

Etablierung eines Triple-Kultur-Modells der oberen Atemwege unter Einbeziehung immunkompetenter Zellen

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Vorgelegt von
Marina Schäfer
geb. in Mainz

Mainz, 2014

Wege entstehen dadurch, dass man sie geht.

Franz Kafka (1883-1924)

KONGRESSBEITRÄGE UND VERÖFFENTLICHUNGEN AUS DIESER ARBEIT

Abstract

Schäfer M., Pohl C., Moisch M., Steinritz D., Kehe K., Kirkpatrick C.J. (2012). A primary human bronchial triple-culture model to investigate pathomechanisms of pulmonary injury. 3D Cell Culture Advanced Model Systems, Applications & Enabling Technologies, DECHEMA Biotechnology, March 2012

Schäfer M., Pohl C., Moisch M., Steinritz D., Kehe K., Kirkpatrick C.J. (2012) Dendritic cells play an important role in the initial immune response against pulmonary toxins in lung. 78. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V. (DGPT). Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Volume 385, Supplement 1, March 2012

Schäfer M., Pohl C., Moisch M., Steinritz D., Kehe K., Kirkpatrick C.J. (2012) Investigation of different organophosphates in a human bronchial tripleculture model. 48th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX) Stockholm, Sweden, Volume 211S, June 2012

Schäfer M., Pohl C., Stenger B., Steinritz D., Kirkpatrick C.J. (2013) Influence of organophosphates on a bronchial triple culture. 79. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V. (DGPT). Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Volume 386, Number 1, January 2013

Publikationen

M. Schäfer, F. Koppe, B. Stenger, C. Brochhausen, A. Schmidt, D. Steinritz, H. Thiermann, C. James Kirkpatrick, C. Pohl. Influence of organophosphate poisoning on human dendritic cells. *Chemico-Biological Interactions* 2013 Aug 29. pii: S0009-2797(13)00219-6. doi: 10.1016/j.cbi.2013.08.011.

Pohl C., Schäfer M., Winkler D., Brochhausen C., Steinritz D., Thiermann H., Kirkpatrick C.J. (2013) 3D models of the bronchial epithelial tissue barrier to investigate immunological aspects of respiratory toxicology. (eingereicht bei Int. J. Mol. Sci. 2014):

Schäfer M., Pohl C., Steinritz D., Thiermann H., Kirkpatrick C.J. (2013) Differences on inflammation and apoptosis in a human bronchial triple culture model after OPC poisoning.(in Bearbeitung)

Pohl C., Schäfer M., Kasper J., Steinritz D., Thiermann H., Kirkpatrick C.J. (2013) N-Acetylcystein shows inhibitory effects on p38 MAPK in cytokine release in L-PAM induced primary bronchial cells.(in Bearbeitung)

Vorträge

Schäfer M., Pohl C., Moisch M., Steinritz D., Kehe K., Kirkpatrick C.J. (2012) Effekte von Organophosphaten auf in vitro Ko- und Triple-Kulturmodelle der bronchialen Einheit. C-Schutztagung 2012, München.

INHALTSVERZEICHNIS

KONGRESSBEITRÄGE UND VERÖFFENTLICHUNGEN AUS DIESER ARBEIT	1
Abstract.....	1
Publikationen	1
Vorträge	2
INHALTSVERZEICHNIS	3
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	7
EINLEITUNG	9
Aufbau und Funktion der Lunge.....	9
Funktionelle Barrieren	14
<i>In vitro</i> Modell des respiratorischen Epithels.....	17
Immunologie	21
Dendritische Zellen	23
Apoptose.....	26
Organophosphate	28
Vitamin C	32
ZIELE DER ARBEIT	33
MATERIAL.....	34
Zellen	34
FACS-Antikörper.....	34
Primär-Antikörper.....	35
Sekundär-Antikörper	35
Chemikalien	35
Material	37
Kits	38
Lösungen und Puffer.....	38
Fixierung von Zellen (mit 3,7% PFA):.....	38
Einbetten der Paraffin-Schnitte:.....	38
Haematoxylin-Eosin (HE) Färbung:.....	39
Alzianblau Färbung:.....	39
Geräte	39

Computerprogramme	41
METHODEN	42
Allgemeine Zellkultur	42
Humane Monozytische Leukämie Zell-Linie THP-1	42
Differenzierung von dendritischen Zellen aus THP-1 (τDCs).....	42
16HBE 14o-	42
Wi-38	43
Ablösen der Zellen	43
Trypsinierung.....	43
Abschaben von Zellen	43
Ablösen mit PBS.....	43
Ablösen mit Kollagenase I/ EDTA.....	44
Zählung der Zellen	44
CASY.....	44
Neubauer-Zählkammer.....	44
Isolierung primärer bronchialer Epithelzellen aus Lungengewebe	44
Buffy Isolation aus Vollblut	45
Differenzierung von dendritischen Zellen aus primären Monozyten (pDCs).....	46
Differenzierung von Makrophagen aus primären Monozyten (pM).....	46
Durchflusszytometrie.....	46
Annexin V-FITC Kit	47
Apoptose Array	48
Proteinbestimmung	49
Immunfluoreszenz.....	49
Bio-Plex.....	50
Biorad-Kit.....	50
Luminex Screening Assay (VersaMap) von RnD Systems.....	51
Rasterelektronenmikroskopie.....	51
Paraffin-Schnitte	52
Hematoxylin-Eosin (HE) Färbung.....	52
Alzianblau-Färbung	53
CD83 Immunhistologie Färbung.....	53

Bronchiales Ko-Kultur Modell (HTS 24-Transwell Filter Platten).....	54
Flüssigkeits-Luft-Grenze der Bronchialmodelle (ALI Kultivierung)	54
Bronchiales Triple-Kultur Modell (HTS 24-Transwell Filter Platten)	55
TEER Messung.....	55
Beschichtung der Platten	56
Ansetzen der Stimulanzen	56
Fixieren der Zellen	56
ERGEBNISSE	57
Differenzierung und Charakterisierung von dendritischen Zellen aus THP-1	57
Differenzierung von Makrophagen aus primären Monozyten.....	63
Etablierung des bronchialen Triple-Kultur Modells.....	65
Inflammatorische Prozesse.....	67
Untersuchung der Zell-Zell-Kontakte	67
TER-Werte	69
Immunfluoreszenz der Zell-Zell-Kontakte	69
Mucus-Produktion in der Ko-Kultur.....	72
Zytokinproduktion der Inflammatorischen Prozessen.....	73
Einfluss von Organophosphaten auf τ DCs.....	76
Durchflusszytometrie Analyse	76
Apoptose Untersuchung	78
Morphologische-Untersuchungen.....	80
Zytokin-Produktion (Bioplex)	81
Einfluss von Organophosphatenauf die Ko- und Triple-Kultur	82
TER-Messung	82
Immunfluoreszenz	83
Zytokin-Messungen	85
Proteinbestimmung.....	86
Apoptose	86
Interventionsstudie: Vitamin C vor Stimulation mit Chlorpyrifos	90
TER-Werte – Vitamin C	90
Zytokin-Messungen – Vitamin C.....	91

Interventionsstudie: Regeneration nach Organophosphat-Vergiftung (72 Stunden Versuche).....	92
Zytokin-Messungen – 72 h Versuch	92
Apoptose – 72 h Versuch	93
DISKUSSION	97
ZUSAMMENFASSUNG.....	106
DANKSAGUNG	107
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	108
TABELLENVERZEICHNIS	114
QUELLENANGABE	115

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AChE	Acetylcholinesterase
ALI	Flüssigkeits-Luft-Grenze (air-liquid-interface)
APC	Allophycocyanin
AQP	Aquaporin
β -ME	β -Merkaptoethanol
BChE	Butyrylcholinestrerase
CCL	CC-chemokine ligand
CCR	CC-chemokine receptor
CD	Unterscheidungsgruppen („Cluster of differentiation“)
CK	Zytokeratin
COPD	Chronische obstruktive Atemwegserkrankung (chronic obstructive pulmonary disease)
DC	Dendritische Zelle
τ DC	Dendritische Zelle (aus der Zell-Linie THP-1 differenziert)
p DC	Dendritische Zelle (aus primären Monozyten differenziert (Buffy Coat))
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(β -aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetoxymethylester
EVOM	Millivolt-/ Ohm-Meter
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiozyanat
FSC	Forward Scatter
h	Stunde
HBEC	Humane Bronchiale Epithelzellen (human bronchial epithelial cells)
HE	Haematoxylin-Eosin
IL	Interleukin
imDC	unreife dendritische Zelle (immature dendritic cell)
Int- γ	Interferon- γ
KK	Ko-Kultur
LPS	Lipopolysaccharid
mDC	reife dendritische Zelle (mature dendritic cell)
M/E	Methanol/Ethanol
min	Minuten

NIK	NF- κ B induzierte Kinase
OPC	Organophosphate compounds (inklusive Nervengase und Pestizide)
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Dulbecco's Phosphate Puffered Saline
PE	R-phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PGE ₂	Prostaglandin 2
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunden
SSC	Side Scatter
T/E	Trypsin/EDTA
TER	Transbilialer elektrischer Widerstand (<u>t</u> ranbilayer <u>e</u> lectrical <u>r</u> esistence)
TEER	Transepithelialer elektrischer Widerstand (<u>t</u> ransepithelial <u>e</u> lectrical <u>r</u> esistence)
TK	Triple-Kultur
TNF- α	Tumor-necrosis factor α
TSLP	thymic stromal lymphopietin

EINLEITUNG

Das Statistische Bundesamt stellt eine Zunahme von Lungenerkrankungen in Bezug auf die Todesursache der Bevölkerung in Deutschland fest. Immer mehr Menschen sterben an der chronisch obstruktiven Atemwegserkrankung (COPD), welche zum Beispiel durch eine Raucherlunge verursacht wird. Nicht nur COPD, sondern auch andere chronische Atemwegserkrankungen, wie zum Beispiel Asthma, nehmen weltweit zu. Um diesem Trend entgegenzuwirken ist eine Grundlagenforschung der Lunge und der hiermit verbundenen Krankheiten entscheidend.

Aufbau und Funktion der Lunge

Die Lunge besteht aus zwei Lungenflügeln, die wiederum in jeweils 2-3 Lungenlappen unterteilt sind (Abbildung 1A). Der luftleitende Teil wird als Bronchialsystem bezeichnet (Abbildung 1B).

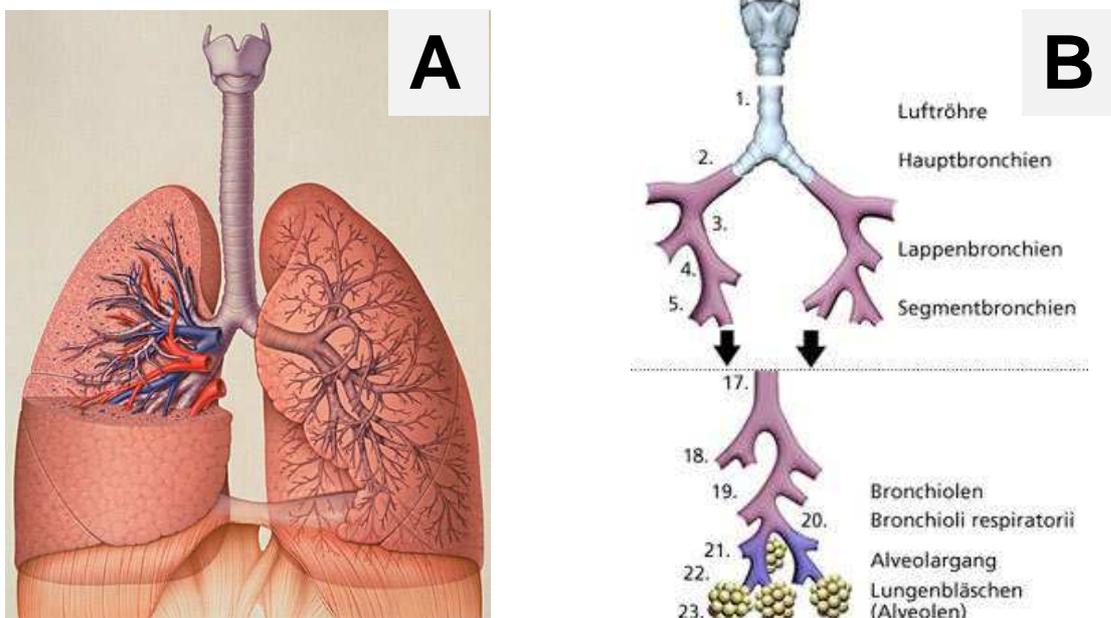


Abbildung 1: Aufbau der Lunge von der Luftröhre bis zu den Alveolen. **A:** Querschnitt der Lunge mit Sicht auf die beiden Lungenflügel und dessen Kapillaren. **B:** Bestandteile der Lunge von der Luftröhre bis hin zu den Alveolen.

(Quellen: **A:** http://www.planet-wissen.de/natur_technik/anatomie_mensch/lunge/img/tempx_superleistung_lunge_g.jpg
B: http://www.lungenaerzte-im-netz.de/lin/lincontent/pspic/bild/14/bild1131629727_bronchialb43734bce1ffa1.jpg)

Beim Einatmen durchdringt die Luft zunächst die Luftröhre und wird dann über die Hauptbronchien zu den Bronchiolen und die Lappenbronchien zu den

Segmentbronchien weitergeleitet. Von den Bronchiolen aus wird die Luft zu den Bronchioli respiratorii bis zum Alveolargang in die Alveolen transportiert. In den Alveolen erfolgt der Gasaustausch der Lunge. Der Knorpelanteil nimmt von den Lappenbronchien zu den schmalen Bronchien stetig ab.

Die Bronchien bestehen aus Basalzellen, Flimmerepithelzellen, mukusproduzierenden Becher- und Klarazellen. In den tiefen Zellschichten von Epithelien oder in der Nähe der Basalmembran sind die Basalzellen zu finden. Diese dienen als Reservezellen für abgestorbene Epithelzellen. Becherzellen produzieren Schleim innerhalb des Epithelverbandes. Ihre Zellgranula enthalten saure und neutrale Sekrete, welche durch Exozytose und merokine Exkretion an die Epitheloberfläche transportiert werden. Die Muzine bilden einen Schleimfilm, welcher die Schutzschicht für das Epithel darstellt. Die Epithelzellen sind polare Zellen an der apikalen und basalen Seite, sie bilden das Epithelgewebe, auch bekannt als Basalmembran. Die Flimmerepithelzellen sind mit einer Schleimschicht überzogen. Sie besitzen bewegungsfähige Fortsätze (Zilien), welche den Schleim aus der Lunge in Richtung Luftröhre transportieren. Die Schleimschicht besteht aus 2-3 Schichten und bildet eine mechanische Barriere, um Fremdstoffe, wie zum Beispiel Partikel oder Bakterien, abzutransportieren. Je nach Bedarf können die Epithelzellen die Mukus Produktion inhibieren oder induzieren. Ist ein Mensch krank, kann der Schleim nicht mehr abtransportiert werden, sodass der Körper versucht den fehlenden Transport durch Husten auszugleichen. Zilienschlagende Zellen sind 20-60 μm dick und besitzen auf der apikalen Seite bis zu 250 Zilien pro Zelle (Mathias, Yamashita and Lee 1996). Die Zilien weisen eine Länge von 6 μm und einen Durchmesser von 0,2 μm auf, welche mit 700-1.000 Beats pro Minute schlagen (Clarke and Pavia 1980). In der humanen Trachea variiert die Durchflussrate von 5-20 mm pro Minute (Yeates et al. 1975). Durch den Zilienschlag der Flimmerepithelzellen können schädliche Stoffe, wie zum Beispiel Pollen oder Bakterien nach außen transportiert werden.

Fibroblastenzellen gehören zu den Bindegewebszellen. Sie synthetisieren wichtige Komponenten der Extrazellulärmatrix, darunter verschiedene Kollagentypen und Proteoglykane. Wenn das Gewebe geschädigt ist, wird in Zusammenarbeit mit der Entzündungsreaktion die Proliferation der Fibroblasten stimuliert, sodass die Abgabe von Zytokinen verstärkt wird und die Reparatur der Verletzung erfolgt. Der Bereich der schmalen Bronchien ist sehr anfällig, sodass es hier auch leicht zu Krankheiten

kommen kann. Chronisch obstruktiven Atemwegserkrankungen (COPD) oder auch Asthma sind häufige Erkrankungen im bronchialen Bereich. Bei einer COPD liegt eine dauerhafte Entzündung wegen einer chronischen Bronchitis vor. Der Luftfluss in den Atemwegen ist zunehmend limitiert und verknüpft mit einer auffälligen inflammatorischen Reaktion der Lunge auf schädliche Partikel und Gase (Pauwels and Rabe 2004). Die Atemwegsblockierung erfolgt durch einen variablen Grad der Verengung der Luftröhre, einer starken Sputum Produktion, einer verkrampften Bronchialmuskulatur, als auch fehlender Elastizitätsdruck der pulmonaren Emphysema, die zu einer Veränderung der Lunge führen (Calverley and Walker 2003). Abbildung 2 zeigt den Vergleich einer gesunden Lunge im Vergleich zu einer COPD erkrankten Lunge.

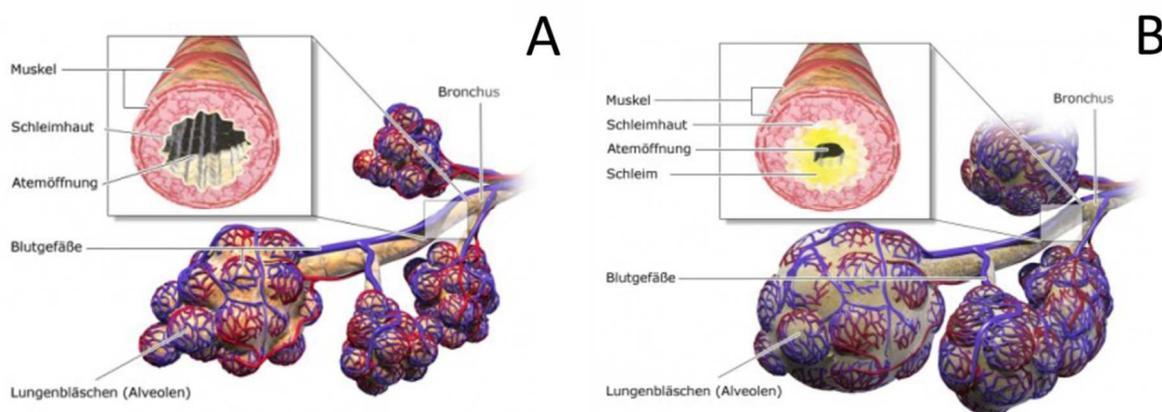


Abbildung 2: Vergleich einer gesunden Lunge (A) und einer COPD erkrankten Lunge (B)
(Bildquelle: <http://www.gesundheitsinformation.de/chronischer-husten-und-atembeschwerden.251.de.html>)

Bei beiden Erkrankungen liegt einer Obstruktion der Atemwege vor. Asthma wird in vier verschiedene Gruppen unterteilt: allergisches (extrinsisches), intrinsisches (nicht-allergisches), belastungsinduziertes Asthma und Husten als Asthma-Äquivalent (Buhl et al. 2006). Asthma tritt in allen Altersklassen in Verbindung mit Allergenen auf, wohingegen COPD im Alter ab 40 Jahren vor allem bei Rauchern auftritt (Beeh et al. 2004). Der Entzündungsprozess und die jeweiligen Immunzellen im Vergleich Asthma und COPD sind in Abbildung 3 dargestellt. Abbildung 3A zeigt die Histopathologie im Vergleich von Asthma zu COPD. Bei Asthma ist eine Erhöhung der Mast-, dendritischen Zellen und eosinophilen Granulozyten (Eosinophilen) nachweisbar, im Gegensatz zu COPD, bei welcher eine Alveolarschädigung erfolgt (Barnes 2008). Die Inflammation von Asthma ist in Abbildung 3B und die Inflammation von COPD in Abbildung 3C abgebildet. Durch ein inhaliertes Allergen

werden bei Asthma Mastzellen und dendritische Zellen aktiviert. Die Aktivierung der Mastzellen erfolgt durch das Allergen und die Bindung von IgE. Dendritische Zellen sind abhängig von dem Zytokin TSLP (thymic stromal lymphopoietin), welches von Epithel- und Mastzellen produziert wird. Durch das Zusammenspiel von TSLP und den dendritischen Zellen können die Chemokin-Liganden CCL17 und CCL22 freigesetzt werden, um mit dem Chemokin-Rezeptor CCR4 an der T-Helferzelle 2 zu interagieren, wodurch sie IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 induzieren. IL-5 spielt eine Rolle bei der eosinophilen Entzündung, IL-9 stimuliert die Proliferation der Mastzellen und IL-13 stimuliert die B-Zelle, welche dann IgE synthetisiert. Die Epithelzellen setzen SCF für die Erhaltung der Mastzellen und CCL11 für die Rekrutierung Eosinophiler über CCR3 frei. Durch das Zusammenspiel von den Mastzellen und IgE werden verschiedene Mediatoren, wie zum Beispiel Histamin, freigesetzt, welche zur Verengung der Bronchiolen führt (Barnes 2008).

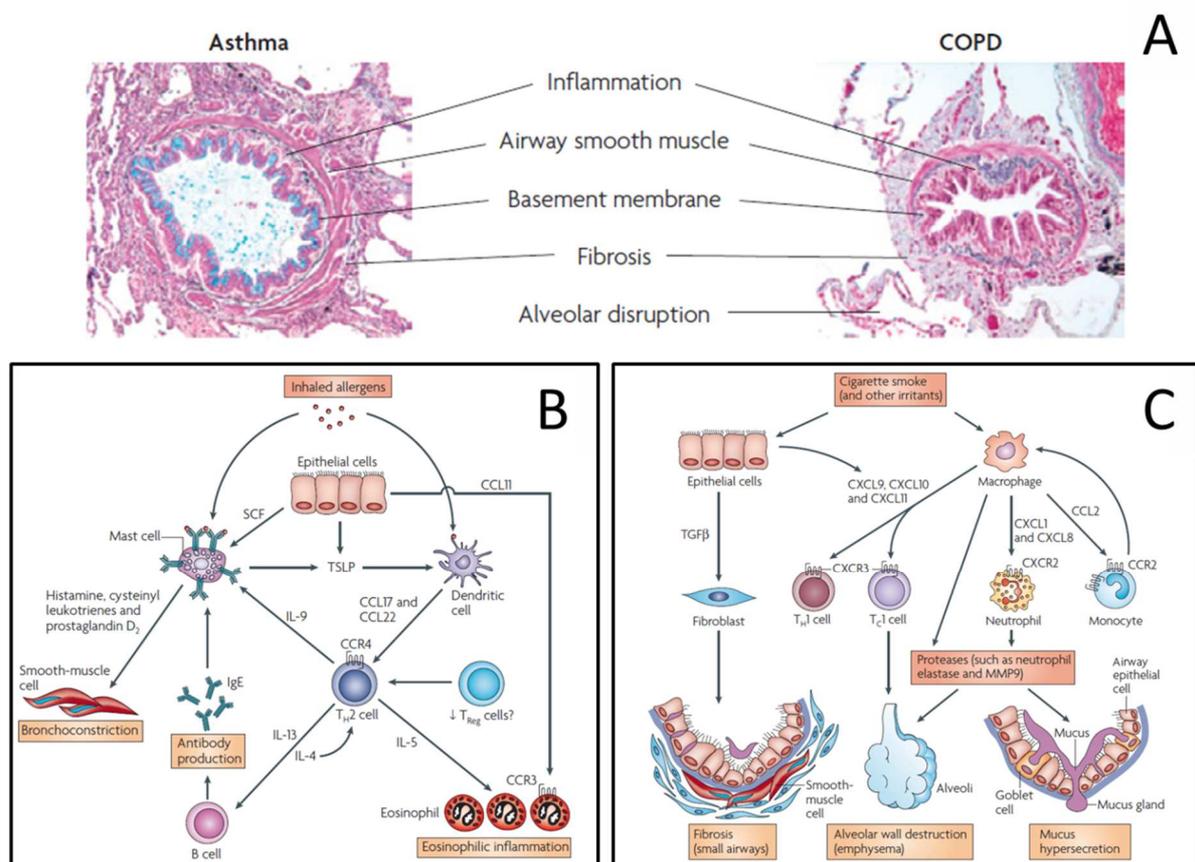


Abbildung 3: Vergleich zwischen Asthma und COPD (Bildquelle: (Barnes 2008))

Bei COPD werden die Epithelzellen und Makrophagen zum Beispiel durch inhalierten Zigarettenrauch aktiviert. Epithelzellen setzen TGFβ (transforming growth factor-β) frei, welcher die Proliferation der Fibroblasten stimuliert und schließlich zu einer

Fibrose in den schmalen Luftwegen führt. Makrophagen und Epithelzellen induzieren CXCL9, CXCL10 und CXCL11, welche mit dem Rezeptor CXCR3 der T-Zellen (T-Helferzellen 1 und zytotoxische T-Zellen Typ 1) interagieren. Die Induktion von CXCL1, CXCL8 und CCL2 wird ebenso durch Makrophagen eingeleitet, die an CCR2 von Monozyten und Neutrophilen binden, um diese zu Makrophagen in der Lunge zu differenzieren. Neutrophile und Makrophagen induzieren Proteasen, wie zum Beispiel die Neutrophile-Elastase oder auch die Matrix Metalloprotease 9 (MMP9), die Emphysema und Mukus Hypersekretion verursachen (Barnes 2008).

Funktionelle Barrieren

Der Mukus des bronchialen Epithels hat einen Einfluss auf die funktionelle Barriere der oberen Atemwege. Die Mukus-Produktion ist abhängig von verschiedenen Faktoren und beinhaltet zwei Gene MUC5AC und MUC5B; sie schützen die Zilien, als auch deren Zilienschlag (Knowles and Boucher 2002). Der Transport des Schleims auf der Oberfläche hat eine Durchflussrate von 80 $\mu\text{m}/\text{Sekunde}$ (Boucher 2004).

Um den Einfluss verschiedener Faktoren auf die oberen Atemwege zu untersuchen, müssen der Aufbau und die Funktionen der verschiedenen Zelltypen in der Lunge erforscht sein, hierzu zählen auch die funktionellen Barrieren. Das bronchiale Epithelium besteht aus mehreren differenzierten Zelltypen, Basal-, Becher-, Clara- und Zilienzellen, welche eine Schleimschicht und eine epitheliale Barriere bilden (Diamond, Legarda and Ryan 2000). Sie bilden *tight* (TJ), zum Beispiel ZO-1, Occludin und *adherens junctions* (AJ) auf der apikalen Seite der Zellen aus (Schneeberger and Lynch 1984). Im Körper gibt es mechanische und physiologische Barrieren, um Fremdstoffe und Erreger fern zu halten. So zählen zum Beispiel die Haut, die Blut-Hirn-Schranke, die Schleimhaut oder auch die Magensäure im Magen zu den natürlichen Barrieren im Körper. Um eine funktionelle Barriere zu erreichen, bilden benachbarte Zellen *tight* und *adherens junctions* aus (Abbildung 4).

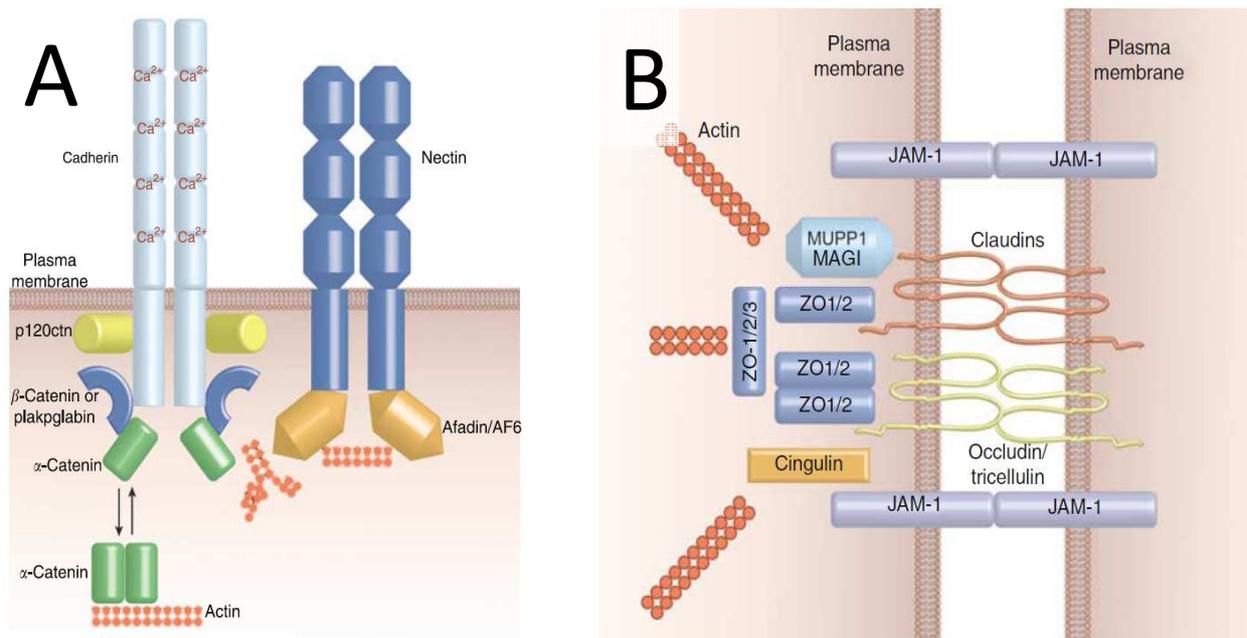


Abbildung 4: Schematische Darstellung der (A) *adherens junctions* und (B) *tight junctions* (Bildquelle: (Niessen 2007))

Die *junctions* sind nicht nur wichtig für die Barriere, sondern auch für die interzelluläre Kommunikation. Durch die *tight junctions* wird die zelluläre Schicht für Ionen und gelöste Substanzen undurchlässig, sodass sie hier eine Diffusionsbarriere aufbauen. Die Vermischung der apikalen und basolateralen Membrankomponenten, wie Lipiden und Proteinen wird durch diese Barriere ebenso verhindert. Zu den *adherens junctions* gehören der Cadherin-Catenin Komplex, der Nectin-Afadin Komplex und die potentiellen Interaktionen mit Aktin (Niessen 2007). In dieser Arbeit wird der Hauptanteil der Versuche auf den *tight junctions* liegen. Die *tight junctions* bestehen aus Verbindungen zwischen JAM-1 Proteinen, als auch aus Verbindungen zwischen ZO-1/2 und Claudin oder auch Occludin/ Tricellulin. Auch die Proteine ZO-3, MAGI und MUP1 spielen hier eine Rolle, allerdings ist deren Funktion noch weitgehend ungeklärt (Niessen 2007).

Je mehr *tight junction* Verbindungen vorhanden sind, desto undurchlässiger wird das Epithel. Es gibt verschiedene Transportproteine für den Stoffaustausch durch die Zellmembran (Abbildung 5).

Transportmechanismen

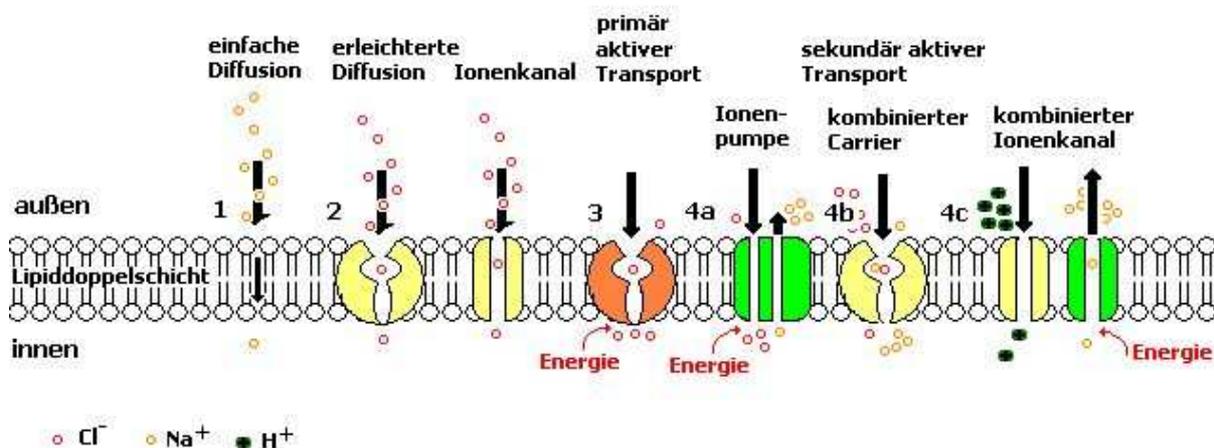


Abbildung 5: Transportmechanismen über die Zellmembran
(Bildquelle: <http://schwarzwurzel.sc.funpic.de/Pics/Transportmechanismen.jpg>)

Die Transportmechanismen werden in passive und aktive Transporte unterteilt. Zu den passiven Transporten zählen die einfache Diffusion und die erleichterte Diffusion durch Ionenkanäle. Bei der einfachen Diffusion können bestimmte Stoffe direkt durch die Lipiddoppelschicht entlang ihres Konzentrationsgradienten diffundieren. Die erleichterte Diffusion verläuft entlang eines elektrochemischen Gradienten durch einen Ionenkanal und kann durch bestimmte Ionen reguliert werden. Um Ionen

gegen einen elektrochemischen Gradienten transportieren zu können, gibt es aktive Transportmechanismen. Aktive Transportmechanismen werden in primäre und sekundäre unterteilt, wobei immer Energie benötigt wird, um den Transport zu ermöglichen und immer gegen einen elektrochemischen Gradienten transportiert wird. Zu den sekundären aktiven Transportmechanismen zählt die Ionenpumpe, der kombinierte Carrier oder auch kombinierte Ionenkanal, diese lassen nur spezifische Ionen passieren. Der Antrieb erfolgt durch Ionenbewegung entlang seines Konzentrationsgradienten und durch Verbrauch von ATP vor (indirekter aktiver Transport), zum Beispiel für einen Konzentrationsgradienten oder nach dem Transport (direkter aktiver Transport), hier wird ATP direkt vom Transporter hydrolysiert.

***In vitro* Modell des respiratorischen Epithels**

Die Lunge und deren Barrieren sind ein komplexes System, welches bisher nur in Tierversuchen untersucht werden konnte. Um Tierversuche zu reduzieren wurde in unserem Institut ein humanes Zellkultur-Modell des proximalen respiratorischen Systems etabliert, um verschiedene Studien durchzuführen (Pohl et al. 2009). Für das bronchiale Ko-Kultur Modell werden Transwell-Filterplatten verwendet. Auf der apikalen Seite werden bronchiale Epithelzellen und auf der basolateralen Seite Fibroblaste ausgesät (siehe Abbildung 6).

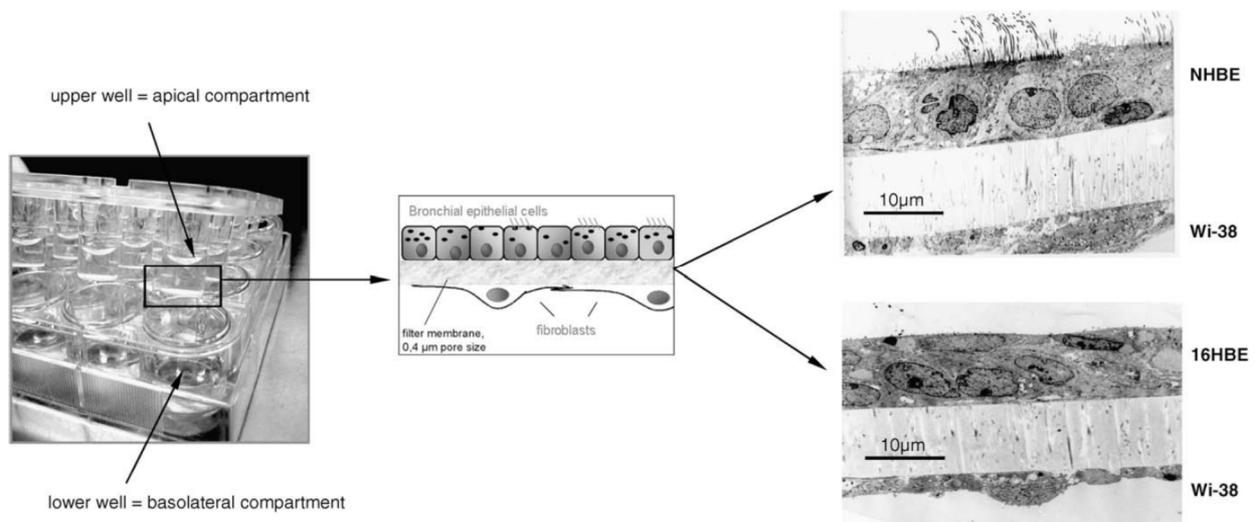


Abbildung 6: Bronchiale Ko-Kultur auf einer 24-Well HTS-Transwell Filterplatte. Bei den primären bronchialen Epithelzellen (HBEC) und bei der bronchialen Zell-Linie (16HBE14o-) wurden jeweils Wi-38 Fibroblasten für die Kultivierung verwendet. (Bildquelle: (Pohl et al. 2009))

Die Ko-Kultur kann sowohl mit primären Bronchialepithelzellen (HBEC), als auch mit einer Epithelzelllinie (16HBE 14o-) kultiviert werden. Primäre Bronchialepithelzellen werden aus Resektaten von Patienten gewonnen, wobei nur tumorfreies Gewebe verwendet wird. Beide Zelltypen exprimieren die Zytokeratine CK14 und CK19, welche als spezifische Epithelzellmarker den Status der Differenzierung widerspiegeln. Die Zytokeratine CK14 und CK15 sind nur in Basalzellen nachweisbar, wohingegen CK7, CK8, CK18 und CK19 im Bronchialepithelium exprimiert werden (Schlage et al. 1998). Die Basalzellen aus den Explantationskulturen weisen ebenso die Marker Aquaporin-3 (AQP-3) auf, dieser wird im Bronchialepithel der Basalzellen positiv (Sato et al. 2004). Ebenso ist AQP-5 im trachealen Epithelium zu finden. AQP-5 ist auf der apikalen Seite von nicht zilienschlagenden Zellen zu finden (Matsuzaki et al. 2009). Basalzellen werden auch als Vorläuferzelle der Lunge diskutiert (Rackley and Stripp 2012). Um die Basalzellen

zu differenzieren, werden die Membranen mit den Bronchialepithelzellen an der Flüssigkeits-Luft-Grenze (air liquid interface, ALI) gehalten. Die Differenzierung der Zellen wird anhand der verschiedenen Zelltypen beurteilt, als auch anhand des elektrischen Widerstandes (TER). Flimmerepithelzellen und mukusproduzierende Becherzellen konnten bereits nach 21 Tagen in der Kultur nachgewiesen werden, wobei in der Monokultur nur kurze Membranfortsätze zu finden sind (Abbildung 7).

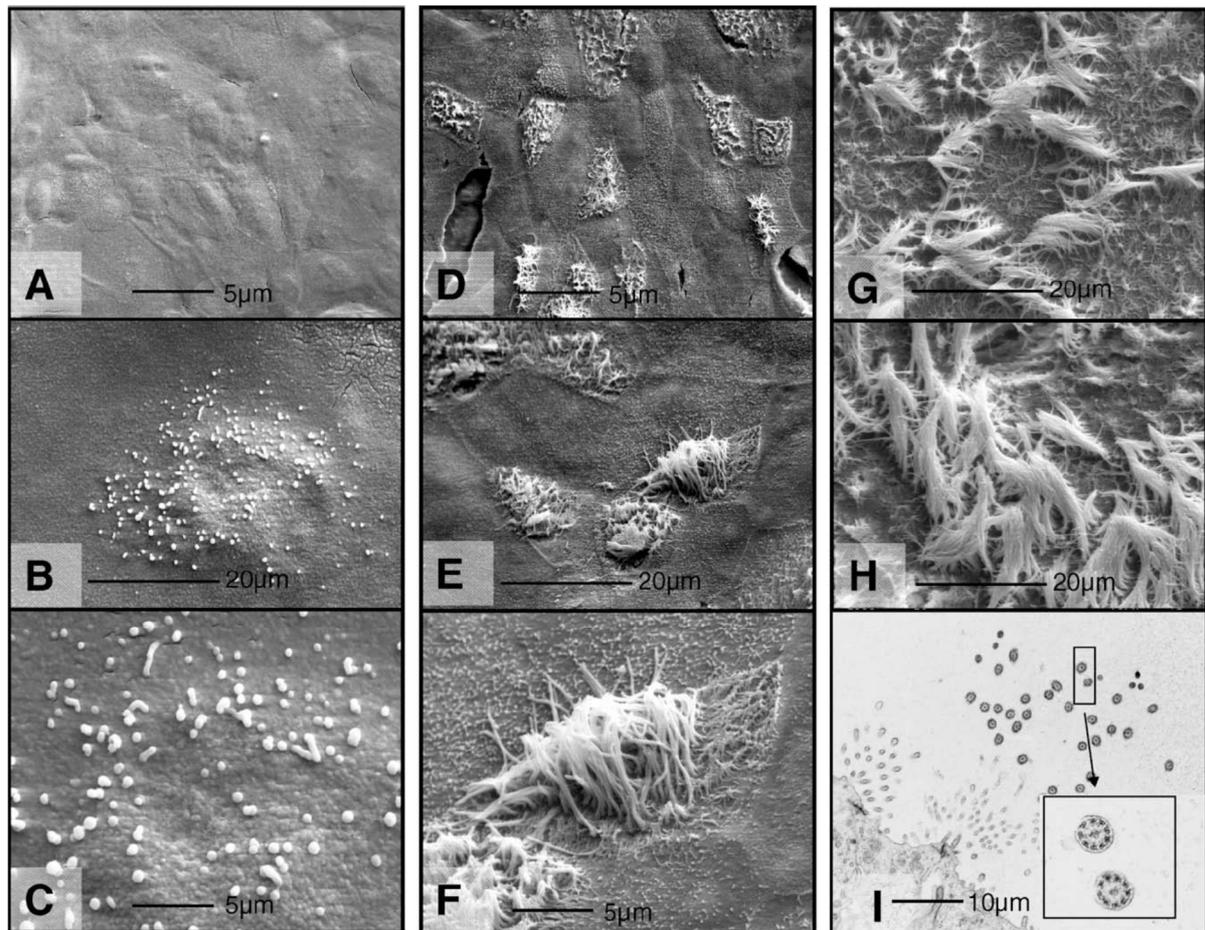


Abbildung 7: Elektronenmikroskopie Aufnahmen der HBEC auf Transwell Filtermembranen nach 24 Tagen Mono-Kultur (A-C Vergrößerungen 1.000x, 2.000x, 5.000x) und in Ko-Kultur mit Wi38 (D-F 1.000x, 2.000x, 5.000x). (G) Ko-Kultur nach 42 Tagen (H) Ko-Kultur nach 84 Tagen (I) Querschnitt der ausgebildeten Zilien. (Bildquelle: (Pohl et al. 2009))

Die ausgebildeten Zilien in der Ko-Kultur zeigen nach 24 Tagen ein typisches 9 plus 2 Muster, welches schon in mehreren Veröffentlichungen für reife Zilien nachgewiesen wurden (Olbrich et al. 2012). In der Ko-Kultur kann ein Zilienschlag zwischen 14-19 Hz nachgewiesen werden (Pohl et al. 2009), wobei in Bronchialen Biopsien eine Frequenz von 9-14 messbar ist (Wohlsen et al. 2003, Laoukili et al. 2001).

In Abbildung 8 wird zum einen die Explantationskultur als auch Immunfluoreszenzaufnahmen der charakteristischen Marker CK14 und AQP-3 in den Basalzellen dargestellt. Es ist ersichtlich, dass nach einer Kultivierung der primären Ko-Kultur von 28 Tagen Flimmerepithelzellen, als auch mukusproduzierende Becherzellen vorhanden sind. Nach einer Zeit von 84 Tagen sind die Zilien stark verlängert, sodass die Frequenz der Zilienschläge besser messbar wird. Auch β -Tubulin (als Marker für Zilien) kann mittels Immunfluoreszenz bei den Zellen nachgewiesen werden. Im Vergleich zu der primären Ko-Kultur zeigt die Kultivierung mit 16HBE14o-Wi38 einen mehrschichtigen Zellverband ohne Differenzierung.

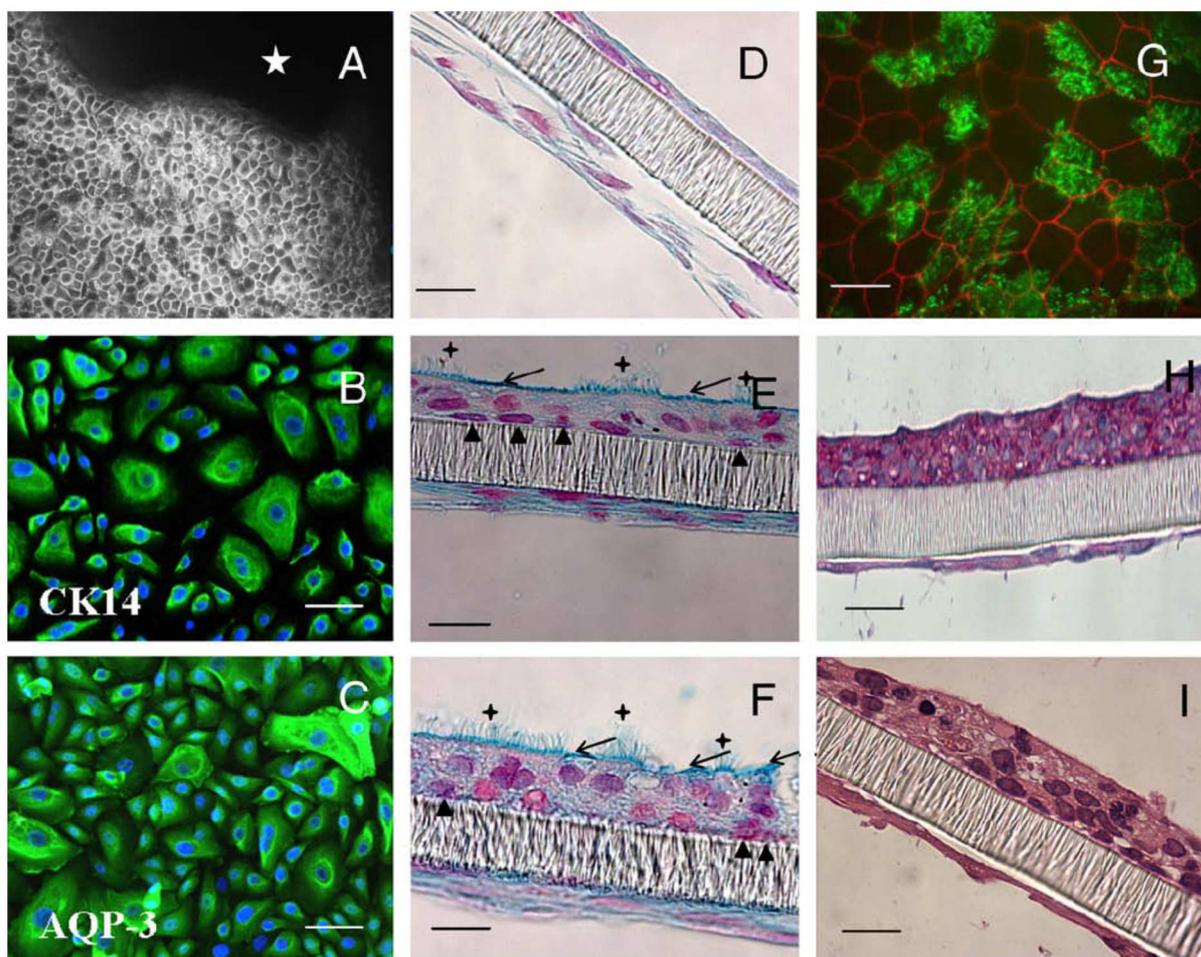


Abbildung 8: Untersuchungen der HBEC: (A) Lichtmikroskopie Aufnahme der Explantationskultur (B) Expression von Zytokeratin 14 (C) Expression von Aquaporin 3. Untersuchungen der Ko-Kultur (D-F) Alzianblau-Färbung nach Tag 7 (D), Tag 28 (E) und Tag 84 (F) Zilienzellen ◆, Basalzellen ▲, Mukusschicht I. (G) Immunfluoreszenz der apikalen Seite mit ZO-1 (rot fluoreszierend) und β -Tubulin (grün fluoreszierend). (H-I) Ko-Kultur mit 16HBE14o-Wi38 im Vergleich submerse Bedingung (H) und Air-Lift (I). (Bildquelle: (Pohl et al. 2009))

Die TER Werte der Ko-Kultur 16HBE14o- erreichen an Tag 10 ihren höchsten Wert (bis zu 1.000 Ohm-cm²) und bleiben über maximal 4 Tage stabil. Die Ko-Kultur

HBEC/Wi38 erreicht ihren höchsten Wert mit etwa 700 Ohm·cm² ab Tag 17 und kann bis zu Tag 84 stabil bleiben. Die Expression von MUC 2, MUC 5AC und MUC 5b, als auch die Ausprägung der *adherens* und *tight junctions* konnte nachgewiesen werden (Pohl et al. 2009).

Immunologie

Um die Zerstörung der Barrieren und der Funktion der einzelnen Zelltypen zu reduzieren beziehungsweise zu verhindern gibt es auf Seite der bronchialen Epithelschicht zwei verschiedene Abwehrmechanismen. Zum einen die physikalische Schutzfunktion durch Schleim und zum anderen die angeborene Immunantwort, durch die Aktivierung der immunkompetenten Zellen (wie zum Beispiel dendritische Zellen) und das adaptive Immunsystem, welches T- und B-Zellen beinhaltet (Travis, Singh and Welsh 2001, Iwasaki and Medzhitov 2010). Epithelzellen sind der erste Angriffspunkt von Mikroorganismen, Gasen und Allergenen, sodass eine stabile Barrierefunktion durch *tight junctions* unerlässlich ist (Lambrecht and Hammad 2012a).

Allgemein besteht das Immunsystem aus unterschiedlichen Bestandteilen, um Eindringlinge, wie zum Beispiel Bakterien oder Viren abzuhalten. Wenn Schädlinge durch diese mechanischen Barrieren durchbrechen, kommt es zur Immunabwehr. Es wird zwischen dem angeborenen (auch unspezifischen) und dem adaptiven Immunsystem unterschieden (Abbildung 9).

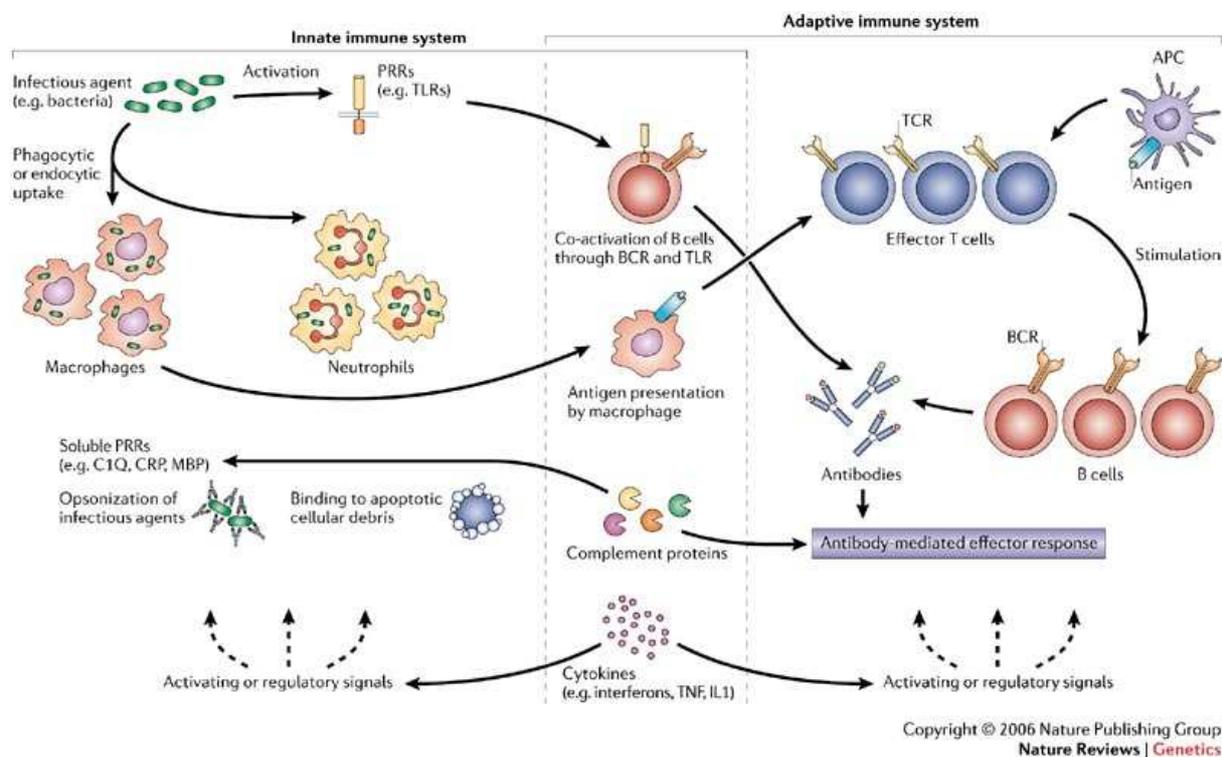


Abbildung 9: Vergleich angeborenes und erworbenes Immunsystem (Quelle: (Gregersen and Behrens 2006))

Die angeborene Immunantwort ist die erste antikörperfreie Abwehr des Körpers, auf Infektionen (Pilze, Parasiten, Viren) oder Schadstoffe. Zu dem angeborenen Immunsystem zählen natürliche Killerzellen, Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen, welche die erste Immunreaktion auf Fremdstoffe auslösen. Wenn dieses nicht allein reicht, wird das adaptive Immunsystem aktiviert, indem sowohl reife als auch unreife dendritische Zellen (durch verschiedene Bindungen) T-Zellen mobilisieren (Ambali and Ayo 2012).

Dendritische Zellen sind das Verbindungsglied zwischen den beiden Immunsystemen, indem sie das adaptive System aktivieren und unterstützen. Sie sind ein essentieller Bestandteil für die Immunologie. Wenn ein infektiöses Agens, wie zum Beispiel Bakterien, die mechanischen Barrieren durchbrechen, kommt das angeborene Immunsystem ins Spiel. Durch Phago- und Endozytose werden die Bakterien von Makrophagen und Neutrophilen aufgenommen. Die Makrophagen präsentieren die gewonnenen Antikörper bei der erworbenen Immunantwort. Auch verschiedene Signalwege werden aktiviert, sodass B-Zellen durch zum Beispiel TLRs aktiviert werden. Zytokine bewirken sowohl bei der angeborenen, als auch bei der erworbenen Immunantwort eine Aktivierung und Regulation verschiedener Signale für die Immunreaktion. Antigen-präsentierende Makrophagen und dendritische Zellen aktivieren T-Zellen, welche wiederum B-Zellen stimulieren. Es kommt zur Antikörper Abwehr des Immunsystems.

Dendritische Zellen

Immunkompetente Zellen sind für eine erfolgreiche Immunabwehr unerlässlich. Sie entscheiden, ob eine Immunreaktion stattfindet und wie stark diese abläuft. Dendritische Zellen sind vor allem bei Erkrankungen der oberen Atemwege essentiell. Ralph Steinman zählt zu den erfolgreichsten Wissenschaftlern im Gebiet der Immunologie von dendritischen Zellen und bekam 2011 für seine Forschungen den Nobelpreis für Medizin verliehen. Er und Zanvil Cohn beschrieben zum ersten Mal 1973 die dendritische Zelle. Sie wurde mit langen Dendriten und einer typischen sternförmigen Morphologie beschrieben (Steinman and Cohn 1973). Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Immunantwort. In der Lunge bilden die dendritischen Zellen mit den Epithelzellen *tight junctions* aus (Hammad and Lambrecht 2008). Hubo et al. beschreibt 2013 die Funktion der dendritischen Zelle abhängig von deren Reifungsprozess (Hubo et al. 2013). Dendritische Zellen haben einen großen Einfluss im Prozess von Asthma oder einer allergischen Reaktion, wobei auch die Interaktion zwischen ihnen und den Epithelzellen eine wichtige Rolle spielt (Hammad 2011). Zusammen mit den Epithelzellen formen sie Zell-Zell-Kontakte, wie ZO-1, Occludin oder auch Claudine, indem sie mit ihren langen Dendriten zwischen die Epithelzellen gehen und von beiden Seiten mit den benachbarten Zellen Verbindungen eingehen (Lambrecht and Hammad 2009). Dendritische Zellen reagieren auf die Wirkung von inflammatorischen Prozessen von Allergenen, indem sie mit den bronchialen Epithelzellen interagieren. Sie wandern auch in T-Zell freie Zonen und zu den Lungen-Lymphknoten, um dort auch T-Lymphozyten Antigene zu präsentieren (Gill 2012). Während der Differenzierung werden viele CD-Marker, wie zum Beispiel CD80, CD83 und CD86 induziert, wohingegen HLA-DR nur bei reifen dendritischen Zellen an der Oberfläche messbar wird. Eine Funktion der unreifen dendritischen Zelle ist es Antikörper aufzunehmen, um sie dann als reife dendritische Zelle zu präsentieren (Banchereau and Palucka 2005). Unreife dendritische Zellen können Antigene auf die unterschiedlichsten Arten aufnehmen, wie zum Beispiel Phagozytose oder auch Pinozytose. Sie interagieren nicht nur mit T-Zellen, sondern auch mit B-Zellen, welche ebenso wie die DCs Antikörper präsentieren (Banchereau and Steinman 1998). DCs präsentieren außerdem auch Peptide von apoptotischen Zellen (Albert et al. 1998). In der Lunge kommen dendritische Zellen in einer Zellzahl zwischen 600 und 800 Zellen pro mm² in Bezug auf die Epitheloberfläche vor, in den

über verschiedene Signalwege exprimiert (Komuro et al. 2005). Die Anwesenheit von PGE₂ erhöht die Aufnahme von Calcium in die Zelle (Zhang et al. 2007), Ionomycin ebenfalls. Die Bindung von Calcium an Ionomycin werden stark beeinflusst zwischen einem pH-Wert von 7-9, so erhöht Ionomycin zum Beispiel auch die Membranpermeabilität für Calcium, um in die Zelle einzudringen (Beeler, Jona and Martonosi 1979). Unter einem pH-Wert von 7 erfolgt keine Bindung von Calcium an Ionomycin, wohingegen bei einem pH Wert von 9,5 eine maximale Bindung erfolgt (Liu and Hermann 1978). Durch das Zusammenspiel von IL-4, GM-CSF und TNF- α wird die CD83 Expression induziert (Zhou and Tedder 1996). In einer Veröffentlichung von Young und Steinman 1990 wurden Versuche zu dem Mengenverhältnis von dendritischen Zellen zu T-Zellen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass ein Verhältnis von 1:10 bzw. 1:30 zwischen DCs zu T-Zellen erforderlich ist. Allerdings ist das Verhältnis im Blut viel höher (Young and Steinman 1990). Dendritische Zellen interagieren mit einer ganzen Reihe von Zellen in der Lunge. In Zusammenarbeit mit den T-Zellen spielen sie bei der ersten Immunantwort, aber auch bei Asthma eine sehr wichtige Rolle (Vermaelen and Pauwels 2005). DCs wirken in der Lunge als T-Zell Stimulatoren, die Wirkung dieser, in Bezug auf Allergene, ist noch weitgehend unerforscht (Lambrecht and Hammad 2012b). DC-SIGN induziert die ERK Expression in der Zelle, mit daraus folgender Expression von IL-10. Bei unreifen dendritischen Zellen wird kein IL-10 exprimiert (Caparros et al. 2006). Es kommt zu einem Anstieg des intrazellulären Gehalts von IL-2 und IL-6 und zu einem Abfall des intrazellulären IL-1 und TNF- α (Pulendran, Tang and Manicassamy 2010). Für den ersten Kontakt zwischen dendritischer Zelle und der ruhenden T-Zelle spielt die Verbindung durch den Transmembran-Rezeptor DC-SIGN der dendritischen Zelle und ICAM-3 der T-Zelle eine entscheidende Rolle, um die T-Zelle zur Proliferieren anzuregen (Vaziri et al. 1978). Durch die Bindung von GM-CSF an den Rezeptor werden mehrere Signalwege induziert, so zum Beispiel auch der PI3K/Akt Signalweg. Diese Signalwege tragen zum Überleben, der Proliferation und der Differenzierung der Zellen wesentlich bei (Guthridge et al. 1998). VEGF erhöht *in vivo* unter anderem die vaskuläre Permeabilität und aktiviert Endothelzellen, *in vitro* wird durch VEGF das Überleben, die Proliferation und Migration der Endothelzellen erhöht und sichergestellt (Mac Gabhann and Popel 2006).

Apoptose

Nicht nur die Proliferation und Migration der Endothelzellen entscheiden über eine gut Immunabwehr, sondern auch der Apoptose-Signalweg spielt für das Gleichgewicht zwischen gesunden und kranken Zellen eine Rolle. Vor allem bei Vergiftungen ist eine Prüfung des Apoptose-Signalwegs unerlässlich. Apoptose wird auch als programmierter Zelltod bezeichnet. In Abbildung 11 ist der Signalweg der Apoptose dargestellt.

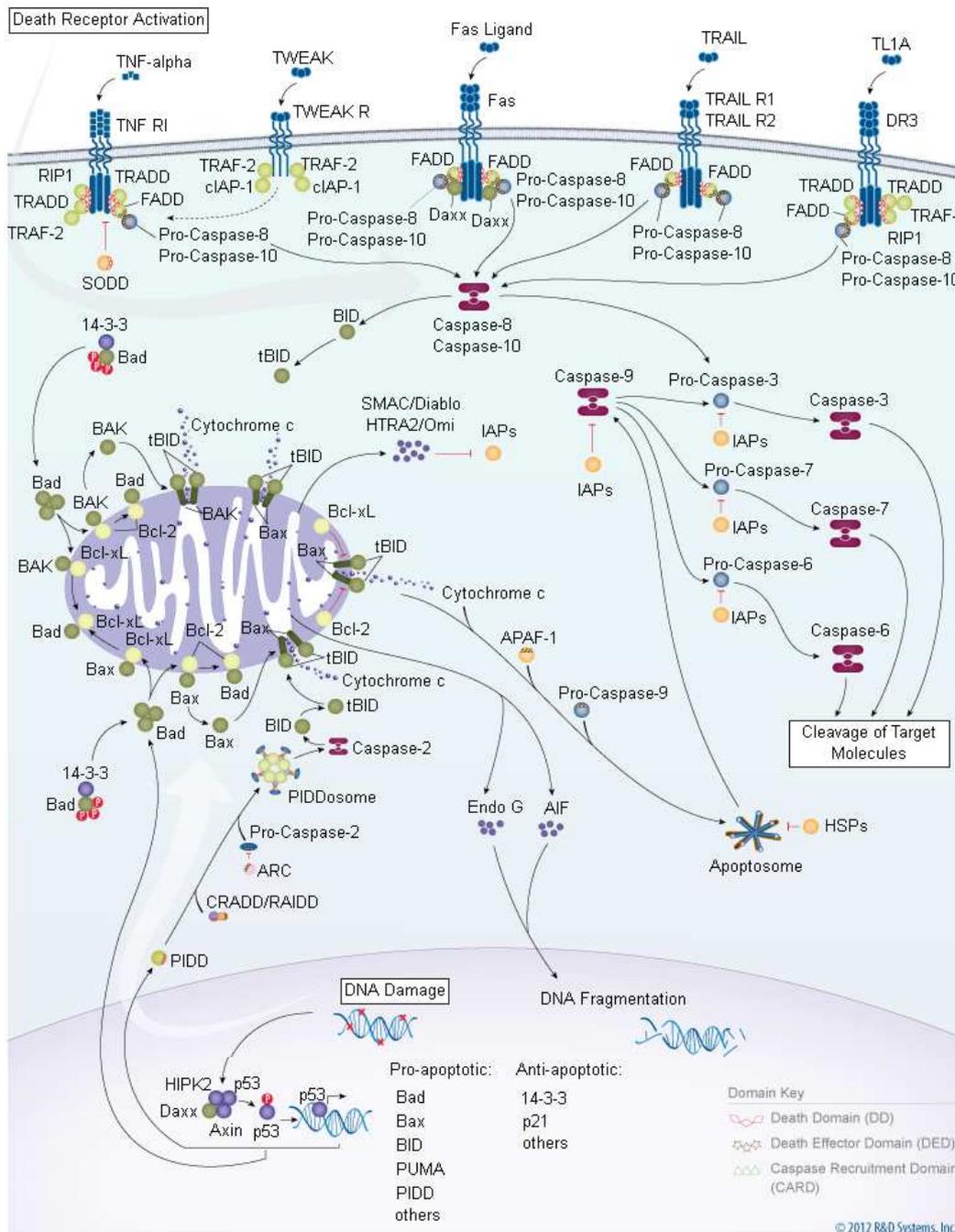


Abbildung 11: Apoptose Signalweg (Bildquelle: <http://www.rndsystems.com/Pathway.aspx?p=15445&r=15436>)

Der Zelltod wird zwischen den zwei Arten Apoptose und Nekrose unterschieden. Bei der Nekrose schwillt die Zelle, ebenso der Kern, an und es bilden sich Vakuolen. Es kommt zu einer Immunantwort in Form einer Entzündungsreaktion. Im Gegensatz zur Nekrose schrumpft die Zelle bei der Apoptose. Chromatin wird kondensiert, es entstehen Membranbläschen und es kommt zur regulären Phagozytose, sodass hier keine Immunantwort erfolgt.

Im Apoptose Signalweg spielen viele Rezeptoren eine wichtige Rolle, auch bekannt als Todesrezeptoren. Im intrazellulären Bereich der Rezeptoren FADD, TRADD, TRAF oder IAP Proteine können Pro-Caspasen 8 und 10 binden. Diese aktivieren die eigentlichen Caspasen 8 und 10. Es gibt zwei Möglichkeiten, in die die Signale weitergeleitet werden können. Der eine Weg geht über die Pro-Caspase 3, 6 und 7, welche jeweils durch IAPs inhibiert werden können. Die daraus produzierten Caspasen können Zielmoleküle spalten. Der zweite Weg geht über die BID bzw. tBID Expression, welche wiederum an BAK und Bax des Mitochondriums binden, sodass Cytochrom C produziert werden kann. Das Cytochrom C ist notwendig, um Apoptosome zu generieren, welche durch HSPs inhibiert werden können und somit anti-apoptotisch wirken. Pro-apoptotische Proteine sind Bad, Bax, BID, PIDD oder auch PUMA. Anti-apoptotische Proteine sind p21, HSPs oder auch IAPs.

Organophosphate

Der Apoptose-Signalweg ist bei Organophosphat-Vergiftungen ein interessanter Eckpunkt, da die Todesrate bei Toxizitätsstudien in der heutigen Gesellschaft, nicht nur in Bezug auf Angriffe mit chemischen Substanzen, sondern auch die Anwendung von Pestiziden in der Landwirtschaft, sehr hoch ist. Durch die Inhalation von Nervengasen kommt es zu akuten, als auch chronischen Erkrankungen des respiratorischen Epithels, welche je nach Konzentration bis zum Tod führen.

Organophosphate werden weltweit zur Beseitigung von Schädlingen eingesetzt, wie zum Beispiel gegen Insekten und Milben im Bereich des Anbaus von Getreiden und Obst (Roberts and Karr 2012). Nicht nur im landwirtschaftlichen Bereich, sondern auch in verschiedenen Kriegen werden Pestizide als Waffe eingesetzt. Jährlich kommen hunderttausende Menschen durch eine Organophosphat-Vergiftung ums Leben (Chatterjee and Riaz 2013). In Abbildung 12 ist die Wirkung von Organophosphaten auf den Acetylcholin-Signalweg dargestellt.

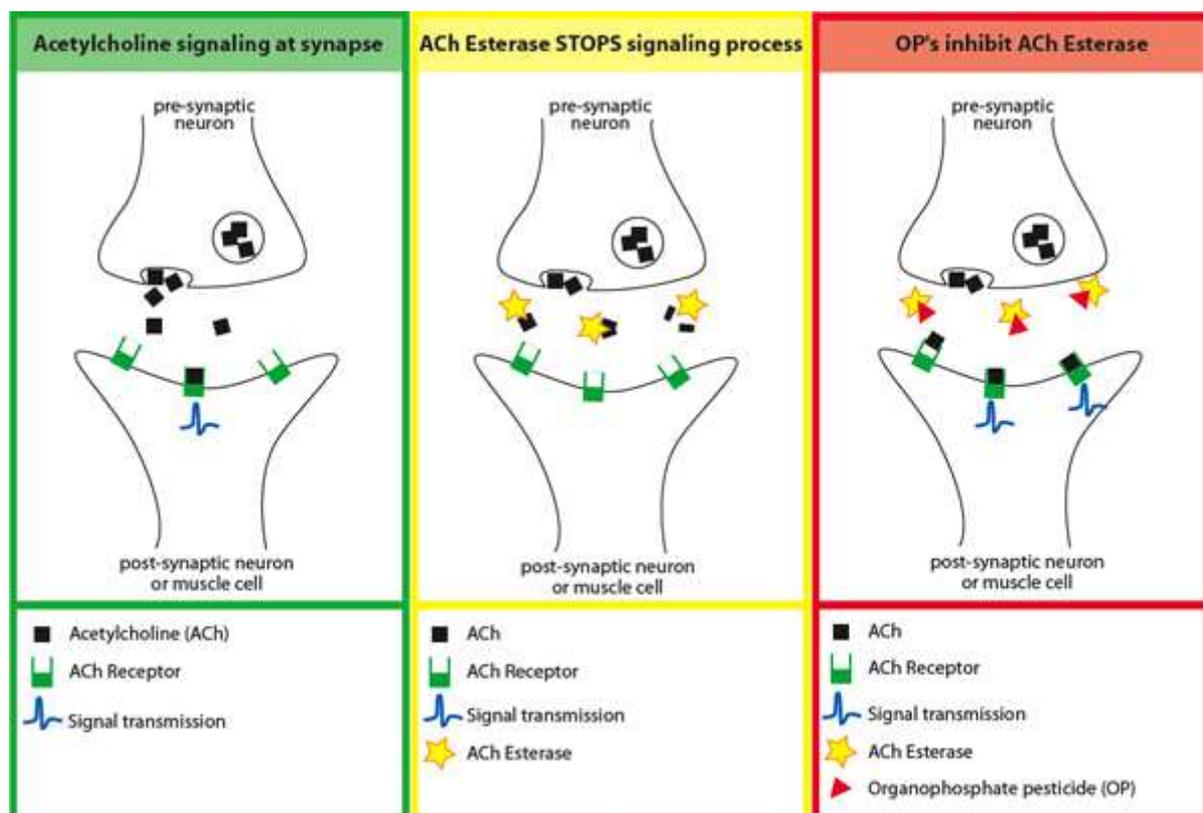


Abbildung 12: Wirkung von Organophosphaten auf den Acetylcholin-Abbau **Links (Grün):** Acetylcholin-Signalweg **Mitte (Gelb):** Wirkung der Acetylcholinesterase **Rechts (Rot):** Blockierung der Acetylcholinesterase durch ein Organophosphat. (Bildquelle: <http://depts.washington.edu/opchild/images/ach.jpg>)

Organophosphate inhibieren die Acetylcholinesterase (AChE) als auch die Butyrylcholinesterase (BChE) (Worek, Eyer and Thiermann 2012). Somit kann Acetylcholin nicht mehr abgebaut werden, es kommt zu einer Erhöhung des Acetylcholinspiegels. Acetylcholin gehört zu den klassischen Neurotransmittern und wird durch die Esterase in Cholin und einen Acetyl-Rest (Acetat) gespalten. Durch die Inhibition der AChE und BChE kommt es zu einer Anhäufung von Acetylcholin im synaptischen Spalt mit muskarin und nikotinartigen Symptomen. Durch die andauernden Nervenimpulse kommt es zur Verkrampfung der Atemwege. Es kommt zur Atemnot (Dyspnoe) aufgrund einer Verengung der Bronchien durch Kontraktion der glatten Bronchialmuskulatur (Bronchokonstriktion). Eine Bronchokonstriktion kann durch die Freisetzung von Entzündungsmediatoren entstehen. Atropin wirkt gegen die Inhibition, da es den Acetylcholin-Rezeptor blockiert und somit Acetylcholin nicht mehr wirken kann, sodass dies häufig als Behandlungsmaßnahme eingesetzt wird (Eddleston et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Pestizide Dimethoat, Omethoat und Chlorpyrifos eingesetzt. Das Insektizid Dimethoat zählt zu den Phosphorsäureestern und wirkt als starkes Nervengift für Insekten und Säugetiere. Es wird durch eine oxidative Desulfurierung von Dimethoat zu Omethoat abgebaut (Abbildung 13). Hierbei wird ein Phosphat-Schwefel durch Sauerstoff ersetzt.

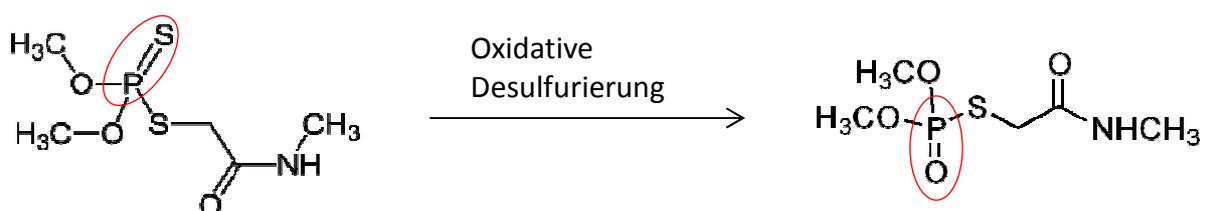


Abbildung 13: Chemische Reaktion des Abbaus von Dimethoat (links) zu Omethoat (rechts).

In Tabelle 1 sind einige chemische und physikalische Eigenschaften von Dimethoat dargestellt (Roberts 1999).

IUPAC Name	O,O-DimethylS-methylcarbamoylmethyl phosphorodithioate
CAS-Nr.	60-51-5
Summenformel	C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂
Molekulargewicht	229,2 g·mol ⁻¹
Wasserlöslichkeit	23,8 mg·l ⁻¹
Hydrolytische Stabilität	pH 2-7 hydrolytisch stabil bei RT, alkalischer und saurer Bereich Hydrolyse

Tabelle 1: Chemische und physikalische Eigenschaften von Dimethoat.

Dimethoat ist unter der Formel O,O-Dimethyl S-methylcarbamoylmethyl phosphorodithioate und einem Molekulargewicht von 229,2 g·mol⁻¹ zu finden. Es ist in Wasser löslich und weist bei Raumtemperatur eine hohe hydrolytische Stabilität auf. Ebenso wie Dimethoat gehört Chlorpyrifos auch zu den Phosphorsäureestern und wird im landwirtschaftlichen Bereich eingesetzt. Chlorpyrifos ist ein toxisches Gift, welches allerdings noch nicht zu den gefährlichsten der Organophosphate zählt. Chlorpyrifos wird durch eine oxidative Desulfurierung zu Chlorpyrifosoxon abgebaut (Abbildung 14).

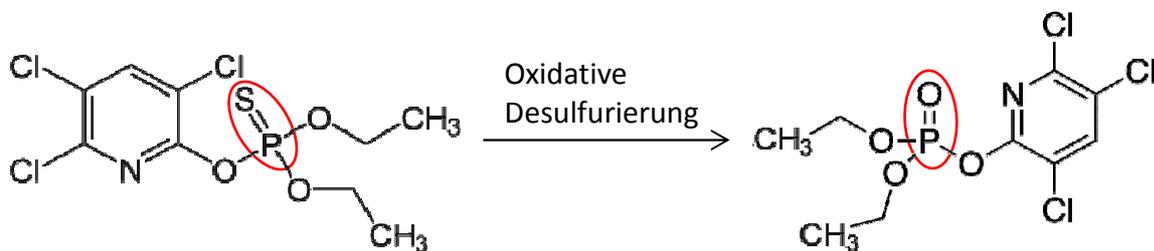


Abbildung 14: Chemische Reaktion von Chlorpyrifos (links) zu Chlorpyrifosoxon (rechts).

Einige chemische und physikalische Eigenschaften von Chlorpyrifos sind in Tabelle 2 dargestellt.

IUPAC Name	O,O Diethyl O-(3,5,6-trichloro-2-pyridyl)phosphorothioate
CAS-Nr.	2921-88-2
Summenformel	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
Molekulargewicht	350,59 g·mol ⁻¹
Wasserlöslichkeit	wasserunlöslich (löslich in EtOH)
Hydrolytische Stabilität	

Tabelle 2: Chemische und Physikalische Eigenschaften von Chlorpyrifos

Chlorpyrifos, auch bekannt als O,O Diethyl O-(3,5,6-trichloro-2-pyridyl) phosphorothioate, ist in Wasser unlöslich und kann jedoch in Ethanol gelöst werden.

Vitamin C

Als Radikalfänger und Antioxidans ist Vitamin C ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems und spielt hier eine wichtige Rolle in der zellulären Immunabwehr. Die Strukturformel, chemische und physikalische Eigenschaften von Vitamin C sind in Abbildung 15 und Tabelle 3 dargestellt.

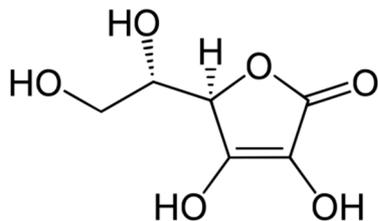


Abbildung 15: Strukturformel Vitamin C (L-Ascorbinsäure)

In vivo wird Vitamin C aus Glucose synthetisiert. Der Vitamin C Spiegel ist bei Rauchern oder auch Diabetikern im Körper um fast 40% niedriger, als bei gesunden Menschen (Telang 2013). Die schützende Wirkung von Ascorbinsäure bei vorstimulierten Erythrozyten mit Dimethoat wurde von Abdallah et. al. untersucht. Vitamin C mit einem Einsatz von 20 mM wirkt gegen den oxidativen Stress, welcher durch die Stimulation mit Dimethoat erfolgt (Abdallah et al. 2011). Ambali et al. hat bei Ratten bereits den Einfluss von Vitamin C gegen Chlorpyrifos getestet, unter anderem in Hinsicht auf Acetylcholin (Ambali and Ayo 2012).

IUPAC Name	(5 <i>R</i>)-5-[(1 <i>S</i>)-1,2-Dihydroxyethyl]-3,4-dihydroxy-5-hydrofuran-2-on
CAS-Nr.	50-81-7
Summenformel	C ₆ H ₈ O ₆
Molekulargewicht	176,13 g·mol ⁻¹
Wasserlöslichkeit	wasserlöslich (333 g·l ⁻¹ bei 20 °C)
Trivialname	Vitamin C

Tabelle 3: Chemische und Physikalische Eigenschaften von L-Ascorbinsäure (Vitamin C)

Vitamin C wird in der heutigen Krebstherapie auch in hohen Dosen eingesetzt, da herausgefunden wurde, dass Vitamin C Krebszellen abtötet (Vuyyuri et al. 2013).

ZIELE DER ARBEIT

In unserem Institut wurde ein Ko-Kultur Modell der oberen Atemwege mit zwei verschiedenen Zelltypen (bronchiale Epithelzellen und Fibroblasten) etabliert, um dort Prozesse *in vitro* zu untersuchen (Pohl et al. 2009). Das bronchiale Ko-Kultur Modell zeigte eine funktionelle Barriere und eine Differenzierung der bronchialen Epithelzellen in die verschiedenen Zelltypen des Epitheliums. Es wurden verschiedene Toxizitätsstudien durchgeführt, allerdings zeigte das Modell ein paar Schwachstellen. So fehlten zum Beispiel immunkompetitive Zellen, welche einen Einfluss auf die funktionelle Barriere und auf das Immunsystem haben.

Um die fehlenden Komponenten zu integrieren wurde das Ko-Kultur Modell mit immunkompetitiven Zellen erweitert. Um das Triple-Kultur Modell zu etablieren wurden aus Monozyten dendritische Zellen und Makrophagen differenziert und charakterisiert. Die Charakterisierung erfolgte durch morphologische Untersuchungen, Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie. Da die dendritischen Zellen mit den bronchialen Epithelzellen nach einer Stimulation mit einem Allergen interagieren, sind diese immunkompetenten Zellen zunächst für die Betrachtung der Immunreaktion interessanter. Die Etablierung der Triple-Kultur erfolgte durch die Zugabe der dendritischen Zellen auf die apikale Seite der Ko-Kultur unter Beobachtung der funktionellen Barriere und der Interaktion zwischen den einzelnen Zelltypen. Entscheidend war, dass die funktionelle Barriere, durch die Zugabe der dendritischen Zellen, nicht negativ beeinflusst wurde.

Um Veränderungen und den Einfluss der dendritischen Zellen auf die Ko-Kultur zu testen wurden verschiedene Toxizitätsstudien in der Mono- und Ko-Kultur im Vergleich zur Triple-Kultur getestet. Hierbei stand die Untersuchung der funktionellen Barriere (Zell-Zell-Kontakte), Veränderungen spezifischer Oberflächenmarker, Zytokinproduktion und des Apoptose-Signalwegs im Vordergrund. Durch den Einfluss von Noxen auf die Triple-Kultur wurden verschiedene Interventionsstudien zur Prophylaxe oder auch Regeneration nach einer Stimulation durchgeführt.

MATERIAL

Zellen

Zellen	Hersteller, Ort
16HBE 14o- HBEC	Dr. Gruenert, University of California, Oakland, CA Universitätsmedizin Mainz
Primäre Monozyten THP-1	Transfusionszentrale, Universitätsmedizin Mainz ATCC, LGC Standards GmbH, Wesel
Wi-38	ATCC, LGC Standards GmbH, Wesel

FACS-Antikörper

Antigen	Klon	Hersteller, Ort
CD11c	IgG1 APC Maus B-ly6	BD Biosciences, Heidelberg
CD25	IgG1 APC Maus M-A251	BD Biosciences, Heidelberg
CD33	IgG1 APC Maus WM53	BD Biosciences, Heidelberg
CD54	IgG1 APC Maus HA58	BD Biosciences, Heidelberg
CD68	IgG2b PE Maus YI/82A	BD Biosciences, Heidelberg
CD83	IgG1 APC Maus HB15e	BD Biosciences, Heidelberg
CD85j	IgG2b PE Maus GHI/75	BD Biosciences, Heidelberg
CD86	IgG1 PE Maus 2331(FUN-1)	BD Biosciences, Heidelberg
CD163	IgG1 PE Maus GHI/61	BD Biosciences, Heidelberg
CD206	IgG1 PE Maus 19.2	BD Biosciences, Heidelberg
CD209	IgG2b FITC Maus DCN46	BD Biosciences, Heidelberg
CD304	IgG1 APC Maus AD5-17F6	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
HLA-DR	IgG2a APC G46-6	BD Biosciences, Heidelberg
IgG1	APC Maus G18-145	BD Biosciences, Heidelberg
IgG2a	APC Maus G155-178	BD Biosciences, Heidelberg
IgG2b	FITC Maus 27-35	BD Biosciences, Heidelberg
IgG1	PE Maus MOPC-21	BD Biosciences, Heidelberg

Primär-Antikörper

Antigen		Verdünnung	Klon	Hersteller
AChE	IgG Maus	1:50	H-134	SantaCruz
CD80	IgG Ziege	1:50	Lot: AAE02	R&D systems
CD83	IgG2b Maus	1:50	HB15a	Beckman Coulter
CD83	IgG1 Maus	1:20	1H4b	Novocastra
(Immunhisto)				
Claudin-5	IgG Ziege	1:200	sc-17668	SantaCruz
DC-SIGN	IgG2b Maus	1:20	120507	R&D systems
(CD209)				
Neuropilin-1	IgG1 Schaf	1:20	Lot: ZUZ03	R&D systems
(CD304)				
Occludin	IgG1 Maus	1:200	OC-3F10	Zymed
ZO-1	IgG-Fraktion Kaninchen	1:200	61-7300	Zymed

Sekundär-Antikörper

Antigen	Fluorochrom	Verdünnung	Hersteller
Goat anti-mouse	IgG Alexa Fluor 488	1:1.000	Molecular Probes
Donkey anti-sheep	IgG Alexa Fluor 488	1:1.000	Molecular Probes
Goat anti-rabbit	IgG Alexa Fluor 546	1:1.000	Invitrogen
Donkey anti-rabbit	IgG Alexa Fluor 594	1:1.000	Invitrogen
Donkey anti-goat	IgG Alexa Fluor 488	1:1.000	Molecular Probes
Rabbit anti-mouse	IgG Alexa Fluor 546	1:1.000	Invitrogen

Chemikalien

Chemikalien	Hersteller, Ort
Aluminiumsulfat	Chroma, Olching
Alzianblau	Chroma, Olching
Aqua dest.	Braun Melsungen AG
BEGM	Cambrex, Wiesbaden
Buffy Coat Monozyten	Universitätsmedizin, Mainz

Chlorpyrifos	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Di Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Dimethoat	IPO, Warsaw (Polen)
Dulbecco's Phosphate Puffered Saline	Gibco, Darmstadt
EGTA	Sigma, Deisenhofen
Eosin	VWR, Darmstadt
Essigsäure 99-100%	Baker, Griesheim
Ethanol	Riedel de Haen, Seelze
Ethylenglycol	VWR, Darmstadt
Fetales Kälberserum	Gibco, Darmstadt
Formaldehyd-Lösung	Roth, Karlsruhe
GM-CSF	PeproTech, Hamburg
Haematoxylin	VWR, Darmstadt
Histopaque	Sigma, Deisenhofen
Human-Albumin 20% (salzarm)	Behring, Hattersheim am Main
IL-1 β	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
IL-4	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
IL-6	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Interferon- γ	Sigma, Deisenhofen
Ionomycin	Sigma, Deisenhofen
Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kernechtrot	Chroma, Olching
Kollagen Type I, Rat tail	BD Biosciences, Heidelberg
L-Alanyl-L-Glutamin (Glutamax I)	Gibco, Darmstadt
Lipopolysaccharide (LPS) von E.coli	Sigma, Deisenhofen
MEM	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Baker, Griesheim
NaOH	Sigma, Deisenhofen
Natrium-Bicarbonat	Sigma, Deisenhofen
Natriumjodat	AppliChem, Darmstadt
Natrium-Pyruvat	Sigma, Deisenhofen
Omethoat	Sigma, Deisenhofen
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Penicillin/ Streptomycin	Gibco, Darmstadt
Pipes	Sigma, Deisenhofen
Polyethylenglykol	Sigma, Deisenhofen
Prostaglandin 2	Sigma, Deisenhofen

RPMI 1640	Gibco, Deutschland
β -Merkaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
TNF- α	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Trypsin/EDTA	Sigma, Deisenhofen
Vitamin C	Sigma, Deisenhofen
Zitronensäure	VWR, Darmstadt

Material

Material	Hersteller, Ort
1,5 ml Eppendorfgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
15 ml Falkons	BD Falcon TM , Erembodegem, Belgien
2,0 ml Eppendorfgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
24 Well, 48 Well-, 96 Well- Platten	TPP, Trasadingen, Schweiz
50 ml Falkons	Greiner bio-one, Tuttingen, Germany
6 Well Platten	TPP, Trasadingen, Schweiz
HTS Transwell 24-Well-Filterplatten	Costar/Corning Life sciences, Amsterdam, Niederlande
Pipetten (2ml, 5ml, 10ml, 25ml)	Greiner bio-one, Tuttingen, Germany
Pipettenspitzen (10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l)	Greiner, Solingen, Germany
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	TPP, Trasadingen, Schweiz

Kits

Kit	Hersteller, Ort
Annexin V-FITC	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce, Rockford USA
Dako REAL TM Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse Code K5005	Dako, Hamburg
Human Protein Apoptose Array	RnD Systems, Wiesbaden

Lösungen und Puffer

Fixierung von Zellen (mit 3,7% PFA):

CS-Puffer: 60,5 g Pipes
 6,76 g EGTA
 80 g Polyethylenglykol
 8 g NaOH
 2.000 ml *aqua dest.*
 →pH auf 6,9 einstellen

Einbetten der Paraffin-Schnitte:

Formalin 4 %ig: 2.000 ml Phosphatpuffer
 6.600 ml Aqua dest.
 1.400 ml 37 %ige Formaldehyd-Lösung

Phosphatpuffer: 67,5 g Di Natriumhydrogenphosphat
 45 g Kaliumhydrogenphosphat
 Auf 5 l mit Aqua dest. Auffüllen
 → pH 6,8-7,0 einstellen (mit 1n NaOH oder 1n HCl)

Haematoxylin-Eosin (HE) Färbung:

Eosin: 11 g Eosin auf 1.000 ml Aqua dest. Auflösen (rühren und erhitzen bis es gelöst ist), pro 100 ml Eosin 1 Tropfen 96 %ige Essigsäure zusetzen. → Ansatz reicht für ca. 1.000 Objektträger

Hämalaun nach Gill: 1. Tag 250 ml Ethylenglykol
(min 4 Monate bei 4°C haltbar) 42 g Aluminiumsulfat
4 g Haematoxylin
In ca. 600 ml Aqua dest. Lösen, gut schütteln

2. Tag 1,3 g Zitronensäure
Zusetzen und gut schütteln

3. Tag 0,6 g Natriumjodat
Alles auf 1 l auffüllen und gut mischen

Alzianblau Färbung:

Alzianblaugebrauchslösung: 1 g Alzianblau
(Haltbar 14 Tage bei RT) auf 100 ml 3 %ige Essigsäurefiltrieren.

Kernechtrot-Lösung: 1 g Kernechtrot
(max. 4 Wochen haltbar) 50 g Aluminiumsulfat
Auf 1.000 ml Aqua dest. unter Erhitzen lösen und vor Gebrauch filtrieren.

Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller, Ort
Brutschrank	Heraeus 6000, Cytoperm 8080	Heraeus
Chemolumineszenz	Chemi-Smart 5100	PeqLab Chemolumineszenz
Dampfsterilisator	Varioklav Typ 500	H+P Labortechnik
ELISA-Reader	TECAN GENios Plus	Männedorf, Schweiz

FACS	FACSCalibur flow cytometer	BD Biosciences, Heidelberg
Färbeautomat (Immunhistologie)	Autostainer	Leica
Fluoreszenzmikroskop	Delta Vision	AB, Applied Precision
Intelli Mixer		Neolab
Kühlschrank	Vario cooler	Bosch
Kühltruhen	Electronic luxus, economic no frost	Bosch
Lichtmikroskope	Inversmikroskop DM IRB	Leica
	Inversmikroskop Telaval 21	Zeiss
Luminex	Bio-Plex System	Bio-Rad, Dreieich
pH-meter	Inolab pH 730	WTW series, Weilheim
Rasterelektronenmikroskop	Modell DSM 962	Zeiss
Reinstwasseranlage	Elgastat Maxima. VF	ELGA
Rollmischer		Karl Hecht, Sondheim
Sterilbank	Lamin Air Flow Typ HB 2448	Hereaus
Sterilisator	TYP 18115300002020	WTC Binder
Sterilisator	Typ 18115300002020	WTC Binder
TER-Messgerät	EVOM	WPI
Transmissionelektronen- mikroskop	Modell EM410	Philips
Varioklav	Typ 500	H+P Labortechnik
Waage	LC-420	Sartorius
Zählkammer	Neubauer	Marienfeld Superior, Lauda Königshofen
Zellzählgerät	CASY 1, Modell TTC	Schärfe-System
Zentrifuge	Labofuge M, Rotor BS 4402/A	Heraeus Sepatech

Computerprogramme

Programme	Hersteller, Ort
CellQuestPro Software	BD Biosciences, Heidelberg
Microsoft® Office XP (Excel, Word)	Microsoft Corporation, USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, USA
Bio-1D	Peqlab, Erlangen

METHODEN

Allgemeine Zellkultur

Humane Monozytische Leukämie Zell-Linie THP-1

Humane Monozytische Leukämie Zell-Linie THP-1 werden in dem Zellkulturmedium RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) mit 10% Fetalen Kälberserum (FCS), 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) und 0.1 mM β -Merkaptoethanol kultiviert. Durch das β -Merkaptoethanol werden die freien Radikale im Medium abgefangen, sodass die Vitalität der Zellen zunimmt. Die Zellen werden auf minimal $7,5 \cdot 10^4$ Zellen/ml gesplittet und zwischen den Passagen 8 und 25 verwendet. Die Zellen bilden mehrere traubenförmige Zusammenschlüsse.

Differenzierung von dendritischen Zellen aus THP-1 (rDCs)

Für die Differenzierung zu dendritischen Zellen werden die THP-1 Zellen auf 6-Well Platten mit einer Zellzahl von $3 \cdot 10^5$ Zellen/ml mit nur 1% FCS nach der Beschreibung von Ogasawara und Berges (Ogasawara et al. 2009, Berges et al. 2005) mit 200 ng/ml IL-4, 100 ng/ml GM-CSF, 20 ng/ml TNF- α und 200 ng/ml Ionomycin, aber ohne β -Merkaptoethanol für 7 Tage stimuliert. Jeden zweiten Tag erfolgt ein Mediumwechsel mit den entsprechenden Zytokinen.

16HBE 14o-

16HBE 14o- wurden von Dr. Gruenert (Universität von Kalifornien, Oakland, CA) zur Verfügung gestellt. Es wird ein Eagle's minimal essential Medium der Firma Sigma-Aldrich mit den Zusätzen 10% FCS, 1% P/S, 2% Natrium Bicarbonat, 1% Glutamax und 1% Natrium Pyruvat verwendet. Die Zellen werden in der Regel 1:5 gesplittet und zwischen einer Passage von 10-30 verwendet. Die Zellen werden immer auf kollagenbeschichteten Zellkulturflaschen kultiviert. Bei der Ko- und Triple-Kultur werden die jeweiligen Filtermembranen mindestens einen Tag zuvor mit Rattenschwanz Kollagen Typ I über Nacht beschichtet.

Wi-38

Humane fötalen Lungen Fibroblasten Zellen, Wi-38 (ATCC-CCL-75), werden bei der Firma ATCC erworben. Es wird das Zellkulturmedium RPMI 1640 mit den Zusätzen 10% FCS, 1% P/S verwendet. Die Zellen werden in der Regel 1:5 gesplittet und zwischen einer Passage von 10-30 verwendet.

Ablösen der Zellen

Trypsinierung

Um adhärente Zellen zu lösen, wird eine Trypsinierung durchgeführt. Hierzu wird das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Mit einer Trypsin/EDTA Lösung (0,25 % Trypsin/ 0,25 % EDTA in PBS) werden die Zellen bei 37°C inkubiert und anschließend durch Zugabe von serumhaltigen Medium das Trypsin inaktiviert.

Abschaben von Zellen

Differenzierte τ DCs werden einmal mit PBS gewaschen und anschließend in jedes Well einer 6-Well Platte 1 ml frisches Medium zugegeben. Die Zellen werden im Medium vorsichtig abgeschabt und anschließend in ein 50 ml Falcon zum Zählen vereinigt.

Ablösen mit PBS

Primäre Monozyten, unreife und reife dendritische Zellen werden mit kaltem PBS auf Eis abgelöst. Hierzu wird das Medium abgesaugt einmal mit PBS (RT) gewaschen und anschließend mit kaltem PBS auf Eis für circa. 10 min geschwenkt und in ein 50 ml Falcon zum Zählen vereinigt. Gegebenenfalls können stark adhärenierte Zellen durch abschaben vorsichtig abgelöst werden.

Ablösen mit Kollagenase I/ EDTA

Kollagenase I (0,1%) und EDTA/BSA (0,01%/0,1%)-Lösung wird im Verhältnis 1:1 gemischt und für primär isolierte HBEC verwendet. Die Zellen werden zuvor mit PBS gewaschen und anschließend für 10-15 Minuten bei 37°C mit der Kollagenase I/ EDTA Lösung inkubiert. Danach werden die Zellen in PBS mit 0,2% BSA aufgenommen und bei 1.500 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen.

Zählung der Zellen

CASY

Die Aussaat der Zellen wird bis auf die primären Monozyten und alle dendritischen Zellen mit dem vollautomatischen Zellzähler CASY von der Firma Schärfe durchgeführt. Hierbei werden tote und lebende Zellen anhand der Zellgröße voneinander unterschieden. Die Zellzahl wird in Suspension pro ml bestimmt.

Neubauer-Zählkammer

Primäre Monozyten und alle dendritischen Zellen werden mittels der Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Neubauer Zählkammer ist aus jeweils 4 Großquadraten aufgebaut, welche wiederum in 4x4 weitere Quadrate aufgeteilt sind. Durch die genau eingesetzte Volumenmenge kann die Zellzahl pro ml berechnet werden. Die Zellzahl wird wie folgt berechnet:

$$\text{mittlere Zellzahl} \cdot \text{Verdünnung} \cdot 10.000 = \text{Zellen/ml}$$

Hier ist die Möglichkeit gegeben, mit Trypanblau tote und lebende Zellen voneinander zu unterscheiden.

Isolierung primärer bronchialer Epithelzellen aus Lungengewebe

Die Aufarbeitung des Lungengewebes zur Isolierung bronchialer Epithelzellen erfolgt nach der Methode von Lechner (Lechner et al. 1981). Für die Isolation wird tumorfreies Gewebe distal aus Resektaten von Patienten verwendet. Die Patienten

werden aufgrund eines Bronchialkarzinoms, pulmonaler Metastasen eines extrabronchopulmonalen Primärkarzinoms einer Lob- oder Pneumektomie operiert. Entnommene Bronchialgewebstücke (2-4 cm Länge) werden in Transport-Puffer gelegt, sodass unter einer Sterilbank das Lungengewebe in kleinere Stücke (1-2 cm Länge) geteilt werden können. Die Bronchusstücke werden von Gewebe befreit, einmal gewaschen und mit der luminalen Seite nach unten auf eine mit Kollagen beschichtete Gewebekulturflasche gesetzt. Nach einer 30 minütigen Adhäsionsphase wird 5 ml BEGM (Bronchial Epithelial Cell Growth Medium) zugegeben und die Stücke für 1 Woche bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach zwei Wochen können die Zellen vereinzelt werden und zu einem konfluenten Zellrasen weiter wachsen. Die Bronchusstücke werden nur zum einmaligen Auswachsen verwendet und die ausgewachsenen Epithelzellen werden direkt für die Ko- & Triple-Kultur verbraucht.

Buffy Isolation aus Vollblut

Die Buffy Isolation wurde nach der Anleitung von Dauer et al. Durchgeführt (Dauer et al. 2003, Dauer et al. 2005). Mit Hilfe einer Dichtegradienten-Zentrifugation kann die monozytäre Phase des Vollblutes isoliert werden. Für die Auftrennung des Vollblutes werden auf 15 ml Histopaque jeweils 25 ml einer 1:1 Mischung Vollblut mit PBS überschichtet und bei 2.500 rpm für 30 min ohne Bremse zentrifugiert. Die oberste Phase der zentrifugierten Blutprobe ist Plasma, dann kommt die monozytäre Phase (= Buffy Coat) zuletzt die Erythrozyten mit dem restlichen Histopaque. Zwei Buffy Coats werden vorsichtig abgenommen und in ein Falcon auf Eis vereinigt und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Das Eis ist hierbei wichtig, sodass die Monozyten nicht am Plastik adhären. Bei 1.800 rpm für jeweils 10 min, mit Bremse, wird der Buffy Coat zweimal gewaschen, sodass am Ende nur noch zwei Falkons mit der monozytären Phase vorhanden sind. Während des zweiten Waschschrtes wird mit einer Trypanblau Färbung mittels einer Neubauer-Zählkammer die Zellen der zwei Falkons gezählt. Mit einer Zellzahl zwischen 10-15·10⁶ Zellen/Well werden die Zellen auf 6-Well Costar Platten ausgesät mit 1,5% Humanalbumin und 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) für 2 h adhären gelassen. Nach dieser

Inkubationszeit werden die Platten dreimal mit warmen PBS gewaschen und in RPMI 1640 mit 1,5% Humanalbumin und 1% P/S aufgenommen.

Differenzierung von dendritischen Zellen aus primären Monozyten (pDCs)

Nach dem Waschschrift kommen zu den 1,5% RPMI 500 U/ml IL-4 und 1.000 U/ml GM-CSF zur Differenzierung von unreifen dendritischen Zellen (imDC), welche im Überstand zu finden sind. Durch Zugabe von 10 ng/ml IL1 β , 1.000 U/ml IL-6, 10 ng/ml TNF- α , 1 μ g/ml PGE₂ differenzieren die Zellen weiter zu reifen dendritischen Zellen (mDC). mDCs können bis zu einer Woche verwendet werden.

Differenzierung von Makrophagen aus primären Monozyten (pM)

Nach dem Waschschrift wird RPMI mit 1% FCS und 1% P/S mit 500 U/ml IL-4 und 1.000 U/ml GM-CSF zur Differenzierung von adhärennten Makrophagen verwendet. Jeden zweiten Tag erfolgt ein Mediumwechsel mit erneuter Zytokinzugabe von IL-4 und GM-CSF. Die Zellen werden nach 5 Tagen in einem Serum- und zytokinfreien Medium für weitere 2 Tage kultiviert und können anschließend für Versuche eingesetzt werden. Makrophagen werden mit Trypsin/EDTA abgelöst.

Durchflusszytometrie

Die Methode der Durchflusszytometrie beruht auf einer Messung von Zellen durch Anregung eines Lasers und die Auswertung der daraus resultierenden Emission. Mittels eines Detektors können unterschiedliche Streulicht und Fluoreszenzsignale ausgewertet werden. Das Volumen der Zelle kann durch die Beugung des Lichtes (FSC = Forward Scatter) und die Granularität über die Brechung des Lichtes (SSC = Side Scatter) ermittelt werden. Die Granularität hängt von dem Zellkern und der Menge der Vesikel in der Zelle ab. Durch verschiedene Filterkanäle können die einzelnen Fluoreszenzsignale bestimmter Antikörper detektiert werden. Alle zu

untersuchenden Antikörper werden mit einer Isotyp-Kontrolle verglichen und ausgewertet. Es werden verschiedene Fluorochrome (siehe Tabelle 4) eingesetzt.

Fluorochrom	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
FITC (Fluoresceinisothiozyanat)	494 nm	520 nm
PE (R-phycoerythrin)	496 nm	578 nm
APC (Allophycocyanin)	650 nm	660 nm

Tabelle 4: Absorptions- und Emissionsmaxima der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe

Abgelöste Zellen werden mit 3,7% Paraformaldehyd in CS-Puffer 15 min bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Nach Zugabe von PBS mit 5% FCS werden die Proben auf die jeweiligen FACS Röhren verteilt und bei 1.500 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 100 µl PBS aufgelöst unter Zugabe des direkt markierten Antikörpers. Es wurden folgende Antikörper verwendet: CD11c, CD25, CD33, CD54, CD68, CD83, CD85j, CD86, CD163, CD206, CD209, CD304 und HLA-DR. Pro Messung werden 200.000 Zellen pro Röhren verwendet, sodass jeder Antikörper mit 10 µl eingesetzt wird. Die Proben werden im Dunkeln für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wird mit 1 ml PBS und 5% FCS die Färbung gestoppt und erneut bei 1.500 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 500 µl PBS mit 5% FCS aufgenommen und gemessen. Die Messung erfolgt mit dem FACSCalibur Durchflusszytometer.

Die Auswertung erfolgt mit der CellQuestPro Software mittels Quadranten Statistik. Zur Übersicht werden die einzelnen Messungen auch mit einer Histogramm Auswertung dargestellt.

Annexin V-FITC Kit

Mit dem Annexin-V Kit von Miltenyi Biotec kann zwischen lebenden, apoptotischen, und toten Zellen unterschieden werden. Annexin-V bindet an Phosphatidylserin von apoptotischen Zellen, sie sind negativ für Propidiumiodid. Tote Zellen sind sowohl Annexin-V als auch Propidiumiodid positiv, wohingegen für lebende Zellen beide negativ sind (Datenblatt Kit).

Die Vorgehensweise erfolgt wie im Kit beschrieben. Zu Beginn wird die Zellzahl der Proben bestimmt, hierbei ist zu beachten, dass die angegebenen Mengen für einen

Versuch mit maximal 10^6 Zellen ausgelegt sind. Wenn die Zellzahl darüber liegt, müssen die Puffer und Antikörper daran angepasst werden. Für bis zu 10^6 Zellen werden 1 ml 1x Binding Puffer zugegeben. Bevor die Zellen gewaschen werden, werden diese bei 2.500 rpm für 5 min zentrifugiert und anschließend mit 1 ml 1x Binding Puffer bei 2.500 rpm für 10 min gewaschen. Der Überstand wird vollständig abgesaugt und der Waschschrift gegebenenfalls wiederholt. Das Pellet wird in 100 μ l Binding Puffer pro 10^6 Zellen gelöst und 10 μ l Annexin V-FITC zugegeben. Das Röhrchen wird gut geschüttelt und für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit werden die Zellen wieder, wie im obigen Schritt, mit 1 ml 1x Binding Puffer gewaschen. Der Überstand wird vollständig abgesaugt und der Waschschrift gegebenenfalls wiederholt. Das Pellet wird in 500 μ l Binding Puffer resuspendiert. Kurz vor der Messung wird 5 μ l PI Lösung zugegeben und dann am Durchflusszytometer gemessen.

Apoptose Array

Mit dem Human Protein Apoptose Array (RnD systems) werden die zu bestimmenden, als auch Kontroll-Antikörper, auf eine Nitrozellulose Membran gespottet. Mit dem Array-Puffer 1 werden die Nitrozellulose-Membranen für 1 h bei RT schüttelnd inkubiert, sodass der blaue Farbstoff auf der Membran verschwindet. Die Proteinproben werden mit dem Array-Puffer 1 und dem Lysis-Puffer auf eine Konzentration zwischen 200-400 μ g verdünnt und über Nacht bei 2-8 °C auf der entsprechenden Membran schüttelnd inkubiert. Nach der Inkubation werden ungebundene Proteine durch 3 Waschschriffe ausgewaschen. Detektionsantikörper werden mit dem Array-Puffer 2 und 3 angesetzt und auf die Membranen für 1 h bei RT verteilt. Es folgen wieder 3 Waschschriffe und die Zugabe von Streptavidin-HRP für 30 min bei RT. Um die Spots zu detektieren wird nach einem erneuten 3 maligen Waschen ein Chemolumineszenz-Reagenz 1 mit dem Chemolumineszenz-Reagenz 2 1:1 angesetzt und für 1 min bei RT inkubiert und anschließend direkt im PeqLab Chemolumineszenzgerät für 5 beziehungsweise 10 min gemessen.

Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgt mit einem „Bicinchoninic acid (BCA)-Protein-Assay Reagent Kit“ (Pierce). Zunächst wird eine Standardreihe mit den Konzentrationen 2.000 µg/ml, 1.500 µg/ml, 1.000 µg/ml, 750 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml und 25µg/ml BSA in PBS angesetzt. Die Herstellung der BCA-Arbeitslösung erfolgt mit 50 Teilen BCA Reagenz A und einem Teil BCA Reagenz B. Alle benötigten Reagenzien werden immer frisch angesetzt. Sowohl die Standardreihe als auch die Proben werden 1:6 für die Messung verdünnt und jeweils 25 µl in eine 96-Well Platte überführt. Als Negativkontrolle wird PBS verwendet. Nach Zugabe von 75 µl BCA-Arbeitslösung wird die Platte für 30 Sekunden auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler gemischt. Nach einer 30 min Inkubationszeit bei 37°C wird die Platte auf RT abgekühlt und bei einer Absorption bei etwa 562 nm gemessen. Für die Auswertung wird bei allen Proben die Absorption des Nullwertes abgezogen.

Immunfluoreszenz

Nach der Fixierung der Zellen werden diese mit 0,5 % Triton-x-100 in PBS für 20 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Der jeweilige Primär-Antikörper wird in PBS mit 3 % BSA verdünnt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Zellen einmal mit PBS, einmal mit 0,5 % Triton-x-100 in PBS und dreimal wieder in PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wird der Sekundär-Antikörper für 1 Stunde bei RT im Dunkeln hinzugefügt. Der Sekundär-Antikörper wird auch in PBS mit 3 % BSA verdünnt. Die verschiedenen Fluorochrome sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Fluorochrom	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
Alexa Fluor® 488	495	519
Alexa Fluor® 546	556	573
Alexa Fluor® 594	590	617

Tabelle 5: Verwendete Fluorochrome für die Immunfluoreszenz

Vor der Kerngegenfärbung erfolgt ein dreimaliger Waschvorgang mit PBS und anschließend im destillierten Wasser. Das Eindecken erfolgt gleichzeitig mit der

Kerngegenfärbung mit dem Fluoroshield DAPI von Immuno Biosciences. Durch einen weiteren über Nacht Schritt können die eingedeckelten Proben aushärten.

Bio-Plex

Es wurden zwei Bio-Plex Assays verwendet. Zum einen die Kits von der Firma Biorad, bei dem alle Zytokine einzeln für den jeweiligen Versuch zusammen gemischt werden müssen. In späteren Versuchen wurde ein Kit der Firma RnD verwendet, welche die zu messenden Zytokine schon gemischt haben.

Biorad-Kit

Verdünnungen der einzelnen Ansätze sehen wie folgt aus (Ansatz für 2 Platten).

Standard I	Verdünnung	Bemerkungen
Standard in 500 µl Medium lösen (30 min auf Eis)	1:4	Standard S1-S8

Mikropartikel	Puffer	Bemerkungen
Verdünnung 1:25	Bioplex Assay Puffer	50 µl/ Well

Antikörper/Streptavidin-PE	Puffer	Bemerkungen
Verdünnung 1:100	Detection Antibody Diluent/	25 µl/ Well
	Bioplex Assay Puffer	50 µl/ Well

Tabelle 6: Ansätze für den Bioplex (Biorad-Kit)

Für den Bio-Plex Assay werden mikroskopische Beads mit unterschiedlich markierten Spektralfarben von der Firma Biorad verwendet. Zunächst wird eine spezielle 96-Well Platte mit Filtermembranen am Boden mit 100 µl Wasch-Puffer befeuchtet. Mit einer Vakuum-Pumpe wird die Flüssigkeit durch den Boden abgesaugt und 50 µl der fertige Mikropartikel-Cocktail zugegeben. Anschließend wird die Platte wieder abgesaugt und zweimal gewaschen. Pro Well werden 50 µl des Standards bzw. der Proben pipettiert. Die Platte wird vor jedem Inkubationsschritt kurz bei $\frac{3}{4}$ der maximalen Geschwindigkeit für 30 Sekunden geschüttelt und dann über Nacht mit 270 rpm inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wird die Platte dreimal

mit jeweils 100 µl Wasch-Puffer gewaschen. Es folgt eine weitere Inkubationszeit von 30 Minuten mit 50 µl des Biotin-Antikörper Cocktails auch unter Schütteln mit 270 rpm. Nach erneutem dreimaligem Waschen wird jeweils 50 µl Streptavidin-PE zugegeben und für weitere 10 Minuten bei 270 rpm inkubiert. Kurz danach wird die Platte wieder dreimal gewaschen, in 125 µl BioPlex Assay Puffer aufgenommen, kurz geschüttelt und anschließend am Bioplex gemessen.

Luminex Screening Assay (VersaMap) von RnD Systems

Verdünnungen der einzelnen Ansätze sehen wie folgt aus (Ansatz für 2 Platten).

Standard(s)	Volumen der Kalibrator Lösung (Volumen 500 µl)	Bemerkungen
Je 100 µl	400 µl oder weniger	1:3 weiter verdünnt (S1-S6)
Mikropartikel/Antikörper	Puffer (RD2-1)	Bemerkungen
1,00 ml	10,00 ml	vorher 30 Sekschütteln
Streptavidin-PE	Wasch Puffer	Bemerkungen
110 µl	11 ml	vorher 30 Sekschütteln

Tabelle 7: Ansätze für den Bioplex (RnD Kit)

Für den Bio-Plex Assay der Firma RnD systems wurde verfahren wie bei dem Biorad Kit. Die Inkubationszeiten verändern sich bei diesem Kit, so werden die Proben 2 Stunden, die Antikörper 1 Stunde und das Streptavidin-PE für 30 min inkubiert.

Rasterelektronenmikroskopie

τDCs werden auf runden Glasblättchen mit einem Durchmesser von 13 mm ohne Kollagenbeschichtung in einer 24-Well Platte mit einer Zellzahl von $3 \cdot 10^5$ Zellen/ml ausgesät. Die Zellen werden ausdifferenziert und mit 3,7% Paraformaldehyd für 20 min bei RT fixiert. Nach 3 Waschschrritten mit PBS werden die Zellen für die Elektronenmikroskopie bei 4°C, bis zu den Aufnahmen, gelagert. Die Weiterverarbeitung nach der Fixierung und Aufnahmen wurden von der AG Brochhausen (Universitätsmedizin Mainz) durchgeführt.

Paraffin-Schnitte

Membranen der Ko- und Triple-Kultur werden nach den jeweiligen Stimulationen mit 3,5% PFA für 20 min bei RT fixiert. Anschließend werden die Filter dreimal gewaschen und im Einbettprogramm (siehe Tabelle 8) eingebettet.

Nachtprogramm		
1. Formalin	4%	1 h
2. Formalin	4%	1 h
3. Ethanol	70%	1 h
4. Ethanol	80%	1 h
5. Ethanol	96%	1 h
6. Ethanol	96%	1 h
7. Ethanol	100%	1 h
8. Ethanol	100%	1 h
9. Xylol		1 h
10. Xylol		1 h
11. Paraffin		1 h
12. Paraffin		1 h
13. Paraffin		1,5 h

Tabelle 8: Einbettung der Filter für die Paraffin-Schnitte

Nach Beendigung des Programms werden die eingebetten Proben in Paraffin ausgeblockt. Aus den Paraffinblöcken werden 3-4 μm Schnitte angefertigt und vor den jeweiligen Färbungen entparaffiniert.

Hematoxylin-Eosin (HE) Färbung

Im Autostainer Leica werden die entparaffinierten Schnittpräparate mit den nach dem folgenden Programm (siehe Tabelle 9) im Färbeautomat von Leica bearbeitet.

Im Färbeergebnis sind die Zellkerne in blau, das Zytoplasma und Bindegewebsfasern in rot und Erythrozyten in rot-orange erkennbar.

Reagenz	Zeit	Reagenz	Zeit
Xylol	50 sek	Hämalaun nach Gill 4%	50 sek
Xylol	50 sek	Hämalaun nach Gill 4%	50 sek
Xylol	50 sek	Hämalaun nach Gill 4%	50 sek
Xylol	50 sek	Hämalaun Wasser	50 sek
Xylol	50 sek	Leitungswasser	50 sek
Xylol	50 sek	Leitungswasser	50 sek
Xylol	50 sek	Leitungswasser	50 sek
Xylol	50 sek	Eosin+Essigsäure	50 sek
Isopropanol 100 %	50 sek	Eosin+Essigsäure	50 sek
Isopropanol 100 %	50 sek	Isopropanol 70 %	50 sek
Isopropanol 100 %	50 sek	Isopropanol 96 %	50 sek
Isopropanol 96 %	50 sek	Isopropanol 100 %	50 sek
Isopropanol 96 %	50 sek	Isopropanol 100 %	50 sek
Isopropanol 70 %	50 sek	Isopropanol 100 %	50 sek
Isopropanol 70 %	50 sek	Xylol	50 sek
		Xylol	50 sek

Tabelle 9: Färbeprotokoll von der HE-Färbung im Automat (erst linke Spalten der Tabelle dann rechte Spalte der Tabelle)

Alzianblau-Färbung

Die entparaffinierten Schnitte werden in 3 %ige Essigsäure für 3 Minuten gestellt. Nach dieser Inkubationszeit werden die Objektträger für 30 Minuten in die Alzianblau Gebrauchslösung und anschließend für 5 Minuten in Leitungswasser gelegt. Vor und nach der 10 minütigen Kernechtrot Färbung, werden alle Schnittproben gut mit destilliertem Wasser gespült. Danach erfolgt eine aufsteigende Alkoholreihe bis Xylol (vergleichbar wie bei der HE-Färbung). Die Objektträger werden alle mit Entellan eingedeckelt.

Im Färbeergebnis sind alle Kerne hellrot, das Zytoplasma und Bindegewebsfasern in rosa und saure Mukopolysaccharide in blau erkennbar.

CD83 Immunhistologie Färbung

Für die Immunhistologie Färbung wird als Detektionssystem das Dako Kit, Dako REAL™ Detection System (Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse Code K5005) verwendet. Färbeablauf beginnt mit einer Inkubation mit Primär-Antikörper für

30 Minuten. Die Objektträger werden mit einem Dako Waschpuffer gespült. Danach folgt eine Inkubation des sekundären biotinylierten Antikörpers für weitere 30 Minuten. Nach dieser Inkubationszeit werden die Objektträger mit dem Dako Waschpuffer gewaschen und anschließend mit Streptavidin-Alkaliner Phosphatase inkubiert. Nach 30 Minuten erfolgen ein Waschschrift und anschließend eine 7 minütiger Behandlung mit AP-Chromogen. Die Gegenfärbung erfolgt mit Mayer's Hämalaun.

Bronchiales Ko-Kultur Modell (HTS 24-Transwell Filter Platten)

Für die Kulturen werden HTS 24-Transwell Filter Platten verwendet, diese bestehen aus einer 10 µm dicken Polycarbonatmembran mit 0,4 µm großen Poren. Vor der Aussaat wird die apikale Filterseite der Transwells mit Rattenschwanzkollagen beschichtet. Dann werden die Fibroblasten Zellen (Wi-38) abgelöst und mit einer Zellzahl von $6,6 \cdot 10^4$ Zellen/ml ($0,33 \cdot 10^4$ Zellen/Insert = $1 \cdot 10^4$ Zellen/cm²) mit 50 µl auf der basolateralen Filterseite ausgesät und für 2 Stunden bei 37°C mit 5 % CO₂ adhärirt gelassen. Nach dieser Inkubationszeit wird in die Bodenwells 1 ml frisches Medium zugegeben und die 16HBE 14o- oder auch HBEC mit einer Zellzahl von $8,25 \cdot 10^4$ Zellen/ml ($1,65 \cdot 10^4$ Zellen/Insert = $5 \cdot 10^4$ Zellen/cm²) mit 200 µl in die Inserts ausgesät. Die Zellen werden dann in der Ko-Kultur für 10 Tage bis zu 3 Monate für die jeweiligen Versuche weiter kultiviert.

Flüssigkeits-Luft-Grenze der Bronchialmodelle (ALI Kultivierung)

Nach 3 Tagen wird das Bronchialmodell an der Flüssigkeits-Luft-Grenze (ALI) kultiviert. Hierzu wird aus den oberen Wells der HTS 24-Transwell Filter Platte das Medium abgesaugt, mit einem Zwischenstück die Platte angehoben und die unteren Wells mit 650 ml Medium aufgefüllt. In das Insert wird nur 50 µl Medium zugegeben, um die Zellen vor Austrocknung zu schützen. Die Kultivierung der Modelle erfolgt für die restliche Zeit bis zur Stimulation an der ALI-Grenze und wird lediglich vor der TER-Wert Messung unterbrochen.

Bronchiales Triple-Kultur Modell (HTS 24-Transwell Filter Platten)

Um das Triple-Kultur Modell auszusäen werden dendritische Zellen in Monokultur aus Monozyten differenziert und parallel das bronchiale Ko-Kultur Modell kultiviert. Eine halbe Stunde vor der Stimulation werden die dendritischen Zellen abgelöst und auf die Filtermembranen in einer Zellzahl von $8,33 \cdot 10^4$ Zellen/ml ($1,5 \cdot 10^4$ Zellen/Insert = $4,5 \cdot 10^4$ Zellen/cm² = 450 Zellen/mm²) ausgesät. Bei den DCs wird zunächst das Medium abgesaugt und jedes Well mit 1 ml PBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS wird 1 ml frisches Medium (MEM oder BEGM) hinzugegeben und die τ DCs werden vorsichtig abgeschabt, wogegen die ρ DCs mit kaltem PBS auf Eis abgelöst werden. Durch kurzes Schwenken der Platte können alle Zellen gelöst und in ein 50 ml Falcon vereinigt werden. Die Zählung der DCs erfolgt mittels Neubauer Zählkammer. Für die primären Modelle werden primären DCs (ρ DCs) verwendet und für das Zell-Linien Modell werden DCs aus THP-1 verwendet (τ DCs). Die Triple-Kultur wird maximal 30 Stunden stimuliert. Ausdifferenzierte DCs können maximal 5-7 Tage weiter verwendet werden, bevor sie in die Apoptose gehen.

TEER Messung

Durch zwei Ag/AgCl-Elektroden an einem Millivolt-/Ohm-Meter (EVOM) kann der transepitheliale elektrische Widerstand gemessen werden. Die längere Elektrode wird in das Medium der basolateralen Seite (Fibroblasten) und die zweite, kürzere Elektrode in das Medium der apikalen Seite (Epithelzellen) getaucht. Es wird mittels des EVOMs Strom angelegt und der Widerstand gemessen. Vor dieser Messung wird 2 Stunden zuvor die Kultur submers weiterkultiviert. Im oberen Well sind 200 μ l Medium und im unteren Well 1 ml zur Weiterkultivierung vorhanden. Die Kultur wird bei 37°C im Brutschrank weiter kultiviert. Zur Kontrolle wird ein Leerfilter, ohne Zellen, mitgemessen (im Durchschnitt 45 $\Omega \cdot \text{cm}^2$) und von der eigentlichen Messung abgezogen. Mit folgender Formel lässt sich der Widerstand von 1 cm² berechnen:

$$\text{Gemessener Widerstand } [\Omega] \cdot \text{Fläche der Filtermembran } [\text{cm}^2] = \text{TEER } [\Omega \cdot \text{cm}^2]$$

Bei den verwendeten HTS 24-Transwell-Filterplatten beträgt die Fläche der Filtermembran 0,33 cm².

Beschichtung der Platten

Die Filter, als auch die Kulturflaschen, für die Epithelzellen werden mit Rattenschwanz Kollagen Typ I beschichtet. Mit einer Fläche von 0,33 cm² werden die Filter mit 40 µl beschichtet, sodass eine Endkonzentration von 12,12 µg /cm² auf der apikalen Seite erreicht wird. Die Zellkulturflaschen werden mit derselben Konzentration beschichtet, so wird zum Beispiel bei einer T25 ein Kollagen-Suspensionsvolumen von 1 ml benötigt. Das Kollagen wird in 0,1 M Essigsäure angesetzt und über Nacht unter einer sterilen Werkbank ausgedampft.

Ansetzen der Stimulanzen

Chlorpyrifos: gelöst in EtOH (100 mM)

→ verwendete Konzentrationen 100 µM, 300 µM, 500 µM, 700 µM, 1.000 µM

Dimethoat: gelöst in destilliertem Wasser (100 mM)

→ verwendete Konzentrationen 100 µM, 300 µM, 500 µM, 700 µM, 1.000 µM

Omethoat: gelöst in destilliertem Wasser (100 mM)

→ verwendete Konzentrationen 20 µM, 70 µM, 100 µM, 300 µM, 500 µM

LPS: gelöst in destilliertem Wasser (8 mg/ml)

→ verwendete Konzentration 1 µg/ml

TNF-α: gelöst in destilliertem Wasser (10 µg/ml)

→ verwendete Konzentration 3 ng/ml

Int-γ: gelöst in destilliertem Wasser (2·10⁶ U/ml)

→ verwendete Konzentration 200 U/ml

Fixieren der Zellen

Zunächst werden die Zellen vor der Fixierung einmal mit PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgt entweder mit 3,7 % Paraformaldehyd (PFA) in CS-Puffer für 20 Minuten oder mit Methanol:Ethanol (2:1) für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Nach dieser Inkubationszeit werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und im letzten PBS bei 4°C bis zur weiteren Verarbeitung (Immunzytochemie, Immunfluoreszenz) aufbewahrt.

ERGEBNISSE

Differenzierung und Charakterisierung von dendritischen Zellen aus THP-1

Dendritische Zellen aus der Leukämie-Zell-Linie THP-1 (τ DCs) wurden mit den Zytokinen IL-4 (200 ng/ml), GM-CSF (100 ng/ml), TNF- α (20 ng/ml) und Ionomycin (200 ng/ml) über 7 Tage differenziert. Während der Differenzierung veränderten die Zellen stark ihre Morphologie, ihr Zellkörper und der Zellkern vergrößerte sich sehr und auch die Oberfläche zeigte lange, dünne Ausläufer in alle Richtungen. Die Größe der Zelle stieg um ein Vielfaches an und sie adhärten, im Gegenteil zur vorherigen Suspensionskultur. Selbst durch Trypsinierung konnten die Zellen nicht mehr abgelöst werden und mussten durch vorsichtiges Abschaben abgelöst werden.

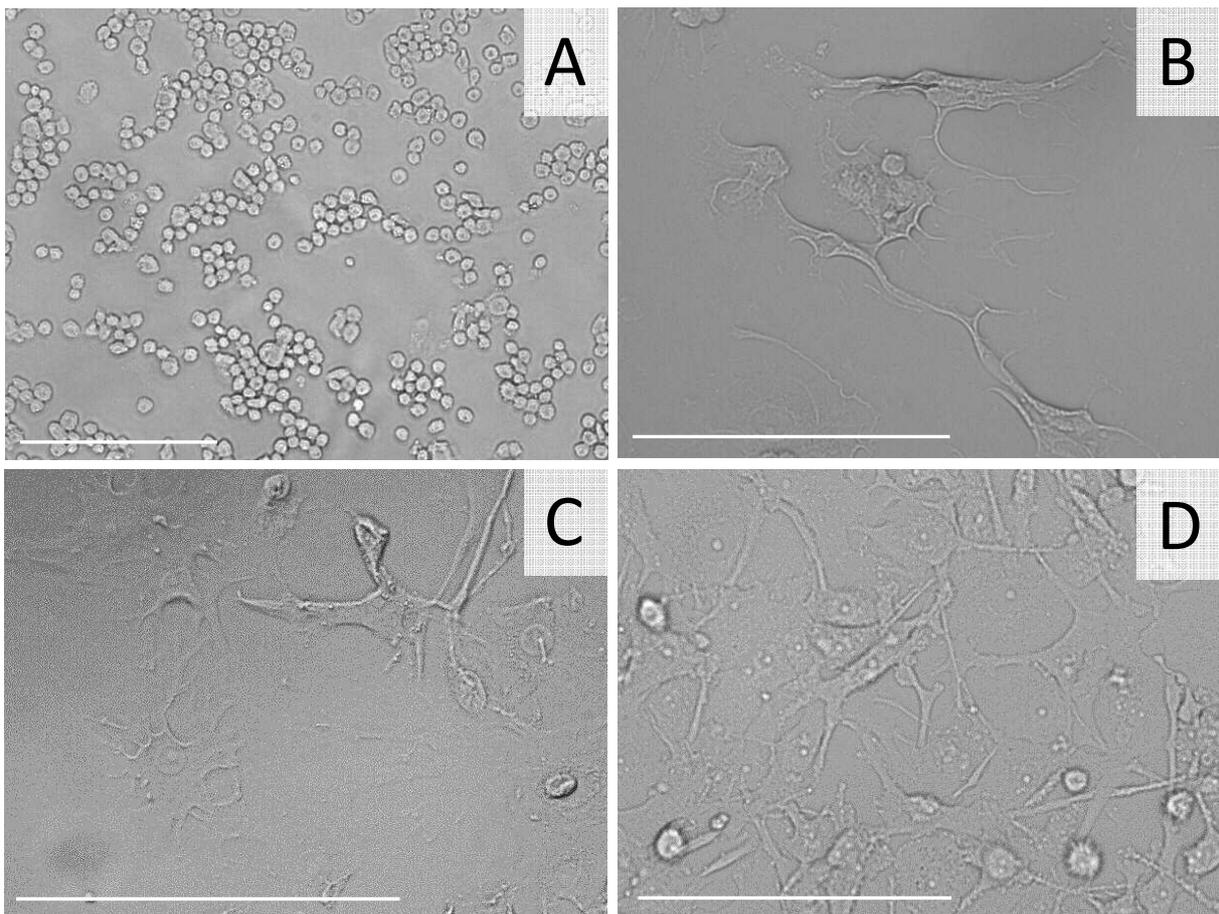


Abbildung 16: Lichtmikroskopie-Aufnahmen von THP-1 im Vergleich zu dendritischen Zellen aus THP-1 (τ DCs). **A:** THP-1 Monozyten unbehandelt **B-D:** Ausdifferenzierte reife τ DCs. Maßstabsbalken = 200 μ m.

Mit einem Durchlichtmikroskop (Abbildung 16) als auch mit einem Rasterelektronenmikroskop (Abbildung 17) wurden die Unterschiede zwischen unbehandelten THP-1 und τ DCs deutlich erkennbar. Reife dendritische Zellen aus THP-1 differenzierten erst vollständig bei einer gewissen Aussaat-Dichte und nach 7 Tagen Stimulation. Unreife dendritische Zellen konnten nach wenigen Tagen eine Anhäufung von Vakuolen im Zytoplasma aufweisen.

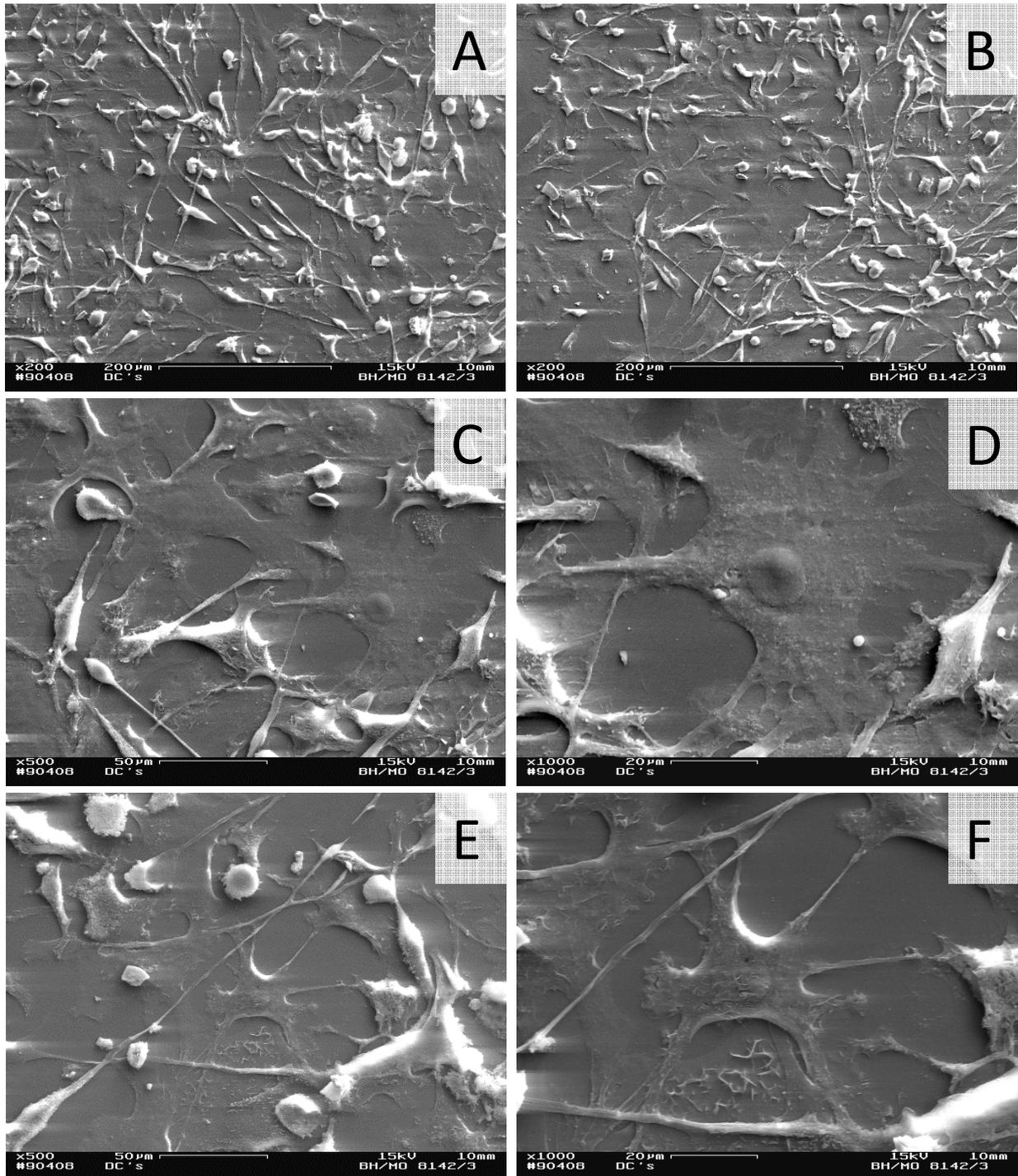


Abbildung 17: Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahmen τ DCs **A,B:** 200-fache Vergrößerung **C,D:** 500-fache Vergrößerung und 1.000-fache Vergrößerung eines Ausschnittes einer reifen dendritischen Zelle **E,F:** 500-fach Vergrößerung und 1.000-fache Vergrößerung eines Ausschnittes einer reifen dendritischen Zelle

Die Vergrößerung des Zellkerns und des Zellkörpers war schon nach kurzer Zeit erkennbar, wohingegen die Ausbildung der Dendriten erst nach einer Stimulation von 5 Tagen sichtbar wurde. Dendritische Zellen nahmen durch ihre Dendriten Kontakt zu den Nachbarzellen auf. Dendriten konnten bis zu einer Länge von 160 µm nachgewiesen werden (Abbildung 17). Neben den τ DC waren auch noch undifferenzierte, runde Monozyten zu finden (Abbildung 17E). Ausdifferenzierte τ DCs wurden ohne Beschichtung der Zellkulturträger adhärent und viel flacher, ebenso die Zellorganellen.

Die Charakterisierung der τ DCs erfolgte mittels Durchflusszytometrie (Tabelle 11). In Tabelle 10 sind alle Marker und deren Funktion, die für die Analyse verwendet wurden, aufgeführt.

	Funktion
CD11c	wichtig für Zell-Zell-Interaktionen während inflammatorischen Prozessen
CD25	Rezeptor für Interleukin-2, spezifisch für aktivierte Makrophagen und negativ bei Monozyten und dendritischen Zellen
CD33	wichtig für Zell-Adhäsion, Zell-Zell-Signale, Apoptose (vor allem bei Monozyten stark exprimiert)
CD54	= ICAM-1
CD68	spezifisch für Makrophagen
CD83	exprimiert von Antigenpräsentierenden Zellen (spezifisch für dendritische Zellen)
CD85j	= HLA Klasse 1
CD86	bindet an CD28 der T-Zelle und gibt somit ein Signal für die T-Zell Aktivierung
CD163	spezifisch für Makrophagen (=Hämoglobin)
CD206	Makrophagen Mannose Rezeptor (spezifisch für Makrophagen)
CD209	= DC-SIGN, spezifisch für die DC Migration, T-Zell Proliferation
HLA-DR	= MHC Klasse II (für Antigenpräsentierende Zellen – spezifisch für DCs)

Tabelle 10: Übersicht der verwendeten CD-Marker und deren Funktion für die Durchflusszytometrie Analyse.

Es wurden 12 verschiedene Oberflächenmarker verwendet, wovon allgemeine Zell-Marker (z.B. CD54, CD11c), spezifische dendritische-Marker (z.B. CD83, CD209, HLA-DR) und spezifische Makrophagen-Marker (z.B. CD25, CD68) als Negativkontrolle verwendet wurden. Es wurden 3 verschiedene Passagen der Zell-Linie THP-1 differenziert und mittels der Durchflusszytometrie analysiert. Auch bei

weiteren Versuchen wurden die unbehandelten τ DCs immer wieder gemessen, sodass immer eine Differenzierungskontrolle im Vergleich Monozyten zu τ DCs mit spezifischen DC-Markern erfolgte. In Tabelle 11 sind die jeweiligen Erwartungen und zugehörigen Ergebnisse der Durchflusszytometrie, im Vergleich der unbehandelten THP-1 Monozyten zu differenzierte THP-1 zu τ DCs, dargestellt. Die Differenzierung wurde mit n=3 durchgeführt und die Ergebnisse mit 0-15% negativ (-), 16-50% positiv (+), 51-80% positiv (++), >80% positiv (+++) bewertet.

		CD11c	CD25	CD33	CD54	CD68	CD83
THP-1 Monozyten	Erwartung	positiv	negativ	positive	positiv	negativ	negativ
	Ergebnis	++	-	+++	+	-	-
THP-1 differenziert zuDCs	Erwartung	positiv	negativ	positiv	positiv	negativ	positiv
	Ergebnis	+	-	+	+++	-	+

		CD85j	CD86	CD163	CD206	CD209	HLA-DR
THP-1 Monozyten	Erwartung	negativ	positiv	negativ	negativ	negativ	negativ
	Ergebnis	-	+	-	-	-	-
THP-1 differenziert zuDCs	Erwartung	negativ	positiv	negativ	negativ	positiv	positiv
	Ergebnis	-	+++	-	-	+	+

Tabelle 11: Ergebnisse der FACS Analyse mit verschiedenen Oberflächenzellmarkern. 0-15% negativ (-), 16-50% positiv (+), 51-80% positiv (++), >80% positiv (+++) n \geq 3.

Die Analysen wurden mittels Quadranten-Statistik ausgewertet. Zur Unterstützung der Ergebnisse wurden die Messungen in Histogramm Plots dargestellt (Abbildung 18). In Abbildung 18 sind unbehandelte THP-1 Monozyten im Vergleich zu den reifen ausdifferenzierten τ DCs abgebildet.

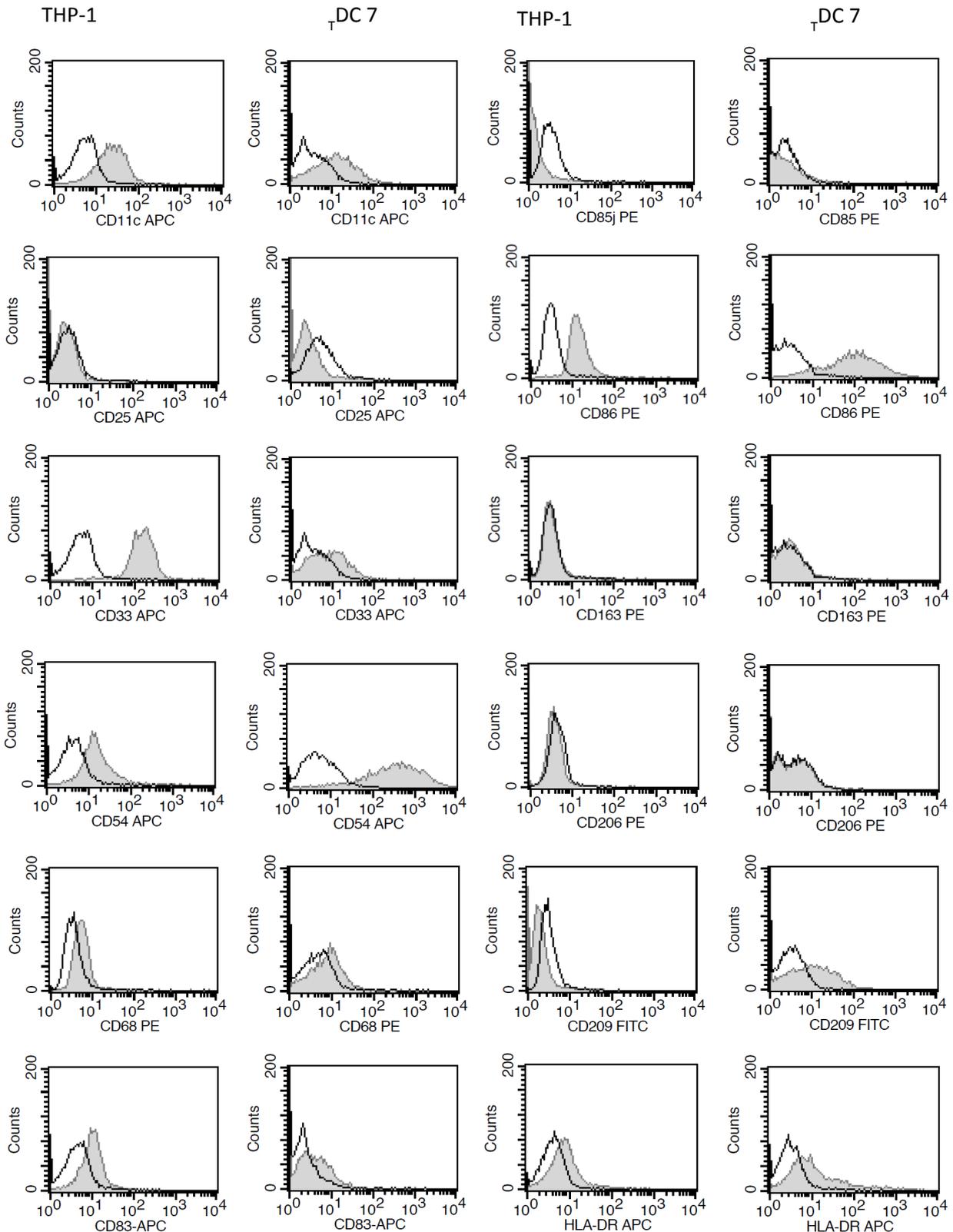


Abbildung 18: Histogrammauswertung der Durchflusszytometrie der Differenzierung von THP-1 in dendritische Zellen. Die schwarze Linie (ohne Füllung) zeigt die Isotyp-Kontrolle an, die graue Linie (mit grauer Füllung) ist die jeweilige Messung.

Alle zu untersuchenden Marker wurden gegen eine passende Isotyp-Kontrolle gemessen und ausgewertet. Um die Charakterisierung mittels Durchflusszytometrie

zu bekräftigen, wurden die Zellen mehrfach getestet und auch bei den einzelnen Versuchen auf die jeweiligen Marker überprüft. Um die Charakterisierung zu erweitern, wurden spezifische Zellmarker als auch ein Marker für Monozyten in der Immunfluoreszenz überprüft (Abbildung 19).

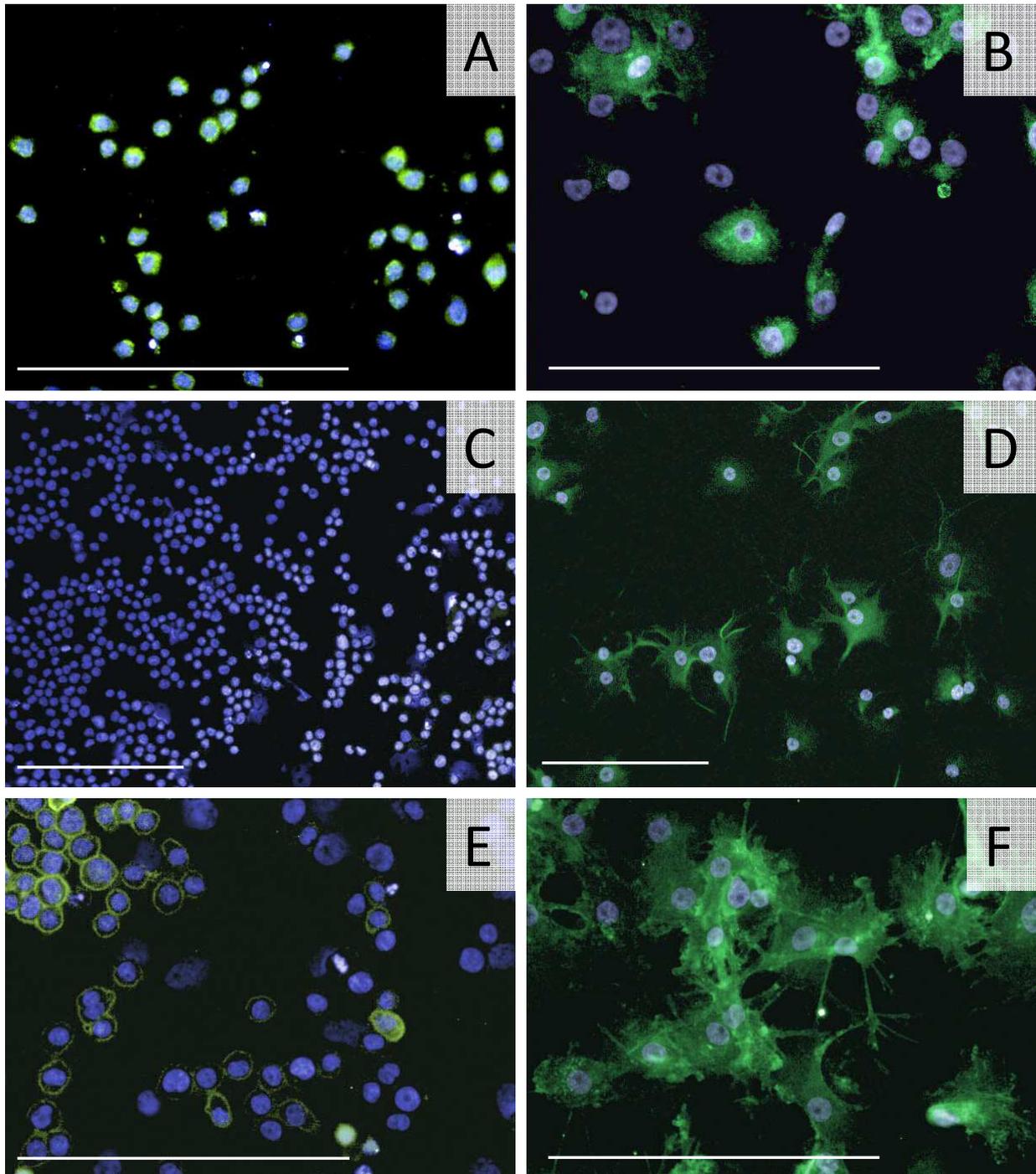


Abbildung 19: Immunfluoreszenz THP-1 im Vergleich zu τ DCs. **A:** unbehandelte THP-1 mit dem Monozyten-Marker CD36. **B:** τ DCs mit dem Monozyten-Marker CD36. **C:** unbehandelte THP-1 mit dem dendritischen-Marker CD83. **D:** τ DCs mit dem dendritischen-Marker CD83. **E:** unbehandelte THP-1 mit dem dendritischen-Marker CD304. **F:** τ DCs mit dem dendritischen-Marker CD304. Maßstabsbalken = 200 μ m.

Es wurden die Marker CD36, CD83 und CD304 verwendet. CD36 ist ein 78-88 kDa großes Glykoprotein, welches bereits bei Monozyten, Endothelzellen, Epithelzellen und bei verschiedenen Zell-Linien nachgewiesen wurde. Das Glykoprotein hat verschiedene physiologische Funktionen zum Beispiel dient es als Kollagen-Rezeptor, spielt eine wichtige Rolle bei Malaria oder auch verschiedenen anderen Signal-Transduktionsvorgängen (Greenwalt et al. 1992). CD83, auch als HB15 bekannt, ist ein 45 kDa großes Transmembranprotein, welches bei dendritischen Zellen und aktivierten Lymphozyten vorkommt. Vor allem bei zellulären Interaktionen und der Antigen Präsentation spielt es eine wichtige Rolle (Zhou et al. 1992). Neuropilin-1 oder auch CD304 ist eine Ko-Rezeptor für Semaphorin oder auch VEGF und besitzt eine wichtige Funktion im Nervensystem und bei der Vaskularisation (Appleton et al. 2007).

Der Monozyten-Marker CD36 ist bei THP-1 Monozyten bei allen Zellen nachweisbar. Er ist über die komplette Oberfläche der Zelle nachweisbar. Bei den τ DCs hingegen wird CD36 nicht mehr exprimiert und ist somit nicht mehr nachzuweisen. Wenn die τ DCs noch nicht ausdifferenziert sind, ist CD36 noch in geringen Mengen vorzufinden (Abbildung 19A). Der dendritische Zellmarker CD83 ist bei THP-1 Monozyten überhaupt nicht exprimiert und erst ausgeprägt bei der Ausdifferenzierung zu τ DCs (Abbildung 19C,D). Das gleiche gilt für den dendritischen Zellmarker CD304. Bei den Monozyten ist ersichtlich, dass sobald die Zellen eine gewisse Dichte erreichen, CD304 auch exprimiert wird. CD304 spielt bei den dendritischen Zellen unter anderem eine Rolle für die Ausbildung der Dendriten. Der Marker ist großflächig auf den gesamten τ DCs exprimiert und vor allem in den Dendriten nachweisbar (Abbildung 19E,F).

Differenzierung von Makrophagen aus primären Monozyten

Primär isolierte Monozyten aus Vollblut wurden mit IL-4 und GM-CSF zu unreifen dendritischen Zellen über 5 Tage differenziert. Direkt im Anschluss wurden die Zellen in serumfreien Medium weitere 2 Tage kultiviert. Die Morphologie der Zellen verändert sich in zwei Richtungen. Zum einen sind aufgeblähte Zellen zu finden und zum anderen Zellen mit bis zu zwei prominenten Pseudopodien (siehe Abbildung 20).

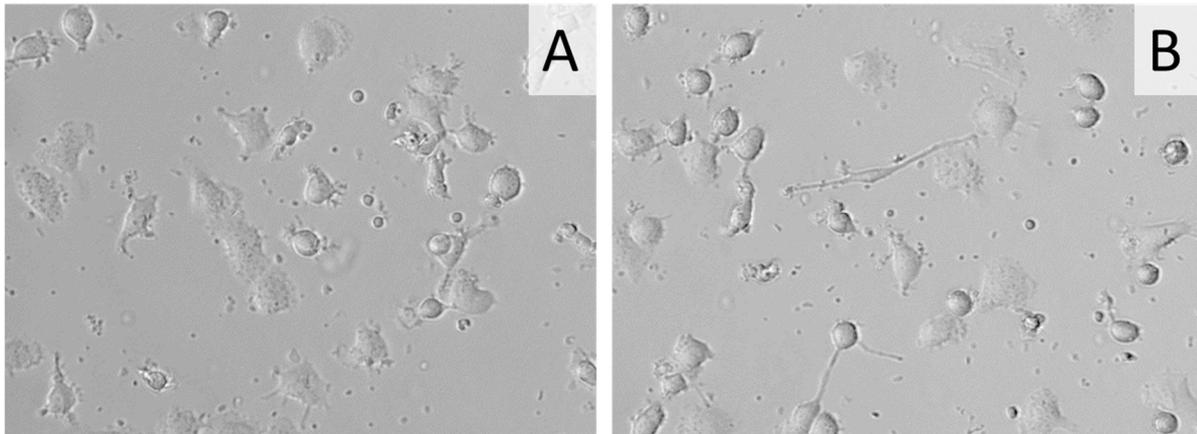


Abbildung 20: Durchlichtmikroskopie von differenzierten Makrophagen aus primären Monozyten.

Um die Zellen zu charakterisieren, wurden diese mit verschiedenen Markern (siehe Abbildung 20) im Durchflusszytometer gemessen. Es wurden spezifische Makrophagen-Marker (zum Beispiel CD206, CD85j) und allgemeine Marker (zum Beispiel CD33, CD54, CD86) verwendet.

	Funktion
CD11c, CD33, CD86	Wird bei Makrophagen, dendritischen Zellen induziert
CD25	Positiv für aktivierte Makrophagen, T-Zellen
CD54	= ICAM-1
CD68, CD163	Makrophagen Marker (wird durch einen bestimmten Stimulus exprimiert, z.B. LPS)
CD85j	= HLA Klasse 1 (bei Makrophagen positiv)
CD86	bindet an CD28 der T-Zelle und gibt somit ein Signal für die T-Zell Aktivierung
CD206	Makrophagen Mannose Rezeptor
CD209	= DC-SIGN, spezifisch für die DC Migration, T-Zell Proliferation, aber auch bei Makrophagen positiv
HLA-DR	= MHC Klasse II (für Antigenpräsentierende Zellen)

Tabelle 12: Verwendete Zellmarker für die Durchflusszytometrie zur Charakterisierung von Makrophagen.

Die Marker CD11c, CD33, CD54 und CD86 sind allgemeine Oberflächenproteine, welche induziert werden, ebenfalls die spezifischen Makrophagen-Marker CD85j und CD206 (siehe Tabelle 13).

		CD11c	CD25	CD33	CD54	CD68	CD85j
pM	Erwartung	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
	Ergebnis	+++	-	++	+++	-	++

		CD86	CD163	CD206	CD209	HLA-DR
pM	Erwartung	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
	Ergebnis	++	-	+++	+++	+++

Tabelle 13: Durchflusszytometrie Analyse der differenzierten Makrophagen aus primären Monozyten (n=3).

Spezifische Makrophagen-Marker, wie zum Beispiel CD25, CD68 oder auch CD163 wurden inhibiert. CD25 wird erst induziert, wenn die Makrophagen aktiv sind, ebenso die Marker CD68 und CD163, welche einen Stimulus benötigen, um induziert zu werden.

Da die dendritischen Zellen im Bronchialmodell unerlässlich sind, wurden zunächst diese in ein Triple-Kultur Modell etabliert. Sie spielen bei der ersten Immunantwort eine wichtige Rolle, erst danach kommen die Makrophagen in Einsatz.

Etablierung des bronchialen Triple-Kultur Modells

Um das bronchiale Triple-Kultur Modell möglichst physiologisch zu etablieren, wurden die dendritischen Zellen in einer Zellzahl von 600–800 Zellen/mm² auf die apikale Seite der bronchialen Ko-Kultur ausgesät. Wichtig hierbei war, die Aussaat der dendritischen Zellen so zu verfeinern, dass zum einen der TER-Wert stabil bleibt, somit die Ko-Kultur nicht geschädigt wird und zum anderen die dendritischen Zellen unter möglichst wenig Stress in die Ko-Kultur zu etablieren. Durch die Verknüpfung des Mediumwechsels mit der Aussaat der DCs im Insert, konnte ein zusätzlicher Stress der Ko-Kultur vermieden werden. Vor den Stimulationen konnten die DCs sich für 30 Minuten regenerieren und an die neue Umgebung gewöhnen.

Das Modell wurde so optimiert, dass zum einen der TER-Wert vor jeder Stimulation stabil blieb, die DCs sich an das neue Medium anpassten und keine negative Beeinflussung der Zellen aufeinander wirkte (Abbildung 21).

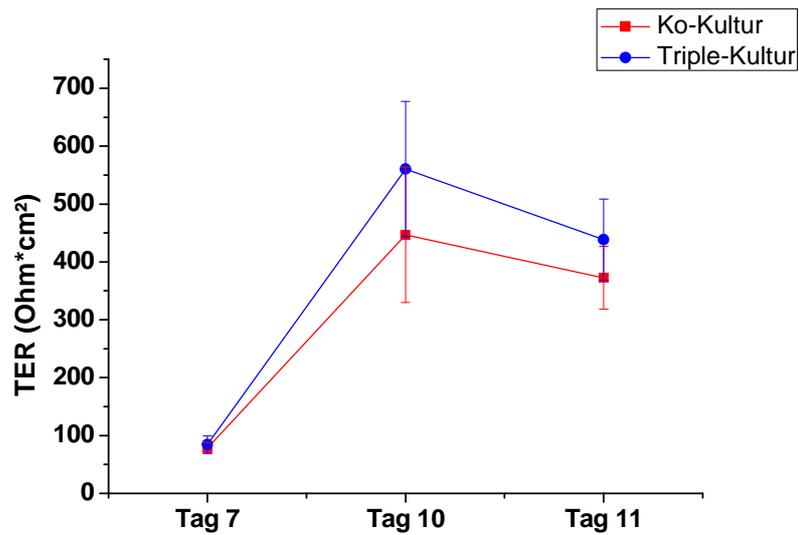


Abbildung 21: TER Verlauf der Ko- (rot) und Triple-Kultur (blau) über die Zeit. Zugabe der dendritischen Zellen erfolgte bei der Triple-Kultur an Tag 10 ($n > 3$).

Der TER-Wert steigt bei der Triple-Kultur mit Zugabe der dendritischen Zellen an Tag 10 gering an. Ko- und Triple-Kultur bleiben dennoch bei ihren TER Werten vergleichbar, da sie keine signifikanten Unterschiede zueinander aufweisen.

Inflammatorische Prozesse

Untersuchung der Zell-Zell-Kontakte

Nachdem die Filter der HTS-Transwell 24-Well-Platten mit Ko- und Triple-Kulturen fixiert wurde, konnten diese für die Alzian- und HE-Färbung weiter verwendet werden. In Abbildung 22 sind Paraffinschnitte mit Alzianblau der Ko- und Triple-Kultur vor und nach der Behandlung mit LPS angefärbt.

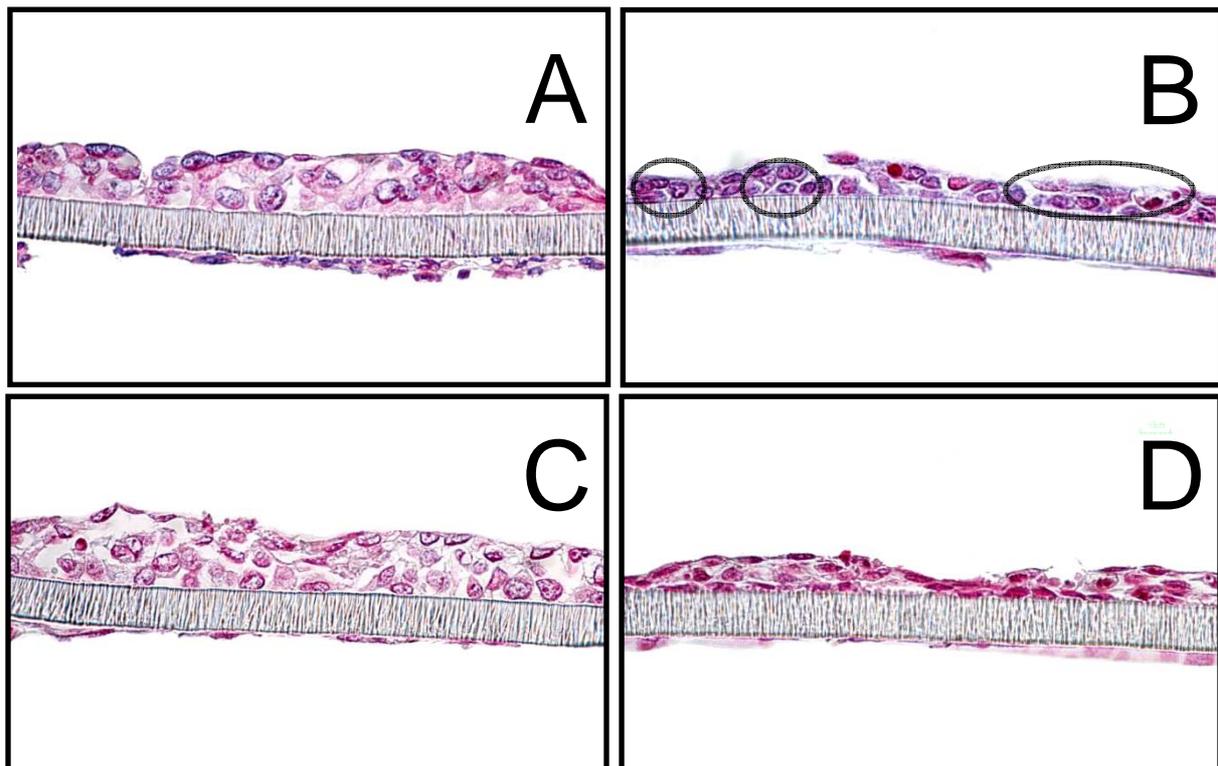


Abbildung 22: Alzianblau-Färbungen von Paraffinschnitten der 24 h stimulierten Ko- & Triple-Kultur zur Veranschaulichung der Schädigung der Zell-Zell-Kontakte **A:** unbeschädigte Ko-Kultur (16HBE, Wi38) **B:** Ko-Kultur behandelt mit LPS (16HBE, Wi38), markierte Felder sind Schädigungen der *tight junctions* **C:** Unbeschädigte Triple-Kultur (16HBE, Wi38, DCs) **D:** Triple-Kultur behandelt mit LPS (16HBE, Wi38, DCs).

Bei der unbeschädigten Ko- und Triple-Kultur ist die Filterseite mit den bronchialen Epithelzellen intakt und ein unbeschädigter Zellverband sichtbar. Nach Stimulation mit 1 µg/ml LPS sind die Zell-Zell-Kontakte der Ko-Kultur deutlich geschädigt, sodass sich der Zellverband auflöst. Diese Schädigung ist in Abbildung 22B zum Teil durch Kreise markiert. In der Triple-Kultur können die Epithelzellen von den dendritischen Zellen nicht unterschieden werden, allerdings ist sichtbar, dass die Zell-Zell-Kontakte scheinbar nur minimal beschädigt wurden oder eventuelle durch dendritische Zellen ausgeglichen wurden (Abbildung 22D). Um das genauer zu untersuchen wurden die Schnitte in der Immunhistochemie untersucht (Abbildung 23).

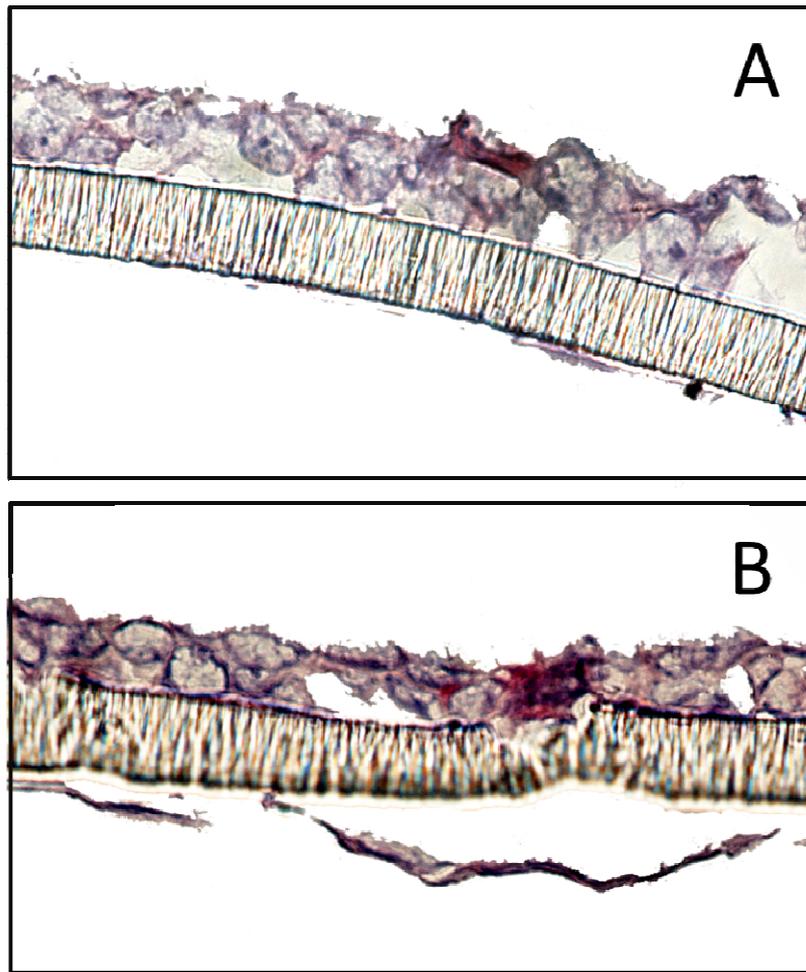


Abbildung 23: Immunhistochemie der Triple-Kultur. Dendritische Zellen sind mit dem Zellmarker CD83 (rot) gefärbt. **A:** unbehandelte Triple-Kultur **B:** LPS-stimulierte Triple-Kultur.

Die dendritischen Zellen wurden mit dem Marker CD83 (rot) gefärbt. Bei der unbehandelten Triple-Kultur liegt die dendritische Zelle auf der Epithelschicht auf. Nach der Stimulation mit LPS wandern die dendritischen Zellen in die Epithelschicht und scheinen zumindest topographisch die Beschädigung auszugleichen. In den vorherigen Paraffinschnitten der HE- und Alzianblau-Färbungen ist ein geschlossener Zellverband der Triple-Kultur, auch nach Stimulation, erkennbar. Es zeigt sich allerdings, bei der Immunhistochemie, dass dieser nicht nur aus Epithelzellen besteht. Der schützende Effekt der dendritischen Zelle auf das Bronchialmodell ist sowohl in der Immunfluoreszenz, als auch in der Immunhistochemie deutlich erkennbar.

TER-Werte

Um zu überprüfen, ob die ausgesäten Kulturen für Versuche eingesetzt werden können, wurden diese zunächst auf ihren transbilayer Widerstand überprüft.

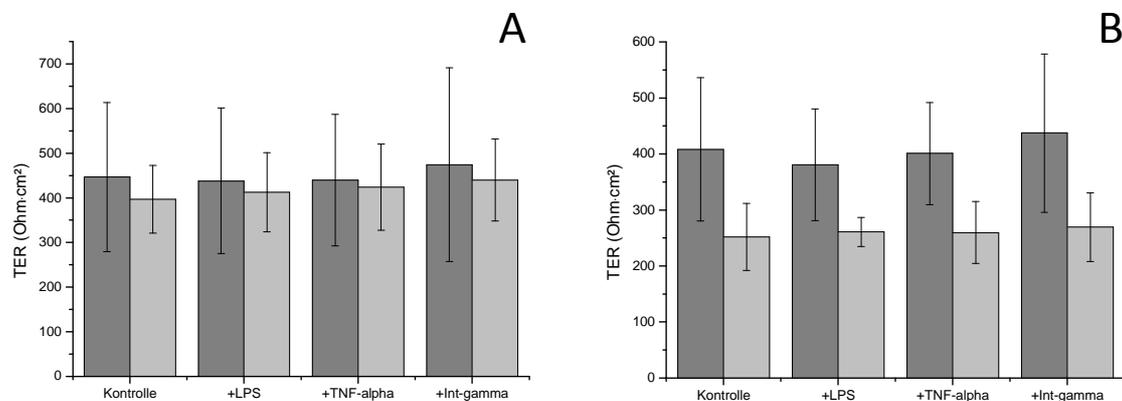


Abbildung 24: TER-Werte der Ko- (B) Triple-Kultur (A) nach Stimulation mit verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen. Dunkelgraue Balken sind TER-Werte vor der Stimulation und hellgraue Balken 24 h nach der jeweiligen Stimulation (n=3).

Ko- und Triple-Kulturen haben sich in ihrem TER-Wert vergleichbar gezeigt. Die Triple-Kultur scheint aber stabiler zu sein, da der Wert nicht abfällt im Gegensatz zu der Ko-Kultur, wo der Kontrollwert minimal abfällt (Abbildung 24). Nach Behandlung mit verschiedenen inflammatorischen Stimulanzen, wie z.B. LPS, TNF- α und Int- γ zeigen die stimulierten Ko- und Triple-Kulturen keine Veränderungen innerhalb der Kulturen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen.

Immunfluoreszenz der Zell-Zell-Kontakte

Um den Einfluss der Substanzen auf die Zell-Zell-Kontakte zu untersuchen, wurden *tight junctions* (ZO-1, Occludin) sowohl in unbehandelten als auch stimulierten Ko-Kulturen angefärbt (Abbildung 25).

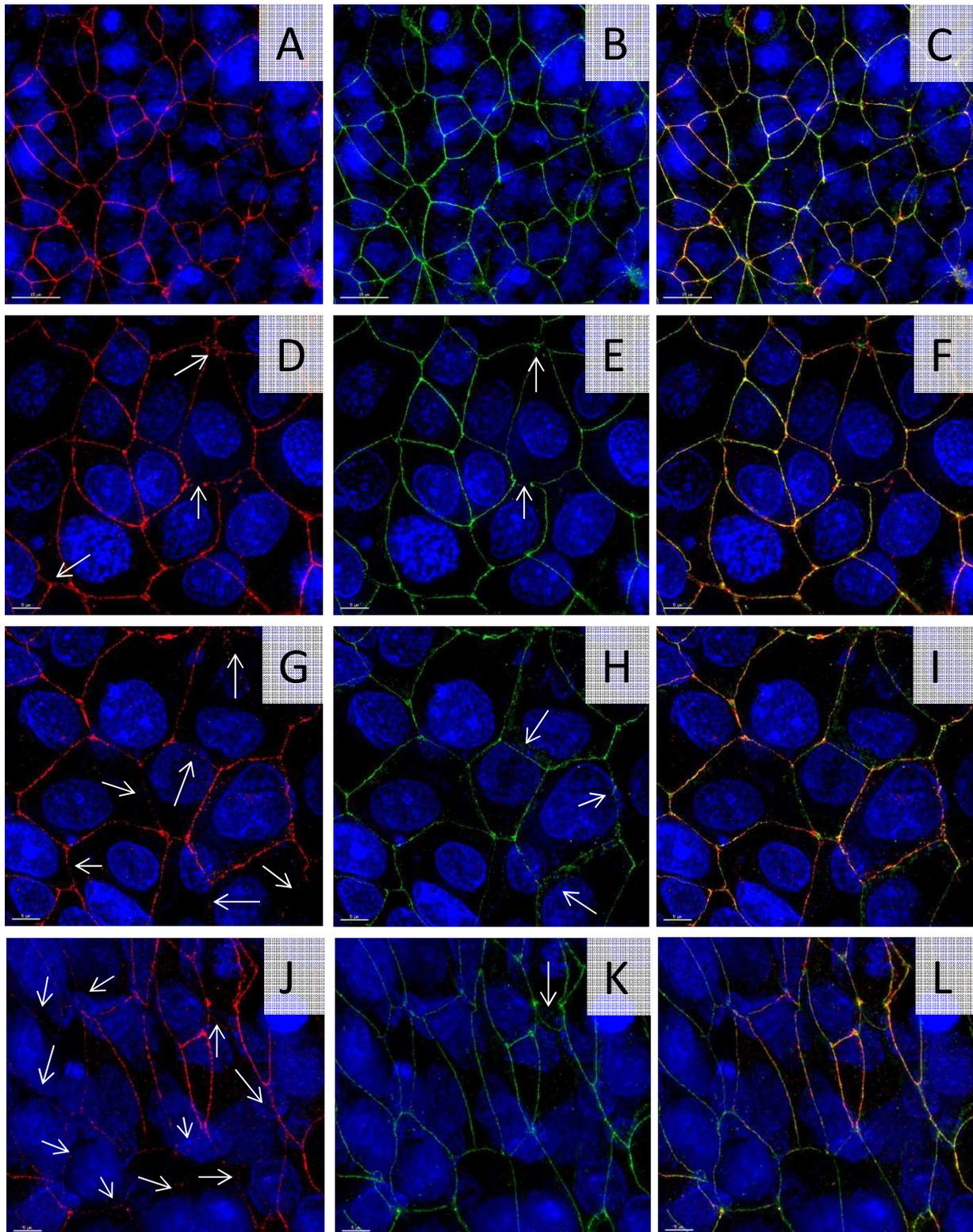


Abbildung 25: Zell-Zell-Kontakte der Ko-Kulturen nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen, ZO-1 (rot), Occludin (grün). **A-C:** unbehandelte Ko-Kultur. **D-F:** Stimulation mit 1 µg/ml LPS. **G-I:** Stimulation mit 3 ng/ml TNF- α . **J-L:** Stimulation mit 200 U/ml Int- γ . Balken = 5 µm. **C, F, I, L:** Überlagerung der roten und grünen Fluoreszenz. \rightarrow Markierung der geschädigten Zell-Zell-Kontakte.

Die Versuche der inflammatorischen Prozesse wurden mit je 1 µg/ml LPS, 3 ng/ml TNF- α und 200 U/ml Interferon- γ durchgeführt. Bei den unbehandelten Proben sind

die Zell-Zell-Kontakte ZO-1 und Occludin vollständig ausgeprägt und intakt (Abbildung 25A-C). Nach Stimulation mit verschiedenen Substanzen ist eine Schädigung vor allem bei ZO-1 in unterschiedlichen Ausmaßen an mehreren Stellen zu beobachten. Occludin hingegen bleibt relativ stabil und weist nur an geringen Stellen Schädigungen auf (Abbildung 25D-L).

Insgesamt sind die Zell-Zell-Kontakte allerdings noch weitgehend intakt. Die Schädigung der Zell-Zell-Kontakte sind vor allem nach der Stimulation mit Interferon- γ am stärksten (Abbildung 25J). Um die Wirkung der dendritischen Zelle in diesem Schädigungsprozess in der Triple-Kultur zu untersuchen, wurden die Stimulationen auch in der Triple-Kultur durchgeführt (Abbildung 26).

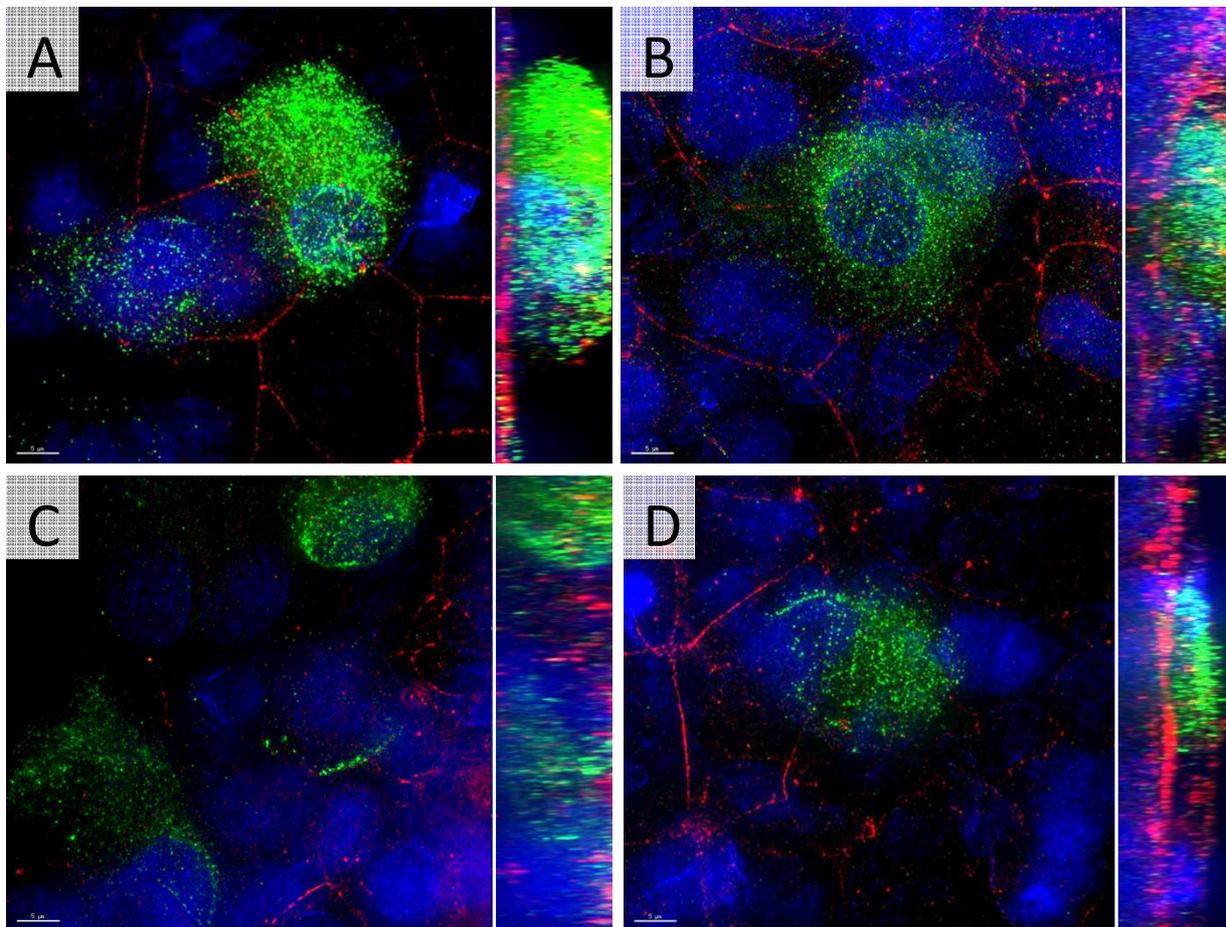


Abbildung 26: Immunfluoreszenz der Triple-Kultur nach Behandlung mit verschiedenen inflammatorischen Zytokinen Claudin-5 (rot) und CD83 (grün) **A:** unbehandelte Triple-Kultur **B:** Stimulation mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS **C:** Stimulation mit 3 ng/ml TNF- α **D:** Stimulation mit 200 U/ml Int- γ . Balken = 5 μm .

Die Zell-Zell-Kontakte wurden mit Claudin-5 und die dendritischen Zellen mit dem spezifischen Marker CD83 angefärbt. Unbehandelte Kulturen zeigen keine Aktivität

der immunkompetenten τ DCs, sie liegen auf der Epithelschicht auf (Abbildung 26A). Wird diese Triple-Kultur durch proinflammatorische Zytokine stimuliert, dringt die dendritische Zelle in die epitheliale Zellschicht ein und versucht möglicherweise den Effekt der Zell-Zell-Schädigung entgegen zu wirken (Abbildung 26B-D). In der Seitenansicht ist bei allen Stimulationen klar zu erkennen, dass bei den stimulierten Proben die dendritischen Zellen in die epitheliale Schicht eindringen (Abbildung 26B-D).

Mucus-Produktion in der Ko-Kultur

Da die TER-Werte der stimulierten Kulturen stabil bleiben und dies entgegen den Ergebnissen der Schädigung der Zell-Zell-Kontakte spricht, wurde die Mukus-Produktion der Ko-Kultur untersucht (Abbildung 27). Mukus kann trotz Schädigung der Zell-Kontakte einen Widerstand vortäuschen.

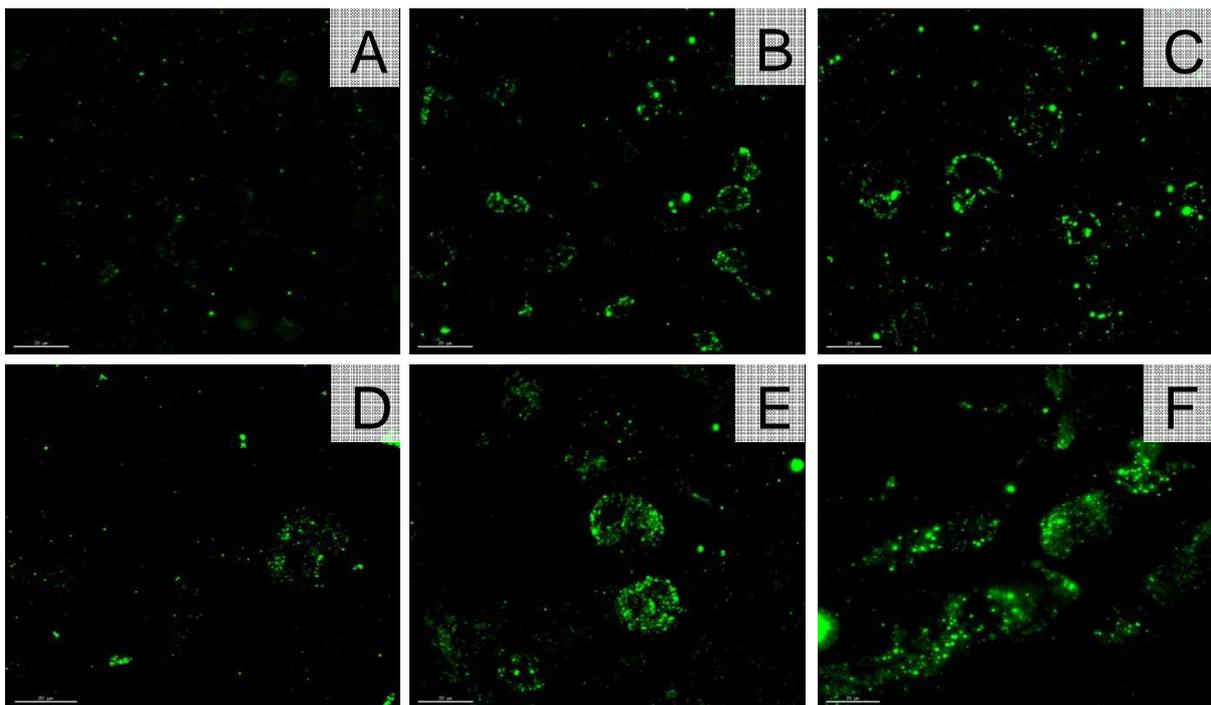


Abbildung 27: MUC5AC Produktion in der Ko-Kultur unbehandelt (A,B,C 16HBE, Wi-38); (D,E,F HBEC, Wi38). A,D unbehandelt B,C,E,F behandelt mit LPS

Bei der unbehandelten Ko-Kultur wurde nur vereinzelt eine sehr schwache MUC5AC Produktion nachgewiesen. Die Mukus-Produktion wurde durch die Stimulation mit LPS stark gefördert, sodass hier über den bronchialen Epithelzellen eine Mukus-Schicht nachweisbar war (Abbildung 27B,C,E,F) und zusammen mit den

Widerstandswerten vermuten lässt, dass die Mukusschicht einen TER-Wert vortäuscht.

Zytokinproduktion der Inflammatorischen Prozessen

Die Stimulation der Ko-Kultur zeigte keine Veränderungen der Zytokinproduktion mit verschiedenen inflammatorischen Entzündungsmediatoren wie LPS, TNF- α oder auch Interferon- γ . In Abbildung 28 ist die Zytokinproduktion nach 24 Stunden LPS Stimulation dargestellt. Es ist deutlich sichtbar, dass sowohl bei verschiedenen Interleukinen als auch Zell-Zell-Kontaktmarkern keine signifikante Veränderung ersichtlich sind. Bei der Stimulation mit TNF- α und Int- γ sieht das Ergebnis vergleichbar aus (Daten sind hier nicht dargestellt).

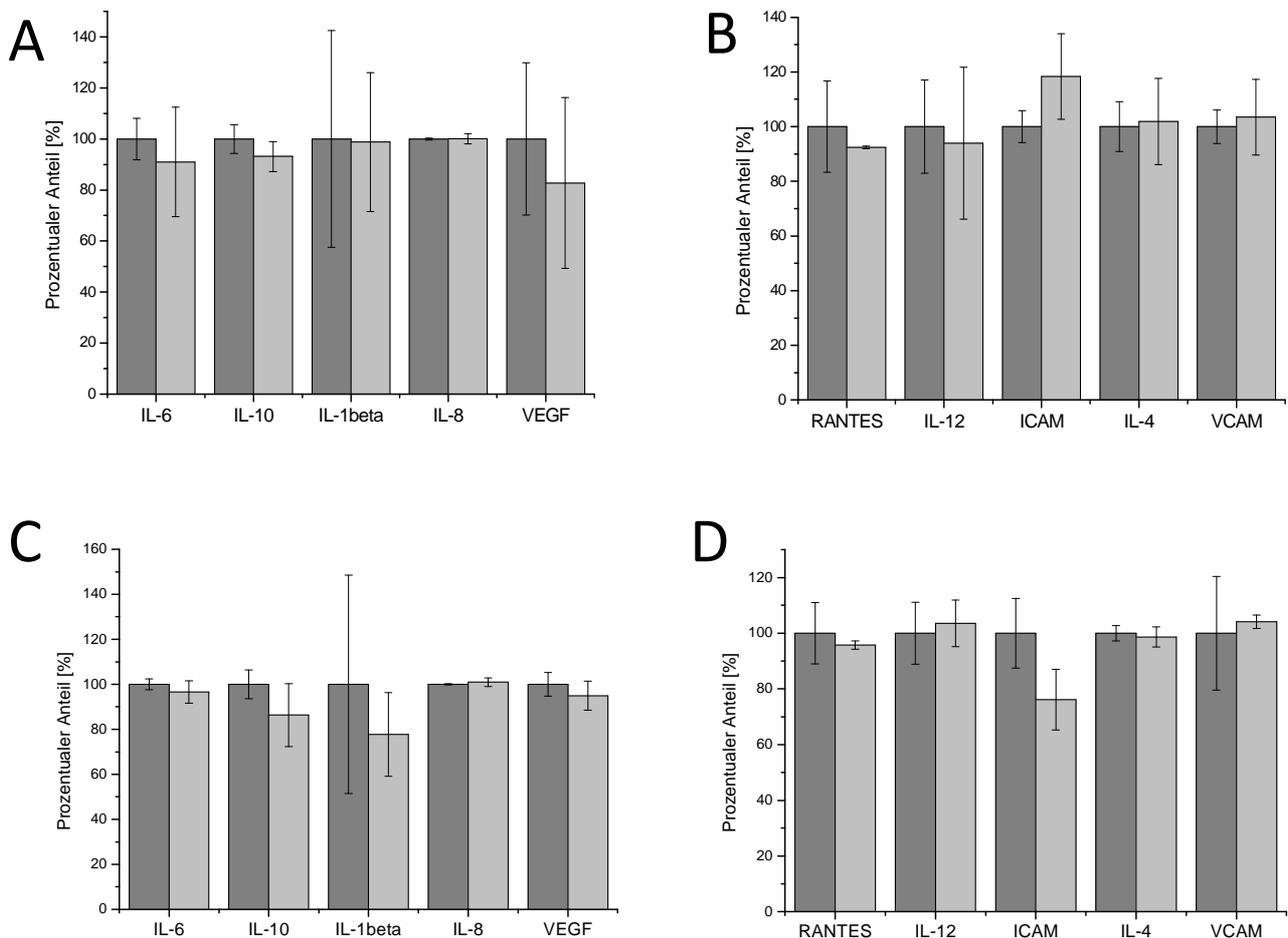


Abbildung 28:Prozentualer Anteil der Zytokinproduktion der primären Ko-Kultur nach Stimulation mit LPS. Dunkelgraue Balken = unbehandelt; Hellgraue Balken = mit LPS stimuliert **A-B:** apikale Seite der primären Ko-Kultur. **C-D:** basolaterale Seite der primären Ko-Kultur. (n=3)

Bei der Triple-Kultur hingegen sind leichte Veränderung bei bestimmten Zytokinen nach der Stimulation mit LPS erkennbar (Abbildung 29). Nach der Stimulation mit TNF- α und Int- γ sind keine signifikanten Veränderungen messbar (Daten sind hier nicht dargestellt).

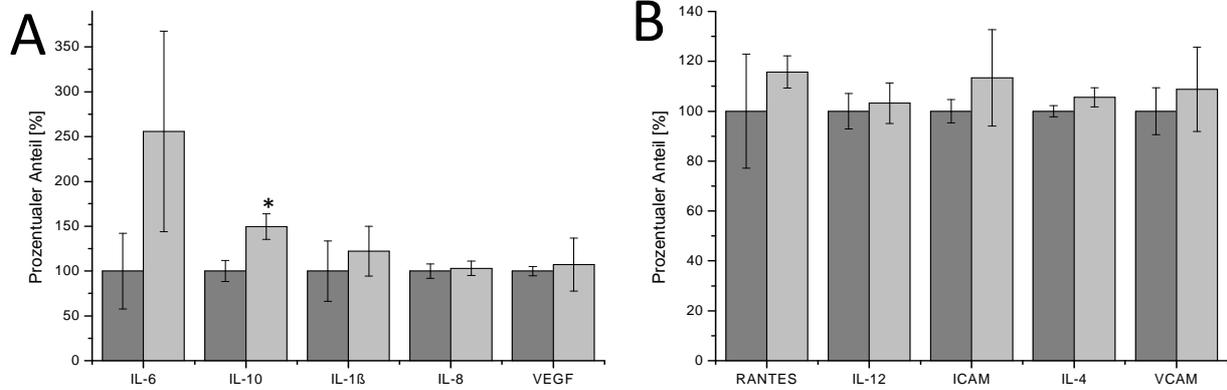


Abbildung 29: Prozentualer Anteil der Zytokinproduktion nach Stimulation mit LPS der primären Triple-Kultur. **A-B:** apikale Seite der primären Triple-Kultur. Graue Balken = Kontrolle; Hellgraue Balken = nach Stimulation mit LPS. Signifikanz * ($p < 0,05$) in Relation zur Kontrolle ($n=3$).

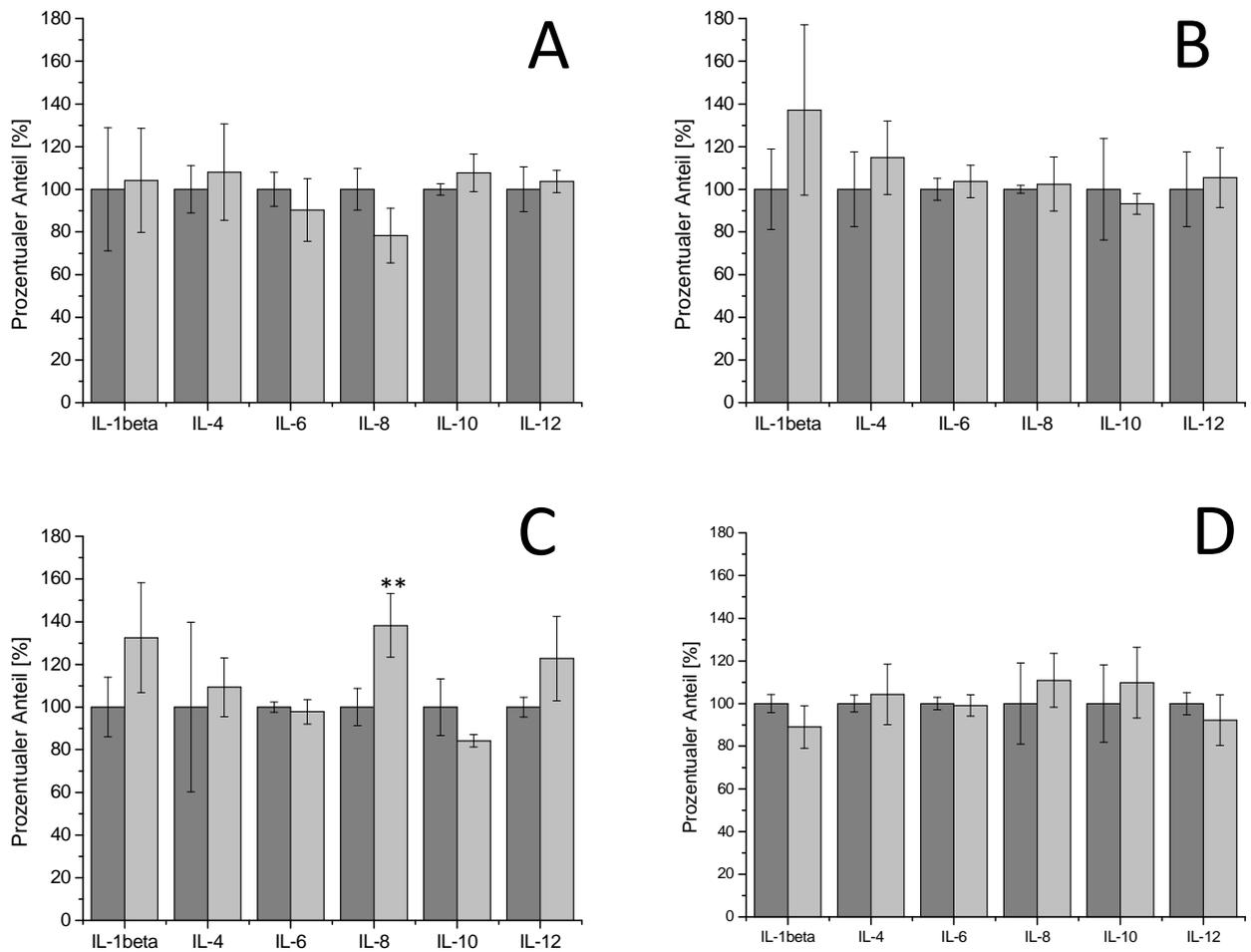


Abbildung 30: Prozentualer Anteil der Zytokinproduktion nach Stimulation mit LPS der Ko- und Triple-Kultur. **A:** apikale Seite der Ko-Kultur (16HBE, Wi-38) **B:** basolaterale Seite der Ko-Kultur (16HBE, Wi-38) **C:** apikale Seite der Triple-Kultur (16HBE, Wi-38, τ DCs) **D:** basolaterale Seite der Triple-Kultur (16HBE, Wi-38, τ DCs). Graue Balken = Kontrolle; Hellgraue Balken = nach Stimulation mit LPS. Signifikanz ** ($p > 0,01$) in Relation zur Kontrolle ($n=3$).

Auf der basolateralen Seite der Ko- und Triple-Kultur ist keine signifikante Veränderung erkennbar. Nach einer 24 stündigen LPS Stimulation ist eine statistisch signifikante höhere IL-8 Expression von bis zu 40% messbar (Abbildung 30). Die anderen gemessenen Marker zeigen sonst keine signifikanten Veränderungen, aber trotzdem einen Anstieg bei IL-1 β und IL-12.

Einfluss von Organophosphaten auf τ DCs

Bevor die Wirkung der Organophosphate auf die Ko- und Triple-Kultur untersucht werden konnte, wurde der Einfluss auf die immunkompetenten dendritischen Zellen untersucht.

Durchflusszytometrie Analyse

Zunächst wurde mittels Durchflusszytometrie der Effekt von unterschiedlichen Organophosphaten auf verschiedene spezifische dendritische CD-Marker untersucht (Tabelle 14).

		CD11c	CD33	CD83	CD86	CD209	HLA-DR	
1.000 μ M	Chlorpyrifos	Ergebnis	++	-	-	++	+	-
	Schaden	-10%	-66-70%	-10-15%	+4-6%	-27-33%	-9-11%	
1.000 μ M	Dimethoat	Ergebnis	++	+	+	++	+	+
	Schaden	-	-5-12%	-3%	+5-7%	-6-8%	-4%	
500 μ M	Omethoat	Ergebnis	+++	+++	+	++	+	+
	Schaden	+10-15%	/	/	/	-5-10%	-1-2%	

Tabelle 14: Durchflusszytometrie zur Untersuchung der Schädigung an DCs durch Organophosphate. 0-15% negativ (-), 16-50% positiv (+), 51-80% positiv (++) , >80% positiv (+++) n \geq 3.

Die Ergebnisse wurden ebenfalls in Histogramm-Plots dargestellt (Abbildung 31). Es werden die Plots von undifferenzierten THP-1 im Vergleich zu unbehandelten und stimulierten τ DCs dargestellt.

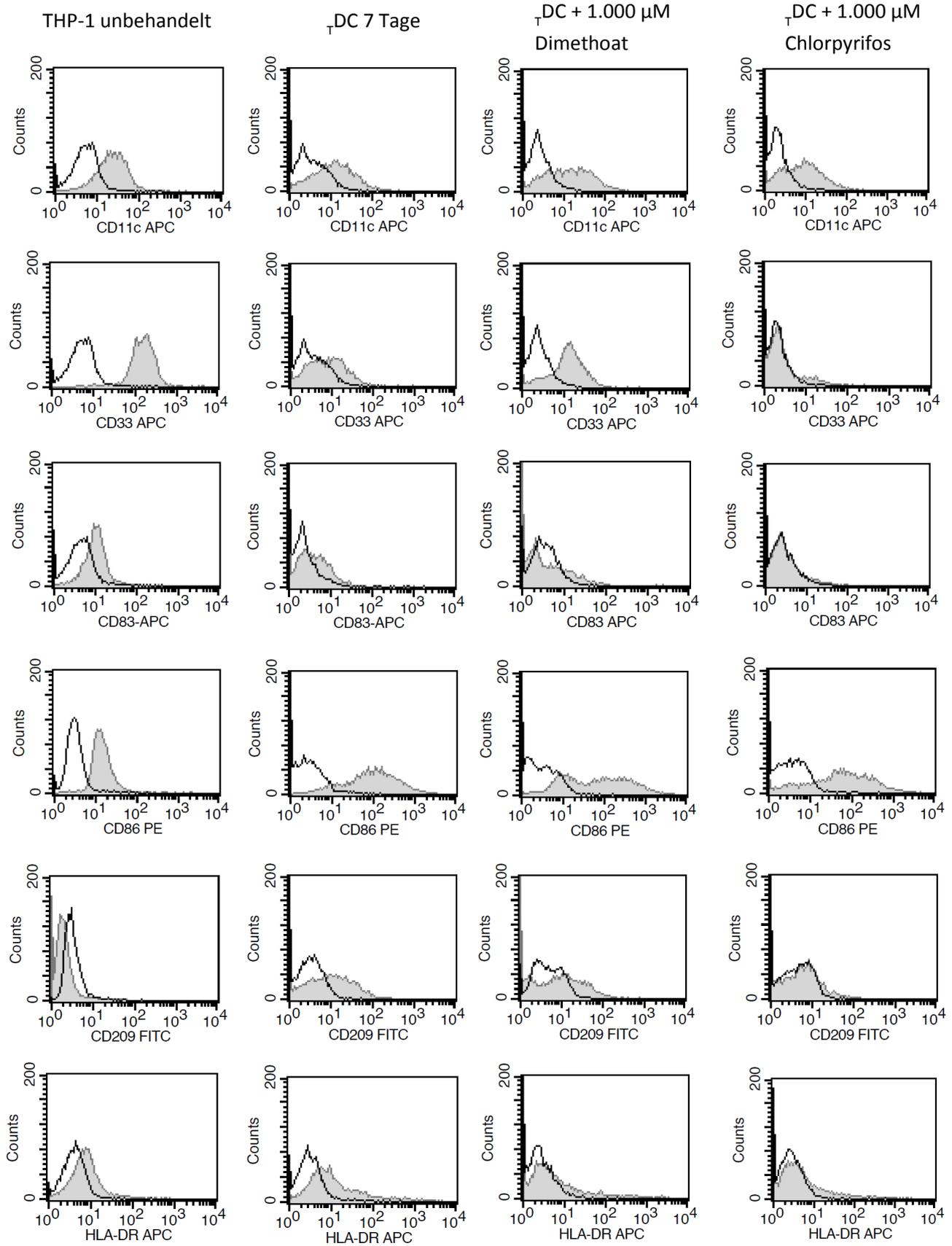


Abbildung 31: Histogramm-Auswertung der Durchflusszytometrie nach Stimulation der dendritischen Zellen mit Zytokinen.

Apoptose Untersuchung

Mit Hilfe des Annexin V-FITC Kits konnte am Durchflusszytometer das Verhältnis zwischen lebenden, nekrotischen und apoptotischen Zellen untersucht werden. Hierfür wurden τ DCs 24 h direkt nach der Stimulation mit dem Kit im FACS gemessen (Tabelle 15; Tabelle 16).

DIMETHOAT	Unb.	100 μ M	300 μ M	500 μ M	700 μ M	1.000 μ M
Lebende Zellen	87,47	84,91	84,86	83,45	85,52	83,56
Tote Zellen	12,53	15,08	15,12	16,32	14,45	16,36

Tabelle 15: Annexin V-FITC Kit Untersuchung nach Stimulation mit Dimethoat bei τ DCs (n=3).

CHLORPYRIFOS	Unb.	100 μ M	300 μ M	500 μ M	700 μ M	1.000 μ M
Lebende Zellen	90,37	74,04	40,68	28,97	15,81	11,46
Tote Zellen	9,52	25,93	59,29	70,99	84,71	88,54

Tabelle 16: Annexin V-FITC Kit Untersuchung nach Stimulation mit Chlorpyrifos bei τ DCs (n=3).

Nach der Stimulation mit Dimethoat ist keine signifikante Veränderung beim Verhältnis „Lebende Zellen“ zu „Tote Zellen“ ersichtlich. Bei der Stimulation mit Chlorpyrifos steigt die Anzahl der toten Zellen mit zunehmender Konzentration an (Abbildung 32).

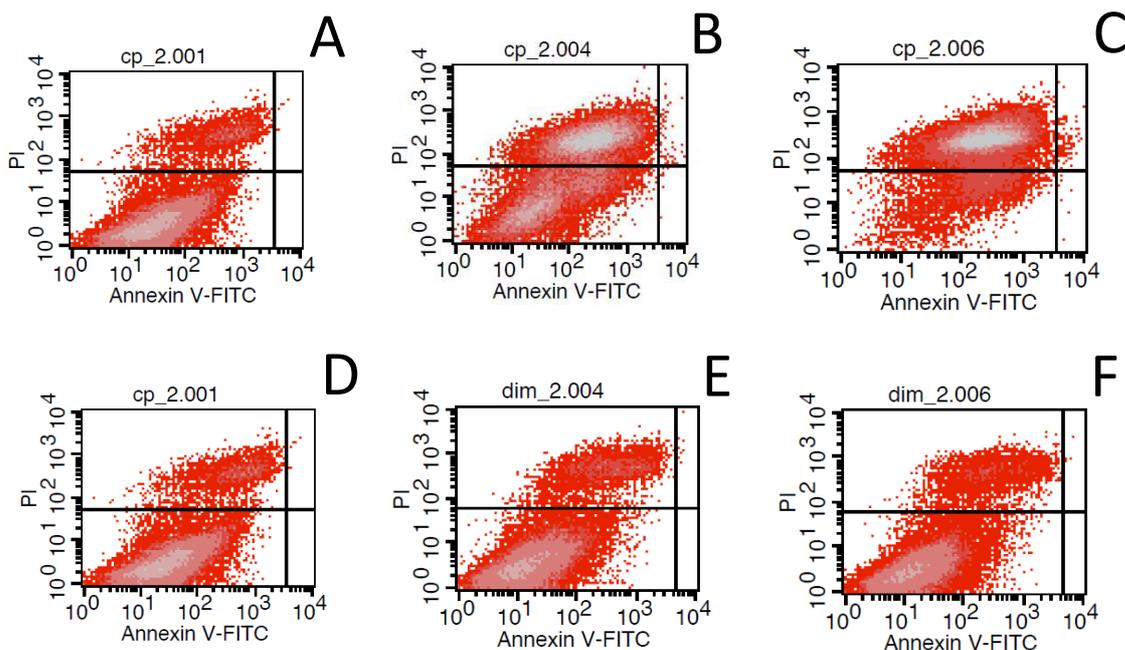


Abbildung 32: Dichte-Plots der Annexin-V und PI Untersuchung am FACS.

A: unbehandelte τ DCs B: τ DCs stimuliert mit 500 μ M Chlorpyrifos C: τ DCs stimuliert mit 1.000 μ M Chlorpyrifos D: unbehandelte τ DCs E: τ DCs stimuliert mit 500 μ M Dimethoat F: τ DCs stimuliert mit 1.000 μ M Dimethoat.

Bei einer Konzentration von 1.000 μM ist das Verhältnis zwischen lebenden und toten Zellen genau spiegelverkehrt zur unbehandelten Kontrolle, wobei hier fast 90 % der Zellen tot sind und nur noch etwa 10 % der Zellen leben. Bei dieser Untersuchung konnte allerdings keine apoptotische Zelle nachgewiesen werden. In Abbildung 32 sind die Dichte-Plots der Durchflusszytometrie zur Veranschaulichung dargestellt. Um den unterschiedlichen Einfluss der Organophosphate zu verdeutlichen, ist in Abbildung 33 das Verhältnis zwischen toten und lebenden Zellen dargestellt.

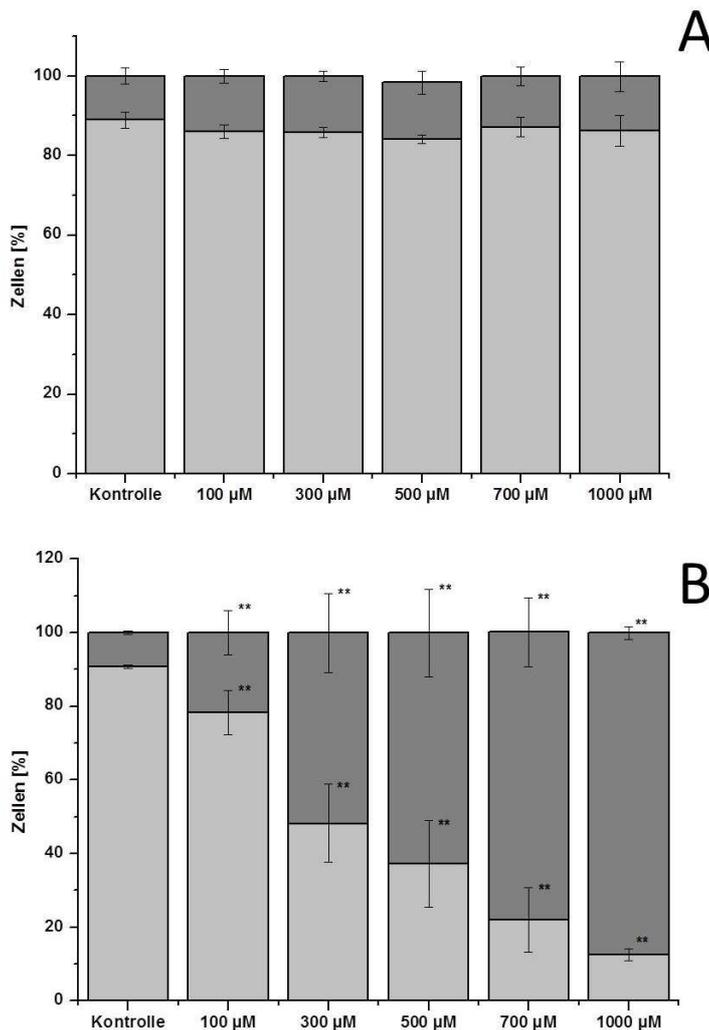


Abbildung 33: Durchflusszytometrie Analyse im Verhältnis tote Zellen (dunkelgraue Balken) zu lebenden Zellen (hellgraue Balken). (A) Stimulation mit Dimethoat (B) Stimulation mit Chlorpyrifos. Signifikanz ** ($p < 0,01$) zu der unbehandelten Kontrolle.

Morphologische-Untersuchungen

Um die Auswirkungen der Organophosphate zu untersuchen wurden Durchlichtmikroskopische-Aufnahmen gemacht (Abbildung 34).

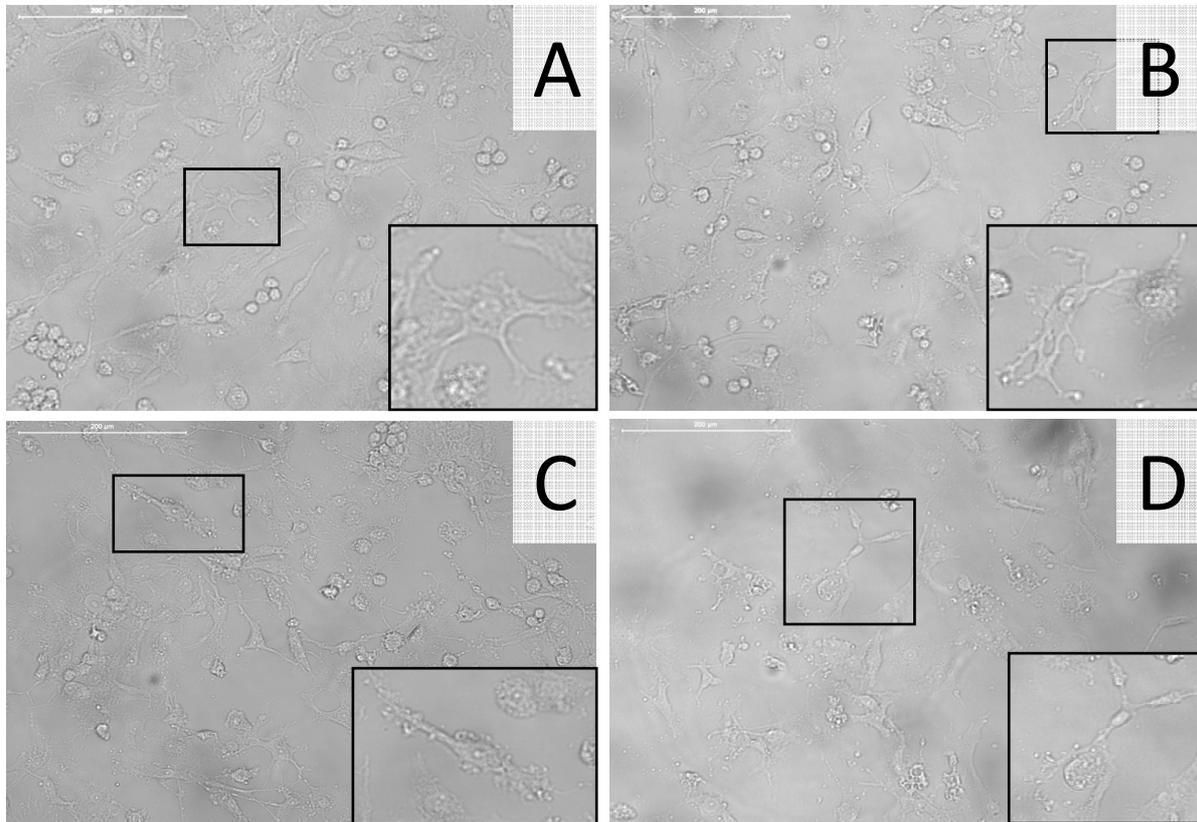


Abbildung 34: Morphologieveränderung von dendritischen Zellen durch den Einfluss von Organophosphaten. Rechts unten in jeder Abbildung ist ein vergrößerter Ausschnitt einer einzelnen dendritischen Zelle **A:** unbehandelt **B:** Stimulation mit 1.000 μM Dimethoat **C:** Stimulation mit 500 μM Omethoat **D:** Stimulation mit 1.000 μM Chlorpyrifos. Balken = 200 μM .

Unbehandelte τDCs zeigten die typische Morphologie, wohingegen die Stimulation mit Dimethoat und Omethoat eine Schädigung vor allem an den Dendriten aufwies. Bei der Stimulation mit 1.000 μM Chlorpyrifos waren die Zellen größtenteils vollständig zerstört. Auch der Zellkern wurde angegriffen und somit war die typische Morphologie der Zellen nicht mehr erkennbar.

Zytokin-Produktion (Bioplex)

Um den Einfluss der Organophosphate auf die Signalwege in den Zellen besser nachvollziehen zu können, wurden mit dem Bioplex System mehrere Zytokine (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12) gemessen. Bei den Interleukinen 6 und 12 konnte keine signifikante Veränderung festgestellt werden. Veränderungen der Zytokinexpression von IL-1 β , IL-8 und IL-10 sind in Abbildung 35 dargestellt.

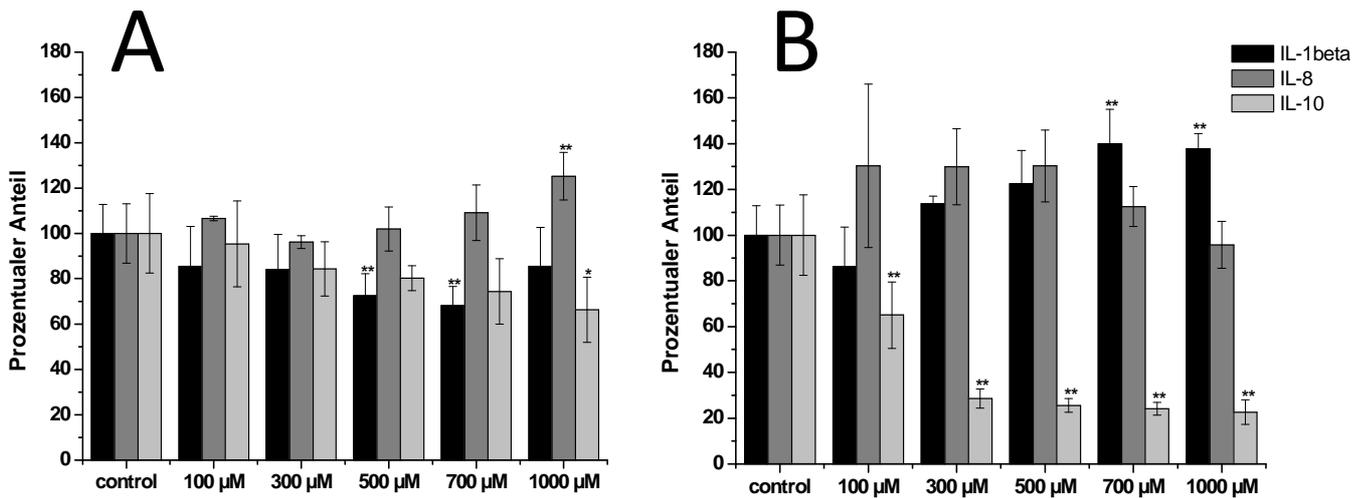


Abbildung 35: Untersuchung der Zytokinexpression von IL-1 β , IL-8 und IL-10 nach Stimulation der τ DCs mit Dimethoat (A) und Chlorpyrifos (B) am Bioplex System (n=3).

Bei der Stimulation mit Dimethoat ist ein signifikanter Anstieg der Interleukin 8 Expression ab 1.000 μ M erkennbar. Ab einer Konzentration von 500 μ M Dimethoat fällt die Interleukin 8 Expression um mehr als 30 %, ebenso bei IL-10 Expression, allerdings erst bei einer Konzentration von 1.000 μ M. Die Stimulation mit Chlorpyrifos hat keine Auswirkung auf die IL-8 Expression. Allerdings nimmt die IL-10 Expression ab einer Konzentration von 100 μ M Chlorpyrifos um 30 % und bei 1.000 μ M sogar um fast 80% ab. Der Anstieg von über 40% des Interleukins 1 β ist ab einer Konzentration von 700 μ M zu verzeichnen.

Einfluss von Organophosphatenauf die Ko- und Triple-Kultur

Die Ko- und Triple-Kulturen wurden jeweils 24 h mit Dimethoat, Omethoat bzw. Chlorpyrifos behandelt und auf verschiedene Parameter (z.B. Zytokinexpression) untersucht.

TER-Messung

Die TER-Werte weisen zwischen den Versuchen unterschiedlich, große Werte aus, sodass sich hier auch relativ große Standardabweichungen entstehen.

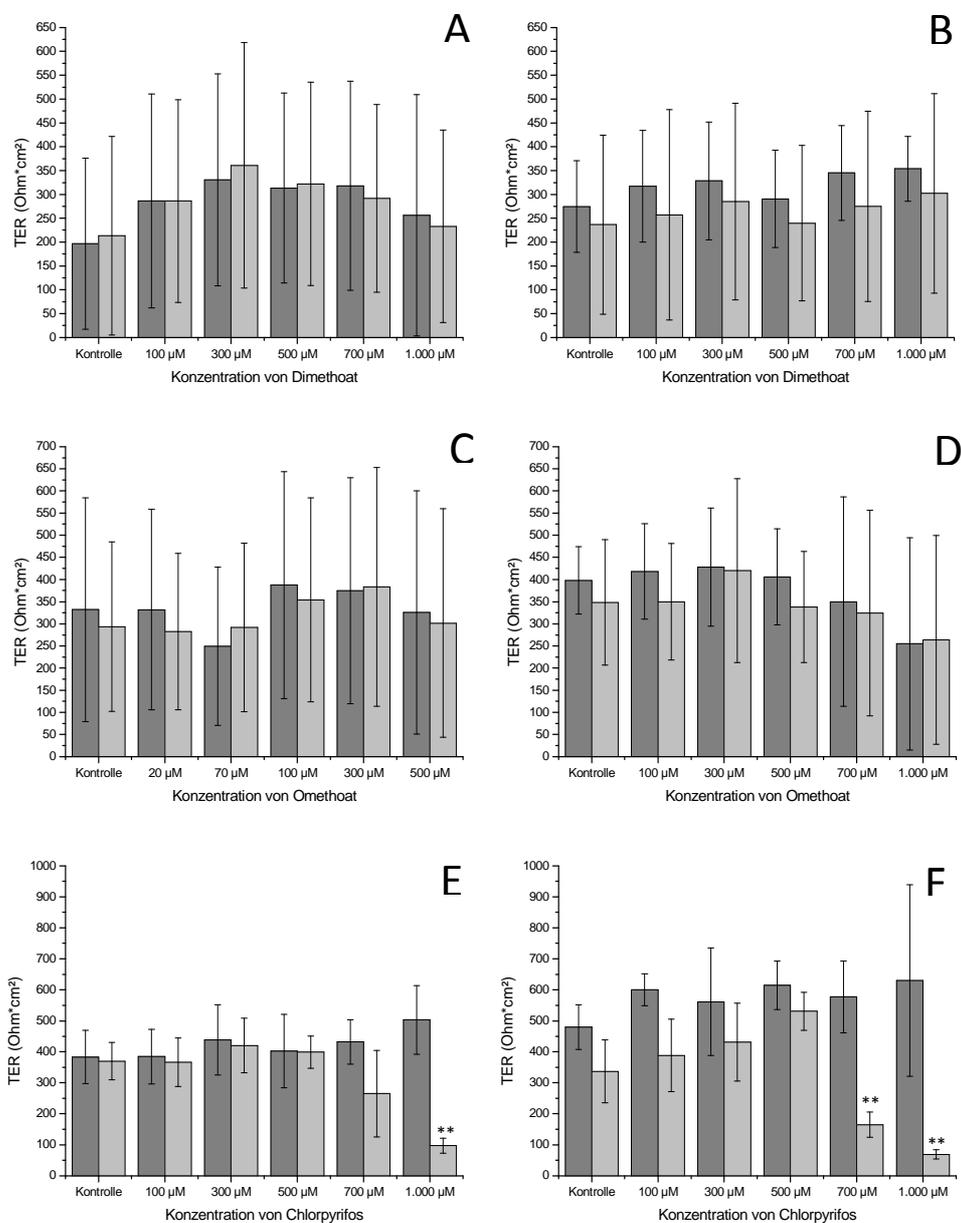


Abbildung 36: TER-Werte im Vergleich Ko- & Triple-Kultur **A, C, E:** Ko-Kultur mit 16HBE, Wi-38 **B, D, F:** Triple-Kultur mit 16HBE, Wi-38, τ DCs. Dunkelgraue Balken: Vor der Stimulation; hellgraue Balken: Nach der Stimulation. Signifikanz ** ($p < 0,01$) in Relation zur Kontrolle ($n=3$).

Alle Versuche einzeln betrachtet sind allerdings ineinander stimmig. In

Abbildung 36 A-D sind keine Veränderungen der TER-Werte durch die Stimulation mit Dimethoat oder Omethoat erkennbar. Bei der Stimulation mit Chlorpyrifos ist ab einer Konzentration von 700 μM sowohl in der Ko- als auch in der Triple-Kultur ein starker Abfall des Widerstandes messbar (

Abbildung 36 E-F).

Immunfluoreszenz

Um die Zell-Zell-Kontakte der apikalen Seite mit Epithelzellen zu untersuchen, wurden *tight junctions* (ZO-1, Occludin) angefärbt (Abbildung 37).

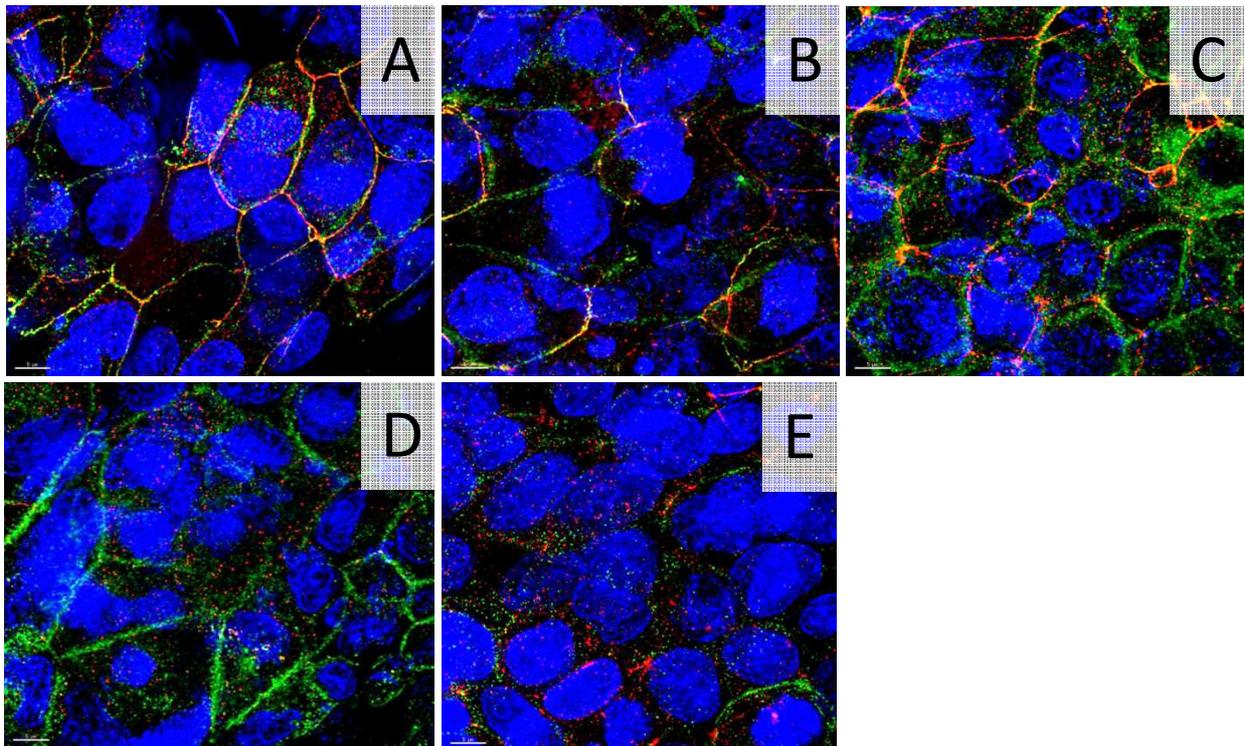


Abbildung 37: Immunfluoreszenz der Ko-Kultur der Zell-Zell-Kontakte ZO-1 (rot), Occludin (grün) Stimulation mit Dimethoat **A:** unbehandelt **B:** 100 μM Dimethoat **C:** 300 μM Dimethoat **D:** 700 μM Dimethoat **E:** 1.000 μM Dimethoat

Die unbehandelte Ko-Kultur zeigte ausgeprägte *tight junctions*. Mit zunehmender Organophosphat-Konzentration wurden die Zell-Zell-Kontakte geschädigt, sodass bei einer Konzentration von 1 mM keine intakten Zell-Zell-Kontakte mehr vorhanden waren. Dieser Effekt war für Dimethoat und Chlorpyrifos vergleichbar. Erste Schädigungen der Kontakte waren bei ZO-1 ab einer Konzentration von 100 μM der Organophosphate sichtbar, wohingegen eine großflächige Schädigung von Occludin ab 700 μM erfolgte.

In der Triple-Kultur mit den immunkompetenten dendritischen Zellen war ein deutlicher Unterschied im Vergleich zur Ko-Kultur zu erkennen (Abbildung 38).

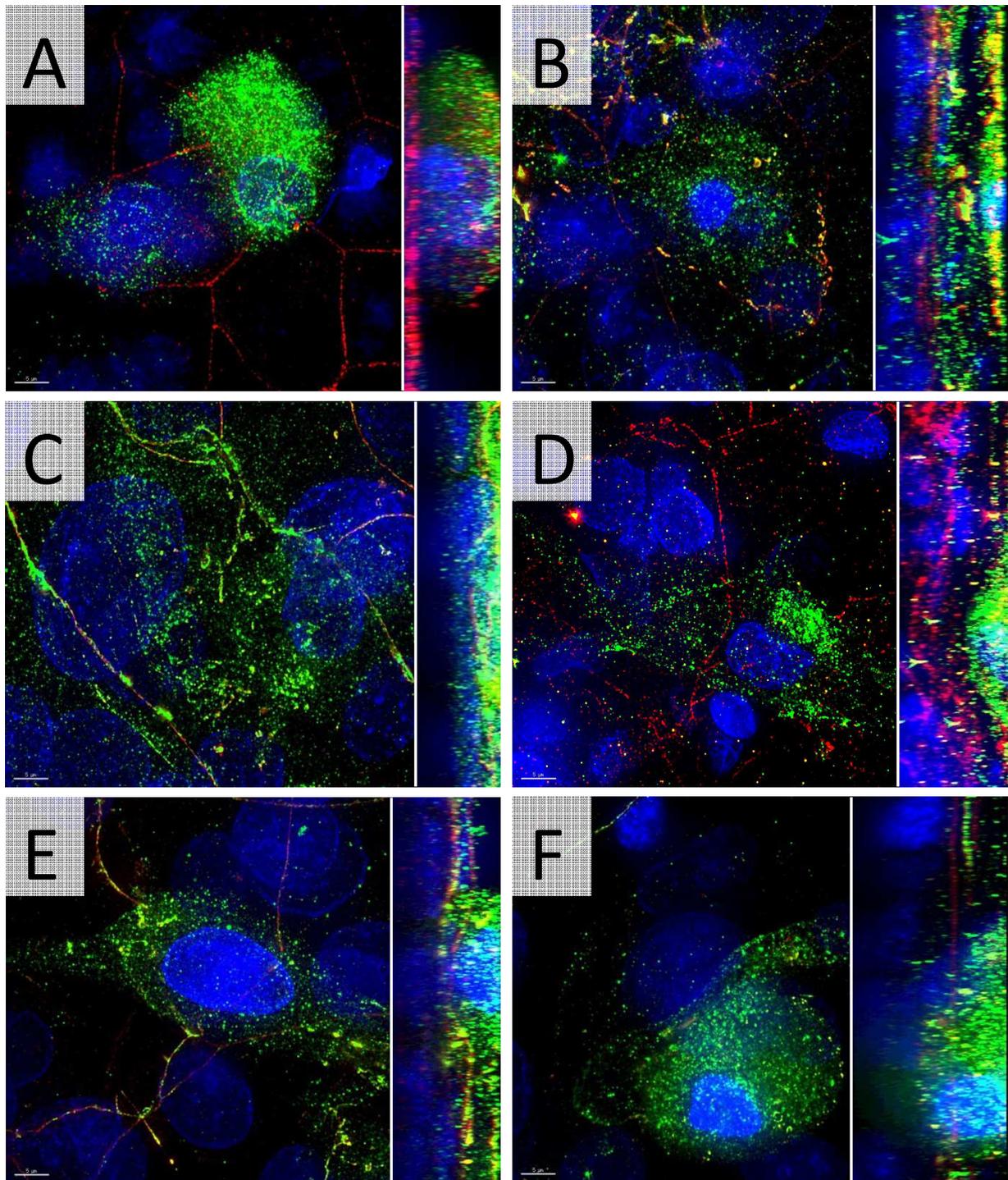


Abbildung 38: Immunfluoreszenz der Triple-Kultur **A:** unbehandelte Triple-Kultur der Zell-Linie (16HBE, Wi-38, DCs) Claudin-5 (rot), CD83 (grün) **B-F:** primäre Triple-Kultur (HBEC, Wi-38, DCs) mit ZO-1 (rot), CD304 (grün). **B:** unbehandelt **C:** 100 µM Dimethoat **D:** 300 µM Dimethoat **E:** 700 µM Dimethoat **F:** 1.000 µM Dimethoat

Bei der unbehandelten Triple-Kultur scheinen die dendritischen Zellen auf der Epithelzellschicht aufzuliegen. Bei einer Konzentration von 100 µM und größer legen

die dendritischen Zellen sich weiter auf die bronchiale Ko-Kultur auf und wandern zu den geschädigten Zell-Zell-Kontakten, um diese mit ihren Dendriten auszugleichen. Bei einer Konzentration von 300 μM zeichnen sich die Ausläufer der Zelle in der Immunfluoreszenz mehr ab.

Die Stimulation mit 1.000 μM der Organophosphate zeigen fast keine intakten *tight junctions* mehr, sodass hier nur noch eine Schicht mit Epithelzellen und dendritischen Zellen erkennbar ist. ZO-1 und Occludin sind an keinen Stellen mehr erkennbar und intakt, sodass nur noch die dendritische Zelle in ihren Konturen sichtbar ist.

Zytokin-Messungen

Der Einfluss von Chlorpyrifos im Vergleich Ko- und Triple-Kultur ist in Abbildung 39 dargestellt.

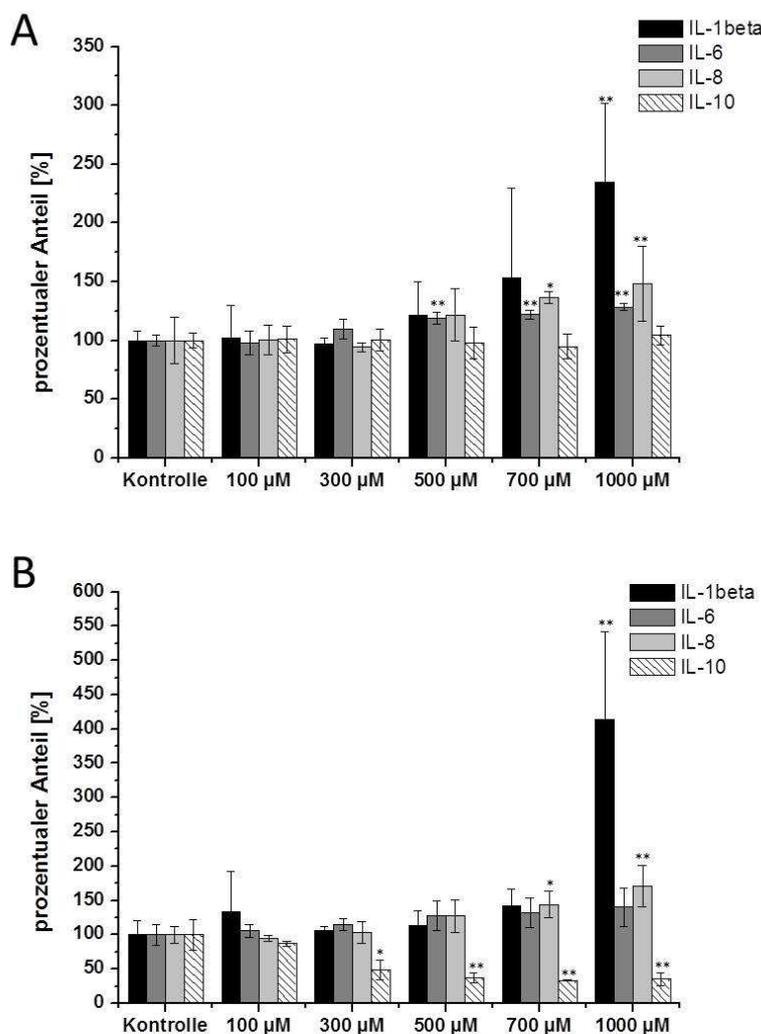


Abbildung 39: Proinflammatorische Mediatoren der Triple-Kultur (A) und der Ko-Kultur (B) nach Stimulation mit Chlorpyrifos. Signifikanz * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$) in Relation zur Kontrolle. $n=3$

Chlorpyrifos Vergiftungen zeigen im Vergleich zur Ko-Kultur, dass IL-1 β stark induziert und IL-10 bis zu 70% inhibiert wird. Dieser Effekt ist ebenso bei den dendritischen Zellen nachweisbar. Sie beeinflussen also auch die Zytokinregulation in der Triple-Kultur.

Nach Stimulation mit Dimethoat sind keine signifikanten Effekte auf die Zytokinexpression nachweisbar (Daten sind hier nicht dargestellt).

Proteinbestimmung

Proteinkonzentrationsbestimmungen für die Apoptose Arrays wurden kurz vor dem Versuch durchgeführt (Tabelle 17). Es wurden bis zu 6 verschiedene Filtermembranen gepoolt und die Filter für die Proteinisolation in 300 μ l Lysis Puffer zu einer Probe vereinigt, sodass der Apoptose Array auch nur einmal mit gepoolten Proben durchgeführt wurde.

Um einen möglichst guten Protein-Array zu bekommen wurde eine hohe Proteinkonzentration eingesetzt.

Probenbezeichnung	μg/μl
Unbehandelt (Ko-Kultur)	2,55
500 μ M Dimethoat (Ko-Kultur)	2,40
100 μ M Omethoat (Ko-Kultur)	2,12
500 μ M Chlorpyrifos (Ko-Kultur)	2,65
Unbehandelt (Triple-Kultur)	2,30
500 μ M Dimethoat (Triple-Kultur)	2,61
100 μ M Omethoat (Triple-Kultur)	2,48
500 μ M Chlorpyrifos (Triple-Kultur)	2,33

Tabelle 17: Proteinkonzentrationsbestimmung für den Apoptose Array

Apoptose

Für den Apoptose Array wurden die Proteine in einer Konzentration von 400 μ g eingesetzt. Die Proben wurden mit dem jeweiligen Lysis Puffer und Array Puffer wie in Tabelle 18 beschrieben verdünnt.

Probe	400 µg = x µl	LB15 auf 250 µl	Array Puffer 1
KK unbehandelt	164,61 µl	85,39 µl	1,25 ml
KK 500 µM Dimethoat	175,44 µl	74,56 µl	1,25 ml
KK 100 µM Omethoat	200,00 µl	50,00 µl	1,25 ml
KK 500 µM Chlorpyrifos	158,10 µl	91,90 µl	1,25 ml
TK unbehandelt	183,49 µl	66,51 µl	1,25 ml
TK 500 µM Dimethoat	160,64 µl	89,36 µl	1,25 ml
TK 100 µM Omethoat	169,49 µl	80,51 µl	1,25 ml
TK 500 µM Chlorpyrifos	181,00 µl	69,00 µl	1,25 ml

Tabelle 18: Ansätze der Proteine für die Apoptose Arrays (KK = Ko-Kultur; TK = Triple-Kultur).

Die Apoptose Arrays wurden mit den Organophosphaten Dimethoat, Omethoat und Chlorpyrifos im Vergleich Ko- und Triple-Kultur durchgeführt (Abbildung 40; Abbildung 41). In den abgebildeten Graphiken sind alle untersuchten Proteine des Apoptose Wegs aufgeführt. Alle gemessenen Werte wurden im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle betrachtet und zu dieser prozentual berechnet.

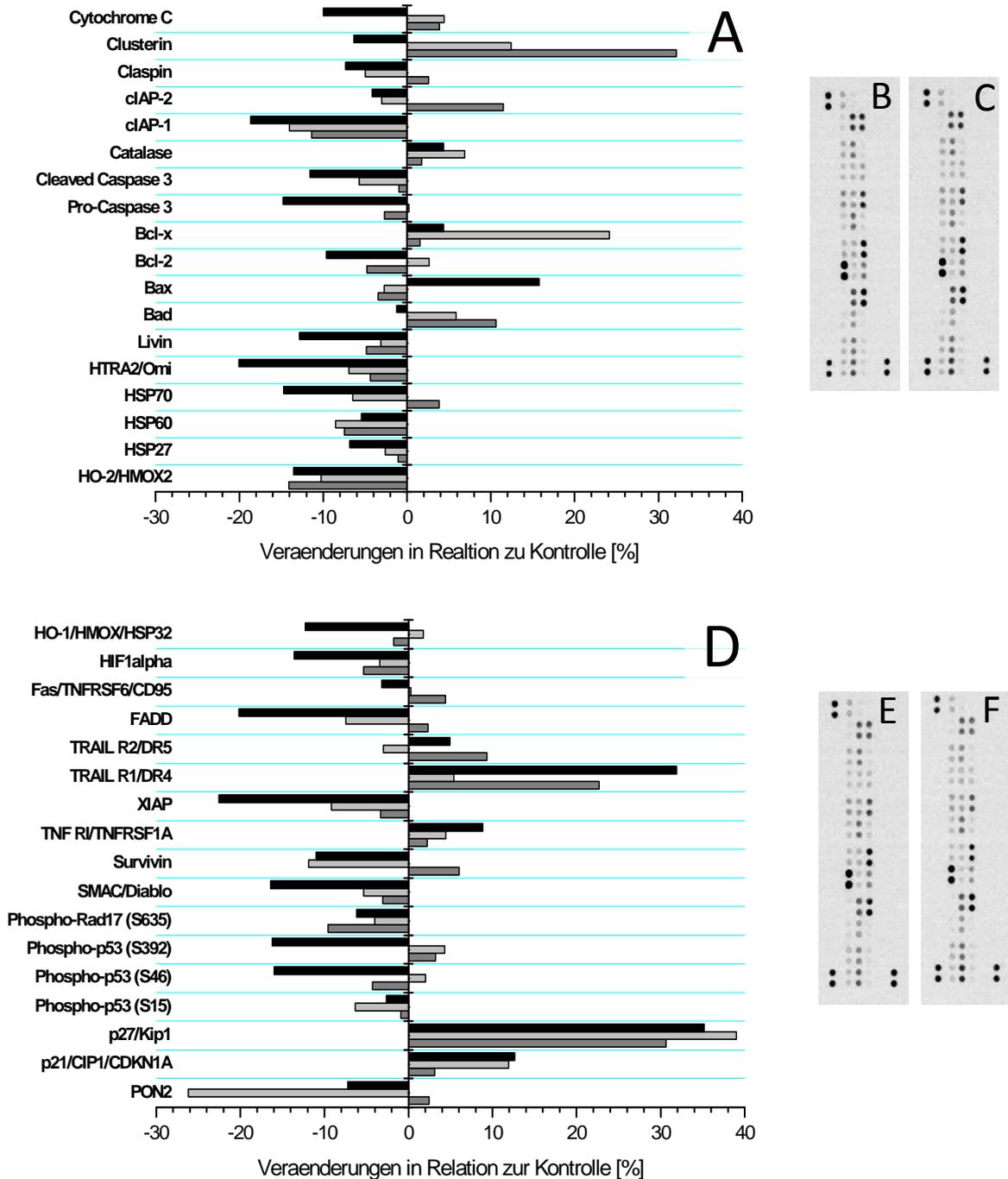


Abbildung 40: Apoptose-Array der Ko-Kultur **A,D:** Veränderungen in Relation zur Kontrolle des jeweiligen Proteins **B:** unbehandelt **C:** 500 µM Dimethoat **E:** 100µM Omethoat **F:** 500 µM Chlorpyrifos. Schwarze Balken = 500 µM Chlorpyrifos; dunkelgraue = 500 µM Dimethoat; hellgraue = 100 µM Omethoat

Bei der Ko-Kultur konnte bei p27 und bei TRAIL R1 eine Veränderung bis zu 40% gemessen werden (Abbildung 40). Die anderen Proteine schwanken bis zu 20% um die Kontrolle, welche allerdings hier erst einmal nicht weiter ausgeführt werden.

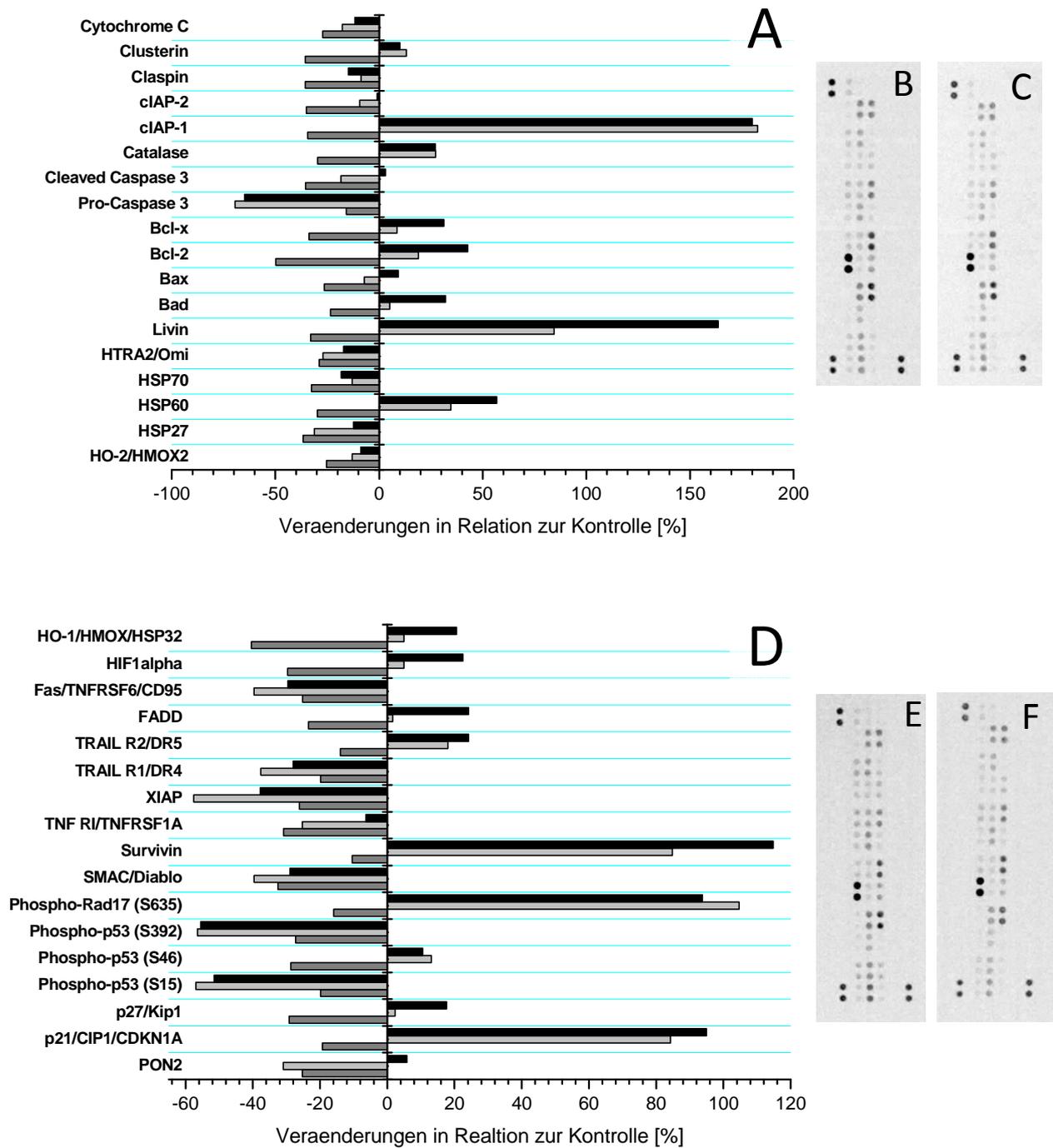


Abbildung 41: Apoptose Untersuchung der Triple-Kultur **A,D:** Veränderungen in Relation zur Kontrolle des jeweiligen Proteins **B:** unbehandelt **C:** 500 µM Dimethoat **E:** 100µM Omethoat **F:** 500 µM Chlorpyrifos. Schwarze Balken = 500 µM Chlorpyrifos, dunkelgraue = 500 µM Dimethoat, hellgraue = 100 µM Omethoat

In der Triple-Kultur zeigte Chlorpyrifos einen erheblichen Einfluss auf die anti-apoptotischen Proteine IAPs, HSPs, Livin und Survivin (Abbildung 41).

Nach der Stimulation mit Dimethoat konnten keine signifikanten Regulationen beobachtet werden im Gegensatz zu Omethoat, welche sich ähnlich wie bei Chlorpyrifos verhalten.

Interventionsstudie: Vitamin C vor Stimulation mit Chlorpyrifos

Um den Effekt von Chlorpyrifos zu mindern bzw. zu verhindern, wurden die Ko- und Triple-Kulturen mit Vitamin C (Ascorbinsäure) für 6 Stunden vorbehandelt. Nach dieser Inkubation erfolgte die eigentliche Stimulation mit 500 µM und 1.000 µM Chlorpyrifos für weitere 24 Stunden. Die Stimulation wurde nur mit Chlorpyrifos durchgeführt, da hier der größere Effekt im Bereich der Zell-Zell-Kontakt Schädigung eingetroffen ist.

TER-Werte – Vitamin C

Der transbilayer elektrische Widerstand wurde vor und nach jedem Versuch gemessen.

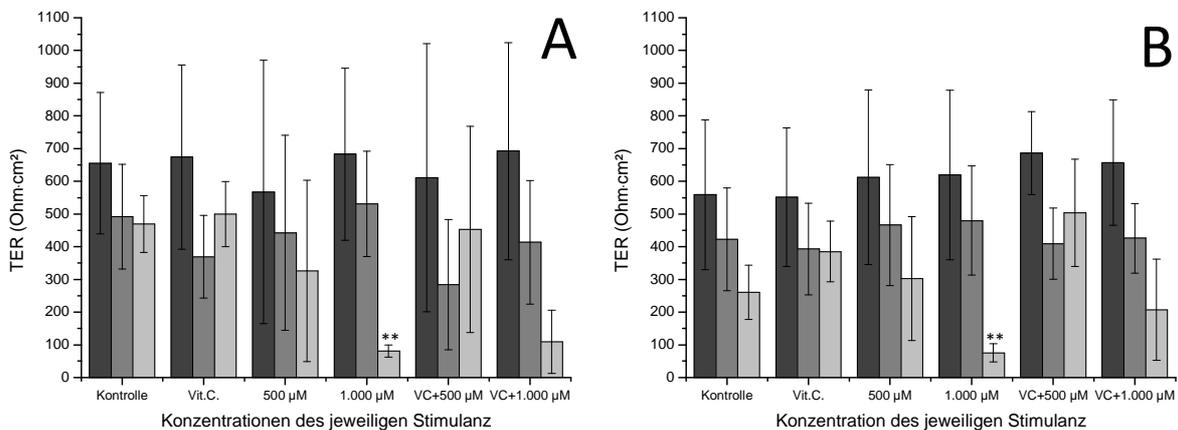


Abbildung 42: TER-Werte der Ko- und Triple-Kulturen nach Vorbehandlung mit Vitamin C (VC) und Stimulation mit Chlorpyrifos. **A:** Ko-Kultur **B:** Triple-Kultur. Dunkelgraue Balken: Vor der Stimulation; graue Balken: 6h nach der Stimulation mit Vitamin C; hellgraue Balken: Nach der Stimulation mit Vitamin C und Chlorpyrifos. Signifikanz ** ($p < 0,01$) in Relation zur Kontrolle ($n = 3$).

Vitamin C zeigt einen positiven, aber nicht signifikanten, Effekt auf den TER-Wert. Der TER-Wert bleibt mit Vorbehandlung von Vitamin C stabiler, sodass dieser bei einer Konzentration zwischen 500–1.000 µM ähnlich zur unbehandelten

Kontrolle bleibt. Es ist allerdings ersichtlich, dass Vitamin C keine Schutzfunktion für die Ko- und Triple-Kultur aufzeigt. Auch in den Zytokinmessungen können sich keine Veränderungen von unbehandelten und 6 Stunden vorbehandelten Proben mit Vitamin C feststellen lassen.

Zytokin-Messungen – Vitamin C

Vitamin C zeigt sowohl bei der Ko- als auch bei der Triple-Kultur keinen positiven Effekt (Abbildung 43). Die beiden Modelle unterscheiden sich nicht in der Zytokinexpression. Im Vergleich zu den Stimulationen ohne Vitamin C Vorbehandlung (Abbildung 39) bleibt die Expression von IL-1 β und IL-6 vergleichbar. Allerdings ist zu erkennen, dass die Expression von IL-10 bei der Triple-Kultur reduziert wird, allerdings nicht so stark wie ohne Vitamin C Behandlung.

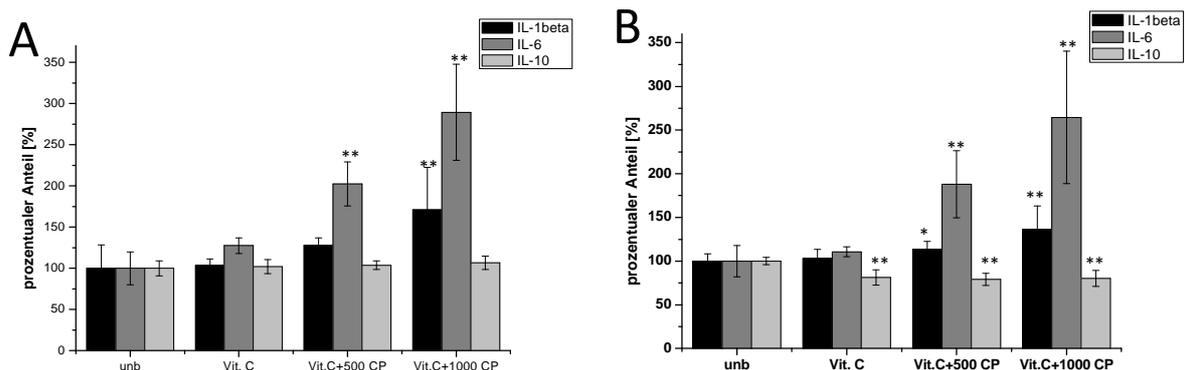


Abbildung 43: Zytokinproduktion der Ko-Kultur (A) und der Triple-Kultur (B) nach Stimulation mit Chlorpyrifos mit Vorbehandlung mit Vitamin C. Signifikanz * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$) in Relation zur Kontrolle ($n=4$).

Die Ko- und Triple-Kultur weist nach einer 24 stündigen Chlorpyrifos Stimulation mit 6 h Vorbehandlung mit Vitamin C einen signifikanten Anstieg von IL-1 β und IL-6 auf. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit den Ergebnissen der Ko- und Triple-Kulturen ohne Vitamin C Vorbehandlung (Abbildung 39).

Interventionsstudie: Regeneration nach Organophosphat-Vergiftung (72 Stunden Versuche)

Um den Einfluss einer Erholungsphase nach Stimulation mit Organophosphaten zu untersuchen, wurden die Triple-Kulturen für 24 h mit jeweils 100 μM , 500 μM und 1.000 μM Dimethoat und Chlorpyrifos stimuliert mit einer anschließenden 48 stündigen Erholungsphase. Als Kontrolle diente eine unbehandelte Triple-Kultur über 72 h.

Zytokin-Messungen – 72 h Versuch

Die Überstände wurden auf Zytokinexpression von IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-10 als auch apoptotische Untersuchungen getestet. In Abbildung 44 sind die Veränderungen der verschiedenen Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle dargestellt, d.h. Triple-Kultur mit 24h Organophosphat Stimulation und anschließender 48h Erholungsphase.

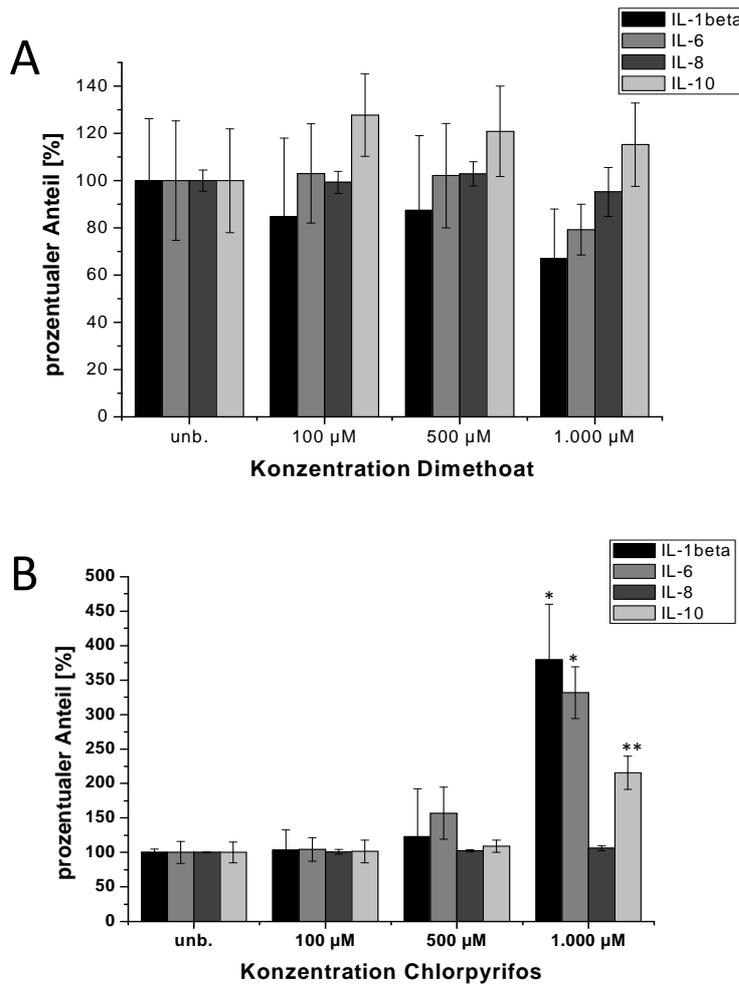


Abbildung 44: Stimulation der Triple-Kultur mit (A) Dimethoat und (B) Chlorpyrifos. Die Stimulation erfolgte 24 Stunden mit einer anschließenden 48 Stunden Erholungsphase. Signifikanz * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$) in Relation zur Kontrolle ($n=3$).

Nach Stimulation mit Dimethoat zeigt sich keine signifikante Veränderung der Zytokinexpression. Bei Chlorpyrifos hingegen steigt die Expression von IL-1 β und IL-6 um ein vielfaches im Gegensatz zur 24 h Stimulation mit Chlorpyrifos ohne Erholungsphase an. Auch IL-10 zeigt eine starke Veränderung und steigt um mehr als 100% von der Kontrolle an. Im Vergleich zur Triple-Kultur ohne Erholungsphase ist das ein Anstieg von über 170% bei einer Konzentration von 1.000 μ M.

Apoptose – 72 h Versuch

In Abbildung 45 und Abbildung 46 sind die Expressionen der untersuchten Proteine des Apoptose-Signalwegs in Relation zur unbehandelten Kontrolle dargestellt. Getestet wurde die Stimulation der Triple-Kultur mit Chlorpyrifos und Dimethoat (jeweils 100 μ M, 500 μ M und 1.000 μ M).

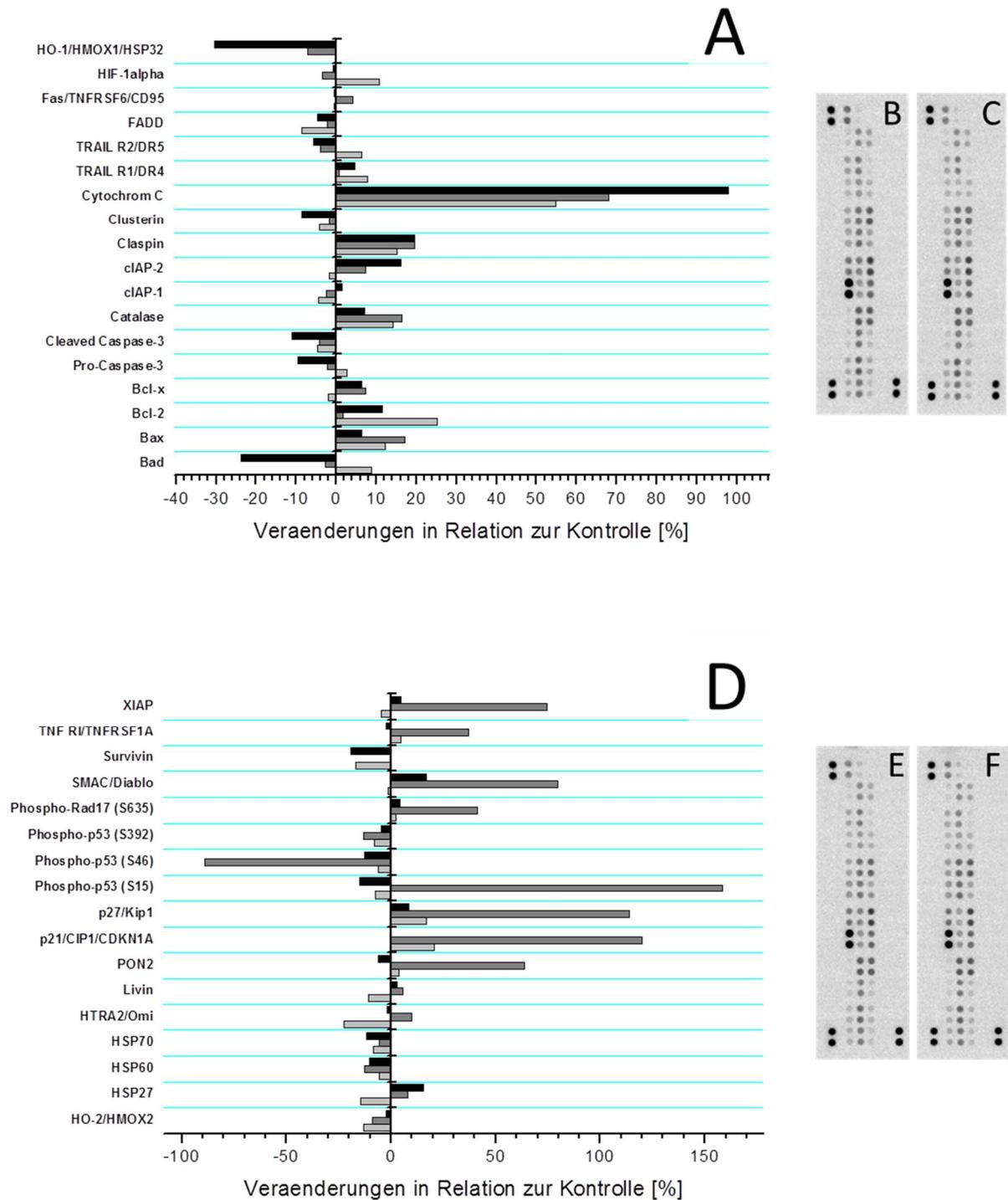


Abbildung 45: Apoptose-Array der Triple-Kultur nach Stimulation mit Dimethoat 100 µM (hellgraue Balken), 500 µM (graue Balken) und 1.000 µM (schwarze Balken) **A,D:** Veränderungen in Relation zur Kontrolle des jeweiligen Proteins **B:** unbehandelt **C:** 100 µM Dimethoat **E:** 500 µM Dimethoat **F:** 1.000 µM Dimethoat

Die Veränderungen von Chlorpyrifos waren vor allem bei einer Konzentration von 1.000 µM erkennbar. Bcl-x, Cleaved- und Pro-Caspase 3 wurden bis zu 50% in Relation zur Kontrolle inhibiert. Ebenso erfolgt bei HSP32 und cIAP-1 eine

Reduktion. Auch Livin und Survivin werden im Gegensatz zur 24 h Stimulation mit Chlorpyrifos deutlich reduziert.

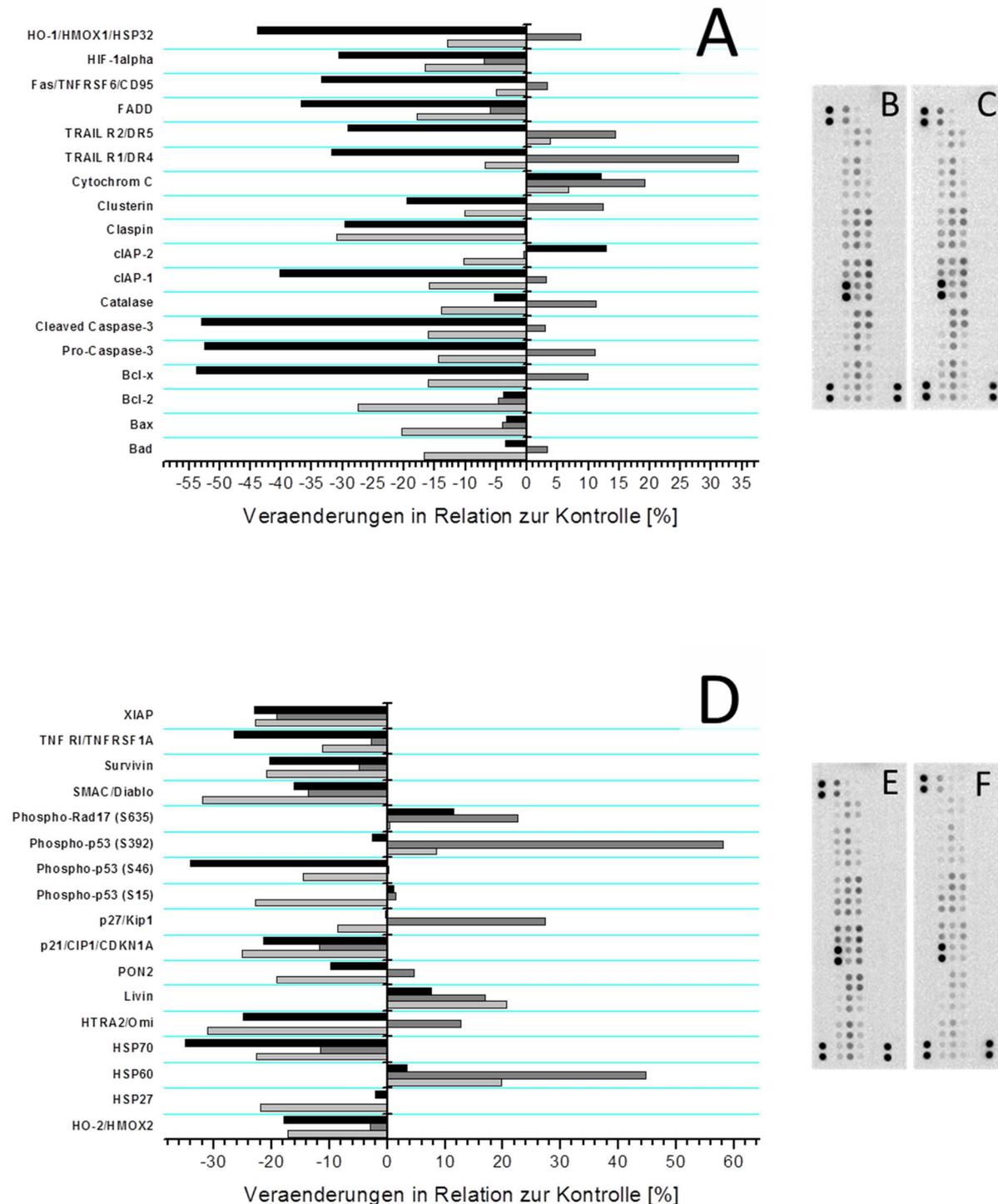


Abbildung 46: Apoptose-Array der Triple-Kultur nach Stimulation mit Chlorpyrifos **A,D:** Veränderungen in Relation zur Kontrolle des jeweiligen Proteins **B:** unbehandelt **C:** 100 µM Chlorpyrifos **E:** 500 µM Chlorpyrifos **F:** 1.000 µM Chlorpyrifos. Hellgraue Balken = 100 µM Chlorpyrifos; graue Balken = 500 µM Chlorpyrifos; schwarze Balken = 1.000 µM Chlorpyrifos.

Bei allen Konzentrationen von Dimethoat wurde die Expression von Cytochrom C bis zu 100% induziert. Je höher die Dimethoat Konzentration, desto höher die Cytochrom C Expression. Die Stimulation mit 500 μ M Dimethoat zeigte bei der Triple-Kultur außerdem eine Induktion von XIAP, SMAC/Diablo, Phospho p53 (S15), p27/Kip1, p21 und PON2. Inhibiert wurde die Expression von Phospho p53 (S46) bei einer Konzentration von 500 μ M Dimethoat.

DISKUSSION

Differenzierung und Charakterisierung von immunmodulatorischen Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl aus der Zell-Linie THP-1, als auch aus primären Monozyten, aus Vollblut, erfolgreich dendritische Zellen differenziert. Morphologische Untersuchungen zeigten einen vergrößerten Zellkörper und Zellkern, als auch an der Oberfläche lange, dünne Ausläufer in alle Richtungen. Die Adhäsion zur Oberfläche stieg stark an, sodass diese nur durch Abschaben abgelöst werden konnten. Auch der Unterschied zwischen unreifen und reifen dendritischen Zellen wurde sichtbar, da die unreifen dendritischen Zellen eine Anhäufung von Vakuolen in der Zelle aufwiesen. Die Charakterisierung der dendritischen Zellen erfolgte mittels Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie. Monozyten exprimieren kein CD83, CD209 und HLA-DR, aber zeigten dafür typische Marker wie CD11c, CD33 und CD54, welche überwiegend für die allgemeine Zell-Zell-Interaktion und Zell-Adhäsion bekannt sind. Ausdifferenzierte τ DCs zeigten einen vergrößerten Zellkörper und Zellkern, die Ausbildung langer Dendriten, als auch typische dendritische-Zellmarker, wie CD83, CD209 und HLA-DR. Diese spezifischen Marker sind vor allem bei Antigenpräsentierenden Zellen vorhanden, um zum Beispiel die T-Zell Proliferation zu steuern. Auch bei der Immunfluoreszenz waren die Monozyten auf typische Monozyten-Marker, wie zum Beispiel CD36 positiv und auf dendritische-Marker wie zum Beispiel CD304 negativ. Dies war auch umgekehrt für die dendritischen Zellen der Fall.

Die Differenzierung und Charakterisierung von Monozyten zu dendritischen Zellen ist bereits in mehreren Publikationen veröffentlicht, sowohl bei primären dendritischen Zellen (Dauer et al. 2005); (Jonuleit et al. 1997), als auch mit der Zell-Linie THP-1 (Berges et al. 2005); (Ogasawara et al. 2009). Um die Zellen als reife dendritische Zellen verwenden zu können, wurden sie auf unterschiedliche Arten charakterisiert und analysiert. Die Gruppe von Rothen-Rutishauser hatte 2005 differenzierte Makrophagen und dendritische Zellen aus Vollblut verwendet (Rothen-Rutishauser, Kiama and Gehr 2005).

Auch die Differenzierung der primären Monozyten in Makrophagen war ein Bestandteil der vorliegenden Arbeit. Zunächst wurden veröffentlichte Methoden zur

Differenzierung der Makrophagen verwendet, allerdings zeigte zum Beispiel die Methode von der Gruppe Rothen-Rutishauser et al. keine positiven spezifischen Makrophagen-Marker in der Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz (Rothen-Rutishauser et al. 2005). Die fehlenden spezifischen Makrophagen-Marker nach Anwendung der bekannten Methoden erschwerte eine erfolgreiche Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen. In der Habilitationsarbeit von Helmut Jonuleit veröffentlichte er eine effektive Methode zur Differenzierung von Makrophagen aus primären Monozyten. Hierzu wurden die primären isolierten Monozyten zunächst zu unreifen dendritischen Zellen differenziert. Danach wurden sie in serumfreien Medium ohne Zugabe von Zytokinen kultiviert. Die Zellen veränderten ihre Morphologie in zwei Richtungen. Die eine Art von Zellen war aufgebläht und die andere Art von Zellen wies bis zu zwei Pseudopodien auf. Die Charakterisierung erfolgte ebenfalls mit der Durchflusszytometrie. Die spezifischen Zellmarker wie zum Beispiel CD85j und CD206 konnten positiv getestet werden. Andere Marker wie CD25 und CD163 blieben allerdings aus, was sich darauf zurück schließen lässt, dass diese erst einen Stimulus benötigen, um induziert zu werden. Vor allem CD25 wird erst bei aktiven Makrophagen induziert.

Triple Kultur

Auf zellulärer Ebene gibt es viele Abwehrmechanismen gegen Lungenerkrankungen, so spielen Dendritische Zellen eine zentrale Rolle in der Immunabwehr. Sie sind nicht nur in der Lunge lokalisiert, sondern auch in vielen anderen Organen und Geweben im Körper (de Heer et al. 2005, Prickett, McKenzie and Hart 1988, Sertl et al. 1986)

Dendritische Zellen spielen bei der Immunreaktion im Bronchialmodell eine essentielle Rolle für die erste Immunantwort, wobei sie für die Aktivierung verschiedener Zelltypen und für die weiterführenden Prozesse verantwortlich sind. Da sie eine solche entscheidende Rolle übernehmen, wurde zunächst das bronchiale Triple-Kultur Modell mit dendritischen Zellen etabliert. Um dieses möglichst physiologisch zu etablieren, wurden die dendritischen Zellen in einer Zellzahl von 600-800 Zellen/mm² auf die epitheliale Seite ausgesät. Entscheidend für die erfolgreiche Etablierung war die Stabilisierung des TER Wertes. Durch

Prozessoptimierungen der Aussaaten und Kultivierungen konnte zwischen der Ko-Kultur und der Triple-Kultur ein nahezu identischer TER-Wert, ohne signifikante Veränderungen, erreicht werden.

Um Entzündungsprozesse und Toxizitätsstudien des bronchialen Lungenteils zu testen, wurde das bereits veröffentlichte Modell von Pohl et al. weiter entwickelt (Pohl et al. 2009). Bisher wurde noch kein Lungenmodell so nah an die *in vivo* Situation angepasst. Besonderheit hierbei ist das Zusammenspiel der verschiedenen Zelltypen, so wurde dieses noch mit immunkompetenten Zellen, hier dendritische Zellen, erweitert. Zunächst wurden inflammatorische Prozesse untersucht, hierzu wurde die Ko- und Triple-Kultur mit LPS, TNF- α und Int- γ über 24 Stunden behandelt. TNF- α und Int- γ zeigten nur leichte Varianzen der Zell-Zell-Kontakte, allerdings keine Veränderungen in den weiteren Versuchsreihen, wie bei den TER Messungen oder auch Zytokinuntersuchungen. Paraffinschnitte mit HE- und Alzianblau-Färbung zeigten bei der Ko-Kultur ein Auflösen der Zell-Zell-Kontakte. Dies war nicht in der Triple-Kultur der Fall, da die dendritischen Zellen scheinbar die geschädigten Zell-Zell-Kontakte auszugleichen schienen. Bei der unbehandelten Triple-Kultur lagen die dendritischen Zellen auf der Epithelschicht auf, wohingegen nach Stimulation diese in die epitheliale Schicht integriert waren. Die dendritischen Zellen schienen somit das Bronchialmodell zu schützen. Auch die TER-Werte der Triple-Kultur zeigen eine bessere Stabilität nach einer Stimulation mit Entzündungsmediatoren im Gegensatz zur Ko-Kultur. Bei der Ko-Kultur konnte eine geringe Reduktion des TER-Wertes gezeigt werden, allerdings ohne Signifikanz.

Die Schutzfunktion der dendritischen Zellen auf die Triple-Kultur konnte auch in der Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Es ist eine Schädigung der *tight junctions* erkennbar. Sheth et. al. zeigte bereits, dass LPS eine Umlagerung der *tight junctions* verursacht und den Level von ZO-1 senkt (Sheth et al. 2007). Da aber eine Schädigung der Zell-Zell-Kontakte erfolgte, wurde die MUC5AC-Produktion untersucht, welche mit Stimulation von LPS stark anstieg, sodass eine durchgängige Schleimschicht über den Epithelzellen lag. Bereits Pohl et al. zeigte einen solchen Effekt bei Versuchen mit L-Pam, hier stieg auch nach der Stimulation die MUC-Produktion an, sodass die transepitheliale Schicht geschützt wurde und keine Schädigung über den TER Wert festzustellen war (Pohl et al. 2010). Bei der primären Ko-Kultur blieb die Zytokinexpression nach Behandlung mit LPS für die untersuchten Marker IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, VEGF, RANTES, ICAM und VCAM ohne

signifikante Veränderung. Die Zytokinproduktion stieg nur bei der primären Triple-Kultur mit LPS Stimulation für IL-8 an, ein solcher Effekt von LPS wurde bereits *in vivo* in einem Meerschweinchen-Modell gezeigt (Azghani, Miller and Peterson 2000). Weitere getestete Zytokinmarker (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, VEGF, RANTES, ICAM, VCAM) zeigten keine signifikante Veränderung. In den Zelllinien Modellen konnte derselbe Effekt, wie im primären Bronchialmodell gezeigt werden. Es stieg ebenso in der Triple-Kultur die IL-8 Expression nach Stimulation mit LPS signifikant an, wohingegen die anderen getesteten Interleukin-Marker keine Veränderung, sowohl in der Ko- als auch in der Triple-Kultur zeigten.

Einfluss der Organophosphate auf die dendritischen Zellen

Organophosphate sind hoch toxische Substanzen, welche Lungenerkrankungen auslösen können, wie zum Beispiel Pneumonie oder auch respiratorische Paralyse (Rivera and Rivera 1990, Tsai et al. 2007). Bisher konnten Immunreaktionen nach einer Dimethoat und Chlorpyrifos Vergiftung in Tierversuchen nachgewiesen werden (Blakley et al. 1999). In humanen epidemiologischen Studien wurde häufiger Allergien und immunologische Auffälligkeiten nach einer Organophosphat Vergiftung beobachtet (Thrasher, Madison and Broughton 1993). Durch die hohe Toxizität der Organophosphate gab es in der Vergangenheit schon viele Vergiftungsoffer und es gibt nur wenige Studien, welche den Effekt dieser Substanzen an immunkompetenten Zellen untersucht haben (Nakadai, Li and Kawada 2006).

Organophosphat-Vergiftungen waren ein Hauptbestandteil der vorliegenden Arbeit. Sie sind nicht nur in der Landwirtschaft eingesetzt, sondern werden auch als chemische Kampfstoffe verwendet. Da die Vergiftungsprozesse ein komplexes Thema darstellen und sich die Signaltransduktion zwischen den Organophosphaten unterscheidet, wurden zunächst die dendritischen Zellen mit Organophosphaten über 24 Stunden stimuliert. Um zunächst die morphologischen Veränderungen zu erfassen, wurden die behandelten τ DCs unter dem Durchlichtmikroskop betrachtet. Es konnte eine Schädigung beobachtet werden, vor allem bei den Dendriten der Zellen. Um diese quantitativ zu untersuchen, wurden die behandelten τ DCs mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die toxischen Auswirkungen auf die Oberflächenmarker der Zellen waren bei Dimethoat wesentlich geringer als bei

Chlorpyrifos. CD33, ein Marker für die intrazelluläre Kommunikation, war durch den Einfluss von Chlorpyrifos stark geschädigt, was eine Folge der Schädigung der Dendriten sein könnte. Dies wurde auch bei der Durchlichtmikroskopie sichtbar. Die Schädigung der Dendriten kann zu einer gestörten Kommunikation zwischen den benachbarten Zellen führen. In C6 Rat Glioma Zellen wurde bereits nachgewiesen, dass Chlorpyrifos und dessen Metabolit Chlorpyrifos-Oxon in der Lage sind, die Ausbildung von Dendriten zu inhibieren (Sachana et al. 2008). Nakadai et al. zeigten, dass in der Monozyten-Zell-Linie, U937, ein zeit- und dosisabhängiger Zelltod nach einer Chlorpyrifos Vergiftung mit einem MTT oder LDH Assay nachweisbar ist (Nakadai et al. 2006).

In den vorliegenden Ergebnissen wurde auch ein konzentrationsabhängiger Zelltod nach Stimulation mit Chlorpyrifos gezeigt, wohingegen sich bei Dimethoat keine Veränderungen zeigten. Auch in der Zytokinproduktion unterschied sich der Einfluss der beiden Organophosphate. IL-8 zeigte keinen signifikanten Effekt nach der Chlorpyrifos und Dimethoat Stimulation, nur bei den hohen Konzentrationen. IL-1 β , ein wichtiger Mediator für inflammatorische Prozesse, wurde nach einer Dimethoat Vergiftung inhibiert und nach einer Chlorpyrifos Vergiftung induziert. Das anti-inflammatorische Zytokin, IL-10, war bei beiden Organophosphaten leicht reduziert, allerdings war bei Chlorpyrifos eine höhere Reduktion messbar. IL-10 ist ein Zytokin, welches eine wichtige Rolle in der Immunantwort spielt. Durch die Aktivierung der extrazellulären Signal-regulierten Kinase (ERK 1/2) in Makrophagen und Dendritischen Zellen wird die Expression von IL-10 gestartet. Wenn ein niedriger ERK Expressionslevel vorhanden ist, wird kein IL-10 produziert (Saraiva and O'Garra 2010). Diese Arbeit zeigt, dass beides sowohl IL-10, als auch der phosphorylierte Level von ERK 2 für Dimethoat und Chlorpyrifos reduziert sind. Viele Studien bewiesen, dass Zellproliferation durch die Rezeptor-abhängige Akt Aktivierung vermittelt wurde (Unfried et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit wurden mittels eines Protein Arrays, gespottet mit verschiedenen MAPK Signal Proteinen, gezeigt, dass der phosphorylierte Level der Akt Familie und von ERK 2 signifikant, bei beiden Organophosphaten reduziert war. Dahingegen waren die Level von p38 und der JNK Familien unverändert. JNK und p38 wurden normalerweise durch reaktive Sauerstoffarten aktiviert (Davis 2000) und sind eingebunden in das Zellüberleben (Xia et al. 1995). ERK 1/2 wirkt anti-apoptotisch (Xia et al. 1995). In den Versuchen war ERK 2 signifikant reduziert und HSP27 zeigte auch eine leichte Reduktion, wobei

dieses ebenso in den apoptotischen Signalweg involviert ist. Das Ergebnis zeigte, dass τ DCs nicht den apoptotischen Weg gehen, was ebenso der Annexin-V Zellversuch zeigte. Die Veränderung der Morphologie, der Zytotoxizität und der reduzierten IL-10 Expression nach Chlorpyrifos Vergiftung zeigte eine wesentlich höhere Auswirkung, als bei einer Dimethoat Vergiftung.

Einfluss der Organophosphate auf bronchiale Modelle

Nach Stimulation der Ko-Kultur und Triple-Kultur mit Dimethoat und Chlorpyrifos, wurde der Effekt der Zell-Zell-Kontakt-Schädigung erneut gezeigt. Bei der Triple-Kultur zeigte sich derselbe Effekt wie nach der Behandlung mit LPS. Bei einer unbehandelten Triple-Kultur, lagen die dendritischen Zellen auf der epithelialen Schicht auf. Es war deutlich erkennbar, dass die dendritischen Zellen mit zunehmender Organophosphat-Konzentration zwischen der epithelialen Schicht wandern. Die Dendriten der Zellen wanderten hierbei scheinbar auch zwischen und unter die Zell-Zell-Kontakte, um die Schädigung auszugleichen. Der TER-Wert zeigte nach einer Chlorpyrifos-Stimulation bei höheren Konzentrationen eine deutliche Reduktion. Die Zytokinproduktion bei Dimethoat war nicht signifikant, wohingegen bei Chlorpyrifos eine deutliche Veränderung zu finden war. Sowohl bei der Ko- als auch bei der Triple-Kultur stiegen die IL-1 β Produktion stark an. Der IL-1 β -Expressionslevel wurde bereits bei der Stimulation mit Chlorpyrifos der τ DCs induziert. Die Ko-Kultur wies eine erhöhte Expression von IL-6 und IL-8 auf, was sich aber bei der Triple-Kultur durch die dendritischen Zellen nicht mehr bemerkbar gemacht hatte. IL-10 wurde nur bei der Triple-Kultur stark reduziert, dies war auch bereits bei den τ DCs erkennbar, sodass hier auch der Einfluss dieser ersichtlich war. Erst in der Triple-Kultur wurden Regulationen der einzelnen phosphorylierten Proteine messbar. Durch die immunkompetenten Zellen wurde das Modell scheinbar geschützt. Nicht nur im Bereich der Apoptose, sondern auch bei den *tight junctions*. Vor allem Livin, Survivin, p21, IAPs und HSPs wurden nach Stimulation mit Chlorpyrifos bis zu 150 % induziert. Livin inhibiert die Apoptose (Sauna and Ambudkar 2007), ebenso wie IAPs, HSPs oder auch p21 wirken sie anti-apoptotisch. Survivin ist ebenfalls ein Apoptose-Inhibitor (Altieri 2003). Es wurde bereits gezeigt, dass dendritische Zellen die Apoptose in B-Zellen reduzieren (Schwarz et al. 1999).

Sie wirken schützend bei inflammatorischen Prozessen und sind wichtig für die erste Immunantwort, indem sie schnell bestimmte Zytokine ausschütten (Lipscomb and Masten 2002). Dies war auch bei den vorliegenden Ergebnissen ersichtlich. Es wird zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen unterschieden (Orrenius, Nicotera and Zhivotovsky 2011). In den durchgeführten Versuchen war erkennbar, dass der Zelltod nicht durch Apoptose eintritt, sondern über einen anderen Signalweg lief. Dies verstärkt sich durch die Ergebnisse der phosphorylierten Proteine des Apoptose-Versuches und der reduzierten IL-10 Expression. Durch das Wandern der dendritischen Zellen zu den geschädigten Kontakten oder auch die Zytokinfreigabe von IL-1 β bei höheren Konzentrationen wirkten sie schützend auf die anderen Zellen, dies wirkte sich dann auch auf die Stabilität und die Sensibilität des bronchialen Triple-Kultur Modells aus. Das Triple-Kultur Modell nähert sich, durch diese Erweiterung, an die *in vivo* Situation.

In klinischen Studien wurde bereits gezeigt, dass die Todesrate nach Vergiftung mit methylierten Organophosphaten (zum Beispiel Dimethoat) viel höher ist als mit dimthylierten Organophosphaten (zum Beispiel Chlorpyrifos), obwohl die Behandlungsmöglichkeiten viel besser sind (Elsinghorst et al. 2013).

Interventionsstudien

Um diese Einflüsse der Organophosphate, speziell von Chlorpyrifos, zu verhindern oder auch zu mindern, wurden Interventionsstudien durchgeführt. Die Interventionsstudien wurden mit einer 6 Stündigen Vorbehandlung von Vitamin C und anschließender Stimulation mit Chlorpyrifos durchgeführt. Tierversuchsstudien haben bereits gezeigt, dass Vitamin C vor Chlorpyrifos Vergiftungen schützt, indem sie unter anderen freie Radikale abfangen (Ozkan et al. 2012). Bei den vorliegenden Versuchen konnte in keinem der Modelle ein positiver Effekt gezeigt werden. Die eingesetzten Konzentrationen und Stimulationszeiten wurden bereits mit einem positiven Erfolg bei einer Organophosphat-Vergiftung im Tier festgestellt (Ambali et al. 2007). Vitamin C besitzt eine anti-apoptotische Wirkung in Zellen, indem eine Reduktion des Cytochrom C und eine Inhibition der Caspase 9 Aktivität erfolgt (Rossig et al. 2001). Weitere Interventionsstudien zeigten, dass nach einer 24 h Stimulation der bronchialen Triple-Kultur mit Chlorpyrifos anti-apoptotische Marker,

wie zum Beispiel IAPs, HSPs oder auch p21, stark induziert wurden. Nach einer Regenerationszeit von weiteren 48 h wurden die induzierten Proteine bis zu -50% in Relation zur unbehandelten Kontrolle inhibiert. Es war ersichtlich, dass die Zellen der Triple-Kultur, nach Stimulation mit Chlorpyrifos, nicht apoptotisch waren. Im Gegensatz zu Chlorpyrifos zeigte die 24 h Stimulation mit Dimethoat und anschließender 48 h Regeneration ein anderes Ergebnis. Die Expression von Cytochrom C wurde bei den eingesetzten Konzentrationen bis zu 100% höher induziert, als die unbehandelte Kontrolle. Das Ergebnis zeigte, dass Dimethoat einen verspäteten Einfluss auf die Triple-Kultur hat und diese 72 h nach dem Stimulationsbeginn in Apoptose gehen. Dies passt auch zu den bisherigen humanen Studien, in denen Patienten mit Chlorpyrifos-Vergiftung eine höhere Überlebenschance haben als Patienten mit einer Dimethoat-Vergiftung.

Ausblick

Für die weitere Forschungsarbeit im Bereich Lunge ist das in dieser Arbeit etablierte Triple-Kultur Modell ein wichtiger Bestandteil. Es gibt verschiedene Wege, welche eingeschlagen werden könnten, zum einen das Lungenmodell für verschiedene Untersuchungen, wie zum Beispiel Toxizitätsuntersuchungen oder auch Asthma, zu nutzen. Das Modell kann hierbei durch eine vierte Zellenart, wie zum Beispiel Makrophagen oder auch T-Zellen ergänzt werden, um inflammatorische Prozesse, als auch verschiedene Vergiftungen, zu untersuchen und weiter auszutesten. Hierbei ist es interessant, ein Augenmerk auf die dendritische Zellen zu richten, da sie das Verbindungsglied zwischen den einzelnen Kommunikationen der verschiedenen Zelltypen und deren Signalwege sind. Ein weiterer Aspekt ist der Transport der dendritischen Zellen über die Zilien der epithelialen Zellschicht. Wenn dieser Bereich näher untersucht wird, ermöglichen sich vielleicht auch Wege, um eventuell über bestimmte Signale Medikamente direkt an einem bestimmten Zielort transportieren zu lassen.

Das Zusammenspiel unterschiedlicher Zellen und das Verfeinern des vorhandenen Zellkulturmodells sind für die pulmonale Grundlagenforschung unerlässlich. Die immunkompetenten Zellen haben in diesem Modell einen entscheidenden Beitrag

zum Fortschritt beigetragen, da sie das Bronchialmodell schützen, erste Schritte zur Immunabwehr einleiten und den Übergang zu einem neuen Signalweg des Immunsystems herstellen.

ZUSAMMENFASSUNG

Organophosphate können chronische Lungenerkrankungen und Vergiftungen hervorrufen. Bei der Vergiftung erfolgt eine Immunreaktion, welche noch nicht erforscht ist. In dieser Arbeit wurden Toxizitätsstudien an dendritischen Zellen und einem bronchialen Triple-Kultur-Modell durchgeführt. Dendritische Zellen spielen bei der ersten Immunabwehr in der Lunge eine große Rolle. Aus der Zell-Linie THP-1 und primären Monozyten wurden reife dendritische Zellen differenziert und mittels Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz auf spezifische Zellmarker, wie zum Beispiel CD11c, CD83 oder auch CD209, charakterisiert und etabliert. Durch die Vergiftung der Zellen mit Dimethoat und Chlorpyrifos konnte eine Erhöhung des Zelltodes, die Sekretion von proinflammatorischen Mediatoren, Veränderungen in der Morphologie der Zellen und ein Effekt auf den Proteinkinase-Signalweg festgestellt werden. Spezifische dendritische Zellmarker (CD83, CD209) wurden inhibiert und die Dendriten der Dendritischen Zellen kürzer und beschädigt. Die Schädigung von Chlorpyrifos war erheblich größer, als die bei Dimethoat.

Die weiteren Toxizitätsstudien wurden an einem bronchialen Triple-Kultur-Modell durchgeführt. Hierzu wurden auf Transwell-Filtermembranen bronchiale Epithelzellen, Fibroblastenzellen und Dendritische Zellen verwendet. Die bronchialen Epithelzellen und Fibroblastenzellen waren hier physiologisch voneinander getrennt, konnten aber durch Poren in der Membran miteinander interagieren. Die Etablierung des Triple-Kultur-Modells erfolgte durch die Untersuchung von Entzündungsprozessen, durch Stimulation mit LPS, TNF-alpha und Interferon-gamma. In der Ko-Kultur konnten Zell-Zell-Kontakt Schädigungen und Erhöhung von proinflammatorischen Markern, wie zum Beispiel IL-1 β , IL-6 oder auch IL-8 gemessen werden. Versuche in der Triple-Kultur zeigten den positiven Effekt von Dendritischen Zellen. Bei höheren Konzentrationsbereichen von Dimethoat und Chlorpyrifos konnte ein Wandern der Zellen zu den geschädigten Zell-Zell-Kontakten nachgewiesen werden. Die Ausschüttung der proinflammatorischen Mediatoren wurde inhibiert, vor allem bei IL-10 war eine deutliche Reduktion, um mehr als 70% messbar. Ebenso konnten Veränderungen in dem Apoptose-Signalfeld festgestellt werden. Vor allem anti-apoptische Proteine wurden nach einer Vergiftung der Triple-Kultur induziert. Interventionsstudien mit Vitamin C zeigten allerdings keinen positiven Effekt.

DANKSAGUNG

Ein großer Dank gilt auch meiner Familie, vor allem meinen Eltern, und meinem Freund, die mich in allen auch schwierigen Situationen immer wieder motiviert haben und mir immer zur Seite gestanden haben. Ohne diesen Rückhalt hätte ich das nicht geschafft.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 1: Aufbau der Lunge von der Luftröhre bis zu den Alveolen. A: Querschnitt der Lunge mit Sicht auf die beiden Lungenflügel und dessen Kapillaren. B: Bestandteile der Lunge von der Luftröhre bis hin zu den Alveolen..... 9
- Abbildung 2: Vergleich einer gesunden Lunge (A) und einer COPD erkrankten Lunge (B) 11
- Abbildung 3: Vergleich zwischen Asthma und COPD (Bildquelle: (Barnes 2008))12
- Abbildung 4: Schematische Darstellung der (A) *adherens junctions* und (B) *tight junctions* (Bildquelle: (Niessen 2007))..... 14
- Abbildung 5: Transportmechanismen über die Zellmembran..... 15
- Abbildung 6: Bronchiale Ko-Kultur auf einer 24-Well HTS-Transwell Filterplatte. Bei den primären bronchialen Epithelzellen (HBEC) und bei der bronchialen Zell-Linie (16HBE14o-) wurden jeweils Wi-38 Fibroblasten für die Kultivierung verwendet. (Bildquelle: (Pohl et al. 2009))..... 17
- Abbildung 7: Elektronenmikroskopie Aufnahmen der HBEC auf Transwell Filtermembranen nach 24 Tagen Mono-Kultur (A-C Vergrößerungen 1.000x, 2.000x, 5.000x) und in Ko-Kultur mit Wi38 (D-F 1.000x, 2.000x, 5.000x). (G) Ko-Kultur nach 42 Tagen (H) Ko-Kultur nach 84 Tagen (I) Querschnitt der ausgebildeten Zilien. (Bildquelle: (Pohl et al. 2009)) 18
- Abbildung 8: Untersuchungen der HBEC: (A) Lichtmikroskopie Aufnahme der Explantationskultur (B) Expression von Zytokeratin 14 (C) Expression von Aquaporin 3. Untersuchungen der Ko-Kultur (D-F) Alzianblau-Färbung nach Tag 7 (D), Tag 28 (E) und Tag 84 (F) Zilienzellen ◆, Basalzellen ▲, Mukusschicht †. (G) Immunfluoreszenz der apikalen Seite mit ZO-1 (rot fluoreszierend) und β -Tubulin (grün fluoreszierend). (H-I) Ko-Kultur mit 16HBE14o-/Wi-38 im Vergleich submerse Bedingung (H) und Air-Lift (I). (Bildquelle: (Pohl et al. 2009))..... 19
- Abbildung 9: Vergleich angeborenes und erworbenes Immunsystem (Quelle: (Gregersen and Behrens 2006))..... 21

Abbildung 20: Durchlichtmikroskopie von differenzierten Makrophagen aus primären Monozyten..... 64

Abbildung 21: TER Verlauf der Ko- (rot) und Triple-Kultur (blau) über die Zeit. Zugabe der dendritischen Zellen erfolgte bei der Triple-Kultur an Tag 10 (n>3)..... 66

Abbildung 22: Alzianblau-Färbungen von Paraffinschnitte der 24 h stimulierten Ko- & Triple-Kultur zur Veranschaulichung der Schädigung der Zell-Zell-Kontakte A: unbehandelte Ko-Kultur (16HBE, Wi38) B: Ko-Kultur behandelt mit LPS (16HBE, Wi38), markierte Felder sind Schädigungen der *tight junctions* C: Unbehandelte Triple-Kultur (16HBE, Wi38, DCs) D: Triple-Kultur behandelt mit LPS (16HBE, Wi38, DCs)..... 67

Abbildung 23: Immunhistochemie der Triple-Kultur. Dendritische Zellen sind mit dem Zellmarker CD83 (rot) gefärbt. A: unbehandelte Triple-Kultur B: LPS-stimulierte Triple-Kultur. 68

Abbildung 24: TER-Werte der Ko- (B) Triple-Kultur (A) nach Stimulation mit verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen. Dunkelgraue Balken sind TER-Werte vor der Stimulation und hellgraue Balken 24 h nach der jeweiligen Stimulation (n=3). 69

Abbildung 25: Zell-Zell-Kontakte der Ko-Kulturen nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen, ZO-1 (rot), Occludin (grün). A-C: unbehandelte Ko-Kultur. D-F: Stimulation mit 1 µg/ml LPS. G-I: Stimulation mit 3 ng/ml TNF-α. J-L: Stimulation mit 200 U/ml Int-γ. Balken = 5 µm. C, F, I, L: Überlagerung der roten und grünen Fluoreszenz. → Markierung der geschädigten Zell-Zell-Kontakte... 70

Abbildung 26: Immunfluoreszenz der Triple-Kultur nach Behandlung mit verschiedenen inflammatorischen Zytokinen Claudin-5 (rot) und CD83 (grün) A: unbehandelte Triple-Kultur B: Stimulation mit 1 µg/ml LPS C: Stimulation mit 3 ng/ml TNF-α D: Stimulation mit 200 U/ml Int-γ. Balken = 5 µm. 71

Abbildung 27: MUC5AC Produktion in der Ko-Kultur unbehandelt (A,B,C 16HBE, Wi-38); (D,E,F HBEC, Wi38). A,D unbehandelt B,C,E,F behandelt mit LPS 72

Abbildung 28: Prozentualer Anteil der Zytokinproduktion der primären Ko-Kultur nach Stimulation mit LPS. Dunkelgraue Balken = unbehandelt; Hellgraue Balken = mit LPS stimuliert A-B: apikale Seite der primären Ko-Kultur. C-D: basolaterale Seite der primären Ko-Kultur. (n=3)... 73

Abbildung 29: Prozentualer Anteil der Zytokinproduktion nach Stimulation mit LPS der primären Triple-Kultur. A-B: apikale Seite der primären Triple-Kultur. Graue Balken = Kontrolle; Hellgraue Balken = nach Stimulation mit LPS. Signifikanz * ($p < 0,05$) in Relation zur Kontrolle (n=3)..... 74

Abbildung 30: Prozentualer Anteil der Zytokinproduktion nach Stimulation mit LPS der Ko- und Triple-Kultur. A: apikale Seite der Ko-Kultur (16HBE, Wi-38) B: basolaterale Seite der Ko-Kultur (16HBE, Wi-38) C: apikale Seite der Triple-Kultur (16HBE, Wi-38, τ DCs) D: basolaterale Seite der Triple-Kultur (16HBE, Wi-38, τ DCs). Graue Balken = Kontrolle; Hellgraue Balken = nach Stimulation mit LPS. Signifikanz ** ($p > 0,01$) in Relation zur Kontrolle (n=3)..... 75

Abbildung 31: Histogramm-Auswertung der Durchflusszytometrie nach Stimulation der dendritischen Zellen mit Zytokinen..... 77

Abbildung 32: Dichte-Plots der Annexin-V und PI Untersuchung am FACS. 78

Abbildung 33: Durchflusszytometrie Analyse im Verhältnis tote Zellen (dunkelgraue Balken) zu lebenden Zellen (hellgraue Balken). (A) Stimulation mit Dimethoat (B) Stimulation mit Chlorpyrifos. Signifikanz ** ($p < 0,01$) zu der unbehandelten Kontrolle. 79

Abbildung 34: Morphologieveränderung von dendritischen Zellen durch den Einfluss von Organophosphaten. Rechts unten in jeder Abbildung ist ein vergrößerter Ausschnitt einer einzelnen dendritischen Zelle A: unbehandelt B: Stimulation mit 1.000 μ M Dimethoat C: Stimulation mit 500 μ M Dimethoat D: Stimulation mit 1.000 μ M Chlorpyrifos. Balken = 200 μ M. 80

Abbildung 35: Untersuchung der Zytokinexpression von IL-1 β , IL-8 und IL-10 nach Stimulation der τ DCs mit Dimethoat (A) und Chlorpyrifos (B) am Bioplex System (n=3). 81

Abbildung 36: TER-Werte im Vergleich Ko- & Triple-Kultur A, C, E: Ko-Kultur mit 16HBE, Wi-38 B, D, F: Triple-Kultur mit 16HBE, Wi-38, τ DCs.

Dunkelgraue Balken: Vor der Stimulation; hellgraue Balken: Nach der Stimulation. Signifikanz ** ($p < 0,01$) in Relation zur Kontrolle ($n=3$). 82

Abbildung 37: Immunfluoreszenz der Ko-Kultur der Zell-Zell-Kontakte ZO-1 (rot), Occludin (grün) Stimulation mit Dimethoat A: unbehandelt B: 100 μM Dimethoat C: 300 μM Dimethoat D: 700 μM Dimethoat E: 1.000 μM Dimethoat..... 83

Abbildung 38: Immunfluoreszenz der Triple-Kultur A: unbehandelte Triple-Kultur der Zell-Linie (16HBE, Wi-38, DCs) Claudin-5 (rot), CD83 (grün) B-F: primäre Triple-Kultur (HBEC, Wi-38, DCs) mit ZO-1 (rot), CD304 (grün). B: unbehandelt C: 100 μM Dimethoat D: 300 μM Dimethoat E: 700 μM Dimethoat F: 1.000 μM Dimethoat 84

Abbildung 39: Proinflammatorische Mediatoren der Triple-Kultur (A) und der Ko-Kultur (B) nach Stimulation mit Chlorpyrifos. Signifikanz * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$) in Relation zur Kontrolle. $n=3$ 85

Abbildung 40: Apoptose-Array der Ko-Kultur A,D: Veränderungen in Relation zur Kontrolle des jeweiligen Proteins B: unbehandelt C: 500 μM Dimethoat E: 100 μM Omethoat F: 500 μM Chlorpyrifos..... 88

Abbildung 41: Apoptose Untersuchung der Triple-Kultur A,D: Veränderungen in Relation zur Kontrolle des jeweiligen Proteins B: unbehandelt C: 500 μM Dimethoat E: 100 μM Omethoat F: 500 μM Chlorpyrifos..... 89

Abbildung 42: TER-Werte der Ko- und Triple-Kulturen nach Vorbehandlung mit Vitamin C (VC) und Stimulation mit Chlorpyrifos. A: Ko-Kultur B:Triple-Kultur. Dunkelgraue Balken: Vor der Stimulation; graue Balken: 6h nach der Stimulation mit Vitamin C; hellgraue Balken: Nach der Stimulation mit Vitamin C und Chlorpyrifos. Signifikanz ** ($p < 0,01$) in Relation zur Kontrolle ($n=3$). 90

Abbildung 43: Zytokinproduktion der Ko-Kultur (A) und der Triple-Kultur (B) nach Stimulation mit Chlorpyrifos mit Vorbehandlung mit Vitamin C. Signifikanz * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$) in Relation zur Kontrolle ($n=4$)... 91

Abbildung 44: Stimulation der Triple-Kultur mit (A) Dimethoat und (B) Chlorpyrifos. Die Stimulation erfolgte 24 Stunden mit einer anschließenden 48 Stunden Erholungsphase. Signifikanz * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$) in Relation zur Kontrolle ($n=3$)..... 93

- Abbildung 45: Apoptose-Array der Triple-Kultur nach Stimulation mit Dimethoat 100 μM (hellgraue Balken), 500 μM (graue Balken) und 1.000 μM (schwarze Balken) A,D: Veränderungen in Relation zur Kontrolle des jeweiligen Proteins B: unbehandelt C: 100 μM Dimethoat E: 500 μM Dimethoat F: 1.000 μM Dimethoat 94
- Abbildung 46: Apoptose-Array der Triple-Kultur nach Stimulation mit Chlorpyrifos A,D: Veränderungen in Relation zur Kontrolle des jeweiligen Proteins B: unbehandelt C: 100 μM Chlorpyrifos E: 500 μM Chlorpyrifos F: 1.000 μM Chlorpyrifos. Hellgraue Balken = 100 μM Chlorpyrifos; graue Balken = 500 μM Chlorpyrifos; schwarze Balken = 1.000 μM Chlorpyrifos. 95

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Chemische und physikalische Eigenschaften von Dimethoat.....	30
Tabelle 2: Chemische und Physikalische Eigenschaften von Chlorpyrifos.....	30
Tabelle 3: Chemische und Physikalische Eigenschaften von L-Ascorbinsäure (Vitamin C).....	32
Tabelle 4: Absorptions- und Emissionsmaxima der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe	47
Tabelle 5: Verwendete Fluorochrome für die Immunfluoreszenz	49
Tabelle 6: Ansätze für den Bioplex (Biorad-Kit).....	50
Tabelle 7: Ansätze für den Bioplex (RnD Kit)	51
Tabelle 8: Einbettung der Filter für die Paraffin-Schnitte	52
Tabelle 9: Färbeprotokoll von der HE-Färbung im Automat (erst linke Spalten der Tabelle dann rechte Spalte der Tabelle).....	53
Tabelle 10: Übersicht der verwendeten CD-Marker und deren Funktion für die Durchflusszytometrie Analyse.	59
Tabelle 11: Ergebnisse der FACS Analyse mit verschiedenen Oberflächenzellmarkern. 0-15% negativ (-), 16-50% positiv (+), 51-80% positiv (++), >80% positiv (+++) n≥3.....	60
Tabelle 12: Verwendete Zellmarker für die Durchflusszytometrie zur Charakterisierung von Makrophagen.....	64
Tabelle 13: Durchflusszytometrie Analyse der differenzierten Makrophagen aus primären Monozyten (n=3).	65
Tabelle 14: Durchflusszytometrie zur Untersuchung der Schädigung an DCs durch Organophosphate.0-15% negativ (-), 16-50% positiv (+), 51-80% positiv (++), >80% positiv (+++) n≥3.....	76
Tabelle 15: Annexin V-FITC Kit Untersuchung nach Stimulation mit Dimethoat bei τDCs (n=3).....	78
Tabelle 16: Annexin V-FITC Kit Untersuchung nach Stimulation mit Chlorpyrifos bei τDCs (n=3).....	78
Tabelle 17: Proteinkonzentrationsbestimmung für den Apoptose Array.....	86
Tabelle 18: Ansätze der Proteine für die Apoptose Arrays (KK = Ko-Kultur; TK = Triple-Kultur).....	87

QUELLENANGABE

- Abdallah, F. B., B. Gargouri, H. Bejaoui, S. Lassoued & L. Ammar-Keskes (2011) Dimethoate-induced oxidative stress in human erythrocytes and the protective effect of vitamins C and E in vitro. *Environ Toxicol*, 26, 287-91.
- Albert, M. L., S. F. Pearce, L. M. Francisco, B. Sauter, P. Roy, R. L. Silverstein & N. Bhardwaj (1998) Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*, 188, 1359-68.
- Altieri, D. C. (2003) Survivin and apoptosis control. *Adv Cancer Res*, 88, 31-52.
- Ambali, S., D. Akanbi, N. Igbokwe, M. Shittu, M. Kawu & J. Ayo (2007) Evaluation of subchronic chlorpyrifos poisoning on hematological and serum biochemical changes in mice and protective effect of vitamin C. *J Toxicol Sci*, 32, 111-20.
- Ambali, S. F. & J. O. Ayo (2012) Vitamin C Attenuates Chronic Chlorpyrifos-induced Alteration of Neurobehavioral Parameters in Wistar Rats. *Toxicol Int*, 19, 144-52.
- Appleton, B. A., P. Wu, J. Maloney, J. Yin, W. C. Liang, S. Stawicki, K. Mortara, K. K. Bowman, J. M. Elliott, W. Desmarais, J. F. Bazan, A. Bagri, M. Tessier-Lavigne, A. W. Koch, Y. Wu, R. J. Watts & C. Wiesmann (2007) Structural studies of neuropilin/antibody complexes provide insights into semaphorin and VEGF binding. *EMBO J*, 26, 4902-12.
- Azghani, A. O., E. J. Miller & B. T. Peterson (2000) Virulence factors from *Pseudomonas aeruginosa* increase lung epithelial permeability. *Lung*, 178, 261-9.
- Banchereau, J. & A. K. Palucka (2005) Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol*, 5, 296-306.
- Banchereau, J. & R. M. Steinman (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392, 245-52.
- Barnes, P. J. (2008) Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol*, 8, 183-92.
- Beeh, K. M., O. Kornmann, J. Beier, M. Ksoll & R. Buhl (2004) Clinical application of a simple questionnaire for the differentiation of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*, 98, 591-7.
- Beeler, T. J., I. Jona & A. Martonosi (1979) The effect of ionomycin on calcium fluxes in sarcoplasmic reticulum vesicles and liposomes. *J Biol Chem*, 254, 6229-31.

- Berges, C., C. Naujokat, S. Tinapp, H. Wieczorek, A. Hoh, M. Sadeghi, G. Opelz & V. Daniel (2005) A cell line model for the differentiation of human dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 333, 896-907.
- Blakley, B. R., M. J. Yole, P. Brousseau, H. Boermans & M. Fournier (1999) Effect of chlorpyrifos on immune function in rats. *Vet Hum Toxicol*, 41, 140-4.
- Boucher, R. C. (2004) Relationship of airway epithelial ion transport to chronic bronchitis. *Proc Am Thorac Soc*, 1, 66-70.
- Buhl, R., D. Berdel, C. P. Criege, A. Gillissen, P. Kardos, C. Kroegel, W. Leupold, H. Lindemann, H. Magnussen, D. Nowak, D. Pfeiffer-Kascha, K. Rabe, M. Rolke, G. Schultze-Werninghaus, H. Sitter, D. Ukena, C. Vogelmeier, T. Welte, R. Wettengel & H. Worth (2006) [Guidelines for diagnosis and treatment of asthma patients]. *Pneumologie*, 60, 139-77.
- Calverley, P. M. & P. Walker (2003) Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*, 362, 1053-61.
- Caparros, E., P. Munoz, E. Sierra-Filardi, D. Serrano-Gomez, A. Puig-Kroger, J. L. Rodriguez-Fernandez, M. Mellado, J. Sancho, M. Zubiaur & A. L. Corbi (2006) DC-SIGN ligation on dendritic cells results in ERK and PI3K activation and modulates cytokine production. *Blood*, 107, 3950-8.
- Chatterjee, S. & H. Riaz (2013) Death by insecticide. *BMJ*, 346, f2029.
- Clarke, S. W. & D. Pavia (1980) Lung mucus production and mucociliary clearance: methods of assessment. *Br J Clin Pharmacol*, 9, 537-46.
- Dauer, M., B. Obermaier, J. Herten, C. Haerle, K. Pohl, S. Rothenfusser, M. Schnurr, S. Endres & A. Eigler (2003) Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *J Immunol*, 170, 4069-76.
- Dauer, M., K. Schad, J. Herten, J. Junkmann, C. Bauer, R. Kiefl, S. Endres & A. Eigler (2005) FastDC derived from human monocytes within 48 h effectively prime tumor antigen-specific cytotoxic T cells. *J Immunol Methods*, 302, 145-55.
- Davis, R. J. (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, 103, 239-52.
- de Heer, H. J., H. Hammad, M. Kool & B. N. Lambrecht (2005) Dendritic cell subsets and immune regulation in the lung. *Semin Immunol*, 17, 295-303.

- Diamond, G., D. Legarda & L. K. Ryan (2000) The innate immune response of the respiratory epithelium. *Immunol Rev*, 173, 27-38.
- Eddleston, M., N. A. Buckley, P. Eyer & A. H. Dawson (2008) Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *Lancet*, 371, 597-607.
- Elsinghorst, P. W., F. Worek, H. Thiermann & T. Wille (2013) Drug development for the management of organophosphorus poisoning. *Expert Opin Drug Discov*, 8, 1467-77.
- Gill, M. A. (2012) The role of dendritic cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 129, 889-901.
- Greenwalt, D. E., R. H. Lipsky, C. F. Ockenhouse, H. Ikeda, N. N. Tandon & G. A. Jamieson (1992) Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood*, 80, 1105-15.
- Gregersen, P. K. & T. W. Behrens (2006) Genetics of autoimmune diseases--disorders of immune homeostasis. *Nat Rev Genet*, 7, 917-28.
- Guthridge, M. A., F. C. Stomski, D. Thomas, J. M. Woodcock, C. J. Bagley, M. C. Berndt & A. F. Lopez (1998) Mechanism of activation of the GM-CSF, IL-3, and IL-5 family of receptors. *Stem Cells*, 16, 301-13.
- Hammad, H. & B. N. Lambrecht (2008) Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat Rev Immunol*, 8, 193-204.
- Heinrich, P. C., I. Behrmann, S. Haan, H. M. Hermanns, G. Muller-Newen & F. Schaper (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*, 374, 1-20.
- Hoge, J., I. Yan, N. Janner, V. Schumacher, A. Chalaris, O. M. Steinmetz, D. R. Engel, J. Scheller, S. Rose-John & H. W. Mittrucker (2013) IL-6 controls the innate immune response against *Listeria monocytogenes* via classical IL-6 signaling. *J Immunol*, 190, 703-11.
- Hubo, M., B. Trinschek, F. Kryczanowsky, A. Tuettenberg, K. Steinbrink & H. Jonuleit (2013) Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *Front Immunol*, 4, 82.
- Iwasaki, A. & R. Medzhitov (2010) Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*, 327, 291-5.
- Jonuleit, H., U. Kuhn, G. Muller, K. Steinbrink, L. Paragnik, E. Schmitt, J. Knop & A. H. Enk (1997) Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce

- maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol*, 27, 3135-42.
- Knowles, M. R. & R. C. Boucher (2002) Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest*, 109, 571-7.
- Komuro, K., M. Tada, E. Tamoto, A. Kawakami, A. Matsunaga, K. Teramoto, G. Shindoh, M. Takada, K. Murakawa, M. Kanai, N. Kobayashi, Y. Fujiwara, N. Nishimura, J. Hamada, A. Ishizu, H. Ikeda, S. Kondo, H. Katoh, T. Moriuchi & T. Yoshiki (2005) Right- and left-sided colorectal cancers display distinct expression profiles and the anatomical stratification allows a high accuracy prediction of lymph node metastasis. *J Surg Res*, 124, 216-24.
- Lambrecht, B. N. & H. Hammad (2009) Lung dendritic cells: targets for therapy in allergic disease. *Handb Exp Pharmacol*, 99-114.
- Lambrecht, B. N. & H. Hammad (2012a) The airway epithelium in asthma. *Nat Med*, 18, 684-92.
- Lambrecht, B. N. & H. Hammad (2012b) Lung dendritic cells in respiratory viral infection and asthma: from protection to immunopathology. *Annu Rev Immunol*, 30, 243-70.
- Laoukili, J., E. Perret, T. Willems, A. Minty, E. Parthoens, O. Houcine, A. Coste, M. Jorissen, F. Marano, D. Caput & F. Tournier (2001) IL-13 alters mucociliary differentiation and ciliary beating of human respiratory epithelial cells. *J Clin Invest*, 108, 1817-24.
- Lechner, J. F., A. Haugen, H. Autrup, I. A. McClendon, B. F. Trump & C. C. Harris (1981) Clonal growth of epithelial cells from normal adult human bronchus. *Cancer Res*, 41, 2294-304.
- Lipscomb, M. F. & B. J. Masten (2002) Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev*, 82, 97-130.
- Liu, C. & T. E. Hermann (1978) Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *J Biol Chem*, 253, 5892-4.
- Mac Gabhann, F. & A. S. Popel (2006) Targeting neuropilin-1 to inhibit VEGF signaling in cancer: Comparison of therapeutic approaches. *PLoS Comput Biol*, 2, e180.
- Mathias, N. R., F. Yamashita & V. H. L. Lee (1996) Respiratory epithelial cell culture models for evaluation of ion and drug transport. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 22, 215-249.

- Matsuzaki, T., H. Hata, H. Ozawa & K. Takata (2009) Immunohistochemical localization of the aquaporins AQP1, AQP3, AQP4, and AQP5 in the mouse respiratory system. *Acta Histochem Cytochem*, 42, 159-69.
- Nakadai, A., Q. Li & T. Kawada (2006) Chlorpyrifos induces apoptosis in human monocyte cell line U937. *Toxicology*, 224, 202-9.
- Niessen, C. M. (2007) Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol*, 127, 2525-32.
- Ogasawara, N., T. Kojima, M. Go, J. Fuchimoto, R. Kamekura, J. Koizumi, T. Ohkuni, T. Masaki, M. Murata, S. Tanaka, S. Ichimiya, T. Himi & N. Sawada (2009) Induction of JAM-A during differentiation of human THP-1 dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 389, 543-9.
- Olbrich, H., M. Schmidts, C. Werner, A. Onoufriadis, N. T. Loges, J. Raidt, N. F. Banki, A. Shoemark, T. Burgoyne, S. Al Turki, M. E. Hurles, G. Kohler, J. Schroeder, G. Nurnberg, P. Nurnberg, E. M. Chung, R. Reinhardt, J. K. Marthin, K. G. Nielsen, H. M. Mitchison & H. Omran (2012) Recessive HYDIN mutations cause primary ciliary dyskinesia without randomization of left-right body asymmetry. *Am J Hum Genet*, 91, 672-84.
- Orrenius, S., P. Nicotera & B. Zhivotovsky (2011) Cell death mechanisms and their implications in toxicology. *Toxicol Sci*, 119, 3-19.
- Ozkan, F., S. G. Gunduz, M. Berkoz, A. O. Hunt & S. Yalin (2012) The protective role of ascorbic acid (vitamin C) against chlorpyrifos-induced oxidative stress in *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiol Biochem*, 38, 635-43.
- Pauwels, R. A. & K. F. Rabe (2004) Burden and clinical features of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Lancet*, 364, 613-20.
- Pohl, C., M. I. Hermanns, C. Uboldi, M. Bock, S. Fuchs, J. Dei-Anang, E. Mayer, K. Kehe, W. Kummer & C. J. Kirkpatrick (2009) Barrier functions and paracellular integrity in human cell culture models of the proximal respiratory unit. *Eur J Pharm Biopharm*, 72, 339-49.
- Pohl, C., H. Hofmann, M. Moisch, M. Papritz, M. Iris Hermanns, J. Dei-Anang, E. Mayer, K. Kehe & C. J. Kirkpatrick (2010) Acute cytotoxicity and apoptotic effects after I-Pam exposure in different cocultures of the proximal and distal respiratory system. *J Biotechnol*, 148, 31-7.
- Prickett, T. C., J. L. McKenzie & D. N. Hart (1988) Characterization of interstitial dendritic cells in human liver. *Transplantation*, 46, 754-61.

- Pulendran, B., H. Tang & S. Manicassamy (2010) Programming dendritic cells to induce T(H)2 and tolerogenic responses. *Nat Immunol*, 11, 647-55.
- Rackley, C. R. & B. R. Stripp (2012) Building and maintaining the epithelium of the lung. *J Clin Invest*, 122, 2724-30.
- Rivera, J. A. & M. Rivera (1990) Organophosphate poisoning. *Bol Asoc Med P R*, 82, 419-22.
- Roberts, J. R. & C. J. Karr (2012) Pesticide exposure in children. *Pediatrics*, 130, e1765-88.
- Roberts, T. R. H. H., D.H. (Hrsg.). 1999. *Metabolic pathways of agrochemicals Part 2*: . Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Rossig, L., J. Hoffmann, B. Hugel, Z. Mallat, A. Haase, J. M. Freyssinet, A. Tedgui, A. Aicher, A. M. Zeiher & S. Dimmeler (2001) Vitamin C inhibits endothelial cell apoptosis in congestive heart failure. *Circulation*, 104, 2182-7.
- Rothen-Rutishauser, B. M., S. G. Kiama & P. Gehr (2005) A three-dimensional cellular model of the human respiratory tract to study the interaction with particles. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 32, 281-9.
- Sachana, M., J. Flaskos, E. Sidiropoulou, C. A. Yavari & A. J. Hargreaves (2008) Inhibition of extension outgrowth in differentiating rat C6 glioma cells by chlorpyrifos and chlorpyrifos oxon: effects on microtubule proteins. *Toxicol In Vitro*, 22, 1387-91.
- Saraiva, M. & A. O'Garra (2010) The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol*, 10, 170-81.
- Sato, K., K. Kobayashi, S. Aida & S. Tamai (2004) Bronchiolar expression of aquaporin-3 (AQP3) in rat lung and its dynamics in pulmonary oedema. *Pflugers Arch*, 449, 106-14.
- Sauna, Z. E. & S. V. Ambudkar (2007) About a switch: how P-glycoprotein (ABCB1) harnesses the energy of ATP binding and hydrolysis to do mechanical work. *Mol Cancer Ther*, 6, 13-23.
- Schlage, W. K., H. Bulles, D. Friedrichs, M. Kuhn & A. Teredesai (1998) Cytokeratin expression patterns in the rat respiratory tract as markers of epithelial differentiation in inhalation toxicology. I. Determination of normal cytokeratin expression patterns in nose, larynx, trachea, and lung. *Toxicol Pathol*, 26, 324-43.

- Schneeberger, E. E. & R. D. Lynch (1984) Tight junctions. Their structure, composition, and function. *Circ Res*, 55, 723-33.
- Schon-Hegrad, M. A., J. Oliver, P. G. McMenamin & P. G. Holt (1991) Studies on the density, distribution, and surface phenotype of intraepithelial class II major histocompatibility complex antigen (Ia)-bearing dendritic cells (DC) in the conducting airways. *J Exp Med*, 173, 1345-56.
- Schwarz, Y. X., M. Yang, D. Qin, J. Wu, W. D. Jarvis, S. Grant, G. F. Burton, A. K. Szakal & J. G. Tew (1999) Follicular dendritic cells protect malignant B cells from apoptosis induced by anti-Fas and antineoplastic agents. *J Immunol*, 163, 6442-7.
- Sertl, K., T. Takemura, E. Tschachler, V. J. Ferrans, M. A. Kaliner & E. M. Shevach (1986) Dendritic cells with antigen-presenting capability reside in airway epithelium, lung parenchyma, and visceral pleura. *J Exp Med*, 163, 436-51.
- Sheth, P., N. Delos Santos, A. Seth, N. F. LaRusso & R. K. Rao (2007) Lipopolysaccharide disrupts tight junctions in cholangiocyte monolayers by a c-Src-, TLR4-, and LBP-dependent mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 293, G308-18.
- Steinman, R. M. & Z. A. Cohn (1973) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*, 137, 1142-62.
- Telang, P. S. (2013) Vitamin C in dermatology. *Indian Dermatol Online J*, 4, 143-6.
- Thrasher, J. D., R. Madison & A. Broughton (1993) Immunologic abnormalities in humans exposed to chlorpyrifos: preliminary observations. *Arch Environ Health*, 48, 89-93.
- Travis, S. M., P. K. Singh & M. J. Welsh (2001) Antimicrobial peptides and proteins in the innate defense of the airway surface. *Curr Opin Immunol*, 13, 89-95.
- Tsai, J. R., C. C. Sheu, M. H. Cheng, J. Y. Hung, C. S. Wang, I. W. Chong, M. S. Huang & J. J. Hwang (2007) Organophosphate poisoning: 10 years of experience in southern Taiwan. *Kaohsiung J Med Sci*, 23, 112-9.
- Unfried, K., U. Sydlik, K. Bierhals, A. Weissenberg & J. Abel (2008) Carbon nanoparticle-induced lung epithelial cell proliferation is mediated by receptor-dependent Akt activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 294, L358-67.
- Vaziri, N. D., M. A. Robinson, C. Barton & R. Ness (1978) Control of bleeding from cannulation sites with topical thrombin in dialyzed patients. *J Dial*, 2, 393-8.

- Vermaelen, K. & R. Pauwels (2005) Pulmonary dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med*, 172, 530-51.
- Vuyyuri, S. B., J. Rinkinen, E. Worden, H. Shim, S. Lee & K. R. Davis (2013) Ascorbic Acid and a cytostatic inhibitor of glycolysis synergistically induce apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *PLoS One*, 8, e67081.
- Wang, P., F. Zhu & K. Konstantopoulos (2010) Prostaglandin E2 induces interleukin-6 expression in human chondrocytes via cAMP/protein kinase A- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent NF-kappaB activation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 298, C1445-56.
- Wohlsen, A., C. Martin, E. Vollmer, D. Branscheid, H. Magnussen, W. M. Becker, U. Lepp & S. Uhlig (2003) The early allergic response in small airways of human precision-cut lung slices. *Eur Respir J*, 21, 1024-32.
- Worek, F., P. Eyer & H. Thiermann (2012) Determination of acetylcholinesterase activity by the Ellman assay: a versatile tool for in vitro research on medical countermeasures against organophosphate poisoning. *Drug Test Anal*, 4, 282-91.
- Xia, Z., M. Dickens, J. Raingeaud, R. J. Davis & M. E. Greenberg (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*, 270, 1326-31.
- Yasukawa, H., M. Ohishi, H. Mori, M. Murakami, T. Chinen, D. Aki, T. Hanada, K. Takeda, S. Akira, M. Hoshijima, T. Hirano, K. R. Chien & A. Yoshimura (2003) IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nat Immunol*, 4, 551-6.
- Yeates, D. B., N. Aspin, H. Levison, M. T. Jones & A. C. Bryan (1975) Mucociliary tracheal transport rates in man. *J Appl Physiol*, 39, 487-95.
- Young, J. W. & R. M. Steinman (1990) Dendritic cells stimulate primary human cytolytic lymphocyte responses in the absence of CD4+ helper T cells. *J Exp Med*, 171, 1315-32.
- Zhang, L., L. Jiang, Q. Sun, T. Peng, K. Lou, N. Liu & J. Leng (2007) Prostaglandin E2 enhances mitogen-activated protein kinase/Erk pathway in human cholangiocarcinoma cells: involvement of EP1 receptor, calcium and EGF receptors signaling. *Mol Cell Biochem*, 305, 19-26.
- Zhou, L. J., R. Schwarting, H. M. Smith & T. F. Tedder (1992) A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells,

and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily. *J Immunol*, 149, 735-42.

Zhou, L. J. & T. F. Tedder (1996) CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 2588-92.