



---

**Forschungszentrum Karlsruhe**  
in der Helmholtz-Gemeinschaft

---

**Wissenschaftliche Berichte**  
FZKA 6899

**Zur toxikologischen  
Untersuchung ultrafeiner  
Partikel: Entwicklung und  
Einsatz eines realitätsnahen  
*in vitro* Lungenmodells**

**R. Wottrich**

Institut für Toxikologie und Genetik

August 2003



# **Forschungszentrum Karlsruhe**

in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 6899

Zur toxikologischen Untersuchung ultrafeiner Partikel:  
Entwicklung und Einsatz eines realitätsnahen *in vitro*  
Lungenmodells\*

**Ralf Wottrich**

Institut für Toxikologie und Genetik

\*von der Fakultät für Chemie- und Biowissenschaften der Universität  
Karlsruhe (TH)  
genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

2003

Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH  
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft  
Deutscher Forschungszentren (HGF)

ISSN 0947-8620

**Zur toxikologischen Untersuchung ultrafeiner Partikel:  
Entwicklung und Einsatz eines realitätsnahen *in vitro*  
Lungenmodells**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
an der Fakultät für Chemie- und Biowissenschaften  
der  
Universität Karlsruhe  
genehmigte  
**Dissertation**

von  
**Ralf Wottrich**

aus  
Karlsruhe  
2003

Tag der mündlichen Prüfung: 16.07.2003

Referent: PD Dr. H.F. Krug

Korreferent: Prof. Dr. A. Hartwig



## ***Zusammenfassung***

Die Exposition mit ultrafeinen Partikeln wird in epidemiologischen Studien mit einer erhöhten Sterblichkeit in der Bevölkerung in Verbindung gebracht. Die Eigenschaften der Partikel und die zugrundeliegenden Mechanismen, die zu diesen Beeinträchtigungen führen, sind noch weitgehend unbekannt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines realitätsnahen humanen Zellkulturmodells der Luft/Blut-Schranke. Dazu wurde die Wirkung von ultrafeinen Modellpartikeln (Hämatit-, Silicasol- und Quarz-Partikel) auf die Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B, die Alveolarepithelzelllinie A549, die Endothelzelllinie ECV304 und die Makrophagenzelllinien THP-1 und Mono Mac 6 untersucht, um geeignete Zelllinien zu finden.

Mit dem Transmissionselektronenmikroskop konnte die Aufnahme und der basolateral gerichtete Transport von Partikeln in A549-Alveolarepithelzellen dokumentiert werden.

Die Ergebnisse aus umfangreichen Zytotoxizitätsstudien unterstützen die Hypothese, nach der die Wirkung von Partikeln mit abnehmender Größe zunimmt. Jedoch determiniert die chemische Zusammensetzung den grundsätzlichen toxischen Effekt der Partikel, deren Wirkung durch eine Dosis-Wirkungs-Beziehung beschrieben werden konnte. Jede Zelllinie zeigte eine charakteristische Wirkungsempfindlichkeit. Nach Exposition mit Partikeln setzten die Zellen in für die jeweilige Zelllinie charakteristischer Weise die Entzündungsmediatoren Interleukin-6 und Interleukin-8 frei. In Kokulturen von A549-Alveolarepithelzellen mit THP-1- oder Mono Mac 6-Makrophagen zeigte sich eine um das vielfache gesteigerte Freisetzung der Interleukine. Diese Ergebnisse zeigen die Bedeutung der Interaktion zwischen den verschiedenen Zelllinien bei den Entzündungsreaktionen nach Exposition mit Partikeln an der Luft/Blut-Schranke. Erste Untersuchungen an der Triple-Zellkultur unterstützen diese Befunde. Zudem wurden in elektronenmikroskopischen Aufnahmen erste Hinweise auf eine Translokation von Partikeln durch die Zellschichten gefunden.

Die gelungene Entwicklung eines Zellkulturmodells im Rahmen dieser Arbeit ermöglicht in zukünftigen Studien, die Zell/Zell-Interaktionen an der Luft/Blut-Schranke unter Einbeziehung der Rolle der Endothelzellen zu untersuchen.

**Abstract**

**Toxicological studies of ultrafine particles: Development and application of a close-to-reality *in vitro* lung model**

Exposure to ambient ultrafine particulate matter has been associated with increased mortality in the public. The particle parameters triggering the underlying mechanisms are still largely unknown. The aim of the present study was the development of a close-to-reality human cell culture model of the air/blood barrier. Therefore, different human cell lines were evaluated regarding their response after exposure to fine and ultrafine model particles (hematite, silicasol and quartz particles). The cell lines under study were the bronchial epithelial cells BEAS-2B, the alveolar epithelial cells A549, the endothelial cells ECV304 and the macrophage-like cells THP-1 and Mono Mac 6.

The uptake of hematite particles into A549 alveolar epithelial cells and the basolateral directed transport could be documented by use of light microscopy and transmission electron microscopy. The results from extensive cytotoxicity studies support the hypothesis, that decreasing diameters of the used particles increase the intensity of the cytotoxic effects. However, the chemical composition determines the fundamental toxic impact of the particles. Each cell line showed a characteristic sensitivity to particle exposure in a dose-dependent manner.

After exposure to particles, the cells released the inflammatory mediators Interleukin-6 and Interleukin-8 in dependence of the cell line. The co-cultures of alveolar epithelial cells (A549) and macrophage-like cells (differentiated THP-1 or Mono Mac 6) showed an increased sensitivity to particles concerning the cytokine release in comparison to the mono-cultures of each cell line. These results point out the significance of the interactions between the different cell types for inflammatory responses after exposure to particles at the air/blood barrier.

First studies using the triple-cell culture system support these findings. Furthermore, transmission electron micrographs of the triple-cell culture system indicate translocation of hematite particles through the cell layers. The successful development of a cell culture model in the context of this work enables examinations of the cell/cell interactions at the air/blood barrier under inclusion of the role of endothelial cells in future studies.

<b>1</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Partikel in unserer Atemluft – Herkunft und Verteilung .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2</b>	<b>Gesundheitliche Beeinträchtigungen durch ultrafeine Partikel .....</b>	<b>5</b>
<b>2.3</b>	<b>Auswirkungen von ultrafeinen Partikeln auf den Organismus .....</b>	<b>6</b>
<b>2.4</b>	<b>Modellsysteme - <i>In vitro</i> Kokulturen.....</b>	<b>9</b>
<b>2.5</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>13</b>
<b>3.1</b>	<b>Chemikalien und Lösungen .....</b>	<b>13</b>
<b>3.2</b>	<b>Zellkulturen und <i>in vitro</i> Assays.....</b>	<b>16</b>
3.2.1	A549Zellen .....	16
3.2.2	BEAS-2B Zellen .....	17
3.2.3	ECV304 Zellen .....	17
3.2.4	Mono Mac 6 Zellen.....	18
3.2.5	THP-1 Zellen .....	19
3.2.6	Differenzierung von THP-1 Zellen .....	19
3.2.7	Langzeitkonservierung von Zellen.....	19
3.2.8	Auftauen von Zellen .....	20
3.2.9	Verwendete Partikel.....	21
3.2.10	Kokultur aus A549-Zellen und THP-1- und Mono Mac 6-Zellen.....	22
3.2.11	Triple Zellkultur .....	22
3.2.12	Exposition der Zellen .....	24
3.2.13	Unterscheidung von Apoptose und Nekrose durch Annexin-V-FITC/Propidiumjodid Assay.....	24
3.2.14	Bestimmung der CD14-Rezeptor-Expression .....	25
3.2.15	Zytotoxizitätstest - Laktatdehydrogenase (LDH)-Assay .....	27
3.2.16	Vitalitätstest - MTT-Assay.....	29
3.2.17	Zytotoxizitätstest - Sytox® Green Assay .....	30
3.2.18	Trypanblau .....	31
3.2.19	Untersuchung der Zytokinfreisetzung mittels ELISA .....	32
3.2.20	IL-6-ELISA .....	32
3.2.21	IL-8-ELISA .....	34
3.2.22	Transiente Transfektion.....	36

<b>3.3</b>	<b>Elektronenmikroskopie</b> .....	<b>37</b>
3.3.1	Transmissionselektronenmikroskopie.....	37
3.3.2	Rasterelektronenmikroskopie.....	40
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>42</b>
<b>4.1</b>	<b>Untersuchungen an Einzelzellkulturen</b> .....	<b>42</b>
4.1.1	A549 Langzeitkultur .....	42
4.1.2	Differenzierung der Makrophagenzelllinien THP-1 und Mono Mac 6.....	44
4.1.3	Aufnahme von Hämatis-Partikeln in Zellen.....	46
4.1.4	Zytotoxizität verschiedener Modellpartikel – Laktatdehydrogenase-Assay (LDH) .....	53
4.1.5	Einfluss verschiedener Partikel auf die Vitalität - MTT-Assay .....	58
4.1.6	Zeitverlauf der Zytotoxizität von Modellpartikeln - Sytox Green®-Assay .....	61
4.1.7	Apoptose .....	66
4.1.8	Freisetzung von Interleukin 6 und Interleukin 8 durch Partikeleinwirkung.....	68
<b>4.2</b>	<b>Kokulturen – Epithelzellen und Makrophagen</b> .....	<b>73</b>
4.2.1	Lichtmikroskopische Dokumentation von Kokulturen .....	73
4.2.2	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen an Kokultursystemen .....	74
4.2.3	Apoptoseinduktion durch den Zell/Zell-Kontakt von THP-1- und A549-Zellen.....	75
4.2.4	Freisetzung von IL-6 und IL-8 in Kokulturen.....	76
<b>4.3</b>	<b>Entwicklung eines Kokultursystems aus Epithelzellen (A549), Endothelzellen (ECV304) und Makrophagen (Mono Mac 6)</b> .....	<b>79</b>
4.3.1	Kultivierung der A549- und ECV304-Zellen in Fremdmedium .....	80
4.3.2	Beschichtung der Transwell®-Membranen mit extrazellulären Matrixproteinen – Anheftung der Zellen auf Ober- und Unterseite.....	82
4.3.3	Anheftung der Zellen gegen interzelluläre Abstoßungseffekte.....	83
4.3.4	Transiente Transfektion .....	85
4.3.5	Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) .....	85
4.3.6	Elektronenmikroskopische Dokumentation des Triple-Zellkultursystems .....	87
4.3.7	Freisetzung von Interleukin-6 und Interleukin-8 im Triple-Zellkultursystem .....	90
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>92</b>
<b>5.1</b>	<b>Kokultursystem – Adaption an die realen Bedingungen</b> .....	<b>93</b>
<b>5.2</b>	<b>Ultrafeine Partikel – Je kleiner der Partikel desto größer die Wirkung</b> .....	<b>100</b>
<b>5.3</b>	<b>Aufnahme und intrazellulärer Transport von Partikeln</b> .....	<b>108</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>111</b>

## 1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A549	Humane Alveolarepithelzelllinie
BEAS-2B	Humane Bronchialepithelzelllinie
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DIC	Differentieller Interferenzkontrast
DMEM	Zellkulturmedium ( <i>Dulbeccos Modified Eagles Medium</i> )
DMSO	Dimethylsulfonid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DQ12	Dörentruoper Quarzkristallmehl der Mahlung 12
ECV304	Humane Nabelschnurendothelzelllinie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminiethlether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest ( <i>enzyme linked immuno sorbent assay</i> )
EVOM	Ohm-Voltmeter ( <i>electronical volt ohm meter</i> )
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsorter
FCS	Fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
HBSS	Gepufferte Salzlösung ( <i>Hank's balanced salt solution</i> )
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
KGM	Keratinocyten Kulturmedium ( <i>keratinocyte growth medium</i> )

M199	Zellkulturmedium (Medium 199)
MIP-1/2	Makrophagen-inflammatorisches Protein 1/2
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromid
NAD	Nicotinamidadenindinucleotid
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid-Phosphat
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PET	Polyvinylpyrrolidon- und EGTA-haltige Lösung
PM	Partikel ( <i>particulate matter</i> )
REM	Rasterelektronenmikroskop
RPMI	Zellkulturmedium (entwickelt im Roswell Park Memorial Institute, USA)
SBIT	Trypsin Inhibitor ( <i>soy bean trypsin inhibitor</i> )
SEM	standard error of the mean
SEM	Standardfehler ( <i>standard error of the mean</i> )
SiO <sub>2</sub>	Silizumdioxid
TEER	Elektrischer Transmembranwiderstand ( <i>trans epithelial electrical resistance</i> )
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
THP-1	Humane Makrophagenzelllinie
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrosis Faktor
TPA	12-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat
TSP	Gesamtschwebstaub ( <i>total suspended particles</i> )

## 2 EINLEITUNG

Der Mensch hat heute die Bedeutung einer sauberen Umwelt für seine Lebensqualität erkannt. Saubere Luft ist für Pflanzen, Tiere und Menschen ebenso lebenswichtig wie Wasser und Nahrung. Der Anblick rauchender Schornsteine, die gasförmige Luftschadstoffe und große Mengen an Schwebstaub in unsere Atmosphäre entlassen, gehört in den Industrieländern weitgehend der Vergangenheit an. Die lufthygienischen Verhältnisse und damit die Qualität unserer Atemluft haben sich in den letzten Jahren merklich verbessert (Umweltbundesamt, 2003b). Trotzdem wurden seit Mitte der 80er Jahre vermehrt epidemiologische Studien über gesundheitliche Beeinträchtigungen durch Luftschadstoffe veröffentlicht (Dockery *et al.*, 1989; Korn *et al.*, 1987; Utell *et al.*, 1988; Ware *et al.*, 1986). Diese Studien belegen Auswirkungen von Luftschadstoffen, auch bei Konzentrationen weit unterhalb der Grenzwerte, und führen diese zum Großteil auf die inhalierbare Fraktion des Schwebstaubs zurück (Brunekreef *et al.*, 1995; Dockery *et al.*, 1993; Dockery & Pope, III, 1994; Pope, III *et al.*, 1991; Seaton *et al.*, 1995).

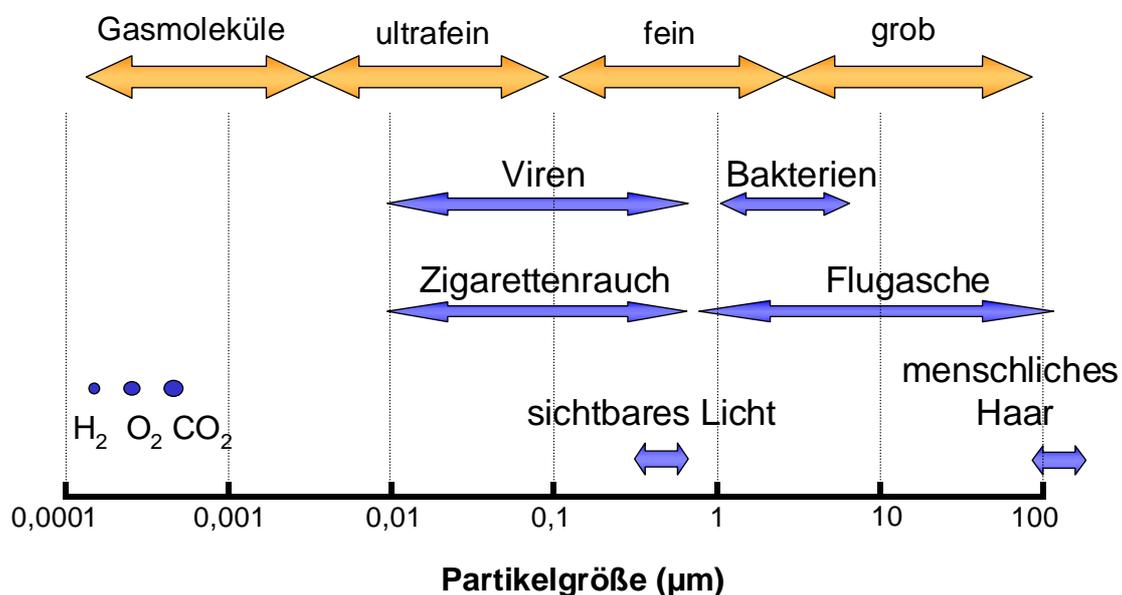
Die Inhalation ist ein wichtiger Aufnahmeweg für die verschiedensten Umweltschadstoffe. Zudem können gerade schwer lösliche partikelförmige Luftverunreinigungen über Jahre hinweg im Körper verbleiben und ihre Wirkung entfalten. Die Aufklärung von Dosis-Wirkungsbeziehungen und Wirkmechanismen durch inhalationstoxikologische Studien soll zu einem besseren Verständnis der Problematik verhelfen und damit als Grundlage für Maßnahmen zur Reinhaltung der Luft dienen.

### 2.1 Partikel in unserer Atemluft – Herkunft und Verteilung

Unter Schwebstaub versteht man in der Gasphase suspendierte Partikel mit einem Durchmesser zwischen 1 nm und 100 µm. Natürliche Quellen für Schwebstaub sind die Seesalzkerne aus den Ozeanen und Mineralteilchen aus Vulkanausbrüchen oder Bodenerosionen. Zusätzlich gibt es auch biogene Partikel wie Sporen, Pollen, Viren, Bakterien und Pilze. Der weitaus besorgniserregendere Anteil stammt jedoch aus anthropogenen Quellen wie Rußpartikel aus organischen und anorganischen Komponenten, und schwermetallhaltige Partikel aus industriellen Abgasen. Grundsätzlich ist jeglicher Verbrennungsprozess als Emissionsquelle für

Partikel zu verstehen, vom großindustriellen Kraftwerk über den Straßenverkehr bis hin zum einfachen Grillfeuer (Peters *et al.*, 1998).

Der Gesamtschwebstaub oder TSP („*total suspended particles*“) kann nach der Größe der Partikel in verschiedene Fraktionen unterteilt werden. Schwebstaub aus Partikeln mit einem aerodynamischen Durchmesser kleiner als  $10\ \mu\text{m}$  wird als inhalierbaren Schwebstaub oder  $\text{PM}_{10}$  (*particulate matter*  $< 10\ \mu\text{m}$ ) bezeichnet, bei einem aerodynamischen Durchmesser kleiner als  $2,5\ \mu\text{m}$  spricht man von lungengängigem Staub oder  $\text{PM}_{2,5}$  (*particulate matter*  $< 2,5\ \mu\text{m}$ ) (Peters *et al.*, 1998). Eine Übersicht über den Größenbereich und die Einteilung von Schwebstaub in ultrafein ( $< 0,1\ \mu\text{m}$ ), fein ( $< 2,5\ \mu\text{m}$ ) und grob ist in Abb. 2.1 gegeben.



**Abb. 2.1: Übersicht über die Größendimensionen von Partikelfractionen**

Partikel werden aufgrund ihrer Größe in die Fraktionen ultrafein („*ultrafine*“,  $< 0,1\ \mu\text{m}$ ), fein („*fine*“,  $< 2,5\ \mu\text{m}$ ) und grob („*coarse*“,  $> 2,5\ \mu\text{m}$ ) eingeteilt. Da die Wellenlänge von sichtbarem Licht größer ist als der Durchmesser von ultrafeinen Partikeln, sind diese mit dem Lichtmikroskop nicht sichtbar. Viren und Bakterien sind Beispiele für biogene, Zigarettenrauch und Flugasche für anthropogene lungengängige Partikel.

Größere Partikel werden im oberen Bereich der Atemwege abgeschieden und durch die Selbstreinigungsmechanismen der Lunge weitgehend wieder aus der Lunge entfernt (Heyder, 1982a; Heyder, 1982b). Moderne Filtertechniken haben den Anteil an größeren Partikeln und damit den Massenausstoß an Schwebstaub in den letzten Jahrzehnten drastisch reduziert. Jedoch gibt die Messung der Massenkonzentration keine Angabe über die Anzahl und die Lungengängigkeit der freigesetzten Staubpartikel an (Osunsanya *et al.*, 2001). Partikel mit einem Durchmesser kleiner als  $1\ \mu\text{m}$  bilden stabile Aerosole, die mit dem Wind über große Entfer-

nungen getragen werden. Dagegen setzen sich Partikel mit einem Durchmesser über 2,5 µm durch Regen und Sedimentation innerhalb von Stunden ab, so dass sich für PM<sub>10</sub>, PM<sub>2,5</sub> und ultrafeine Partikel unterschiedliche Verteilungen in unserer Atemluft ergeben (Wiedensohler *et al.*, 2002). Zudem dringen feine Partikel durch kleinste Öffnungen in Gebäude ein, folglich bieten Innenräume keinen Schutz vor der Inhalation dieser Partikel (Brauer *et al.*, 1999; Koutrakis *et al.*, 1991). Die Europäische Union hat auf diese Daten reagiert und neue Immissions-Standardwerte beschlossen. Ab dem 1. Januar 2005 darf ein 24 Stundenmittelwert von 50 µg/m<sup>3</sup> PM<sub>10</sub> nicht öfter als 35mal im Jahr überschritten werden, der Jahresmittelwert darf den Wert von 40 µg/m<sup>3</sup> PM<sub>10</sub> nicht übersteigen. In einer zweiten Stufe ab dem 1. Januar 2010 soll der 24 Stundenmittelwert von 50 µg/m<sup>3</sup> PM<sub>10</sub> nicht öfter als 7mal im Jahr erreicht werden, während ein Jahresmittelwert von unter 20 µg/m<sup>3</sup> PM<sub>10</sub> angestrebt wird (Umweltbundesamt, 2003a). Die moderne Messtechnik ermöglicht jedoch schon heute eine differenziertere Betrachtungsweise von partikelförmigen Luftverunreinigungen, so dass die Überwachung und gesetzliche Regulation in Zukunft grundlegend überdacht werden sollte (Ibald-Mulli *et al.*, 2002).

## 2.2 Gesundheitliche Beeinträchtigungen durch ultrafeine Partikel

Die in den epidemiologischen Studien beobachteten gesundheitlichen Beeinträchtigungen lassen sich in eine lokale Wirkung auf die Lunge und in systemische Wirkungen auf das kardiovaskuläre System unterteilen (Donaldson & MacNee, 2001). Hohe Konzentrationen von Partikeln in der Atemluft wirken sich speziell auf Menschen mit einer Vorschädigung des respiratorischen Systems aus wie chronische Bronchitis oder Asthma. So verschlechtert sich die Gesundheit von asthma-erkrankten Kindern durch erhöhte Partikelkonzentrationen in der Atemluft (Hoek *et al.*, 1998; Roemer *et al.*, 1993; Schwartz *et al.*, 1994). Insgesamt kann eine gesteigerte Einlieferungsrate von schweren Asthmafällen in den Notaufnahmen der Krankenhäuser festgestellt werden (Pope, III, 1991; Schwartz *et al.*, 1993). Steigende Konzentrationen von feinen und ultrafeinen Partikeln in der Atemluft erhöhen das Risiko für einen myocardiellen Infarkt (Atkinson *et al.*, 1999; Dockery, 2001; Peters *et al.*, 2001). Dabei wird ein Einfluss auf die autonome Regulation bzw. Variabilität der Herzschlagfrequenz beobachtet, der vor allem bei älteren und vorgeschädigten Menschen zum Herzinfarkt führen kann (Dockery, 2001; Gold *et al.*, 2000; Liao *et al.*, 1999; Pope, III *et al.*, 1999). Die zellulären und molekularen Mechanismen, die den beschriebenen gesundheitlichen Auswirkungen von Partikelexpositionen zugrunde liegen, sind weitgehend unbekannt. Jedoch legen epidemiologische Untersu-

chungen nahe, dass speziell die ultrafeinen Partikel in der Atemluft der Auslöser für die beobachteten gesundheitlichen Beeinträchtigungen sind (Peters *et al.*, 1997; Wichmann *et al.*, 2000). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden von toxikologischen Daten unterstützt. Ultrafeine Partikel von geringer Toxizität und geringer Löslichkeit in Form von Kohlenstoff bewirken nach Instillation in Rattenlungen eine stärkere Entzündungsreaktion als vergleichbare feine Partikel, wobei sekundäre toxische Mechanismen wie die Freisetzung von Übergangsmetallen oder die Beladung mit Endotoxinen kaum eine Rolle spielen (Brown *et al.*, 2000). Die unterschiedliche Wirkung von chemisch ungiftigen feinen und ultrafeinen Partikeln lässt sich am einfachsten erklären, indem die Belastung der Lunge in Einheiten der Gesamtoberfläche der Partikel („*total particle surface area*“) ausgedrückt wird (Tran *et al.*, 2000). Diese Ausdrucksweise spiegelt das extreme Verhältnis von Oberfläche zu Volumen von ultrafeinen Stäuben wieder, das der Wirkung der ultrafeinen Partikeln zugrunde liegt (Oberdörster, 2001). Untersuchungen zur Selbstreinigungsfähigkeit von Rattenlungen zeigen, dass ab einem Schwellenwert von ungefähr 200 bis 300 cm<sup>2</sup> Gesamtoberfläche der Partikel eine Überlastung der Lunge festzustellen ist, ab der sich die beobachtete Entzündungsreaktion sprunghaft erhöht (Cullen *et al.*, 2000). Es ist anzunehmen, dass ultrafeine Partikel ein interzelluläres Signalnetzwerk aktivieren, das Entzündungsreaktionen und oxidativen Stress auslöst (Tao & Kobzik, 2002; Voelkel *et al.*, 2003). Zudem kommt es zu den beschriebenen kardiovaskulären Symptomen durch bisher ungeklärte Mechanismen (Donaldson *et al.*, 2001).

### **2.3 Auswirkungen von ultrafeinen Partikeln auf den Organismus**

Grundsätzlich können die Partikel ihre gesundheitsschädlichen Wirkungen nur auf zwei verschiedene Art und Weisen auslösen. Zum einen könnten sie direkt auf die betroffenen Organe wirken, zum anderen ihre Wirkung indirekt durch die Ausschüttung von Mediatoren aus den betroffenen Zellen auslösen. Gelangen lungengängige Partikel bis in den Alveolarraum, treffen sie dort auf einen dünnen Flüssigkeitsfilm („*surfactant*“), der die Alveolen auskleidet. Wasserlösliche Partikel können hier in Lösung gehen. Die unlöslichen Partikel werden normalerweise von den Alveolarmakrophagen phagozytiert. Bei einer Überforderung dieser ersten Abwehr kommt es zu einer lokalen Entzündungsreaktion (Seaton *et al.*, 1995).

#### ***Direkte Partikelwirkung durch Translokation***

Bei der lokalen Wirkung von Partikeln auf die Lunge ist ein direkter Wirkungsmechanismus naheliegend, jedoch die extrapulmonale Wirkung auf das kardiovaskuläre System schwer

nachzuvollziehen. Voraussetzung für die direkte Wirkung der Partikel auf andere Zielorgane als die Lunge ist ein Transport über die Luft/Blut-Schranke hinweg. Dabei müssten die Partikel einen Weg durch die Epithelzellen der Alveolen und die Endothelzellen der Kapillargefäße hindurch oder an ihnen vorbei nehmen. Neueste Untersuchungen zeigen, dass dieser Wirkungsweg durchaus in Betracht zu ziehen ist. Ultrafeine Teflon-Partikel mit einem Durchmesser von 20 nm werden nach Inhalation schnell durch das Lungenepithel von Ratten und Mäusen transportiert (Oberdörster *et al.*, 2000). Mittlerweile konnte auch nach Instillation von ultrafeinen Albumin-Nanokoloid-Partikeln (kleiner 80 nm) deren Translokation von der Lunge in die Blutbahn von Hamstern gezeigt werden (Nemmar *et al.*, 2001). Zudem wurde nach Inhalation von radioaktiv markierten ultrafeinen Kohlenstoff-Partikeln der Übergang in die Blutbahn beim Menschen nachgewiesen (Nemmar *et al.*, 2002a). Eine ebenfalls mit radioaktiv markierten ultrafeinen Kohlenstoff-Partikeln durchgeführte Inhalationsstudie mit Ratten fand einen signifikanten Anteil der inhalierten Partikel in der Leber, jedoch nicht in anderen Organen, deponiert (Oberdörster *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse konnten von anderen Arbeitsgruppen bislang noch nicht bestätigt werden. Eine Untersuchung von Ratten nach Inhalation von radioaktiv markierten ultrafeinen Iridium-Partikeln ergab, dass der größte Teil der Partikel über den Gastrointestinaltrakt ausgeschieden wird. Nur ein sehr kleiner Anteil von weniger als 1 % der Partikel ging in den Kreislauf über und konnte in der Leber und der Milz nachgewiesen werden (Kreyling *et al.*, 2002). Die Frage, ob ultrafeine Partikel tatsächlich über die Luft/Blut-Schranke hinweg in den Organismus transportiert werden, ist sicherlich noch nicht abschließend beantwortet. Über das weitere Schicksal dieser Partikel ist noch wenig bekannt. Bislang wurden noch keine Ergebnisse von zellulären Studien oder transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen veröffentlicht, die eine Translokation von ultrafeinen Partikeln durch Zellschichten hindurch belegen würden.

### ***Indirekte Partikelwirkung durch Mediator-Ausschüttung***

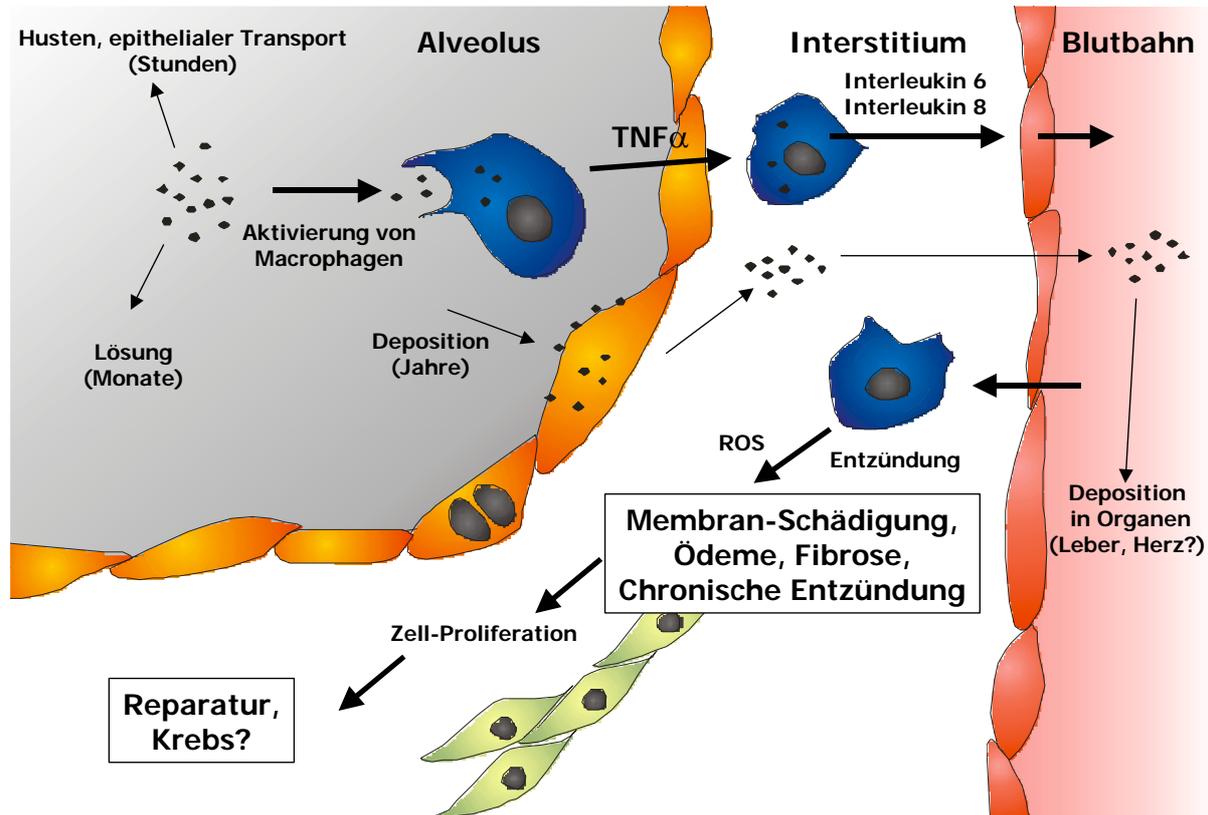
Die Inhalation von feinen und ultrafeinen Partikeln löst eine lokale Entzündungsreaktion in der Lunge aus. Alveolarmakrophagen und Lungenepithelzellen sind dabei einem direkten Kontakt zu den Partikeln ausgesetzt. Vor allem die Alveolarmakrophagen erkennen und phagozytieren die Fremdkörper und reagieren mit der Freisetzung von Mediatoren. Untersuchungen an Meerschweinchen zeigten, dass eine Partikelexposition zu einer erhöhten Freisetzung von Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) führt (Chen *et al.*, 1992). Auch bei Alveolarmakrophagen aus der Ratte und dem Menschen konnte eine erhöhte Freisetzung von TNF- $\alpha$ , Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, „*macrophage inflammatory protein*“ (MIP)-1 $\alpha$ , „*granulocyte mac-*

*rophage colony stimulating factor*“ (GM-CSF) und reaktiven Sauerstoffformen nachgewiesen werden (Becker *et al.*, 1996; van Eeden *et al.*, 2001). Epithelzellen können ebenfalls Mediatoren freisetzen. Sie spielen eine aktivere Rolle im Ablauf von Entzündungsreaktionen als lange Zeit vermutet wurde (Devalia & Davies, 1993). Lungenepithelzellen können Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-8, „*monocyte chemotactic protein*“ (MCP)-1, GM-CSF und TNF- $\alpha$  ausschütten (Mills *et al.*, 1999). Eine Behandlung von primären Lungenzellen mit urbanen Stäuben führt zu einer erhöhten Freisetzung von IL-1 $\beta$ , IL-8 und GM-CSF. Diese Zytokine verstärken den lokalen Entzündungseffekt in den Atemwegen und könnten so auch für systemische Wirkungen verantwortlich sein (Fujii *et al.*, 2001). Die andauernde Belastung der Lunge mit Partikeln kann zu einer chronischen Entzündung führen. Die Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffformen und Entzündungsmediatoren führt zur Schädigung der Zellmembranen, Ansammlung von Gewebsflüssigkeit (Ödemen) und zur Proliferation der Bindegewebszellen (Fibrose). Auf lange Sicht können diese Abläufe zur Entstehung von Krebs beitragen (Churg & Brauer, 2000; Driscoll *et al.*, 1997; Oberdörster, 1995; Timblin *et al.*, 2002). Mit wachsendem Verständnis des Geschehens bei Entzündungsreaktionen wird die Komplexität dieser Abläufe offenbar. Es werden dabei von allen beteiligten Zellen eine Vielzahl von Entzündungsmediatoren freigesetzt, so dass dem interzellulären Zusammenspiel eine wichtige Rolle zukommt (Simon & Paine, III, 1995).

Die Deposition von Partikeln in der Lunge induziert eine systemische Entzündungsreaktion, die Entzündungszellen im Knochenmark aktiviert und mobilisiert sowie zur Ausschüttung von Akut-Phase Proteinen aus der Leber wie „*C-reactive protein*“ (CRP) führt (Terashima *et al.*, 1997; van Eeden *et al.*, 2001). Dies könnte zu den beschriebenen systemischen Wirkungen auf das kardiovaskuläre System führen. Der tatsächliche Wirkungsmechanismus der Beeinträchtigungen der Variabilität der Herzfrequenz bleibt aber ungeklärt. Eine andauernde Exposition mit verunreinigter Luft führt zu einem Anstieg der Viskosität des Blutes und des Gehalts an Fibrinogen und CRP im Blut (Donaldson *et al.*, 2001). Lungenepithelzellen sind in der Lage, Fibrinogen zu synthetisieren und zu sezernieren (Haidaris, 1997). Durch die Stimulation mit IL-6, wie es bei der Stimulation durch Partikel freigesetzt wird, kommt es zu einem erhöhten Ausstoss von Fibrinogen durch die Epithelzellen, so dass die Exposition mit Partikeln letztlich zu einem erhöhten Fibrinogengehalt im Blut führt (Anderson *et al.*, 2002). Diese Überlegungen lassen die Endothelzellen der Lungengefäße außer acht. Dabei sind Endothelzellen an der Regulation des Blutdrucks beteiligt und eine Schädigung in der Lunge durch direkte oder indirekte Partikelwirkung führt zu einer Erhöhung des Endothelin (ET)-1 Spiegels während die Aktivität des „*angiotensin cleaving enzyme*“ (ACE) verringert wird (Ulrich

et al., 2002). Dies könnte ebenfalls zu den oben beschriebenen Beeinträchtigungen der Regulation der Herzfrequenz führen.

Ein entscheidender Faktor bei all diesen Vorgängen ist offensichtlich die Kommunikation zwischen verschiedenen Zelltypen und Geweben. In Abb. 2.2 sind die Zusammenhänge der direkten und indirekten Partikelwirkung auszugsweise dargestellt.



**Abb. 2.2 Schematische Darstellung der Partikelwirkung an der Luft/Blut-Schranke**

Mögliche Wirkungen von Partikeln in den Alveolen. Zum einen können Partikel direkt in die Blutbahn übertreten, zum anderen löst die Exposition mit Partikeln eine Entzündungsreaktion aus, die den ganzen Körper betreffen kann. Eine ausführliche Beschreibung ist im Abschnitt 2.3 zu finden.

## 2.4 Modellsysteme - *In vitro* Kokulturen

Bei den Forschungen über die Auswirkungen von Schwebstäuben steht die Gesundheit des Menschen im Mittelpunkt. Epidemiologische Erhebungen und klinische Untersuchungsreihen sind deshalb von besonderer Bedeutung. Die Aufklärung der Wirkungsmechanismen ist auf diese Weise aber nicht möglich. Für den Zugriff auf zellulärer und molekularer Ebene ist die Verwendung von Modellsystemen wie Zellkulturen und Tiermodelle unumgänglich. Die

Verwendung humaner Primärzellen hat den Nachteil, dass jeder Patient eine individuelle Krankengeschichte und unterschiedliche genetische Prädispositionen hat. Die erhaltenen Ergebnisse unterliegen oft großen Schwankungen und sind schlecht vergleichbar. Zudem ist die Verfügbarkeit von humanen Primärzellen oft eingeschränkt.

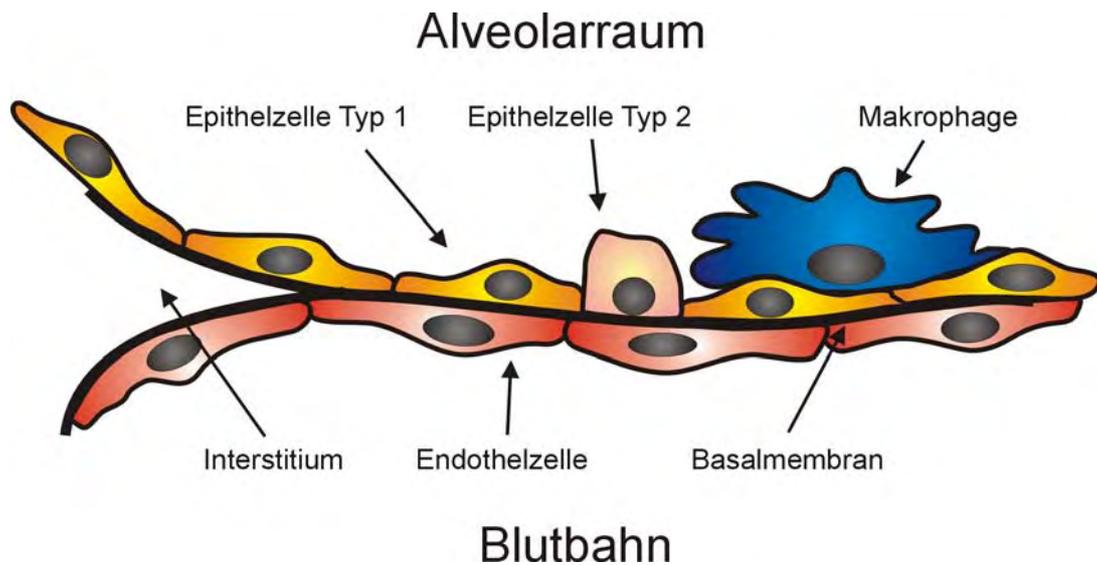
Die Verwendung von Zelllinien hingegen bietet ein reproduzierbares, einfaches Modell bei kontrollierten Expositionsbedingungen. Eine Standardisierung ermöglicht eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse und ermöglicht umfangreiche Serienuntersuchungen mit dem Zugriff auf zahlreiche molekulare und zelluläre Parameter. Zellkulturmodelle entsprechen jedoch nur in einer Annäherung der physiologischen Realität in einem komplexen Organismus, so dass mit Artefakten bei den Ergebnissen zu rechnen ist. *In vitro* Studien an Zellkulturen können wertvolle Hinweise auf die Wirkungsmechanismen von Partikeln geben, jedoch konzentrierten sich die meisten Arbeiten auf einen Zelltyp. Dies vernachlässigt aber das interzelluläre Zusammenspiel der verschiedenen Zelltypen in der Lunge, das höchstwahrscheinlich die biologische Antwort auf eine Belastung mit Fremdstoffen koordiniert.

Bislang existieren im Zusammenhang mit Untersuchungen über die Wirkung von Partikeln nur sehr wenige Arbeiten über Kokulturen. Zur Untersuchung der Wirkung von Ozon und Quarz-Partikeln wurde im Hause des ITG ein Zellkulturmodell aus der bronchialen Epithelzelllinie BEAS-2B und der Endothelzelllinie ECV304 entwickelt. Die Zellen standen über das Medium in Kontakt. Die Kokultur der Zellen setzte nach Exposition mehr IL-6 und IL-8 frei als die Summe der Einzelzellkulturen, so dass ein synergistischer Effekt abzuleiten war (Mögel *et al.*, 1998). Auf den Ergebnissen dieser Arbeiten wurde für die vorliegende Arbeit aufgebaut. Seit Beginn des Projektes wurden weitere Untersuchungen über die Wirkung von Partikeln mit Kokulturen veröffentlicht. Die Exposition einer Kokultur aus BEAS-2B-Zellen und primären Monozyten aus dem Blut mit Rußpartikeln belegte eine Steigerung der IL-6 und IL-8 Produktion gegenüber der Monokultur von BEAS-2B-Zellen (Drumm *et al.*, 2000). Eine weitere Studie belegt die Wirkung von eingeatmeten Asbestfasern auf Kokulturen. In diesem Falle konnte gezeigt werden, dass sich die Konzentration von IL-6 und IL-8 in Kokulturen von BEAS-2B-Zellen mit einer Zelllinie von Lungenfibroblasten namens W1STAR-38 nach Exposition mit Asbestfasern synergistisch im Vergleich zu den Einzelzellkulturen erhöht (Lang *et al.*, 2001). Die Kokultur von Lungenepithelzellen der Ratte mit primären Alveolar-makrophagen zeigte ebenfalls eine synergistische Erhöhung der Freisetzung der Zytokine TNF- $\alpha$  und MIP-2, ein Zytokin mit der analogen Funktion wie humanes IL-8 in der Ratte (Tao & Kobzik, 2002).

## **2.5 Zielsetzung der Arbeit**

Um einen tieferen Einblick in die Wirkungsweise von ultrafeinen Partikeln zu erhalten, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein humanes Zellkulturmodell entwickelt werden. Um das Zusammenspiel der verschiedenen Zelltypen zu ermöglichen, wurde der Einsatz von einem Kokultursystem geplant, das über die bisher verwendeten Systeme hinausgehend, den realen Verhältnissen an der Luft/Blut-Schranke nahe kommen sollte. Dabei sollte bewusst auf den Einsatz von Primärzellen verzichtet werden, um die Handhabung zu vereinfachen und durch Standardisierung eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu ermöglichen. Das Kokultursystem sollte es gestatten, die Aufnahme der ultrafeinen Partikel in die Zellen und das weitere Schicksal mit licht- und elektronenmikroskopischen Methoden zu verfolgen. Zudem sollte die Ausschüttung von Mediatoren der interzellulären Kommunikation untersucht und molekularbiologische Methoden angewendet werden können.

Zur Umsetzung muss der Aufbau der Luft/Blut-Schranke in der Lunge genauer betrachtet werden. Die Wände der Alveolen sind sehr dünn, um den Gasaustausch durch Diffusion zu ermöglichen. Alveolen haben einen Durchmesser von ungefähr 250  $\mu\text{m}$ , die Wandstärke zwischen der Gasphase und der Blutbahn beträgt nur 1  $\mu\text{m}$ . Die Luft/Blut-Schranke besteht aus einer Lage Epithelzellen auf der Luftseite und einer Lage Endothelzellen auf der Blutseite. Dazwischen befindet sich die Basalmembran aus extrazellulärer Matrix. Auf den Epithelzellen sitzen die Alveolarmakrophagen. Ein schematischer Überblick dieser Verhältnisse ist in Abb. 2.3 dargestellt.



**Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Luft/Blut-Schranke**

Der obere Bereich stellt den luftgefüllten Alveolarraum, der untere Bereich die Blutbahn dar. Dazwischen ist eine Lage Epithelzellen, eine Basalmembran aus extrazellulären Matrixproteinen und eine Lage Endothelzellen. Es gibt Epithelzellen vom Typ 1, die in erster Linie den Alveolarraum auskleiden, und vom Typ 2, die zur Sekretion von Surfactant und als Stammzellen für die Typ 1 Zellen dienen.

Zusammenfassend können die Ziele der vorliegenden Arbeit wie folgt formuliert werden:

1. Auswahl geeigneter humaner Zelllinien zur Etablierung eines realitätsnahen Lungenmodells.
2. Vergleichende Untersuchung der zytotoxischen Wirkung der verwendeten Partikel auf die verwendeten Zelllinien.
3. Untersuchung der partikelinduzierten Freisetzung von IL-6 und IL-8 von Kokulturen im Vergleich zu Monokulturen.
4. Etablierung eines realitätsnahen Lungenmodells.
5. Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung der Aufnahme von Partikeln in die Zellen.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Chemikalien und Lösungen

##### *Allgemeine Chemikalien*

Annexin-V-FITC	BD PharMingen, Heidelberg
Dimthylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg
Etoposid	Sigma, Deisenhofen
Glutaraldehyd (25 %)	Roth, Karlsruhe
Humanes TNF- $\alpha$	Roche, Mannheim
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Propidiumiodid	Sigma, Deisenhofen
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
TPA (12-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat)	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Tween-20	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Serva, Heidelberg

Lösungsmittel, Säuren und Salze wurden, wenn nicht anders erwähnt, von den Firmen Merck, Roth oder Sigma bezogen.

**Allgemeine Puffer und Lösungen**

PBS, ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> ( <i>phosphate buffered saline</i> )	138,00 mM NaCl 2,67 mM KCl 8,10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O 1,47 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4
HBSS ( <i>Hank's balanced salt solution</i> )	138,00 mM NaCl 5,33 mM KCl 0,30 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,44 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,26 mM CaCl <sub>2</sub> 0,50 mM MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O 0,41 mM MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O 4,00 mM NaHCO <sub>3</sub> pH 7,4
HBS ( <i>HEPES buffered saline</i> )	280,00 mM NaCl, 10,00 mM KCl 1.50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O 12,00 mM Dextrose 50,00 mM HEPES pH 7,4
Physiologische Kochsalzlösung	9,0 g Natriumchlorid 1 l Aqua bidest.
EDTA-Lösung	5,00 mM EDTA in PBS
Trypsin/EDTA-Lösung	4,4 g Natriumcitrat 10 Kaliumchlorid 2,5 g Trypsin (Nordwald, Hamburg) 1 ml 1 %ige Phenolrotlösung ad 1 l 5 mM EDTA-Lösung, pH 7,6

PET-Lösung	10 mg/ml Polyvinylpyrrolidon 40 µg/ml EGTA 200 µg/ml Trypsin 200 µg/ml Kaliumchlorid 1,7 mg/ml Glucose 4,8 mg/ml HEPES 7,0 mg/ml Natriumchlorid 1 µg/ml Phenolrot
SBIT-Lösung	10 mg Trypsin-Inhibitor 50 ml HBS

***Laborgeräte***

Mikroskope	Axiovert 100, Zeiss, Oberkochen Eclipse TS100, Nikon, Japan
Plattenlesegerät	Microplate Reader, Versamax, Molecular Devices, USA
Zentrifugen	Digifuge GL, Heraeus, Fellbach Tischzentrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg
Zellzählgerät	Coulter Counter, Becton Dickinson, Heidelberg CASY 1 Cell Counter Model TT, Schärfe System, Reutlingen
Wasserbad	GFL 1083, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Ultraschallgerät	Sonifier 250, Branson, USA
Sterilbank	HERAsafe, Heraeus, Fellbach
Brutschrank	CB 210, WTB Binder
Dampfsterilisator	Vapoklav 500, H & P Labortechnik, München

FACS-Gerät

BD LSR, Becton Dickinson, Heidelberg

### 3.2 Zellkulturen und *in vitro* Assays

Soweit nicht anders erwähnt, stammten alle Zellkulturgefäße von der Firma Greiner, Frickenhausen. Die Grundmedien sowie alle Medienzusätze und Antibiotika wurden von Life Technologies, Karlsruhe, bezogen. Alle verwendeten Kulturmedien wurden steril filtriert (Bottle Top Filter, 0,22 µm Porenweite, Millipore, Bedford, USA). Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre im Brutschrank (CB 210, WTB Binder) inkubiert.

#### **Medienzusätze:**

- fötales Kälberserum (FCS)
- 2 mM L-Glutamin
- Penicillin (100 U/ml) , Streptomycin (100 µg/ml)
- OPI-Medienzusatz (enthält Oxallessigsäure, Natriumpyruvat und Insulin, Sigma)

#### **sonstige Materialien:**

Bottle Top Filter, 0,22 µm Porenweite (Millipore)

Zellkulturflaschen Cellstar 250 ml (Greiner)

96-Well-Platten, Nuncleon (Nalgen, Nunc International)

96-Well-Platten, Nuncleon surface (Nalgen, Nunc International)

Transwell-Platten und Einsätze (Corning Costar)

#### **3.2.1 A549Zellen**

Bei der A549-Zelllinie (ATCC-No. CCL-185) handelt es sich um humane Alveoarepithelzellen vom Typ 2, die 1972 aus dem Lungenkarzinom eines 58-jährigen männlichen Westeuropäers entnommen wurden. (Giard *et al.*, 1973; Lieber *et al.*, 1976).

A549-Zellen bilden in Zellkultur einen Zellrasen (Monolayer) aus. Die Zellen wurden einmal pro Woche passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, der Zellrasen einmal mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung gespült und anschließend für ca. 5 Min. mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Einwirkungszeit wurde durch mikroskopische Kontrolle des Ablösevorgangs optimiert. Die Trypsinwirkung wurde durch Zugabe von Zellkulturmedium gestoppt.

**Zusammensetzung des Zellkulturmediums:**

DMEM	500,0 ml
Fötale Kälberserum	56,0 ml
L-Glutamin 200mM	7,5 ml
Penicillin-/Streptomycin-Lösung	2,5 ml

**3.2.2 BEAS-2B Zellen**

Die BEAS-2B-Zelllinie wurde aus gesunden humanen Bronchialepithelzellen gewonnen und durch SV40-Transformation immortalisiert (Reddel *et al.*, 1988). Die Zellen behielten dabei weitgehend ihre epithelialen Eigenschaften wie die typische Morphologie eines Epithels (Ke *et al.*, 1988), Zytokeratinexpression (Hornberg *et al.*, 1996) und eine polare Freisetzung von Eicosanoiden (Noah *et al.*, 1991) bei.

BEAS-2B Zellen bilden in Zellkultur einen Zellrasen (Monolayer) aus. Die Zellen wurden einmal pro Woche passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, der Zellrasen einmal mit 2 ml PET-Lösung gespült und anschließend für ca. 15 Min. mit 2 ml PET-Lösung bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Einwirkungszeit wurde durch mikroskopische Kontrolle des Ablösevorgangs optimiert. Die Trypsinwirkung wurde durch Zugabe von 0,4 ml SBIT-Lösung gestoppt.

**Zusammensetzung des KGM (keratinocyte growth medium) Zellkulturmediums:**

KBM ( <i>keratinocyte basal medium</i> )	500,0 ml
EGF ( <i>epidermal growth factor</i> )	0,1 ng/ml
Insulin	5 µg/ml
Hydrocortison	0,5 µg/ml
Bovine Pituitary Extract	0,4 %
Gentamicin	50 µg/ml
Amphotericin-B	50 ng/ml

Bezug: Cell Systems, Remagen

**3.2.3 ECV304 Zellen**

ECV304 ist eine Zelllinie humanen Ursprungs. Die Zelllinie wurde von der European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC, UK) bezogen. Es handelt sich um spontan transformierte Endothelzellen aus der Umbelikalvene eines neugeborenen japanischen Mädchens (Takahashi *et al.*, 1990). Wegen ihrer einfachen Kultivierung und der starken Ausprägung endothelialer Merkmale werden ECV304-Zellen häufig für Fragestellungen eingesetzt, in

denen das Endothel im allgemeinen, unabhängig von der Herkunft, untersucht werden soll. In der vorliegenden Arbeit dienten ECV304-Zellen als Modell für das pulmonale Endothel.

ECV304-Zellen bilden in Zellkultur einen Zellrasen (Monolayer) aus. Die Zellen wurden einmal pro Woche passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, der Zellrasen einmal mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung gespült und anschließend für ca. 5 Min. mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Einwirkungszeit wurde durch mikroskopische Kontrolle des Ablösevorgangs optimiert. Die Trypsinwirkung wurde durch Zugabe von Zellkulturmedium gestoppt.

**Zusammensetzung des Zellkulturmediums:**

M199-Medium	500,0 ml
Fötale Kälberserum	56,0 ml
L-Glutamin 200mM	7,5 ml
OPI 100mM	5,0 ml
Penicillin-/Streptomycin-Lösung	2,5 ml

**3.2.4 Mono Mac 6 Zellen**

Die makrophagen-ähnlichen promyeloischen Mono Mac 6 Zellen (No. ACC 124) stammen aus der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig. Sie wurden ursprünglich aus einem 64 Jahre alten Patienten mit monoblastischer Leukämie isoliert (Ziegler-Heitbrock & Riethmuller, 1984). Die Mono Mac 6 Zellen teilen sich permanent weiter, besitzen eine Generationszeit von etwa 40 Stunden und wachsen in Suspension. Sie werden zweimal in der Woche passagiert und mit einer Zelldichte von etwa  $5 \times 10^6$  Zellen in 20 ml Kulturmedium ausgesät.

**Zusammensetzung des Zellkulturmediums:**

RPMI 1640	500,0 ml
Fötale Kälberserum	56,0 ml
L-Glutamin 200mM	7,5 ml
OPI 100mM	5,0 ml
Penicillin-/Streptomycin-Lösung	2,5 ml

### 3.2.5 THP-1 Zellen

Die promyeloischen THP-1 Zellen stammen aus der American Type Culture Collection (ATCC-No. TIB-202) und wurden ursprünglich aus einem 1 Jahr alten Jungen mit akuter monocytischer Leukämie isoliert (Tsuchiya *et al.*, 1980). Die Zellen wachsen in Suspension und bilden lockere Anhäufungen. Fast keine Zellen hefteten sich an der Oberfläche der Zellkulturflaschen an. Mittels Behandlung mit 8 nM 12-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) können die THP-1 Zellen in reife Zellen mit Funktionen von Makrophagen differenziert werden (Tsuchiya *et al.*, 1982). Für die Versuche wurden die adhärennten Zellen mit 5 mM EDTA-Lösung von den Kulturflaschen abgelöst.

#### *Zusammensetzung des Zellkulturmediums:*

RPMI 1640	500,0 ml
Fötale Kälberserum	56,0 ml
L-Glutamin 200mM	7,5 ml
Penicillin-/Streptomycin-Lösung (104 U/ml)	2,5 ml

### 3.2.6 Differenzierung von THP-1 Zellen

Die Zugabe von TPA regt die Zellen an, sich zu Makrophagen zu differenzieren. Für nahezu alle Versuche mit diesen Zellen wurden sie in ihrer differenzierten Form verwendet. Dazu wurden die THP-1-Zellen abzentrifugiert und mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in Kulturmedium mit 8 nM TPA aufgenommen. Die Zellen wurden 24, 48 und 72 Stunden zur Ausdifferenzierung im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre angeregt.

### 3.2.7 Langzeitkonservierung von Zellen

Die Langzeit- oder Kryokonservierung wird sowohl als schützende Maßnahme vor Verlust der Zelllinie bei Kontamination angewendet als auch zur Aufbewahrung von Zellen, die nicht permanent in Gebrauch sind. Die Lagerung in flüssigem Stickstoff bei -196°C bewahrt die Zellen vor genetischer Variabilität. Ziel der Lagerung ist demnach, die Stoffwechselaktivität und die Zellvermehrung vollständig, aber reversibel, zum Erliegen zu bringen. Werden Zellen nur für kurze Zeit gelagert, kann dies bei -80°C geschehen.

Die Problematik beim Einfrieren besteht darin, die Eiskristallbildung und die daraus resultierende irreversible Schädigung der Zellen zu verhindern.

Substanzen wie Glycerin oder Dimethylsulfoxid (DMSO) wirken der Eiskristallbildung weitgehend entgegen, jedoch ist ihr prozentualer Anteil je nach Zelllinie unterschiedlich. Eine höhere Überlebensrate wurde auch durch den Einsatz erhöhter Serumkonzentrationen im Einfriermedium festgestellt. Die Vitalität aufgetauter Zelllinien hängt weiter vom Abkühlprozess selbst ab. Eine Abkühlgeschwindigkeit von 1°C pro Minute bis zu einer Temperatur von -50°C gilt als optimal und geht mit einer reduzierten Bildung von Eiskristallen einher. Danach sollten die Zellen möglichst schnell in flüssigen Stickstoff überführt und eingelagert werden.

Die zum Einfrieren gewünschte Anzahl an Zellen wurde bei 1500 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert. Etwa  $1 \times 10^7$  der Zellen pro ml wurden dann auf Eis in vorgekühltes Zellkulturmedium pipettiert. Dazu wurde nochmal das gleiche Volumen Einfriermedium (bestehend aus 80 % FCS und 20 % DMSO) gegeben. Vor dem Verschließen wurden die Kryoröhrchen kurz abgeflammt, um jede Kontamination auszuschließen. Anschließend wurden sie in einer mit Isopropanol gefüllten Styroporbox für maximal 45 Minuten bei -20°C abgekühlt und danach über Nacht bei -80°C in dieser Box eingefroren. Am nächsten Morgen wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt und der Probenzugang in das vorgesehene Protokollheft übertragen.

### **3.2.8 Auftauen von Zellen**

Da das Auftauen so schnell wie möglich vonstatten gehen sollte, wurden die Kryoröhrchen mit der Zellsuspension direkt vom flüssigen Stickstoff in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 37°C gestellt und Materialien wie Zellkulturflaschen unter der Sterilbank bereitgestellt. Sobald die Zellsuspension aufgetaut war, wurde sie in eine Zellkulturflasche mit 20 ml vorinkubiertem Zellkulturmedium überführt. Nach dem ersten Mediumwechsel wurden die Zellen für einige Tage im Brutschrank bei 37°C und einer fünfprozentigen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre ruhen gelassen und dann passagiert, damit die von den Zellen gebildeten Wachstumsstoffe weitergegeben werden konnten.

### 3.2.9 Verwendete Partikel

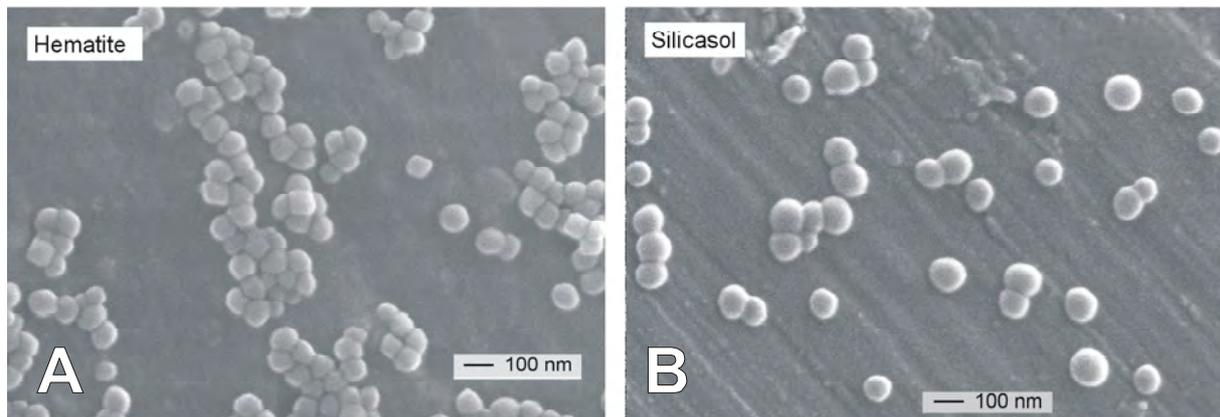
Für die vorliegende Arbeit wurden die in Tab. 3.1 aufgezählten Partikel eingesetzt.

**Tab. 3.1: Eingesetzte Modellpartikel**

Partikelsorte	Einsatzgründe
Hämatit (Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	∅ ~ 70 nm (ultrafein), gilt als untoxisch, durch die rote Färbung im Lichtmikroskop nach Aggregation sichtbar, sehr gut im Transmissionselektronenmikroskop zu erkennen.
Quarz (DQ12, SiO <sub>2</sub> kristallin)	∅ < 2 µm (fein), gilt als sehr toxisch durch radikale Oberflächengruppen, Auslöser der Silikose
Silicasol (SiO <sub>2</sub> , amorph)	∅ ~ 100 / 60 / 40 nm (ultrafein), nicht toxisch, durch unterschiedliche Durchmesser lässt sich der Parameter Partikelgröße in der Wirkung bestimmen

Alle eingesetzten Partikel wurden am Institut für Technische Chemie, Forschungszentrum Karlsruhe, hergestellt. Die Hämatit-Partikel ( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) und die amorphen Silikat-Partikel (SiO<sub>2</sub>, Silicasol) wurden wie in der Literatur beschrieben synthetisiert (Matijevic & Scheiner, 1978; Stöber *et al.*, 1968). Die erhaltenen Suspensionen schwerlöslicher Partikel einer definierten Größe wurden gegen Reinstwasser dialysiert, um Spuren löslicher Chemikalien zu entfernen. Die Endotoxin-Konzentrationen wurden im *Limulus Amoebocyt*-Assay nach Firmenprotokoll durchgeführt und waren unter der Nachweisgrenze. Die Analyse der Größenverteilung der Partikel wurde mit einem „*sedimentation field-flow fractionation system*“ (Model S-101, FFFractionation) gekoppelt mit einem „*multiangle light scattering detector*“ (Dawn Dsp, Wyatt Technology Corporation) durchgeführt. Die gemessene Partikelgröße war 50 - 90 nm (mean 70 nm) für die Hämatit-Partikel und 80 - 110 nm (mean 100 nm) für die Silicasol S-100-Partikel. Die Größe der kleineren Silicasol-Fractionen S-60 und S-40 wurde mit einem Photonen Korrelations-Spektroskop (PCS) mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 60 nm und 40 nm bestimmt. Die Analyse der synthetisierten Partikel im Raster-elektronenmikroskop bestätigte die einheitliche Form und Größe der verschiedenen Partikel-Fractionen (Abb. 3.1).

Die kristallinen Quarz-Partikel (DQ12, Partikelgröße < 5 µm) wurden freundlicherweise von Prof. Dr. N. H. Seemayer, Düsseldorf, zur Verfügung gestellt und sollten als gut charakterisierte Positivkontrolle eingesetzt werden. Es handelt sich dabei um Dörentruper Quarzkristallmehl der Mahlung Nr. 12 (Robock, 1973). Alle Partikelsuspensionen wurden direkt vor dem Einsatz in den Zellkulturen präpariert und mit einem Sonifier (Sonifer 250, Branson, USA) behandelt.



**Abb. 3.1: Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme von eingesetzten Modellpartikeln**

REM-Aufnahmen von **A**) Hämatit-Partikeln ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) mit einem durchschnittlichen aerodynamischen Durchmesser von 70 nm und **B**) amorphen Silicasol-Partikeln ( $\text{SiO}_2$ ) mit einem durchschnittlichen Aerodynamischen Durchmesser von 60 nm. Aufnahmen von B. Neufang (Hauptabteilung Verfahrenstechnik – Heiße Zellen, Forschungszentrum, Karlsruhe)

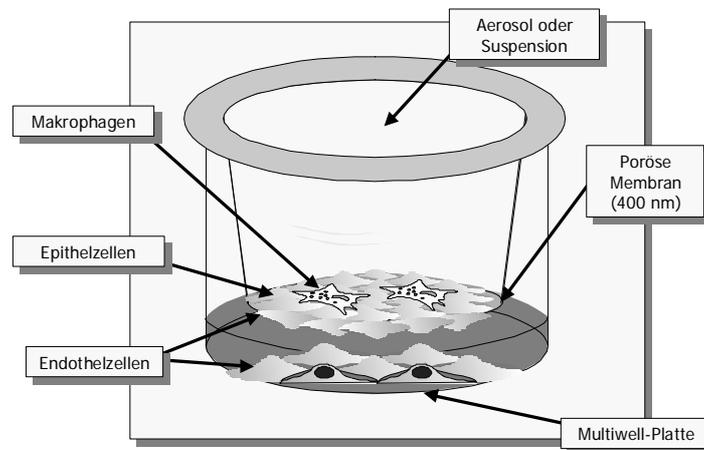
### **3.2.10 Kokultur aus A549-Zellen und THP-1- und Mono Mac 6-Zellen**

Für die Kokultur von A549-Zellen und den Makrophagenzelllinien THP-1- und Mono Mac 6 wurden 20000 A549-Zellen in 96-Well-Platten ausgesät. Direkt im Anschluß wurden entweder 2000 THP-1-Zellen, die zuvor für 2 Tage mit 8 nM TPA zu Makrophagen differenziert wurden (siehe 3.2.6), oder 2000 Mono Mac 6-Zellen gegeben. Das Verhältnis zwischen Epithelzellen und Makrophagen betrug also 10:1 (Abb. 4.29). In einigen Fällen, z.B. für die Rasterelektronenmikroskopie (Abb. 4.31) wurde ein geringeres Verhältnis von 50:1 ausgewählt. Nach 24 Stunden Inkubationszeit bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  im Brutschrank konnten die Zellen zu Partikelexpositionen eingesetzt werden.

### **3.2.11 Triple Zellkultur**

Zur Umsetzung des Kokultursystems sollte ein Transwell®-Membransystem in einer „Multiwell“-Platte eingesetzt werden. Wie in Abb. 3.2 dargestellt, trennt ein Einsatz das System in ein oberes und ein unteres Kompartiment auf. Die Poren in der Membran mit einem Durchmesser von 0,4  $\mu\text{m}$  sind die einzige Verbindung zwischen den Kompartimenten. Die Poren sind groß genug, um Partikel, nicht aber Zellen, einen Übergang zwischen den Kompartimenten zu ermöglichen. Die Membran sollte von unten mit Endothelzellen und von oben mit Epithelzellen besiedelt werden. Zudem sollten Makrophagen auf die Epithelzellen aufge-

bracht werden. Das ganze Kokultursystem gleicht der Luft/Blut-Schranke in den Alveolen und eignet sich sowohl für submerse als auch für direkte Aerosol-Expositionen.



**Abb. 3.2: Schematische Darstellung des Transwell®-Systems für Triple-Zellkulturen**

Das System besteht aus einem Einsatz mit einer porösen Membran, die zwei Kompartimente unterteilt. Im oberen wird die Membran mit Epithelzellen und Makrophagen, im unteren Kompartiment mit Endothelzellen besiedelt.

### **Durchführung**

Die folgende Beschreibung gilt für die Verwendung von 6-Well-Platten (Firma Corning, Costar, Wiesbaden). Die Oberseite der Transwell®-Membranen wurden mit einer Lösung aus aus 20 µg/ml „calf skin“ Kollagen und 50 µg/ml humanes Fibronectin (Roche, Mannheim) in PBS für 60 Minuten beschichtet. Anschließend erfolgte die Montage des Ringsystems. Die verwendeten Teflonringe wurden zuvor autoklaviert und die Abdichtung am Transwell®-Einsatz erfolgte mit mehreren Lagen autoklaviertem handelsüblichem Teflon-Dichtungsband. Nun konnte die Unterseite der Transwell®-Membran ebenfalls für 60 Minuten mit Beschichtungslösung behandelt werden.

Anschließend wurden  $5 \times 10^5$  A549-Zellen in 1,5 ml Kulturmedium in das obere Kompartiment gegeben und für 3 Stunden im Brutschrank inkubiert (Abb. 4.38 A). Ab diesem Zeitpunkt wurden Erschütterungen des Transwells® soweit wie nur möglich vermieden. Danach wurde das Medium aus dem oberen Kompartiment durch äußerst behutsames Abkippen entfernt und das Transwell umgedreht. Nun konnten  $5 \times 10^4$  ECV304-Zellen auf die Unterseite der Membran ausgesät werden (Abb. 4.38 B). Dieser Vorgang mußte zügig durchgeführt werden, um das Austrocknen der A549-Zellen zu vermeiden, die nun durch die Membran hindurch von dem ECV304-Medium versorgt wurden. Die Zellen wurden für weitere

3 Stunden im Brutschrank inkubiert. Währenddessen wurden 2,5 ml ECV304-Medium in 6-Well-Platten vorgelegt und im Brutschrank vorinkubiert. Nach Ablauf der 3 Stunden wurde das Medium vorsichtig durch Abkippen entfernt und die Ringe behutsam entfernt. Die Transwell®-Einsätze wurden in die Well-Platte eingesetzt und 1,5 ml A549-Medium sehr behutsam in das obere Well pipettiert.

Die Zellen wurden vor der ersten lichtmikroskopischen Kontrolle für mindestens 16 Stunden soweit wie möglich ohne Erschütterung im Brutschrank inkubiert. Der Besatz der Epithelzellen mit Mono Mac 6-Zellen war nach 24 Stunden, die Behandlungen mit Partikeln ungefähr nach 48 Stunden möglich.

### **3.2.12 Exposition der Zellen**

Für die Versuche wurden die Zellen mit Suspensionen unterschiedlicher Konzentration und für unterschiedlich lange Zeiträume mit den Modellpartikeln inkubiert (siehe 3.2.9). Alle Suspensionen wurden zu Beginn der Exposition frisch in den verwendeten Konzentrationen 10, 50, 100 und 200 µg/ml hergestellt. Von den Hämatit- und Silicasol-Partikeln standen Stammlösungen zur Verfügung, während die Stammlösung der Quarz-Partikeln (DQ12) für jedes Experiment eingewogen wurde. Die Stammlösungen wurden mit Zellkulturmedium auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt und vor dem Einsatz mit einem Ultraschallgerät (Sonifier, Branson, USA) behandelt. Dazu wurde die Mikrospritze aus Titan in eine Suspension von 5 bis 10 ml mindestens 10 mm tief eingetaucht und die Suspension in der Standardeinstellung (cont.; Power = MS72/D; Cycle = 50 %) mit 10 Pulsen von je 1 – 2 Sekunden Dauer beschallt.

### **3.2.13 Unterscheidung von Apoptose und Nekrose durch Annexin-V-FITC/Propidiumjodid Assay**

#### ***Prinzip***

Gesunde, vitale Zellen halten stets eine Phospholipid-Assymetrie in ihrer Plasmamembran aufrecht. Wird diese Assymetrie gestört, kommt es zur Externalisierung des zytoplasmaständigen Membranlipids Phosphatidylserin, das Kennzeichen apoptotischer Zellen. Phosphatidylserin an der Außenmembran ist ein wichtiges Signal bei der Zielerkennung und Eliminierung apoptotischer Zellen durch Makrophagen im Organismus darzustellen (Kagan *et al.*, 2000).

Die Umverteilung des spezifischen Lipids wird genutzt, um in der FACS-Analyse apoptotische Zellen spezifisch anzufärben und kenntlich zu machen. Die Färbung wird mit Annexin-V-FITC, einem FITC-gekoppelten Protein, ausgeführt. Dieses Protein bindet spezifisch an Phosphatidylserin. Die Anregung mit Licht bei 485 nm lässt das gebundene FITC grün fluoreszieren. Annexin-V-FITC kann die Zellmembran intakter Zellen nicht passieren und bindet somit spezifisch auf der Außenseite apoptotischer Zellen. Nekrotische Zellen verlieren im Verlauf ihres Sterbevorgangs die Integrität der Plasmamembran. Diese wird löchrig und somit ist es Annexin-V-FITC möglich an die Innenmembran nekrotischer Zellen an Phosphatidylserin zu binden. Daher muss für eine Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose noch zusätzlich mit Propidiumjodid gefärbt werden. Bei Propidiumjodid (PI) handelt es sich um einen Farbstoff, der spezifisch an die DNA bindet, aber aufgrund seiner Größe und Polarität nicht durch intakte Membranen wandern kann. Propidiumjodid ist es also nur möglich an DNA zu binden, wenn die Plasmamembran der Zellen durch nekrotische Vorgänge perforiert wurde.

Vitale Zellen können weder durch Annexin-V-FITC noch durch Propidiumjodid angefärbt werden, da die Plasmamembran intakt ist und Phosphatidylserin auf der zytosolischen Seite der Zellmembran liegt. Die FACS-Analyse der behandelten Proben erfolgt mit Hilfe des Durchflusszytometers. Die Zellen können nach ihrer Behandlung mit PI und Annexin aufgrund ihrer unterschiedlichen Färbung in vier Quadranten eingeteilt werden. Sie können somit in ungefärbt (vitale Zellen), Annexin (Apoptosen), PI sowie in PI+Annexin (Nekrosen), unterschieden werden. Jeder Punkt des Datenblatts repräsentiert eine Zelle. Für jede Probenanalyse werden 10.000 Zellen gezählt. Die Ergebnisse der Dot-Plot-Analysen können in einer Quadranten-Statistik abgelesen werden. In dieser Statistik sind die gezählten Ereignisse, sowie die prozentuale Verteilung der Zellen aufgeführt. Die PI- und doppeltgefärbten Zellen sind unter den Nekrosen zusammengefasst, und wurden daher als ein Wert dargestellt.

Material

### **3.2.14 Bestimmung der CD14-Rezeptor-Expression**

#### ***Prinzip***

Die Zellen wurden zur Bestimmung der CD14-Expression mit einem spezifischen Antikörper gegen CD14 gefärbt und dann mittels Durchflusszytometrie der Prozentsatz der CD14-positiven Zellen bestimmt.

### ***Material***

Zur Durchführung der CD14-Färbung wurden folgende Materialien benötigt:

- 0,25 % EDTA-Lösung
- FACS-Waschpuffer            PBS (ohne Ca, Mg)  
   0,1 % Natriumazid
- FACS-Färbepuffer            PBS (ohne Ca, Mg)  
   0,1 % Natriumazid  
   2 % FCS
- anti-human CD14 monoklonaler Antikörper, MY4-FITC (Coulter, PN 6602511)
- mouse IgG2b-FITC Isotypkontrolle (Coulter, PN 6603034)
- LSR-FACS, Durchflusszytometer (488 nm Argon Laser), Becton Dickinson, Heidelberg
- 12 x 75 mm Einmal-Probenröhrchen (Falcon, Becton Dickinson #352052)

### **Durchführung**

Von den Mono Mac 6 Zellen, differenzierten und undifferenzierten THP-1 Zellen und den humanen Monozyten wurden jeweils  $1,5 \times 10^6$  Zellen abgenommen und für 5 Minuten bei 250 g abzentrifugiert (Ball, 2002). Die Zellen wurden mit je 2 ml eiskaltem Waschpuffer gewaschen (5 Minuten, 250 g, 4°C) und anschließend in 300 µl Färbepuffer aufgenommen.

Es wurden jeweils drei Ansätze pro Zelllinie vorbereitet:

- ungefärbte Zellen
- anti-CD14 gefärbte Zellen
- Istotyp gefärbte Zellen

Für jeden dieser drei Ansätze wurden 100 µl der Zellsuspension in Färbepuffer in FACS-Röhrchen verteilt. Zu den Ansätzen wurden dann 20 µl des entsprechenden Antikörpers gegeben, zu den ungefärbten Zellen wurden 20 µl Wasser gegeben. Die Zellen wurden nun 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert, anschließend zweimal mit je 2 ml eiskaltem Waschpuffer gewaschen (5 Minuten, 250 g, 4°C) und dann in je 900 µl eiskaltem PBS aufgenommen.

Zur Justierung der Messung am Durchflusszytometer wird eine ungefärbte Probe verwendet. Das FITC wird auf Kanal FL-1 (Fluoreszenzfilter-1: 520 nm) registriert. Dazu wird ein Histogramm log [FL-1] gegen die Anzahl der Zellen erstellt. Mit Hilfe der ungefärbten Probe werden die Marker gesetzt, wobei Marker 1 (M1) die CD14-negativen und Marker 2 (M2) die CD14-positiven Zellen erfasst.

### 3.2.15 Zytotoxizitätstest - Laktatdehydrogenase (LDH)-Assay

Die Messungen zur Freisetzung der zytoplasmatischen Laktatdehydrogenase (LDH) in den Zellüberstand wurde mit einem kommerziell erhältlichen Test durchgeführt (Roche, Mannheim).

#### Prinzip

Das intrazelluläre Enzym Laktatdehydrogenase wird beim Zelltod aus den Zellen freigesetzt. Ein Anstieg der LDH-Aktivität im Inkubationsüberstand ist streng mit der Zunahme der toten Zellen während der Inkubation verknüpft. Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der LDH ist daher ein Möglichkeit, den zytotoxischen Effekt von Partikeln *in vitro* abzuschätzen. Dem Test liegt das in Abb. 3.3 dargestellte Reaktionsprinzip zu Grunde:

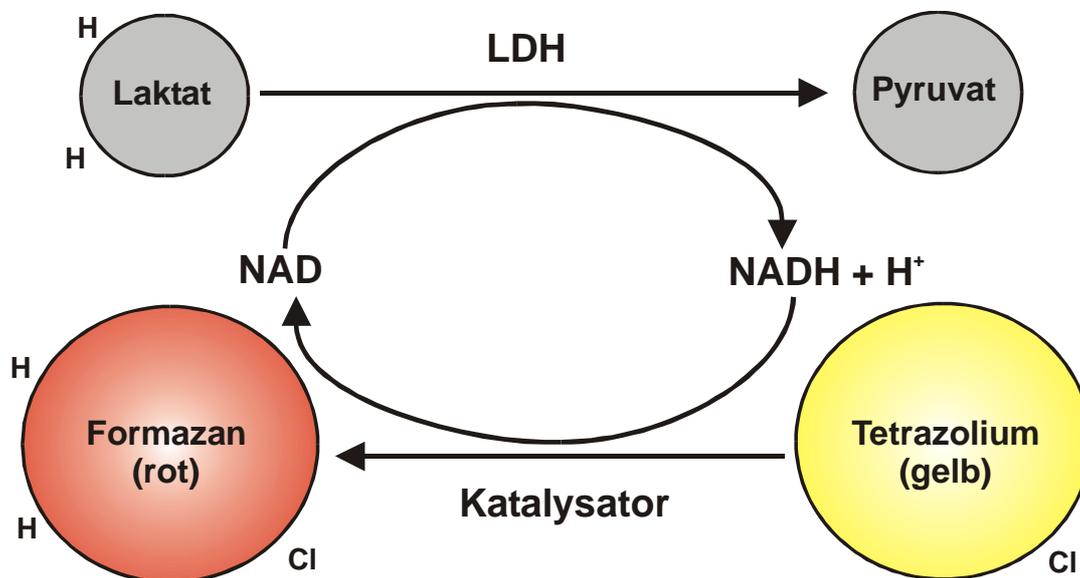


Abb. 3.3: Funktionprinzip des LDH-Zytotoxizitätstests

Die Umwandlung von Laktat zu Pyruvat durch LDH bewirkt eine Reduktion von NAD zu NADH/H<sup>+</sup>, dass wiederum Tetrazoliumsalz quantitativ zu Formazan reduziert.

Im ersten Schritt wird Laktat durch die LDH-Aktivität zu Pyruvat umgewandelt. Bei diesem Schritt wird  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}/\text{H}^+$  reduziert. Im zweiten Schritt überträgt der enthaltene Katalysator (Diaphorase) das  $\text{H}/\text{H}^+$  vom  $\text{NADH}/\text{H}^+$  zu dem Tetrazoliumsalz, das zu Formazan reduziert wird. Die Anzahl toter Zellen ist direkt proportional zur Menge an Formazan, das im Photometer bei 490 nm gemessen werden kann.

### **Material**

- Farbstofflösung mit Iodotetrazoliumchlorid und Natriumlaktat      Bestandteil des „LDH Cytotoxicity detection kit“, Roche, Mannheim
- Diaphorase/NADH-Lösung      Bestandteil des „LDH Cytotoxicity detection kit“, Roche, Mannheim
- Absorptions-Reader (VersaMax, Molecular Devices)
- 96-Well-Platten, Nuncleon (Nalgen, Nunc International)

### **Durchführung**

Der Test erfolgte in 96-Well-Platten. Jeweils vier Vertiefungen einer Platte dienten als Nullwert und wurden nicht mit Zellen beladen, in die zu testenden Vertiefungen wurden jeweils 20000 Zellen ausgesät. Die THP-1-Zellen wurden bereits 48 Stunden vor der Versuchsdurchführung in den 96-Well-Platten mit 8 nM TPA differenziert. Als Positivkontrolle wurde 1 % Triton-X100-Lösung zur vollständigen Lyse der Zellen verwendet.

Für den LDH-Test wurden 100  $\mu\text{l}$  des Überstandes über den Zellen abgenommen und in eine neue 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurden 100  $\mu\text{l}$  der LDH-Testlösung aus 10 ml NADH-Lösung und 0,4 ml Pyruvat-Lösung in jede Vertiefung, einschließlich derer für den Nullwert zugegeben. Nach 30 Minuten Inkubation im Dunkeln wurde die Reaktion durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  1 N HCl abgestoppt.

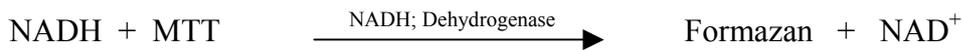
Die Messung erfolgte im Absorptions-Reader bei 490 nm und der Referenzwellenlänge von 690 nm. Zur Auswertung wurde der prozentuale Anteil toter Zellen relativ zur Positivkontrolle mit 1 % Triton-X100-Lösung nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Fehler!} \times 100$$

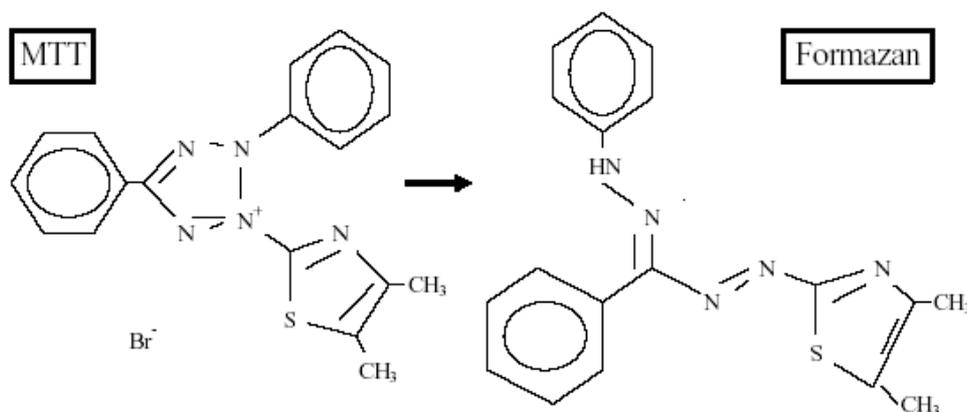
### 3.2.16 Vitalitätstest - MTT-Assay

#### Prinzip

Der MTT-Test ist eine Methode zur Bestimmung der Stoffwechselaktivität kultivierter Zellen. MTT ist die Abkürzung für das gelbe Tetrazoliumsalz 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid. Es wird von den lebenden Zellen aufgenommen und von den Mitochondrien mit NADH in einer durch succinat-abhängige Dehydrogenasen-katalysierten Reaktion zum unlöslichen blauen Formazan reduziert.



Diese Reaktion ist irreversibel. Formazan bildet sich in Form kleiner Nadeln in der Zelle. Dieses wird mit SDS gelöst und die Absorption der Lösung bei 550 nm im Mikroplattenreader gemessen. Die Höhe der Absorption ist dabei proportional zur mitochondrialen Stoffwechselaktivität der Zellen (Denizot & Lang, 1986; Mosmann, 1983).



**Abb. 3.4: Umwandlung von MTT zu Formazan**

Die Abbildung zeigt die chemische Struktur des gelben Tetrazoliumsalz 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid und die Umwandlung zu Formazan durch succinat-abhängige Dehydrogenasen.

#### **Material**

- MTT-Stammlösung                      MTT in Zellmedium, 5 mg/ml
  
- 20% SDS-Lösung:                      20 %SDS in 0,02 M Salzsäure (HCl)

- Absorptions-Reader (VersaMax, Molecular Devices)
- 96-Well-Platten, Nuncleon surface (Nalgen, Nunc International)

### ***Durchführung***

Der Test erfolgte in 96-Well-Platten. Jeweils vier Vertiefungen einer Platte dienten als Nullwert und wurden nicht mit Zellen beladen, in die zu testenden Vertiefungen wurden jeweils 20000 Zellen ausgesät. Die THP-1-Zellen wurden bereits 48 Stunden vor der Versuchsdurchführung in den 96-Well-Platten mit 8 nM TPA differenziert.

Für den MTT-Test wurde zuerst das Medium über den Zellen entfernt, dann in jede Vertiefung, einschließlich derer für den Nullwert, 200 µl Kulturmedium und 20 µl MTT-Stammlösung zugegeben. Nach zwei Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Formazan-Kristalle lysiert, indem in jede Vertiefung 60 µl SDS-Lösung zugegeben und über Nacht inkubiert wurde.

Am nächsten Morgen wurde die Platte leicht geschüttelt, um das Formazan zu lösen und nach etwa 10 Minuten im Absorptions-Reader bei 550 nm gegen Medium gemessen. Je niedriger hierbei die gemessene Absorption war, desto weniger Formazan war von den Zellen gebildet worden, d.h. desto niedriger war die Vitalität.

### **3.2.17 Zytotoxizitätstest - Sytox® Green Assay**

#### ***Prinzip***

SYTOX® Green färbt mit hoher Affinität Nukleinsäuren an und dringt schnell durch löchrige Zellmembranen toter Zellen, ist aber nicht in der Lage die intakte Zellmembran von lebenden Zellen zu durchdringen. Die Fluoreszenz steigt dabei streng proportional zum Anteil toter Zellen in der Kultur. Der Farbstoff bleibt lange Zeit stabil im Zellkulturmedium und ermöglicht somit die Verfolgung der Zytotoxizität über die Zeit in der lebenden Kultur. Die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 488 nm, die Messung der Fluoreszenz bei 490 nm.

#### ***Material***

- SYTOX® Green *nucleic acid stain* 5 mM Lösung in DMSO (Molecular Probes, Leiden)
- Automatisierter Fluoreszenzreader (MWG-Biotech AG, Ebersberg)
- 96-Well-Platten, Nuncleon surface (Nalgen, Nunc International)

### **Durchführung**

In 96-Well-Platten wurden je 20000 Zellen pro Well ausgesät. Nach 24 Stunden Wachstum bis zu Konfluenz der A549- und ECV304-Zellen wurden die Zellen mit Partikeln behandelt. Die THP-1-Zellen wurden vor der Behandlung für 48 Stunden mit 8 nM TPA zu Makrophagen differenziert. Für die Bestimmung der Zytotoxizität wurde das Zellkulturmedium mit Sytox® Green versetzt. Dabei wurde eine Endkonzentration von 100 nM eingestellt. Die Messung erfolgte nach 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 und 48 Stunden nach Zugabe der Partikel zu den Zellen.

### **3.2.18 Trypanblau**

#### **Prinzip:**

Trypanblau färbt tote Zellen blau an, so dass der Anteil toter Zellen unter dem Mikroskop bestimmt werden kann (Hanks & Wallace, 1958). Die Methode beruht darauf, dass Trypanblau die Zellmembran intakter Zellen nicht durchdringen kann, wohl aber durch die löchrige Membran von toten Zellen, so dass diese eine tiefblaue Färbung annehmen.

#### **Material**

- Trypanblau-Lösung            0,5 % Trypanblau (Sigma) in physiologischer Kochsalzlösung

#### **Durchführung**

Ein Aliquot der Zellen wurde im Verhältnis 1:1 mit Trypanblaulösung gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer gebracht. Gegebenenfalls musste die Suspension in geeigneter Weise verdünnt werden. Die Netzeinteilung der Kammer bestand aus 9 großen Quadraten mit einer Fläche von jeweils 1 mm<sup>2</sup>. Dies ergab bei einer Tiefe von 0,1 mm ein Volumen von 0,1 µl. Nach Auszählen der lebenden und der toten Zellen in mindestens 4 Quadranten bei 100facher Vergrößerung unter dem Mikroskop konnte nach Bildung des Mittelwertes der prozentuale Anteil toter Zellen nach folgender Formel berechnet werden.

$$\text{Vitalität [\%]} = \mathbf{Fehler!} \times 100$$



- Bindungspuffer für Beschichtungs-Antikörper  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O [0,1 M]  
mit Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* H<sub>2</sub>O [0,1 M] auf pH 7 einstellen;  
Monoklonalen Anti-human-IL-6-Antikörper darin aufnehmen (Pharmingen), Konzentration 1 µg/ml
- Detektorantikörper  
Biotinylierter Anti-human-IL6-Antikörper ,  
Konz. 50 µg/ml (Pharmingen), gelöst in Blockierungspuffer + 0,05% Tween
- Standards  
Humanes rekombinantes IL-6, Konzentration  
100 ng/ml,  
Verdünnungen: 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125,  
62,5, 31,5 und 15,6 pg/ml
- Streptavidin-HRP-Lösung  
Meerrettich-peroxidase-gekoppeltes Streptavidin  
(Sigma), Konzentration 125 ng/ml, gelöst in PBS
- Substratlösung  
Tetramethylbenzidindihydrochlorid-Tablette  
(Sigma), gelöst in 10 ml Phosphat-Citrat-Puffer  
Zugabe von 2 µl 30 %ige Wasserstoffperoxidlösung  
(Merck) unmittelbar vor Gebrauch
- Stoplösung  
2 mM Schwefelsäure

### ***Durchführung des Interleukin-6-ELISA***

In eine 96-Well ELISA-Platte wurden pro Vertiefung jeweils 100 µl Beschichtungsantikörper pipettiert. Die Platte wurde über Nacht bei 4°C abgedeckt inkubiert. Anschließend wurde die Platte ausgeschlagen, jeweils 300 µl des Blockierungspuffers in jede Vertiefung gegeben und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Platte 3x mit je 400 µl Waschpuffer im ELISA-Washer gewaschen. Nun wurden jeweils 100 µl der Standards und der Proben in die Vertiefungen der Platte aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden abgedeckt bei Raumtemperatur und einem erneuten 4fachen Waschschritt wurde in jede Vertiefung der Platte 100 µl des Detektorantikörpers pipettiert und er-



- Detektorantikörper                      Biotinylierter Anti-human-IL8-Antikörper (hIL-8, OptEIA™, Pharmingen), Konzentration 50 µg/ml, gelöst in Blockierungspuffer + 0,05% Tween
  
- Standards                                      Humanes rekombinantes IL-8, Konzentration 920 pg/ml  
Verdünnungen: 920; 460; 230; 115; 57,5; 28,8; 14,4; 7,2 und 3,6 pg/ml
  
- Streptavidin-HRP-Lösung                Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltes Streptavidin (aus hIL-8 OptEIA™-KIT, Pharmingen)  
Konzentration 125 ng/ml, gelöst in PBS
  
- Substratlösung                                Tetramethylbenzidindihydrochlorid-Tablette (Sigma) gelöst in 10 ml Phosphat-Citrat-Puffer;  
Zugabe von 2 µl 30 %iger Wasserstoffperoxidlösung (Merck) unmittelbar vor Gebrauch
  
- Stoplösung                                      2 mM Schwefelsäure

#### ***Durchführung des Interleukin-8-ELISA***

In eine 96-Well ELISA-Platte wurden pro Vertiefung jeweils 100 µl Beschichtungsantikörper pipettiert. Die Platte wurde über Nacht bei 4°C abgedeckt inkubiert. Anschließend wurde die Platte dreimal im ELISA-Washer mit je 400 µl Waschpuffer je Well gewaschen. Danach wurden jeweils 200 µl des Verdünnungspuffers in jede Vertiefung gegeben und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Platte 3x mit je 400 µl Waschpuffer im ELISA-Washer gewaschen. Nun wurden jeweils 100 µl der Standards und der Proben in die Vertiefungen der Platte aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden abgedeckt bei Raumtemperatur und einem erneuten 5fachen Waschschrift wurde in jede Vertiefung der Platte 100 µl des Detektorantikörpers pipettiert und eine Stunde abgedeckt inkubiert. Anschließend wurde die Platte nochmals 3x gewaschen, bevor in jede Vertiefung 100 µl Streptavidin-Peroxidase-Lösung gegeben wurde. Nach weiteren 30 Minuten Inkubation und einem weiteren 7maligen Waschvorgang mit je 30 Sekunden Einwirkzeit pro Well wurden je 100 µl Substratlösung in die Vertiefungen gebracht. Die

Farbentwicklung wurde beobachtet und bei einem Zeitpunkt optimaler Färbung, nach etwa 10 Minuten, die Reaktion durch Zugabe von jeweils 50 µl Stopplösung abgebrochen. Nun erfolgte die Messung der Absorption am ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 550 nm. Mittels einer Auswertungssoftware (SOFTmax, Molecular Devices) wurde eine Standardkurve erstellt, mit deren Hilfe dann die entsprechenden Zytokinkonzentrationen in den Proben errechnet werden konnten.

### **3.2.22 Transiente Transfektion**

#### ***Prinzip***

Das Prinzip der sogenannten Liposomen Methode zur transiente Transfektion von Fremd-DNA, in diesem Fall ein für ein fluoreszierendes Protein codierender Expressionvektor, in Zellen höherer Eukaryonten ist die Bindung von negativ geladenen Nukleinsäuren an synthetisch hergestellte, positiv geladene Phospholipidvesikel definierter Größe. Dieser so entstandene DNA/Liposomen-Komplex wird auf die Zellen gebracht und fusioniert mit der Zellmembran. Der Inhalt des DNA/Liposomen-Komplexes gelangt durch Endozytose in das Zellinnere. Dort wird das von dem Expressionsvektor codierte Protein hergestellt. Bei der transienten Expression verliert die Zelle die Fremd-DNA im Laufe der Zellteilungen.

In dem Versuch wurden zwei unterschiedlich fluoreszierende Proteine, humanes  $\beta$ -Aktin gekoppelt mit „*green fluorescent protein*“ (GFP) für die A549- und die Palmitoylierungsdomäne von humanem Neuromodulin als Membranmarker (MEM) gekoppelt mit „*cyan fluorescent protein*“ (CFP) für die ECV304-Zellen, verwendet. Dadurch konnten die Zelllinien im Fluoreszenzmikroskop durch ihre unterschiedliche Anfärbung unterschieden werden.

#### ***Material***

- |  |                       |
|--|-----------------------|
| • Lipofectamine®                           | Invitrogen, Karlsruhe |
| • Plus Reagent®                            | Invitrogen, Karlsruhe |
| • Living Colors®-MEM-Vector, #Cat 6918-1   | Clontech, Heidelberg  |
| • Living Colors®-Actin-Vector, #Cat 6116-1 | Clontech, Heidelberg  |

### **Durchführung**

Die transiente Transfektion wurde mit den „*Lipofectamine plus*“®-Transfektions-Kit (Invitrogen, Karlsruhe) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Zur Transfektion wurden in ein Eppendorfgefäß 1 µg Plasmid-DNA in 100 µl serumfreiem DMEM-Medium verdünnt. In einem Polystyrolröhrchen wurden 10 µl Lipofectamine® und 2 µl Plus-Reagent mit 90 µl Medium gemischt. Anschließend wurde die DNA-Lösung zu der Lösung im Polystyrolröhrchen getropft, gemischt, und für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

In der Zwischenzeit wurden die Zellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  pro Ansatz bei 1000 g abzentrifugiert, in 0,8 ml pro Ansatz serumfreiem DMEM-Medium aufgenommen und in eine 6-Well-Gewebekulturplatte ausgesät. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Transfektionsmischung zu den Zellen getropft. Nach zwei Stunden wurde noch 1 ml komplettes Medium (mit 10 % FCS) dazugegeben, die Zellen wiederum abzentrifugiert und in Kulturmedium aufgenommen. Direkt im Anschluß wurden die Zellen für den Ansatz des Triple-Zellkulturmodell eingesetzt.

## **3.3 Elektronenmikroskopie**

### **3.3.1 Transmissionselektronenmikroskopie**

#### **Prinzip**

Bei der Transmissionselektronenmikroskopie wird das Präparat mit Elektronen durchstrahlt. Transmissionselektronenmikroskope sind vom Prinzip her den Lichtmikroskopen sehr ähnlich. An Stelle der Glühbirne zur Beleuchtung des Objektträgers benutzt man eine Elektronenquelle. Zur Abbildung verwendet man Magnetspulen, die Elektronenstrahlen ähnlich bündeln, wie das Glaslinsen mit Lichtstrahlen tun. Das stark vergrößerte Bild erscheint dann auf einem Leuchtschirm und kann zusätzlich mit einer Photoplatte oder einer Kamera aufgenommen werden. Mit derartigen Transmissionselektronenmikroskopen können heute Abstände von unter 0,2 nm (= 1 fünfmillionstel Millimeter) sichtbar gemacht werden. Diese Größe entspricht ungefähr dem Durchmesser eines einzelnen Atoms. Daher kann mit Hilfe der Elektronenmikroskopie der atomare Aufbau von Kristallen abgebildet werden.

***Material***

Die speziell für die Elektronenmikroskopie benötigten Substanzen und Lösungen wurden von der Firma Serva, Heidelberg, bezogen.

- 0,2 M Cacodylatpuffer                      21,4 g Natriumcacodylat · 3 H<sub>2</sub>O  
Aqua bidest. ad 500 ml  
pH 7,0
  
- Fixierungspuffer                              0,4 ml 25 % Glutaraldehyd (Roth, Karlsruhe)  
5 ml Aqua bidest.  
4,6 ml 0,2 M Cacodylatpuffer
  
- Sucrosepuffer                                 10 ml 0,2 M Cacodylatpuffer  
10 ml Aqua bidest.  
7 % Sucrose
  
- Veronalpuffer                                 2,94 g Veronal  
1,94 g Natriumacetat · H<sub>2</sub>O  
H<sub>2</sub>O ad 100 ml
  
- Osmiumtetroxid-Veronalpuffer  
(nach Pallade)                                 1 ml Veronalpuffer  
1 ml 0,1 M HCl  
4 %ige OsO<sub>4</sub>-Lösung
  
- Uranylacetat                                 2 % Uranylacetat in Aqua bidest.
  
- Bleicitrat-Lösung                              1,33 g Bleinitrat (Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Merck)  
1,76 g Natriumcitrat · 2H<sub>2</sub>O  
1 ml 1 N NaOH

- SPURR-Einbettungsharz 10,0g 3,4 Epoxycyclohexylmethyl-34-epoxycyclohexylcarboxylat (ERL 4206)  
6,0g DER 736  
26,0g Nonenylsuccinic anhydride (NSA)  
0,2g Dimethylaminoethanol (DMAE)
- Uranylacetat, wässrige Lösung 2 % Uranylacetat in Aqua bidest.
- Uranylacetat in Methanol 2 % Uranylacetat in Methanol
- Sörensenpuffer, Lösung A 9,08 g Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )  
Aqua bidest. ad 1000 ml
- Sörensenpuffer, Lösung B 11,88 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )  
Aqua bidest. ad 1000 ml
- Sörensenpuffer pH 7 61,2 ml Sörensen-Lösung B  
Sörensen-Lösung A ad 100 ml
- Ultramikrotom LKB 2088 Ultrotome®V (Bromma)
- Elektronenmikroskop Zeiss EM109T (Oberkochen)
- Kupfergrids 75 Mesh Plano, Wetzlar

### ***Durchführung***

Die Präparation der Zellen für das Transmissionselektronenmikroskop (TEM) erfolgte nach einem Protokoll von Cornell (Cornell, 1969). Die Zellen wurden wie beschrieben in Transwell®-Kultursystemen ausgesät (Siehe 3.2.10 und 3.2.11). Zur Fixierung wurden die Zellen über Nacht auf Eis mit 1 %iger vorgekühlter Glutaraldehydlösung behandelt. Anschließend wurden die Membranen ausgeschnitten und in Sucrosepuffer gewaschen. Danach wurde zur Nachfixierung und Kontrastierung für 2 Stunden mit Osmiumtetroxid-Lösung auf Eis inkubiert. Nach dem Absaugen schloß sich eine Nachfixierung mit 2 % wässriges Uranylacetat für eine Stunde auf Eis an. Nach der Entfernung des Uranylacetats erfolgte die Entwässerung mit

einer aufsteigenden Ethanolreihe von 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 100 % und noch einmal 100 % Ethanolanteil in Wasser. Anschließend erfolgte die erste Einbettungsstufe mit einer Mischung von 1:1 Ethanol und Einbettungsharz. Als Einbettungsharz wurde SPURR verwendet (Okada *et al.*, 1980). Nach 20 Minuten folgten 3 SPURR-Inkubationen der Membranen in Flachformen im Exsikkator: Zuerst über Nacht bei Raumtemperatur, anschließend für weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur und für eine Stunde bei 60 °C. Zur Polymerisation wurden die eingebetteten Membrane für drei Tage bei 60 °C gelagert.

Von den Blöckchen wurden mit dem Ultramikrotom Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 70 bis 100 nm angefertigt und auf mit Formvar-beschichtete 75 Mesh Kupfergrids aufgebracht. Bei einigen Schnitten erfolgte eine Nachkontrastierung mit Uranylacetat in Methanol für 1 Minute und Bleicitrat für 5 Minuten. Die Aufnahmen erfolgten am Zeiss EM109T-Elektronenmikroskop.

### **3.3.2 Rasterelektronenmikroskopie**

#### ***Prinzip***

Die Rasterelektronenmikroskopie stellt eine Sonderform der der Elektronenmikroskopie dar. Dabei wird das darzustellende Objekt zeilenweise durch einen feinen Elektronenstrahl abgetastet. Die Intensität der rückgestreuten Elektronen oder der vom Präparat aufgenommene Elektronenstrahl steuert die Helligkeit eines Bildschirms, dessen Elektronenstrahl synchron zum Elektrodenstrahl im Rasterelektronenmikroskop abgelenkt wird. Es entsteht eine Punkt-zu-Punkt-Zuordnung zwischen Objekt und Bild. Wegen des geringen Öffnungswinkels des Elektronenstrahls im Rasterelektronenmikroskop haben die Bilder große Tiefenschärfe. Die Methode eignet sich deshalb besonders zur dreidimensionalen plastischen Darstellung von Oberflächenstrukturen.

#### ***Material***

- 0,2 M Cacodylatpuffer            21,4 g Natriumcacodylat · 3 H<sub>2</sub>O (Serva, Heidelberg)  
  Aqua bidest. ad 500 ml  
  pH 7,0
- Fixierungspuffer                10 ml 0,2 M Cacodylatpuffer  
  4 ml 25 % Glutaraldehyd (Roth, Karlsruhe)

- Sucrosepuffer  
10 ml 0,2 M Cacodylatpuffer  
10 ml Aqua bidest.  
7 % Sucrose
- Sörensenpuffer, Lösung A 9,08 g Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Serva, Heidelberg)  
Aqua bidest. ad 1000 ml
- Sörensenpuffer, Lösung B 11,88 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Serva, Heidelberg)  
Aqua bidest. ad 1000 ml
- Sörensenpuffer pH 7 61,2 ml Sörensen-Lösung B  
Sörensen-Lösung A ad 100 ml

Die Membranen wurden mit Fixierungspuffer überschichtet und über Nacht auf Eis bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Membranen mit einem Skalpell aus den Einsätzen herausgeschnitten und zweimal auf Eis mit 2 ml Sucrosepuffer gewaschen. Zur Lagerung und zum Transport wurden die Membranen vorsichtig in Eppendorfgeläße mit kaltem Sörensenpuffer überführt.

Die weitere Verarbeitung, wie das Entwässern, das Auftragen auf die Grids und das Bedampfen mit Gold wurde freundlicherweise von Herrn H. Thiele im Labor für Elektronenmikroskopie am Institut für Transurane (ITU, Forschungszentrum Karlsruhe) durchgeführt. Die Aufnahmen wurden ebenfalls an diesem Institut mit einem PhilipsXL40 Rasterelektronenmikroskop erstellt.

## 4 ERGEBNISSE

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst unterschiedliche Zelllinien ausgewählt und auf ihre Eignung zur Verwendung in Kokultursystemen überprüft. Dazu gehörte die Untersuchung der individuellen Sensitivität dieser Zelllinien für die eingesetzten Modellpartikel durch Zytotoxizitätsstudien. Zudem musste die Freisetzung von IL-6 und IL-8 in den Einzelzellkulturen charakterisiert werden, da nur im Vergleich von Kokulturen mit Einzelzellkulturen Rückschlüsse auf die Rolle der verschiedenen Zelltypen gezogen werden können. Aufgrund dieser notwendigen Vorarbeiten wurde zunächst mit Untersuchungen an Einzelzellkulturen begonnen.

### 4.1 Untersuchungen an Einzelzellkulturen

Als Epithelzelllinien wurden die humane Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B und die humane Alveolarepithelzelllinie A549 getestet. BEAS-2B-Zellen wurden bereits erfolgreich in Kokulturen mit ECV304-Zellen eingesetzt (Mögel *et al.*, 1998). Aufgrund dieser Vorarbeiten sollten die ECV304-Zellen auch in diesem Modell als humane Endothelzelllinie verwendet werden. Als Zelllinie für humane Makrophagen erschien der Einsatz von THP-1- und Mono Mac 6-Zellen geeignet.

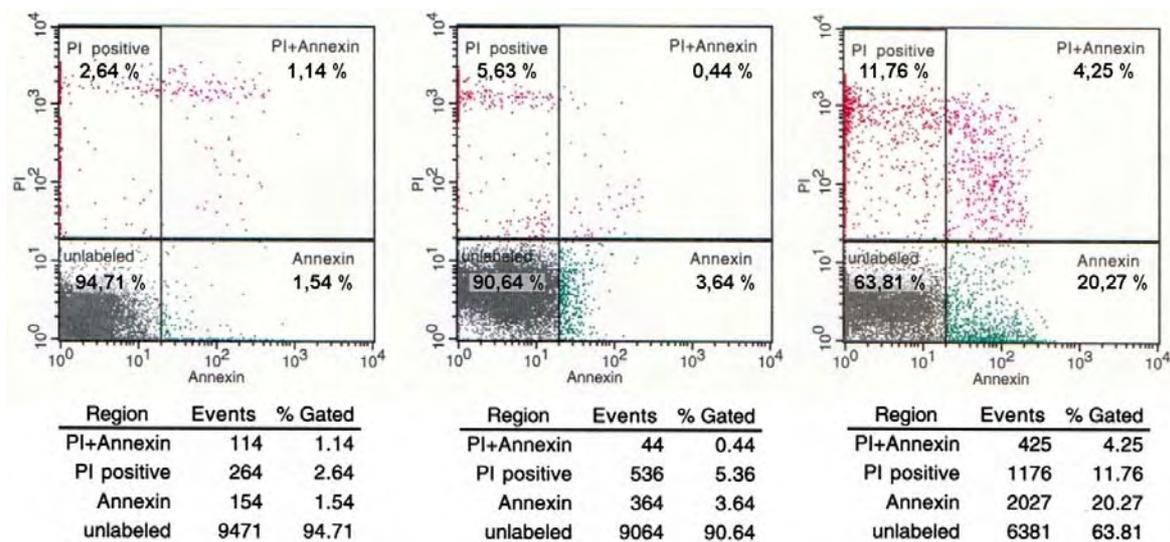
#### 4.1.1 A549 Langzeitkultur

Aufgrund eines Diskussionsbeitrages von Prof. Dr. Borlak, Fraunhofer Institut für Inhalationstoxikologie (ITA), Hannover, bestand Grund zu der Annahme, dass es bei A549-Zellen nach Erreichen einer konfluenten Zelldichte zum Absterben durch Apoptose kommt. Um die Relevanz für die geplanten Versuche zu überprüfen wurden  $1 \times 10^6$  A549-Zellen in Petrischalen ausgesät. Bereits nach 24 Stunden zeigte eine lichtmikroskopische Kontrolle eine konfluente Zellschicht (Abb. 4.5). An fünf aufeinanderfolgenden Tagen wurden jeweils die Zellen eines Petrischälchens durch Trypsinieren geerntet und die Anteile apoptotischer, nekrotischer und vitaler Zellen durch Anfärbung mit Propidiumjodid und Annexin-V-FITC im Durchflusszytometer bestimmt.

In vitalen Zellen sind die Phospholipide in der Zellmembran asymmetrisch verteilt. Ein Merkmal apoptotischer Zellen ist die Externalisierung des zytoplasmaständigen Membranlipids Phosphatidylserin, das Makrophagen als Erkennungssignal zur Eliminierung solcher Zellen

dient (Kagan *et al.*, 2000). Annexin-V-FITC ist ein FITC-gekoppeltes Protein, das spezifisch an Phosphatidylserin und somit an die Außenseite von apoptotischen Zellen bindet. Bei nekrotischen Zellen verliert die Zellmembran ihre Integrität, so dass Annexin an zytoplasmaständiges Phosphatidylserin binden kann. Zur Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen muss zusätzlich mit Propidiumjodid gefärbt werden. Propidiumjodid interkaliert mit DNA, kann aber nicht durch intakte Zellmembranen wandern und markiert somit nur die nekrotischen Zellen. Vitale Zellen können aufgrund ihrer intakten Zellmembran weder durch Annexin-V-FITC noch durch Propidiumjodid angefärbt werden. Die behandelten Proben wurden anschließend mit einem Durchflusszytometer analysiert.

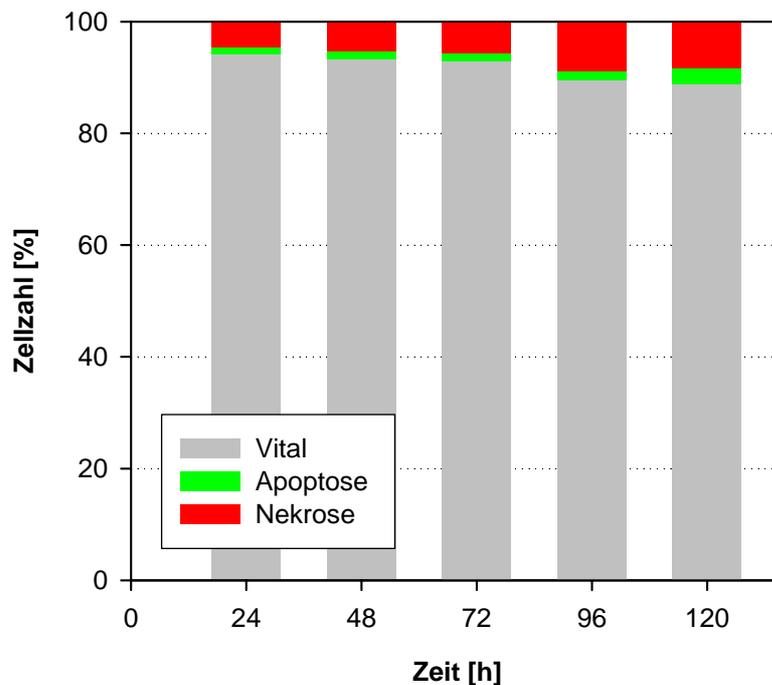
Die ausgezählten Zellen wurden aufgrund ihrer Färbung in die Gruppen vital (ungefärbt), apoptotisch (Annexin-V-FITC-gefärbt) und nekrotisch (Propidiumjodid und doppelt gefärbt) unterteilt. Die Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe einer Quadranten-Statistik eines sogenannten Dot-Blots. Jeder Punkt dieses Dot-Blots repräsentiert eine Zelle, seine Position im Koordinatensystem den Grad seiner Fluoreszenzfärbung. Die prozentualen Zellzahlen konnten aus der Verteilung in den Quadranten ermittelt werden, wie in Abb. 4.1 beispielhaft für alle folgenden durchflusszytometrischen Analysen gezeigt. Zur übersichtlicheren Darstellung wurden alle ermittelten Ergebnisse in Balkendiagrammen dargestellt.



**Abb. 4.1: Beispieldatenblätter einer durchflusszytometrischen Analyse**

Zum besseren Verständnis der Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen sind hier typische Datenblätter (Dot-Blots) von A549-Zellen dargestellt. Von links nach rechts ist eine unbehandelte Negativkontrolle, eine mit 50 µg/ml S-100 Partikeln behandelte Probe und eine Positivkontrolle (200 µM Etoposid) abgebildet. Eine detaillierte Erläuterung zur Auswertung dieser Daten ist im vorangehenden Text nachzulesen.

Wie in Abb. 4.2 zu erkennen, erhöhte sich der Anteil apoptotischer Zellen in einer konfluenten Kultur von A549-Zellen innerhalb eines Zeitraumes von 96 Stunden nicht um mehr als 0,1 %. Erst nach 120 Stunden stieg die Anzahl apoptotischer Zellen um nur 1,45 % an. Somit sollte die von Herrn Prof. Dr. Borlak beschriebene auto-apoptotische Eigenschaft von A549-Zellen bei Konfluenz keinen Einfluss auf die folgenden Versuchsergebnisse haben.



**Abb. 4.2: Induktion von Apoptose in konfluenter Langzeitkultur**

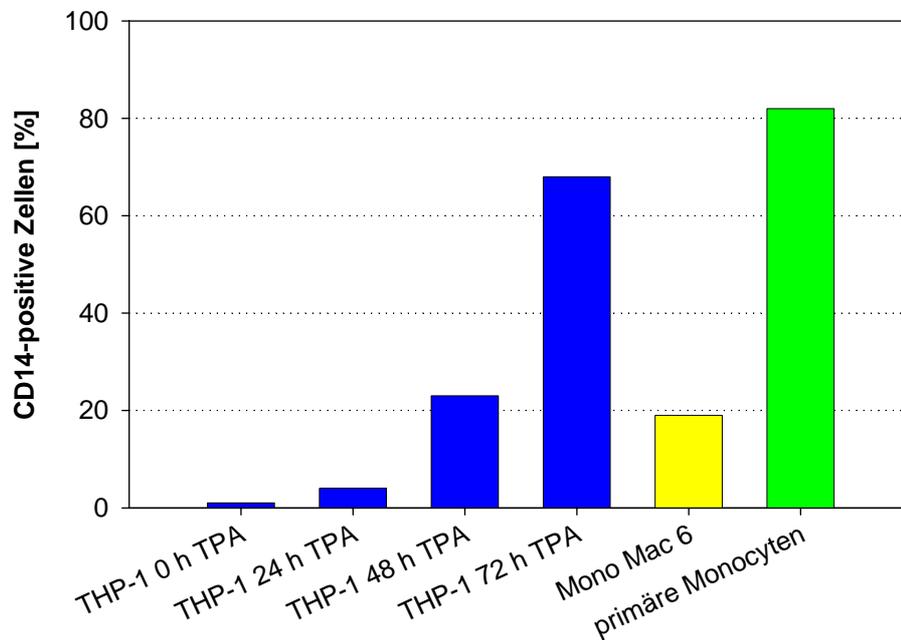
Konfluente A549-Zellen wurden über einen Zeitraum von fünf Tagen auf Apoptose überprüft. Erst am vierten Tag war ein leichter Anstieg von nekrotischen und apoptotischen Zellen zu erkennen. (n = 2)

#### **4.1.2 Differenzierung der Makrophagenzelllinien THP-1 und Mono Mac 6**

Makrophagenzelllinien verlieren, andere Zelllinien aus, einen Teil ihrer Eigenschaften in Kultur. Um den Differenzierungszustand der THP-1- und Mono Mac 6-Zellen zu Makrophagen zu dokumentieren, wurden diese Zellen auf die Expression des Rezeptors CD14, ein Markerprotein für Makrophagen und Monozyten, untersucht. Als Positivkontrolle dienten primäre humane Monozyten. Während die THP-1-Zellen durch eine Behandlung mit TPA gezielt zu Makrophagen differenziert werden können, differenziert ein Anteil von ungefähr 20 % der Mono Mac 6-Zellen kontinuierlich zu Makrophagen (Tsuchiya *et al.*, 1982; Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1994). Für den Versuch wurden THP-1 Zellen mit 8 nM TPA inkubiert. Zur Messung wurden von den Mono Mac 6-Zellen, differenzierten und undifferenzierten THP-1

Zellen und den humanen Monozyten jeweils  $1,5 \times 10^6$  Zellen abgenommen, mit CD14-Antikörper (anti-human CD14 monoklonaler Antikörper, MY4-FITC, Coulter, PN 6602511) behandelt und im Durchflusszytometer gemessen.

Im Versuch exprimierten 19 % der Mono Mac 6-Zellen und 82 % der primären Monozyten den CD14-Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche. Von den undifferenzierten THP-1-Zellen exprimierten etwa 1 % den Rezeptor. Nach 24 Stunden Inkubation mit 8 nM TPA konnte der CD14-Rezeptor bei 4 % aller THP-1-Zellen nachgewiesen werden, nach 48 Stunden stieg die Anzahl der CD14-exprimierenden Zellen auf 23 % an und nach 72 Stunden Inkubation trugen 68 % der Zellen den Rezeptor auf ihrer Oberfläche (Abb. 4.3).



**Abb. 4.3: Expression von CD14 von Mono Mac 6 und THP-1 Zellen**

Frisch isolierte primäre humane Monozyten wurden für drei Stunden in Petrischalen im Brutschrank inkubiert. THP-1 Zellen wurden für 24, 48 und 72 Stunden mit 8 nM TPA behandelt. Anschließend wurden alle Zellen mit einem FITC gekoppelten Antikörper gegen CD14 markiert und im Durchflusszytometer die CD14-markierten Zellen gezählt (Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen).

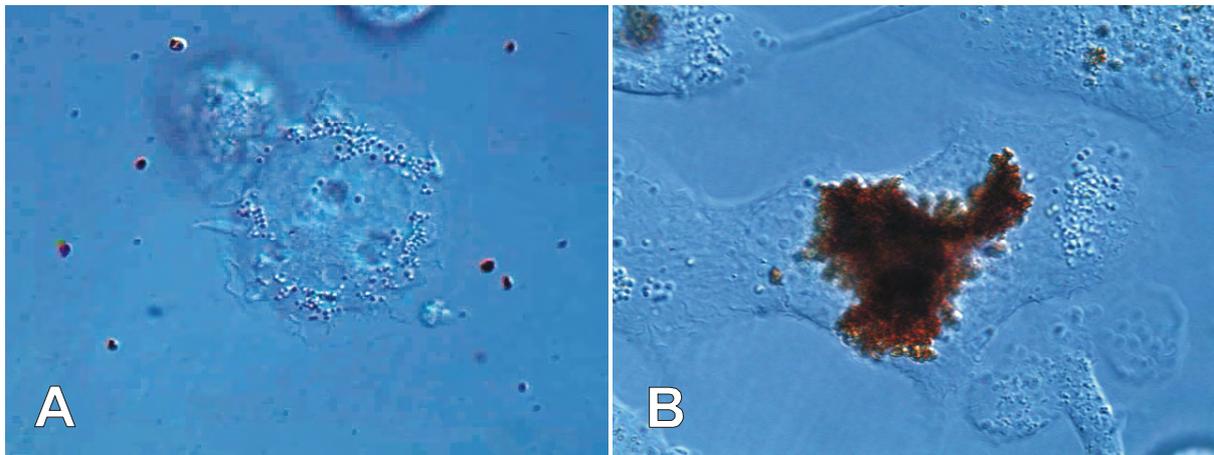
Das Ergebnis belegte die Differenzierung von THP-1-Zellen mit TPA zu Makrophagen und ihre Eignung als Makrophagen-Zelllinie für Kokultursysteme. Jedoch ist der Anteil von CD14-tragenden Zellen mit 19 % bei den Mono Mac 6-Zellen ohne jede Maßnahme zur Differenzierung ebenfalls recht hoch. Die Möglichkeit, diese Zellen ohne Differenzierung

direkt in Kokultursystemen zu verwenden ist gerade in komplizierten Mehrfachzellkulturen ein verfahrenstechnischer Vorteil.

#### 4.1.3 Aufnahme von Hämatit-Partikeln in Zellen

Eine grundsätzliche Frage zur Wirkung von unlöslichen Partikeln auf Zellen stellt sich bei der Aufnahme von Partikeln in die Zelle. Während Makrophagen in der Lage sind, Partikel zu phagozytieren, ist dies für Epithel- und Endothelzellen nicht eindeutig geklärt.

Die THP-1-Zellen wurden in Chamberslides ausgesät und mit 8 nM TPA über 48 Stunden zu Makrophagen differenziert. Nach Zugabe von Hämatit-Partikeln (200 µg/ml) zeigten die THP-1-Zellen im Lichtmikroskop sofort eine deutliche Phagozytose-Aktivität. Einzelne Hämatit-Partikel haben einen durchschnittlichen aerodynamischen Durchmesser von ungefähr 70 nm und waren deshalb im Lichtmikroskop nicht sichtbar. Jedoch waren Agglomerate der Hämatit-Partikel nach Aufnahme in die Zellen durch ihre rote Färbung zu erkennen. Nach 16 Stunden Inkubation mit 200 µg/ml Hämatit waren die THP-1 Zellen mit aufgenommenen Partikeln angefüllt (Abb. 4.4).

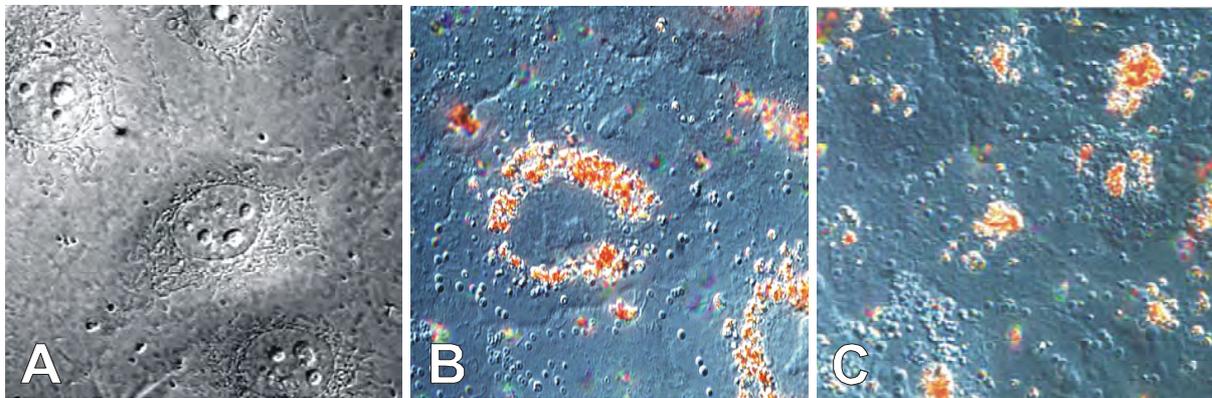


**Abb. 4.4: Differenzierte THP-1-Zellen nach 16 Stunden Exposition mit Hämatit-Partikeln**

THP-1-Zellen wurden für 48 Stunden mit 8 nM TPA differenziert und mit 200 µg/ml Hämatit-Partikeln für 16 Stunden inkubiert. **A)** Am Beginn der Inkubation waren vereinzelt Hämatit-Agglomerate im Medium zu erkennen, einzelne Partikel sind im Lichtmikroskop nicht sichtbar. **B)** Nach 16 Stunden sind die Partikel von den THP-1-Zellen aufgenommen worden (630fache Vergrößerung, differentieller Interferenzkontrast (DIC)).

Die Aufnahme von in Zellkulturmedium resuspendierten Hämatit-Partikel durch A549-Zellen konnte sowohl im Lichtmikroskop als auch im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) dokumentiert werden. Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden A549- und

ECV304-Zellen in Chamberslides ausgesät und nach Erreichen einer konfluenten Zellschicht (Abb. 4.5 A) für 24 Stunden mit Hämatit-Partikeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gründlich mit PBS gespült, um nicht von den Zellen aufgenommene Partikel zu entfernen. Hämatit-Partikel sind nur als Agglomerate im Lichtmikroskop zu erkennen. Einzelne Partikel können aufgrund ihrer geringen Größe nicht wahrgenommen werden. Die Hämatit-Agglomerate waren im Lichtmikroskop durch ihre rote Färbung eindeutig zu identifizieren. In den mit Partikeln behandelten A549-Zellen fanden sich diese Agglomerate in erster Linie um den Zellkern herum (Abb. 4.5 B). Bei ECV304-Zellen zeigte die gleiche Behandlung ein etwas anderes Bild. Es fanden sich insgesamt weniger Hämatit-Partikel in den Zellen, die im Zentrum der Zelle lokalisiert waren (Abb. 4.5 C).



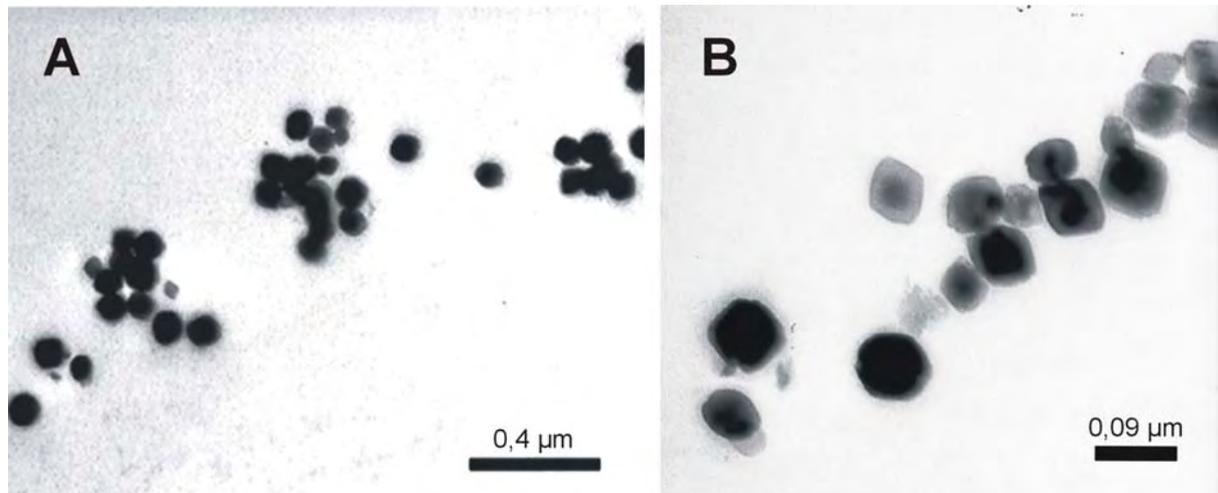
**Abb. 4.5: A549- und ECV304-Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit Hämatit-Partikel**

Lichtmikroskopische Bilder von A549- und ECV304-Zellen **A)** unbehandelte A549-Zellen **B)** A549-Zellen nach 24 Stunden Exposition mit Hämatit-Partikel (100 µg/ml) und anschließendem Waschen mit PBS. Hämatit-Agglomerate sind um den Zellkern sichtbar. **C)** ECV304-Zellen nach identischer Behandlung wie die A549-Zellen. Die Partikel sind im Zentrum der Zelle nahe des Zellkerns zu erkennen. (630fache Vergrößerung, DIC).

Mit dem Transmissionselektronenmikroskop waren Hämatit-Partikel sehr gut und eindeutig zu identifizieren. In den Vergrößerungsstufen bis 30000fach waren sie als runde, sehr dunkle, punktförmige Bereiche in den Aufnahmen zu erkennen (Abb. 4.6 A). Erst bei höheren Auflösungen ab 85000facher Vergrößerung offenbarte sich der kristalline Charakter der Hämatitpartikel als eckige, rhombusförmige Strukturen (Abb. 4.6 B). Präparate, die nicht mit Hämatitpartikeln behandelt wurden, zeigten diese dunklen, punktförmigen Stellen nicht, so dass es sich bei diesen Stellen zweifelsfrei nicht um Artefakte oder andere Zelleinschlüsse handeln konnte.

Im Zytosol von A549-Zellen waren Hämatitpartikel als Agglomerate, aber auch als einzelne Partikel zu finden. Diese einzelnen Hämatit-Partikel waren mit dem Lichtmikroskop nicht zu

erkennen. Zudem ermöglichte das Transmissionselektronenmikroskop die Bestimmung, ob die Hämatitpartikel an der Zelloberfläche hafteten oder in die Zellen aufgenommen wurden. Ferner konnten Hinweise über den Verbleib der Partikel innerhalb der Zellen gesammelt werden.

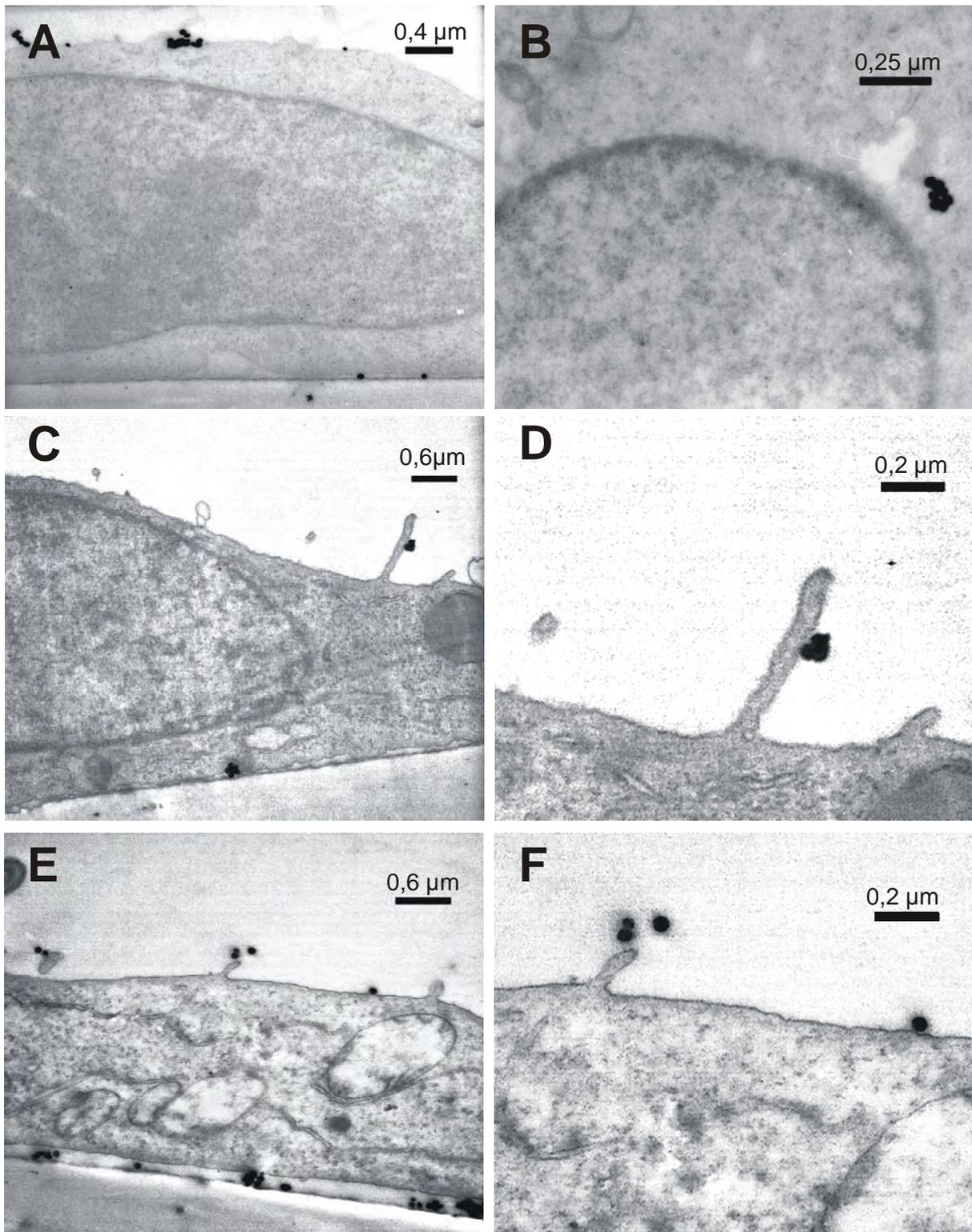


**Abb. 4.6: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von Hämatitpartikeln**

Die Aufnahmen zeigen Hämatit-Partikel im Transmissionselektronenmikroskop (TEM). **A)** Bei 20000-facher Vergrößerung erscheinen die Partikel als elektronendichte runde Punkte. **B)** Bei stärkerer Vergrößerung (85000-fach) ist der kristalline Charakter der Partikel zu erkennen.

Um die Aufnahme von Hämatit-Partikeln in die Zelle zu untersuchen wurden A549-Zellen auf Transwell<sup>®</sup>-Membranen ausgesät und mit Hämatit-Partikeln in einer Konzentration von 50 µg/ml inkubiert. Die anschließende Fixierung der Zellen erfolgte 3, 6 und 16 Stunden nach der Inkubation. Diese Zeitpunkte wurden nach den Erfahrungen mit dem Lichtmikroskop gewählt. Damit sollten unterschiedliche Stadien bei der Aufnahme von Hämatit-Partikeln in die Zellen erkennbar werden. Alle Abbildungen repräsentieren die Beobachtungen aus mehreren Schnitten.

Von den A549-Zellen wurden Querschnitte angefertigt. Die flache, spindelförmige Kontur mit dem Zellkern an der dicksten Stelle in der Mitte der Zelle war dabei deutlich zu erkennen. Je nach Grad der Kontrastierung lassen sich Zellorganellen und Membranstrukturen identifizieren. Nach 3 Stunden sind Partikel auf der Zelloberfläche angelagert oder knapp unter die Zelloberfläche aufgenommen. Zudem waren einzelne Partikel bis an die basolaterale Membran der Zelle transportiert worden (Abb. 4.7 A und B). Einige Partikel waren im Zytoplasma zu finden. Eine höhere Vergrößerung zeigte aber keine Membranstrukturen um die Partikel, wie es bei einer Phagozytose zu erwarten wäre (Abb. 4.7 B).

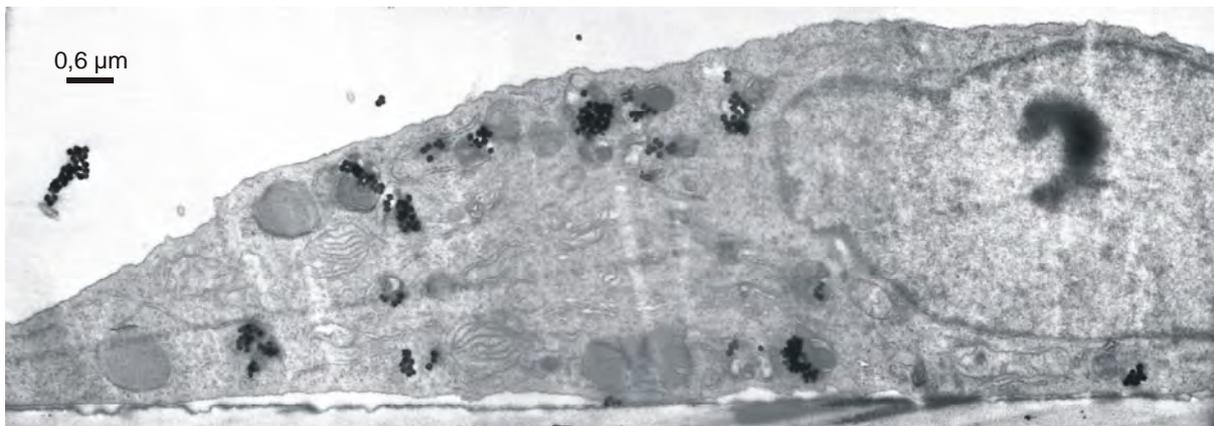


**Abb. 4.7: Aufnahme von Hämatitpartikel in A-549-Zellen (TEM)**

A549-Zellen wurden für 3 und 6 Stunden mit 50  $\mu\text{g/ml}$  inkubiert und anschließend fixiert. **A) – D)** Nach 3 Stunden Inkubation mit Hämatitpartikeln **E) – F)** Nach 6 Stunden Inkubation mit Hämatitpartikeln. **D)** ist eine Detailaufnahme von **C)**, **F)** eine Detailaufnahme aus **E)**. Die Partikel wurden in die Zellen aufgenommen und Richtung basolateraler Membran transportiert. Es sind Zellfortsätze zu erkennen, die sich den Partikeln entgegen zu strecken scheinen. (A, D, F: 20000-, D, F: digitale Ausschnittsvergrößerung, B: 30000-, C, E: 12000-fach)

Bei einigen Zellen waren Zellfortsätzen in unmittelbarer Nähe der Hämatitpartikeln zu beobachten (Abb. 4.7 C – D). In Abb. 4.7 C so ein Zellfortsatz zu erkennen. Bei höherer Vergrößerung wird der Kontakt zu den Partikeln sichtbar (Abb. 4.7 D). Nach 6 Stunden Inkubation waren deutlich mehr Partikel im Bereich der basolateralen Membran lokalisiert (Abb. 4.7 E). Auch hier waren Partikel an der Oberfläche angelagert und Zellfortsätze in unmittelbarer Nähe der Partikel lokalisiert (Abb. 4.7 F).

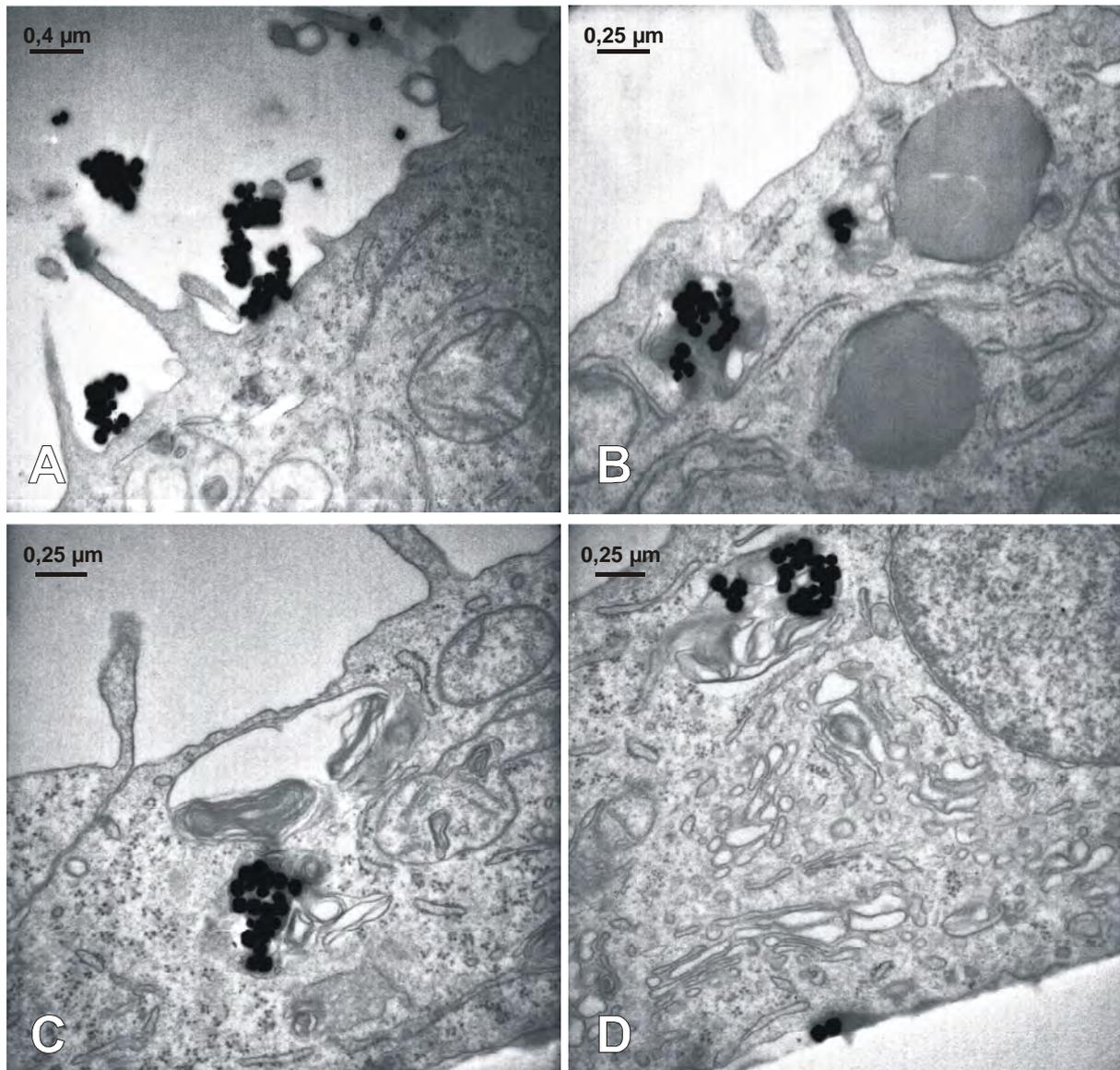
Nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden waren in den Zellen deutlich mehr Hämatit-Partikel zu erkennen. Wie in Abb. 4.8 ersichtlich, bildeten die Partikel Agglomerate innerhalb der Zellen, die den Agglomeraten aus den lichtmikroskopischen Aufnahmen entsprechen (Abb. 4.5 B). Die Partikel waren in erster Linie direkt unterhalb der oberen Zellmembran oder in unmittelbarer Nähe der basolateralen Membran zu finden (Abb. 4.8).



**Abb. 4.8: Hämatit-Partikel in einer A549-Zelle (TEM-Aufnahme)**

A549-Zelle nach 16 Stunden Inkubation mit Hämatitpartikeln (12000fach). Um den Kern der Zelle sind Agglomerate im Zytoplasma zu finden, teils direkt unter der oberen Zellmembran, teils in der Nähe der basolateralen Membran.

Der Aufnahmemechanismus der Hämatit-Partikel in die A549-Zellen war anhand der transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen nicht eindeutig zu klassifizieren. In den TEM-Bildern in Abb. 4.9 sind die Strukturen der Zelle wie Mitochondrien, endoplasmatisches Reticulum, Polysomen, Golgi-Strukturen und in Abb. 4.9 D ein Ausschnitt des Zellkerns zu erkennen. Im Anfangsstadium des Aufnahmeprozesses konnten häufig Ausstülpungen der Epithelzellen zu den Partikeln auf der Zelloberfläche hin beobachtet werden, die Partikel befinden sich jedoch noch außerhalb der Zelle (Abb. 4.9 A).



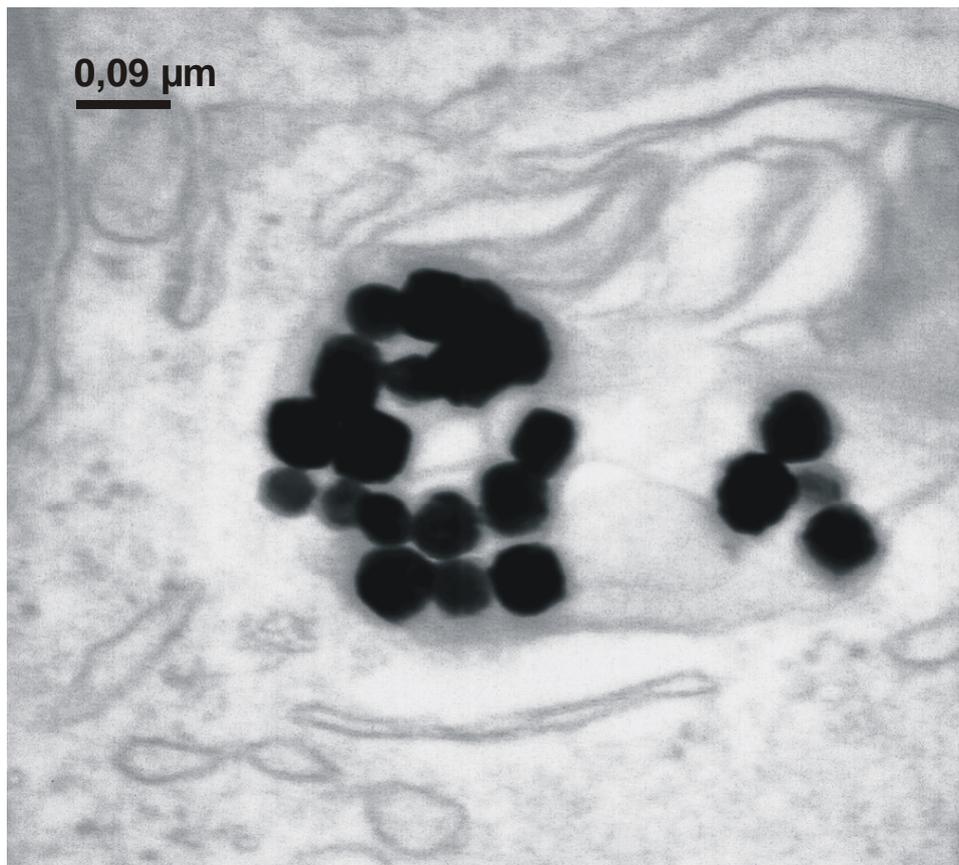
**Abb. 4.9: Schicksal von Hämatit-Partikeln innerhalb von A549-Zellen (TEM)**

A549-Zellen wurden für 3 Stunden (A) und 6 Stunden (B – D) mit Hämatit-Partikeln inkubiert. In A) sind die Partikel noch außerhalb der Zelle zu erkennen. In B), C) und D) sind die Partikel in die Zelle aufgenommen worden. Um die Zellen herum sind zelluläre Strukturen zu erkennen (A: 20000fache, D, C, D 30000fache Vergrößerung)

Nach der Aufnahme der Partikel in die Zelle waren keine eindeutigen Membranstrukturen um die Partikel herum zu erkennen, die auf eine Phagozytose der Partikel, bei der über Einschnürung der äußeren Zellmembran Vesikel ins Innere aufgenommen werden, schließen lassen könnten. Während die Hämatit-Partikel in Abb. 4.7 B anscheinend frei im Zytoplasma vorlagen, war in Abb. 4.9 B jedoch eine lysosomale Struktur um das Partikel-Agglomerat zu beobachten. In Abb. 4.9 C waren die Partikel unterhalb einer Art Laminarkörperchen lokalisiert.

Um die zu einem Agglomerat zusammengeballten Hämatit-Partikeln war eine schwer zu definierende Struktur zu erkennen. Eine sehr ähnliche Struktur war ebenfalls um die Hämatit-Partikel herum in Abb. 4.9 D zuerkennen. Zudem konnten in Abb. 4.9 D Partikel an der basolateralen Membran der Zelle identifiziert werden.

Um die Struktur um die Hämatit-Partikel in der Zelle genauer zu untersuchen, wurden TEM-Aufnahmen in stärkerer Vergrößerung aufgenommen. Eine Aufnahme in 85000facher Vergrößerung der Hämatit-Partikel innerhalb einer A549-Zelle ist in Abb. 4.10 gezeigt.

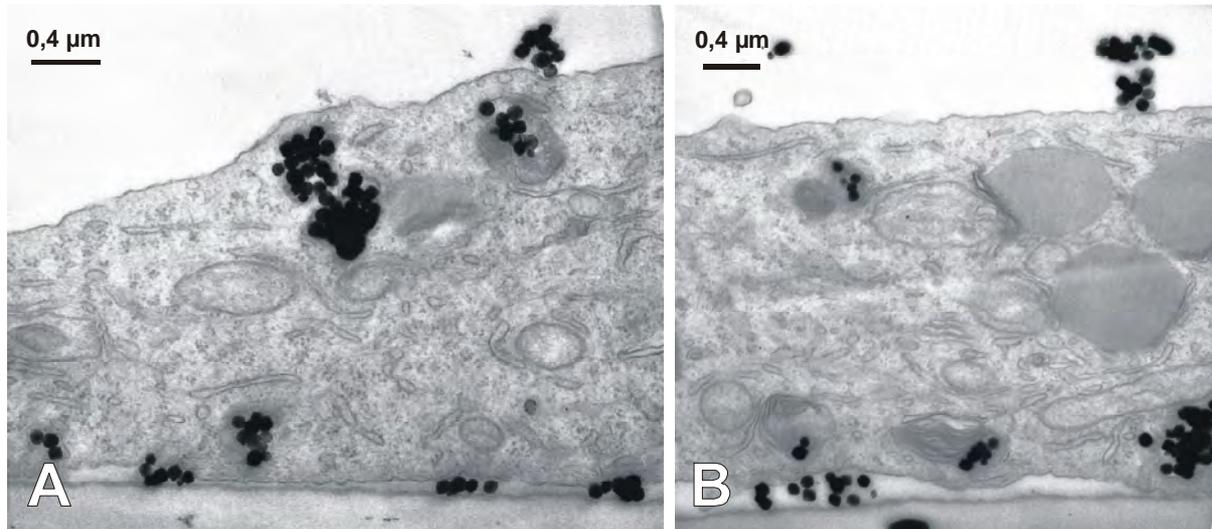


**Abb. 4.10: Struktur um Hämatit-Partikeln in einer A549-Zelle bei 85000facher Vergrößerung (Detailvergrößerung aus Abb. 4.9 D)**

Zur Aufklärung der Struktur um in A549-Zellen aufgenommene Hämatit-Partikel herum wurden transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen bei starker Vergrößerung angefertigt. Bei den Strukturen könnte es sich um Membranstrukturen handeln (85000fache Vergrößerung).

Nach Aufnahme der Hämatit-Partikel in die Zelle war ein zur basolateralen Membran gerichteter Transport festzustellen. Nach einer Inkubationsdauer von 16 Stunden war ein beträchtlicher Anteil der Partikel im unteren Bereich der Zelle lokalisiert. Dabei konnte ein Teil der

Partikel innerhalb der Zelle an der basolateralen Membran, ein anderer Teil unterhalb der Membran außerhalb der Zelle gefunden werden (Abb. 4.11).



**Abb. 4.11: Transport von Hämatit-Partikel durch A549-Zellen hindurch**

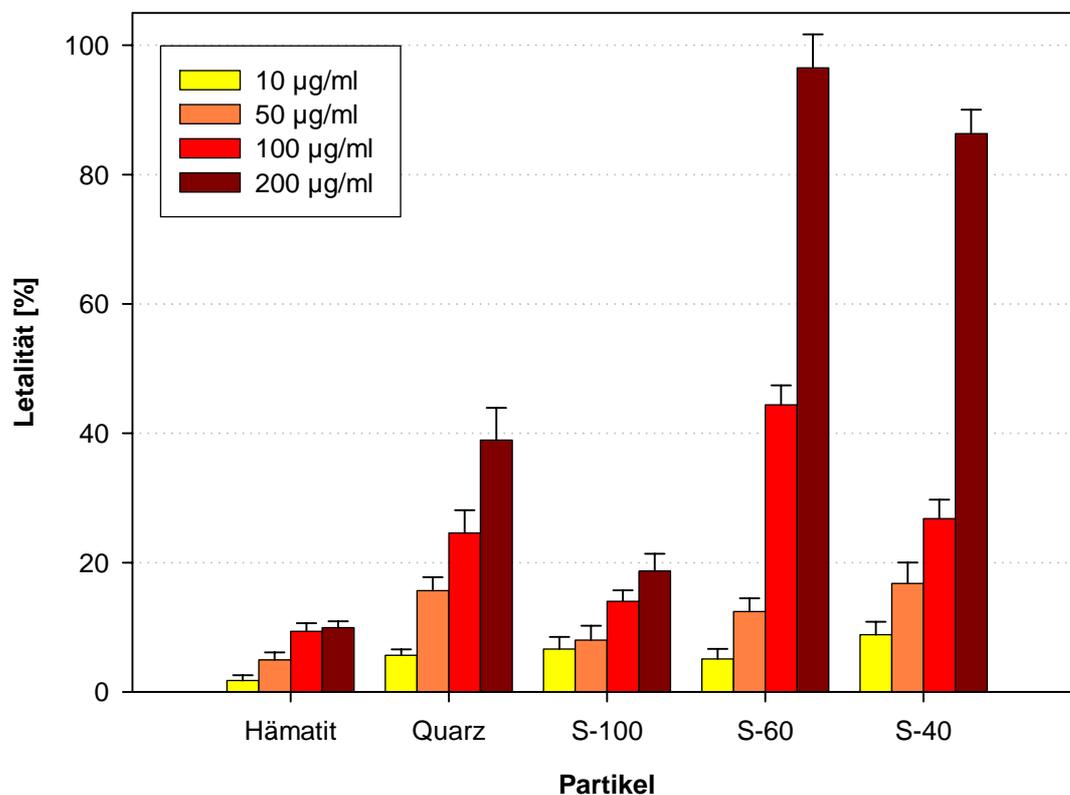
TEM-Aufnahmen von A549-Zellen nach 16 Stunden Inkubation mit 100 µg/ml Hämatit-Partikeln. Die von den A549-Zellen aufgenommenen Partikel wurden durch die Zellen hindurch auf die Unterseite transportiert. (20000fache Vergrößerung)

#### **4.1.4 Zytotoxizität verschiedener Modellpartikel – Laktatdehydrogenase-Assay (LDH)**

Die Laktatdehydrogenase ist ein intrazelluläres Enzym, das beim Zelltod aus den Zellen freigesetzt wird, wenn die Zellen die Integrität ihrer Zellmembran verlieren. Die Messung der LDH-Aktivität von Inkubationsüberständen ist daher zur Abschätzung der Zytotoxizität von Agenzien anwendbar.

Dazu wurden 20000 BEAS-2B-, A549-, ECV304- und Mono Mac 6-Zellen pro Well in 96-Well-Platten ausgesät. Nach 24 Stunden waren die Zellen zu einer konfluenten Zellschicht gewachsen. Die THP-1 Zellen wurden ebenfalls in einer Dichte von 20000 Zellen pro Well ausgesät, jedoch über 2 Tage mit 8 nM TPA zu Makrophagen differenziert. Die LDH-Aktivität im Überstand über den Zellen wurde nach 24 Stunden Inkubation mit Konzentrationen von 10, 50, 100 und 200 µg/ml der Modellpartikeln gemessen.

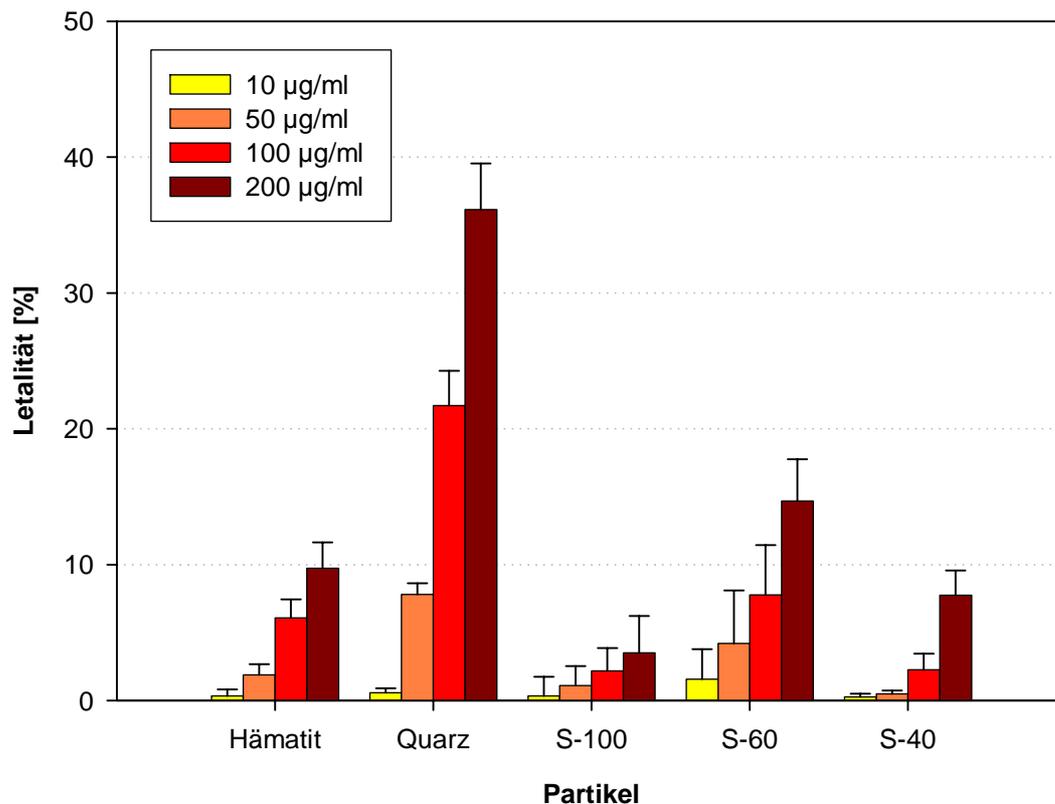
Die BEAS-2B-Zellen zeigten keine hohe Empfindlichkeit für Hämatitpartikel, deren toxische Wirkung den Anteil toter Zellen auf lediglich 10 % der Zellen ansteigen ließ. Der Effekt schien sich auch durch eine Steigerung der Partikelkonzentration von 100 auf 200  $\mu\text{g/ml}$  nicht zu verstärken. Die Behandlung mit den toxischen Quarz-Partikeln dagegen zeigte eine Dosis-Wirkungs-Beziehung, die in ihrer Intensität mit der anderen getesteten Epithelzelllinie, den A549-Zellen vergleichbar war. Auffallend ist die hohe Empfindlichkeit gegenüber den Silicasol-Partikeln S-60 und S-40. Diese Partikel erhöhten den Anteil toter Zellen in der Konzentration von 200  $\mu\text{g/ml}$  auf 96,5 % bzw. 87 % der Zellen, während geringere Konzentrationen von 10 und 50  $\mu\text{g/ml}$  in ihrer Wirkung durchaus mit der Wirkung der toxischen Quarz-Partikel zu vergleichen waren (Abb. 4.12).



**Abb. 4.12: LDH-Aktivität im Überstand von BEAS-2B-Zellen nach Exposition mit verschiedenen Partikeln für 24 Stunden**

BEAS-2B-Zellen wurden mit Hämatit, Quarz und Silicasol-Partikeln in den Konzentrationen 10, 50, 100 und 200  $\mu\text{g/ml}$  behandelt. Das Ergebnis zeigt die LDH-Aktivität im Überstand der Zellen 24 Stunden nach Behandlungsbeginn (Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 4$ ).

Die A549-Zellen zeigten eine mit den BEAS-2B-Zellen vergleichbare Empfindlichkeit für Hämatit- und Quarz-Partikel. In den niedrigeren Konzentrationen von 10 und 50  $\mu\text{g/ml}$  dieser Partikel waren die A549-Zellen jedoch unempfindlicher. Die toxische Wirkung der Silicasol-Partikel fiel dagegen im Vergleich deutlich niedriger aus. Die ultrafeinen S-60 Partikel wirkten zytotoxischer als die größeren S-100 Partikel und die kleineren S-40 Partikel. Bei allen verwendeten Partikeln war eine klare Dosis-Wirkungs-Beziehung zu erkennen (Abb. 4.13).

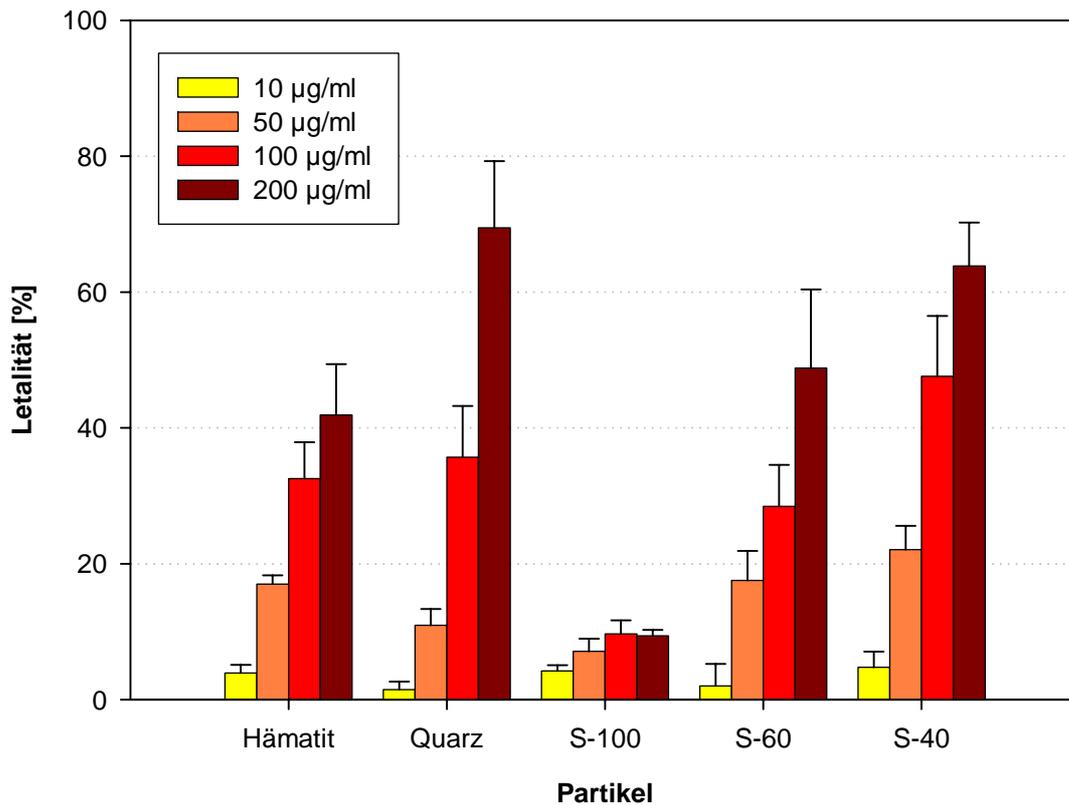


**Abb. 4.13: LDH-Aktivität im Überstand von A549-Zellen nach 24 Stunden Exposition mit verschiedenen Partikeln**

A549-Zellen wurden mit Hämatit, Quarz und Silicasol-Partikeln in den Konzentrationen 10, 50, 100 und 200  $\mu\text{g/ml}$  inkubiert. Das Ergebnis zeigt die LDH-Aktivität im Überstand der Zellen 24 Stunden nach Behandlungsbeginn (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 7).

Die Ergebnisse der Behandlung von ECV304-Endothelzellen mit den Modellpartikeln überraschten durch die hohe Sensitivität gegenüber allen verwendeten Partikeln. Besonders die Hämatitpartikel zeigten schon bei geringen Konzentrationen von 10 und 50  $\mu\text{g/ml}$  eine zyto-

toxische Wirkung und erhöhten den Anteil toter Zellen in den höheren Konzentrationen auf bis zu 40 % der Zellen, vergleichbar mit der Wirkung der toxischen Quarz-Partikel auf die Epithelzelllinien. Quarz-Partikel in der Konzentration von 200  $\mu\text{g/ml}$  führten zu einem 70 %igen Vitalitätsverlust. Auch für die ultrafeinen Partikel S-60 und S-40 war eine hohe Sensitivität zu beobachten (Abb. 4.14).

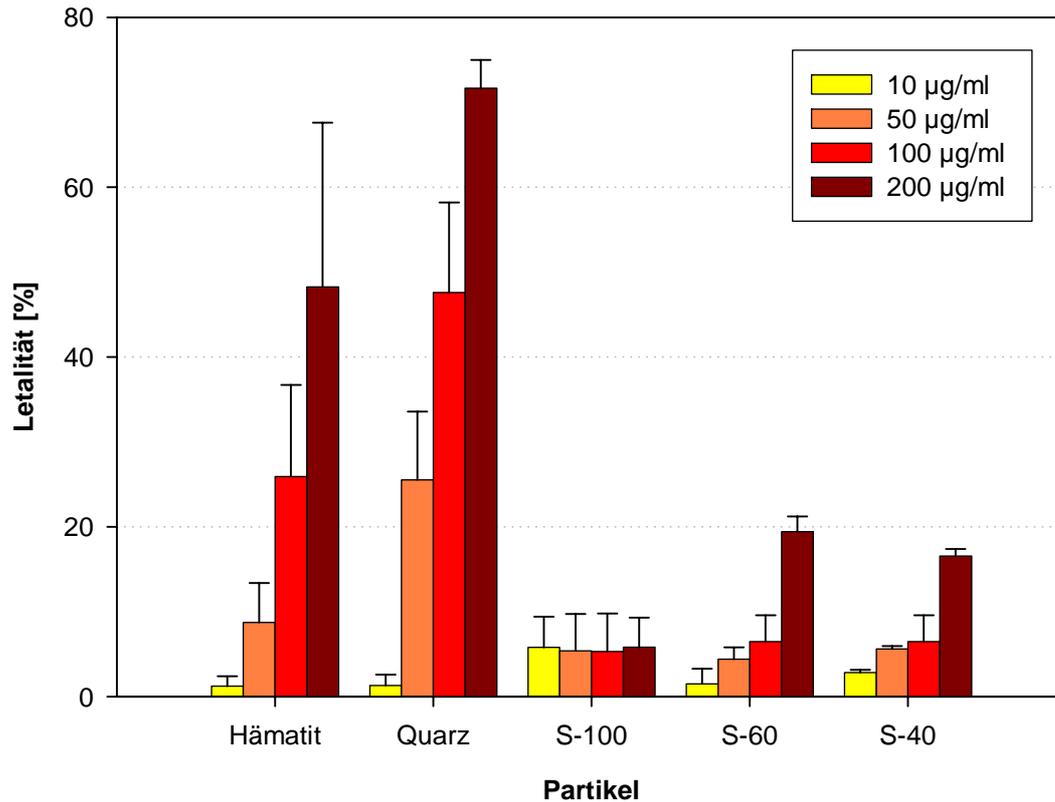


**Abb. 4.14: LDH-Aktivität im Überstand von ECV304-Zellen nach 24 Stunden Exposition mit verschiedenen Partikeln**

ECV304-Zellen wurden mit Hämatit, Quarz und Silicasol-Partikeln in den Konzentrationen 10, 50, 100 und 200  $\mu\text{g/ml}$  inkubiert. Das Ergebnis zeigt die LDH-Aktivität im Überstand der Zellen 24 Stunden nach Behandlungsbeginn (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 4).

Die zu Makrophagen differenzierten THP-1-Zellen reagierten sehr empfindlich auf Partikelbehandlung. Die als ungiftig geltenden Hämatit-Partikel erhöhten den Anteil toter Zellen in höheren Konzentrationen von 100 und 200  $\mu\text{g/ml}$  auf 30 und 50 %. Insbesondere Quarz-Partikel sind für THP-1-Zellen besonders toxisch. Bereits eine Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$

wirkte bei ungefähr einem Drittel der Zellen tödlich. Konzentrationen von 100 und 200  $\mu\text{g/ml}$  erhöhen den Anteil toter Zellen auf bis zu 80 % der THP-1-Zellen. Eine Behandlung mit S-100 Partikeln zeigte nur eine geringe Wirkung und keine Dosis-Wirkungs-Beziehung. Dagegen zeigte eine Behandlung mit S-60 und S-40 Partikeln eine deutliche Dosis-Abhängigkeit (Abb. 4.15).

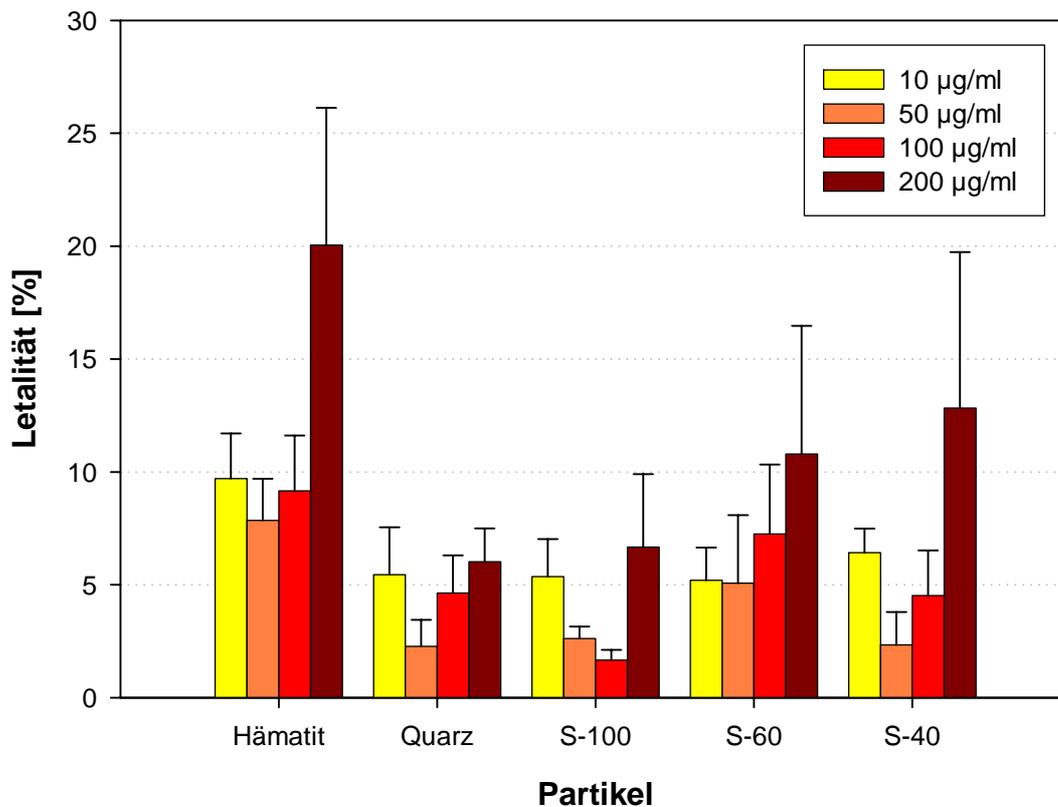


**Abb. 4.15: LDH-Aktivität im Überstand von THP-1-Zellen nach 24 Stunden Exposition mit verschiedenen Partikeln**

THP-1-Zellen wurden mit Hämatit, Quarz und Silicasol-Partikeln in den Konzentrationen 10, 50, 100 und 200  $\mu\text{g/ml}$  inkubiert. Das Ergebnis zeigt die LDH-Aktivität im Überstand der Zellen 24 Stunden nach Behandlungsbeginn an (Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 4$ ).

Im Gegensatz dazu reagierten Mono Mac 6 Zellen auf eine Behandlung mit ultrafeinen Partikeln nicht empfindlich. Die Sensitivität gegenüber den toxischen Quarz-Partikeln war die geringste im Vergleich zu allen anderen getesteten Zelllinien und war sogar in den höchsten

Konzentrationen bemerkenswert schwach. Dagegen zeigten die ultrafeinen Partikel wie Hämatit-, S-60- und S40-Partikel deutliche zytotoxische Wirkungen (Abb. 4.16).



**Abb. 4.16: LDH-Aktivität im Überstand von Mono Mac 6-Zellen nach 24 Stunden Exposition mit verschiedenen Partikeln**

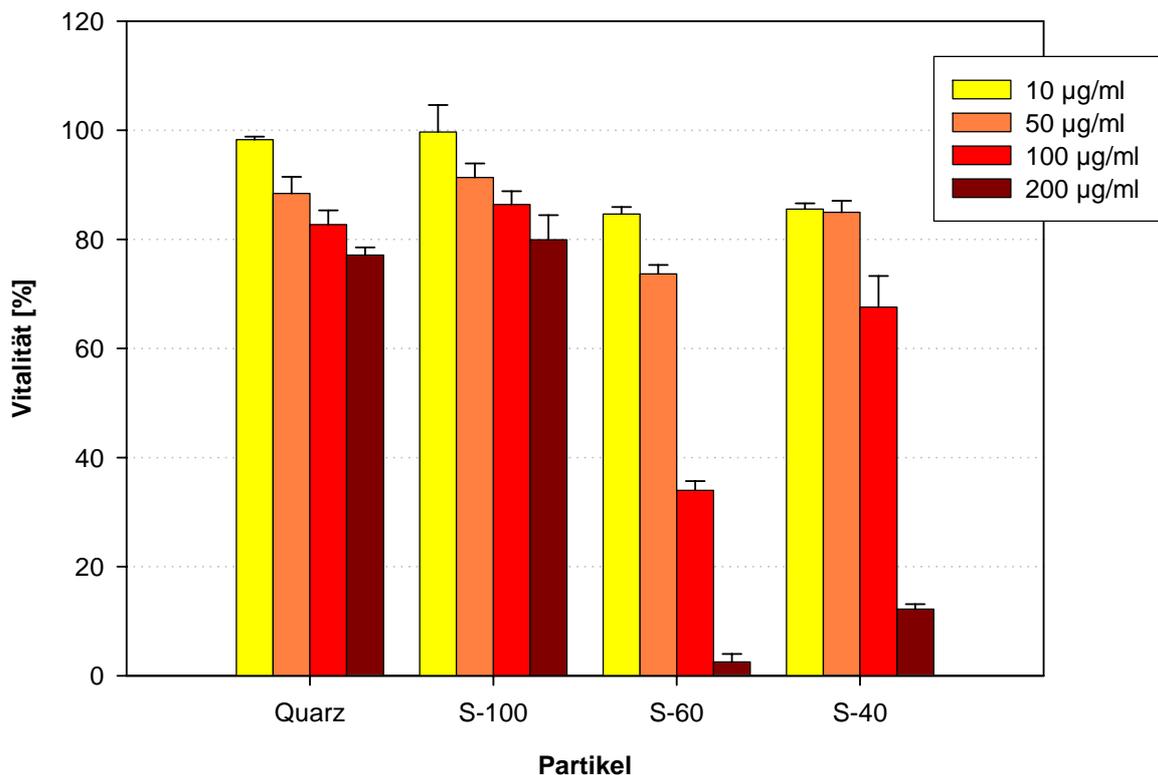
Mono Mac 6-Zellen wurden mit Hämatit, Quarz und Silicasol-Partikeln in den Konzentrationen 10, 50, 100 und 200 µg/ml inkubiert. Das Ergebnis zeigt die LDH-Aktivität im Überstand der Zellen 24 Stunden nach Behandlungsbeginn (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 4).

#### **4.1.5 Einfluss verschiedener Partikel auf die Vitalität - MTT-Assay**

Beim MTT-Assay handelt es sich um einen kolorimetrischen Test, der auf einer Reduktion des gelben Tetrazoliumsalses 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromid (MTT) zu lila Formazankristallen durch mitochondriale Dehydrogenasen beruht. Die Absorption des entstandenen Formazans wird spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 550 nm bestimmt. Die Aktivität der Dehydrogenasen ist ein Maß für eine vorhandene mitochondriale Aktivität und dient zur Bestimmung der Vitalität der Zellen (Mosmann, 1983).

Für die Versuche wurden die Zellen aus den LDH-Experimenten verwendet (Siehe 4.1.4). Während der Überstand über den Zellen zur Bestimmung der LDH-Aktivität verwendet werden konnte, wurden die Zellen mit MTT-Medium überschichtet. Nach zwei Stunden Inkuba-

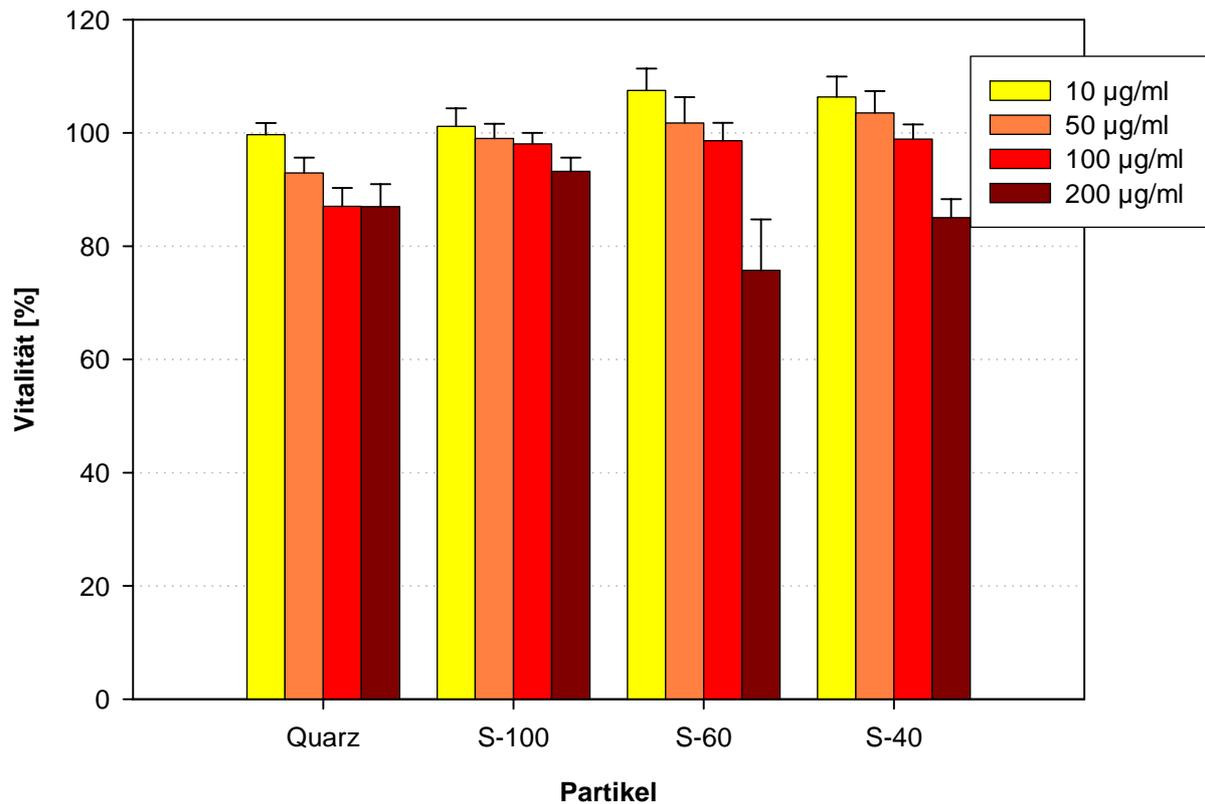
tion im Brutschrank wurde 20 % SDS in 0,02 M Salzsäure zugegeben und über Nacht inkubiert. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 550 nm mit einem Absorptions-Reader (VersaMax, Molecular Devices). Der MTT-Assay kann aufgrund ihrer Färbung nicht nach Inkubation der Zellen mit Hämatit-Partikeln durchgeführt werden. Die Anwesenheit von Hämatit führte zu sehr hohen Absorptionen bei der für Formazan wichtigen Wellenlänge von 550 nm.. Der MTT-Test bestätigte die mit dem LDH-Assay gemessenen Resultate. BEAS-2B-Zellen reagierten sensitiv auf die ultrafeinen Partikel S-60 und S-40. Die Vitalität fiel schon bei einer Konzentration von 10 µg/ml auf einen Anteil von 85 % der Kontrolle ab. Dabei zeigte eine Konzentrationserhöhung bei den S-60-Partikeln eine stärkere Abnahme der Vitalität als bei den S-40-Partikeln. In der höchsten verwendeten Konzentration von 200 µg/ml sank die Vitalität bei S-40-Partikeln auf unter 15 %, bei S-60-Partikeln sogar auf unter 5 %. Die Wirkungen von Quarz und S-100-Partikeln waren miteinander vergleichbar. Bei einer Konzentration von 50 µg/ml verringerte sich die Vitalität auf ungefähr 90 %, bei der höchsten Konzentration von 200 µg/ml auf 80 % der Kontrolle (Abb. 4.17).



**Abb. 4.17: Mitochondriale Aktivität von BEAS-2B-Zellen nach 24 Stunden Exposition mit Modellpartikeln (MTT-Test)**

BEAS-2B-Zellen wurden mit Quarz und Silicasol-Partikeln in den Konzentrationen 10, 50, 100 und 200 µg/ml inkubiert. Das Ergebnis zeigt die mitochondriale Aktivität der Zellen 24 Stunden nach Behandlungsbeginn (Mittelwerte ± SEM, n = 5)

Im Gegensatz zu den BEAS-2B- (Abb. 4.17) und den ECV304-Zellen (Abb. 4.19) verringerte sich die Vitalität der A549-Zellen nach Behandlung mit Partikeln nicht um mehr als 25 %. Bemerkenswert war die Erhöhung der mitochondrialen Aktivität nach der Inkubation mit den ultrafeinen Partikeln S-60 und S-40 in den Konzentrationen von 10 und 50  $\mu\text{g/ml}$ . In der höchsten Konzentration von 200  $\mu\text{g/ml}$  zeigte die Behandlung eine Verringerung auf 80 % der Kontrolle (Abb. 4.18).



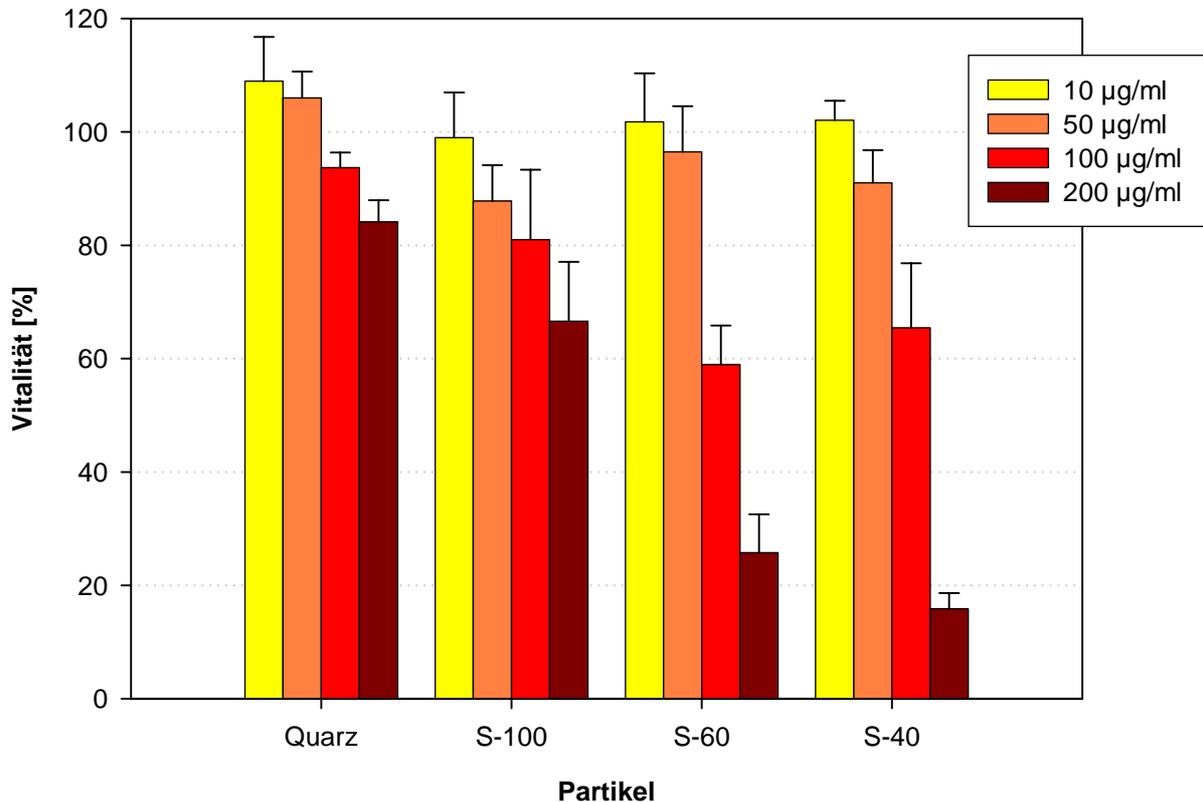
**Abb. 4.18: Mitochondriale Aktivität von A549-Zellen nach 24 Stunden Exposition mit verschiedenen Partikeln (MTT-Test)**

A549-Zellen wurden mit Quarz und Silicasol-Partikeln in den Konzentrationen 10, 50, 100 und 200  $\mu\text{g/ml}$  inkubiert. Das Ergebnis zeigt die mitochondriale Aktivität der Zellen 24 Stunden nach Behandlungsbeginn (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 8)

Die Vitalitätsmessung bei ECV304-Zellen nach einer Behandlung mit Partikeln ergab eine höhere Empfindlichkeit im Vergleich zu allen anderen Zelllinien. Auch hier fiel ähnlich wie bei den A549-Zellen eine leichte Erhöhung der mitochondrialen Aktivität nach Inkubation mit 10  $\mu\text{g/ml}$  Quarz-Partikeln auf. Nach Behandlung mit den ultrafeinen Partikeln war ein deutlicher Effekt nachzuweisen. In Konzentrationen von 100 und 200  $\mu\text{g/ml}$  der S-60 Partikel wur-

de die Vitalität auf 59 % und 24 %, bei der Verwendung von S-40 auf 67 % und 18 % verringert (Abb. 4.19).

Die MTT-Messungen mit den Makrophagenzelllinien THP-1 und Mono Mac 6 ergaben auch nach mehrfacher Wiederholung keine konsistenten Ergebnisse.



**Abb. 4.19: Mitochondriale Aktivität von ECV304-Zellen nach 24 Stunden Exposition mit verschiedenen Partikeln (MTT-Test)**

ECV304-Zellen wurden mit Quarz und Silicasol-Partikeln in den Konzentrationen 10, 50, 100 und 200 µg/ml inkubiert. Das Ergebnis zeigt die mitochondriale Aktivität der Zellen 24 Stunden nach der Behandlungsbeginn an (Mittelwerte ± SEM, n = 7)

#### **4.1.6 Zeitverlauf der Zytotoxizität von Modellpartikeln - Sytox Green®-Assay**

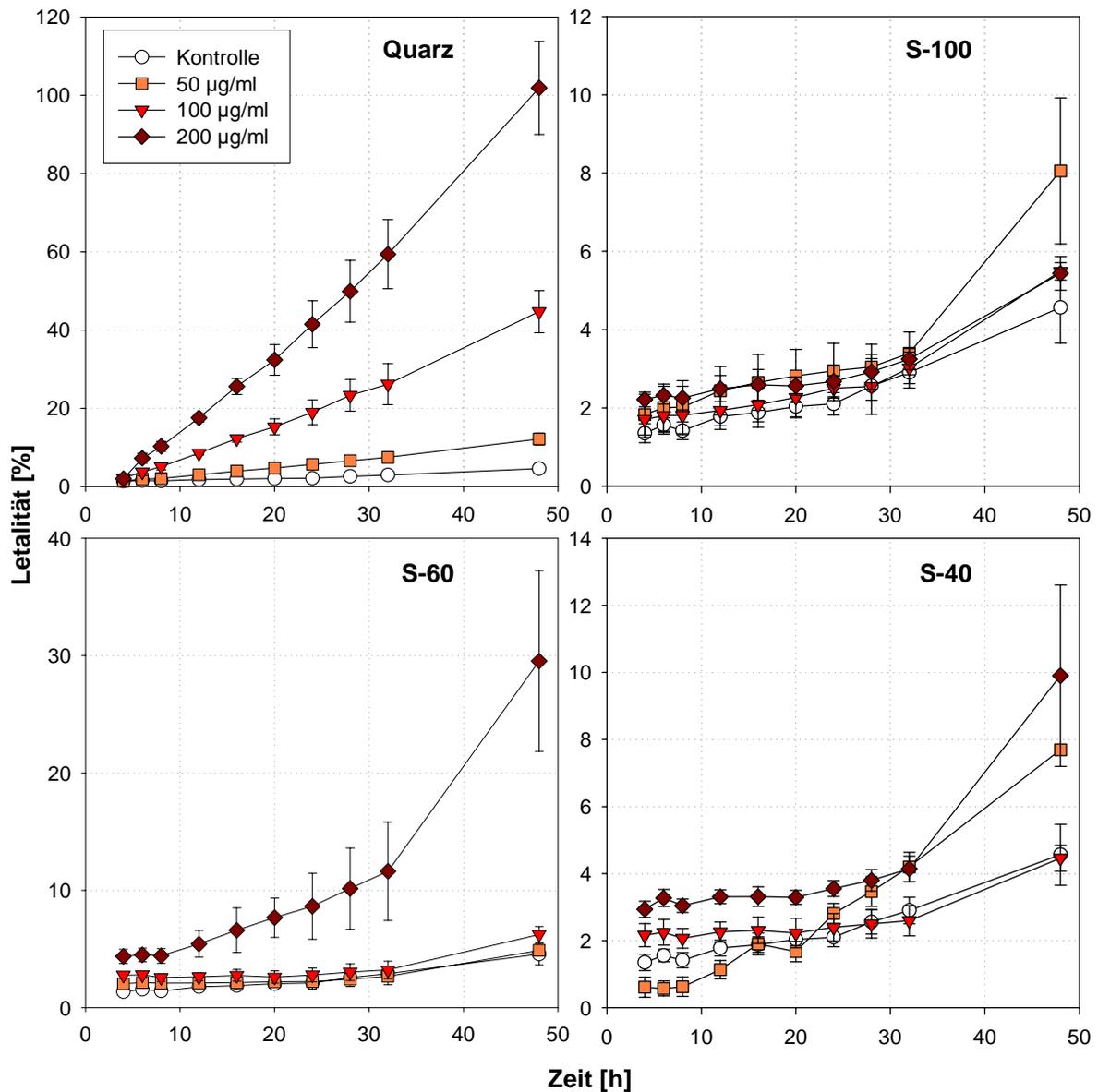
Der Farbstoff Sytox Green® (Molecular Probes, Leiden) fluoresziert nach Interkalierung mit DNA bei einer Anregung mit Licht von einer Wellenlänge von 485 nm. Die Fluoreszenzintensität wird bei 530 nm Wellenlänge quantifiziert. Die Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der zytotoxischen Wirkung von Modellpartikeln mit Sytox Green® erfolgte nach einem ähnlichen Funktionsprinzip wie es beim LDH-Assay als Zytotoxizitätstest genutzt wurde. Wenn die Zellen die Integrität ihrer Zellmembran verlieren, kann der Farbstoff in die Zellen eindrin-

gen und die Zellen beginnen zu fluoreszieren. Die Messung der Fluoreszenz der Zellen ist daher ein Maß für die Zytotoxizität von Agenzien. Ein Vorteil gegenüber dem LDH-Assay war die Möglichkeit der kontinuierlichen Messung der selben Zellen über die Zeit. Dies ist möglich, da Sytox Green<sup>®</sup> über mehrere Tage hinweg auch unter Brutschrankbedingungen stabil bleibt. Auf diese Weise konnten genaue Zeitverlaufskurven der zytotoxischen Wirkung gemessen werden.

Dazu wurden 20000 A549- und ECV304-Zellen pro Well in 96-Well-Platten ausgesät, die über Nacht zu einer konfluenten Zellschicht wuchsen. Die THP-1 Zellen wurden ebenfalls in einer Dichte von 20000 Zellen pro Well ausgesät, jedoch über 2 Tage mit 8 nM TPA zu Makrophagen differenziert. Zu Beginn des Experiments wurden die Zellen mit den entsprechenden Partikelkonzentrationen und 100 nM Sytox<sup>®</sup> Green versetzt. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte über einen Zeitraum von 48-Stunden nach Zugabe der Partikel zu den Zellen. Wie beim MTT-Assay konnten die Hämatit-Partikel aufgrund ihrer intensiven roten Färbung nicht in diesem Versuch eingesetzt werden. Das emittierte Licht mit einer Wellenlänge von 530 nm wird von den Hämatit-Partikeln absorbiert und führt zur Verfälschung von Messwerten. Je höher die Konzentration der Hämatit-Partikel während der Inkubation, desto niedriger liegen zumeist die Messwerte. Wie schon beim MTT-Assay wurden Quarz und Silicasol-Partikel eingesetzt.

Die A549-Zellen zeigten bei der Behandlung mit Quarz-Partikeln einen linearen Anstieg des Anteils an toten Zellen über der Zeit. Dieser Anstieg ist direkt von der Konzentration abhängig. Bei der höchsten Konzentration von 200 µg/ml wird nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden die Höchstmarke toter Zellen erreicht. Die Kurve gibt eine fast lineare Dosis-Wirkungsbeziehung wieder (Abb. 4.20, Quarz). Die Silicasol-Partikel wirken in diesem Versuch weit weniger toxisch. In diesem Zusammenhang ist unbedingt die unterschiedliche Skalierung der Y-Achse in den Abbildungen zu beachten, die zwar eine erschwerte Vergleichbarkeit der Wirkungen auf den ersten Blick, dafür aber eine differenziertere Betrachtung der Wirkung der unterschiedlichen Partikel erlaubt (Abb. 4.20, Abb. 4.21 und Abb. 4.22). Die Kontrolle steigt im Laufe der 48 Stunden leicht von 2 % auf 4 % tote Zellen an. Die S-100- und S-40-Partikel scheinen für die A549-Zellen in diesem Experiment untoxisch zu sein. Nur in der höchsten Konzentration von 200 µg/ml steigt der Anteil toter Zellen auf 8 %. Der Höchstwert der Y-Achse beträgt 12 % im Vergleich zur 10fach höheren Skalierung der Y-Achse bei den Quarz-Partikeln (Abb. 4.20, S-100, S-40). Dagegen zeigten die S-60-Partikel in der Konzentration von 200 µg/ml eine stärkere Wirkung, während die Konzentrationen 50 und 100 µg/ml in diesem Assay keine toxischen Effekte erkennen lassen. Zwischen

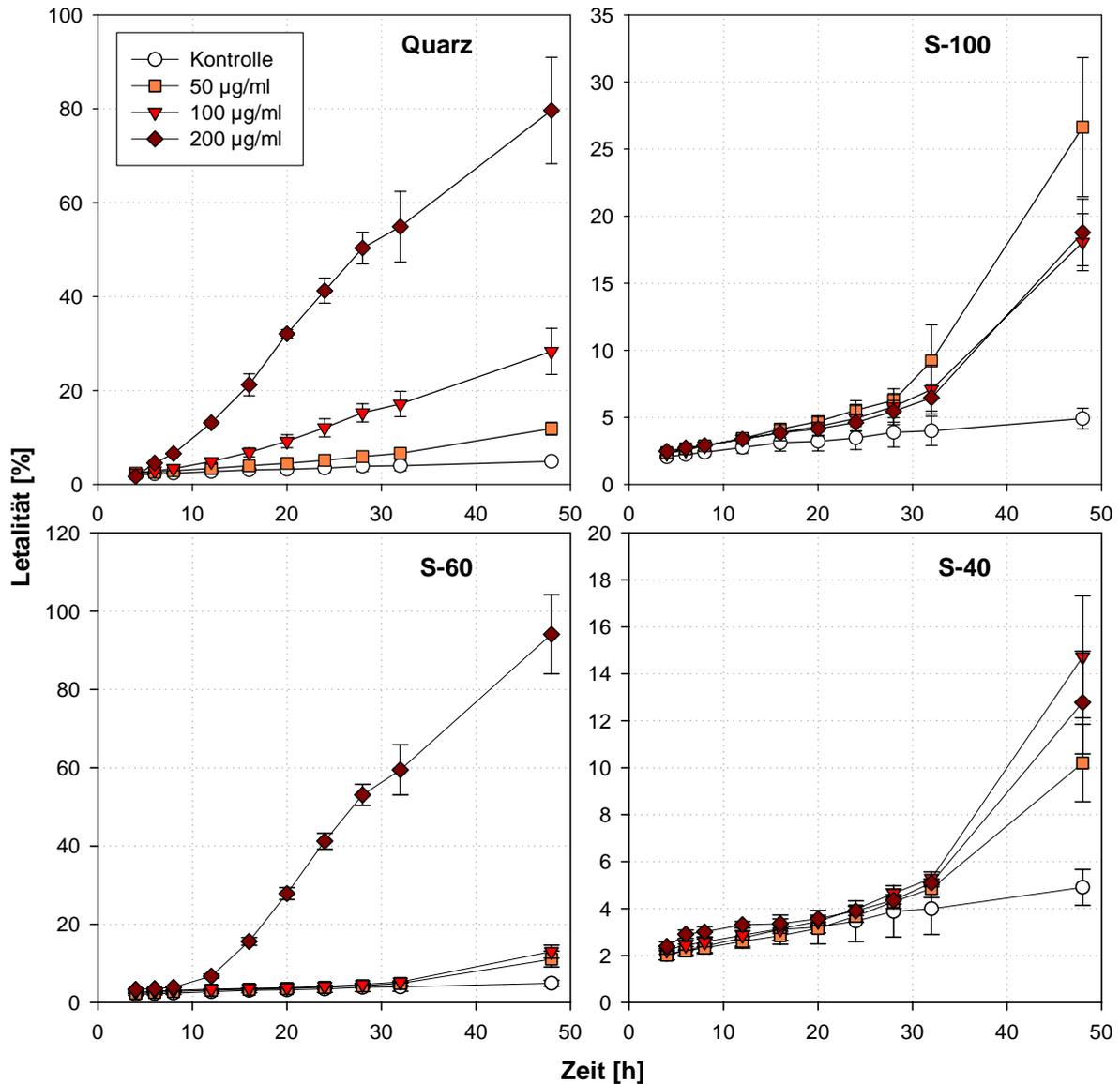
100 und 200 µg/ml liegt demnach ein Schwellenwert zur toxischen Wirkung (Abb. 4.20, S-60).



**Abb. 4.20: Zeitverlauf der zytotoxischen Wirkung auf A549-Zellen nach Exposition mit verschiedenen Partikeln (Sytox® Green Assay)**

A549-Zellen wurden für 48 Stunden mit Quarz- und Silicasol-Partikeln inkubiert und die Zytotoxizität zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Während die Quarz-Partikel sehr toxisch wirkten, blieben S-100- und S-40-Partikel im subtoxischen Konzentrationsbereich. Bei den S-60-Partikeln wird bei einer Konzentration über 100 µg/ml ein Schwellenwert zur Toxizität überschritten. Die unterschiedliche Skalierung der Y-Achse ist zu beachten. (Mittelwerte ± SEM, n = 4)

Die Wirkung der Quarz-Partikel auf die ECV304-Zellen zeigte, ähnlich wie bei den A549-Zellen, eine lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung. In der höchsten Konzentration von 200 µg/ml war nach 48 Stunden ein Anteil von 80 % der Zellen abgetötet (Abb. 4.21, Quarz).



**Abb. 4.21: Zeitverlauf der zytotoxischen Wirkung auf ECV304-Zellen nach Exposition mit verschiedenen Partikeln (Sytox® Green Assay)**

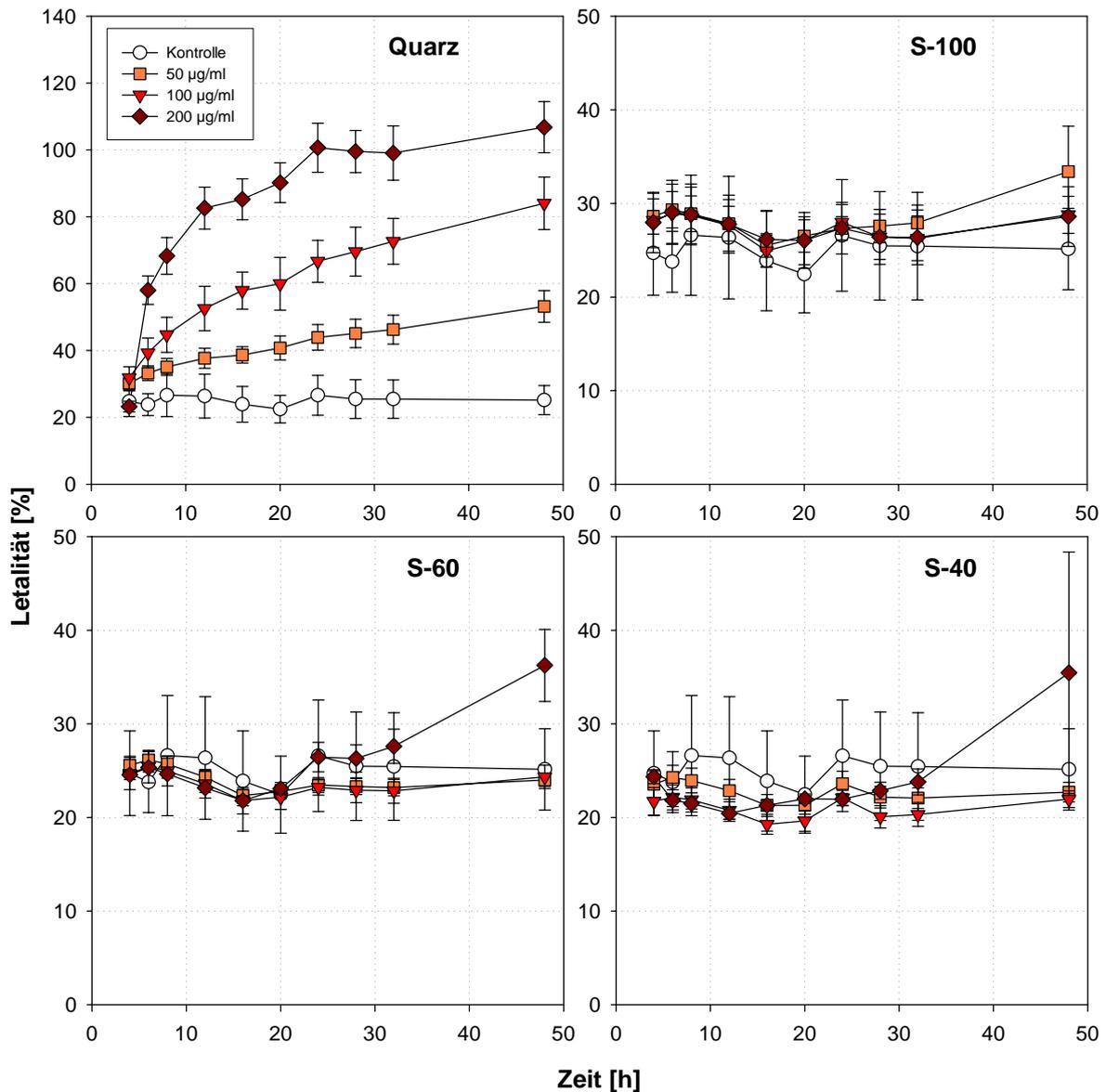
ECV304-Zellen wurden für 48 Stunden mit Quarz- und Silicasol-Partikeln inkubiert und die Zytotoxizität zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Quarz-Partikel wirkten toxisch, dagegen bleiben S-100 und S-40 Partikel im subtoxischen Konzentrationsbereich. Bei den S-60 Partikeln wird bei einer Konzentration über 100 µg/ml ein Schwellenwert zur Toxizität überschritten. Man beachte die unterschiedliche Skalierung der Y-Achse. (Mittelwerte ± SEM, n = 4)

Wiederum konnte mit den S-100- und S-40-Partikeln nur eine geringere Zytotoxizität festgestellt werden. Auffallend ist die Zunahme des Anteils toter Zellen nach 32 Stunden Inkubationszeit (Abb. 4.21, S-100, S-40).

Auffallend war zudem die hohe zytotoxische Wirkung von S-60-Partikeln in der höchsten Konzentration von 200 µg/ml auf die ECV304-Zellen, während die niedrigeren Konzentrationen ein mit den S-100- und S-40-Partikeln vergleichbares Ergebnis lieferten. Wiederum ähnlich wie bei den A549-Zellen, schien zwischen den Konzentrationen 100 und 200 µg/ml ein Wirkungsschwellenwert zu existieren (Abb. 4.21, S-60).

THP-1-Zellen, die über 2 Tage hinweg mit 8 nM TPA zu Makrophagen differenziert wurden, zeigten eine andere Reaktion auf die Partikelbehandlung, als die adärenten Zelllinien A549 und ECV304. Der Anteil toter Zellen in der Negativkontrolle war mit ungefähr 25 % weit höher. Zudem waren die Schwankungen in den Messwerten deutlich ausgeprägter, wie aus den Standardfehlern in den Grafiken zu erkennen ist (Abb. 4.22). Dennoch war eine Dosis-Wirkungs-Beziehung der zytotoxischen Wirkung bei den Quarz-Partikeln zu erkennen. Dabei wirkten die Partikel schneller als bei den anderen Zelllinien. Bei einer Konzentration von 200 µg/ml sind bereits nach 24 Stunden alle Zellen abgetötet (Abb. 4.22, Quarz).

Die Behandlung mit Silicasol-Partikeln zeigte dagegen keinen zytotoxischen Effekt auf die THP-1-Zellen. Bei den S-60- und S-40-Partikeln war lediglich in der höchsten Konzentration nach 32 Stunden Einwirkdauer ein Anstieg des Anteils toter Zellen zu vermerken.



**Abb. 4.22: Zeitverlauf der zytotoxischen Wirkung auf THP-1-Zellen nach Exposition mit verschiedenen Partikeln (Sytox® Green Assay)**

Mit 8 nM TPA über 2 Tage zu Makrophagen differenzierte THP-1-Zellen wurden für 48 Stunden mit Quarz- und Silicasol-Partikeln inkubiert und die zytotoxischen Wirkungen zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Der Anteil von 25 % toter Zellen in der Kontrolle war im Vergleich zu den anderen Zelllinien sehr hoch. Die Quarz-Partikel wirkten sehr toxisch. Der Anteil toter Zellen nach Behandlung mit S-100-, S-60- und S-40-Partikel dagegen war erst nach 32 Stunden höher als in der Kontrolle. Man beachte die unterschiedliche Skalierung der Y-Achse (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 4).

#### 4.1.7 Apoptose

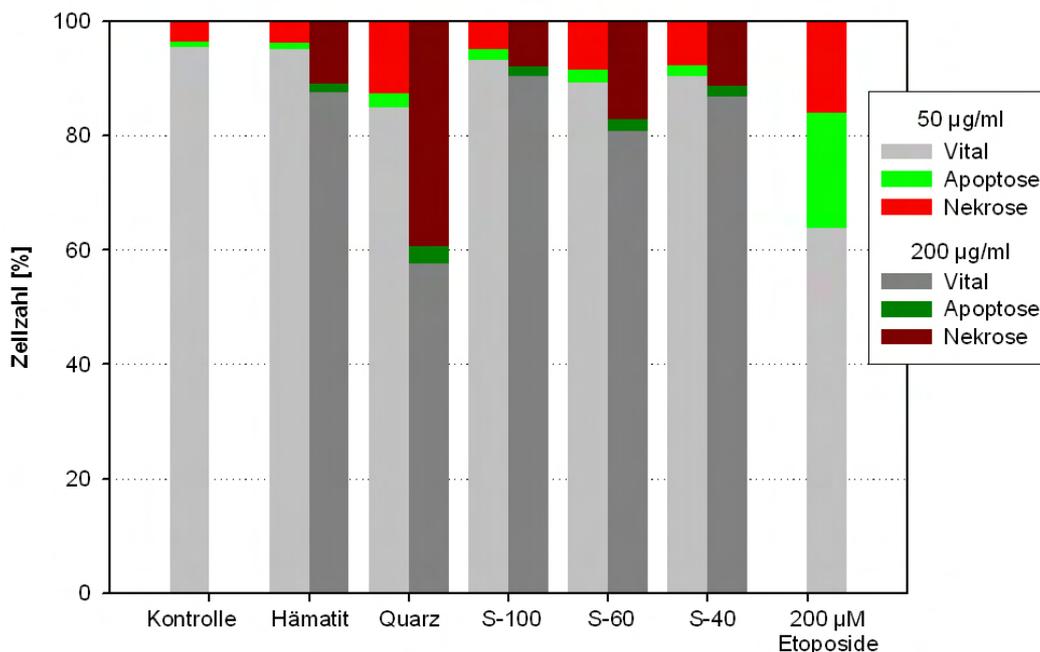
Für die weiteren Kokulturversuche wurden die A549-Zellen als Epithelzelllinie ausgewählt. Die vorangegangenen Versuche hatten gezeigt, dass A549-Zellen für Langzeitkulturen gut

geignete, unempfindliche und leicht zu handhabende Zellen sind, während die BEAS-2B-Zellen eine höhere Empfindlichkeit gegenüber der Behandlung mit Partikeln und eine schwierigere Handhabung aufwiesen.

Nachdem bereits gezeigt wurde, dass Partikel in Zellen aufgenommen wurden und einen massiven zytotoxischen Effekt auf die Zellen bewirken können, sollte überprüft werden, inwieweit dieser Effekt auf einem apoptotischen oder nekrotischen Mechanismus beruht.

Dazu wurden A549-Zellen für 24 Stunden mit Hämatit-, Quarz- und Silicasol-Partikeln in den Konzentrationen 50 und 200 µg/ml behandelt. Danach wurden die Zellen durch Trypsinieren geerntet und mit Annexin-V-FITC und Propidiumjodid gefärbt. Die Auswertung erfolgte wie schon auf Seite 42 und in Abb. 4.1 beschrieben.

Der Anzahl an toten Zellen glich dem schon in den vorangegangenen Zytotoxizitätstests ermittelten Werten (siehe Seite 53). Der Anteil apoptotischer Zellen war dabei gering. Selbst bei einer Inkubation mit 200 µg/ml Quarz-Partikel, die über 40 % der Zellen abtötete, war der Anteil der apoptotischen Zellen nicht größer als 4 %. Die ultrafeinen Hämatit- und Silicasol-Partikel lösten ebenfalls keine Apoptose aus, während die Inkubation mit 200 µM Etoposid bei 25 % der Zellen zur Apoptose führte.



**Abb. 4.23: Partikel-induzierte Apoptose bei A549-Zellen**

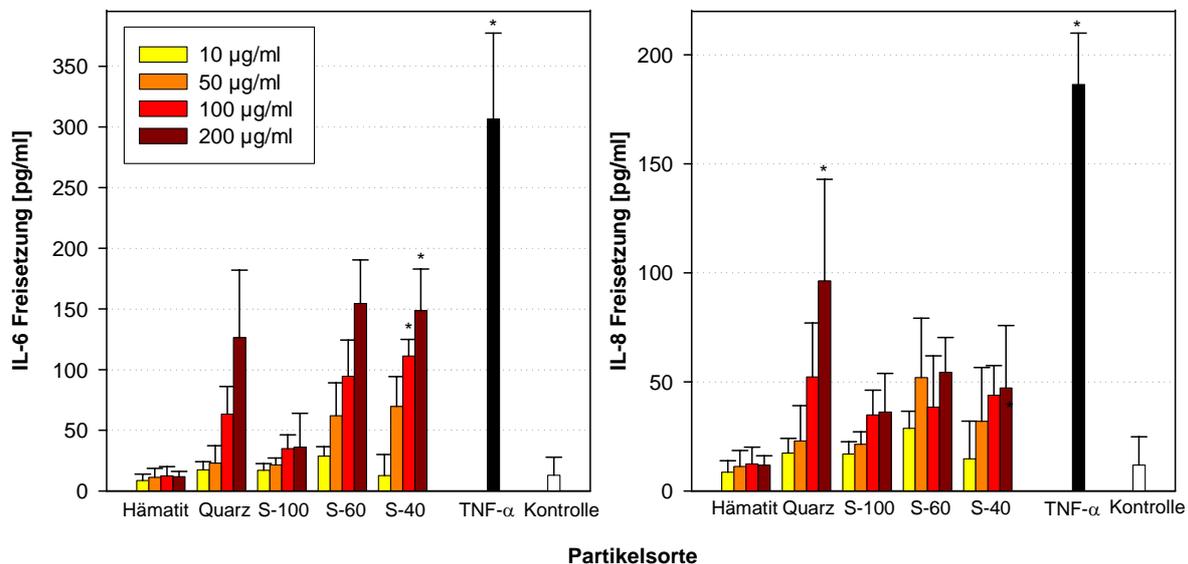
A549-Zellen wurden mit Hämatit-, Quarz- und Silicasol-Partikeln behandelt und der Anteil apoptotischer Zellen nach Annexin-V-FITC-Färbung im Durchflusszytometer bestimmt. Die Apoptose konnte nicht durch eine Behandlung mit Partikeln induziert werden (Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten).

#### 4.1.8 Freisetzung von Interleukin 6 und Interleukin 8 durch Partikeleinwirkung

Sowohl Makrophagen als auch Epithelzellen bilden und sezernieren nach Exposition mit Partikeln eine Vielzahl von Entzündungsmediatoren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Freisetzung der Interleukine IL-6 und IL-8 der Zellen nach Inkubation mit Partikeln bestimmt.

Dazu wurden 20000 Zellen pro Well in 96-Well-Platten ausgesät. Nach 24 Stunden konnte im Lichtmikroskop eine konfluente Zellschicht beobachtet werden. Die THP-1-Zellen wurden für 48 Stunden mit 8 nM TPA zu Makrophagen differenziert. Zur Ermittlung der partikelinduzierten Interleukinfreisetzung wurden die Zellen für 24 Stunden mit den Modellpartikeln in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Als Positivkontrolle wurde TNF- $\alpha$  in einer Konzentration von 2 ng/ml eingesetzt. Anschließend wurde die Zytokin-Freisetzung im Überstand über den Zellen mittels ELISA bestimmt. Die Behandlung mit 2 ng/ml TNF- $\alpha$  führte bei allen Zellen zu einer signifikant erhöhten Freisetzung von IL-6 und IL-8 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Bei den BEAS-2B-Zellen konnte durch die Behandlung mit Hämatit-Partikeln keine Interleukin-Freisetzung induziert werden. Dagegen löste die Behandlung mit Quarz- und den kleineren S-60- und S-40-Partikeln einen deutlichen konzentrationsabhängigen Anstieg des Interleukin-Spiegels im Medium aus. Die gemessenen IL-6-Konzentrationen nach Behandlung mit



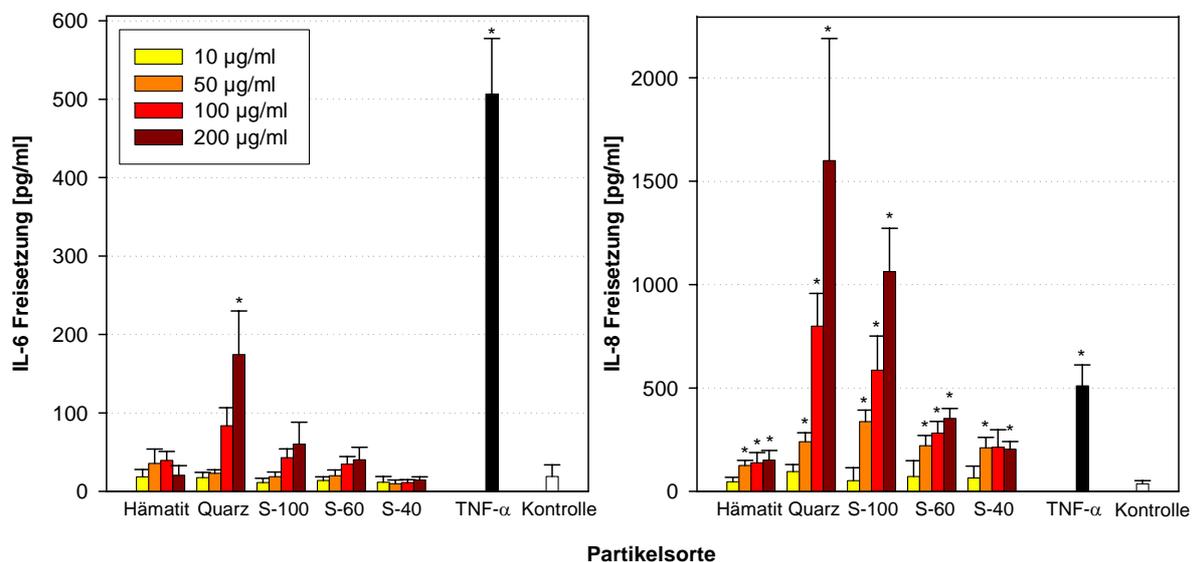
**Abb. 4.24: Freisetzung von IL-6 und IL-8 aus BEAS-2B-Zellen nach 24 Stunden Exposition mit verschiedenen Partikeln**

BEAS-2B-Zellen wurden für 24 Stunden mit unterschiedlichen im Medium resuspendierten Partikeln (Hämatit, Quarz, Silicasol) inkubiert. Als Positivkontrolle wurde 2 ng/ml TNF- $\alpha$  verwendet (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 3, \* P < 0,05 beim Student t-test).

200 µg/ml Quarz-, S-60- und S-40-Partikeln liegen im Bereich von 150 pg/ml und fallen im Vergleich höher aus als die IL-8-Werte. Hier werden bei der Inkubation mit 200 µg/ml Quarz-Partikel lediglich 100 pg/ml, mit den ultrafeinen S-60 und S-40-Partikeln 60 und 50 pg/ml sezerniert. Im Vergleich zu den anderen Zelllinien setzen BEAS-2B-Zellen wenig IL-6 und IL-8 frei. Mit allen verwendeten Partikeln, bis auf die Hämatit-Partikel, war eine Konzentrationsabhängigkeit bei der Interleukinfreisetzung zu erkennen (Abb. 4.24.).

Die Inkubation von A549-Zellen mit den Suspensionen der Modellpartikel löste keine starke IL-6-Freisetzung ins Medium aus. Während die Behandlung mit 2 ng/ml TNF-α zu einer Freisetzung von 506 pg/ml führte, zeigten ultrafeinen Hämatit-, S-100-, S-60- und S-40-Partikeln nur eine geringe Wirkung. Bei den S-40-Partikeln war keine konzentrationsabhängige Steigerung der IL-6-Produktion zu erkennen. Lediglich bei der Behandlung mit Quarz-Partikeln konnte eine signifikante Steigerung der IL-6-Ausschüttung von 174 pg/ml festgestellt werden (Abb. 4.25, links).

Im Gegensatz dazu führte die Stimulation mit Partikeln zu beinahe dramatischen Freisetzungen von IL-8. Die Behandlung mit 2 ng/ml TNF-α führte zur Produktion von 510 pg/ml IL-8, die Behandlung mit 100 und 200 µg/ml Quarz übertraf diese Wirkung bei weitem mit Werten von 1063 und 1600 pg/ml IL-8 im Medium. Insgesamt zeigten die meisten Messun



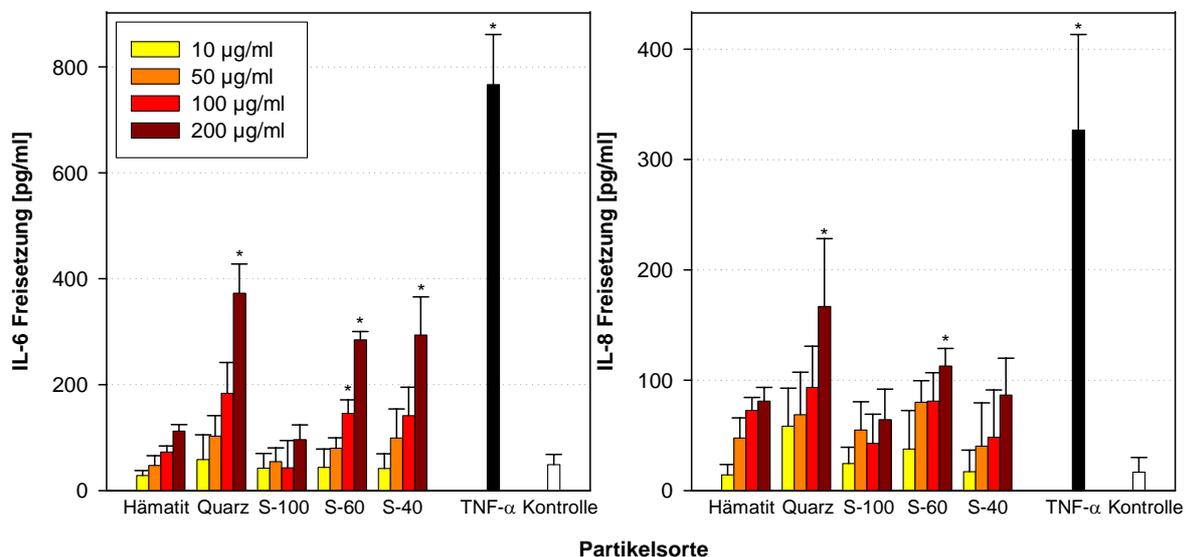
**Abb. 4.25: Freisetzung von IL-6 und IL-8 aus A549-Zellen nach 24 Stunden Exposition mit verschiedenen Partikeln**

A549-Zellen wurden für 24 Stunden mit unterschiedlichen im Medium resuspendierten Partikeln (Hämatit, Quarz, Silicasol) inkubiert. Als Positivkontrolle wurde 2 ng/ml TNF-α verwendet (Mittelwerte ± SEM, n = 5, \* P < 0,05 beim Student *t*-test).

gen eine signifikante Erhöhung der IL-8-Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle. Nach Behandlung mit den größeren Quarz- und S-100-Partikeln konnten dabei die höchsten IL-8-Konzentrationen nachgewiesen werden (Abb. 4.25 rechts).

Bei den ECV304-Zellen führte die Inkubation mit den Partikeln zu einer verstärkten Ausschüttung von IL-6. Die Inkubation mit 2 ng/ml TNF- $\alpha$  setzte 767 pg/ml IL-6 frei. Die Behandlung mit den ultrafeinen S-60-Partikeln in den Konzentrationen 100 und 200  $\mu\text{g/ml}$  und S-40-Partikeln in der Konzentration von 200  $\mu\text{g/ml}$  erhöhte die IL-6-Freisetzung signifikant im Vergleich zur Kontrolle. Quarz-Partikel in der Konzentration von 200  $\mu\text{g/ml}$  führten zur Sekretion der höchsten IL-6-Ausschüttung von 372 pg/ml (Abb. 4.26, rechts).

Die Freisetzung von IL-8 fiel vergleichsweise geringer aus als die IL-6-Produktion. Die Behandlung mit TNF- $\alpha$  führte zu einer Konzentration von 326 pg/ml IL-8 im Medium. Nur Quarz- und S-60-Partikel in der Konzentration von 200  $\mu\text{g/ml}$  stimulierten die Zellen zu einer gegenüber der Kontrolle signifikant erhöhten Produktion von 166 bzw. 112  $\mu\text{g/ml}$  IL-8 (Abb. 4.26, rechts). Alle Partikelbehandlungen der ECV304-Zellen führten zu konzentrationsabhängigen Interleukinfreisetzungen.

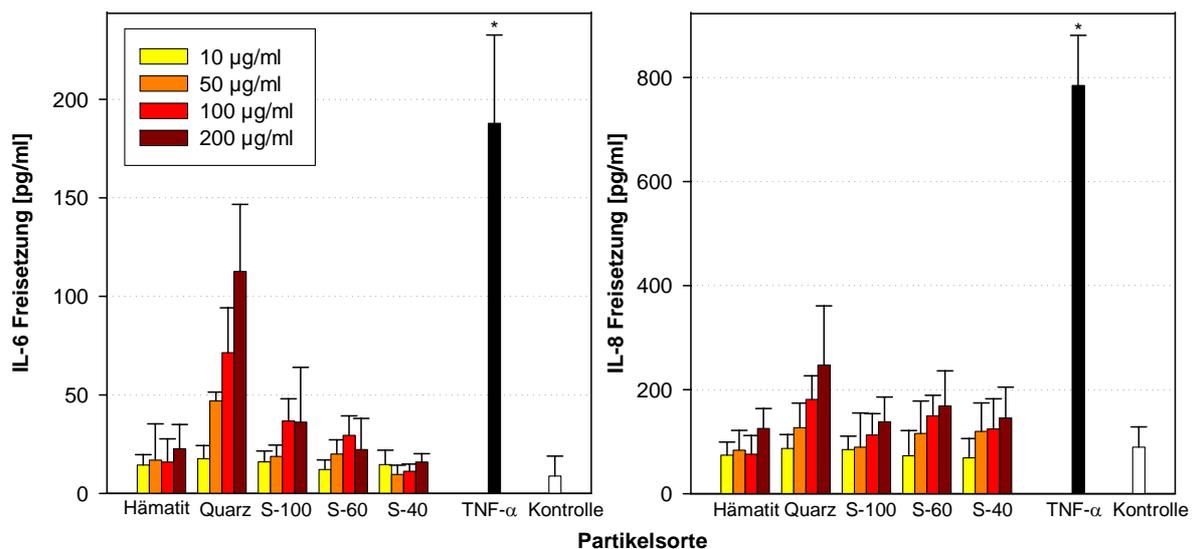


**Abb. 4.26: Freisetzung von IL-6 und IL-8 aus ECV304-Zellen nach 24 Stunden Exposition mit verschiedenen Partikeln**

ECV304-Zellen wurden für 24 Stunden mit unterschiedlichen im Medium resuspendierten Partikeln (Hämatit, Quarz, Silicasol) inkubiert. Als Positivkontrolle wurde 2 ng/ml TNF- $\alpha$  verwendet (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 4, \* P < 0,05 beim Student t-test).

Die THP-1-Zellen wurden vor der Stimulation mit den Partikelsuspensionen mit 8 nM TPA über 48 Stunden zu Makrophagen differenziert. Die anschließende Behandlung mit TNF- $\alpha$  führte zur Produktion von 188 pg/ml IL-6, im Vergleich zu den anderen Zelllinien die geringste IL-6-Ausschüttung. Die Inkubation mit den Partikeln führte nicht zu im Vergleich zur Kontrolle signifikanten Erhöhungen der IL-6 Freisetzung. Jedoch konnte durch die Behandlung mit Quarz-Partikeln eine konzentrationsabhängige Steigerung der Freisetzung bis auf 113 pg/ml IL-6 bei 200  $\mu$ g/ml in das Medium beobachtet werden (Abb. 4.27, links).

Der IL-8-Messwert der Kontrolle lag mit 90 pg/ml höher als die Kontrollen der Epithel- und Endothelzellen. Durch die Behandlung mit TNF- $\alpha$  wurden 785 pg/ml IL-8 ausgeschüttet. Die IL-8-Messwerte konnten durch die Inkubation mit Partikeln nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle erhöht werden, doch zeigte sich eine leichte konzentrationsabhängige Steigerung der IL-8-Ausschüttung bei allen eingesetzten Partikeln (Abb. 4.27, rechts).



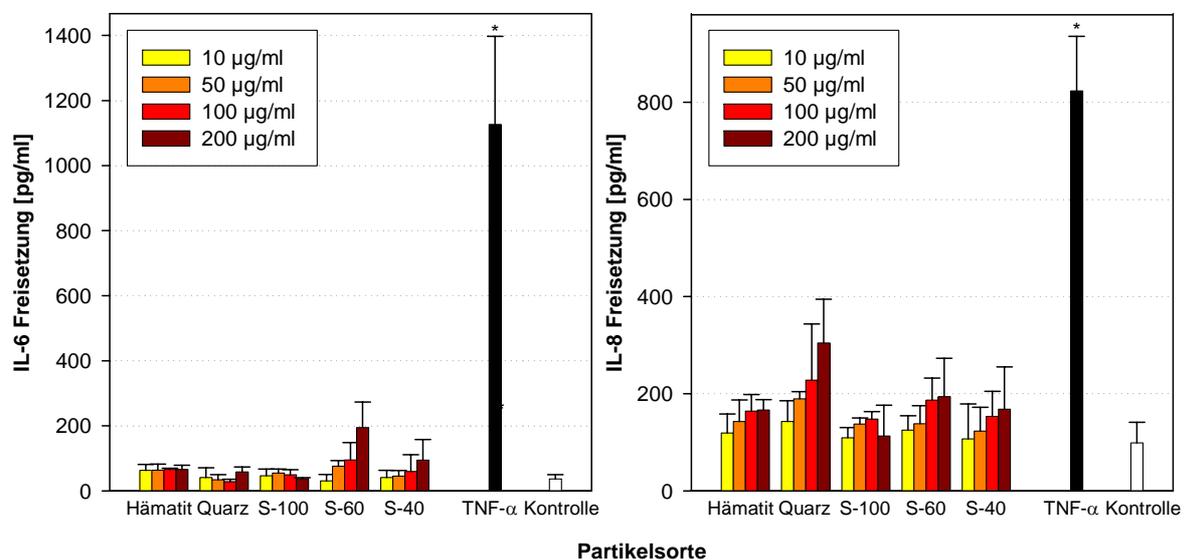
**Abb. 4.27: Freisetzung von IL-6 und IL-8 aus differenzierten THP-1-Zellen nach 24 Stunden Exposition mit verschiedenen Partikeln**

THP-1-Zellen wurden für 48 Stunden mit 8 nM TPA zu Makrophagen differenziert und anschließend für 24 Stunden mit unterschiedlichen im Medium resuspendierten Partikeln (Hämatit, Quarz, Silicasol) inkubiert. Als Positivkontrolle wurde 2 ng/ml TNF- $\alpha$  verwendet (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 4, \* P < 0,05 beim Student *t*-test).

Die Behandlung von den Mono Mac 6-Zellen mit 2 ng/ml TNF- $\alpha$  führte zur Sekretion von 1127 pg/ml IL-6. Bei der Inkubation mit Partikelsuspensionen konnte kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden. Allein die S-60 und in geringerem Maße auch die

S-40-Partikel bewirkten eine konzentrationsabhängige IL-6-Freisetzung. Die Mono Mac 6-Zellen zeigten von allen Zelllinien die geringste IL-Freisetzung als Reaktion auf die Behandlung mit Partikeln (Abb. 4.28, links).

Die Mono Mac 6-Zellen sezernierten in der Kontrolle, ähnlich wie die THP-1-Zellen eine im Vergleich zu den Epithel- und Endothelzellen relativ hohe Konzentration an IL-8. Bei allen Partikelsuspensionen war eine konzentrationsabhängige Freisetzung von IL-8 zu erkennen, wobei Quarz-Partikel die stärkste Wirkung zeigten. Im Vergleich zur Kontrolle unterschied sich kein partikelinduziertes Messergebnis signifikant von der Kontrolle (Abb. 4.28, rechts).



**Abb. 4.28: Freisetzung von IL-6 und IL-8 aus Mono Mac 6-Zellen nach 24 Stunden Exposition mit verschiedenen Partikeln**

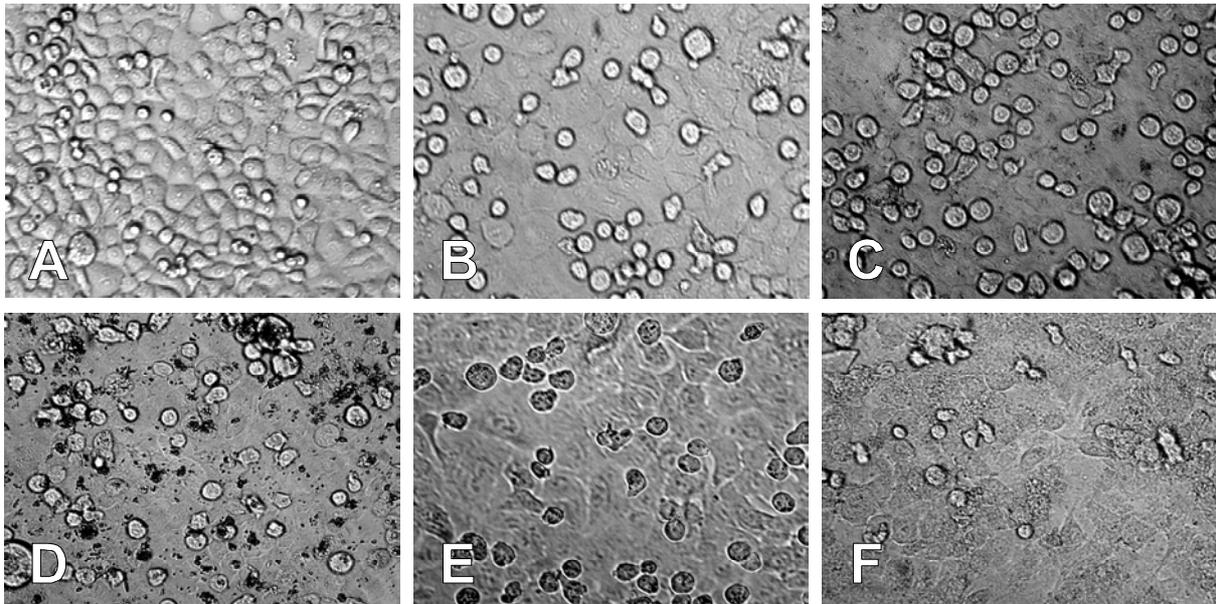
Mono Mac 6-Zellen wurden für 24 Stunden mit unterschiedlichen im Zellkultur resuspendierten Partikeln (Hämatit, Quarz, Silicasol) inkubiert. Als Positivkontrolle wurde 2 ng/ml TNF- $\alpha$  verwendet (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 3, \* P < 0,05 beim Student t-test).

## 4.2 Kokulturen – Epithelzellen und Makrophagen

Nach der eingehenden Untersuchung der einzelnen Zelllinien wurden die Versuche auf Kokulturen aus den A549-Epithelzellen und den Makrophagenzelllinien THP-1 und Mono Mac 6 ausgeweitet.

### 4.2.1 Lichtmikroskopische Dokumentation von Kokulturen

Für die Kokultur von A549-Zellen mit den Makrophagen wurden zunächst 20000 A549-Zellen in 96-Well-Platten ausgesät. Auf diese A549-Zellen wurden Makrophagen im Verhältnis 1: 10 gegeben. In Abb. 4.29 sind lichtmikroskopische Aufnahmen von Kokulturen dargestellt.



**Abb. 4.29: Lichtmikroskopische Bilder von Kokulturen vor und nach Partikelstimulation**

A549-Epithelzellen wurden mit THP-1- und Mono Mac 6-Zellen im Verhältnis 10:1 besetzt, für 24 Stunden mit Partikeln behandelt. **A)** Kokultur von A549- mit THP-1-Zellen. **B - F)** Kokulturen von A549- mit Mono Mac 6-Zellen. **A)** und **B)** unbehandelte Kontrollen **C)** mit Hämatit- **D)** Quarz- **E)** S-100- **F)** S-60-Partikeln in einer Konzentration von 100 µg/ml behandelt (200fache Vergrößerung, Hoffmann-Modulations Relief Kontrast).

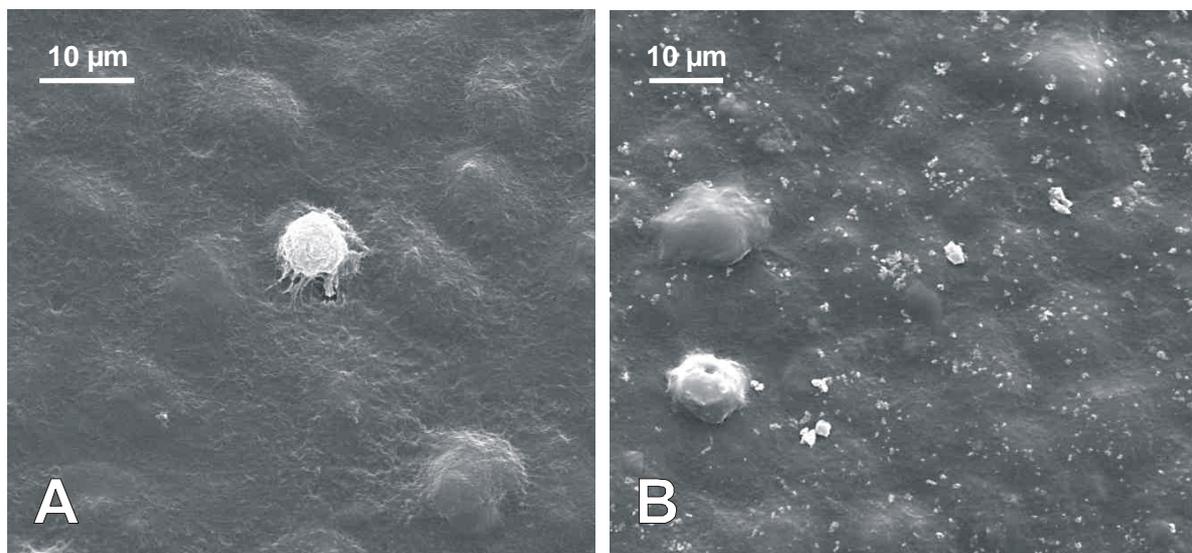
In den Aufnahmen ist deutlich die konfluente Zellschicht der A549-Epithelzellen zu erkennen, während die Makrophagen auf den Epithelzellen angesiedelt sind (Abb. 4.29 A – B). Nach Behandlung mit Hämatit-Partikeln sind Agglomerate als rötliche Flecken zu erkennen (Abb. 4.29 C). Die Quarz-Partikel sind als dunkle Agglomerate sehr unterschiedlicher Größe

zumeist in Assoziation zu den Makrophagen sichtbar (Abb. 4.29 D). Nach Behandlung mit Silicasol-Partikeln erscheinen die Makrophagen deutlich kontrastreicher bzw. granulierter (Abb. 4.29 E und F). Die Überstände der hier gezeigten Kokulturen wurden zur Bestimmung der Freisetzung von IL-6 und IL-8 verwendet (Abb. 4.33).

#### 4.2.2 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen an Kokultursystemen

Um den Kontakt der Makrophagen in den bereits unter dem Lichtmikroskop beobachteten Kokulturen genauer zu untersuchen, wurden A549- und Mono Mac 6-Zellen im Verhältnis 1:50 auf Transwell®-Membranen ausgesät. Ein Teil der Proben wurde mit 50 und 100 µg/ml Hämatit-Partikeln behandelt und 6 Stunden bis zur Fixierung damit inkubiert.

In den Kontrollen war deutlich die konfluente Zellschicht der A549-Zellen zu erkennen. Die Mono Mac 6-Zellen siedelten einzeln auf den A549-Zellen und hielten sich dort mit Pseudopodien auf der Oberfläche der A549-Zellschicht fest (Abb. 4.30 A). Im Vergleich zur Kontrolle waren die verwendeten Hämatit-Partikel in den behandelten Proben sehr gut auf den Zelloberflächen zu erkennen (Abb. 4.30 B).

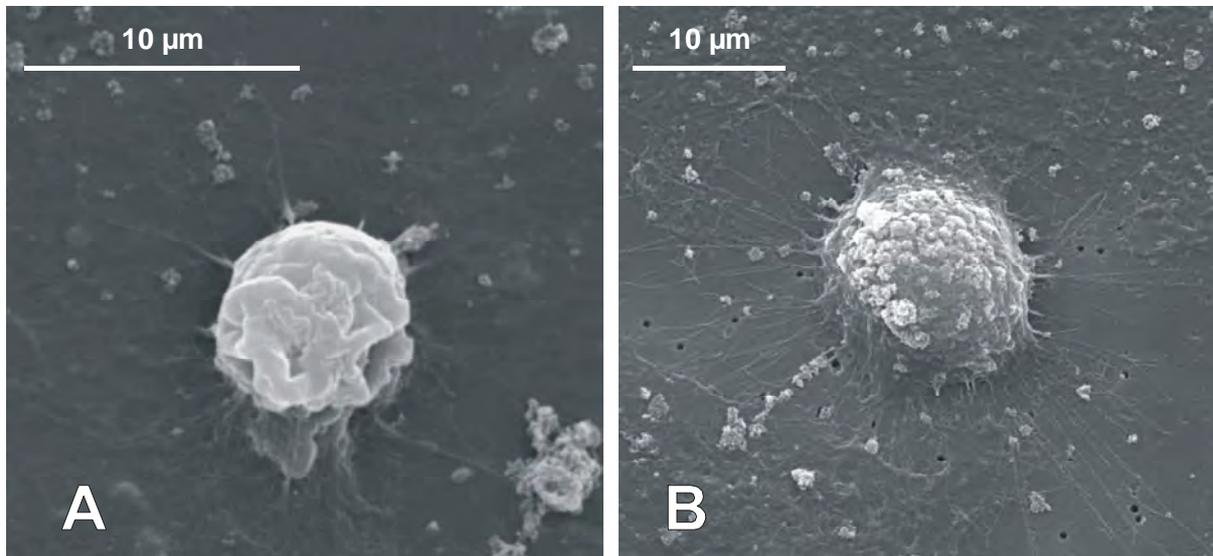


**Abb. 4.30: REM-Aufnahmen von A549- und Mono Mac 6-Zellen in Kokultur**

Mono Mac 6-Zellen wurden im Verhältnis 1:50 auf A549-Zellen ausgesät und nach Behandlung mit Hämatit-Partikeln nach 12 Stunden für die REM-Aufnahmen fixiert. Die Mono Mac 6-Zellen sind auf der Schicht aus A549-Zellen zu erkennen. **A)** unbehandelte Kontrolle, **B)** Behandlung mit 100 µg/ml Hämatit-Partikel.

Die Mono Mac 6-Zellen zeigten die morphologischen Merkmale von Makrophagen, jedoch war bei einem Teil keine aktive Phagozytose von Hämatit-Partikeln zu erkennen

(Abb. 4.31 A). Bei anderen Mono Mac 6-Zellen dagegen konnte eine rege Phagozytose-Tätigkeit festgestellt werden. Dabei waren am Zellsoma und an den Pseudopodien entlang Hämatit-Partikel lokalisiert (Abb. 4.31 B).



**Abb. 4.31: REM-Aufnahme von Mono Mac 6 Makrophagen nach Hämatit-Exposition**

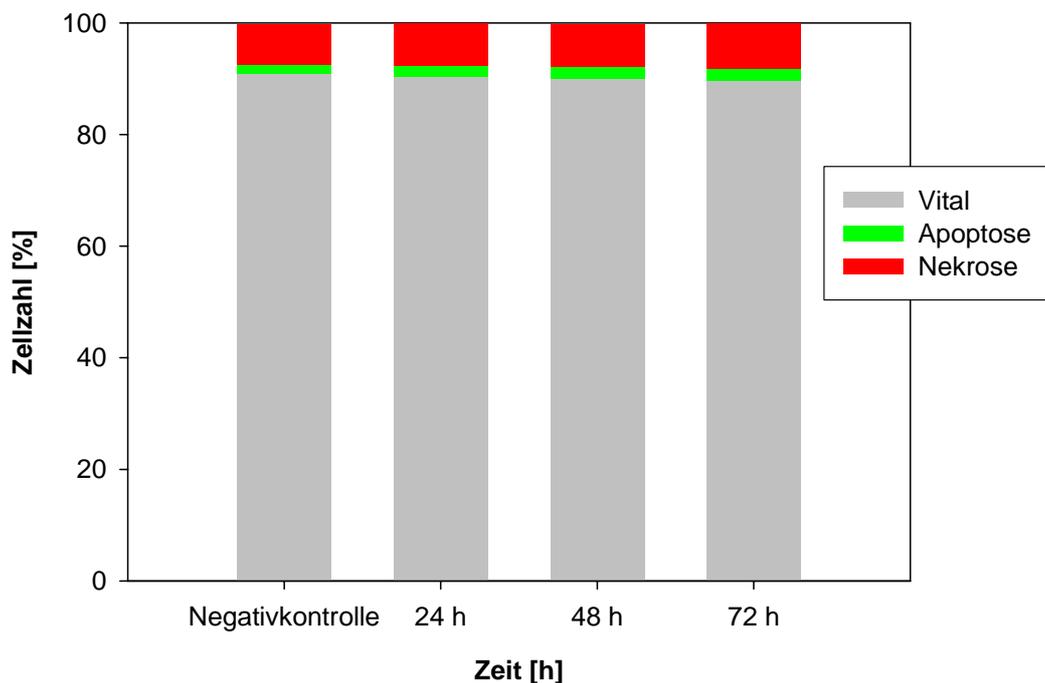
Mono Mac 6-Zellen **A**) mit morphologischen Merkmalen von Makrophagen, aber ohne erkennbare Phagozytose-Aktivität **B**) bei der Phagozytose von Hämatit-Partikeln.

#### **4.2.3 Apoptoseinduktion durch den Zell/Zell-Kontakt von THP-1- und A549-Zellen**

Aus der Literatur war bekannt, dass THP-1-Zellen den FAS-Liganden konstitutiv auf der Oberfläche exprimieren. Dadurch kann in Zellen, die FAS-Rezeptoren auf der Zelloberfläche tragen, durch Kontakt mit den THP-1-Zellen der programmierte Zelltod ausgelöst werden (Bremner *et al.*, 1999). Um zu prüfen, ob die THP-1-Zellen in A549-Zellen Apoptose auslösen, wurde die Anzahl apoptotischer Zellen in Kokulturen von A549- und THP-1-Zellen bestimmt. Dazu wurden  $1 \times 10^6$  A549- und  $1 \times 10^5$  THP-1-Zellen (Verhältnis von 10:1) in 6-Well-Platten ausgesät und über 72 Stunden inkubiert. Dabei war 8 nM TPA im Zellmedium enthalten, so dass sich die THP-1-Zellen zu Makrophagen differenzierten. Die Detektion apoptotischer Zellen erfolgte wie auf Seite 42 beschrieben durch Färbung der Zellen mit Annexin-V-FITC und Propidiumiodid. Die Auswertung wurde mit Hilfe eines Durchflusszytometers durchgeführt. Die erste Messung folgte unmittelbar im Anschluss an den Experimentansatz und ist als Negativkontrolle dargestellt. Weitere Messungen erfolgten im Abstand

von 24 Stunden. Die Ergebnisse sind die Mittelwerte von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

In der Negativkontrolle wurde nur ein geringer Anteil von 1,7 % an apoptotischen Zellen gemessen. Nach 24 Stunden stieg dieser Anteil auf 2 % und nach 48 Stunden auf 2,1 % an. Nach 72 Stunden wurde ebenfalls ein Anteil von 2,1 % apoptotischer Zellen gemessen (Abb. 4.32). Demnach konnten die THP-1-Zellen im genannten Zeitraum keine Apoptose in den A549-Zellen auslösen. Die THP-1-Zellen wurden im weiteren als geeignet für Experimente in Kokulturen angesehen.



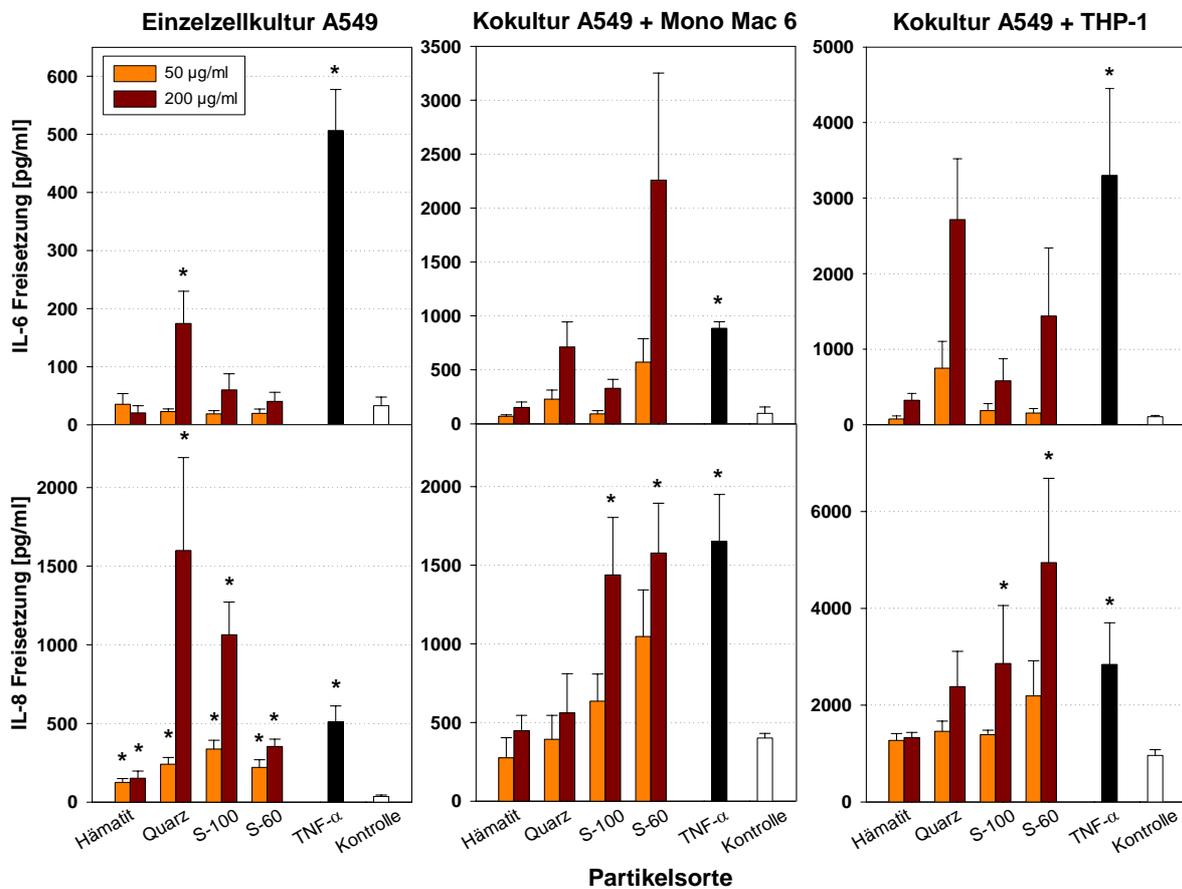
**Abb. 4.32: Apoptose Induktion durch direkten Zell/Zell Kontakt von A549- und THP-1-Zellen**

A549- und THP-1-Zellen wurden im Verhältnis 10:1 ausgesät. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde mit Hilfe eines Durchflusszytometers im Abstand von 24 Stunden ermittelt. Es konnte keine erhöhte Apoptoserate durch Kokultur der Zelllinien nachgewiesen werden (Mittelwerte zweier unabhängiger Experimente).

#### 4.2.4 Freisetzung von IL-6 und IL-8 in Kokulturen

Die Behandlung von A549-Zellen mit feinen und ultrafeinen Partikeln verursacht wie schon in Abb. 4.25 gezeigt eine dosisabhängige Freisetzung der Zytokine IL-6 und IL-8. Dabei wirkten Hämatit-Partikel am geringsten während Quarz-Partikel die stärkste Wirkung auslösten (Abb. 4.33, links).

Die Kokultur der Epithelzellen (A549) zusammen mit den Makrophagen (Mono Mac 6, THP-1) in einem Verhältnis von 10:1 zeigte einen klaren Anstieg der Sensitivität für die partikelinduzierte Zytokinfreisetzung. Zusammen mit Mono Mac 6-Zellen ließen die A549-Zellen im Vergleich mit der Einzelzellkultur eine nahezu 10fach erhöhte IL-6 Freisetzung und eine deutlich gesteigerte Empfindlichkeit für die ultrafeinen S-60-Partikel erkennen. Zudem wurde die Freisetzung von IL-8 um ein vielfaches verstärkt (Abb. 4.33, Mitte). In den Kokulturen der A549- mit THP-1-Zellen wurden die gleichen Effekte, jedoch noch einmal in stärkerem Umfang beobachtet (Abb. 4.33, rechts).



**Abb. 4.33: Freisetzung von IL-6 und IL-8 in Einzelzellkultur von A549-Zellen und in Kokultur mit THP-1- und Mono Mac 6-Zellen nach 24 Stunden**

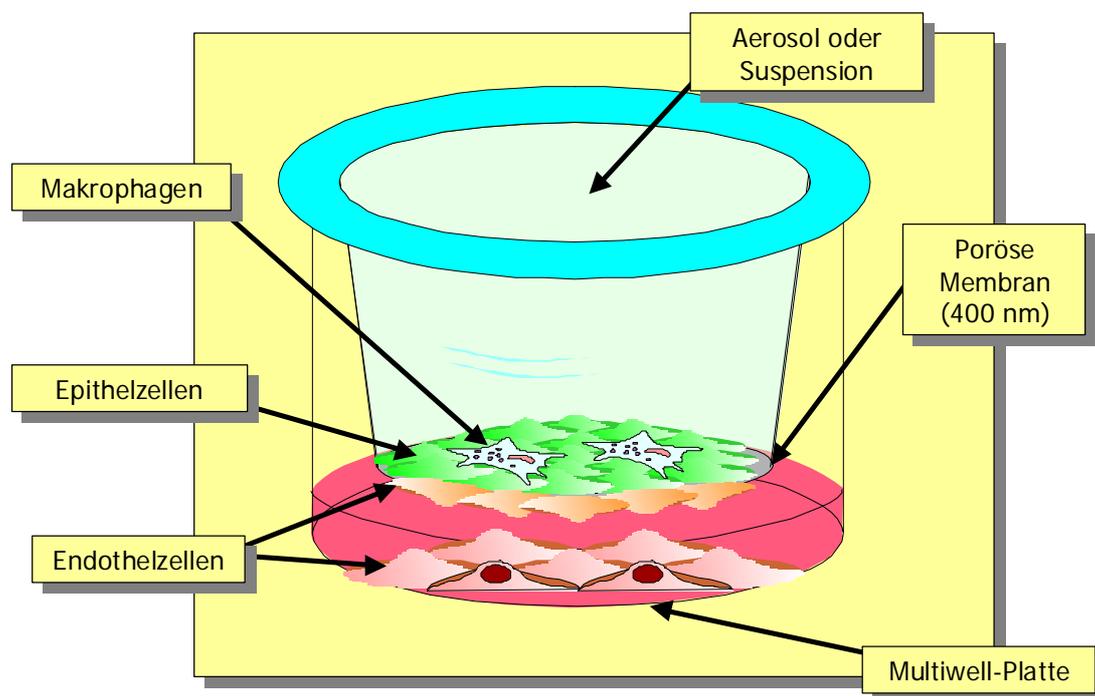
Die IL-6 und IL-8-Freisetzung wurde nach 24 Stunden Partikelexposition (Hämatit, Quarz, Silicasol) durch ELISA bestimmt. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit 2 ng/ml humanem TNF- $\alpha$  stimuliert. Kokulturen zeigten eine höhere Empfindlichkeit als Einzelzellkulturen. (Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n \geq 5$ , \*  $< 0,05$  beim Student  $t$ -test).

Die IL-6 und IL-8-Freisetzung von den Einzelzellkulturen der Zelllinien Mono Mac 6 und THP-1 wurden in Abb. 4.28 und Abb. 4.27 gezeigt. Ein einzeln durchgeführter Versuch mit diesen Zellen, jedoch mit einer um den Faktor 10 und 100 verminderte Zellzahl zeigte kaum nachweisbare IL-6 und IL-8-Freisetzungen.

### 4.3 Entwicklung eines Kokultursystems aus Epithelzellen (A549), Endothelzellen (ECV304) und Makrophagen (Mono Mac 6)

Eine wichtige Aufgabenstellung dieser Arbeit war die Entwicklung eines Kokulturmodells aus Epithelzellen, Endothelzellen und Makrophagen. Dieses Kokultursystem sollte etabliert werden, um inhalationstoxikologische Fragestellungen unter Berücksichtigung des interzellulären Signalnetzes angemessen untersuchen zu können und zudem die Anwendung des Transmissionselektronenmikroskops ermöglichen. Eine Besonderheit sollte dabei die Möglichkeit von direkten Zell/Zell-Kontakten der Epithelzellen mit den Endothelzellen sein.

Grundlage des Systems war die Verwendung von Transwell®-Membransystemen, bei denen die Epithelzellen auf der Oberseite und die Endothelzellen auf der Unterseite der Membran kultiviert werden sollten. Die Makrophagen sollten auf den Epithelzellen ausgesät werden. Die Stimulation mit Partikeln ist sowohl als Suspension als auch durch direkte Aerosolbegasung möglich (Abb. 4.34). Die Umsetzung dieses Konzeptes unterlag zahlreichen technischen Schwierigkeiten.



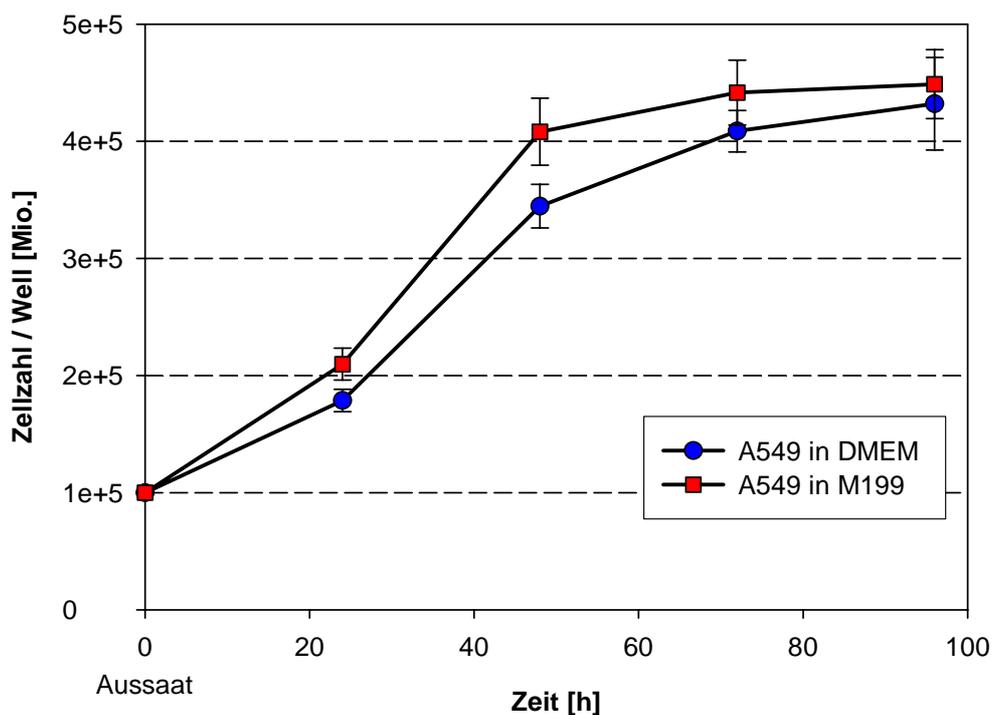
**Abb. 4.34: Transwell®-Membransystem zur Herstellung eines realitätsnahen *in vitro* Lungenmodells**

Das System besteht aus einem Einsatz mit einer porösen Membran, die zwei Kompartimente unterteilt. Im oberen wird die Membran mit Epithelzellen und Makrophagen, im unteren Kompartiment mit Endothelzellen besiedelt. Die Kommunikation der Zellen kann über die Poren erfolgen.

### 4.3.1 Kultivierung der A549- und ECV304-Zellen in Fremdmedium

Die Epithel- und Endothelzellen mussten bei den Kokulturversuchen mit dem Zellkulturmedium der jeweils anderen Zelllinie in Kontakt kommen. Deshalb musste geprüft werden, inwieweit diese Umstellung des Kulturmediums zu Veränderungen in der Wachstumsrate und der Vitalität der Zellen führen würde. Deshalb wurde das Wachstum von A549- und ECV304-Zellen im eigenen Medium mit dem Wachstum im Medium der anderen Zelllinie verglichen. Dazu wurden  $1 \times 10^5$  Zellen in Petri-Schalen ausgesät und die Zellzahl über 96 Stunden hinweg alle 24 Stunden bestimmt (Coulter Counter).

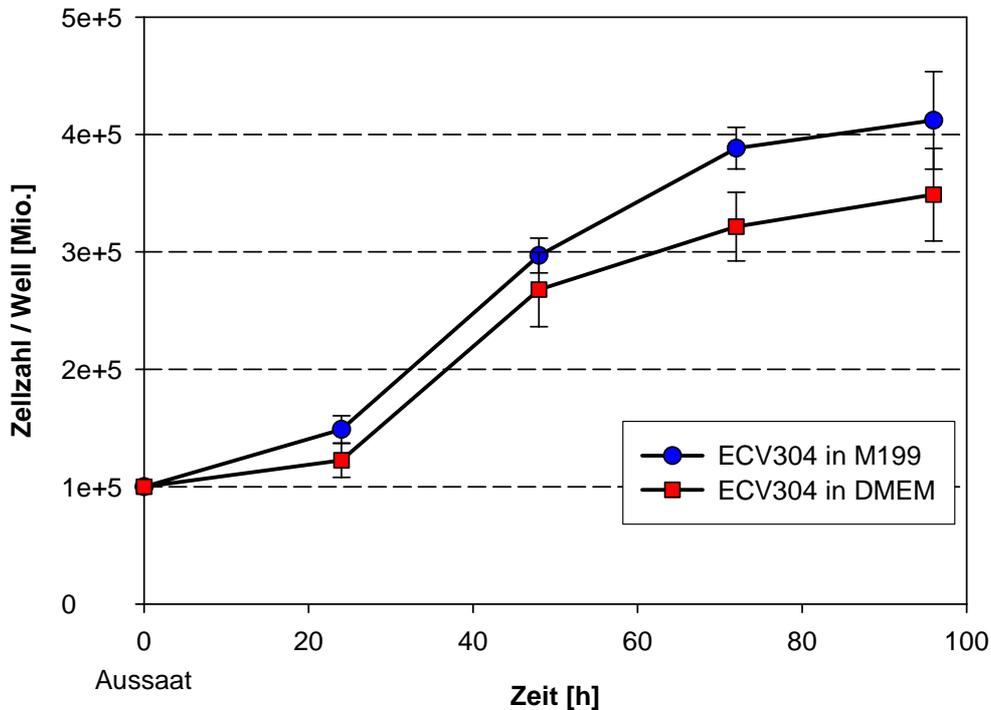
Während dieser Zeitspanne ergaben sich keine besonderen Unterschiede zwischen dem A549-Medium („*dulbeccos modified eagles medium*“, DMEM) und dem Medium der ECV304-Zellen (M199). Tatsächlich wuchsen die A549-Zellen bei Kultivierung in M199-Medium sogar geringfügig schneller als in DMEM (Abb. 4.35).



**Abb. 4.35: Wachstumskurven von A549-Zellen in DMEM- und M199-Zellkulturmedium**

A549-Zellen wurden in „*dulbeccos modified eagles medium*“ (DMEM) und M199-Medium über 96 Stunden kultiviert. Die Wachstumskurve zeigt sowohl ein sehr gutes Wachstum von den A549-Zellen in DMEM als auch in M199-Medium (Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 3$ ).

In einem weiteren Versuch wurde das Wachstumsverhalten von ECV304-Zellen im DMEM-Medium der A549-Zellen überprüft. Die Zellen zeigten auch in DMEM ein zufriedenstellendes Wachstum, erreichten aber nicht die gleiche Zellzahl wie in M199-Medium (Abb. 4.36).



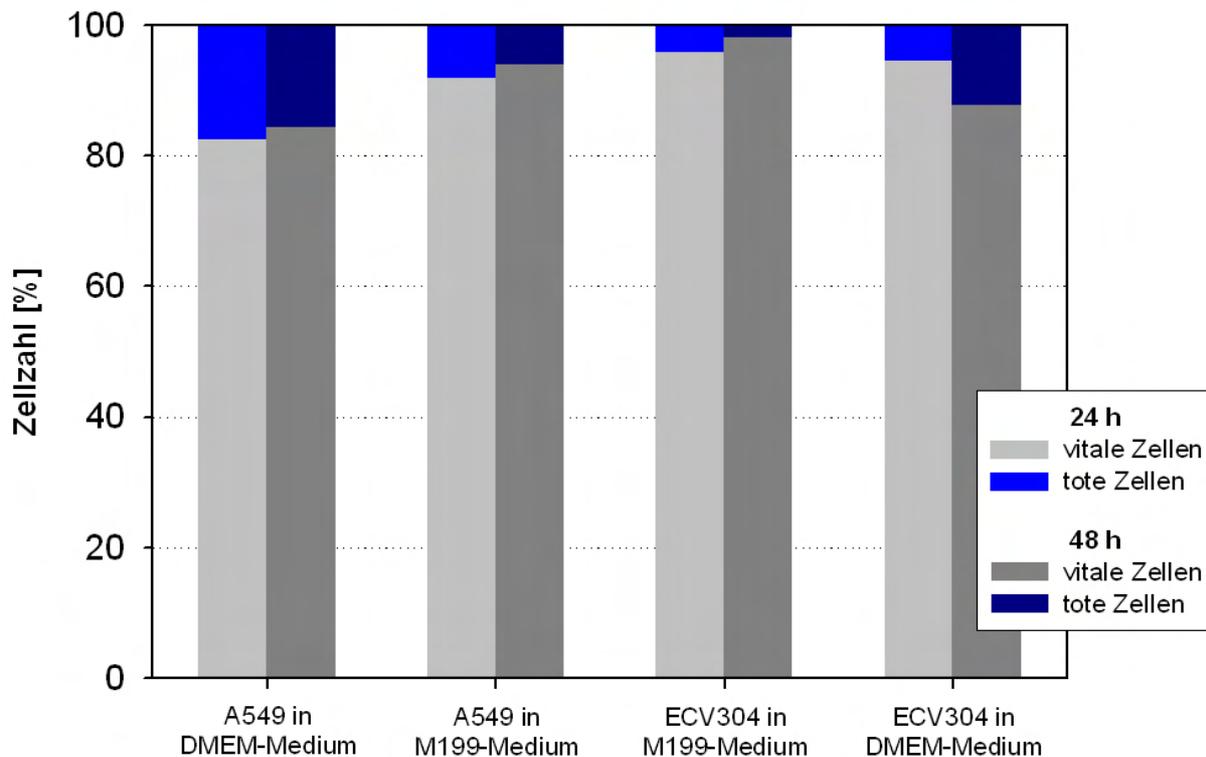
**Abb. 4.36: Wachstumskurven von ECV304-Zellen in M199- und DMEM-Zellkulturmedium**

ECV304-Zellen wurden in „*dulbeccos modified eagles medium*“ (DMEM) und M199-Medium über 96 Stunden kultiviert. Die Wachstumskurve zeigt ein besseres Wachstum der ECV304-Zellen in M199 als in DMEM (Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 3$ ).

Zusätzlich zu den Wachstumskurven wurde überprüft, ob die Kultivierung in Fremdmedium bei den A549- oder ECV304-Zellen den Anteil toter Zellen in der Kultur erhöht. Dazu wurde aus den oben beschriebenen Ansätzen nach 24 und 48 Stunden eine Trypanblau-Färbung vorgenommen und der Anteil toter Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt.

Bei den A549-Zellen war der Anteil an toten Zellen bei Verwendung von M199-Medium sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden sogar geringer als bei Kultivierung in DMEM-Medium. Dagegen war die Anzahl toter ECV304-Zellen bei Verwendung von DMEM-Medium statt M199-Medium leicht erhöht (Abb. 4.37).

Die Kultivierung von A549- und ECV304-Zellen stellte also weder in DMEM- noch in M199-Medium ein Hindernis für eine Kokultur dar. Das M199-Medium der ECV304-Zellen schien für beide Zelllinien am besten geeignet zu sein.



**Abb. 4.37: Überlebensraten von auf A549- und ECV304-Zellen in DMEM- und M199-Zellkulturmedium**

A549- und ECV304-Zellen wurden in „*dulbeccos modified eagles medium*“ und M199-Medium kultiviert und nach 24 und 48 Stunden mit Trypanblau angefärbt und der Anteil toter Zellen mit einer Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt. Das Ergebnis zeigt eine verbesserte Vitalität bei Kultivierung der Zellen in M199-Medium (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 5).

#### 4.3.2 Beschichtung der Transwell®-Membranen mit extrazellulären Matrixproteinen – Anheftung der Zellen auf Ober- und Unterseite

Für das Modellsystem wurden Transwell®-Polyester-Membranen der Firma Corning Costar, (Wiesbaden) mit einer Porenweite von 0,4  $\mu$ m verwendet. Die Besiedelung der ECV304-Zellen auf die Unterseite der Membran erforderte, dass die Zellen entgegen der Schwerkraft angeheftet werden mussten. Die einzige Möglichkeit, dies zu bewerkstelligen, bestand darin, zuerst die eine und dann die andere Zelllinie anzuheften. Um auch die Unterseite der Membran mit Lösungen und Zellsuspensionen überschichten zu können, wurde ein spezielles

Ringsystem entwickelt und angefertigt. Das System wird durch Aufstecken und Abdichtung mit Teflonband an den Transwell®-Membraneinsätzen befestigt. Als Material wurde Teflon ausgewählt. Das Ringsystem steht sowohl für 6-Well- als auch für 12-Well-Platten zur Verfügung. Zur Anwendung musste festgestellt werden, wie lange die A549- und ECV304-Zellen zur Anheftung an die Membran benötigen. In den ersten Versuchen mit unbeschichteten Membranen fielen die Zellen nach 90 Minuten Anheftungsdauer kurze Zeit nach dem Umdrehen der Membran wieder ab und wuchsen auf dem Boden der Transwell-Platte. Dies konnte durch die Verwendung von Beschichtungen der Membran verhindert werden. Als effektivste Mischung erwies sich eine Beschichtung mit einer Lösung aus 20 µg/ml „calf skin“ Kollagen und 50 µg/ml humanes Fibronectin in PBS. Die Beschichtung wurde auf beiden Seiten der Membran durch 60 Minuten Inkubation der Membran bei 37°C in der Beschichtungslösung aufgebracht. Anschließend wurde überschüssige Beschichtungslösung abgesaugt. Wie aus Tab. 4.1 hervor geht, heften sich die Zellen bereits nach 40 Minuten stabil an die Membran an.

**Tab. 4.1: Anheftung von Zellen auf Transwell®-Polyester Membranen nach Beschichtung mit einer Mischung aus Kollagen und Fibronectin.**

Anheftungszeit	Anheftung	dauerhaft adhärent
10 Min.	-	-
20 Min.	-	-
30 Min.	+	-
40 Min.	+	+
50 Min.	+	+
60 Min.	+	+

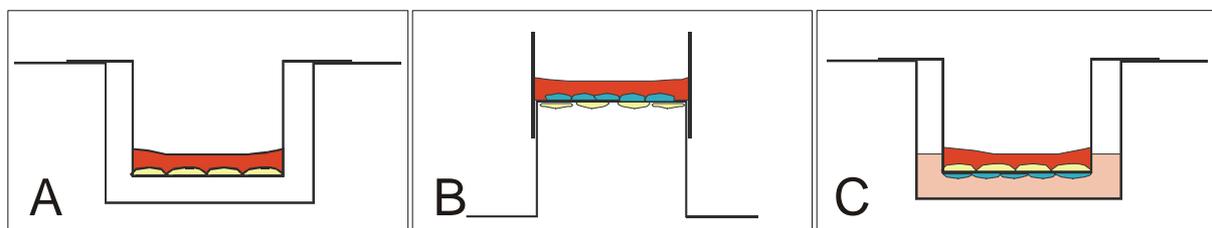
Die A549-Zellen unterscheiden sich in der Anheftungsdauer nicht von den ECV304-Zellen. Beim weiteren Wachstum bleiben die Zellen an die Membran angeheftet. Auf diese Weise ist also ein Bewuchs mit ECV304-Zellen auf der Unterseite bis zur Konfluenz möglich.

#### **4.3.3 Anheftung der Zellen gegen interzelluläre Abstoßungseffekte**

Aufgrund von interzellulären Abstoßungseffekten zwischen A549- Zellen und ECV304-Zellen, konnten diese nicht beliebig miteinander kultiviert werden. Nach Besiedelung der Unterseite der Transwell®-Membran wachsen die A549-Zellen nicht mehr auf der Oberseite

an, sondern kugelten sich ab und blieben in Suspension. Dieser Effekt ließ sich durch die Beschichtung der Transwell®-Membran mit Kollagen und Fibronectin abmildern, aber nicht verhindern. Umgekehrt zeigten die ECV304-Zellen ein solches Verhalten nicht in diesem Ausmaß, so dass sich die folgende Vorgehensweise, zuerst die A549-Zellen und anschließend die ECV304-Zellen, bei Kokultur-Start bewährte. Zudem stellte sich die Anzahl der eingesetzten Zellen als wichtiger Faktor heraus.

Zur Herstellung des Triple-Zellkultursystems wurde folgendermaßen vorgegangen: Zuerst wurde die Transwell®-Membran mit Kollagen und Fibronectin beschichtet. Anschließend erfolgte die Montage des Ringsystems, wobei die Abdichtung mit autoklaviertem Teflonband erfolgte. Danach erfolgte zuerst die Anheftung der A549-Zellen. Hierzu wurden  $5 \times 10^5$  A549-Zellen im oberen Kompartiment ausgesät und für 3 Stunden im Brutschrank inkubiert (Abb. 4.38 A). Das Medium in den Transwell®-Einsätzen über den Zellen wurde vorsichtig abgekippt und 1,5 ml Zellmedium mit  $5 \times 10^4$  ECV304-Zellen auf die Unterseite der Membran gegeben. Die Versorgung der bereits angehefteten A549-Zellen erfolgte nun durch die Poren in der Membran hindurch mit dem Medium der ECV304-Zellen. Wiederum erfolgte eine Inkubation von 3 Stunden abgedeckt im Brutschrank (Abb. 4.38 B). Anschließend wurde das Medium wieder vorsichtig abgekippt und der Ring demontiert. Der Transwell®-Einsatz wurde umgehend in 6-Well-Platten mit 2,5 ml vorgelegtem Medium eingelegt und das obere Kompartiment vorsichtig mit 1,5 ml Medium aufgefüllt (Abb. 4.38 C). Bei allen Schritten wurden Erschütterungen nach Möglichkeit vermieden und die Zeiten ohne Medium so kurz wie möglich gehalten, um die Austrocknung der Zellen zu vermeiden. Die Zellen wurden vor der ersten lichtmikroskopischen Kontrolle für mindestens 16 Stunden ohne Erschütterung im Brutschrank inkubiert. Der Besatz der Epithelzellen mit Mono Mac 6-Zellen war nach 24 Stunden, die Behandlungen mit Partikeln nach ca. 48 Stunden möglich.

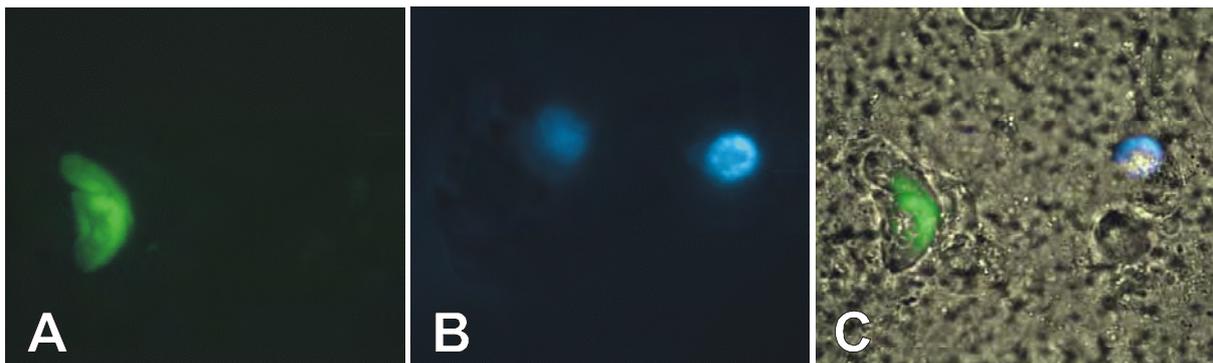


**Abb. 4.38: Anheftung von A549- und ECV304-Zellen auf Ober- und Unterseite der Transwell®-Membran**  
 Zur Erstellung des Triple-Zellkulturmodells wurden zuerst  $5 \times 10^5$  A549-Zellen im oberen Kompartiment ausgesät (A) und für 3 Stunden inkubiert. Anschließend wurden  $5 \times 10^4$  ECV304-Zellen auf der Membranunterseite ausgebracht (B). Nach weiteren 3 Stunden im Brutschrank konnten die Transwell®-Einsätze in die Well-Platten eingesetzt werden (C).

#### 4.3.4 Transiente Transfektion

Im Lichtmikroskop konnte die obere und untere Zellschicht kaum unterschieden werden. Deshalb wurden die A549-Zellen mit einem Expressionsvektor für „green fluorescent protein“ (GFP)-markiertem Aktin und die ECV304-Zellen mit einem Expressionsvektor für „cyan fluorescent protein“ (CFP)-markiertem MEM transient transfiziert. Bei den Vektoren handelte es sich um kommerziell erhältliche Markervektoren (Living Colors®, Clontech, Heidelberg). Die unterschiedlichen Fluoreszenzen machten es möglich, zwischen A549-Zellen und ECV304-Zellen zu unterscheiden.

Dazu wurden A549- und ECV304-Zellen unmittelbar vor dem Einsatz im Triple-Zellkultursystem mit Hilfe von Lipofektamin mit dem entsprechenden Expressionsvektor transfiziert. Nach Fertigstellung des Modells konnten im Fluoreszenzmikroskop sowohl A549-Zellen (Abb. 4.39 A) wie auch ECV304-Zellen (Abb. 4.39 B) identifiziert werden. Die Anheftung beider Zelllinien für ein Triple-Zellkultursystem war also erfolgreich.



**Abb. 4.39: Transiente Transfektion von A549- und ECV304-Zellen zum Nachweis der Zellkulturschichtung**

A549- und ECV304-Zellen wurden mit Hilfe von Lipofektin mit einem Aktin-GFP-, bzw. einem MEM-CYP-Expressionsvektor transfiziert. **A)** A549-Zelle, **B)** ECV304-Zellen, **C)** Overlay der Fluoreszenzbilder mit einem Hellfeld-Bild. Schwache Fluoreszenzen gehen bei der Overlay-Erstellung verloren. Die Aufnahme belegt dass beide Zelltypen an der Transwell®-Membran hafteten (Ölimmersion, 630 x Vergrößerung).

#### 4.3.5 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER)

Die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes, im folgenden mit TEER abgekürzt, diente zur Feststellung, wie dicht die Zellen die Transwell®-Membran bewachsen hatten. Dabei wurde der elektrische Widerstand mit Hilfe einer speziellen Messelektrode zwischen dem oberen und dem unteren Kompartiment des Transwell®-Membransystems gemes-

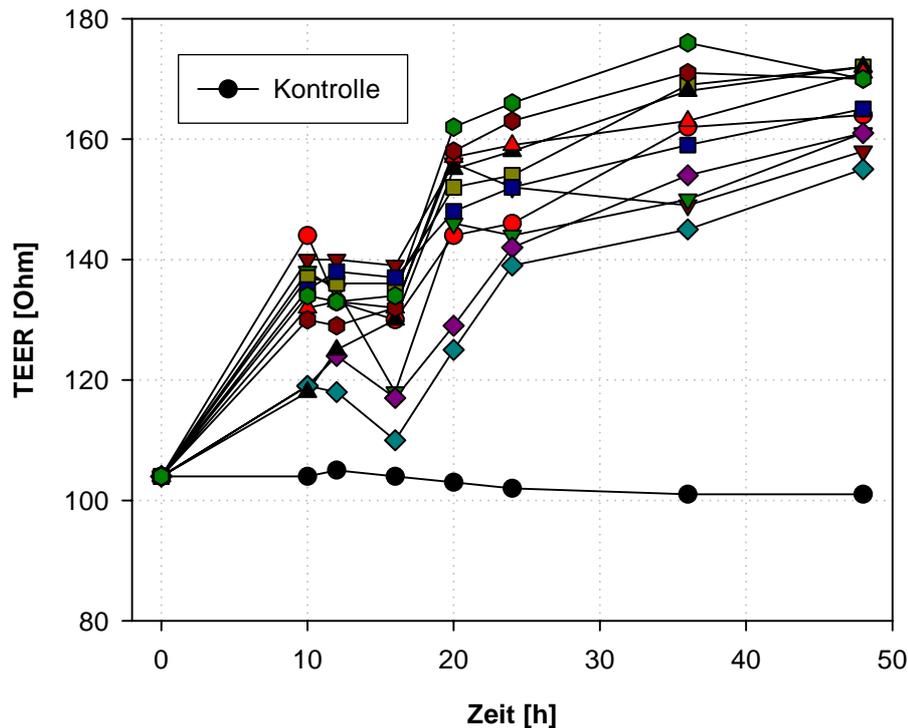
sen. Je konfluentier die Zellen die Membran bewachsen, desto dichter wurden die Poren der Membran verschlossen, desto höher wurde der gemessene Widerstand.

Der elektrische Widerstand zwischen oberem und unterem Kompartiment der einzelnen Wells wurde während des Ansatzes des Triple-Zellkultursystems einzeln zu verschiedenen Zeitpunkten mit einem EVOM-TEER-Messgerät (WPI Instruments, Berlin) bestimmt. Die Messungen wurden auf einem 37 °C-Tisch unter sterilen Bedingungen durchgeführt. In Tab. 4.2 sind typische TEER-Messwerte aufgeführt.

**Tab. 4.2 TEER-Messwerte verschiedener Medien**

Teer-Messwerte	
Wasser	13500 Ohm
70 % Isopropylalkohol	1048 Ohm
A549-Zellkulturmedium	40 Ohm
A549-Zellkulturmedium + Transwell-Membran	104 Ohm

Die erste TEER-Messung wurde 10 Stunden nach dem Ansatz des Triple-Zellkultursystems vorgenommen. Jedes Well wurde einzeln vermessen und mit einer Kontrolle ohne Zellen verglichen. Die Ergebnisse sind als Kurvenschar in Abb. 4.40 dargestellt. Nach den ersten 10 Stunden konnte ein Anstieg des TEER-Wertes beobachtet werden. Zwischen 10 und 16 Stunden blieben die TEER-Werte mehr oder weniger unverändert, um zwischen 16 und 20 Stunden nach dem Ansatz wiederum einen starken Anstieg zu zeigen. Danach stiegen die TEER-Messwerte in fast allen Wells leicht bis zum Ende der Messung an. Insgesamt ähnelt das Bild des Verlaufs aller Kurven der Form einer Sättigungskurve (Abb. 4.40).



**Abb. 4.40: Kurvenschar von 12 TEER-Messungen in verschiedenen Wells von Triple-Zellkulturen**

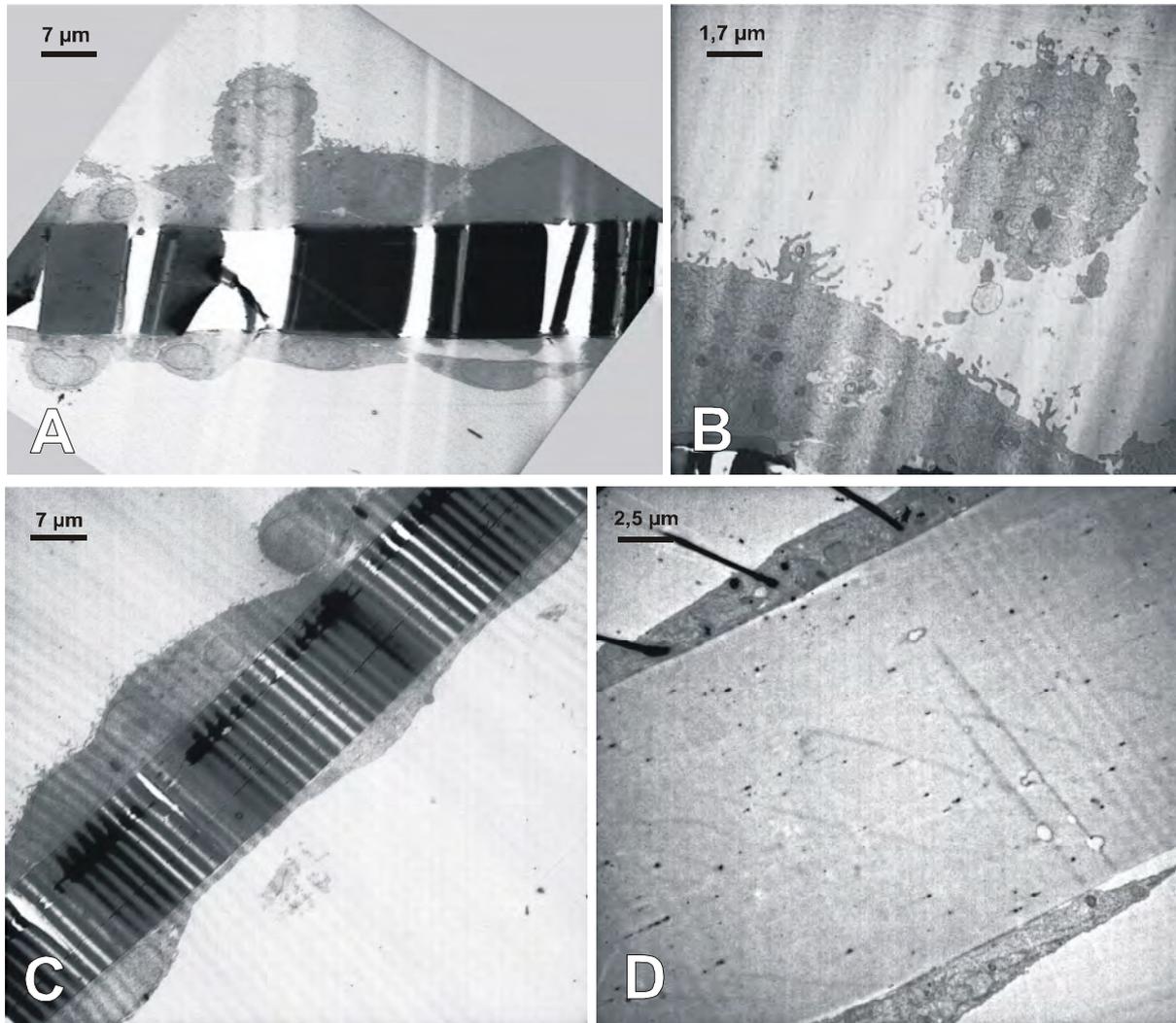
Die Messung des transepithelialen Widerstands (TEER) mit einem EVOM-Messgerät wurde zur Dokumentation des konfluenten Wachstums der Zellen im Triple-Zellkultursystem genutzt. Die Abbildung zeigt eine Kurvenschar von 12 verschiedenen Kulturansätzen und eine Kontrolle ohne Zellen. Der ansteigende Widerstand belegt das immer dichtere Verschließen der Poren in den Transwell<sup>®</sup>-Membranen durch die Zellen.

#### **4.3.6 Elektronenmikroskopische Dokumentation des Triple-Zellkultursystems**

Nachdem mit Hilfe der transienten Transfektion (siehe 4.3.4 oben) der Nachweis eines Triple-Zellkultursystem erbracht war, sollte zusätzlich durch TEM-Aufnahmen der Aufbau belegt werden. Dazu wurde das Triple-Zellkultursystem, wie beschrieben, angelegt (siehe 4.3 oben) und für die Elektronenmikroskopie fixiert.

Es zeigte sich, dass die Zellen in der Realität tatsächlich, wie in Abb. 4.34 vorgestellt, auf bzw. unter die Transwell<sup>®</sup>-Membranen festwuchsen. Auf der Oberseite der Transwell<sup>®</sup>-Membran waren die A549-Epithelzellen angesiedelt, während die ECV304-Endothelzellen entgegen der Schwerkraft auf der Unterseite der Membran angeheftet waren (Abb. 4.41 A, C und D). Auf den Epithelzellen konnten vereinzelte Makrophagen (Mono Mac 6-Zellen) beobachtet werden (Abb. 4.41 A und B).

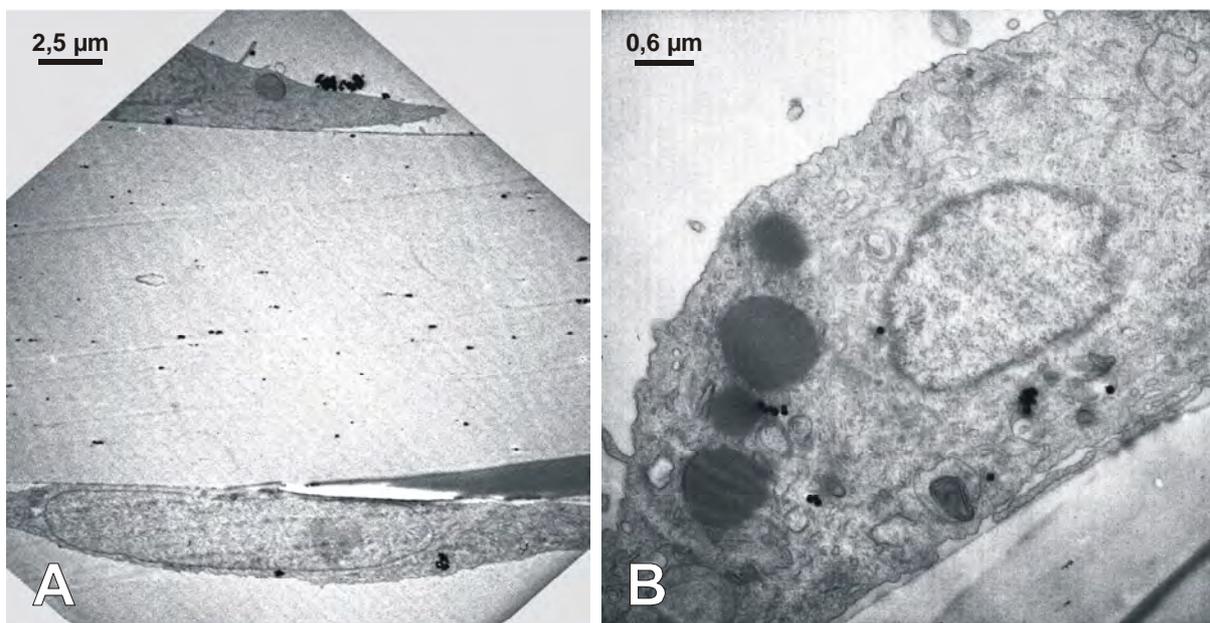
Nach Behandlung mit Hämatit-Partikeln waren diese deutlich auf der Oberseite der A549-Zellen zu erkennen (Abb. 4.7 und Abb. 4.8). Dagegen war die Unterseite mit den ECV304-Zellen frei von Hämatit-Partikeln (Abb. 4.41 D).



**Abb. 4.41: TEM-Bilder eines Triple-Zellkultursystems**

Das Triple-Zellkultursystem wurde, wie im Text beschrieben, zusammengesetzt, ein Teil der Wells mit 100 µg/ml Hämatit-Partikeln behandelt und für die Elektronenmikroskopie fixiert. A) zeigt die Struktur des Systems mit A549-Zellen auf der Oberseite und ECV304-Zellen auf der Unterseite der Transwell®-Membran. Auf den A549-Zellen waren vereinzelte Mono Mac 6-Makrophagen wie auch in B) zu erkennen. In C) ist ebenfalls die Struktur des Kultursystems ohne Partikel und in D) nach Behandlung mit Hämatit-Partikeln zu erkennen. Die teilweise zu beobachtende „Riffelung“ der Schnitte (C) ist technisch durch die hohe Schnittfestigkeit der Polyestermembranen bedingt (A und C: 1100fache Vergrößerung, B: 4400fache und D: 3000fache Vergrößerung).

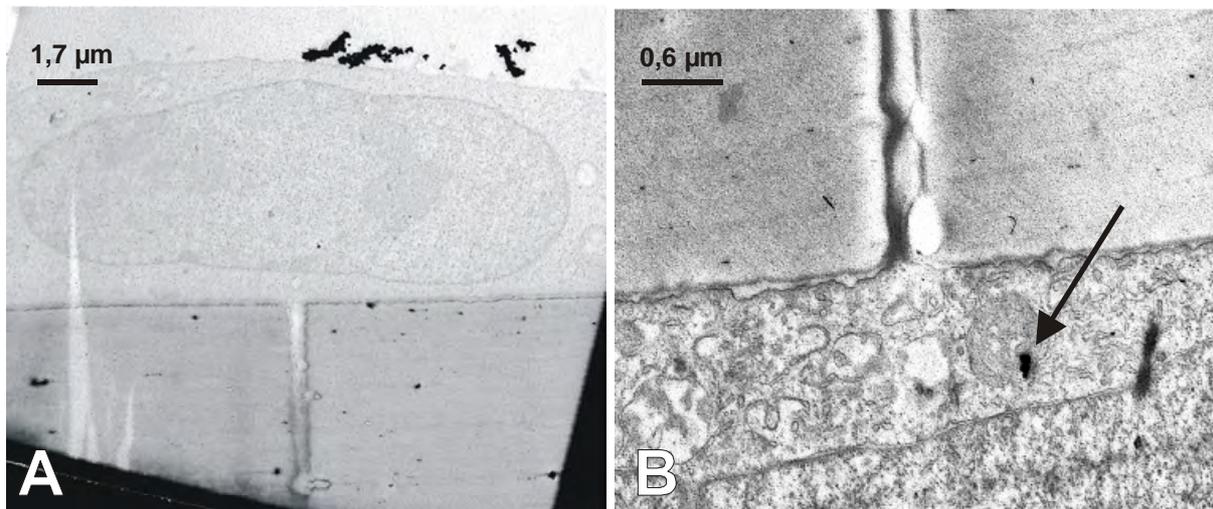
Neben der Demonstration, dass ultrafeine Partikel nicht nur von Makrophagen, sondern auch von Epithel- und Endothelzellen in Einzelzellkultur aufgenommen werden können, war das Kokultursystem auch dazu bestimmt, einen möglichen (postulierten) Transport der Partikel zwischen den Zelltypen in der Kokultur nachzuweisen. Dazu müssten Hämatit-Partikel in den ECV304-Zellen im TEM sichtbar sein. Dieser Fall konnte nur sehr selten dokumentiert werden. In Abb. 4.42 A ist ein Agglomerat von Hämatit-Partikeln auf der Oberseite der A549-Zelle (oben) zu erkennen, aber auch einzelne Hämatit-Partikel in der ECV304-Zelle auf der Unterseite. In Abb. 4.42 B ist eine ECV304-Zelle abgebildet, bei der eindeutig vereinzelt Hämatit-Partikel im Inneren zu erkennen waren.



**Abb. 4.42: Hämatit-Partikel in ECV304-Zellen auf der Unterseite der Membran**

Im Triple-Zellkultursystem konnten nach 16 Stunden Stimulation mit 100 µg/ml Hämatit-Partikeln nur selten ein Übergang der Partikel in die ECV304-Zellen festgestellt werden. **A)** zeigt Partikel sowohl in der A549-Zelle auf der Oberseite als auch vereinzelt Partikel in der ECV304-Zelle auf der Unterseite der Transwell®-Membran. **B)** zeigt ebenfalls eine ECV304-Zelle auf der Unterseite der Membran mit vereinzelt Hämatit-Partikeln im Inneren (A: 3000fache, B: 12000fache Vergrößerung).

Ein Transport von Partikeln von der Ober- zur Unterseite kann nur durch die Poren stattfinden. Abb. 4.43 A zeigt eine A549-Zelle, die einen Zellfortsatz in eine Membranpore ausgestreckt hat. In Abb. 4.43 B ist die Aufnahme einer Pore unmittelbar über einer ECV304-Zelle gezeigt. Der Pfeil weist auf Hämatit-Partikel in unmittelbarer Nähe der Pore hin.



**Abb. 4.43: Zell-Zell-Kontakt durch die Poren der Transwell®-Membran**

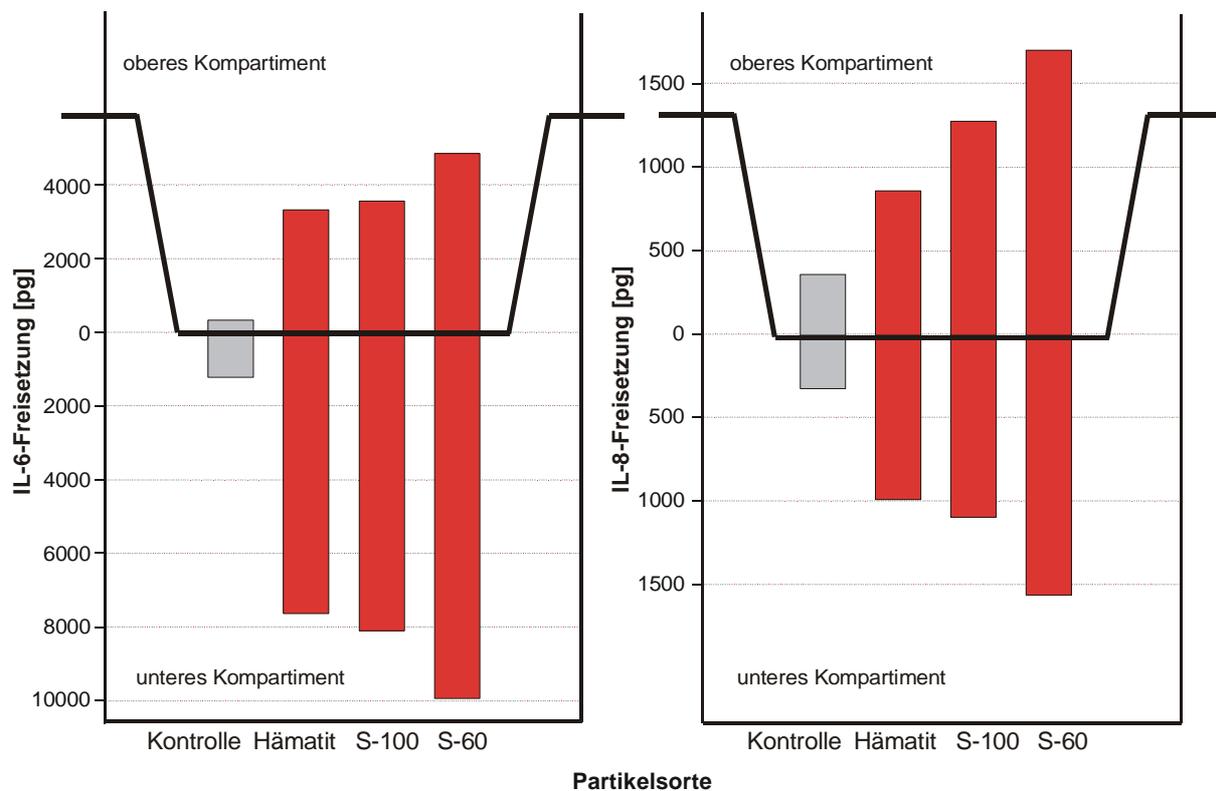
TEM-Aufnahmen von **A**) einer A549-Zelle, die einen Zellfortsatz in eine Pore der Transwell®-Membran streckt und **B**) einer ECV304-Zelle unmittelbar unterhalb einer Pore. Direkt neben der Pore sind Hämatit-Partikel zu erkennen (A: 4400fache Vergrößerung, B: 12000fache Vergrößerung).

#### **4.3.7 Freisetzung von Interleukin-6 und Interleukin-8 im Triple-Zellkultursystem**

Nach der Dokumentation des Triple-Zellkultursystem sollte die IL-6- und IL-8-Freisetzung bei der Interaktion von allen drei eingesetzten Zelllinien untersucht werden. Dazu wurden Triple-Zellkulturen angesetzt und mit 100 µg/ml Hämatit-, S-100- und S-60-Partikeln behandelt. Als Kontrolle dienten Kulturen ohne Partikelbehandlung. Nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden wurden die Überstände abgenommen und die Interleukinkonzentrationen mittels ELISA bestimmt. Das Triple-Zellkultursystem konnte nicht im gleichen Umfang wie Einzelzellkulturen oder Kokulturen aus Epithelzellen und Makrophagen hergestellt werden. Deshalb wurden im Vergleich zu den anderen Versuchen nur wenige Einzelexperimente durchgeführt. Aus diesem Grunde konnte nur die Wirkung von 3 verschiedenen Partikeln untersucht werden. Zudem ermöglichten die wenigen Messungen keine statistische Analyse der Daten.

Die freigesetzte IL-6-Konzentration war im Vergleich zu den Ergebnissen aus den Einzelzell- und Kokulturen hoch (siehe 4.1.8. und 4.2.4). Dabei führte die Behandlung mit S-60-Partikeln zu den höchsten IL-6- und IL-8-Konzentrationen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Konzentration in die Gesamtmenge von freigesetztem IL-6 und IL-8 umgerechnet, da im oberen, mit A549- und Mono Mac 6-Zellen besetzten, und unteren, mit ECV304-Zellen besetztem Kompartiment unterschiedliche Volumina an Zellkulturmedium eingesetzt wurden. Die

gemessene IL-6-Abgabe nach S-60-Partikelstimulation lag bei mehr als 4000 pg im oberen und fast 10000 pg im unteren Kompartiment. Nach Behandlung mit S-60-Partikeln wurden über 1500 pg IL-8 im oberen und 1610 pg IL-8 im unteren Kompartiment freigesetzt. Bemerkenswert war die generelle Unterscheidung zwischen der Freisetzung in das obere und das untere Kompartiment. Im oberen Kompartiment war nach Behandlung mit allen eingesetzten Partikeln deutlich weniger IL-6 nachzuweisen als im unteren Kompartiment. Im Gegensatz dazu war die IL-8 Abgabe im oberen Kompartiment in ungefähr der gleichen Größenordnung nachzuweisen wie im unteren Kompartiment (Abb. 4.44).



**Abb. 4.44: Freisetzung von IL-6 und IL-8 im Triple-Zellkulturmodell**

Das Triple-Zellkultursystem wurde mit 100 µg/ml Hämatit-, S-100- und S-60-Partikeln behandelt. Nach 16 Stunden Inkubationszeit wurden Überstände aus dem oberen, besetzt mit A549- und Mono Mac 6-Zellen, und unteren, mit ECV304-Zellen besetzten, Kompartiment getrennt zur Bestimmung der Interleukinfreisetzung mittels ELISA abgenommen. Die Freisetzung von IL-6 war im unteren Kompartiment immer höher als im oberen, während die Freisetzung von IL-8 im oberen immer höher war als im unteren Kompartiment (Mittelwerte, n = 2).

## 5 DISKUSSION

Feine und ultrafeine Partikel in unserer Atemluft entstammen vorwiegend aus Verbrennungsprozessen und damit überwiegend aus anthropogenen Quellen (Peters *et al.*, 1998). Epidemiologische Studien belegen, dass die Inhalation dieser Partikel zu einem Anstieg der Sterblichkeitsrate und der Erkrankungshäufigkeit aufgrund von Atemwegs- und Herz-Kreislauf-Komplikationen führt. Bereits in den 30iger Jahren wurden alarmierende Berichte über akute Auswirkungen von Luftverschmutzung im belgischen Maastal veröffentlicht (Friket, 1936). Im Jahre 1952 kam es in London durch eine 5 Tage andauernde Inversionswetterlage mit Partikelkonzentrationen bis zu  $1600 \mu\text{g}/\text{m}^3$  in der Atemluft. Die Luftverschmutzung verursachte ungefähr 4000 zusätzliche Sterbefälle (Ministry of Health, 1954). Als Antwort auf diese Episode verabschiedete die Britische Regierung 1956 die ersten Vorschriften zur Reinhaltung der Luft („*Clean Air Act*“). Die Analyse der Messdaten aus London von 1952 und einer weiteren Inversionswetterlage im Jahre 1972 zeigten, dass neben der Belastung mit Schwefeldioxid auch die Belastung mit Schwebstaub von entscheidender Bedeutung für die dramatische Erhöhung der Sterblichkeitsrate war (Ito *et al.*, 1993; Ito & Thurston, 1989; Schwartz, 1994b; Thurston *et al.*, 1989). Obwohl in den Industrieländern seit dieser Zeit immer wirksamere Maßnahmen zur Reinhaltung der Luft getroffen wurden, konnte in weitgehenden epidemiologischen Studien die Beziehung zwischen der Konzentration lungengängiger Partikel in der Atemluft und einer erhöhten Mortalität und Morbidität überzeugend aufgezeigt werden (Schwartz, 1994a). Solche Studien leisten einen wichtigen Beitrag zur Einschätzung von Gesundheitsrisiken für den Menschen, vermögen jedoch keine Aussage über die zugrunde liegenden Mechanismen beizutragen. Die pathophysiologischen Mechanismen, welche für die gesundheitlichen Beeinträchtigungen durch Partikel in der Atemluft verantwortlich sind, blieben bis heute weitgehend ungeklärt. Die Partikel könnten sowohl direkt durch Translokation oder indirekt über die Ausschüttung von Mediatoren wirken (Donaldson *et al.*, 2002; Donaldson & MacNee, 2001; Oberdörster & Utell, 2002). Zur Aufklärung der Wirkungsmechanismen wurden bisher in erster Linie Studien an Tieren und Versuche an Einzelzellkulturen durchgeführt.

## 5.1 Kokultursystem – Adaption an die realen Bedingungen

Um die Vorgänge in der Lunge nach Inhalation von Partikeln zu ergründen, muss ein geeignetes Testsystem gefunden werden. Zahlreiche Arbeiten im Bereich der Inhalationstoxikologie beruhen auf Tierversuchen. Dabei ist die Übertragbarkeit auf den Menschen jedoch schwierig. Insgesamt sind Tierversuche mit zahlreichen, nicht zuletzt auch ethischen Problemen behaftet. Der Organismus von Versuchstieren entspricht in seiner Komplexität durchaus dem des Menschen, was sich jedoch bei Untersuchungen von zellulären Wirkungsmechanismen als Nachteil erweisen kann. Die Messergebnisse unterliegen oft großen Schwankungen, die auf individuellen Unterschieden zwischen den Versuchstieren beruhen. Zudem ist die Tierhaltung mit hohen Kosten verbunden und der Zugriff auf zahlreiche zelluläre und molekulare Parameter schwierig. Hinzu kommt die Problematik, dass der Aufbau der Atemwege (Länge von Trachea und Bronchien) und der aufrechte Gang (Depositionswahrscheinlichkeit) den Menschen deutlich von den Versuchstieren unterscheiden. ~~Im Gegensatz dazu sind die *in vitro*-Studien an Zelllinien zahlreiche Vorteile. Eine Standardisierung des Testsystems ermöglicht eine hohe Reproduzierbarkeit der gewonnenen Ergebnisse. Zudem ist der Zugriff auf ein breites Spektrum von Untersuchungsmethoden möglich. In der Vergangenheit wurden zahlreiche *in vitro*-Studien an Zellkulturen durchgeführt. Dabei beschränkten sich die meisten Studien auf die Verwendung von Einzellkulturen, beispielsweise von Makrophagen oder Epithelzellen. In der Realität bleibt der Effekt eines Schadstoffes aber nicht auf einen Zelltyp begrenzt. Die Freisetzung von Mediatoren, wie Zytokinen, zeigt, dass die Antwort des Organismus auf einer Kommunikation zwischen verschiedenen Zellen beruht, die dann in einer konzertierten Aktion, beispielsweise nach einer Exposition mit Partikeln, reagieren. Für inhalationstoxikologische Fragestellungen ist das Zusammenspiel der Zellen an der Luft/Blut-Schranke in den Alveolen von besonderem Interesse. Aufgrund des Gasaustausches in der Lunge beträgt der Abstand zwischen der Gasphase und der Blutbahn nur 1 µm. In diesem Kontext ist die Aktivierung des Endothels durch die aufliegenden Epithelzellen von bisher wenig beachteter Bedeutung, bzw. in den bisher verwendeten *in vitro*-Systemen nicht nachweisbar gewesen.~~

Die zentrale Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit war die Ausarbeitung eines möglichst realitätsnahen *in vitro* Lungenmodells. An das System wurden verschiedene wichtige Anforderungen gestellt. Es sollte die Verhältnisse an der Luft/Blut-Schranke in den Alveolen nachbilden (Abb. 2.3). Dazu sollte eine Lage Epithelzellen und eine Lage Endothelzellen nur

durch eine dünne Membran getrennt gemeinsam kultiviert werden. Die verwendeten Membranen sollten den Übergang von Partikeln und Mediatoren sowie den Kontakt der Zellen durch die Membran hindurch ermöglichen. Allerdings sollte der Übergang von Zellen nicht möglich sein. Außerdem war es wünschenswert, eine durchsichtige Membran für die Beobachtung im Lichtmikroskop einzusetzen, die sich zudem gut für die Herstellung von Ultradünnschnitten für die Elektronenmikroskopie eignen sollte. Trotz dieser schwierigen Anforderungen sollte die Handhabung des Zellkulturmodells so einfach wie möglich gehalten werden, um eine standardisierte Anwendung im Laborbetrieb zu ermöglichen.

Bisher wurden Kokultursysteme für *in vitro* Studien partikelinduzierter Effekte nur in geringem Maße genutzt. Erst in den letzten Jahren wurden dazu Ansätze veröffentlicht, bei denen zumeist primäre Zellen zum Einsatz kamen. So konnte der Einfluss von partikelstimulierten primären Alveolarmakrophagen auf die Mutationsrate von Alveolarepithelzellen der Ratte gezeigt werden (Driscoll *et al.*, 1997; Knaapen *et al.*, 2002). Die Kokultur von Monozyten aus dem Blut mit BEAS-2B-Zellen führte nach der Exposition mit Ruß zu einer verstärkten Zytokinfreisetzung (Drumm *et al.*, 2000). Eine weitere Studie zeigte die verstärkte Freisetzung von TNF- $\alpha$  und MIP-2, dem analogen Zytokin der Ratte zum IL-8 des Menschen, aus einer Kokultur aus Alveolarmakrophagen mit Epithelzellen aus der Ratte nach Stimulation mit verschiedenen Partikeln (Tao & Kobzik, 2002). Die Interaktion von primären Alveolarmakrophagen und primären Bronchialepithelzellen (HBECs) in Kokulturen führte zu verstärkter Zytokinfreisetzung nach Behandlung mit PM<sub>10</sub> (Fujii *et al.*, 2002). All diese Arbeiten beschränkten sich auf die Interaktion von Makrophagen mit Lungenepithelzellen. Kokulturen aus mehr als diesen zwei Zelltypen wurden bislang nicht beschrieben.

In anderen Forschungsbereichen wird ebenfalls an der Etablierung von Kokultursystemen geforscht. Für den Stofftransport über Gewebegrenzen hinweg wurde beispielsweise ein *in vitro* Modell der Blut/Hirn-Schranke aus zwei verschiedenen Zelltypen entwickelt (Fenart *et al.*, 1999; Hurst & Fritz, 1996). Mit der Kokultur von retinalen Pigmentepithelzellen und choroidalen Endothelzellen konnte ein *in vitro* Modell zur Erforschung der Zell/Zell-Kommunikation des Augenhintergrundes etabliert werden (Fan *et al.*, 2002). Bei der Erforschung von Melanomen werden häufig Kokulturen aus Fibroblasten oder Keratinozyten, beispielsweise mit Karzinoma-Zellen eingesetzt (Bartholomew *et al.*, 2002; Fagot *et al.*, 2002; Hirobe *et al.*, 2002; Lei *et al.*, 2002; Okazaki *et al.*, 2003; Phan *et al.*, 2002).

Als Grundlage für die Entwicklung des Triple-Kokultursystems wurde das bereits für eine Kokultur aus der humanen Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B und der humanen Endothelzelllinie ECV304 erfolgreich angewendete Transwell®-Membransystem ausgewählt (Mögel,

1998; Mögel *et al.*, 1998). Als geeignete Membranvariante fiel die Entscheidung auf Polyestermembranen mit einer Porenweite von 0,4 µm, welche die oben genannten Anforderungen erfüllten. Die Transwell®-Membran sollte im oberen Kompartiment mit Epithelzellen und Makrophagen besetzt werden. Eine besondere Herausforderung stellte die Anheftung von Endothelzellen auf der Unterseite der Membran dar (Abb. 4.34).

Als Vorarbeit mussten Zelllinien für Epithelzellen, Endothelzellen und Makrophagen gefunden und auf ihre Eignung für das Kokultursystem geprüft werden. Dazu gehörte auch die Untersuchung der individuellen Empfindlichkeit der unterschiedlichen Zelllinien für die eingesetzten Partikel. Da der Mensch im Zentrum der umweltmedizinischen Forschung steht, sollten bevorzugt humane Zelllinien zur Anwendung kommen.

Als Endothelzellen lag die Verwendung der ECV304-Zelllinie nahe (Takahashi *et al.*, 1990). Diese Zelllinie steht im Verdacht, unmittelbar nach ihrer Etablierung mit der Blasenkarzinom-Zelllinie T24 kontaminiert worden zu sein, jedoch belegen neuere Arbeiten die endothelialen Merkmale und die Eignung dieser Zellen als Modell für Endothelzellen (Dirks *et al.*, 1999; Suda *et al.*, 2001).

Die humane Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B wurde, wie bereits erwähnt schon in Kokulturen mit ECV304-Zellen eingesetzt. Zudem war diese Zelllinie bereits etabliert, so dass eine Verwendung für das Kokulturmodell ebenfalls nahe lag. Für ein Modell der Luft/Blut-Schranke wären jedoch Alveolarepithelzellen eine bessere Wahl als Bronchialepithelzellen. Zudem ergaben sich mit den BEAS-2B-Zellen weitere Probleme. Die Zellen heften sich nicht leicht an den Untergrund von Zellkulturgefäßen an, sondern benötigen dafür eine Beschichtung aus Kollagen, Fibronectin und BSA („bovine serum albumin“). Für das Ablösen wird ebenfalls eine spezielle Behandlung (PET-Lösung, SBIT-Lösung, siehe 3.2.2) benötigt. Die BEAS-2B-Zellen sind als einzige der verwendeten Zelllinien auf ein serumfreies Medium angewiesen, so dass die Kokultur mit den anderen Zelllinien einen zusätzlichen Problemfaktor beinhaltete. Bei den durchgeführten Kokulturen von BEAS-2B- mit ECV304-Zellen wurde den ECV304-Zellen das Serum entzogen, so dass die Kokultur nur über einen kurzen Zeitraum aufrecht erhalten werden kann (Mögel, 1998). Zudem agglomerieren Hämatit-Partikel sehr schnell in dem serumfreien Medium der BEAS-2B-Zellen. Diese Partikel waren für den Einsatz bei transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen vorgesehen.

Deshalb wurde die humane Alveolarepithelzelllinie A549 für Kokultursysteme ausgewählt. Die A549-Zelllinie wurde im Rahmen dieser Dissertation im Labor neu etabliert. Im Gegensatz zum serumfreien Zellkulturmedium (KGM) für die BEAS-2B-Zellen ist im A549-Medium ein Anteil von 10 % FCS enthalten. Die Zellkulturmedien aller anderen verwendeten

Zelllinien enthalten ebenfalls 10 % FCS. Dadurch erwies sich der Einsatz von A549-Zellen in Kokultursystemen wesentlich unproblematischer als der Einsatz von BEAS-2B-Zellen. Zudem stellte die Verwendung von Alveolarepithelzellen statt Bronchialepithelzellen eine weitere Annäherung an die Realität der Luft/Blut-Schranke dar.

Es bestand die Befürchtung, dass A549-Zellen nach Erreichen einer konfluenten Zellschicht durch Apoptose absterben könnten. Diese Bedenken gründeten auf einer persönlichen Information von Prof. Borlak, Institut für Toxikologie und experimentelle Medizin, Hannover. Deshalb wurde die Apoptose-Induktion während der Langzeitkultur von A549-Zellen untersucht, jedoch ohne apoptotische Effekte nachweisen zu können. Tatsächlich erwiesen sich die A549-Zellen in Kultur auch über mehrere Tage als ein vitales Zellsystem, in dem nach 120 Stunden Dauerkultur noch ungefähr 90 % aller Zellen lebten (Abb. 4.2).

Die Auswahl einer geeigneten Makrophagenzelllinie war zusätzlich eine sehr wichtige Aufgabe. Bei der Erstellung des Kokulturmodells sollte bewusst auf die Verwendung von Primärzellen verzichtet werden, da der Zugriff auf Primärzellen zum einen nur beschränkt möglich ist und zum anderen die Reaktionen durch die unterschiedliche Krankengeschichte und genetische Prädisposition der Patienten häufig zu schwer reproduzierbaren Versuchsergebnissen führt. Nach umfangreicher Recherche kamen allein die Zelllinien THP-1 und Mono Mac 6 in Betracht (Tsuchiya *et al.*, 1980; Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1988). Die THP-1-Zellen können durch die Inkubation mit 8 nM TPA zu Makrophagen differenziert werden, während bei den Mono Mac 6-Zellen ein Anteil von ungefähr 22 % aller Zellen zu Makrophagen differenziert vorliegt (Tsuchiya *et al.*, 1982; Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1994). Beide Zelllinien wurden auf ihre Eignung für Kokulturen überprüft. Dazu wurde die Präsentation des CD14-Rezeptors auf der Oberfläche der Zellen als Marker für Monozyten und Makrophagen mit primären Monozyten verglichen. Die Untersuchung zeigte, dass etwa 19 % der Mono Mac 6-Zellen diesen Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren, während nach 48 Stunden Inkubation mit 8 nM TPA 23 % der THP-1-Zellen CD14 exprimieren (Abb. 4.3). Aus diesem Grund wurden die Versuche mit THP-1-Makrophagen stets mit 48 Stunden differenzierten Zellen durchgeführt. Weiterführende Untersuchungen der beiden Makrophagenzelllinien im Vergleich zu primären Monozyten zeigten grundsätzlich ähnliche Reaktionen nach Inkubation mit den Partikeln, jedoch waren die Antworten der primären humanen Monozyten durchweg ausgeprägter als die der beiden Zelllinien. Dies zeigt sich vor allem in der Interleukin-Produktion, die bei den primären Monozyten um den Faktor 1000 gegenüber den Zelllinien erhöht war. Auch zeigte sich eine geringere Phagozytoserate von *E. coli* und Latex-Partikeln durch die THP-1- und Mono Mac 6-Zellen im Vergleich zu primären Zellen (Ball, 2002). Jedoch sind beide Linien

grundsätzlich als Makrophagen für Kokulturen geeignet. Zudem beeinflusst der Zell/Zell-Kontakt in der Kokultur die Differenzierung der Makrophagen zusätzlich. THP-1-Zellen nehmen in Kokultur mit den A549-Zellen charakteristische Merkmale von Alveolar-makrophagen an. (Striz *et al.*, 2001).

Der Vorteil der THP-1-Zellen ist die definierte Differenzierung mit Hilfe von 8 nM TPA im Zellmedium zu Makrophagen und die umfangreichere Dokumentation in der Literatur. Die Möglichkeit, die Mono Mac 6-Zellen ohne Differenzierung direkt in Kokultursystemen zu verwenden, war jedoch gerade in den angestrebten, komplizierten Mehrfachzellkulturen ein verfahrenstechnischer Vorteil.

Von den THP-1-Zellen war bekannt, dass sie den FAS-Liganden konstitutiv auf der Oberfläche exprimieren und damit in der Lage sind, nach Kontakt Apoptose in anderen Zellen auszulösen (Bremner *et al.*, 1999). In Kokulturen von A549- und THP-1-Zellen konnte jedoch über einen Zeitraum von 72 Stunden keinerlei Erhöhung der Apoptoserate festgestellt werden (Abb. 4.32). Der Versuch bestätigte wiederum die schon im Versuch mit der Langzeitkultur beobachtete Vitalität von A549-Zellkulturen.

Aufgrund der deutlich unproblematischeren Eigenschaften wurden die Mono Mac 6-Zellen für den Einsatz im Triple-Zellkultursystem ausgewählt. Ohne besondere Behandlung zur Differenzierung kann mit einem Anteil von 20 % Makrophagen gerechnet werden und es sind bislang keine weiteren nachteiligen Eigenschaften wie die Induktion von Apoptose durch THP-1-Zellen beschrieben.

Damit war die Auswahl der Zelllinien für das Triple-Zellkultursystem getroffen. Als Endothelzelllinie wurden ECV304-, als Epithelzelllinie A549- und als Makrophagenzelllinie die Mono Mac 6-Zellen ausgewählt. Für den Einsatz in Kokultursystemen musste die Reaktion jeder Zelllinie auf die verschiedenen verwendeten Partikelsorten überprüft werden.

Die Voraussetzungen für einfache Kokultursysteme aus Epithelzellen und Makrophagen waren zu diesem Zeitpunkt schon gegeben (Abb. 4.29, Abb. 4.30 und Abb. 4.31). Die Ergebnisse aus den Kokulturen von A549-Zellen und THP-1- oder Mono Mac 6-Zellen zeigten eine gesteigerte Sensitivität für die Behandlung mit Partikeln im Vergleich zu den Einzelzellkulturen und werden im weiteren noch ausführlicher diskutiert (siehe 5.2).

Für das Triple-Zellkultursystem mussten A549- und ECV304-Zellen für längere Zeit zusammen kultiviert werden. Um Einflüsse auf das Wachstum und die Vitalität der jeweiligen Fremdmedien auf die Zelllinien zu untersuchen, wurden Wachstumskurven von beiden Zelllinien im eigenen und im Fremdmedium aufgenommen. Dabei zeigten beide Zelllinien in dem M199-Medium der ECV304-Zellen das beste Wachstum. Insgesamt war die Auswirkung der

unterschiedlichen Zellkulturmedien auf die Wachstumsrate als gering einzustufen (Abb. 4.36 und Abb. 4.37). Zusätzlich wurden die Zellen mit Trypanblau angefärbt, um einen Effekt des Fremdmediums auf die Vitalität der Zellen festzustellen. Jedoch konnte kein erhöhter Anteil an toten Zellen gefunden werden, wobei wiederum die höchste Vitalität beider Zelllinien im M199-Medium der ECV304-Zellen beobachtet wurde (Abb. 4.37).

Um drei verschiedenen Zelltypen in einer gemeinsamen Kultur zu halten, mußten noch weitere, technische Probleme gelöst werden. Dazu gehörte die Anheftung der Zellen auf Ober- und Unterseite der Membran. Zellen wachsen nicht entgegen der Schwerkraft an einer Membran fest. Deshalb musste die Anheftung der Zellen nacheinander erfolgen. Um die Membran des Transwell®-Einsatzes auch umgedreht mit Flüssigkeiten überschichten zu können, wurde ein spezielles Ringsystem entwickelt. Das Ringsystem wird auf den Transwell®-Einsatz aufgesteckt. Als Material wurde Teflon verwendet, so dass die Ringe optimal über die Einsätze gleiten können und zudem autoklavierbar sind. Die Dichtung zwischen Ring und Transwell®-Einsatz erfolgte durch mehrere Lagen autoklaviertes Teflonband. Mehrere Versuchsreihen mit A549- und ECV304-Zellen zeigten, dass eine stabile Anheftung der Zellen auf der Membran einen relativ langen Zeitraum beansprucht. Nach 90 Minuten fielen die meisten Zellen nach dem Umwenden des Transwell®-Einsatzes ins untere Kompartiment herab. Ein Lösung für dieses Problem wurde durch die Beschichtung der Membran mit Proteinen der extrazellulären Matrix gefunden. Nach einer Beschichtung mit Kollagen und Fibronectin heften sich sowohl A549- als auch ECV304-Zellen nach 40 Minuten stabil an die Membran an (Tab. 4.1).

Es lag nahe, zuerst die ECV304-Zellen auf der Unterseite der Membran anzuheften, danach den Transwell®-Einsatz in die Well-Platte einzusetzen und die A549-Zellen im oberen Kompartiment auszusäen. Leider führte diese Vorgehensweise zu Abstoßungsreaktionen zwischen den verschiedenen Zelltypen. Sobald die ECV304-Zellen die Membran besetzen, heften sich die A549-Zellen nicht mehr auf der Oberseite an, sondern kugeln sich ab und verbleiben im Medium in Suspension. Dieser Effekt beruht auf der in einem multizellulären Organismus lebenswichtigen Gewebespezifität von Zellen. Die Kontaktinhibition zweier Zelltypen in Kokulturen wurde schon in anderen Arbeiten belegt. So inhibierten transformierte A31-Zellen das Wachstum in Kokulturen mit anderen Zelltypen (Sakamoto *et al.*, 1999). Dagegen verlieren Krebszellen häufig die Kontaktinhibition und wachsen jenseits ihrer vorgegebenen Gewebegrenzen (Maciuleviciute *et al.*, 1996). Dies ist letztendlich die Voraussetzung zur Bildung von Metastasen. Die Kokultur von Krebszellen zusammen mit Mesothelzellen wiederum hemmt das Wachstum der Krebszellen durch parakrine Interaktionen zwischen den Zelltypen (van der Wal *et al.*, 1997). Es gibt deutliche Hinweise, dass die Ausschüttung von Botenstoffen

aus Erythrozyten und Endothelzellen die Anheftung von Tumorzellen in Blutgefäßen verhindert (van Rossen *et al.*, 1999; van Rossen *et al.*, 2001). Somit ist zu verstehen, warum die ECV304-Zellen als Endothel eine Anheftung der A549-Zellen unmöglich machen. Im Grunde ist diese Eigenschaft eine Bestätigung für die endothelialen Merkmale der ECV304-Zellen. Der Effekt der Kontaktinhibition konnte durch die Beschichtung der Membran abgemildert, aber nicht verhindert werden. Zur Lösung des Problems wurden die A549-Zellen zuerst und in deutlich größerer Anzahl auf der Membran angesiedelt, auch wenn sich der Ablauf dadurch komplizierte. Die ECV304-Zellen heften sich trotz der A549-Zellen auf der anderen Seite der beschichteten Membran an. Abschließend wurden Mono Mac 6-Zellen in das obere Kompartiment gegeben. Dabei war von Vorteil, dass die Mono Mac 6-Zellen auch ohne Differenzierung in der Kokultur eingesetzt werden können, was die zeitliche Koordination der Zelllinien und des Versuchsablaufs im Vergleich zur Verwendung der THP-1-Zellen wesentlich erleichterte.

Eine weitere Schwierigkeit bestand darin, eine Möglichkeit der Dokumentation zu finden, ob die Anheftung der Zellen tatsächlich gelungen war, da eine einfache lichtmikroskopische Kontrolle mit differentiellem Interferenzkontrast aufgrund der lichtstreuenden und lichtdepolarisierenden Polyestermembran nicht möglich war. Zur Lösung dieses Problems wurden die A549- und ECV304-Zellen mit fluoreszierenden Proteinen durch transiente Transfektion mit entsprechenden Expressionvektoren markiert. Die Durchführung gestaltete sich schwierig, da das Protokoll der transienten Transfektion in das Protokoll zur Erstellung des Triple-Zellkulturmodells integriert werden musste. Mit dem Gelingen dieses Experimentes konnte dann allerdings erfolgreich nachgewiesen werden, dass die Membran tatsächlich von oben mit A549- und von unten mit ECV304-Zellen besiedelt war (Abb. 4.39).

Die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) zwischen den Kompartimenten diente als Maß für die Geschlossenheit einer Zellschicht und kann ohne Nebenwirkung direkt in den eingesetzten Kulturgefäßen durchgeführt werden (Kraut *et al.*, 1992; Mischler *et al.*, 1990). Je dichter die Zellschicht gewachsen ist, desto höher ist die elektrische Isolierung zwischen den Kompartimenten, was sich in einem steigenden TEER-Wert messen lässt. Die Messung in den Triple-Zellkulturen zeigte einen Anstieg des TEER Wertes im Vergleich zur Kontrolle ohne Zellen und lässt darauf schließen, dass die Zellschichten zwischen 24 und 26 Stunden zur konfluenten Zellschicht ausgewachsen waren (Abb. 4.40).

Ein überzeugender Nachweis für den Aufbau des Triple-Zellkultursystems konnte durch die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen erbracht werden. Die Schichtung der

Epithelzellen auf der Oberseite der Transwell®-Membran und der Endothelzellen auf der Unterseite ist eindeutig belegt und entspricht genau der gestellten Zielsetzung (Abb. 4.41).

Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit neu entwickelte Triple-Zellkultursystem als Modell der Luft/Blut-Schranke im Alveolus stellt eine Weiterentwicklung der bisher verfügbaren Kokultursysteme dar. Speziell für inhalationstoxikologische Fragestellungen bietet dieses System die Möglichkeit, die Rolle der Endothelzellen an den systemischen Gesundheitsbeeinträchtigungen nach Inhalation von Partikeln mit einzubeziehen. Auch andere Anwendungen sind vorstellbar, wie beispielsweise der Transport von Pharmaka in partikulärer Form über die Luft/Blut-Schranke hinweg (Ehrhardt *et al.*, 2002).

## **5.2 Ultrafeine Partikel – Je kleiner der Partikel desto größer die Wirkung**

Bei der Auswahl der Partikel, die in den Experimenten verwendet werden sollten, fiel die Entscheidung auf Modellpartikel, da so die Charakterisierung des Zellmodells als auch verschiedener Meßparameter, wie der Partikelgröße, möglich sein sollte. Reale Flugstäube enthalten ein Gemisch von Partikel unterschiedlichster Größe und chemischer Zusammensetzung (Diabate *et al.*, 2002). Eine Auftrennung der Partikeleffekte nach verschiedenen Parametern wird dadurch erheblich erschwert, die Validität des Modells schlechter abschätzbar. Das besondere Augenmerk lag dabei auf der Fraktion der ultrafeinen Partikel mit einer Größe unter 100 nm. Deren gesundheitlichen Auswirkungen sind bisher kaum untersucht. In Erfurt wurde im Winter 1991/92 die Größenverteilung der Partikel über ein halbes Jahr hinweg parallel zu einer Kohortenstudie bestimmt. Bei erwachsenen Asthmatikern wurde dabei eine Beeinträchtigung der Lungenfunktion in Assoziation mit der Anzahl ultrafeiner Partikel als in Assoziation mit der Masse der feinen Partikel ermittelt. Die Häufigkeit von Atemwegssymptomen war weiterhin deutlich stärker mit der Anzahl der ultrafeinen Partikel als mit  $PM_{10}$  assoziiert (Penttinen *et al.*, 2001; Peters *et al.*, 1997). Dagegen konnten in einer finnischen Studie bei Kindern mit Asthma keine stärkeren Effekte von ultrafeinen Partikeln im Vergleich mit  $PM_{10}$  nachgewiesen werden (Pekkanen *et al.*, 1997). Die Auswertung der von 1992 bis 2000 in Erfurt gesammelten Daten lässt durchaus den Schluss zu, dass ultrafeine Partikel einen besonderen Anteil an den gesundheitlichen Beeinträchtigungen durch die Inhalation von Schwebstaub haben. Die Maßnahmen zur Luftreinhaltung führten zu einer deutlichen Abnahme der Massenkonzentration von Schwebstaub, gleichzeitig jedoch nahm die Anzahl ultrafeiner Partikel in der Atemluft zu. Die Reduktion der Massenkonzentration führte jedoch nicht zu einem Rückgang der Atemwegserkrankungen, während sogar eine Zunahme

der Häufigkeit von Allergien bei Schulkindern festzustellen war (Ebelt *et al.*, 2001; Heinrich *et al.*, 2002; Ibald-Mulli *et al.*, 2002; Wichmann *et al.*, 2000).

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass neben den chemischen Eigenschaften der Partikel die Anzahl bzw. die Oberfläche der Partikel für die beobachteten pathophysiologischen Prozesse verantwortlich sein könnten (Oberdörster *et al.*, 1992; Oberdörster *et al.*, 1994; Seaton *et al.*, 1995). In einfacheren Worten ausgedrückt: Je kleiner die Partikel, desto größer die gesundheitlichen Auswirkungen. Diese Hypothese wurde durch Tierversuche untermauert (Oberdörster *et al.*, 1992). Dabei erregte eine Studie Aufsehen, bei der Ratten ultrafeinen Teflonpartikeln ausgesetzt waren. Die Exposition endete für alle Tiere nach vier Stunden mit einem akuten hämorrhagischen Lungenödem mit massivem Einstrom von Leukozyten und anschließendem Lungen und Herzversagen. Es wurde vermutet, dass diese Effekte auf toxische Komponenten zurückgeführt werden konnten, die auf der Partikeloberfläche assoziiert waren (Oberdörster *et al.*, 1995).

In der vorliegenden Arbeit sollte, neben der Entwicklung eines realitätsnahen *in vitro* Modells der Luft/Blut-Schranke, die oben genannte Hypothese überprüft werden. Die eingesetzten ultrafeinen Modellpartikel wurden am Institut für technische Chemie (ITC), Forschungszentrum Karlsruhe, hergestellt. Hämatit-Partikel ( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) und amorphe Silikat-Partikel (SiO<sub>2</sub>, Silicasol) gelten gemeinhin als ungiftig. Die Hämatit-Partikel haben den Vorteil, durch ihre rote Färbung nach Agglomeration in den Zellen sichtbar zu werden und sind auch im Transmissionselektronenmikroskop sehr deutlich zu erkennen. Mit einem durchschnittlichen aerodynamischen Durchmesser von 70 nm wurden Hämatit-Partikel als ultrafeine Partikel klassifiziert. Die Silicasol-Partikel standen in unterschiedlicher Größe mit den Durchmessern 100, 60 und 40 nm zur Verfügung, waren aber chemisch völlig identisch. Unterschiede in der Wirkung der eingesetzten Silicasol-Partikel auf Zellen können nur durch die Größe, demnach von der zur Verfügung stehenden Oberfläche erklärt werden. Zudem wurden kristalline Quarz-Partikel (DQ12) eingesetzt, die aufgrund ihrer mit radikalischen Gruppen besetzten Oberfläche, für ihre starke toxische Wirkung bekannt sind (Borm & Tran, 2002; Clouter *et al.*, 2001; Donaldson & Borm, 1998; Driscoll *et al.*, 1996; Polzer *et al.*, 1994; Schimmelpfeng & Seidel, 1991; Wilczek *et al.*, 1989).

Die allgemeine zytotoxische Wirkung auf die eingesetzten Zellen wurde durch mehrere Methoden analysiert. Dazu wurden LDH-Assay und MTT-Assay sowie fluoreszenzbasierende Methoden, wie das Sytox®Green Assay angewendet. Dabei zeigte sich eine weitgehende Übereinstimmung der Ergebnisse aus den Versuchen mit den verschiedenen Methoden. Die verschiedenen Zelllinien zeigten eine sehr unterschiedliche und charakteristische

Empfindlichkeit für die eingesetzten Partikel. Die zytotoxische Wirkung der ultrafeinen Partikel lies eine strikte Dosis-Wirkungs-Beziehung erkennen. Partikel-induzierte Apoptose konnte bei den A549-Zellen mit Hilfe durchflusszytometrischer Analyse nach einer Annexin-V-FITC/Propidiumiodid-Färbung ausgeschlossen werden und spielt bei der Wirkung von Partikeln auf Epithelzellen höchstwahrscheinlich keine Rolle (Abb. 4.23). Die zytotoxische Wirkung beruht also auf einer nekrotischen Wirkung der Partikel auf die Zellen. Bei allen Zellen, außer den Mono Mac 6-Zellen, zeigt Quarz immer eine starke zytotoxische Wirkung. Somit scheint die chemische Beschaffenheit der Partikel auch grundsätzlich den toxischen Effekt eines Partikels auf die Zellen zu determinieren. Bei den ultrafeinen, aber chemisch ungiftigen Partikeln zeigten die kleinen S-60- und S-40-Partikel immer einen stärkeren Effekt als die größeren S-100-Partikel.

Der Unterschied kann nur auf das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen zurückgeführt werden. Nimmt man das Volumen eines S-100-Partikels, so passen rein rechnerisch 15,625 S-40-Partikel hinein. Die Oberfläche dieser S-40-Partikel hat dabei die 2,5fache Größe der Oberfläche des S-100 Partikels

Der Anteil toter Zellen war nach einer Behandlung mit den S-40-Partikeln nur bei den ECV304-Zellen deutlich höher einzustufen als nach der Behandlung mit S-60-Partikeln. Möglicherweise bilden die S-40-Partikel eine stabilere Suspension und setzen sich langsamer ab, so dass die tatsächliche Dosis, welche die Zellen innerhalb der Inkubationszeit erreicht geringer ausfällt als bei Verwendung von S-60-Partikeln. Zudem neigen besonders kleine Partikel ab einem bestimmten Durchmesser dazu, Agglomerate zu bilden (Beck-Speier *et al.*, 2001; Oberdörster *et al.*, 1994). Bei allen untersuchten adhärennten Zelllinien, also BEAS-2B-, A549- und ECV304-Zellen ist die Abstufung der zytotoxischen Wirkung der untoxischen Partikeln mit dem Partikeldurchmesser korreliert. Die S-60-Partikel (60 nm) wirken zytotoxischer als Hämatit-Partikel (70 nm), dieser wiederum zeigten einen stärkeren toxischen Effekt als S-100-Partikel. Damit wird die aufgestellte Hypothese, je kleiner der Partikel, desto höher seine Wirkung, in diesen Systemen bestätigt. Es muss aber beachtet werden, dass immer die gleiche Partikelmasse eingesetzt wurde, also bei kleineren Partikeln deren Zahl und Oberfläche erheblich größer waren.

Die Zelllinien reagierten sehr unterschiedlich auf die Behandlung mit den verschiedenen Partikeln. Die A549-Aleolarepithelzellen zeigten nur eine geringe Empfindlichkeit für die ultrafeinen Partikel. Dagegen reagierten BEAS-2B-Bronchialepithelzellen und ECV304-Endothelzellen sehr empfindlich auf die Behandlung mit Partikeln. Die Sensitivität der Makrophagenzelllinien ist dagegen schlecht vergleichbar. THP-1-Zellen reagieren sehr

schnell und hochempfindlich auf Quarz- und Hämatit-Partikel, Mono Mac 6-Zellen lassen sich anhand der vorliegenden Versuchsergebnisse nicht einordnen. Über die Gründe für diese unterschiedlichen Reaktionen der Zelllinien auf die verwendeten Partikel lässt sich nur spekulieren. Möglicherweise gibt es einen Zusammenhang mit der Aufnahmefähigkeit der unterschiedlichen Zelltypen für Partikel unterschiedlicher Größe. Bei Makrophagen und in diesem Zusammenhang bei den THP-1-Zellen, ist die Fähigkeit zur Phagozytose beschrieben (Tsuchiya *et al.*, 1980; Tsuchiya *et al.*, 1982). Die Phagozytose von Hämatit-Partikeln konnte zudem unter dem Lichtmikroskop dokumentiert werden (Abb. 4.4). Die Quarz-Partikel sind deutlich größer als die Hämatit- und Silicasol-Partikel und werden wahrscheinlich ebenfalls schnell von den THP-1-Zellen phagozytiert. Über die Phagozytose der Silicasol-Partikel liegen jedoch keine Daten vor. Ein Vergleich der Phagozytose von Latex-Partikeln, *E. coli*-Bakterien und ultrafeinen Titandioxid-Partikeln zeigte eine deutlich geringere Phagozytoseaktivität von Mono Mac 6-Zellen im Vergleich zu THP-1-Zellen (Ball, 2002). Die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber verschiedenen Partikeln scheint also mit deren Phagozytose durch die Zellen korreliert zu sein. Bei den Epithel- und Endothelzellen ist die Fähigkeit zur Aufnahme von Partikeln weitgehend ungeklärt. A549-Epithelzellen sind in der Lage, Hämatit- und andere Partikel an die Oberfläche zu binden und zu internalisieren (Stringer *et al.*, 1996). Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden und wird im weiteren ausführlicher erörtert (siehe 5.3). Dabei bleibt der Aufnahmemechanismus jedoch noch ungeklärt. Über die BEAS-2B-Zellen, andere Bronchialepithelzellen sowie die ECV304- oder andere Endothelzellen liegen bislang keine Arbeiten vor.

Bei der Analyse der Produktion und Freisetzung von Interleukinen sowie der Zell/Zell-Interaktion in Kokulturen darf die zytotoxische Wirkung durch die Partikel-Behandlung nicht zu falschen Interpretationen der Messergebnisse führen. Für die Interaktionsexperimente sollte der subtoxische Konzentrationsbereich für die verschiedenen eingesetzten Partikel und die eingesetzten Zellen ermittelt werden. Nach Auswertung aller Ergebnisse aus den Zytotoxizitätstests wurde eine Konzentration von 50 µg/ml bis maximal 100 µg/ml Partikelsuspension von den Hämatit- und Silicasol-Partikeln als eine Konzentration angesehen, die innerhalb von 24 Stunden einerseits partikelinduzierte Wirkungen erkennen lässt, andererseits die Zellen nicht in der Vitalität beeinträchtigt. Bei allen gemessenen Partikeln in allen Konzentrationen folgte eine Zunahme von toten Zellen über der Zeit. Bei den Kurven für die Silicasol-Partikel (mit Ausnahme der S-60-Partikel in einer Konzentration von 200 µg/ml) ist dieser Anstieg erst nach 32 Stunden zu erkennen. Die Zellen wurden mit unlöslichen Partikeln behandelt. Im Organismus werden eingeatmete unlösliche Partikel über die Selbstreinigungsmechanismen

der Lunge abtransportiert (Oberdörster *et al.*, 1980; Oberdörster *et al.*, 1997; Svartengren *et al.*, 2001). In der Zellkultur können diese Partikel nicht abtransportiert oder abgebaut werden, sondern verbleiben an ihrem Wirkungsort. Im Organismus würde ein Verbleiben in den Alveolen zu chronischen Symptomen führen (Brauer *et al.*, 2001; Hesterberg *et al.*, 1996; Roemer *et al.*, 1993).

Zytokine sind Protein-Mediatoren, die hauptsächlich von Zellen des Immunsystems gebildet werden. Die Rolle von Epithelzellen als Syntheseorte für Zytokine wurde lange unterschätzt, weil angenommen wurde, dass sie nur als passive Barriere zu betrachten sind. Heute ist bekannt, dass Epithelzellen auf Schädigungen, beispielsweise aus der Umwelt, auch mit der Freisetzung von Zytokinen reagieren (Stadnyk, 1994). Zytokine modulieren das Verhalten von Zellen in autokriner und/oder parakriner Weise und signalisieren ihnen, sich auf bestimmte physiologische Veränderungen einzustellen. Sie binden mit hoher Affinität an ihre Rezeptoren und sind daher nur in geringen Konzentrationen nötig.

Zur Untersuchung der Entzündungsreaktionen wurde die Messung der Zytokine IL-6 und IL-8 ausgewählt. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit TNF- $\alpha$  behandelt.

IL-6 und TNF- $\alpha$  gehören zu einer Gruppe von Zytokinen, die als proinflammatorisch oder als endogene Pyrogene (fieber-induzierende Substanzen) bezeichnet werden. Sie werden nach Aktivierung von immunkompetenten Zellen durch bestimmte Alarmsignale induziert und in die Blutbahn freigesetzt. Diese Alarmsignale können entweder körperfremde (exogene Pyrogene, wie beispielsweise bakterielle Endo- und Exotoxine, Viren, Medikamente) oder körpereigene Substanzen wie beispielsweise DNA, RNA oder Hitzeschockproteine aus geschädigten Zellen sein (Matzinger, 2002). IL-6 stimuliert das Knochenmark zur Produktion und Freisetzung von Leukozyten und Blutplättchen in den Blutkreislauf. Zudem wird die Leber durch IL-6 zur Produktion von Akut-Phase-Proteinen angeregt (Suwa *et al.*, 2001; Suwa *et al.*, 2002; van Eeden *et al.*, 2001). Diese Proteine erscheinen innerhalb weniger Stunden nach einer Partikelexposition im Blutkreislauf. Möglicherweise sind sie für multiple Effekte auf das kardiovaskuläre System verantwortlich, wie zum Beispiel die erhöhte Koagulationsfähigkeit des Blutes (MacNee & Donaldson, 2000; Nemmar *et al.*, 2002b). Bei den Akut-Phase-Proteinen handelt es sich um löslichen Faktoren, wie Serum-Amyloid A, Fibrinogen, Komplementfaktoren oder „*C-reactive protein*“. Die Wirkung dieser Proteine beinhaltet eine Steigerung der Phagozytosefähigkeit von Makrophagen, die Aktivierung des Komplementsystems, die Kontrolle des Gerinnungssystems und die Unterstützung von Wundheilungsprozessen.

sen. Die Akut-Phase-Antwort ist charakterisiert durch Erhöhung der Leukozytenzahl, Fieber und erhöhte Gefäßdurchlässigkeit (Wehmeier & Kliche, 1992).

IL-8 gehört zu den Chemokinen. Das sind Mediatoren, die für die Aktivierung und Wanderung von weißen Blutzellen (Leukozyten) ins Gewebe notwendig sind. Sie induzieren die Leukozyten zur Bindung an Endothelzellen und zur Wanderung in die Richtung der höchsten Konzentration des Chemokins. Chemokine sind kleine Proteine, die aus ca. 60 - 70 Aminosäuren bestehen (Molekulargewicht 8-12 kDa). IL-8 ist ein Chemokin, das neutrophile Granulozyten anlockt und zu den betroffenen Geweben leitet. Granulozyten zählen, wie die Monozyten, zu den Fresszellen und leiten sich aus den gleichen Stammzellen im Knochenmark ab. Ihre Aufgabe ist die Phagozytose von Krankheitserregern und Fremdkörpern. Die Exposition von Lungenepithelzellen mit Partikeln regt die IL-8-Ausschüttung an und aktiviert Makrophagen, die durch die Freisetzung von TNF- $\alpha$  die IL-8-Abgabe der Epithelzellen noch verstärken (Keman *et al.*, 1997).

Das als Positivkontrolle verwendete TNF- $\alpha$ , ursprünglich entdeckt als anti-Tumor-Faktor, wird vor allem von Monozyten und Makrophagen gebildet, die z.B. durch LPS, Protozoen, Lymphokine oder Phagozytose von Mikroorganismen aktiviert wurden. TNF- $\alpha$  mRNA wird auch in nicht-aktivierten Makrophagen gebildet, aber nicht zur Proteinsynthese benutzt. TNF- $\alpha$  wirkt autokrin auf Monozyten und Makrophagen und parakrin auf Granulozyten und zytotoxische Lymphozyten (T-Zellen) und steigert deren Phagozytosefähigkeit und Zytotoxizität. TNF- $\alpha$  wirkt aber auch direkt auf Tumoren (Schädigung der Blutgefäße durch mangelnde Blut- und Sauerstoffversorgung, massive Blutungen) und zytotoxisch auf Tumorzellen, wahrscheinlich durch Bildung von Enzymen und freien Radikalen, die zum Zelltod führen.

Bei chronischen Entzündungen und Tumorerkrankungen kann TNF- $\alpha$  zu Kachexie (allgemeine Auszehrung, Verlust der Fettreserven, Schwund der Muskelmasse) führen. Der Grund ist, dass TNF- $\alpha$  die Lipoprotein-Lipase hemmt, die für die normale Fettspeicherung verantwortlich ist. Das führt zum Verbrauch der Proteinreserven und führt über die Induktion von IL-1 zu einer Proteolyse des Muskels (Wehmeier & Kliche, 1992).

Diese Zytokine spielen auch in den verwendeten Zellkulturen eine große Rolle und es konnte gezeigt werden, dass ultrafeine Partikel ihre Produktion und Freisetzung induzieren. Bei allen Zelltypen konnte eine Dosis-Wirkungs-Beziehung bei der IL-6 und IL-8-Ausschüttung beobachtet werden.

Bemerkenswert ist die hohe Sekretion von IL-8 nach Stimulation der A549-Zellen. Die gemessenen Konzentrationen übertreffen die Freisetzung aus den BEAS-2B-Zellen fast um das 10fache. Dabei ist die IL-8-Abgabe bei den größeren Quarz- und S-100-Partikeln höher als bei den kleineren Partikeln. Möglicherweise werden die kleineren Hämatit-, S-60- und S-40-Partikel in die A549-Zellen aufgenommen, während die größeren Partikel die Aktivierung und Rekrutierung von Makrophagen über die Freisetzung von Chemokinen auslöst. Dagegen bleibt die IL-6-Ausschüttung eher gering, außer bei der Aktivierung durch TNF- $\alpha$  (Abb. 4.25). Die BEAS-2B-Zellen dagegen reagierten mit einer höheren Freisetzung von IL-6, insbesondere als Reaktion auf die Behandlung mit den kleinen S-60- und S-40-Partikeln, während die IL-8-Freisetzung nur sehr gering ausfiel (Abb. 4.24). *In vivo* beruht die Selbstreinigung in den Bronchien und Bronchiolen in erster Linie auf einem beständigen Strom von *Mucus* in Richtung der Speiseröhre. Dabei spielen die Cilien der Bronchialepithelzellen eine wichtige Rolle. Größere Partikel werden so sehr schnell abtransportiert während die kleineren Partikel dort möglicherweise für längere Zeit zwischen den Cilien verbleiben und zu chronischen Entzündungsreaktionen führen könnten (Peters *et al.*, 1998). Dieses Verhalten blieb *in vitro* ähnlich, die Zellen schütteten nur wenig IL-8 aus, um Makrophagen zu aktivieren, zeigten jedoch eine Entzündungsreaktion auf die Behandlung mit den ultrafeinen Partikeln.

Die Makrophagenzelllinien THP-1 und Mono Mac 6 zeigen fast eine identische IL-8 Freisetzung. Die IL-6-Ausschüttung befindet sich nach der Stimulation mit Partikeln ebenfalls auf einem vergleichbaren Niveau, jedoch setzen die Mono Mac 6-Zellen nach der Stimulation mit TNF- $\alpha$  sehr viel IL-6 frei (Abb. 4.27 und Abb. 4.26). Makrophagen nehmen Partikel durch Endozytose auf und geben dabei TNF- $\alpha$  in die Umgebung ab (Gu & Seidel, 1996; Muller *et al.*, 1989; Schimmelpfeng & Seidel, 1991). Die Ausschüttung von TNF- $\alpha$  führt zu einer Art autokrinen Aktivierung der Makrophagen. In den Versuchen reagieren die Zellen jedoch nur in geringem Ausmaß auf die Behandlung mit den Partikeln (Abb. 4.27 und Abb. 4.28).

In der Realität könnten Endothelzellen nur mit Partikeln in Berührung kommen, wenn diese an den Epithelzellen vorbei oder hindurch transportiert wird (Translokation). In diesem Fall sind auch die ECV304-Zellen in der Lage, IL-6 und IL-8 freizusetzen.

Bei allen Zelllinien konnte eine starke Reaktion auf die Behandlung mit Quarz-Partikeln beobachtet werden. Dies ist bemerkenswert, denn die durchgeführten Zytotoxizitätsstudien zeigten, dass die Quarz-Partikel in hohen Konzentrationen zu einem großen Vitalitätsverlust führten (Schimmelpfeng & Seidel, 1991).

Die Interaktionen zwischen den Alveolarmakrophagen und den Alveolarepithelzellen könnte zur Verstärkung der Entzündungsreaktion nach Exposition mit Partikeln führen. In Kokulturen von Alveolarmakrophagen und Epithelzellen aus der Ratte wurde eine Erhöhung der Ausschüttung von TNF- $\alpha$  und MIP-2 festgestellt, während Kokulturen von Epithelzellen mit Fibroblasten keine Steigerung der Zytokin-Produktion hervorriefen (Tao & Kobzik, 2002).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kokulturen aus humanen Zellen reagierten generell mit einer erhöhten Empfindlichkeit auf die Behandlung mit Partikeln in Bezug auf IL-6- und IL-8-Freisetzung im Vergleich zu den untersuchten Einzelzellkulturen. Dies lässt auf eine wichtige Rolle der Zell/Zell Interaktionen bei Entzündungsreaktionen schließen. Dabei handelt es sich nicht um einen additiven Effekt. Zum Beispiel setzen die A549-Zellen nach einer Behandlung mit 200  $\mu\text{g/ml}$  S-60-Partikel 40  $\text{pg/ml}$  IL-6 und 350  $\text{pg/ml}$  IL-8, THP-1-Zellen bei gleicher Behandlung 22  $\text{pg/ml}$  IL-6 und 168  $\text{pg/ml}$  IL-8 frei. Ein rein additiver Effekt beider Zelllinien würde in der Kokultur Messwerte von ungefähr 60  $\text{pg/ml}$  IL-6 und 520  $\text{pg/ml}$  IL-8 erwarten lassen. Tatsächlich wurden in der Kokultur aber 1440  $\text{pg/ml}$  IL-6 und 4945  $\text{pg/ml}$  IL-8 nachgewiesen. Dabei wurde noch nicht einmal mit einberechnet, dass die Makrophagen in der Kokultur in einer im Verhältnis 1:10 geringeren Zelldichte eingesetzt wurden, die in Kontrollversuchen alleine zu keinen messbaren Interleukin-Ausschüttungen führten. Das bedeutet eine deutliche Erhöhung der Sensitivität der Kokulturen gegenüber den Einzelzellkulturen weit über den additiven Effekt hinaus, so dass viel mehr ein starkes synergistisches Zusammenspiel der beiden Zelltypen zu postulieren ist. Dieses Verhalten der Kokulturen im Vergleich zu den Einzelzellkulturen war sowohl unter Verwendung von THP-1- wie Mono Mac 6-Zellen zu beobachten (Abb. 4.33). Der synergistische Effekt ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Makrophagen durch die Partikelstimulierung TNF- $\alpha$  freisetzen und über diesen Weg die Epithelzellen zur erhöhten Freisetzung von Interleukinen anregen, wie durch die Positivkontrolle in den Versuchen belegt wird (Driscoll *et al.*, 1995; Drost & MacNee, 2002; Jimenez *et al.*, 2002; Jorna *et al.*, 1994).

In den Triple-Zellkulturen konnten bei weitem nicht so viele Werte zur Interleukin-Freisetzung wie bei den Einzelzellkulturen und Kokulturen gemessen werden. Während die Einzel- und Kokulturversuche in 96-Well-Platten durchgeführt wurden, kamen bei der Triple-Zellkultur in erster Linie 6- und 12-Well-Platten zum Einsatz, wobei der Aufwand bei der Triple-Zellkultur deutlich höher war, als für die anderen Kulturen. Zudem lag der Schwerpunkt auf der Entwicklung und Dokumentation des Triple-Zellkultursystems. Deshalb wurden in erster Linie Hämatit-Partikel vor allem auch wegen der besseren Eignung für die Transmissionselektronenmikroskopie eingesetzt. Somit ist noch nicht für alle Parameter eine statisti-

sche Absicherung vorhanden. Trotz dieser Einschränkungen zeigen die bisher ermittelten Daten, dass auch in der Triple-Zellkultur ein synergistischer Effekt vorliegt. Im oberen und unteren Kompartiment werden unterschiedliche Volumina an Zellkulturmedium eingesetzt. Zum Vergleich zwischen der Freisetzung ins obere und untere Kompartiment wurden die gemessenen Konzentrationen als Gesamtmenge an Interleukin im Medium umgerechnet. Dabei zeigte sich, dass die ECV304-Zellen eine deutlich höhere Menge an IL-6 freisetzen als die A549-Zellen. Dagegen ist die Abgabe von IL-8 im oberen und unteren Kompartiment ungefähr gleich (Abb. 4.44). Die ECV304-Zellen schütteten auch in der Einzelzellkultur mehr IL-6 aus als die A549-Zellen. Wie oben ausgeführt, hat IL-6 eher eine systemische Wirkung über den Blutkreislauf, während IL-8 chemotaktische Wirkung auf die Granulozyten ausübt. Möglicherweise sind die Endothelzellen an der systemischen Wirkung von Partikeln in einem größeren Umfang beteiligt, als dies bisher angenommen werden konnte. Mit Hilfe des in der vorliegenden Arbeit entwickelten Triple-Zellkultursystems könnten neue Erkenntnisse über die Rolle der Endothelzellen und der indirekten, mediatorvermittelten Auswirkungen von Partikelexposition gewonnen werden.

### **5.3 Aufnahme und intrazellulärer Transport von Partikeln**

Neben der indirekten Wirkung von Partikeln auf die Gesundheit des Menschen über die Freisetzung von Mediatoren, wird auch eine direkte Wirkung, durch die Translokation von Partikeln über die Luft/Blut-Schranke hinweg, diskutiert.

Bislang konnte die Translokation von Partikeln nur in einigen wenigen Fällen gezeigt werden. Eine der ersten Veröffentlichungen zu diesem Thema belegte eine Translokation vom Alveolarraum in die Lymphknoten von Ratten, mit der Überlegung, dass der Transport von den Granulozyten als Carrier bewerkstelligt werden könnte (Lehnert *et al.*, 1986). Bislang konnte keine weitere Arbeit diese Hypothese belegen. Einige Arbeitsgruppen haben seither erfolgreich die Translokation von Partikeln bei Ratte, Hamster und Mensch über die Luft/Blut-Schranke hinweg und eine Deposition der Partikel in Leber und Milz nachgewiesen (Nemmar *et al.*, 2001; Nemmar *et al.*, 2002a; Oberdörster *et al.*, 2000). In anderen Publikationen war dagegen keine nennenswerte Translokation von Partikeln über die Blut/luft-Schranke hinweg gezeigt worden, sondern eher eine Wanderung der Partikel über die Luftröhre in den Magen/Darmtrakt der Versuchstiere (Kreyling *et al.*, 2002). Es könnte daher eher spekuliert werden, ob die Translokation von Partikeln über das Darmepithel und nicht über die

Luft/Blut-Schranke stattfindet. Jüngst konnte an isolierten Rattenlungen mit Polystyrolpartikeln trotz umfangreicher Studien keine Translokation dieser Partikel detektiert werden (Borm *et al.*, 2003). Die vorliegenden Daten über Translokationen von Partikeln über die Blut/Luft-Schranke hinweg sind also begrenzt und stehen durchaus im Widerspruch zueinander.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein von den oben zitierten Arbeiten abweichender Ansatz zur Aufklärung der Translokation gewählt. Es sollte untersucht werden, ob ultrafeine Partikel im Zellkulturmodell von Alveolarepithelzellen aufgenommen und transportiert werden können. Durch den Einsatz des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Triple-Zellkulturmodells ergibt sich sogar die Möglichkeit, eine Translokation von Partikeln von Alveolarepithelzellen zu Endothelzellen zu analysieren. Die Aufnahme von ultrafeinen Partikeln durch Epithelzellen ist bislang nur wenig erforscht. Zu Beginn der Arbeit lag lediglich eine Publikation vor, die Aufnahme von Hämatit- und Titandioxid-Partikeln in A549-Zellen zeigte und zudem die Existenz eines Oberflächenrezeptors für diese Partikel postulierte (Stringer *et al.*, 1996).

Hämatit-Partikel haben den Vorteil, sowohl im Licht- als auch im Transmissionselektronenmikroskop deutlich sichtbar zu sein (Abb. 4.6). Grundsätzlich sind Partikel mit einem Durchmesser von 70 nm nicht im Lichtmikroskop sichtbar, jedoch werden die Partikel nach ihrer Aufnahme in den Zellen als Agglomerate oder in Organellen gesammelt, die sich durch eine kräftige Rotfärbung auszeichnen. Nach einer Inkubation mit Hämatit-Partikeln waren diese Agglomerate in den THP-1-, A549- und ECV304-Zellen deutlich zu erkennen. Somit sind neben den Makrophagen sowohl Alveolarepithelzellen als auch Endothelzellen grundsätzlich dazu befähigt, Partikel ins Innere aufzunehmen. Dabei waren die Hämatit-Partikel in den A549-Zellen zumeist in charakteristischer Weise als Ring um die Kernregion gelagert, während die Partikel bei den ECV304-Zellen zumeist zentral konzentriert vorlagen (Abb. 4.4 und Abb. 4.5).

Mit Hilfe der transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte die Aufnahme von den Hämatit-Partikeln in die A549-Zellen deutlicher dokumentiert werden (Abb. 4.7). Innerhalb von 16 Stunden waren zahlreiche Agglomerate in die Zellen aufgenommen und in Richtung der basolateralen Membran transportiert worden. In der Nähe von Partikeln auf der Zellmembran waren auffallend häufig Zellfortsätze in unmittelbarer Nähe der Partikel zu erkennen, die den Eindruck einer aktiven Aufnahme erweckte, wie es beispielsweise für THP-1-Zellen unter dem Lichtmikroskop gezeigt und auch dokumentiert werden konnte (Abb. 4.4). Die Verteilung nach der Aufnahme spiegelt dabei das Bild der lichtmikroskopischen Aufnahmen wider (Abb. 4.8). Insgesamt ist mit zunehmender Inkubationsdauer die Tendenz zum Transport der Partikel in Richtung der basolateralen Membran zu beobachten

(Abb. 4.9 und Abb. 4.11). Dabei bleibt unklar, nach welchem Mechanismus die Aufnahme und der Transport erfolgt. Unter Endozytose versteht man die Aufnahme durch die Abschnürung von Membranvesikeln in die Zelle. In mehr als 100 Aufnahmen gibt es jedoch keinen Hinweis auf das Abschnüren eines Membranvesikels mit Partikeln in das Zellinnere oder gar einen Hinweis für die Existenz einer rezeptorvermittelten Phagozytose. Möglicherweise liegt der Aufnahme der Partikel ein unspezifischer Mechanismus zugrunde. In den Zellen sind um die Partikel herum Strukturen zu erkennen, bei denen es sich um Membranen oder Organellen handeln könnte. Auch bei starker Vergrößerung konnte keine Aussage über die Art dieser Struktur um die Partikel herum getroffen werden (Abb. 4.10). Agglomerierte ultrafeine Partikel in Epithelzellen wurden bereits in einer weiteren Arbeit als in lose oder fest gepackte Laminarkörperchen eingebettet beschrieben (Stearns *et al.*, 2001). Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (Abb. 4.9 C).

Es bleibt festzuhalten, dass Hämatit-Partikel von den A549-Zellen aufgenommen und in Richtung der basolateralen Membran transportiert werden. Auffallend waren die Zellfortsätze, die sich von den Zellen den Partikeln entgegenstreckten.

Der Transport zu den Endothelzellen konnte im etablierten System nur durch die Poren der Kunststoffmembran erfolgen. In den Aufnahmen zeigte sich, dass die Zellen Fortsätze in diese Poren ausstrecken (Abb. 4.43 A). Bei primären Rinder-Alveolarmakrophagen konnte bereits ein ähnliches Verhalten beobachtet werden (Wilczek, 1991). Ob die Zellen dabei tatsächlich Zell/Zell-Kontakte zur Unterseite ausbilden konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig geklärt werden. Jedoch wurden in einigen Präparaten Hämatit-Partikel in den ECV304-Zellen auf der Unterseite der Membran gefunden. Es war nicht zu erwarten, dass Hämatit-Partikel in großer Zahl durch die Membran transportiert werden würden. Da der Transport durch die Poren hindurch erfolgen mußte, sollten ECV-Zellen mit Partikeln auch mit Poren assoziiert sein. Eine solche Konstellation konnte in Abb. 4.43 B dokumentiert werden. Für eine Aussage, ob tatsächlich Partikel von den Zellen aus dem oberen in das untere Kompartiment transloziert werden, liegen allerdings noch nicht genügend Daten vor.

Mit Hilfe des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Triple-Zellkulturmodells der Luft/Blut-Schranke ist die Erforschung der Translokation und der zugrunde liegenden Mechanismen *in vitro* möglich geworden. Ob die indirekte Wirkung von ultrafeinen Partikeln auf die Gesundheit des Menschen durch Translokation über die Blut/Luft-Schranke tatsächlich eine Rolle spielt, werden zukünftige Forschungsarbeiten zeigen müssen.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

**Anderson, L., Stone, V., Donaldson, K. & Guy, K.** (2002) Fibrinogen Synthesis in the Lung in Response to Particulate Air Pollution. *Ann. Occup. Hyg.* **46**: 440-443.

**Atkinson, R. W., Bremner, S. A., Anderson, H. R., Strachan, D. P., Bland, J. M. & de Leon, A. P.** (1999) Short-term associations between emergency hospital admissions for respiratory and cardiovascular disease and outdoor air pollution in London. *Arch. Environ. Health* **54**: 398-411.

**Ball, C** (2002). Die Beeinflussung zellulärer Funktionen bei Makrophagen durch ultrafeine Partikel. Thesis/Dissertation, Universität Karlsruhe

**Bartholomew, A., Sturgeon, C., Siatskas, M., Ferrer, K., McIntosh, K., Patil, S., Hardy, W., Devine, S., Ucker, D., Deans, R., Moseley, A. & Hoffman, R.** (2002) Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp. Hematol.* **30**: 42-48.

**Beck-Speier, I., Dayal, N., Karg, E., Maier, K. L., Roth, C., Ziesenis, A. & Heyder, J.** (2001) Agglomerates of ultrafine particles of elemental carbon and TiO<sub>2</sub> induce generation of lipid mediators in alveolar macrophages. *Environ. Health Perspect.* **109 Suppl 4**: 613-618.

**Becker, S., Soukup, J. M., Gilmour, M. I. & Devlin, R. B.** (1996) Stimulation of human and rat alveolar macrophages by urban air particulates: effects on oxidant radical generation and cytokine production. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **141**: 637-648.

**Borm, P., Bagate, K., Meiring, J., Höhr, D., Kreyling, W. & Semmler, M.** (2003) Pulmonary inflammation and systemic effects of ambient particles. *Zwischenbericht anlässlich des Statusseminars des BWPLUS, Forschungszentrum Karlsruhe.*

**Borm, P. J. & Tran, L.** (2002) From quartz hazard to quartz risk: the coal mines revisited. *Ann. Occup. Hyg.* **46**: 25-32.

**Brauer, M., Ebel, S. T., Fisher, T. V., Brumm, J., Petkau, A. J. & Vedal, S.** (2001) Exposure of chronic obstructive pulmonary disease patients to particles: respiratory and cardiovascular health effects. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* **11**: 490-500.

**Brauer, M., Hirtle, R. D., Hall, A. C. & Yip, T. R.** (1999) Monitoring personal fine particle exposure with a particle counter. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* **9**: 228-236.

- Bremner, T. A., Chatterjee, D., Han, Z., Tsan, M. F. & Wyche, J. H.** (1999) THP-1 monocytic leukemia cells express Fas ligand constitutively and kill Fas-positive Jurkat cells. *Leuk Res* **23**: 865-870.
- Brown, D. M., Stone, V., Findlay, P., MacNee, W. & Donaldson, K.** (2000) Increased inflammation and intracellular calcium caused by ultrafine carbon black is independent of transition metals or other soluble components. *Occup. Environ. Med.* **57**: 685-691.
- Brunekreef, B., Dockery, D. W. & Krzyzanowski, M.** (1995) Epidemiologic studies on short-term effects of low levels of major ambient air pollution components. *Environ. Health Perspect.* **103 Suppl 2**: 3-13.
- Chen, L. C., Fine, J. M., Qu, Q. S., Amdur, M. O. & Gordon, T.** (1992) Effects of fine and ultrafine sulfuric acid aerosols in guinea pigs: alterations in alveolar macrophage function and intracellular pH. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **113**: 109-117.
- Churg, A. & Brauer, M.** (2000) Ambient atmospheric particles in the airways of human lungs. *Ultrastruct. Pathol.* **24**: 353-361.
- Clouter, A., Brown, D., Hohr, D., Borm, P. & Donaldson, K.** (2001) Inflammatory effects of respirable quartz collected in workplaces versus standard DQ12 quartz: particle surface correlates. *Toxicol. Sci.* **63**: 90-98.
- Cornell, R.** (1969) Cell-substrate adhesion during cell culture. An ultrastructural study. *Exp. Cell Res.* **58**: 289-295.
- Cullen, R. T., Tran, C. L., Buchanan, D., Davis, J. M., Searl, A., Jones, A. D. & Donaldson, K.** (2000) Inhalation of poorly soluble particles. I. Differences in inflammatory response and clearance during exposure. *Inhal. Toxicol.* **12**: 1089-1111.
- Denizot, F. & Lang, R.** (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* **89**: 271-277.
- Devalia, J. L. & Davies, R. J.** (1993) Airway epithelial cells and mediators of inflammation. *Respir. Med.* **87**: 405-408.
- Diabate, S., Mulhopt, S., Paur, H. R., Wottrich, R. & Krug, H. F.** (2002) In vitro effects of incinerator fly ash on pulmonary macrophages and epithelial cells. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **204**: 323-326.

**Dirks, W. G., MacLeod, R. A. & Drexler, H. G.** (1999) ECV304 (endothelial) is really T24 (bladder carcinoma): cell line cross- contamination at source. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim* **35**: 558-559.

**Dockery, D. W.** (2001) Epidemiologic evidence of cardiovascular effects of particulate air pollution. *Environ. Health Perspect.* **109 Suppl 4**: 483-486.

**Dockery, D. W. & Pope, C. A., III.** (1994) Acute respiratory effects of particulate air pollution. *Annu. Rev. Public Health* **15**: 107-132.

**Dockery, D. W., Pope, C. A., III, Xu, X., Spengler, J. D., Ware, J. H., Fay, M. E., Ferris, B. G., Jr. & Speizer, F. E.** (1993) An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N. Engl. J. Med.* **329**: 1753-1759.

**Dockery, D. W., Speizer, F. E., Stram, D. O., Ware, J. H., Spengler, J. D. & Ferris, B. G., Jr.** (1989) Effects of inhalable particles on respiratory health of children. *Am. Rev. Respir. Dis* **139**: 587-594.

**Donaldson, K. & Borm, P. J.** (1998) The quartz hazard: a variable entity. *Ann. Occup. Hyg.* **42**: 287-294.

**Donaldson, K., Brown, D., Clouter, A., Duffin, R., MacNee, W., Renwick, L., Tran, L. & Stone, V.** (2002) The pulmonary toxicology of ultrafine particles. *J. Aerosol Med.* **15**: 213-220.

**Donaldson, K. & MacNee, W.** (2001) Potential mechanisms of adverse pulmonary and cardiovascular effects of particulate air pollution (PM10). *Int. J. Hyg. Environ. Health* **203**: 411-415.

**Donaldson, K., Stone, V., Seaton, A. & MacNee, W.** (2001) Ambient particle inhalation and the cardiovascular system: potential mechanisms. *Environ. Health Perspect.* **109 Suppl 4**: 523-527.

**Driscoll, K. E., Deyo, L. C., Carter, J. M., Howard, B. W., Hassenbein, D. G. & Bertram, T. A.** (1997) Effects of particle exposure and particle-elicited inflammatory cells on mutation in rat alveolar epithelial cells. *Carcinogenesis* **18**: 423-430.

**Driscoll, K. E., Hassenbein, D. G., Carter, J. M., Kunkel, S. L., Quinlan, T. R. & Mossman, B. T.** (1995) TNF alpha and increased chemokine expression in rat lung after particle exposure. *Toxicol Lett* **82-83**: 483-489.

**Driscoll, K. E., Howard, B. W., Carter, J. M., Asquith, T., Johnston, C., Detilleux, P., Kunkel, S. L. & Isfort, R. J.** (1996) Alpha-quartz-induced chemokine expression by rat lung epithelial cells: effects of in vivo and in vitro particle exposure [see comments]. *Am J Pathol* **149**: 1627-1637.

**Drost, E. M. & MacNee, W.** (2002) Potential role of IL-8, platelet-activating factor and TNF-alpha in the sequestration of neutrophils in the lung: effects on neutrophil deformability, adhesion receptor expression, and chemotaxis. *Eur. J. Immunol.* **32**: 393-403.

**Drumm, K., Attia, D. I., Kannt, S., Micke, P., Buhl, R. & Kienast, K.** (2000) Soot-exposed mononuclear cells increase inflammatory cytokine mRNA expression and protein secretion in cocultured bronchial epithelial cells. *Respiration* **67**: 291-297.

**Ebelt, S., Brauer, M., Cyrus, J., Tuch, T., Kreyling, W. G., Wichmann, H. E. & Heinrich, J.** (2001) Air quality in postunification Erfurt, East Germany: associating changes in pollutant concentrations with changes in emissions. *Environ. Health Perspect.* **109**: 325-333.

**Ehrhardt, C., Fiegel, J., Fuchs, S., Abu-Dahab, R., Schaefer, U. F., Hanes, J. & Lehr, C. M.** (2002) Drug absorption by the respiratory mucosa: cell culture models and particulate drug carriers. *J. Aerosol Med.* **15**: 131-139.

**Fagot, D., Asselineau, D. & Bernerd, F.** (2002) Direct role of human dermal fibroblasts and indirect participation of epidermal keratinocytes in MMP-1 production after UV-B irradiation. *Arch. Dermatol. Res.* **293**: 576-583.

**Fan, W., Zheng, J. J. & McLaughlin, B. J.** (2002) An in vitro model of the back of the eye for studying retinal pigment epithelial-choroidal endothelial interactions. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim* **38**: 228-234.

**Fenart, L., Casanova, A., Dehouck, B., Duhem, C., Slupek, S., Cecchelli, R. & Betbeder, D.** (1999) Evaluation of effect of charge and lipid coating on ability of 60-nm nanoparticles to cross an in vitro model of the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* **291**: 1017-1022.

**Friket, J.** (1936) Fog along the Muese Valley. *Trans. Faraday Soc.* **32**: 1192-1197.

**Fujii, T., Hayashi, S., Hogg, J. C., Mukae, H., Suwa, T., Goto, Y., Vincent, R. & van Eeden, S. F.** (2002) Interaction of alveolar macrophages and airway epithelial cells following exposure to particulate matter produces mediators that stimulate the bone marrow. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **27**: 34-41.

- Fujii, T., Hayashi, S., Hogg, J. C., Vincent, R. & van Eeden, S. F.** (2001) Particulate matter induces cytokine expression in human bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **25**: 265-271.
- Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H. & Parks, W. P.** (1973) In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **51**: 1417-1423.
- Gold, D. R., Litonjua, A., Schwartz, J., Lovett, E., Larson, A., Nearing, B., Allen, G., Verrier, M., Cherry, R. & Verrier, R.** (2000) Ambient pollution and heart rate variability. *Circulation* **101**: 1267-1273.
- Gu, Y. & Seidel, A.** (1996) Influence of salbutamol and isoproterenol on the production of TNF and reactive oxygen species by bovine alveolar macrophages and calcitriol differentiated HL-60 cells. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **18**: 115-128.
- Haidaris, P. J.** (1997) Induction of fibrinogen biosynthesis and secretion from cultured pulmonary epithelial cells. *Blood* **89**: 873-882.
- Hanks, J. H. & Wallace, J. H.** (1958) Determination of cell viability. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **98**: 188-192.
- Heinrich, J., Frye, C., Holscher, B., Meyer, I., Pitz, M., Cyrus, J., Schneller, H., Wjst, M. & Wichmann, H. E.** (2002) [Environmental surveys in the areas of Bitterfeld, Hettstedt and a comparative area in 1992-2000]. *Gesundheitswesen* **64**: 675-682.
- Hesterberg, T. W., McConnel, E. E., Müller, W. C., Chevalier, J., Everitt, J., Thevenaz, P., Fleissner, H. & Oberdörster, G.** (1996) Use of lung toxicity and lung particle clearance to estimate the maximum tolerated dose (MTD) for a fiber glass chronic inhalation study in the rat. *Fundam. Appl. Toxicol.* **32**: 31-44.
- Heyder, J.** (1982a) Alveolar deposition of inhaled particles in humans. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **43**: 864-866.
- Heyder, J.** (1982b) Particle transport onto human airway surfaces. *Eur. J. Respir. Dis Suppl* **119**: 29-50.
- Hirobe, T., Furuya, R., Akiu, S., Ifuku, O. & Fukuda, M.** (2002) Keratinocytes control the proliferation and differentiation of cultured epidermal melanocytes from ultraviolet radiation B-induced pigmented spots in the dorsal skin of hairless mice. *Pigment Cell Res.* **15**: 391-399.

- Hoek, G., Dockery, D. W., Pope, A., Neas, L., Roemer, W. & Brunekreef, B.** (1998) Association between PM10 and decrements in peak expiratory flow rates in children: reanalysis of data from five panel studies. *Eur. Respir. J.* **11**: 1307-1311.
- Hornberg, C., Maciuleviciute, L. & Seemayer, N. H.** (1996) Sister chromatid exchanges in rodent tracheal epithelium exposed in vitro to environmental pollutants. *Toxicol. Lett.* **88**: 45-53.
- Hurst, R. D. & Fritz, I. B.** (1996) Nitric oxide-induced perturbations in a cell culture model of the blood-brain barrier. *J. Cell Physiol* **167**: 89-94.
- Ibald-Mulli, A., Wichmann, H. E., Kreyling, W. & Peters, A.** (2002) Epidemiological evidence on health effects of ultrafine particles. *J. Aerosol Med.* **15**: 189-201.
- Ito, K. & Thurston, G. D.** (1989) Characterization and reconstruction of historical London, England, acidic aerosol concentrations. *Environ. Health Perspect.* **79**: 35-42.
- Ito, K., Thurston, G. D., Hayes, C. & Lippmann, M.** (1993) Associations of London, England, daily mortality with particulate matter, sulfur dioxide, and acidic aerosol pollution. *Arch. Environ. Health* **48**: 213-220.
- Jimenez, L. A., Drost, E. M., Gilmour, P. S., Rahman, I., Antonicelli, F., Ritchie, H., MacNee, W. & Donaldson, K.** (2002) PM(10)-exposed macrophages stimulate a proinflammatory response in lung epithelial cells via TNF-alpha. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **282**: L237-L248.
- Jorna, T. H., Schins, R. P., Lenaerts, L., Derhaag, T. J., Wouters, E. F. & Borm, P. J.** (1994) Airflow obstruction and monocyte TNF release in coal workers. *Exp. Lung Res.* **20**: 421-431.
- Kagan, V. E., Fabisiak, J. P., Shvedova, A. A., Tyurina, Y. Y., Tyurin, V. A., Schor, N. F. & Kawai, K.** (2000) Oxidative signaling pathway for externalization of plasma membrane phosphatidylserine during apoptosis. *FEBS Lett.* **477**: 1-7.
- Ke, Y., Reddel, R. R., Gerwin, B. I., Miyashita, M., McMenamin, M., Lechner, J. F. & Harris, C. C.** (1988) Human bronchial epithelial cells with integrated SV40 virus T antigen genes retain the ability to undergo squamous differentiation. *Differentiation* **38**: 60-66.
- Keman, S., Willemse, B., Tollerud, D. J., Guevarra, L., Schins, R. P. & Borm, P. J.** (1997) Blood interleukin-8 production is increased in chemical workers with bronchitic symptoms. *Am. J. Ind. Med.* **32**: 670-673.

**Knaapen, A. M., Schins, R. P., Polat, D., Becker, A. & Borm, P. J.** (2002) Mechanisms of neutrophil-induced DNA damage in respiratory tract epithelial cells. *Mol. Cell Biochem.* **234-235**: 143-151.

**Korn, R. J., Dockery, D. W., Speizer, F. E., Ware, J. H. & Ferris, B. G., Jr.** (1987) Occupational exposures and chronic respiratory symptoms. A population-based study. *Am. Rev. Respir. Dis* **136**: 298-304.

**Koutrakis, P., Brauer, M., Briggs, S. L. & Leaderer, B. P.** (1991) Indoor exposures to fine aerosols and acid gases. *Environ. Health Perspect.* **95**: 23-28.

**Kraut, J. A., Mishler, D. R., Aboolian, A. & Nagami, G. T.** (1992) Platelet-activating factor attenuates the arginine vasopressin-induced fall of transepithelial resistance across inner medullary collecting duct monolayers. *Miner. Electrolyte Metab* **18**: 9-14.

**Kreyling, W. G., Semmler, M., Erbe, F., Mayer, P., Takenaka, S., Schulz, H., Oberdörster, G. & Ziesenis, A.** (2002) Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *J. Toxicol. Environ. Health A* **65**: 1513-1530.

**Lang, D. S., Schocker, H. & Hockertz, S.** (2001) Effects of crocidolite asbestos on human bronchoepithelial-dependent fibroblast stimulation in coculture: the role of IL-6 and GM-CSF. *Toxicology* **159**: 81-98.

**Lehnert, B. E., Valdez, Y. E. & Stewart, C. C.** (1986) Translocation of particles to the tracheobronchial lymph nodes after lung deposition: kinetics and particle-cell relationships. *Exp. Lung Res.* **10**: 245-266.

**Lei, T. C., Virador, V. M., Vieira, W. D. & Hearing, V. J.** (2002) A melanocyte-keratinocyte coculture model to assess regulators of pigmentation in vitro. *Anal. Biochem.* **305**: 260-268.

**Liao, D., Creason, J., Shy, C., Williams, R., Watts, R. & Zweidinger, R.** (1999) Daily variation of particulate air pollution and poor cardiac autonomic control in the elderly. *Environ Health Perspect* **107**: 521-525.

**Lieber, M., Smith, B., Szakal, A., Nelson-Rees, W. & Todaro, G.** (1976) A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int. J. Cancer* **17**: 62-70.

**Maciuleviciute, L., Hornberg, C. & Seemayer, N. H.** (1996) Rodent tracheal epithelial cells in vitro: a comparative study of normal cells, enhanced growth variants, SV-40 transformed cells and their interactions. *Toxicol. Lett.* **88**: 55-64.

**MacNee, W. & Donaldson, K.** (2000) How can ultrafine particles be responsible for increased mortality? *Monaldi Arch. Chest Dis.* **55**: 135-139.

**Matijevic, E. & Scheiner, F.** (1978) Ferric hydrous oxide sols: III. Preparation of uniform particles by hydrolysis of Fe(III)-chloride, -nitrate, and -perchlorate solutions. *J. Coll. Interf. Sci.* **63**: 509-524.

**Matzinger, P.** (2002) The danger model: a renewed sense of self. *Science* **296**: 301-305.

**Mills, P. R., Davies, R. J. & Devalia, J. L.** (1999) Airway epithelial cells, cytokines, and pollutants. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **160**: S38-S43.

**Ministry of Health.** (1954) Mortality and Morbidity during the London fog of December, 1952. *Her Majesty's Stationery Office. Reports on public health and medical subjects* **95**.

**Mishler, D. R., Kraut, J. A. & Nagami, G. T.** (1990) AVP reduces transepithelial resistance across IMCD cell monolayers. *Am. J. Physiol* **258**: F1561-F1568.

**Mögel, M** (1998). Partikel- und ozoninduzierte Entzündungsreaktionen in der Lunge: Wechselwirkungen und Reaktionen von Bronchialepithelzellen und Endothelzellen *in vitro*. Thesis/Dissertation, Universität Karlsruhe

**Mögel, M., Kruger, E., Krug, H. F. & Seidel, A.** (1998) A new coculture-system of bronchial epithelial and endothelial cells as a model for studying ozone effects on airway tissue. *Toxicol. Lett.* **96-97**: 25-32.

**Mosmann, T.** (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**: 55-63.

**Muller, H. L., Drosselmeyer, E., Hotz, G., Seidel, A., Thiele, H. & Pickering, S.** (1989) Behaviour of spherical and irregular (U,Pu)O<sub>2</sub> particles after inhalation or intratracheal instillation in rat lung and during in vitro culture with bovine alveolar macrophages. *Int. J. Radiat. Biol.* **55**: 829-842.

**Nemmar, A., Hoet, P. H., Vanquickenborne, B., Dinsdale, D., Thomeer, M., Hoylaerts, M. F., Vanbilloen, H., Mortelmans, L. & Nemery, B.** (2002a) Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* **105**: 411-414.

**Nemmar, A., Hoylaerts, M. F., Hoet, P. H., Dinsdale, D., Smith, T., Xu, H., Vermylen, J. & Nemery, B.** (2002b) Ultrafine particles affect experimental thrombosis in an in vivo hamster model. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **166**: 998-1004.

**Nemmar, A., Vanbilloen, H., Hoylaerts, M. F., Hoet, P. H., Verbruggen, A. & Nemery, B.** (2001) Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **164**: 1665-1668.

**Noah, T. L., Paradiso, A. M., Madden, M. C., McKinnon, K. P. & Devlin, R. B.** (1991) The response of a human bronchial epithelial cell line to histamine: intracellular calcium changes and extracellular release of inflammatory mediators. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **5**: 484-492.

**Oberdörster, G.** (1995) Lung particle overload: implications for occupational exposures to particles. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **21**: 123-135.

**Oberdörster, G.** (2001) Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **74**: 1-8.

**Oberdörster, G., Cox, C. & Gelein, R.** (1997) Intratracheal instillation versus intratracheal-inhalation of tracer particles for measuring lung clearance function. *Exp. Lung Res.* **23**: 17-34.

**Oberdörster, G., Ferin, J., Gelein, R., Soderholm, S. C. & Finkelstein, J.** (1992) Role of the alveolar macrophage in lung injury: studies with ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* **97**: 193-199.

**Oberdörster, G., Ferin, J. & Lehnert, B. E.** (1994) Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ. Health Perspect.* **102 Suppl 5**: 173-179.

**Oberdörster, G., Finkelstein, J. N., Johnston, C., Gelein, R., Cox, C., Baggs, R. & Elder, A. C.** (2000) Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. *Res. Rep. Health Eff. Inst.* 5-74.

**Oberdörster, G., Gelein, R. M., Ferin, J. & Weiss, B.** (1995) Association of particulate air pollution and acute mortality: involvement of ultrafine particles? *Inhal. Toxicol.* **7**: 111-124.

**Oberdörster, G., Oldiges, H. & Zimmermann, B.** (1980) Lung deposition and clearance of cadmium in rats exposed by inhalation or by intratracheal instillation. *Zentralbl. Bakteriol. [B]* **170**: 35-43.

**Oberdörster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Lunts, A., Kreyling, W. & Cox, C.** (2002) Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J. Toxicol. Environ. Health A* **65**: 1531-1543.

**Oberdörster, G. & Utell, M. J.** (2002) Ultrafine particles in the urban air: to the respiratory tract--and beyond? *Environ. Health Perspect.* **110**: A440-A441.

**Okada, S., Fukunishi, Y., Mukherjee, A., Ramu, G. & Desikan, K. V.** (1980) An improved embedding method for electron microscopy of lepromata. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* **48**: 408-413.

**Okazaki, M., Yoshimura, K., Fujiwara, H., Suzuki, Y. & Harii, K.** (2003) Induction of hard keratin expression in non-nail-matrical keratinocytes by nail-matrical fibroblasts through epithelial-mesenchymal interactions. *Plast. Reconstr. Surg.* **111**: 286-290.

**Osunsanya, T., Prescott, G. & Seaton, A.** (2001) Acute respiratory effects of particles: mass or number? *Occup. Environ. Med.* **58**: 154-159.

**Pekkanen, J., Timonen, K. L., Ruuskanen, J., Reponen, A. & Mirme, A.** (1997) Effects of ultrafine and fine particles in urban air on peak expiratory flow among children with asthmatic symptoms. *Environ. Res.* **74**: 24-33.

**Penttinen, P., Timonen, K. L., Tiittanen, P., Mirme, A., Ruuskanen, J. & Pekkanen, J.** (2001) Number concentration and size of particles in urban air: effects on spirometric lung function in adult asthmatic subjects. *Environ. Health Perspect.* **109**: 319-323.

**Peters, A., Dockery, D. W., Muller, J. E. & Mittleman, M. A.** (2001) Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction. *Circulation* **103**: 2810-2815.

**Peters, A., Schulz, H., Kreyling, W. G. & Wichmann, H. E.** Handbuch Umweltmedizin. Wichmann, H. E., Schlipkötter & Fülgraf (eds.), pp. 1-20, 1998.

**Peters, A., Wichmann, H. E., Tuch, T., Heinrich, J. & Heyder, J.** (1997) Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **155**: 1376-1383.

- Phan, T. T., Lim, I. J., Bay, B. H., Qi, R., Huynh, H. T., Lee, S. T. & Longaker, M. T.** (2002) Differences in collagen production between normal and keloid-derived fibroblasts in serum-media co-culture with keloid-derived keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* **29**: 26-34.
- Polzer, G., Lind, I., Mosbach, M., Schmidt, A. & Seidel, A.** (1994) Combined influence of quartz dust, ozone and NO<sub>2</sub> on chemotactic mobility, release of chemotactic factors and other cytokines by macrophages in vitro. *Toxicol. Lett.* **72**: 307-315.
- Pope, C. A., III.** (1991) Respiratory hospital admissions associated with PM<sub>10</sub> pollution in Utah, Salt Lake, and Cache Valleys. *Arch. Environ. Health* **46**: 90-97.
- Pope, C. A., III, Dockery, D. W., Spengler, J. D. & Raizenne, M. E.** (1991) Respiratory health and PM<sub>10</sub> pollution. A daily time series analysis. *Am. Rev. Respir. Dis* **144**: 668-674.
- Pope, C. A., III, Verrier, R. L., Lovett, E. G., Larson, A. C., Raizenne, M. E., Kanner, R. E., Schwartz, J., Villegas, G. M., Gold, D. R. & Dockery, D. W.** (1999) Heart rate variability associated with particulate air pollution. *Am. Heart J.* **138**: 890-899.
- Reddel, R. R., Ke, Y., Gerwin, B. I., McMEnamin, M. G., Lechner, J. F., Su, R. T., Brash, D. E., Park, J. B., Rhim, J. S. & Harris, C. C.** (1988) Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Res.* **48**: 1904-1909.
- Robock, K.** (1973) Standard Quartz DQ12 < 5 µm for exoerimental pneumoconiosis research projects in the federal republic of Germany. *Ann. Occup. Hyg.* **16**: 63-66.
- Roemer, W., Hoek, G. & Brunekreef, B.** (1993) Effect of ambient winter air pollution on respiratory health of children with chronic respiratory symptoms. *Am. Rev. Respir. Dis.* **147**: 118-124.
- Sakamoto, Y., Takeda, Y., Takagi, H., Tsuchiya, T., Shoji, A., Miyazaki, K. & Umeda, M.** (1999) Inhibition of focus formation of transformed cloned cells by contact with non-transformed BALB/c 3T3 A31-1-1 cells. *Cancer Lett.* **136**: 159-165.
- Schimmelpfeng, J. & Seidel, A.** (1991) Cytotoxic effects of quartz and chrysotile asbestos: in vitro interspecies comparison with alveolar macrophages. *J. Toxicol. Environ. Health* **33**: 131-140.
- Schwartz, J.** (1994a) Air pollution and daily mortality: a review and meta analysis. *Environ. Res.* **64**: 36-52.

**Schwartz, J.** (1994b) What are people dying of on high air pollution days? *Environ. Res.* **64**: 26-35.

**Schwartz, J., Dockery, D. W., Neas, L. M., Wypij, D., Ware, J. H., Spengler, J. D., Koutrakis, P., Speizer, F. E. & Ferris, B. G., Jr.** (1994) Acute effects of summer air pollution on respiratory symptom reporting in children. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **150**: 1234-1242.

**Schwartz, J., Slater, D., Larson, T. V., Pierson, W. E. & Koenig, J. Q.** (1993) Particulate air pollution and hospital emergency room visits for asthma in Seattle. *Am. Rev. Respir. Dis.* **147**: 826-831.

**Seaton, A., MacNee, W., Donaldson, K. & Godden, D.** (1995) Particulate air pollution and acute health effects. *Lancet* **345**: 176-178.

**Simon, R. H. & Paine, R., III.** (1995) Participation of pulmonary alveolar epithelial cells in lung inflammation. *J. Lab Clin. Med.* **126**: 108-118.

**Stadnyk, A. W.** (1994) Cytokine production by epithelial cells. *FASEB J.* **8**: 1041-1047.

**Stearns, R. C., Paulauskis, J. D. & Godleski, J. J.** (2001) Endocytosis of ultrafine particles by A549 cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **24**: 108-115.

**Stöber, W., Fink, A. & Bohn, E.** (1968) Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J. Coll. Interf. Sci.* **26**: 62-69.

**Stringer, B., Imrich, A. & Kobzik, L.** (1996) Lung epithelial cell (A549) interaction with unopsonized environmental particulates: quantitation of particle-specific binding and IL-8 production. *Exp. Lung Res.* **22**: 495-508.

**Striz, I., Slavcev, A., Kalanin, J., Jaresova, M. & Rennard, S. I.** (2001) Cell-cell contacts with epithelial cells modulate the phenotype of human macrophages. *Inflammation* **25**: 241-246.

**Suda, K., Rothen-Rutishauser, B., Gunthert, M. & Wunderli-Allenspach, H.** (2001) Phenotypic characterization of human umbilical vein endothelial (ECV304) and urinary carcinoma (T24) cells: endothelial versus epithelial features. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim* **37**: 505-514.

- Suwa, T., Hogg, J. C., Klut, M. E., Hards, J. & van Eeden, S. F.** (2001) Interleukin-6 changes deformability of neutrophils and induces their sequestration in the lung. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **163**: 970-976.
- Suwa, T., Hogg, J. C., Quinlan, K. B. & van Eeden, S. F.** (2002) The effect of interleukin-6 on L-selectin levels on polymorphonuclear leukocytes. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **283**: H879-H884.
- Svartengren, M., Sommerer, K., Scheuch, G., Kohlhaeufel, M., Heyder, J., Falk, R., Bergmann, R., Hofmann, W., Bailey, M., Philipson, K. & Camner, P.** (2001) Comparison of clearance of particles inhaled with bolus and extremely slow inhalation techniques. *Exp. Lung Res.* **27**: 367-386.
- Takahashi, K., Sawasaki, Y., Hata, J., Mukai, K. & Goto, T.** (1990) Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **26**: 265-274.
- Tao, F. & Kobzik, L.** (2002) Lung macrophage-epithelial cell interactions amplify particle-mediated cytokine release. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **26**: 499-505.
- Terashima, T., Wiggs, B., English, D., Hogg, J. C. & van Eeden, S. F.** (1997) Phagocytosis of small carbon particles (PM10) by alveolar macrophages stimulates the release of polymorphonuclear leukocytes from bone marrow. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **155**: 1441-1447.
- Thurston, G. D., Ito, K., Lippmann, M. & Hayes, C.** (1989) Reexamination of London, England, mortality in relation to exposure to acidic aerosols during 1963-1972 winters. *Environ. Health Perspect.* **79**: 73-82.
- Timblin, C. R., Shukla, A., Berlinger, I., Berube, K. A., Churg, A. & Mossman, B. T.** (2002) Ultrafine airborne particles cause increases in protooncogene expression and proliferation in alveolar epithelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **179**: 98-104.
- Tran, C. L., Buchanan, D., Cullen, R. T., Searl, A., Jones, A. D. & Donaldson, K.** (2000) Inhalation of poorly soluble particles. II. Influence Of particle surface area on inflammation and clearance. *Inhal. Toxicol.* **12**: 1113-1126.
- Tsuchiya, S., Kobayashi, Y., Goto, Y., Okumura, H., Nakae, S., Konno, T. & Tada, K.** (1982) Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res.* **42**: 1530-1536.

**Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T. & Tada, K.** (1980) Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer* **26**: 171-176.

**Ulrich, M. M., Alink, G. M., Kumarathasan, P., Vincent, R., Boere, A. J. & Cassee, F. R.** (2002) Health effects and time course of particulate matter on the cardiopulmonary system in rats with lung inflammation. *J. Toxicol. Environ. Health A* **65**: 1571-1595.

**Umweltbundesamt, Berlin.** (2003a) EU-Richtlinien über Grenzwerte für Schwefeldioxid, Stickstoffdioxid und Stickstoffoxide, Partikel, Blei, Benzol und Kohlenmonoxid in der Luft. <http://www.umweltbundesamt.net/immission/admin/Test/tochter1.htm>

**Umweltbundesamt, Berlin.** (2003b) Staub PM-10-Jahresmittelwerte: 1986 - 2001. <http://www.umweltbundesamt.de/immissionsdaten/k-pm10.htm>

**Utell, M. J., Samet, J. M., Bates, D. V., Becklake, M. R., Dockery, D. W., Leaderer, B. P., Mauderly, J. L. & Speizer, F. E.** (1988) Air pollution and health. *Am. Rev. Respir. Dis* **138**: 1065-1068.

**van der Wal, B. C., Hofland, L. J., Marquet, R. L., van Koetsveld, P. M., van Rossen, M. E. & van Eijck, C. H.** (1997) Paracrine interactions between mesothelial and colon-carcinoma cells in a rat model. *Int. J. Cancer* **73**: 885-890.

**van Eeden, S. F., Tan, W. C., Suwa, T., Mukae, H., Terashima, T., Fujii, T., Qui, D., Vincent, R. & Hogg, J. C.** (2001) Cytokines involved in the systemic inflammatory response induced by exposure to particulate matter air pollutants (PM(10)). *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **164**: 826-830.

**van Rossen, M. E., Hofland, L. J., van den Tol, M. P., van Koetsveld, P. M., Jeekel, J., Marquet, R. L. & van Eijck, C. H.** (2001) Effect of inflammatory cytokines and growth factors on tumour cell adhesion to the peritoneum. *J. Pathol.* **193**: 530-537.

**van Rossen, M. E., Stoop, M. P., Hofland, L. J., van Koetsveld, P. M., Bonthuis, F., Jeekel, J., Marquet, R. L. & van Eijck, C. H.** (1999) Red blood cells inhibit tumour cell adhesion to the peritoneum. *Br. J. Surg.* **86**: 509-513.

**Voelkel, K., Krug, H. F. & Diabate, S.** (2003) Formation of reactive oxygen species in rat epithelial cells upon stimulation with fly ash. *J. Biosci.* **28**: 51-55.

**Ware, J. H., Ferris, B. G., Jr., Dockery, D. W., Spengler, J. D., Stram, D. O. & Speizer, F. E.** (1986) Effects of ambient sulfur oxides and suspended particles on respiratory health of preadolescent children. *Am. Rev. Respir. Dis* **133**: 834-842.

**Wehmeier, A. & Kliche, K. O.** (1992) Fieber: Ausdruck der zytokinvermittelten Abwehrreaktion. *Dtsch. med. Wschr.* **117**: 1105-1109.

**Wichmann, H. E., Spix, C., Tuch, T., Wolke, G., Peters, A., Heinrich, J., Kreyling, W. G. & Heyder, J.** (2000) Daily mortality and fine and ultrafine particles in erfurt, germany part I: role of particle number and particle mass. *Res. Rep. Health Eff. Inst.* 5-86.

**Wiedensohler, A., Wehner, B. & Birmili, W.** (2002) Aerosol number concentrations and size distributions at mountain-rural, urban-influenced rural, and urban-background sites in Germany. *J. Aerosol Med.* **15**: 237-243.

**Wilczek, W.** (1991). Reaktion von Rinder-Alveolarmakrophagen auf Quarz und Hochtemperaturstäube. Thesis/Dissertation, Universität Karlsruhe

**Wilczek, W., Drosselmeyer, E. & Seidel, A.** (1989) The in vitro effects of high-Tc-superconducting particles (YBa<sub>2</sub>Cu<sub>3</sub>O<sub>6-7</sub>) and quartz (SiO<sub>2</sub>) on bovine alveolar macrophages. *Exp. Pathol.* **37**: 269-272.

**Ziegler-Heitbrock, H. W., Schraut, W., Wendelgass, P., Strobel, M., Sternsdorf, T., Weber, C., Aepfelbacher, M., Ehlers, M., Schutt, C. & Haas, J. G.** (1994) Distinct patterns of differentiation induced in the monocytic cell line Mono Mac 6. *J. Leukoc. Biol.* **55**: 73-80.

**Ziegler-Heitbrock, H. W., Thiel, E., Futterer, A., Herzog, V., Wirtz, A. & Riethmuller, G.** (1988) Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int. J. Cancer* **41**: 456-461.