Maynard 2007, 3I 2002].

Toxizitäts-Assays, wie sie bisher in der klassischen Toxikologie verwendet wurden, lassen sich hier nicht einsetzen, da die Nanopartikel mit Proteinen aus diesen Assays reagieren und so falsch-positive oder -negative Ergebnisse liefern können [Wörle-Knirsch 2006]. Wichtig ist in erster Linie abzuklären, ob Nanopartikel in der Lage sind, die natürlichen Körperbarrieren zu überwinden und in welcher Weise der menschliche Organismus z.B. auf eine Langzeitexposition mit Partikeln reagiert.

Der Einsatz und die Entwicklung dreidimensionaler *in vitro* Testsysteme in der Nanotoxikologie stellen in diesem Zusammenhang eine gute Möglichkeit dar, die Penetration und Permeation von Nanomaterialien durch die Zellbarrieren zu untersuchen. Gleichzeitig bieten diese Modelle auch eine Schnittstelle zwischen Experimenten an Monolayer-Zellkulturen und Tierversuchen. Durch die Verwendung primärer humaner Zellen in einem gewebeähnlichen Aufbau ist eine bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen möglich [Walles 2007].

### 5.1 Aufbau eines 3D-Tracheamodells

Neben dem bereits am Fraunhofer IGB etablierten und patentierten Hautmodell sollte ein Luftröhrenmodell entwickelt werden, da der Respirationstrakt in Bezug auf die Nanotoxikologie eine sehr wichtige Barriere darstellt. Ziel war es, die funktionelle Barrierschicht der Trachea-Epithelzellen *in vitro* nachzubilden. Die Zellen sollten gezielt zur Differenzierung und damit zu einem hochprismatischen Zellwachstum mit der Ausbildung von Zilien und Becherzellen angeregt werden. Diese sind für die mucoziläre Reinigungsfunktion (mucoziläre Clearance) der Atemwege zuständig und somit für ein funktionelles Tracheamodell unerlässlich [Dupuit 2000].

Humane Trachea-Epithelzellen (hTEZ) konnten aus Spendermaterial durch eine Auswaxsmethode isoliert werden. Die Beschichtung des zu bewachsenden Untergrunds mit 500 µg/ml Kollagen Typ 1 hat sich dabei als zwingend notwendig erwiesen. Sie bietet den Zellen eine *in vivo* ähnliche Situation durch die Simulation

der Basalmembran. Aus 1/3 der verwendeten Biopsate konnten mit dieser Methode jeweils mehr als 1 Mio. Zellen gewonnen werden. Das Gelingen der Isolation und die ausgewachsene Zellzahl waren dabei abhängig von der vorherigen Behandlung des jeweiligen Patienten, die teilweise eine neoadjuvante Therapie erhalten hatten [abstract submitted: Impact of neoadjuvant radiochemotherapy on bronchial tissue viability. Bioartificial Organs].

Durch den Einsatz des käuflichen Zellkulturmediums AECG ließen sich die isolierten hTEZ zwar zur Proliferation anregen, zeigten aber im Hinblick auf die Zelldifferenzierung eine sehr geringe Ausbildung zilientragender Zellen. Auf Basis des Minimum Essential Mediums wurde daher eine Erweiterung der Medienzusätze im Vergleich zum AECG-Medium (2.4.1) vorgenommen. Durch die Neuentwicklung dieses Differenzierungsmediums (MEMr II) konnten die isolierten hTEZ gezielt zur Bildung aktiver Zilien angeregt werden.

Der Einfluss des optimierten Zellkulturmediums auf die Zellen wurde nach der Kultivierung durch Anfärben verschiedener Zellmarker untersucht. Die Ausbildung zilientragender Zellen und Becherzellen sind für eine natürliche Reinigungsfunktion auch im Tracheamodell entscheidend [Bals 1997], die entsprechenden Marker für Flimmerepithel- und Becherzellen [Shen 1997] wurden daher gezielt untersucht. Weiterhin ist auch die Ausbildung einer geschlossenen Zellbarriere wichtig. Dies kann mit einem Antikörper, gerichtet gegen Proteine der Tight Junctions, untersucht werden. Dieser zeigt auch, ob die Zellen in der Lage sind, sich zu polarisieren [Shen 1997, Crepaldi 1994], was für die Ausbildung von Zilien und einer geschlossenen Zellbarriere wichtig ist. Durch den Zusatz des Hepatozyten-Wachstumsfaktors (HGF) zeigten die Zellen eine Änderung der Morphologie und gleichzeitig eine verstärkte Ausbildung und Aktivität von Zilien. Die Zilienaktivität konnte im Phasenkontrastmikroskop auch über mehrere Tage beobachtet werden. Da die Zilienzellen terminal differenzierte Zellen sind, die sich nicht weiter teilen können, muss hier eine Differenzierung der Basalzellen stattgefunden haben. Auch in der humanen Trachea bewirkt ein Anstieg der Produktion des HGF, z.B. nach Verwundung der Zellen, eine verstärkte Differenzierung der Basalzellen zu Epithelzellen [Shen 1997, Ayers 1988]. Bei der Charakterisierung der hTEZ nach der Kultivierung im Monolayer konnte bei Verwendung des optimierten Zellkulturmediums außerdem der Marker für Becherzellen eindeutig nachgewiesen werden. Bei der Kultivierung in AECG-Medium bildeten die hTEZ diese Zellstrukturen nicht aus. Die vereinzelt vorliegenden



Becherzellen könnten mit der sehr guten Differenzierung der hTEZ in zilientragende Epithelzellen korrelieren, da diese nicht terminal differenziert sind und sich dadurch auch in Zilienzellen umwandeln können [Ayers 1988]. Bei Verwendung des optimierten Zellkulturmediums waren die hTEZ auch in der Lage, gute Zell-Zell-Kontakte auszubilden, während sich bei der Kultivierung der Zellen in AECG-Medium nur eine sehr schwache Anfärbung der Tight Junctions verzeichnen ließ. Das MEMrII scheint die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten bei der Kultivierung der hTEZ zu induzieren und das darin enthaltene HGF kann eine Polarisierung der Zellen induzieren, was durch das hochprismatische Wachstum der hTEZ bei der statischen Kultivierung eindeutig gezeigt werden konnte. Auch beim Nachweis differenzierter Zellen zeigten die hTEZ nach der Kultivierung im optimierten Zellkulturmedium eine stärkere Braunfärbung als die Zellen, welche in AECG-Medium kultiviert wurden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, ein Zellkulturmedium zu entwickeln, mit dem sich die Polarisierung, die Ausbildung von Tight Junctions und die Ausbildung zilientragender Zellen bei primären humanen Trachea-Epithelzellen induzieren lässt. Darüber hinaus konnte mit dem neu entwickelten Zellkulturmedium über mehrere Tage eine im Phasenkontrastmikroskop sichtbare Zilienaktivität induziert werden.

Da die Menge der primären Zellen von der Anzahl humaner Biopsate abhängt, die zur Verfügung stehen und gleichzeitig auch je nach Spender variieren kann, wurden zum Aufbau des 3D-Tracheamodells zusätzlich 3 Zelllinien herangezogen und deren Differenzierungspotential vergleichend zu den primären Zellen getestet. Die Kultivierung und Untersuchung der Ausbildung der verschiedenen Zellmarker erfolgte entsprechend den hTEZ im Monolayer und fand in dem jeweils für die Zelllinien empfohlenen Zellkulturmedium statt. Bei allen 3 Zelllinien konnten jedoch im Monolayer die untersuchten Marker für Becherzellen, Tight Junctions, zilientragende und differenzierte Zellen nicht nachgewiesen werden. Es ist möglich, dass den Zellen die chemischen Reize für eine Differenzierung fehlten, da nicht wie bei den hTEZ das optimierte Zellkulturmedium MEMr II eingesetzt wurde. Durch den Aufbau statischer Kulturen wurde untersucht, inwieweit eine Kultivierung der Zellen mit Luftkontakt (=Air-Liquid Kultivierung) eine Auswirkung auf die Entwicklung der Zellmorphologie und der Zelldifferenzierung haben kann. Die Air-Liquid-Kultivierung sollte durch den Luftkontakt der Epithelzellen für eine Stimulation [Gray 1996] sorgen und die Zellen

so zur Differenzierung, also zur Ausbildung von zilienträgenden Flimmerepithelzellen und Becherzellen anregen.

Als Trägerstruktur wurden Stücke der azellularisierten BioVaSc und vergleichsweise PET-Inserts eingesetzt. Statische Air-Liquid-Kulturen der humanen Trachea-Epithelzellen (hTEZ), der Lungenkarzinom-Zelllinie Calu-3, immortalisierten humanen Bronchialzellen (HBE) und immortalisierten fötalen humanen Trachea-Epithelzellen (FHTE) wurden aufgebaut und charakterisiert. Alle Zelllinien ließen sich problemlos auf der PET-Membran und der BioVaSc kultivieren, eine vorherige Beschichtung der Oberflächen mit Kollagen Typ 1 war dabei nicht notwendig. Bei allen 3 Zelllinien konnte sowohl auf dem Insert, als auch auf der BioVaSc durch die statische Kultivierung kein hochprismatisches Zellwachstum induziert werden. Vergleichbare Studien zum hochprismatischen Wachstum dieser Zelllinien wurden bislang in dieser Art nicht durchgeführt. Die statische Kultivierung mit dem Fokus, die Morphologie der Zellen in Richtung eines hochprismatischen Zellwachstums zu beeinflussen, fand bislang nur an primären Zellen statt. An diesen konnte gezeigt werden, dass eine statische Air-Liquid-Kultivierung die Ausbildung hochprismatischer Zellen induziert [Shen 1997, Hanamura 1994]. Die Entwicklung einer hochprismatischen Morphologie wird dabei immer im Zusammenhang mit der Ausbildung zilienträger Flimmerepithelzellen und schleimproduzierender Becherzellen gesehen, da durch diese Morphologie die dafür notwendige Polarisierung der Zellen stattfindet.

Für die hTEZ konnten in 5% der Versuche auf einem mit Kollagen Typ 1 beschichteten Insert und unter Verwendung des zuvor optimierten Differenzierungsmediums erstmals das hochprismatische Wachstum der Zellen angeregt werden. Gleichzeitig wurden Zilien ausgebildet, die zur Etablierung eines funktionellen Tracheamodells unerlässlich sind. Auf der BioVaSc ließen sich die Zellen bis dato dagegen nicht kultivieren. Ein wesentlicher Faktor ist sicherlich die Abhängigkeit der Zellisolation und -proliferation vom jeweiligen Spendermaterial. Gleichzeitig muss in weiteren Untersuchungen die Zusammensetzung der Basalmembran analysiert und so bessere Grundbedingungen für die Zellen geschaffen werden. Eine Mischung verschiedener Kollagene zur spezifischeren Nachbildung der Basalmembran und eine zusätzliche Kokultivierung mit weiteren primären Zellen, wie z.B. Fibroblasten, sollte in weiteren Experimenten untersucht werden, um eine bessere Simulation der Extrazellulären Matrix *in vitro* zu ermöglichen.

Die 3 Zelllinien konnten dagegen auf der BioVaSc in einer statischen Air-Liquid-Kultur sehr gut proliferieren und bildeten im Gegensatz zu den Kulturen im Monolayer die Zellmarker für Becherzellen, zilienträgende und differenzierte Zellen, sowie Tight Junctions aus. Eine statische, luftexponierte Kultivierung wirkt sich damit bereits positiv auf die Ausbildung zellspezifischer Merkmale aus. Diese Kultivierungsform hat jedoch in Bezug auf die Kultivierung der Zelllinien keinen Einfluss auf die Entwicklung einer hochprismatischen Zellmorphologie, wie sie die Trachea-Epithelzellen *in vivo* aufweisen und die im Zusammenhang mit der Ausbildung von Zilien gesehen wird.

Das hochprismatische Zellwachstum konnte bei isolierten primären humanen Trachea-Epithelzellen bereits durch eine statische Air-Liquid-Kultivierung in Kombination mit dem neu entwickelten Zellkulturmedium induziert werden. In den parallel untersuchten Zelllinien konnte dagegen durch die statische Kultivierung keine morphologische Veränderung der Zellen herbeigeführt werden.

Durch eine dynamische Kultivierung, wie unten beschrieben, [Peattie 2006] sollten die Zellen daher gezielt zur Ausbildung einer hochprismatischen Zellform und zur Ausbildung der relevanten Zellmarker angeregt werden, um die humane Trachea im Gewebemodell möglichst naturgetreu simulieren zu können. Da bisher unklar ist, welche Prozesse für die Steuerung der metachronen Zilienbewegung der Trachea-Epithelzellen zuständig sind, wurde als ein möglicher Faktor die mechanische Stimulation der Zellen durch die Respiration angenommen. Eine Untersuchung der möglichen Auswirkungen einer solchen Stimulation auf die Zellen erforderte die Entwicklung eines neuen Bioreaktorsystems, welches in der Lage ist, die Kultivierungsbedingungen entsprechend der *in vivo* Situation in der Luftröhre zu simulieren.

## **5.2 Entwicklung eines Bioreaktors zur dynamischen Kultivierung der Zellen**

Zur Durchführung dynamischer Kultivierungsversuche wurde ein neues Bioreaktorsystem entwickelt. Der Reaktor basiert auf 2 Kammereinheiten, die durch das Einspannen der mit Zellen besiedelten BioVaSc räumlich voneinander getrennt werden. Die untere Kammer dient der permanenten Versorgung der Zellen durch das Zellkulturmedium, in der oberen Kammer kann dagegen die Luftströmung entsprechend der Atmung durch einen alternierenden Pumpverlauf simuliert werden. Der Prozess des Ein- und Ausatmens konnte damit nachgestellt und die Zellen

mechanisch stimuliert werden. Bezogen auf die mit Zellen besiedelte Fläche von  $1 \text{ cm}^2$ , wurde die Respiration eines Erwachsenen im Ruhezustand simuliert. Die Einströmöffnung für die Luft wurde dabei so angelegt, dass keine Turbulenzen erzeugt werden und eine gleichmäßige Stimulation der Zellen durch einen Luftstrom von  $2 \text{ m/s}$  erfolgt.

Der neu entwickelte Bioreaktor wurde in dieser Form patentiert (DE 102008056037). Durch den Einbau von Sensoren soll das Reaktorsystem noch erweitert werden, um Daten zum erzeugten Luft- und Mediendruck im System zu liefern und damit die Kultivierung der Zellen reproduzierbar zu gestalten.

Zur Etablierung des Tracheamodells wurden die 3 Zelllinien eingesetzt, auf ein Stück BioVaSc aufgesiedelt und zur dynamischen Kultivierung in den Bioreaktor eingespannt. Durch die kontinuierliche basolaterale Versorgung der Zellen mit Medium und die gleichzeitige apikale mechanische Stimulation durch überströmende Luft konnten die Calu-3 Zellen in ihrer Morphologie beeinflusst werden. Ausschließlich die dynamisch kultivierten Calu-3 Zellen bildeten nach 1 Woche dynamischer Kultivierung hochprismatische Zellstrukturen aus, die sich in den statischen Air-Liquid-Kulturen nicht entwickelt hatten. Ansätze ziliärer Strukturen konnten im Rasterelektronenmikroskop nachgewiesen werden. Eine Optimierung des Zellkulturmediums, wie bereits für die hTEZ durchgeführt, soll in weiteren Untersuchungen klären, ob Wachstumsfaktoren, wie z.B. HGF, in der dynamischen Kultivierung die Ausbildung von Zilien begünstigen kann. Die HBE und FHTE dagegen zeigten auch unter dynamischer Kultivierung kein hochprismatisches Zellwachstum. Möglicherweise haben diese immortalisierten Zellen im Vergleich zur Lungenkarzinom-Zelllinie Calu-3 die Fähigkeit zur Differenzierung der Zellmorphologie verloren. Immunhistologische Färbungen der hochprismatisch gewachsenen Calu-3 Zellen dienen der Überprüfung wichtiger funktioneller Marker, die die nativen Trachea-Epithelzellen ausbilden und die in einem funktionellen Tracheamodell auch vorhanden sein sollten. Untersucht wurde, ob die Zellen Becherzellen ausbilden können. Diese sind für ein funktionelles Modell wichtig, um Partikel mit dem produzierten Mucus zu binden und so die Funktion der mucozilären Clearance zu gewährleisten. Es zeigte sich eine starke Anfärbung der Zellen in immunhistologischen Untersuchungen und auch der verwendeten BioVaSc, sodass von einer unspezifischen Färbung ausgegangen werden muss, da sich bei der statischen Kultivierung nur die Zellen spezifisch angefärbt hatten. Ob die Calu-3

durch die dynamische Kultivierung Muzine produzieren und diese an die umgebende Matrixstruktur abgeben, muss daher noch detailliert untersucht werden.

Ein weiterer Marker zum Nachweis der mucozilären Reinigungsfunktion ist der Anti-FoxJ1-Antikörper, mit dem sich die zilientragenden Zellen gezielt anfärben lassen. Die Calu-3 Zellen wiesen allerdings nur eine schwache Färbung auf. Es ist möglich, dass die Zelllinien über eine eingeschränkte Fähigkeit zur Ausbildung von Zilien verfügen. Eine Optimierung des Zellkulturmediums, z.B. durch den Zusatz von HGF, kann in Bezug auf die dynamische Kultivierung der Calu-3 eine Zilienbildung induzieren und soll in weiteren Studien untersucht werden. Ebenfalls wichtig für den Aufbau des Tracheamodells ist die Ausbildung eines geschlossenen Zellverbandes als Diffusionsbarriere [Bals 1997]. Dazu wurden die Zellen mittels des Antikörpers Anti-Zonula Occludens auf die Ausbildung der Zell-Zell-Kontakte untersucht. Die Calu-3 Zellen wiesen nach der dynamischen Kultivierung eine sehr schwache Färbung der Zell-Zell-Kontakte im Vergleich zur statischen Kultivierung auf. Ein Kriterium kann der Kultivierungszeitraum von 1 Woche sein, der für die Ausbildung der Tight Junctions unzureichend war, da sich in diesem Zeitraum zunächst ein konfluenter Zellrasen ausbildet und erst im Anschluss daran die Ausbildung der Tight Junctions stattfindet [Alberts 2006]. Spezifisch dagegen zeigten sich die Calu-3-Zellen für das Zytokeratin 18. Die Zytokeratine gehören zu den Intermediärfilamenten, die u.a. das Zytoskelett der Zellen bilden. Mit dem Anti-Zytokeratin 18-Antikörper lassen sich gezielt ausdifferenzierte Zellen anfärben. Da sich alle Zellen als bereits ausdifferenziert zeigten, muss untersucht werden, ob sich durch eine Veränderung der Luftströmung oder Zusammensetzung des optimierten Zellkulturmediums dennoch bestimmte Eigenschaften gezielt beeinflussen lassen. Die Etablierung des Modells mit Vorläuferzellen und primären hTEZ sollte daher angestrebt werden. Die Kultivierung der Zellen unter dynamischen Bedingungen wurde als Erfindungsmeldung für ein Verfahrenspatent eingereicht (08F49656-IGB). Durch die Entwicklung des neuen Bioreaktors ist es möglich, Zellen der Trachea durch einen Luftstrom entsprechend der humanen Respiration mechanisch zu stimulieren. Die Zellen werden dazu von der Luft überströmt, wobei das Ein- und Ausatmen im Reaktor nachgestellt werden kann und die Zellen damit einen mechanischen Impuls zur Ausbildung eines metachronen Zilienschlags erhalten. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass eine Zelllinie unter diesen Versuchs-

bedingungen wieder eine physiologische, hochprismatische Morphologie ausbilden kann.

### **5.3 Untersuchungen zur Einschätzung des Gefährdungspotentials von Nanomaterialien**

Neben dem Aufbau eines 3D-Tracheamodells im Rahmen dieser Arbeit stellte die Untersuchung der Toxizität neuer Nanomaterialien anhand der etablierten 3D-Gewebe Modelle ein weiteres Ziel dar. Um über die Dosis-Wirkungs-Beziehungen der zu testenden Nanopartikel eine Aussage treffen zu können, müssen die zu testenden Substanzen zunächst in einheitlichen Konzentrationen dispergiert werden.

#### **5.3.1 Dispergierung und Charakterisierung von Nanomaterialien**

Untersucht wurden Nanomaterialien von Titandioxid, Carbon Black und Carbon Nanotubes. Bei Titandioxid handelt es sich um einen anorganischen rutilen Stoff, der bereits in Kosmetikprodukten und in Farben sowie Lacken als Weißpigment eingesetzt wird und als gesundheitlich unbedenklich gilt [Evonik-Magazin 2008]. Das Carbon Black dagegen besteht aus organischem, amorphem Kohlenstoff und wird ebenfalls als Farbpigment eingesetzt [Evonik 2008]. Der Hersteller weist diesen Stoff als nicht toxisch aus. Die ebenfalls untersuchten Carbon Nanotubes stellen eine neue Art von Material dar, diese bestehen zwar auch aus Kohlenstoff, liegen jedoch in einer röhrenförmigen Struktur vor. Die Carbon Nanotubes sind ebenfalls hydrophob, werden allerdings aufgrund ihrer faserartigen Struktur oftmals in Verbindung mit Asbest gebracht [Brunner 2006]. Gerade für die Carbon Nanotubes wird daher eine genaue Untersuchung der Toxizität gefordert, um Spätfolgen entsprechend den Asbestosen ausschließen zu können.

Bei der Herstellung der Nanomaterialien bzw. deren Weiterverarbeitung wird zur Herstellung einer homogenen Dispersion zumeist SDS verwendet. Ein Einsatz dieses Dispergierungsmittels in der Zellkultur ist jedoch aufgrund der Toxizität des SDS für die Zellen nicht möglich [Islam 2003]. Verwendet wurde daher in dieser Arbeit das Zellkulturmedium DMEM mit einem 10%igen Gehalt an FCS. Der Einsatz dieses Dispergierungsmittels erfolgte in Absprache mit den beiden BMBF geförderten Konsortien INOS und NanoCare, die sich ebenfalls mit der Untersuchung der Nanotoxizität beschäftigen und sollte eine spätere Vergleichbarkeit der Ergebnisse

zwischen den drei BMBF geförderten Projekten INOS, NanoCare und TRACER ermöglichen.

Die Herstellung einer homogenen Dispersion erwies sich dabei als nicht möglich, da die Nanomaterialien aufgrund der starken Agglomeration nicht in definierten Konzentrationen eingesetzt werden konnten. Eine Charakterisierung der Dispersion war aus dem gleichen Grund ebenfalls nicht möglich. Es konnte jedoch die Charakterisierung der Partikelgröße mit dem REM und die Messung der spezifischen Oberfläche über die BET-Methode durchgeführt werden. Dabei zeigte sich, dass die Carbon Nanotubes aufgrund ihrer Röhrenform große Strukturen ausbilden, gleichzeitig weisen sie auch eine große spezifische Oberfläche auf, die mit  $153,824 \text{ m}^2/\text{g}$  im Vergleich zum Titandioxid dreimal so groß ist. Da man bei den Multiwalled Carbon Nanotubes von einer spezifischen Oberfläche von  $100 - 800 \text{ m}^2/\text{g}$  ausgeht, kann man bei den hier untersuchten Carbon Nanotubes von einer Bündelung, bzw. Agglomeration der Röhren ausgehen, da sich damit auch die Oberfläche reduziert [Alexander 2007]. Das Carbon Black wies mit einer gemessenen spezifischen Oberfläche von  $313,084 \text{ m}^2/\text{g}$  wiederum die doppelte Größe der reaktiven Oberfläche auf, wie die Carbon Nanotubes. Damit lassen sich die starken Agglomerationseigenschaften der kohlenstoffhaltigen Nanopartikel erklären, die gegenüber dem FCS eine starke Proteinadsorption aufweisen [Guo 2008], deshalb in standardisierten Toxizitätsassays wichtige Nachweisproteine adsorbieren und somit diese Tests nicht auswertbar machen. Die Behandlung der Dispersionen im Ultraschallbad zur Verminderung der Agglomeration wird auch von anderen Arbeitsgruppen eingesetzt, zeigt aber nur mäßige Erfolge, da bei Carbon Black und den Carbon Nanotubes dennoch Agglomerate in der Dispersion erkennbar sind und auch eine spätere Reagglomeration auftreten kann [Rothen-Rutishauer 2006, Brunner 2006]. Ein negativer Nebeneffekt der Ultraschallbehandlung könnte außerdem eine Veränderung der Nanopartikel-Zusammensetzung sein, die sich je nach Behandlungsdauer, Frequenz und Stärke der eingesetzten Schallintensität unterschiedlich auf das dispergierte Material auswirken kann und daher noch viel genauer untersucht werden muss [Suslick 1999].

Parallel wurde daher auch das nichtionische und chemisch inerte Tensid Tween 80 mit dem für die Hautmodelle eingesetzten Airliftmedium verdünnt und als Dispergierungsmittel bei den Versuchen an den Hautmodellen verwendet. Aber auch

hier trat eine Agglomeration der Nanopartikel auf, sodass diese auch wiederum nicht mehr die typischen Nano-Eigenschaften aufwiesen.

Die Dispergierung in dem für die Zellen gut verträglichen Zellkulturmedium mit FCS oder Tween 80 induzierte stets eine Agglomeration der kohlenstoffhaltigen Nanopartikel, die mit der gemessenen spezifischen Oberfläche mittels der BET-Methode korrelieren. Durchgeführte Toxizitätstest am 3D-Hautmodell mit den beiden unterschiedlichen Dispergierungsmitteln zeigte jedoch, dass das Airliftmedium mit Tween 80 im Vergleich zum DMEM/FCS eine um den Faktor 40 geringere Expression von Stressmarkern induziert.

### **5.3.2 Untersuchung der Nanotoxizität am 3D-Tracheamodell**

Für Untersuchungen zur Testung einer möglichen Nanotoxizität mit dem Tracheamodell wurden die Calu-3-Zellen im Bioreaktor für 1 Woche kultiviert. Nach der Bildung eines geschlossenen Zellmonolayers auf der BioVaSc wurde die zu testende Probe aufgestäubt. Eine Untersuchung fand nur mit Carbon Black-Pulver statt, vergleichend dazu wurde in einer weiteren dynamischen Kultur die Negativkontrolle DMEM/FCS aufgetragen. Die aufgestäubten Partikel setzten sich als Agglomerate auf den Epithelzellen ab. Eine Penetration der Partikel in die Zellen oder durch die epidermale Zellschicht konnte wie in den Versuchen zur Hautbarriere histologisch nicht detektiert werden. Auch wurden nach 24 h und 48 h jeweils Medienüberstände für einen Laktat-Dehydrogenase-Test (LDH-Test) entnommen. Die LDH wird beim Absterben der Zellen direkt ins Zellkulturmedium abgegeben. Auffallend sind die gemessenen unterschiedlichen LDH-Werte zwischen den einzelnen Tracheamodellen, die keine eindeutige Interpretation zulassen. Diese schwanken bereits nach 1 Woche dynamischer Kultivierung von 3 mg/dl bis zu 7 mg/dl. Für eine Vergleichbarkeit von Ergebnissen ist daher eine weitere Optimierung der Kultivierung notwendig und es müssen mehr Versuche durchgeführt werden, um Durchschnittswerte zu ermitteln. Gleichzeitig lässt sich auch nach Zugabe des Carbon Black-Pulvers nicht immer ein Anstieg des LDH-Wertes nach 48 h verzeichnen. Denkbar ist auch, dass das Carbon Black durch die Absorption der LDH keine Auswertung des Tests zulässt [Monteiro-Riviere 2006]. Die Notwendigkeit zur Etablierung neuer Methoden wird damit deutlich. Eine Auswertung der Nanotoxizität sollte demnach nicht auf proteinbasierenden Tests erfolgen, da diese durch die kohlenstoffhaltigen Nanopartikel gebunden werden und damit falsch-



positive und falsch-negative Testergebnisse erzeugt werden können [Wöhrle-Knirsch 2007, Monteiro-Riviere 2006].

### **5.3.3 Untersuchungen der Nanotoxizität am 3D-Hautmodell**

Neben dem Respirationstrakt bildet die Haut eine weitere wesentliche Barriere und schützt den menschlichen Körper gegen eindringende Fremdstoffe. In Bezug auf die Nanotoxizität ist bis jetzt ungeklärt, inwieweit Nanopartikel diese Barriere überwinden oder welche Auswirkung ein chronischer Kontakt der Partikel mit den Zellen der epidermalen Schicht haben könnte. Eine Mehrzahl bisher durchgeführter Studien wurde an Tieren oder an Monolayer-Zellkulturen mit primären Zellen oder Zelllinien durchgeführt [Donaldson 2008, Rothen-Rutishauser 2006, Monteiro-Riviere 2006].

Um die Aussagekraft der Experimente bei der Verwendung von Zelllinien zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit primäre Keratinozyten und die spontan immortalisierte Keratinozyten-Zelllinie (HaCaT) sowohl in Monolayerkulturen, als auch in 3D-Hautmodellen eingesetzt.

Als Negativkontrolle wurde das Dispergierungsmittel DMEM mit 10% FCS und bei den Keratinozyten-Kulturen auch das KBMr Medium eingesetzt, als Positivkontrolle wurde 0,1%iges SDS verwendet. Nach dem Auftragen der Dispersionen und Pulver war bei den Monolayerkulturen, wie auch bei den 3D-Modellen, histologisch eine Ansammlung der Agglomerate auf dem geschlossenen Zellrasen erkennbar. Eine Penetration in die Zellen konnte mit dem Phasenkontrastmikroskop aufgrund der zu geringen Auflösung nicht detektiert werden. Da sich REM-Aufnahmen bei den untersuchten Nanomaterialien auf Kohlenstoffbasis ebenfalls nicht eignen, wurden verschiedene Entzündungsmarker untersucht, die nach der Induktion von Stress von den Zellen ausgeschüttet werden [de Boer 2008]. Die Messung der Entzündungsmarker nach dem Auftragen der verschiedenen Dispersionen auf die Monolayer-Zellkulturen zeigte bei den primären Keratinozyten die Expression der Marker IL-6, IL-8 und MIP-1alpha, während bei den HaCaT-Zellen nur IL-8 nachgewiesen werden konnte. Das Interleukin 6 ist ein Entzündungsmarker, der von den primären Keratinozyten bei Stress oder z.B. auch Verwundung der Epidermis exprimiert wird und daher auch bei der Hautregeneration eine wichtige Rolle spielt [de Boer 2008]. Das Chemokin Interleukin 8 dagegen wird nur im Rahmen der Signalkaskade bei Verwundung der Haut von den Endothelzellen exprimiert [de Boer 2008] und kommt im Gegensatz zum proinflammatorischen Faktor IL-6 nur in

entzündlichen Hauterkrankungen vor. Interessant ist, dass die primären Keratinozyten MIP-1alpha ausschleusen können, wenn auch nur in geringen Mengen von 1-12 pg/ml, einen Entzündungsmarker, der von Fibroblasten exprimiert wird [de Boer 2008]. Die Zelllinie scheint im Gegensatz nicht mehr in der Lage zu sein, im Rahmen der Signalkaskade verschiedene Marker zu exprimieren. Gleichzeitig fällt auf, dass die primären Keratinozyten sehr stark auf das Dispergierungsmittel DMEM/FCS reagieren und dabei die vierfache Menge an IL-8 exprimieren wie die Zelllinie HaCaT. Die Zelllinie reagiert dagegen mit einer erhöhten Expression von IL-8 nach 48 h Inkubation auf das parallel getestete Carbon Black- und Titandioxid-Pulver. Ein Grund für diese Reaktion ist, dass das Dispergierungsmittel für die HaCaT-Zellen dem Zellkulturmedium entspricht, die primären Keratinozyten werden hingegen in serumfreiem Medium kultiviert und reagieren daher verstärkt auf das fötale Kälberserum. Auffallend ist die Expression des Entzündungsmarkers IL-8, der im Vergleich zur Expression desselben Markers bei der Zelllinie HaCaT um den Faktor 5 verstärkt ausgeschüttet wird. Die HaCaT Zellen reagieren dagegen mit einer Freisetzung von bis zu 800 pg/ml IL-8 sensitiver auf den Kontakt zum aufgestäubten Nanopartikel-Pulver. Die verstärkte Stressreaktion der HaCaT auf das Pulver könnte auf das fehlende FCS zurückzuführen sein, das von den Nanomaterialien absorbiert wird und damit auch eine Micellenbildung hervorrufen kann, d.h. die Partikel werden von den Proteinen umschlossen und kommen somit nicht mehr direkt mit den Zellen in Kontakt. Gleichzeitig wurden drei verschiedene Konzentrationen der Dispersionen mit Carbon Black und Titandioxid untersucht (5, 50 und 500 µg/ml). Beim Kontakt der Zellen zu den Dispersionen mit einer Konzentration von 5 µg/ml konnten bei den primären Keratinozyten eine verstärkte Expression des Stressmarkers IL-8 mit 2500-4000 pg/ml gemessen werden. Die HaCaT Zellen reagierten auf die Zugabe dieser geringen Dispersionskonzentration mit der Expression von 600-1700 pg/ml IL-8. Die höheren Entzündungswerte gegen die Dispersionen mit der geringsten eingesetzten Nanopartikel-Konzentration von 5 µg/ml lassen sich durch die starke Proteinabsorption der Nanopartikel erklären. Je mehr Nanopartikel in der Dispersion enthalten sind, desto mehr IL-8 wird durch sie gebunden und steht somit nicht mehr für die Messung zur Verfügung [Monteiro-Riviere 2008]. Unterstützt wird diese These durch den Vergleich der Negativkontrolle und der eingesetzten Dispersion mit einer Konzentration von 500 µg/ml. Die HaCaT-Zellen exprimierten in diesem Fall nach dem Kontakt zur Carbon Black- und Titandioxid-Dispersion 250-600 pg/ml IL-8. Diese

Werte für das ausgeschüttete IL-8 konnten auch bei den Negativkontrollen gemessen werden. Durch den hohen Anteil an Nanopartikeln könnte demnach das Chemokin IL-8 verstärkt von diesen gebunden worden sein und ein Nachweis des IL-8 durch die Multiplex-Analyse war somit nicht möglich. Je geringer aber der Anteil der Nanopartikel-Konzentration wurde, desto mehr IL-8 konnte gemessen werden, da weniger Partikel vorhanden waren, die das von den Zellen freigesetzte Chemokin IL-8 binden konnten.

Generell stellt die stark proteinadsorbierende Eigenschaft der kohlenstoffhaltigen Nanopartikel ein großes Problem dar. Zum einen können die Nanopartikel auch das im Dispergierungsmittel enthaltene FCS binden und durch die auftretende Micellenbildung wird der direkte Zellkontakt verhindert, sodass Testergebnisse nicht ausgewertet werden können. Zum anderen können durch die stark proteinadsorbierende Eigenschaft auch Proteine aus den Toxizitätstests gebunden werden, sodass Ergebnisse aus diesen Tests ebenfalls nicht eindeutig interpretiert werden können.

Da das Dispergierungsmittel DMEM/FCS bei den primären Zellen bereits ohne den Zusatz von Nanopartikeln Stressreaktionen auslöste und v.a. größere Mengen an IL-8 ausgeschüttet wurden, wurde für Untersuchungen der 3D-Hautmodelle mit primären Keratinozyten als Dispergierungsmittel das Tween 80 verdünnt mit dem Airlift-Medium eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde aufgrund der Vergleiche der röhrenförmigen Carbon Nanotubes mit Asbest Blauasbest eingesetzt, von dem bekannt ist, dass es Entzündungen auslösen kann [Mossmann 2006, 1997]. Für die Durchführung der Versuche wurden nur Hautgele mit einer ausgebildeten Hornschicht eingesetzt. In die epidermale Schicht oder gar in Zellen eingedrungene Partikel konnten, wie in verschiedenen Publikationen beschrieben [Zhang 2007, Monteiro-Riviere 2005, Shvedova 2003] und bereits in den Monolayerkulturen gezeigt, histologisch über das Phasenkontrastmikroskop nicht nachgewiesen werden.

Durch den Einsatz des Airliftmediums mit Tween als Dispergierungsmittel zeigte sich bei der Messung von Entzündungsmarkern über das FACS eine verminderte Stressreaktion der primären Keratinozyten im Vergleich zum eingesetzten DMEM/FCS. Somit ist bei der Untersuchung einer möglichen Nanotoxizität im Zusammenhang mit der Verwendung primärer Keratinozyten auch ein Verzicht auf das FCS zwingend notwendig. Die eingesetzte Positivkontrolle Blauasbest erwies

sich dagegen für den Einsatz in den 3D-Hautmodellen bei der Messung von MIP-1alpha und G-CSF als ungeeignet, da die Positivkontrolle Blauasbest mit 0 - 9 pg/ml für beide Marker geringere Entzündungswerte im Vergleich zur Negativkontrolle (10 - 43 pg/ml) aufwies. Bei der Messung von IL-6 und IL-8 dagegen lagen die Entzündungswerte des Blauasbests mit 100 - 300 pg/ml immer über dem gemessenen Wert der Negativkontrolle (50 - 90 pg/ml). Es muss daher genau abgewogen werden, welche Marker in Bezug auf die Nanotoxizität und die jeweiligen Modelle eine Relevanz haben. Da die Marker MIP-1alpha und G-CSF von den Fibroblasten exprimiert werden, sind sie im Zusammenhang mit dieser Messung und der Verwendung von Blauasbest als Kontrolle ungeeignet, da dieses Material nur auf den Keratinozyten aufliegt und ohne eine mechanische Reibung keine toxische Wirkung ausübt, wie Mossmann et al. 1997 bei Alveolarmakrophagen beobachteten. Auffallend ist, dass im Vergleich zu den Versuchen mit den Monolayerkulturen primärer Keratinozyten die Negativkontrollen auch bei dem gemessenen IL-8 unter einem Wert von 100 pg/ml liegen. IL-8 ist in gesunder Haut nur bei Verletzungen oder Hauterkrankungen ein wichtiger proinflammatorischer Faktor, scheint aber im Zusammenhang mit Monolayerkulturen eine wichtigere Rolle zu spielen als in den Hautmodellen. Die Kultivierung der Zellen mit Fibroblasten und die daraus resultierende *in vivo* ähnliche Situation, durch die eine Zell-Zell-Kommunikation zwischen Keratinozyten und Fibroblasten ermöglicht wird, können einer überschießenden IL-8-Expression, wie in den Monolayerkulturen, entgegenwirken. Da sich das Blauasbest in Bezug auf die Anwendung im 3D-Hautmodell nicht als geeignete Positivkontrolle herausgestellt hatte, wurde eine weitere Positivkontrolle für den Einsatz im 3D-Hautmodell untersucht. Getestet wurde dazu vergleichend ein Hautmodell, das künstlich durch Schnitte verwundet wurde (Wundmodell), ein Hautmodell, das mit einer Blauasbest-Dispersion behandelt wurde und ein unbehandeltes Hautmodell. Aus einer vorhergehenden Studie ist bekannt, dass 24 h nach Verwundung des Hautmodells ein Anstieg an Interleukin 1alpha zu erwarten ist [Weimer 2006]. Es zeigte sich in dieser Arbeit auch ein signifikanter Unterschied zwischen dem Wundmodell und der exprimierten IL-1alpha-Konzentration des behandelten Modells mit Blauasbest. Aus diesem Grund wurde für die Versuche an 3D-Hautmodellen mit der Zelllinie HaCaT das Wundmodell als Positivkontrolle eingesetzt und die zu untersuchenden Nanomaterialien wurden, um Einflüsse der Dispergierungsmittel zu vermeiden, mit einer Pasteurpipette aufgestäubt. Als

Positivkontrolle wurde das Wundmodell eingesetzt, als Negativkontrolle dagegen das Kultivierungsmedium der HaCaT-Zellen DMEM mit 10%igem FCS. Die Hautmodelle zeigten ebenfalls nach dem Auftragen der Pulver Agglomerate, die sich auf der epidermalen Schicht abgesetzt hatten.

Da sich mit dem Phasenkontrastmikroskop histologisch keine Einwirkung der Partikel auf die Zellen feststellen ließ, wurde auch an den Überständen der Versuche an 3D-Hautmodellen eine Multiplex-Analyse der Entzündungsmarker IL-1beta, IL-4, IL-6, IL-8, MIP-1alpha und G-CSF durchgeführt. Im Vergleich zu den Hautmodellen mit primären Keratinozyten ließen sich nur die Marker IL-6 und IL-8 nachweisen, wiesen jedoch eine überschießende Stressreaktion nach dem Auftragen der Nanopartikel auf. Im Fall des aufgestäubten Carbon Black Pulvers zeigten die HaCaT Zellen eine IL-6-Expression von 500 - 2000 pg/ml und eine Ausschüttung an IL-8 von 2000-4000 pg/ml. Bei den Hautmodellen mit primären Keratinozyten wurde der Entzündungsmarker IL-6 dagegen mit einer Konzentration von 50 - 150 pg/ml und das IL-8 mit 50 - 140 pg/ml exprimiert. Der proinflammatorische Marker IL-6 ist ein Entzündungsmarker, der von den Keratinozyten bei Hautirritationen, allergischen Reaktionen, Virusinfektionen oder UV-Schädigungen ausgeschleust wird [Witzmann 2007]. Das IL-8 kommt normalerweise in der Echthaut nicht vor, spielt aber bei dermalen Verletzungen oder Entzündungsprozessen erkrankter Haut eine wichtige Rolle [Chabot-Fletcher 1994]. Die überschießende Reaktion der Zellen kann mit der Verwendung der immortalisierten Zelllinie zusammenhängen, die durch die Entartung auch veränderte Signalkaskaden aufweisen kann.

Für das zusätzlich getestete Dispergierungsmittel DMEM/FCS als Negativkontrolle, welches gleichzeitig für die HaCaT-Zellen im Monolayer das gängige Kultivierungsmedium darstellt, zeigten sich gleich hohe Entzündungswerte wie für die eingesetzte Positivkontrolle. Da die Negativkontrolle dem Zellkulturmedium für die HaCaT in der Monolayer-Kultur entspricht, kann eine solch starke Stressreaktion der Zellen auf die veränderte Kultivierungssituation der Zellen im 3D-Hautmodell zurückgeführt werden. Im Rahmen des Aufbaus der 3D-Hautmodelle wurden auch die HaCaT-Zellen entsprechend den Modellen mit primären Keratinozyten mit dem Airlift-Kultivierungsmedium ohne FCS-Zusatz kultiviert. Die Reaktion der HaCaT bestätigt nochmals die zwingende Notwendigkeit, das DMEM/FCS im Zusammenhang mit den 3D-Hautmodellen und der Untersuchung der Nanotoxizität nicht zu verwenden.

Anhand der 3D-Kulturen zeigt sich, welche Auswirkungen die unterschiedlichen Kultivierungsarten auf die Zellen und damit auch auf die Reaktion der Zellen nach dem Auftragen von Nanopartikeln haben können. Während die primären Keratinozyten im Monolayer hohe Mengen an IL-8 ausschütten, reagieren die HaCaT-Zellen nicht mit einer Stressantwort, da das eingesetzte Dispergierungsmittel dem Kultivierungsmedium der Zelllinie entspricht. Im Gegensatz dazu induziert das Probenmaterial bei der Inkubation mit den HaCaT in 3D-Hautmodellen im Vergleich zu den Hautmodellen mit primären Keratinozyten überschießende IL-8 Expression. Die Zelllinie zeigt damit eine übersteigerte Reaktion auf das Probenmaterial, sodass sich die Ergebnisse nicht mit denen aus den Versuchen an 3D-Hautmodellen der primären Keratinozyten vergleichen lassen. Gleichzeitig können die Ergebnisse aus den Untersuchungen mit immortalisierten Zellen auch nicht auf mögliche Reaktionen im menschlichen Organismus übertragen werden. Es sollte daher gezielt die Etablierung der Messung an Entzündungsmarkern an 3D-Hautmodellen mit primären Keratinozyten angestrebt werden, da ansonsten ein Vergleich der *in vitro* gewonnenen Daten mit *in vivo* Versuchen nicht möglich ist.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Kultivierung der primären Zellen in der Kokultur mit Fibroblasten eine *in vivo* ähnliche Kultivierung darstellt. Die in einem solchen Gewebemodell mögliche Zell-Zell-Kommunikation von Keratinozyten und Fibroblasten wirkt einer überschießenden IL-8 Reaktion entgegen, die in Hautmodellen mit Zelllinien beobachtet werden konnte. Im Gegensatz zu den Monolayerkulturen konnten in den 3D-Hautmodellen mit den primären Keratinozyten auch eine eindeutige Reaktion der Zellen auf die Carbon Nanotubes (CNT) bei der Messung der Entzündungsmarker IL-6 und IL-8 gemessen werden. Vor allem der Entzündungsmarker IL-8 wurde durch das Auftragen der CNT-Dispersion verstärkt exprimiert und lag im Vergleich zur Negativkontrolle um das Sechsfache höher. Da die gesunde Haut *in vivo* permanent einen Schutzfilm generiert und damit eine gute Barriere gegen eindringende Partikel darstellt, ist es möglich, dass diese nur mechanisch, z.B. durch Reiben oder kleine Wunden, in die Haut eindringen können und damit ein Risikopotential für verletzte Haut darstellen. Gezielte Untersuchungen verwundeter oder geschädigter Haut sollten daher anschließend durchgeführt werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein länger andauernder Kontakt der primären Keratinozyten mit Nanopartikeln eine chronische Schädigung der Zellen nach sich zieht, was jedoch Untersuchungen in Langzeitstudien bedarf.

Erste Hinweise auf eine mögliche zellschädigende Wirkung der Nanopartikel konnten im Rahmen der Etablierung neuer Testmethoden bereits durch Genexpressionsanalysen an Versuchen mit primären Keratinozyten gesammelt werden.

## **5.4 Relevanz neuer Methoden zur Untersuchung der Nanotoxizität**

Da sich die klassischen Toxizitätstests, wie der MTT-,LDH- oder WST-1-Test, bei denen kolorimetrische oder fluoreszierende Farbstoffe eingesetzt werden, in zahlreichen Untersuchungen ungeeignet für den Einsatz in der Nanotoxikologie zeigten, ist die Etablierung neuer Toxizitätstests im Bereich der Nanotoxikologie zwingend erforderlich [Casey 2007, Wörle-Knirsch 2006, Monteiro-Riviere 2006]. Durch die Bindung der Proteine aus diesen Tests an die Nanopartikel werden sowohl falsch-positive, als auch falsch-negative Ergebnisse erzeugt, die eine Auswertung der Tests oder anschließende Vergleiche unmöglich machen [Monteiro-Riviere 2006]. Eindeutige Aussagen über die Messung von Entzündungsmarkern können ebenfalls nicht gemacht werden, da sie sich je nach Zellart und auch Versuchsmethode, z.B. Testung im Monolayer oder im 3D-Modell, voneinander unterscheiden. Ein Teilaspekt dieser Arbeit war daher die Entwicklung neuer Methoden, die im Bereich der Nanotoxikologie eingesetzt werden können.

### **5.4.1 Globale Genexpressionsanalysen**

Eine Methode zur Untersuchung nanotoxikologischer Effekte auf Zellen, ist die am Fraunhofer IGB entwickelte MESSAGE-Technologie (**M**ultidimensional **E**lectrophoretic **S**ystem of **S**eparation for the **A**nalysis of **G**ene **E**xpression). Sie basiert auf einer hochauflösenden elektrophoretischen Trennung komplexer cDNA in einem zweidimensionalen Gelsystem [Lindemann 2006]. Die Wirkung von Nanopartikeln auf die Zellen kann somit direkt auf Transkriptionsebene untersucht werden, sodass die Bindung von Proteinen an Nanopartikel nicht berücksichtigt werden muss. Mit dieser Technik kann eine umfassende Analyse auf Transkriptomebene durchgeführt werden, ohne dass die Genomsequenz des zu untersuchenden Organismus zuvor bekannt sein muss. Durch den Einsatz der isolierten Gesamt-RNA wird jedes darin vorkommende Transkript durch eine spezifische Adapter-PCR amplifiziert und kann nachgewiesen werden. Komplexe

Genome lassen sich durch die Bildung von Subpopulationen handhabbar machen, sodass die Auftrennung entsprechend variiert werden kann. Zur Etablierung der Methode für den Bereich der Nanotoxikologie wurden erste Versuche mit Keratinozyten-Monolayern durchgeführt. Eine spätere Übertragung der Methode auf das komplexere 3D-Hautmodell soll nach erfolgreichem Einsatz an der Monolayer-Kultur durchgeführt werden.

Die mit Carbon Black und Carbon Nanotubes behandelten Keratinozyten zeigten eine vitale und zelltypische kubische Morphologie, während die mit Titandioxid in Kontakt gebrachten Zellen teilweise eine Ablösung vom Untergrund und damit eine Schädigung zeigten. Bei der anschließend durchgeführten Genexpressionsanalyse konnte aus den mit Titandioxid behandelten Proben das Gen RPSA identifiziert werden, welches für einen Lamininrezeptor kodiert. Das Gen war im Vergleich zur Negativkontrolle um den Faktor 20 vermindert exprimiert, während die mit Carbon Black oder Carbon Nanotubes behandelten Zellen keine oder nur eine um den Faktor 3 herabregulierte Genaktivität zeigten. Fehlende Lamininrezeptoren erklären die verringerte Adhäsionsfähigkeit der Zellen. In der Haut kann ein Mangel an Lamininrezeptoren zu einer verminderten Verankerung der Zellen in der extrazellulären Matrix führen. Auch das Gen PLOD1, das für eine Lysylhydroxylase kodiert, wurde in allen behandelten Keratinozyten vermindert exprimiert, bei der Behandlung der Zellen mit den Carbon Nanotubes sogar um den Faktor 21. Die Carbon Nanotubes haben durch den Kontakt auf die primären Keratinozyten einen Einfluss auf die Expression von PLOD1. Die Lysylhydroxylase bewirkt die Hydroxylierung von Lysylresten in kollagenähnliche Peptide und ermöglicht so eine Quervernetzung von Kollagenstrukturen [Myllyharju 2001, Hautala 1992]. Es ist denkbar, dass die gestörte Verankerung der Zellen in der extrazellulären Matrix und die Störung der Kollagenquervernetzung zu ernsthaften Bindegewebserkrankungen, vergleichbar dem Ehlers-Danlos-Syndrom, führen. Die Haut kann eine erhöhte Elastizität aufweisen, wird aber gleichzeitig instabiler und reißt schneller, sie stellt damit keine effektive Barriere mehr dar, die den Körper vor Umwelteinflüssen schützen kann. Es kommt durch die leichte Verletzbarkeit zu verstärkten Entzündungen der Haut und zu Wundheilungsstörungen. Da davon auch Kollagenstrukturen und Quervernetzungen anderer Körperregionen betroffen sind, können auch Folgeerkrankungen, wie Herz-Kreislaufkrankungen, durch die Instabilität der Gefäßstrukturen oder eine Ablösung der Netzhaut am Auge auftreten



[Pschyrembel 2004]. Durch die starke proteinadsorbierende Eigenschaft kohlenstoffhaltiger Nanopartikel muss auch berücksichtigt werden, dass durch die Bindung der Partikel an Oberflächenproteine der Zellen eine Genregulation stattfinden kann, sodass die Ausbildung von Lamininrezeptoren oder der Lysylhydroxylase gestört werden und die Zellen damit nicht mehr ausreichend in der Extrazellulären Matrix verankert werden können. Ein nanotoxikologischer Effekt durch das Absterben der Zellen kann damit nicht ausgeschlossen werden und muss in weiteren Untersuchungen gezielt betrachtet werden.

Ein weiteres für die Barrierefunktion der Haut essentielles Gen, das durch die Genexpressionsanalyse identifiziert werden konnte, ist das stark vermindert exprimierte Gen *SPRR4* (**s**mall **p**roline **r**iche protein 4). Das Protein *SPRR4* bildet zusammen mit den Proteinen Involucrin, Filaggrin, Loricrin und Proteinen der S100 Familie das „Cornified envelope“ (CE) der Keratinozyten. Das CE ist eine 15 nm dicke, dichte und sehr schwer lösliche Struktur an der Innenseite der Zellmembran der Keratinozyten. Durch seine biomechanischen Eigenschaften bildet es eine protektive Barriere gegen Umwelteinflüsse [Hohl 1990]. In den CNT behandelten Proben wurde dieses Gen um den Faktor 13 und der mit Titandioxid behandelten Probe um den Faktor 15 herabreguliert. Da sich das CE während der Keratinisierung der Epidermiszellen entwickelt, kann eine verminderte Expression auch mit der Kultivierung der Zellen im Monolayer zusammenhängen. Dieses Gen ist für einen wichtigen Schutzmechanismus der Haut zuständig und sollte gezielt in weiteren Studien mit den 3D Hautmodellen untersucht werden. Weitere keratinozyten-spezifische Marker, die identifiziert werden konnten, sind das Kalikrein 7 (KLK7), das S100A10 (= S100A10p) und das Keratin 6b (KRT6B). Das Kalikrein 7 ist ein Enzym, welches für die Degeneration der Corneodesmosomen zuständig und dadurch für die Verhornung der Epidermis wichtig ist [Caubet 2004]. Das Gen S100A10p zählt zur Familie der Kalzium-bindenden EF-Hand Proteine, die gewebespezifisch exprimiert werden. Das Protein kommt in den Zellen des *Stratum basale* und *Stratum spinosum* der Keratinozyten im Cytoplasma vor. Da das Gen ebenfalls bei der Stratifizierung und damit bei der Ausbildung der Barrierefunktion der Haut beteiligt ist, zeigte sich in der Genexpressionsanalyse nur eine geringe Regulation. Wichtig kann dieses Gen allerdings im Zusammenhang eines behandelten Hautmodells werden. Hier muss gezielt die mögliche Auswirkung der Nanopartikel auf die Ausbildung einer intakten Barrierefunktion untersucht werden. Eine Störung der Keratinisierung der Epidermis-

zellen führt zu einer eingeschränkten Barrierefunktion der Haut. Durch die Störung des Gleichgewichts der Zellneubildung und Abschilferung können Folgeinfektionen durch eindringende Keime und Wundheilungsstörungen auftreten. Bekannte Formen einer genetischen Verhornungsstörung der Haut stellen die verschiedenen Ichthyosen dar, die sich in unterschiedliche Schweregrade einteilen lassen. Generell kann bei dieser Erkrankung eine starke Schuppung der Haut bis zur Blasenbildung auftreten [Pschyrembel 2004].

Neben Gendefekten, die die Barrierefunktion der Haut einschränken können, wurden auch Gene detektiert, die wichtige Prozesse in der Zellentwicklung und Differenzierung regulieren. Bei den Zellen, die mit Titandioxid behandelt wurden, konnten die Gene *CCDN2* und *YBX1* des Zellzyklus identifiziert werden. Das *CCDN2* Gen wird um den Faktor 13 vermindert exprimiert. Dabei kann durch die verringerte Expression des Proteins Cyclin D2 die Zelle nicht in die S-Phase des Zellzyklus übergehen, sondern verbleibt in der G1-Phase und es findet somit keine Proliferation statt. Das *YBX1*-Gen kodiert das Protein Y-box-1, welches ein spezifischer Transkriptionsfaktor für den Zellzyklus darstellt [Jurchot 2003]. *YBX1* war in den mit Titandioxid behandelten Zellen im Vergleich zu denen mit Carbon Black und Carbon Nanotube Kontakt herabreguliert. Das Protein Y-box-1 interagiert mit dem Y-Boxmotiv und unterstützt damit die Expression von Cyclin A und B1 [Jurchot 2003]. Das Cyclin A ist ebenfalls beim Übergang der Zelle in die S-Phase beteiligt, während Cyclin B1 den Übergang von der G2-Phase in die Mitose reguliert. Eine Stagnation der Zellen in der G1-Phase hat eine eingeschränkte Proliferation zur Folge, die Zellen teilen sich nicht mehr weiter. In der Haut kann somit eine intakte Barriere nicht aufrechterhalten werden, da keine neuen Zellen aus der Basalmembran proliferieren und stratifizieren können. Der natürliche Reparaturmechanismus der Haut, der für eine gesunde Wundheilung notwendig ist, ist gestört und die Haut wird anfällig für Infektionen oder die Entartung der Zellen in Krebszellen. Auch das *Wnt13* Gen, welches für ein Glykoprotein kodiert, spielt bei der Zellentwicklung und Differenzierung eine wichtige Rolle. Eine veränderte Genexpression wird bereits mit der Entstehung von Leukämie in Verbindung gebracht [Katoh 1996]. Das Gen wird bei den Zellen, die mit Carbon Nanotubes in Kontakt gebracht werden, verstärkt exprimiert. Durch die Auslösung chronischer Stressreaktionen und die Dauerbelastung der Zellen mit Sauerstoffradikalen [Manna 2005] kann es zu Veränderungen der Zelldifferenzierung und gestörten Zellreparaturmechanismen

kommen. Eine Entartung der Zellen muss daher in weiteren Untersuchungen gezielt geprüft werden.

Weitere Gene, die identifiziert werden konnten, waren das RPL21, RPL13A und das RPL10A. Diese kodieren für ribosomale Proteine der 60S Untereinheit und spielen bei der Translation der transkribierten mRNA in Polypeptidketten eine wichtige Rolle. Während das RPL10A für die mit Titandioxid und Carbon Nanotubes behandelten Zellen um den Faktor 22 herabreguliert wurde, zeigten die Gene RPL13A und RPL21 nur eine schwach verminderte, bzw. leicht verstärkte Expression. Von RPL10A ist bekannt, dass eine verminderte Expression auch in neuronalen Vorläuferzellen während der Entwicklung zu finden ist. In welchem Zusammenhang die Varianzen der einzelnen hier identifizierten ribosomalen Proteine jedoch stehen ist noch unklar. Durch eine Störung der Translation kann es zu einer fehlerhaften Synthese von Proteinen kommen, sodass diese nicht mehr für zelluläre Prozesse zur Verfügung stehen.

Neben den hier genannten Genen konnten auch einige identifiziert werden, deren Bedeutung in Zusammenhang mit der Nanotoxikologie noch unklar sind. Da bisher nur ein Viertel des Transkriptoms identifiziert wurde, ist der nächste Schritt die Untersuchung des restlichen Genoms, um so eine genauere Aussage zur Wirkung von Nanomaterialien auf primäre Keratinozyten treffen zu können. Eine anschließende Erweiterung der Studien auf das 3D Hautmodell wird angestrebt, da sich die MESSAGE-Technologie, wie hier gezeigt, sehr gut zur Untersuchung der Nanotoxikologie einsetzen lässt. Mögliche Marker, die dabei näher untersucht werden sollten, sind die Wnt-Gene, die bereits mit der Entstehung von Leukämie in Verbindung gebracht werden [Katoh 1996]. Da diese Gene für Glykoproteine kodieren, die für die Zelldifferenzierung zuständig sind, kann in Bezug auf chronische Entzündungsreaktionen, bedingt durch einen längeren Kontakt der Zellen mit den Nanopartikeln, eine karzinogene Entartung der Zellen nicht ausgeschlossen werden. Ebenfalls genauer untersucht werden sollte das Gen PLOD1, welches ebenfalls in einem chronischen Entzündungsverlauf eine Störung der Kollagen-Quervernetzung zur Folge haben kann und damit die Eigenschaft der Haut als effektive Körperbarriere herabsetzt. Da sich in den Monolayerkulturen mit primären Keratinozyten auch Gene identifizieren ließen (Klk7, S100A10p, Keratin 6b), die für die Bildung der Hornschicht essentiell sind, müssen diese bei der Untersuchung von 3D-Hautmodellen durch eine Belastung der Zellen mit Nanomaterialien genauer

untersucht werden. Eine Störung der Keratinisierung kann ebenfalls zu einer gestörten Barrierfunktion der Haut führen. Ist die Hautbarriere jedoch gestört, können Bakterien und andere Keime in die Haut eindringen und Entzündungen auslösen, sodass Folgeerkrankungen der Haut und auch anderer Organe auftreten können.

#### **5.4.2 Raman-Spektroskopie**

Die Raman-Spektroskopie ist in der Charakterisierung von Materialien bereits eine fest etablierte Methode und wird bisher nur vereinzelt zur Messung biologischer Parameter eingesetzt. Sie stellt eine berührungs- und zerstörungsfreie Analyseverfahren dar. Bestrahlt man eine biologische Probe mit monochromatischem Licht, so wird das eingestrahlte Licht gestreut und die dabei entstehenden Spektrallinien lassen sich als Raman-Linien messen [Kessler 2007]. Da Moleküle und Molekülgitter stets schwingen, können diese Grundsicherungen gemessen und so veränderte Schwingungen der Moleküle, z.B. durch eine Behandlung der Hautmodelle mit Nanomaterialien, im Vergleich festgestellt werden.

Untersuchungen mit Zellsuspensionen konnten mittels Raman Spektroskopie nicht ausgewertet werden, da sich trotz mehrerer Waschschrirte nicht alle Partikel von den Zellen ablösen ließen. Zellen, an denen bei der Messung noch kohlenstoffhaltige Nanopartikel hafteten, wurden durch den Laser so stark erhitzt, dass die Zellen zerstört wurden und somit keine Auswertung in Bezug auf die Nanotoxizität möglich war. Es wurden deshalb Messungen an 3D-Hautmodellen angeschlossen, die sowohl an Hautgelen mit primären Keratinozyten, als auch der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT durchgeführt wurden. Als Negativkontrolle wurden völlig unbehandelte und die mit dem Dispergierungsmittel DMEM/FCS betropften Hautmodelle verwendet. Die Messungen erfolgten 24 h nach Probenauftrag. Zuvor wurden die Nanopartikel mit PBS<sup>-</sup> abgspült, dennoch konnten in den Phasenkontrastaufnahmen der Zellen aufgelagerte Agglomerate der Nanomaterialien detektiert werden. Da die Hautmodelle jedoch komplett untersucht wurden, konnten unter dem Mikroskop zunächst gezielt Zellbereiche ausgewählt werden, die zwar einen Kontakt zu den Partikeln zeigten, die Partikel jedoch nicht direkt auf den Zellen lagen, sodass eine Schädigung der Zellen durch eine Überhitzung mit dem Laser, wie sie in den Zellsuspensionen mit den kohlenstoffhaltigen Partikeln erfolgte, vermieden werden konnte.

Die spektroskopische Untersuchung fand an jeweils 15 Zellen für 100 s pro Probe statt. Durchgeführt wurden Messungen an Hautmodellen, auf die Carbon Black, Carbon Nanotubes und Titandioxid Pulver gestäubt worden waren. Die Messung der Hautmodelle mit primären Keratinozyten zeigte im Score Plot eine Gruppierung der Messpunkte der mit Titandioxid behandelten und der Carbon Nanotube behandelten Proben.

Bei der Messung der Hautgele, die mit der Zelllinie HaCaT aufgebaut waren, zeigten sich bei der ersten durchgeführten Messung ebenfalls klar strukturierte Gruppierungen der Messwerte im Score Plot, die sich je nach Probenauftrag eindeutig voneinander unterscheiden ließen.

Da die Raman-Spektroskopie zuvor nie für Messungen an 3D Modellen eingesetzt worden war, lässt sich nicht sagen, welche Reaktionen in den Zellen ablaufen und ob die hier gemessenen Muster als positiv oder negativ zu bewerten sind. Generell scheint die Methode jedoch geeignet, auch wenn die Gelstruktur der Hautäquivalente doch ein hohes Signal/Rauschverhältnis aufwies. Die Raman-Spektroskopie eignet sich gut zur ersten Abschätzung toxischer Wirkungen der verschiedenen Nanomaterialgruppen. Durch die spektroskopische Untersuchung lassen sich gezielt Fingerprint-Analysen durchführen, die auch in Bezug auf neue Materialien ein schnelles und einfaches Vorscreening auf toxische Wirkungen möglich machen, die im Anschluss durch Genexpressionanalysen intensiver untersucht werden können.

### **Ausblick**

In dieser Arbeit konnte erfolgreich ein Tracheamodell mit der Zelllinie Calu-3 unter dynamischen Kultivierungsbedingungen in einem neu entwickelten Bioreaktor aufgebaut werden. Die Zellen zeigten dabei erstmals ein *in vivo* ähnliches hochprismatisches Zellwachstum. Zur besseren Nachahmung der Trachea im 3D-Gewebemodell sollen Analysen der *in vivo* Basalmembran im Hinblick auf deren Zusammensetzung durchgeführt werden. Ziel ist es, die Kultivierung der hTEZ auf der BioVaSc zu verbessern und damit ein zusätzliches Tracheamodell auf Basis primärer humaner Zellen zu generieren und für Inhalationsstudien nutzbar zu machen. Parallel konnte gezeigt werden, dass sich im Hinblick auf die Untersuchung der Nanotoxizität die häufig eingesetzten 2D-Kulturen primärer Keratinozyten und der Zelllinie HaCaT in ihrer Reaktion wesentlich voneinander unterscheiden. Anhand der untersuchten 3D-Hautmodelle konnte überdies eine überschießende Stressantwort

der Zelllinie detektiert werden. Die Unterschiede machen deutlich, wie wichtig es für eine bessere Übertragbarkeit der Testergebnisse auf den menschlichen Organismus ist, zum einen die *in vivo* nahe Kultivierung der Zellen im Gewebemodell und zum anderen die Verwendung primärer Zellen anzustreben, um mögliche Risiken neu entwickelter Nanomaterialien auf den Menschen besser abschätzen zu können.

Es konnte auch gezeigt werden, dass das FCS zur Herstellung von Nanopartikel-Dispersionen nicht eingesetzt werden sollte, da die primären Zellen auf diesen Zusatz mit starken Stressantworten reagieren. Zur Erstellung gezielter Dosis-Wirkungsbeziehungen ist die Etablierung eines neuen Dispergierungsmittels daher zwingend erforderlich. Im Zusammenhang mit dem Tracheamodell sollte auch die Aerosolgenerierung kohlenstoffhaltiger Nanomaterialien angestrebt werden, um Inhalationsstudien mit konstanten Konzentrationen durchführen zu können.

Die in dieser Arbeit eingesetzte globale Genexpression und Raman-Spektroskopie erwiesen sich als geeignete Werkzeuge zur Untersuchung der Nanotoxizität. Für eine Standardisierung und Kommerzialisierung müssen sie jedoch in weiteren Studien an 3D-Gewebemodellen weiter untersucht werden.

Akute Risiken konnten in den durchgeführten Studien nicht nachgewiesen werden. Es ist allerdings zwingend erforderlich, chronische Effekte gezielt in Langzeitstudien zu untersuchen. Da bislang noch unklar ist, wie sich die unterschiedlichen Nanomaterialien auf den menschlichen Organismus auswirken, sollten bei Arbeiten mit diesen Materialien stets schützende Maßnahmen, wie das Tragen von Handschuhen und einer Feinstaubmaske, ergriffen und eine Aerosolbildung vermieden werden.

## Literaturverzeichnis

- 3I (2002). Size matters: Building a successful nanotechnology company, White Paper von 3I, in Zusammenarbeit mit Economist Intelligence Unit und dem Institut of Nanotechnology, London 2002.
- Abbott A (2003). Cell culture: biology's new dimension. *Nature* 2003; 424: 870-872.
- Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2001). *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie* 2. Aufl. 2001. Weinheim: Wiley-VCH: 653-654.
- Alexander AJ et al. (2007). Carbon Nanotube structures and Compositions: Implications for Toxicological Studies. *Nanotoxicology: Characterization, Dosing and Health Effects* 2007; 1. Auflage: 7-18.
- Alonso L, Fuchs E (2003). Stem cells of the skin epithelium. *PNAS* 2003; 100 (1): 11835.
- Asselineau D, Bernard BA, Bailly C, Darmon M, Prunieras M (1986). Human epidermis reconstructed by culture: is it "normal"? *J Invest Dermatol* 1986: 181-186.
- Bals R (1997). Zelltypen der Atemwegsepithelien: Morphologie, Molekularbiologie und klinische Bedeutung. *Pneumologie* 1997; 51: 142-149.
- Barry BW (1987). Mode of action of penetration enhancers in human skin. *Journal of Controlled Release* 1987; 6: 85-97.
- Bennat C, Müller-Goymann CC (2000). Skin penetration and stabilization of formulations containing microfine titanium dioxide as physical UV filter. *Int J of Cosmet Sci* 2000; 22:271-283.
- Benninghoff A (1985). *Makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen*. 6. Aufl. München: Urban und Schwarzenberg.
- Bianco A, Kostarelos K, Prato M (2005). Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Curr Opin Chem Biol* 2005; 9: 674-679.

- Bos JD (1990). *Skin Immune System (SIS)*. 1. Aufl. CRC Press Incorporated, Boca Raton.
- Brunner TJ, Wick P, Manser P, Spohn P, Gross RN, Limbach LK, Bruinink A, Stark W (2006). In vitro Cytotoxicity of Oxide Nanoparticles: Comparison to Asbestos Silica and the Effect of Particle Solubility. *Environ Sci and Technol* 2006; 40 (14): 4374–4381.
- Brunner TJ, Wick P, Mauser P et al. (2006). In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica and the effect of particle solubility. *Environ Sci Technol* 2006; 40: 4374-4381.
- Buschmann MD, Gluzband YA, Grodzinsky AJ, Hunziker EB. (1995). Mechanical compression modulates matrix biosynthesis in chondrocyte/agarose culture. *J Cell Sci* 108:1497-508.
- Caubet C, Jonca N, Brattsand M, Guerrin M, Bernard D, Schmidt R, Egelrud T, Simon M, Serre G (2004). Degradation of Corneodesmosome Proteins by two Serine Proteases of the Kallikrein Family, SCTE//KLK5//hK5 and SCCE//KLK7//hK7. *J Investig Dermatol* 2004; 122: 1235-1244.
- Chabot-Fletcher M et al. (1994). Interleukin-8 production is regulated by protein kinase C in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1994; 103: 509-515.
- Clark WH, Elder DE, Guerry D, Epstein MN, Greene MH, van Horn M (1984). A study of tumor progression: the precursors lesion of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol* 1984: 1147-1165.
- Coles GV (1992). Occupational risks. *Nature* 1992; 359: 99.
- Crepaldi T, Pollack AL, Prat M, Zborek A, Mostov K, Comoglio PM (1994). Targeting of the SF/HGF receptor to the basolateral domain of polarized epithelial cells. *J Cell Biol* 1994; 125: 313-320.
- Dai H (2002). Carbon nanotubes: synthesis, integration and properties. *Acc Chem Res* 2002; 35: 1035-1044.



- De Boer J, El Ghalbzouri A, D'Amore P, Hirschi K, Rouwkema J, Van Bezooijen R, Karperien M (2008). Cellular signalling. Tissue Engineering. San Diego: Academic Press 2008, 1. Auflage: 16: 94-96.
- Dick CAJ, Brown DM, Donaldson K, Stone V (2003). The Role of Free Radicals in the Toxic and Inflammatory Effects of Four Different Ultrafine Particle Types. *Inhal Toxicol* 2003; 15: 39.
- Donaldson K et al. (2004). Nanotoxicology. *Occup Environ Med* 2004; 61: 727-728.
- Donaldson K, Stone V, Tran CL et al. (2004). Nanotoxicology *Occup Environ Med* 2004; 61: 727-728.
- Dupuit F, Gaillard D, Hinnrasky J, Mongodin E, de Bentzmann S, Copreni E, Puchelle E (2000). Differentiated and functional human airway epithelium regeneration in tracheal xenografts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 278 (1): 165-176.
- Elder A et al. (2006). Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environ Health Perspect* 2006; 114: 1172-1178.
- Evonik-Magazin 2/2008. Gut geschützt: 6-20. Hrsg. Evonik Industries AG.
- Fiorito S, Serafino A, Andreola F, Togna A, Togna G (2006). Toxicity and Biocompatibility of Carbon Nanoparticles. *J of Nanosci and Nanotechn* 6, 591.
- Fubini B, Fenoglio I, Tomatis M (2007). Physicochemical Characterisation of Nanoparticles the Determine Potential Toxicity. *Nanotoxicology: Characterization, Dosing and Health Effects* 2007; 1. Auflage: 59-68.
- Gray TE, Guzman K, Davis CW, Abdullah LH, Nettesheim P (1996). Mucociliary differentiation of serially passaged normal human tracheobronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 14 (1): 104-112.
- Green H, Rheinwald JG, Sun TT (1970). Properties of an epithelial cell type in culture: the epidermal keratinocyte and its dependence on products of the fibroblasts. *Cell Shape Surf Arch* 1970; 17: 493-500.

- Guo L, Van Dem Busche A, Buechner M, Yan A, Kane AB, Hurt RH (2008). Adsorption of Essential Micronutrients by Carbon Nanotubes and the Implications for Nanotoxicity Testing. *Small* 2008; 4, No 6: 721-727.
- Haas K-H, Heubach D (2007). Nano Produktion. Innovationspotenziale für hessische Unternehmen durch Nanotechnologien in Produktionsprozessen. Hrsg. Hessisches Ministerium für Wirtschaft, Verkehr und Landesentwicklung. Juli 2007.
- Hanamure Y, Deguchi K, Ohyama M (1994). Ciliogenesis and mucus synthesis in cultured human respiratory epithelial cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1994; 103: 889-895.
- Hautala T, Heikkinen J, Kivirikko KI, Myllylä R (1992). Minoxidil specifically decreases the expression of lysine hydroxylase in cultured human skin fibroblasts. *Biochem J* 1992; 283 (1): 51-54.
- Heyder J, Svartengren MU (2002). Drug delivery to the lungs. Edited Bisgaard H, O'Callaghan C, Smaldone GC. New York: Marcel Dekker; 2002, 21.
- Hohl D (1990). Cornified cell envelope. *Dermatologica* 1990; 180: 201-211.
- Iijima S (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 1991; 354:56-58.
- Islam MF, Rojas E, Bergey DM, Johnson AT, Yodh AG (2003). High weight fraction surfactant solubilization of single-wall carbon nanotubes in water. *Nano Lett* 2003; 3: 269-273.
- Junqueira LC, Carneiro J (2005). Berlin: Springer Verlag: Histologie, 5. Aufl.: Epidermis: 306-309.
- Jurchott K, Bergmann S, Stein U, Walther W, Janz M, Manni I, Piaggio G, Fietze E, Dietel M, Royer HD (2003). YB-1 as a Cell Cycle-regulated Transcription Factor Facilitating Cyclin A and Cyclin B1 Gene Expression. *J Biol Chem* 2003; 278: 27988-27996.
- Katoh M, Hirai M, Sugimura T, Terada M (1996). Cloning, expression and chromosomal localization of Wnt-13, a novel member of the Wnt gene family. *Oncogene*; 13: 873-876.
- Kessler W (2007). Multivariate Datenanalyse. Weinheim: VCH; 2007.
- Knopf B, Wollina U (1990). The Keratinocyte – a biologically active cell. *Dermatol Monatsschr.* 176: 453-459.

- Kobayashi K, Nomoto Y, Suzuki T, Tada Y, Miyake M, Hazama A, Kanemaru S, Nakamura T, Omori K (2006). Effect of Fibroblasts on Tracheal Epithelial Regeneration in Vitro. *Tissue Eng* 2006; 12 (9): 2619-2628.
- Kopatz I, Remy JS, Behr JP (2004). A model for non-viral gene delivery: through syndecan adhesion molecules and powered by actin. *J Gene Med* 2004; 6: 769-776.
- Lademann J, Weigmann H, Richtmeyer C, Barthelmes H, Schäfer H, Müller G, Sterry W (1999). Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 12(5): 247-256.
- Lam CW, James JT, McCluskey R et al. (2006). A review of carbon nanotube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks. *Crit Rev Toxicol* 2006; 36: 189-217.
- Landsdown ABG, Taylor A (1997). Zinc and titanium oxides: promising UV-absorbers but what influence do they have on the intact skin? *Int J Cosmet Sci* 1997; 19 (4): 167-72.
- Lehmann OJ, Sowden JC, Carlson P, Jordan T, Bhattacharya SS (2003). Fox's in development and disease. *Trends Genet* 2003; 19: 339-344.
- Lindemann E, Rupp S, Sohn K (2006). Universelles Verfahren für die Genexpressionsanalyse. *BIOspektrum*, 6, 636-637.
- Lynch I, Dawson K, Linse S (2006). Detecting cryptic epitopes created by nanoparticles. *Sci STKE* 2006; 327: pe 14.
- Manna SK, Sarkar S, Barr J, Wise K, Barrera EV, Jejelowo O, Rice-Ficht AC, Ramesh GT (2005). Single-walled Carbon Nanotubes Induces Oxidative Stress and Activates Nuclear Transcription Factor-kappaB in Human Keratinocytes. *Nano Lett* 2005, Vol. 5 (9): 1676-1684.
- Maurer HR (1994). In vitro screening for potential anti-cancer drugs: New approaches including induction of differentiation. In: Crommelin C, Couvreur P, Duchene D, editors: *In vitro and ex vivo test systems to rationalize drug design and delivery*. Paris: Editions de Sante 1994; 99-107.
- Maynard AD (2007). Nanotoxicology: Laying a Firm Foundation for Sustainable Nanotechnologies. *Nanotoxicology: Characterization, Dosing and Health Effects* 2007; 1. Auflage: 1-6.

- Menon GK, Elias PM (1997). Morphologic basis for a pore-pathway in mammalian stratum corneum. *Skin Pharmacol* 1997; 10: 235-245.
- Monteiro-Riviere NA, Inman AO (2006). Challenges for assessing carbon nanomaterial toxicity to the skin. *Carbon* 2006; 44: 1070-1078.
- Mossman BT, Lounsbury KM, Reddy SP (2006). Oxidants and signalling by mitogen-activated protein kinases in lung epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 34 (6):666-669.
- Mossmann BT, Faux S, Janssen Y et al. (1997). Cell signalling pathways elicited by asbestos. *Environ Health Perspect* 1997; 105 (Suppl. 5): 1121-1125.
- Muller J, Huaux F, Lison D et al. (2006). Respiratory toxicity of carbon nanotubes: How worried should we be? *Carbon* 2006; 44: 1048-1056.
- Myllyharju J, Kivirikko KI (2001). Collagens and collagen-related diseases. *Ann Med* 2001; 33: 7-21.
- Nemmar A, Hoet PH, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, Vanbilloen H, Mortelmans L, Nemery B (2002). *Circulation* 2002; 105: 411.
- Nikula KJ et al. (1997). *Fundam Appl. Toxicol* 1997; 37 (1): 37.
- Nikula KJ et al. (2001). *Environ Health Perspect* 2001; 109: 311.
- Oberdörster G et al. (2004). Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol* 2004; 16: 437-445.
- Oberdörster G et al. (2005). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. Part I. *Fiber Toxicol* 2005; 2: doi: 10.1186/1743-8977-2-8.
- Oberdörster G, Ferin J, Morrow, PE (1992). Volumetric Loading of Alveolar Macrophages (AM): A possible Basis for diminished AM-Mediated Particle Clearance. *Exp Lung Res* 18: 87-104.
- Oberdörster G, Ferin J, Soderholm S, Gelein R, Baggs R, Morrow PE (1999a). Increased pulmonary toxicity of inhaled ultrafine particles: due to overload alone? *Inhal Toxicol* 38: 295-302.
- Oberdörster G, Maynard A, Donaldson K et al. (2005). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. Review Part I. *Fibre Toxicol* 2005; 2: 1-35.

- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J (2005). Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 2005; 13: 823-840.
- Oberdörster G, Yu CP (1999b). The carcinogenic potential of inhaled diesel exhaust: a particle effect? *J Aerosol Sc 21 Suppl 1*: 397-401.
- Pantarotto D, Briand JP, Prato M, Bianco A (2004). Translocation of bioactive peptides across cell membrane by carbon nanotubes. *Chem Commun* 2004; 16-17, DOI: 10.1039/b311254c.
- Pantarotto D, Singh R, McCarthy D, Erhardt M, Briand J-P, Prato M, Kostarelos K, Bianco A (2004). Functionalized carbon nanotubes for plasmid DNA gene delivery. *Angew Chem Int Ed Engl* 2004; 43: 5242-5246.
- Paredes JI, Burghard M (2004). Dispersion of individual single-walled carbon nanotubes of high length. *Langmuir* 2004; 20: 5149-5152.
- Peattie RA, Fisher RJ (2006). Perfusion Effects and Hydrodynamics. *Adv Biochem Engin/Biotechnol* 2006; 103: 75-156.
- Peigney A, Laurent C, Flahant E, Basca RR, Rousset A (2001): Specific Surface area of carbon nanotubes and bundles of carbon nanotubes. *Carbon* 2001; 39: 507-514.
- Poland CG et al. (2008). Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. Published online: *nature nanotechnology* 20. May 2008; doi: 10.1038/nnano.2008.111.
- Popov VN (2004). Carbon nanotubes: properties and application. *Marker Sci Eng R* 2004; 43: 61-102.
- Porter A (2007). Direct imaging of single-walled carbon nanotubes in cells. *Nat Nanotechnol* 2007; 2 (11): 713-717.
- Pschyrembel 260. Aufl. 2004. Berlin, New York: De Gruyter Verlag. Ehlers-Danlos-Syndrom: 453-454.
- Pschyrembel 260. Aufl. 2004. Berlin, New York: De Gruyter Verlag. Ichthyose: 835-837.

- Putz R, Pabst R (Hrsg.). Sobotta (2000). Atlas der Anatomie des Menschen. Band 2; 21. Auflage, 2000. Urban und Fischer, München, Jena.
- Rayman-Rassmusen JP, Riviere JE, Monteiro-Riviere NA (2006). Penetration of intact skin by quantum dots with diverse physicochemical properties. *Toxicol Sci* 91(1): 159-165.
- Rehn B et al. (2003). Investigations on the inflammatory and genotoxic lung effects of two types of titanium dioxide: untreated and surface treated. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003; 189 (2): 84-95.
- Rothen-Rutishauser BM, Schurch S, Haenni B, Kapp N, Gehr P (2006). Interaction of fine particles and nanoparticles with red blood cells visualized with advanced microscopic techniques. *Environ Sci Technol* 2006; 40: 4353-4359.
- Rothen-Rutishauser BN, Schurch S, Aenni B et al. (2006). Interaction of fine particles and nanoparticles with red blood cells visualized with advanced microscopic techniques. *Environ Sci Technol* 2006; 40: 4353-4359.
- Royal Society and Royal Academy of Engineering. Nanoscience and Nanotechnologies: Opportunities and Uncertainties. London: 2004.
- Shen BQ, Panos RJ, Hansen-Guzman K, Widdicombe JH, Mrsny RJ (1997). Hepatocyte growth factor stimulates the differentiation of human tracheal epithelia in vitro. *Am J Physiol* 1997; 272 (6 Pt 1): L1115-1120.
- Shvedova AA, Castranova V, Kisin ER et al. (2003). Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *J Toxicol Environ Health A* 2003; 66: 1909-1926.
- Snipes MB (1996). *Inhalation Toxicol* 1996; 8 (suppl.): 91.
- Soto KF, Carrasco A, Powell TG, Garza KM, Murr LE (2005). Comparative in vitro cytotoxicity assessment of some manufactured nanoparticulate materials characterized by transmission electron microscopy. *J Nanopart Res* 2005; 7: 145-169.
- Suslick KS, Fang MM, Hyeon T, et al. (1999). Applications of sonochemistry to materials synthesis. *Sonochemistry and Sonoluminescence*. Niederlande: Kluwer-Publishers 1999: 291-320.
- Tortora GJ, Derrickson BH (2006). Anatomie und Physiologie. Weinheim: Wiley-VCH; 1. Auflage: 986.

- Turner A (2007). Making Sense of Water Pollution Monitoring, Vortrag im Rahmen der Veranstaltung: Nanotechnology – Products and Processes for Environmental Benefit, Mai 2007. The Royal Society, London, 2007.
- Valenti LE, Fiorito PA, Garcia CD, Giacomelli CE (2006). The adsorption-desorption process of bovine serum albumin on carbon nanotubes. *J of Colloid and Interf Sci* 2006; 307: 349-356.
- Veronesi B, Makwana O, Pooler M, Chen LC (2005). Effects of Subchronic Exposures to Concentrated Ambient Particles: VII. Degeneration of Dopaminergic Neurons in Apo E<sup>-/-</sup> Mice. *Inhal Toxicol* 2005; 17: 235.
- Vohrer U, Zschoerper N (2007). Kohlenstoff-Nanoröhren – Phönix aus der Asche. *Vakuum in Forschung und Praxis* 2007; 19 (2): 22-30.
- Walles T, Schanz J, Weimer M, Linke K, Hofmann M, Mertsching H (2007). The potential of bioartificial tissues in oncology research and treatment. *Onkologie*; 30 (7): 388-394.
- Weimer M (2006). Entwicklung von humanen organoiden Vollhautäquivalenten für biomedizinische Testsysteme. Universität Stuttgart. Fakultät der Geo- und Biowissenschaften, Diss., 2006.
- Wendt D, Timmins N, Malda J, Janssen F, Ratcliffe A, Vunjak-Novakovic G, Martin I (2008). Bioreactors for tissue engineering. *Tissue Engineering*. San Diego: Academic Press 2008, 1. Auflage: 16: 483-485.
- Witschi HR, Last JA (2003). Toxic responses of the respiratory system. *Essentials of Toxicology*. Hamburg, New York: McGraw-Hill 2003; 15: 220-232.
- Witzmann F, Monteiro-Riviere NA (2006). Multi-walled carbon nanotube exposure alters protein expression in human keratinocytes. *Nanomed: Nanotechnol Biol Med* 2006; 2: 158-168.
- Witzmann FA, Monteiro-Riviere NA (2007). Effect of Carbon Nanotube Exposure on Keratinocyte Protein Expression. *Nanotoxicology: Characterization, Dosing and Health Effects 2007*. New York: Informa Verlag; 1. Auflage: 197-224.
- Wöhrle-Knirsch JM, Pulskamp K, Krug HF (2006). Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano Lett* 2006; 6 (6): 1261-1268.
- Woodley DT, Stanley JR, Reese MJ, O’Keeve EJ (1988). Human dermal fibroblasts synthesize laminin. *J Invest Dermatol* 90, 679-683.

- Yacobson B, Smalley R (1997). Fullerene Nanotubes: C 1 000 000 and Beyond. *Am Sci* 1997; 85: 324-337.
- Yang SY, Ryu I, Kim HY, Kim JK, Jang SK, Russell TP (2006b). Nanoporous Membranes with Ultrahigh Selectivity and Flux for the Filtration of Viruses. *Advanced Materials* 2006b; 18 (6): 709-712.
- Zhao Y, Meng H, Chen Z, Zhao F, Chai Z (2007). Biological activities of nanomaterials/nanoparticles. *Nanotoxicology*. Danvers: American Scientific Publishers 2007; 1: 1-24.
- Zuin S (2007). Effect-Oriented Physicochemical Characterization of Nanomaterials. *Nanotoxicology: Characterization, Dosing and Health Effects* 2007. New York: Informa Verlag; 1. Auflage: 19-44.



## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b> Schematische Abbildung eines einwandigen Carbon Nanotube .....	23
<b>Abbildung 2</b> Mögliche Expositionsrouten von Nanopartikeln in den menschlichen Körper .....	31
<b>Abbildung 3</b> Schematischer Aufbau der Epidermis nach Benninghoff .....	32
<b>Abbildung 4</b> Anatomischer Aufbau der Luftröhre.....	36
<b>Abbildung 5</b> Aufnahmen des humanen respiratorischen Epithels.....	36
<b>Abbildung 6</b> Schema des Abscheidegrads von Partikeln und Aersolen.....	37
<b>Abbildung 7</b> Vergleich der (A) humanen Haut mit (B) dem 3D-Hautäquivalent .....	40
<b>Abbildung 8</b> Aufbau des Pumpsystems zur Azellularisierung der BioVaSc .....	64
<b>Abbildung 9</b> (A) Schweinedünndarm vor dem Azellularisierungsvorgang, während und nach der Azellularisierung.....	64
<b>Abbildung 10</b> Kultivierung der 3D-Hautmodelle in 24-Well Inserts.....	66
<b>Abbildung 11</b> (A) Azellularisierte, mit Zellen besiedelte BioVaSc zur dynamischen Kultivierung im Bioreaktor.....	67
<b>Abbildung 12</b> Prinzip der vergleichenden Genexpressionsanalyse .....	79
<b>Abbildung 13</b> Phasenkontrastaufnahme humaner TEZ .....	89
<b>Abbildung 14</b> Phasenkontrastaufnahme humaner Trachea-Epithelzellen kultiviert mit AECG- und MEMr II-Zellkulturmedium.....	90
<b>Abbildung 15</b> Immunhistochemischer Nachweis von Becherzellen nach der Kultivierung im Differenzierungsmedium .....	91
<b>Abbildung 16</b> Immunhistochemischer Nachweis von zilientragenden Zellen nach der Kultivierung im Differenzierungsmedium .....	92
<b>Abbildung 17</b> Immunhistochemischer Nachweis von Tight Junctions nach der Kultivierung im Differenzierungsmedium .....	92
<b>Abbildung 18</b> Immunhistochemischer Nachweis von ausdifferenzierten Zellen nach der Kultivierung im Differenzierungsmedium .....	93
<b>Abbildung 19</b> Phasenkontrastaufnahme von Monolayerkulturen der 3 getesteten Zelllinien .....	94
<b>Abbildung 20</b> Immunhistochemischer Nachweis von Becherzellen bei den Zelllinien .....	95
<b>Abbildung 21</b> Immunhistochemischer Nachweis zilientragender Zellen bei den Zelllinien. ....	95
<b>Abbildung 22</b> Immunhistochemischer Nachweis von Tight Junctions bei den Zelllinien.....	96
<b>Abbildung 23</b> Immunhistochemischer Nachweis von ausdifferenzierten Zellen bei den Zelllinien ....	96
<b>Abbildung 24</b> HE-Färbung statischer Kulturen auf Inserts .....	98
<b>Abbildung 25</b> HE-Färbung statischer Kulturen auf der BioVaSc.....	99
<b>Abbildung 26</b> Immunhistochemischer Nachweis von Becherzellen auf der BioVaSc.....	100
<b>Abbildung 27</b> Immunhistochemischer Nachweis zilientragender Zellen auf der BioVaSc.....	100
<b>Abbildung 28</b> Immunhistochemischer Nachweis von Tight Junctions auf der BioVaSc.....	101
<b>Abbildung 29</b> Immunhistochemischer Nachweis von ausdifferenzierten Zellen auf der BioVaSc ....	101
<b>Abbildung 30</b> Schemazeichnung des Trachea-Bioreaktors .....	103
<b>Abbildung 31</b> Aufbau des Bioreaktors zur Simulation der Atmung.....	104
<b>Abbildung 32</b> Simulation des einströmenden Mediums in den Bioreaktor .....	104

<b>Abbildung 33</b> Simulation der einströmenden Luft in die obere Kammer des Bioreaktors.....	105
<b>Abbildung 34</b> Mobiler Brutschrank zur Kultivierung der Bioreaktorsysteme .....	105
<b>Abbildung 35</b> HE-Färbung dynamisch kultivierter Zelllinien auf der BioVaSc.....	106
<b>Abbildung 36</b> HE-Färbung nativer humaner Trachea-Epithelzellen und dynamisch kultivierter Calu-3 Zellen .....	107
<b>Abbildung 37</b> REM-Aufnahmen nativer humaner Trachea-Epithelzellen und dynamisch kultivierte Calu-3 auf der BioVaSc .....	107
<b>Abbildung 38</b> Verschiedene immunhistochemische Nachweise der nativen humanen Trachea- Epithelzellen im Vergleich zu dynamisch kultivierten Calu-3 auf der BioVaSc .....	108
<b>Abbildung 39</b> Aufnahmen der Nanomaterialien mit dem Rasterelektronenmikroskop.....	111
<b>Abbildung 40</b> Nanotoxikologischer Versuch mit dem Tracheamodell. ....	113
<b>Abbildung 41</b> LDH-Messung nach der Durchführung nanotoxikologischer Tests am Tracheamodell .....	114
<b>Abbildung 42</b> Phasenkontrastaufnahmen von Monolayerkulturen in Zellkulturflaschen:.....	115
<b>Abbildung 43</b> Hänge-Inserts mit Zellen und darauf aufgetragenen Nanomaterialproben.....	116
<b>Abbildung 44</b> HE-Färbung der Inserts mit primären Keratinozyten und Nanomaterialproben.....	117
<b>Abbildung 45</b> Messung verschiedener Entzündungsmarker an Keratinozyten-Monolayerkulturen:.	119
<b>Abbildung 46</b> Messung des Entzündungsmarkers IL-8 nach dem Auftragen unterschiedlicher Konzentrationen von Carbon Black und Titandioxid auf primäre Keratinozyten .....	120
<b>Abbildung 47</b> Messung von IL-8 an HaCaT-Monolayerkulturen.....	121
<b>Abbildung 48</b> Messung des Entzündungsmarkers IL-8 nach dem Auftragen unterschiedlicher Konzentrationen an Carbon Black und Titandioxida auf HaCaT .....	122
<b>Abbildung 49</b> HE-Färbung der 3D-Hautmodelle.....	123
<b>Abbildung 50</b> Immunhistochemischer Nachweis der Tight Junctions bei den Hautmodellen .....	124
<b>Abbildung 51</b> HE-Färbung 3D-Hautmodelle mit primären Keratinozyten nach dem Auftragen verschiedener Referenzsubstanzen .....	125
<b>Abbildung 52</b> HE-Färbung von 3D-Hautmodellen aufgebaut mit primären Keratinozyten nach dem Auftragen verschiedenen Nanopartikel-Dispersionen .....	126
<b>Abbildung 53</b> Messung von Entzündungsmarkern nach dem Auftragen unterschiedlicher Dispersionen auf Hautgele mit primären Keratinozyten .....	127
<b>Abbildung 54</b> HE-Färbung eines verwundeten 3D-Hautmodells.....	128
<b>Abbildung 55</b> Vergleich der IL-1alpha-Konzentrationen aus 3 unterschiedlich behandelten Hautmodellen .....	129
<b>Abbildung 56</b> HE-Färbung von 3D-Hautmodellen aufgebaut mit der Zelllinie HaCaT, die mit verschiedenen Nanopartikel-Pulvern in Kontakt gebracht wurden.....	130
<b>Abbildung 57</b> Messung der Entzündungsmarker nach dem Auftragen der verschiedenen Proben auf Hautmodelle aufgebaut mit HaCaT-Zellen .....	131
<b>Abbildung 58</b> Phasenkontrastaufnahme eines unbehandelten Keratinozyten-Monolayers im Vergleich zu Keratinozyten, die mit verschiedenen Dispersionen behandelt wurden .....	134
<b>Abbildung 59</b> Messung der RNA-Qualität und Quantität im Agilent Bioanalyzer .....	135
<b>Abbildung 60</b> Zyklusoptimierung der spezifischen PCR.....	136

---

<b>Abbildung 61</b> Falschfarben-Überlagerung der Transkriptomanalyse der Negativkontrolle (DMEM/FCS) mit Carbon Black (Subpopulationen GA/GC) und der Negativkontrolle mit Carbon Black (Subpopulationen GG/GT) .....	137
<b>Abbildung 62</b> Bild der Transkriptionsanalyse der Negativkontrolle mit Carbon Nanotubes, (Subpopulationen GA/GC) und der Negativkontrolle mit Carbon Nanotubes (Subpopulationen GG/GT).....	138
<b>Abbildung 63</b> Falschfarben-Überlagerung der Transkriptomanalyse von der Negativkontrolle mit Titandioxid (Subpopulationen GA/GC) und der Negativkontrolle mit Titandioxid (Subpopulationen GG/GT).....	139
<b>Abbildung 64</b> Phasenkontrastaufnahme von Zellen der Lungenkarzinom-Zelllinie A549 in einer Zellsuspension in Kontakt mit verschiedenen Nanopartikeln .....	143
<b>Abbildung 65</b> Phasenkontrastaufnahme von Hautmodellen mit primären Keratinozyten behandelt mit verschiedenen Nanomaterialien bei der Untersuchung mit dem Raman .....	144
<b>Abbildung 66</b> Score Plot der Messdaten aus den Versuchen an Hautmodellen mit primären Keratinozyten .....	145
<b>Abbildung 67</b> Score Plot der Messdaten aus den Versuchen an Hautmodellen mit der Zelllinie HaCaT .....	146

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b> Mögliche Analysetechniken zur Charakterisierung von Nanomaterialien.....	27
<b>Tabelle 2</b> Vergleich der Einflussfaktoren auf die klassische Toxikologie und Nanotoxikologie nach Yuliang Zhao und Hari Singh Nalwa.....	29
<b>Tabelle 3</b> Eingesetzte Zelllinien .....	43
<b>Tabelle 4</b> Eingesetzte Nanomaterialien .....	44
<b>Tabelle 5</b> Eingesetzte Chemikalien .....	44
<b>Tabelle 6</b> Eingesetzte Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen .....	48
<b>Tabelle 7</b> Eingesetzte Puffer.....	49
<b>Tabelle 8</b> Eingesetzte Lösungen für die Zellbiologie .....	50
<b>Tabelle 9</b> Eingesetzte Lösungen für die Immunhistochemie und Histologie .....	51
<b>Tabelle 10</b> Eingesetzte Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie .....	52
<b>Tabelle 11</b> Eingesetzte Antikörper.....	53
<b>Tabelle 12</b> Eingesetzte Test-Kits .....	54
<b>Tabelle 13</b> Eingesetzte Kitsysteme für die Molekularbiologie .....	55
<b>Tabelle 14</b> Eingesetzte Primer für die MESSAGE-Technologie.....	55
<b>Tabelle 15</b> Verbrauchsmaterial .....	56
<b>Tabelle 16</b> Laborgeräte.....	57
<b>Tabelle 17</b> Einzelne Arbeitsschritte zur Herstellung der Nanopartikel-Dispersionen .....	68
<b>Tabelle 18</b> Programm des Einbettautomaten .....	70
<b>Tabelle 19</b> Die einzelnen Schritte der Entparaffinierung .....	71
<b>Tabelle 20</b> Einzelne Schritte der Antikörperfärbung mit dem Dako EnVision System .....	73
<b>Tabelle 21</b> Einzelne Arbeitsschritte der Hämalaun-Eosin Färbung.....	75
<b>Tabelle 22</b> Einzelne Arbeitsschritte der Movat-Pentachromfärbung .....	76
<b>Tabelle 23</b> Einzelne Schritte der Alcianblau-Färbung bei pH 2,5.....	77
<b>Tabelle 24</b> Fixierungsschritte von Schnitten oder Geweben mit Glutardialdehyd für das REM.....	77
<b>Tabelle 25</b> Durchführung der Isolation von Gesamt-RNA nach dem Protokoll des Herstellers .....	80
<b>Tabelle 26</b> Ansatz für die LD-PCR.....	81
<b>Tabelle 27</b> Protokoll der LD-PCR .....	81
<b>Tabelle 28</b> PCR-Ansatz für die Adapter-PCR I.....	83
<b>Tabelle 29</b> Programm der Adapter-PCR I.....	83
<b>Tabelle 30</b> PCR-Ansatz für die Adapter-PCR II.....	84
<b>Tabelle 31</b> Programm der Adapter-PCR II.....	84
<b>Tabelle 32</b> Ansatz der PCR der gepickten Spots zur späteren Sequenzierung.....	87
<b>Tabelle 33</b> Programm der PCR zur Amplifizierung der gepickten Spots.....	87
<b>Tabelle 34</b> Anzahl eingesetzter Biopsate für die Zellisolation und erzielte Zellausbeute.....	89
<b>Tabelle 35</b> Anzahl der Biopsate aus denen hTEZ mit mikroskopisch erkennbarer Zilienaktivität isoliert werden konnten .....	90
<b>Tabelle 36</b> Vergleich der ausgebildeten Zellmarker nach der Kultivierung der isolierten Trachea- Epithelzelle in AECG-Medium und MEMr II-Medium.....	93

---

<b>Tabelle 37</b> Vergleich der ausgebildeten Zellmarker nach der Kultivierung der Zelllinien.....	97
<b>Tabelle 38</b> Ausgebildete Zellmarker nach der Kultivierung der Zelllinien im Monolayer im Vergleich zur statischen Kultivierung auf der BioVaSc.....	102
<b>Tabelle 39</b> Ausgebildete Zellmarker nach der statischen und dynamischen Kultivierung der Zelllinie Calu-3 auf der BioVaSc .....	109
<b>Tabelle 40</b> Ermittlung der spezifischen Oberfläche mittels BET.....	112
<b>Tabelle 41</b> Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Monolayerkulturen und 3D-Hautmodellen mit primären Keratinozyten und der Zelllinie HaCaT .....	132
<b>Tabelle 42</b> Gesamt-RNA-Konzentrationen und Qualität der isolierten Proben .....	135
<b>Tabelle 43</b> Identifizierung und differentielle Regulation der gepickten Spots.....	140

## Lebenslauf

- Name:** Martina Hampel, geb. Brenner
- Geboren:** 12. Dezember 1979 in Ellwangen
- seit 03/2009** **Wissenschaftliche Mitarbeiterin**  
Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik (IGVT) der  
Universität Stuttgart (Prof. Dr. Thomas Hirth)
- 01/2006 – 03/2009** **Promotion**  
Fraunhofer IGB, Stuttgart (Prof. Dr. Herwig Brunner)  
Promotion in der Abteilung Zellsysteme mit dem Thema:  
Aufbau humaner 3D *in vitro* Testsysteme zur  
Risikobewertung von Nanomaterialien
- 11/2005 – 01/2006** **Wissenschaftliche Hilfskraft**  
Fraunhofer IGB, Stuttgart
- 01/2005 – 07/2005** **Praktikum**  
Schattauer GmbH, Verlag für Medizin und  
Naturwissenschaften, Stuttgart  
Praktikum im Lektorat und in der Redaktion
- 01/2004 – 12/2004** **Diplomarbeit**  
Institut für Parasitologie, Universität Hohenheim  
Diplomarbeit (Prof. Dr. Ute Mackenstedt) mit dem Thema:  
Untersuchung serieller Passagen von *Sarcocystis*  
*singaporensis* in verschiedenen Zwischenwirten, die sich  
in ihrem MHC-I-Komplex voneinander unterscheiden.
- 10/1999 – 01/2005** **Studium**  
Eberhard-Karls-Universität, Tübingen  
Studium der Biologie
- 09/1996 – 07/1999** **Schulbildung**  
Justus-von-Liebig-Schule, Aalen  
Abschluss: Abitur

## Publikationen

### Buchartikel:

Mertsching H, Hansmann J, Schanz J, Linke K, **Brenner M**, Michaelis J, Walles T: Vaskularisierte Trägersysteme für in vitro Testsysteme. In: D. Beckmann, M. Meister. 13. Heiligenstädter Kolloquium. Technische Systeme für Biotechnologie und Umwelt. Heiligenstadt. Inst. f. Bioprozess- und Analysetechnik; 2006; ISBN-10: 3-00-018621-2; 47-55.

### Journals:

Schütz W, Michl F, Forero S, Mertsching H, Vohrer U, **Brenner M**, Peter T, Voetz M, Willmann S, Niederalt C, Ragot J, Oeben-Negele M, Übelmesser P und Sandner H. Toxicology and health risk assessment of carbon nanomaterials (TRACER), in Proceedings. EuroNanoForum, Düsseldorf 2007. Nanotechnology in Industrial Applications, p. 142.

Schanz J, **Hampel M**, Mertsching H, Walles T. Experimental tracheal patching using extracellular matrix scaffolds. Annals of Thoracic Surgery. MS ID ATS/2008/197814.

Steger V, **Hampel M**, Trick I, Müller M, Walles T. Clinical tracheal replacement: transplantation, bioprosthesis and artificial grafts. Expert Rev Med Devices 5 (5), 605-612 (2008).

### Posterpräsentationen:

**Hampel M**, Hansmann J, Mertsching H.

In vitro three dimensional trachea model

EuroNanoForum 2007

19.-21. Juni 2007, Düsseldorf, Deutschland

**Hampel M**, Hansmann J, Mertsching H.

An in vitro three dimensional tubular trachea model

14<sup>th</sup> Congress on Alternatives to Animal Testing

28.-30- September 2007, Linz, Österreich

**Hampel M**, Hansmann J, Mertsching H.

An in vitro three dimensional tubular trachea model

Eurotox Congress 2007

07.-10. Oktober 2007, Amsterdam, Niederlande

**Hampel M**, Hansmann J, Mertsching H.

Development of a threedimensional trachea model

3<sup>rd</sup> World Congress on Regenerative Medicin

18.-20. Oktober 2007, Leipzig, Deutschland

Weimer M, **Hampel M**, Thude S, Mertsching H, Hirth T.

3D Human Skin Testing System

Nanotoxikologisches Symposium

April 2008, Saarbrücken, Deutschland

**Hampel M**, Hansmann J, Mertsching H.

Development of a threedimensional trachea model

World Biomaterial Congress 2008

28. Mai – 01. Juni 2008, Amsterdam, Niederlande

**Hampel M**, Dally I, Hansmann J, Mertsching H.

Development of a threedimensional trachea cell model

15<sup>th</sup> Congress on Alternatives to Animal Testing

19.-21. September 2008, Linz, Österreich

**Hampel M**, Dally I, Hansmann J, Mertsching H.

Development of a threedimensional trachea cell model

BioStar Kongress 2008

09.-11. Oktober 2008, Stuttgart, Deutschland



**Vorträge:****Hampel M**, Mertsching H.

In vitro Testsysteme zur Bewertung der Toxizität von Nanopartikeln

OTTI-Fachforum Carbon Nanotubes

19. September 2007, Regensburg, Deutschland

**Hampel M**, Mertsching H.

Tissue Engineering – von Zellmodellen zu funktionellem Gewebe

TR-22-Retreat

26. April 2008, Hamburg, Deutschland

**Hampel M**, Mertsching H.

In vitro Testsysteme zur Bewertung der Toxizität von Nanopartikeln

OTTI-Fachforum Carbon Nanotubes

16. Juni 2008, Regensburg, Deutschland

**Sonstige Beiträge:**

Beitrag im ZDF in der Sendung „Drehscheibe Deutschland“

Carbon Nanotubes

29. Januar 2008

# Danksagung

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei:

**Prof. Dr. Herwig Brunner** und **Prof. Dr. Thomas Hirth** für die Möglichkeit der Durchführung meiner Promotion am Fraunhofer IGB. Herrn Prof. Brunner möchte ich auch ganz herzlich für die Betreuung meiner Arbeit danken.

**Prof. Dr. Peter Scheurich** für die freundliche Übernahme der Zweitbegutachtung meiner Arbeit.

**Prof. Dr. Heike Mertsching** für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit zur Promotion in Ihrer Abteilung.

**Dr. Kai Sohn** und **seiner Arbeitsgruppe**, ohne deren Hilfsbereitschaft und Engagement die Durchführung der Genexpressionsanalysen nicht möglich gewesen wäre.

**Dr. Thorsten Walles** für die permanente Versorgung mit Trachea-Biopsaten.

**Dr. Andrea Heymer** für ihr Interesse an meiner Arbeit, ihre Diskussionsbereitschaft und Korrekturen.

**Iris Dally** und **Katharina Reutlinger** für Ihre engagierte Mitarbeit.

**Allen Mitarbeitern der Abteilung Zellsysteme**, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

**Petra Kluger** und **Jacqueline Michaelis** für viele anregende Diskussionen und motivierende Gespräche.

Und **meiner Familie** – ohne deren Rückhalt und Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.