

Die Interaktion zwischen pulmonalem Surfactant und inhalierbaren Partikeln

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Carsten Schleh

geboren am 23.02.1978 in Baden-Baden

- 2009 -

Referent: Prof. Dr. Anaclet Ngezahayo
Koreferent: PD Dr. Dr. Veit J. Erpenbeck
Tag der Promotion: 17.07.2009

Zusammenfassung

Das pulmonale Surfactant bedeckt die Alveolen der Lunge wo es die Oberflächenspannung reduziert und so einen Alveolenkollaps verhindert. Des Weiteren sind spezifische Surfactant Proteine (SP), wie beispielsweise SP-D, wichtige Bestandteile des angeborenen Immunsystems. Werden Feinstaubpartikel inhaliert, können sie die Alveolen erreichen und dort direkt auf das pulmonale Surfactant treffen. In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Konsequenzen einer Interaktion zwischen Surfactant und Feinstaubpartikeln untersucht.

Hierbei wurde zunächst der Einfluss von SP-D auf die Aufnahme von Allergenpartikeln in Lungenepithelzellen sowie in Zellen eines Triple-Zellkultur-Modells, bestehend aus Epithelzellen, Makrophagen und Dendritischen Zellen, mittels Durchflusszytometrie und konfokaler Mikroskopie nachgewiesen. Die Ausschüttung inflammatorischer Mediatoren wurde mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay sowie mittels Bead-basierender Multiplex-Messungen untersucht.

Weiterhin wurde analysiert, ob Titandioxid (TiO₂)-Nanopartikel die biophysikalische Funktion des Surfactants beeinflussen. Die Oberflächenspannung des Surfactants wurde hierzu direkt nach Partikelzugabe und nach *surface area cycling* im Pulsierenden-Blasen-Surfactometer gemessen. Zusätzlich wurde mittels Transmissionselektronenmikroskopie der Einfluss auf die Surfactant-Ultrastruktur visualisiert.

Inkubation mit SP-D erhöhte den Anteil *ex vivo*-gewonnener humaner Epithelzellen, welche an der Bindung und Aufnahme der Allergenpartikel beteiligt waren. Dies führte zu einer erhöhten Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-8. Die Anzahl der Allergenpartikel je einzelne Zelle blieb dabei konstant. Im Triple-Zellkultur-Modell sorgte SP-D für eine erhöhte Anzahl an Makrophagen und Epithelzellen, welche an der Aufnahme der Allergenpartikel beteiligt waren. Zusätzlich wurde tendenziell die Anzahl der Allergenpartikel je Makrophage und Dendritische Zelle reduziert. SP-D führte hierbei zu einer reduzierten Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-8.

TiO₂-Nanopartikel induzierten eine Surfactant-Dysfunktion. Diese Dysfunktion wurde durch *surface area cycling* verstärkt. Zusätzlich führten TiO₂-Nanopartikel zu ultrastrukturellen Veränderungen des Surfactants. Lammelarkörperchen wurden deformiert aufgefunden. Unilamellare Vesikel wurden vermehrt gebildet.

Die gezeigten Interaktionen von Feinstaubpartikeln und Surfactantkomponenten könnten daher eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie pulmonaler Erkrankungen spielen.

Abstract

Pulmonary surfactant covers the alveoli and reduces surface tension at the air liquid interface, thus maintaining lung function and preventing alveolar collapse. Furthermore, specific surfactant proteins (SP) like SP-D are part of the innate immune system. After inhalation of various particles, they can reach the alveoli where they come into direct contact with the surfactant layer. In the present work the consequences upon interaction between surfactant and single particles are described.

The influence of SP-D on allergen particle uptake by primary epithelial cells in a monoculture as well as epithelial cells, macrophages, and dendritic cells within a triple cell culture model, was investigated by flow cytometry and confocal microscopy. The secretion of inflammatory mediators was measured by Enzyme Linked Immunosorbent Assay as well as Multiplex Assay.

In addition, titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles were incubated with a natural surfactant preparation. Surface tension was measured with a pulsating bubble surfactometer following particle addition and surface tension was evaluated after *surface area cycling*. The effects of TiO₂ nanoparticles on surfactant ultrastructure were visualized by a transmission electron microscope.

Incubation with SP-D led to an increase in the percentage of primary human epithelial cells which participated in particle attachment and increased secretion of the proinflammatory cytokine interleukin-8 by these cells. The number of allergen particles per cell stayed constant. In the triple cell culture model, SP-D led to an increased percentage of macrophages and epithelial cells, which participated in particle uptake. Interestingly, SP-D treatment also resulted in a trend towards decreased particle uptake per individual macrophage and dendritic cell. In addition, SP-D led to decreased secretion of interleukin-8.

Addition of TiO₂ nanoparticles to surfactant induced a biophysical surfactant dysfunction. This dysfunction was more pronounced after *surface area cycling*. In addition, ultrastructural changes of surfactant were visualized. Lamellar bodies were deformed and unilamellar vesicles were produced.

The observed interactions of various particles and surfactant components could therefore play an important role in the pathophysiology of airway disease.

Schlagworte: Pulmonales Surfactant, Nanopartikel, Allergenpartikel

Key Words: Pulmonary Surfactant, Nanoparticle, Allergen Particle

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Zielsetzung dieser Arbeit	2
2	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	4
2.1	Feinstaub	4
2.1.1	Nanopartikel	6
2.1.2	Allergenpartikel	9
2.2	Allergisches Asthma bronchiale	12
2.2.1	Allergenpartikelaufnahme durch Dendritische Zellen	12
2.2.2	Sensibilisierung	13
2.2.3	Effektorphase	13
2.3	Lungensurfactant	14
2.3.1	Interaktionen zwischen Surfactant und Partikeln	16
3	MATERIAL UND METHODEN	21
3.1	Zellkulturen	21
3.1.1	A549	22
3.1.2	Normale Humane Bronchiale Epithelzellen (NHBE)	23
3.1.3	Humane Primäre Bronchiale Epithelzellen (HPBEC)	24
3.1.4	Isolation von Monozyten aus humanem Blut	26
3.1.5	Generierung eines Triple-Zellkultur-Modells	30
3.1.6	Langzeitkonservierung von Zellen	33
3.1.7	Das Auftauen langzeitkonservierter Zellen	34
3.2	Verwendete Partikel sowie Surfactant Proteine	34
3.2.1	Isolation der Subpollen-Partikel (SPP)	35
3.2.2	Fluoreszenzmarkierung der Subpollen-Partikel	36
3.2.3	Industriell synthetisierte Partikel	37
3.2.4	Surfactant Proteine	38
3.3	Messung der Partikelaufnahme mittels Durchflusszytometrie	38
3.4	Untersuchungen mittels konfokaler Mikroskopie	40
3.4.1	Aufnahme von SPP in Epithelzell-Monokulturen	41
3.4.2	Aufnahme von SPP in Zellen eines Triple-Zellkultur-Modells	42
3.4.3	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	43

3.4.4	Bead-basierende Messung von Zytokinen	44
3.4.5	Messung der biophysikalischen Surfactantfunktion	44
3.4.6	Surface area cycling	46
3.5	Transmissionselektronenmikroskopie	47
3.5.1	Elektronenmikroskopie der Surfactant-Ultrastruktur	47
3.5.2	Repräsentative Bilder der Partikel	48
3.6	Statistische Auswertungen	48
4	ERGEBNISSE	49
4.1	Einfluss von Surfactant Protein D auf die Allergenpartikelaufnahme in Epithelzell-Monokulturen	49
4.1.1	Normale Humane Bronchiale Epithelzellen	50
4.1.2	Humane Primäre Bronchiale Epithelzellen	59
4.1.3	A549-Zellen	61
4.2	Vergleich der Epithelzell-Monokulturen	65
4.3	Einfluss von Surfactant Protein D auf die Allergenpartikelaufnahme in Zellen eines Triple-Zellkultur-Modells	66
4.3.1	Messung verschiedener Zytokine	70
4.4	Interaktionen zwischen Nanopartikeln und Surfactant	73
4.4.1	Repräsentative Bilder der Partikel	74
4.4.2	Einfluss von Partikeln auf die Surfactant-Funktion	76
4.4.3	Einfluss von Partikeln während <i>surface area cycling</i>	78
4.4.4	Effekte von Partikeln auf die Surfactant-Ultrastruktur	80
5	DISKUSSION	82
5.1	Der Einfluss von SP-D auf die Allergenpartikel-Aufnahme in Zellen der Lunge	82
5.2	Die Interaktion von TiO ₂ -Nanopartikeln mit pulmonalem Surfactant	92
5.3	Schlussfolgerung	96
5.4	Ausblick	97
6	ANHANG	99
A1.	LITERATURVERZEICHNIS	99
A2.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	114
A3.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	117
A4.	TABELLENVERZEICHNIS	119
A5.	VERÖFFENTLICHUNGEN	120

A6.	DANKSAGUNG	123
A7.	LEBENS LAUF	125

1 Einleitung

"Durch die Feinstaubbelastung der Luft verkürzt sich die durchschnittliche Lebenserwartung in der Europäischen Union um 8,6 und in Deutschland sogar um 10,2 Monate." (Presseerklärung der Weltgesundheitsorganisation vom 14. April 2005)

Da Feinstaub ein Risiko für unsere Gesundheit darstellt, werden Anstrengungen unternommen, die Feinstaubbelastung in unserer Umwelt möglichst gering zu halten. Deshalb sind in Europa Grenzwerte definiert, nach denen seit Anfang 2005 eine tägliche Konzentration von $50 \mu\text{g Feinstaub} / \text{m}^3$ Luft unterschritten werden soll. Dieser Grenzwert darf an nicht mehr als 35 Tagen überschritten werden.

Die Realität sieht jedoch anders aus. In Stuttgart wurde beispielsweise im Jahre 2006 der Grenzwert an 135 Tagen überschritten. In München konnte 96-mal eine Überschreitung gemessen werden. In Hannover wurde im Jahre 2006 54-mal eine Überschreitung detektiert. Im Maximum konnten Feinstaubkonzentrationen von etwa $200 \mu\text{g} / \text{m}^3$ Luft gemessen werden.

Laut eines Berichts der Weltgesundheitsorganisation steigt das Risiko, an einer Atemwegserkrankung zu sterben, pro $10 \mu\text{g} / \text{m}^3$ Feinstaub in der Umgebungsluft um 1,3 Prozent. Das Risiko, an einer Erkrankung des Herz-Kreislauf-Systems zu sterben, steigt hierbei um 0,9 Prozent. Bezogen auf die gemessene Höchstkonzentration von $200 \mu\text{g} / \text{m}^3$ bedeutet dies einen Anstieg der Todesrisiken um 26 % (Atemwegserkrankung) beziehungsweise 18 % (Herz-Kreislauf-Erkrankung).

Die Haupt-Eingangspforte für Feinstaubpartikel in unseren Körper stellen die Atemwege dar. Nach der Inhalation können diese Partikel die Alveolen erreichen, wo sie eine maximale Deposition aufweisen (1). Sie können nun direkt mit den Lungenstrukturen interagieren oder in den Blutkreislauf gelangen, von wo sie weitere Organe wie Leber oder Niere erreichen können (2). Auch ein Übertritt ins Gehirn konnte bereits detektiert werden (3).

Obwohl angenommen wird, dass Faktoren wie beispielsweise oxidativer Stress eine wichtige Komponente in der Beziehung zwischen Feinstaub und Atemwegserkrankungen darstellen (4), sind die genauen und vollständigen Zusammenhänge zwischen Feinstaub und Atemwegserkrankungen noch unbekannt. Um diese Zusammenhänge zu verstehen, ist deshalb eine verstärkte Forschung, welche die direkten Interaktionen der Feinstaubpartikel mit den Lungenstrukturen in den Fokus stellt, notwendig. Nur wenn detailliert bekannt ist, mit welchen Lungenstrukturen ein Partikel nach Inhalation interagiert

und welche Konsequenzen diese Interaktionen für den menschlichen Körper haben, können bessere Maßnahmen ergriffen werden, um den Menschen vor Feinstaub zu schützen.

1.1 Zielsetzung dieser Arbeit

Direkt nach ihrer Inhalation können Feinstaubpartikel die terminalen Atemwege, welche vollständig von einer dünnen Schicht des pulmonalen Surfactants bedeckt werden, erreichen (1;5). Surfactant stellt somit den initialen Kontakt des Körpers mit inhalierten Partikeln dar. Zusätzlich ist bekannt, dass verschiedene Komponenten des Surfactants mit inhalierten Partikeln interagieren können (6). Die genauen Auswirkungen dieser Interaktionen sind jedoch bisher nicht vollständig geklärt. Sie könnten das weitere Verhalten der Partikel bestimmen und gesundheitschädigende Effekte der Partikel modulieren.

In dieser Arbeit werden deshalb Feinstaub-Partikel mit Surfactant sowie einzelnen Komponenten des Surfactants inkubiert und die Relevanz einer eventuellen Interaktion untersucht. Hierbei wird nicht mit einem Feinstaub-Gemisch, sondern mit speziellen Feinstaub-Partikeln, gearbeitet. So soll eine spezifische Aussage getroffen werden, welche Partikeleigenschaften für einen eventuellen Effekt verantwortlich sind. Zum einen sind dies industriell synthetisierte Titandioxid (TiO_2)-Nanopartikel, welche in nanotechnologischen Prozessen hergestellt werden. Zusätzlich wird mit natürlichen pflanzlichen Allergenpartikeln gearbeitet.

Zwei Ansatzpunkte werden in dieser Arbeit untersucht:

1) Der Einfluss von Surfactant Protein D auf die Aufnahme von Allergenpartikeln in Lungenzellen

Surfactant Protein D (SP-D) ist ein Bestandteil des Surfactants und spielt hauptsächlich in der angeborenen Immunabwehr eine Rolle (6). In der hier vorliegenden Arbeit wird der Einfluss von SP-D auf die Aufnahme von Allergenpartikeln in humane primäre Epithelzellen der Lunge, kultiviert in einer Monokultur, sowie auf die Aufnahme in Zellen eines Triple-Zellkultur-Modells, bestehend aus Epithelzellen (EC), Makrophagen (MO) und Dendritischen Zellen (DC), untersucht. Weiterhin wird die Konsequenz einer eventuellen Modulation der Aufnahme durch Messung verschiedener Entzündungsmediatoren untersucht.

2) Der Einfluss von Titandioxid-Nanopartikeln auf die biophysikalische Surfactant-Funktion

Surfactant reduziert die Oberflächenspannung an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht in den Alveolen und verhindert so einen Alveolenkollaps (5). Um den Einfluss von Nanopartikeln auf die biophysikalische Funktion des Surfactants zu untersuchen, werden TiO_2 -Nanopartikel mit einer natürlichen Surfactant-Präparation inkubiert und unmittelbar im Anschluss die biophysikalische Funktion des Surfactants gemessen. Zusätzlich wird der Effekt der Anwesenheit von Titandioxid-Nanopartikeln während *surface area cycling* auf die biophysikalische Surfactant-Funktion spezifiziert. Der Einfluss auf die Ultrastruktur des Surfactants wird visualisiert. Um abschätzen zu können, welche Partikeleigenschaften für auftretende Effekte verantwortlich sind, wird in bestimmten Experimenten mit mikroskaligen und nanoskaligen Vergleichs-Partikeln gearbeitet.

Durch die Untersuchung des Einflusses von Feinstaub-Partikeln auf die biophysikalische Funktion des Surfactants und durch die Untersuchung des Einflusses eines spezifischen Surfactant Proteins auf die Feinstaub-Partikel sowie die Reaktionen der Zielzellen, erfolgt eine Abschätzung, ob die Interaktion von Surfactant mit Feinstaubpartikeln eine Auswirkung auf den pathophysiologischen Zustand in der Lunge haben kann.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Feinstaub

In unserer Atemluft befinden sich Millionen von verschiedenen Partikeln, welche zu jeder Zeit und an jedem Ort mit unserem Körper in Kontakt kommen. Dieses Gemisch aus festen und flüssigen Partikeln wird Schwebstaub genannt. Schwebstaub wird nach Größe unterteilt. Hierbei werden nach allgemeingültigen Definitionen Partikel eines Durchmessers von mehr als 10 μm (Grobstaub) und Partikel eines Durchmessers von kleiner als 10 μm (Feinstaub - auf Englisch Particulate Matter₁₀ (PM₁₀)) unterschieden. Zur genaueren Klassifikation werden weitere PM₁₀-Subgruppen definiert: PM_{2.5} (Partikel eines Durchmessers < 2,5 μm) und PM_{0.1} (Partikel eines Durchmessers < 0,1 μm). PM_{0.1} werden auch ultrafeine Partikel oder Nanopartikel (NP) genannt. Die Unterteilung von Schwebstaub in verschiedene Größenfraktionen ist sinnvoll. Zum einen befinden sich Partikel eines Durchmessers von über 10 μm meist nur kurz in der Luft, da sie nur sehr kurz (wenige Stunden bis Sekunden) in der Schwebe gehalten werden können. Partikel, welche kleiner als 10 μm sind, schweben hingegen mehrere Tage oder gar Wochen. Die Wahrscheinlichkeit ist dementsprechend größer, dass ein Feinstaub-Partikel - im Gegensatz zu einem Grobstaub-Partikel - eingeatmet wird. Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen Grobstaub und Feinstaub ist die Lungengängigkeit der Partikel. Nachdem ein Grobstaub-Partikel eingeatmet wurde, lagert es sich hauptsächlich in den oberen Atemwegen ab. Feinstaub-Partikel hingegen können bis in die Alveolen vordringen (Abbildung 1).

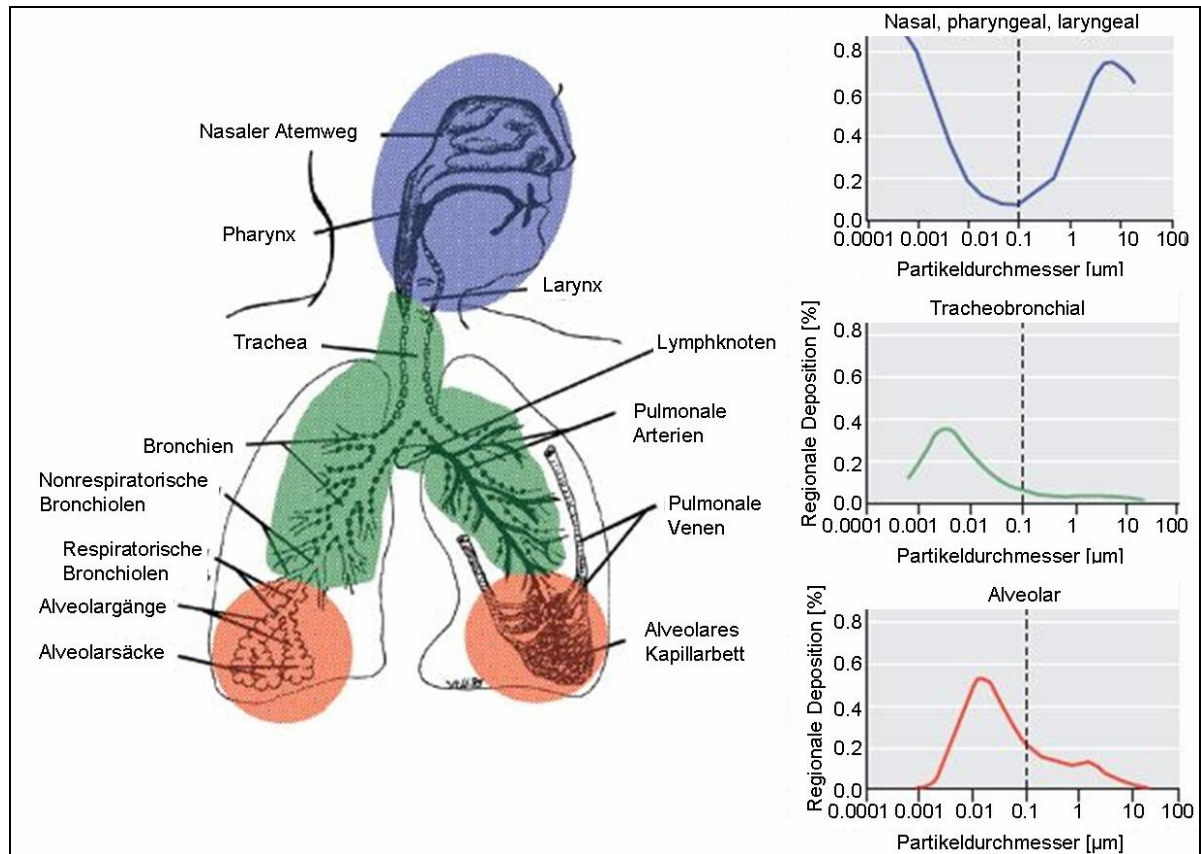


Abbildung 1: Lungengängigkeiten inhalierbarer Partikel (nach Oberdorster *et al.*, 2005).

Auf der rechten Seite der Abbildung sind die Größen-abhängigen Partikel-Depositions-Raten in den verschiedenen Lungenkompartimenten, welche den farbigen Bereichen auf der linken Seite entsprechen, zu erkennen.

Die tägliche Exposition mit Feinstaub ist im Hinblick auf die menschliche Gesundheit, insbesondere in luftverschmutzten Gebieten, besorgniserregend. Dies liegt daran, dass Feinstaub mit verschiedenen Atemwegserkrankungen wie Asthma, Chronisch Obstruktiver Lungenerkrankung oder Mukoviszidose sowie mit einer erhöhten Mortalität assoziiert wird (7-12). Diese gesundheitlichen Auswirkungen von Feinstaub werden in den letzten Jahren auch verstärkt in der Bevölkerung diskutiert. Eine starke Berichterstattung elektronischer Medien sowie Printmedien hat zu einer Sensibilisierung der Bürger gegenüber dem Thema Feinstaub geführt. Ein Beispiel hierfür ist die Ausgabe 14/2005 des Magazins DER SPIEGEL (Abbildung 2).

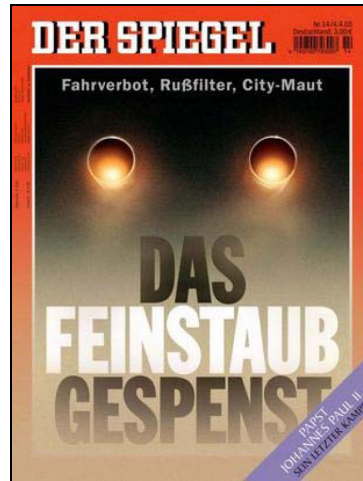


Abbildung 2: Titelblatt des „Spiegel“ 14/2005

Die Quellen für Feinstaub sind äußerst vielfältig. Da Feinstaubpartikel unter anderem durch natürliche Prozesse wie Feuer, Vulkanausbrüche oder Pollenflüge gebildet werden, existieren sie seit Jahrhunderten auf unserer Erde. Jüngere Quellen für Feinstaub sind anthropogene Quellen. Beispiele hierfür sind Auto- und Industrieabgase.

Die genaue Komposition und Konzentration von Feinstaub in unserer unmittelbaren Umgebung hängt von verschiedenen Faktoren ab. So ist es beispielsweise entscheidend, an welchem Ort wir uns befinden (Land, Stadtrand, Hauptverkehrsstraße, Industriegebiet, geschlossene Räume). Aber auch die Tageszeit und besondere temporäre Ereignisse spielen eine gewichtige Rolle. So war beispielsweise in Hannover zum Jahreswechsel 2008 / 2009 ein Anstieg von 70 μg auf etwa 125 μg Feinstaubpartikel pro m^3 Luft zu messen, wie die Hannoversche Allgemeine Zeitung am 02.01.2009 vermeldete.

Da der Begriff Feinstaub ein hochkomplexes Gemisch aus verschiedenen Partikeln definiert, sind nicht alle Partikel in gleichem Maße gesundheitsschädlich.

Im Folgenden werden exemplarisch zwei Partikel-Gruppen beschrieben. Detailliert wird auf die Ursprünge, die Eigenschaften sowie die besonderen Risiken, welche von diesen Partikeln ausgehen, eingegangen.

2.1.1 Nanopartikel

Nanopartikel (NP) existieren schon seit Jahrhunderten in unserer Atmosphäre und werden von verschiedenen Quellen freigesetzt. Natürliche Ursprünge sind beispielsweise Waldbrände, Vulkanausbrüche oder auch Staubverwehungen. Vom Menschen gesteuerte

Prozesse sorgen zusätzlich für die Produktion von NP. Beispiele hierfür sind Schweissarbeiten (13), Kochen (14), Rauchen (15) oder Autoabgase (16;17). So haben Pirjola und Kollegen in einer Studie gezeigt, dass ein großer Anteil der Partikel, welche an einer Straße gemessen werden, kleiner als 50 nm sind (18).

Neben Prozessen, bei denen NP als Abfallprodukte auftreten, gibt es auch Nanopartikel, die gezielt industriell produziert werden. Die Herstellung dieser NP beinhaltet einen Teilbereich eines neuen Industriezweiges - der Nanotechnologie.

Als Nanotechnologie werden verschiedene Technologiebereiche definiert. Diese Bereiche haben gemeinsam, dass sie Partikel eines Durchmessers von unter 100 nm in physikalisch und chemisch definierten Eigenschaften produzieren oder verarbeiten. Im Vergleich mit mikroskaligem Material kommen so neue oder erweiterte physikalische, biologische oder chemische Eigenschaften zum Vorschein. Dies kann durch zwei Sachverhalte erklärt werden:

- 1) Nanopartikel haben, eine sehr viel größere Partikel-Oberfläche pro Masseneinheit als Mikropartikel. Diese große Oberfläche sorgt unter bestimmten Voraussetzungen für eine hohe Reaktivität.
- 2) Im Gegensatz zu Mikropartikeln bestimmen nicht nur physikalische, sondern auch quantenmechanische Gesetze die Eigenschaften von Nanopartikeln.

Mit Hilfe der Nanotechnologie sollen völlig neue Entwicklungen sowie eine Verbesserung bestehender Anwendungen in Bereichen der Elektronik, des Maschinenbaus, der Informationstechnologie und der biomedizinischen Diagnostik entstehen (19). Viele Produkte mit nanotechnologischem Einfluss haben schon seit einigen Jahren Einzug in industrielle Verarbeitungen und unser alltägliches Leben gefunden. So werden beispielsweise Titandioxid-Nanopartikel oder Zinkoxid-Nanopartikel in Sonnencremes eingesetzt, wo sie dem UV-Schutz dienen. Silber-Nanopartikel in Textilien wirken antimikrobiell. Auf Grund dieser antimikrobiellen Wirkung werden Silber-NP sogar in Waschmaschinen (z.B.: Silver Nano Health System[®], Samsung) eingesetzt. Diese Entwicklung wird von Ökotoxikologen kritisch begleitet, da Silber-Nanopartikel, die von Waschmaschinen freigesetzt werden und in das Abwasser gelangen, sich in Kläranlagen anreichern könnten. Dies könnte zum Absterben der für den Klärprozess essentiellen Bakterien führen. In der pharmazeutischen Industrie werden TiO₂-Nanopartikel als Farbpigmente eingesetzt. Kohlenstoff-Nanopartikel werden aufgrund ihrer Leitfähigkeit als Bestandteile von Kunststoffen eingesetzt. Es gibt Bestrebungen, Medikamente in nanoskalige bioabbaubare Lipid-Nanopartikel zu verpacken,

um sie so besser inhalativ verabreichen zu können (20). Mit Hilfe von wasserlöslichen nanogroßen Polymeren (Polyglykolsäure, Dextran, Polyethylenglykol) können Medikamente in bisher unerreichbare Körperregionen, wie beispielsweise das Gehirn, gelangen (21;22). Mittels Hyperthermie sollen Krebszellen spezifisch durch magnetische Nanopartikel zerstört werden (23). Auf diesem Gebiet wurden bereits präklinische Studien erfolgreich durchgeführt. Klinische Studien sind im Gange.

Neben den neuen, viel versprechenden Möglichkeiten, welche sich durch die Nanotechnologie ergeben, werden allerdings auch neue Gefahren für die menschliche Gesundheit geschaffen. Während des Produktionsprozesses, des Transports oder der Anwendung der Partikel können sie in die Umwelt entlassen werden. Da industriell synthetisierte Nanopartikel oftmals völlig neue Partikel mit bisher unbekanntem Eigenschaften darstellen, können noch keine oder nur äußerst grobe Abschätzungen über ihr toxisches Potential gemacht werden. So besteht die Gefahr, dass Nanopartikel in Tonnen ihren Weg in die verarbeitende Industrie finden, bevor ihr riskantes Potential erkannt wird. Es wird teilweise befürchtet, dass sich Nanopartikel als das "neue Asbest" herausstellen könnten. Asbest wurde bis zum Jahre 1979 in verschiedenen Industriebereichen eingesetzt. Erst nach jahrelangem Gebrauch wurden die gesundheitsschädlichen Wirkungen des Asbests (Asbestose, Lungenkrebs) erkannt, was zu einem schrittweise eingeführten Verbot von Asbest geführt hat. Seit dem Jahre 2005 existiert ein EU-weites Verbot. Im Falle von Kohlenstoff-Nanoröhren, einem der vielversprechendsten und oft genutzten Nanomaterialien, gibt es inzwischen erste Anzeichen, dass sie toxikologisch ähnlich wie Asbest wirken können (24).

NP kommen in der Umwelt normalerweise nicht als einzelne nanogroße Partikel vor, sondern treten als Aggregate auf. Da die Deposition in der Lunge von der Größe des inhalierten Partikels abhängt (Abbildung 1), kann sie durch Aggregation der Partikel verändert werden. Auch die Aufnahme von Partikeln in verschiedene Zellen ist von der Größe der Partikel abhängig (25). Eine Aggregation kann deshalb auch Clearance-Mechanismen in der Lunge beeinflussen. Ein Aggregat vieler Nanopartikel verhält sich jedoch nicht wie ein einzelner Mikropartikel, welcher der Größe des Aggregats entspricht. NP-Aggregate beinhalten die Toxizität der einzelnen nanogroßen Partikel (26). Die Autoren erklären dies mit der großen Oberfläche der nanogroßen Partikel, welche in einem Aggregat erhalten bleibt (im Vergleich zu einem einzelnen Partikel mit gleicher Größe). Da Partikel über ihre Oberfläche mit der direkten Umwelt interagieren können, kann diese große Oberfläche eines Partikel-Aggregats zu höheren toxischen Auswirkungen führen.

2.1.2 Allergenpartikel

In disponierten Individuen kann ein Kontakt mit Allergenen zu einer Sensibilisierung und darauf folgend zu einer chronischen Entzündung in verschiedenen Organen wie den Atemwegen oder der Haut führen. Diese ist typischerweise durch die Produktion von allergenspezifischem Immunglobulin E (IgE) gekennzeichnet. Allergene, welche von mindestens 50 % der sensibilisierten Patienten erkannt werden, werden Majorallergene genannt. Allergene, welche nicht für die große Masse der Allergiker, jedoch für einzelne Individuen relevant sind, werden Minorallergene genannt.

Eine Vielzahl der Allergene sind Proteine oder Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 5 bis 60 kD (27) und weisen biochemische Aktivitäten auf. Durch diese können sie zelluläre und nicht-zelluläre Bestandteile der Lunge modulieren (28). Beispiele hierfür sind hydrolytische Enzyme wie Proteasen, Carbohydrasen oder Ribonucleasen. Weiterhin kommen inhibitorische Aktivitäten sowie Homologien zu Transport- und Regulatorproteinen vor.

Einzelne Allergene (beispielsweise *Lol p 1*) werden durch die ersten drei Buchstaben ihres Genus (beispielsweise *Lolium*) sowie einem oder zwei Buchstaben ihrer Species (beispielsweise *perenne*) beschrieben. Darauf folgt eine Ziffer, welche entweder die Reihenfolge, in der das Allergen isoliert wurde, die klinische Relevanz des Allergens oder beides definiert.

Im Falle einer Sequenz-Gleichheit kann bei Allergenen von verschiedenen Spezies oder bei phylogenetisch verwandten Genera die gleiche Ziffer benutzt werden. Diese Allergene werden in Gruppen angeordnet. Beispiele hierfür sind die Milben-Allergene *Der p 1* von *Dermatophagoides pteronyssinus* und *Der f 1* von *Dermatophagoides farinae*. Beide Allergene sind Mitglieder der Gruppe 1 der Milben-Allergene.

In unserer Umwelt kommen normalerweise keine einzelnen Allergene vor. Meist sind sie Bestandteile einer Mischung von verschiedenen (Glyko)Proteinen inmitten eines partikulären Trägers. Je nach Beschaffenheit dieses Allergenpartikels kann es in luftgetragener Form vorkommen und wird deshalb auch Aeroallergen genannt.

Lufgetragene Allergenpartikel entstammen beispielsweise Pflanzen, Pilzen, Insekten oder Säugetieren. Die Größe dieser Partikel variiert von wenigen hundert Nanometern bis hin zu über 50 µm.

2.1.2.1 Allergenpartikel von Pflanzen

Die größte Gruppe pflanzlicher Allergenpartikel sind Pollen. Die genaue qualitative und quantitative Zusammensetzung pflanzlicher Allergenpartikel in unserer Umgebungsluft wird hauptsächlich durch den genauen Aufenthaltsort sowie die aktuelle Jahreszeit bestimmt. Die häufigsten pflanzlichen Quellen von Pollen sind Gräser, Bäume und Zierpflanzen. Pollen haben eine Größe von etwa 15-40 µm. Sie können deshalb nach Inhalation nicht die tieferen Atemwege erreichen und lagern sich in der nasalen und pharyngealen Region ab, wo sie mit nicht-zellulären und zellulären Komponenten interagieren können (29;30). Neben Pollen kommen auch kleine, allergen-beladene Partikel in unserer Umwelt vor. Diese haben eine ungefähre Größe zwischen 0,5 µm und 2,5 µm und werden Pollen-Stärke-Granula oder Subpollen-Partikel (SPP) genannt. SPP werden von ganzen Pollen z.B. nach Kontakt mit Wasser oder hoher Luftfeuchtigkeit freigesetzt (31-33). Diese Freisetzung wird mit einer Verstärkung von Asthma-Symptomen während Gewittern assoziiert (33). Aufgrund ihrer Größe können SPP die bronchialen und alveolaren Regionen der Lunge erreichen, wo sie mit ihrer Umgebung interagieren. Zusätzlich zu Pollen und SPP können auch kleine Pflanzenbruchstücke oder nicht-pflanzliche Feinstaubpartikel, welche mit pflanzlichen Allergenen beladen sind, nach ihrer Inhalation als pflanzliche Allergenpartikel wirken (34).

Einzelne Allergene, die assoziiert in einem pflanzlichen Allergenpartikel zu finden sind, werden in verschiedene Gruppen aufgeteilt. Beispiele für klinisch wichtige Allergene sind die Allergene der Gruppen 1 (beispielsweise *Lol p 1*) und 5 (beispielsweise *Lol p 5*). Gräser-Allergene der Gruppe 1 haben ein Molekulargewicht von ca. 30 kD und weisen eine biochemische Aktivität eines Beta-Expansins auf. Allergene der Gruppe 5 haben ein Molekulargewicht von ca. 29-31 kD und weisen eine biochemische Funktion von Ribonukleasen auf.

2.1.2.2 Allergenpartikel von Pilzen

Sporen von Pilzen sind weit verbreitete Allergenpartikel und wurden sogar auf der Raumstation Mir, welche die Erde 1986 bis 2001 umkreiste, gefunden (35). Sie weisen große Unterschiede bezüglich ihrer Größe auf und deponieren deshalb nach Inhalation sowohl in den oberen als auch in den unteren Atemwegen (36). Die Retention und Deposition von Pilzsporen eines aerodynamischen Durchmessers von 3,1 µm wurde von Geiser und Kollegen nach Inhalation durch Goldhamster untersucht. Der Großteil dieser Sporen wurde in den Alveolen gefunden. Allerdings wurde in dieser Studie die

nasopharyngeale Region über eine intratracheale Kanüle überbrückt. In dieser Region lagern sich normalerweise sehr viele Partikel ab (37).

Zusätzlich zu Pilzsporen können auch Fragmente von Pilzen, welche von der intrazellulären oder extrazellulären Struktur stammen, als Allergenpartikel auftreten (38).

Klinisch relevante Allergene, welche auf Pilzpartikeln gefunden werden, sind beispielsweise *Alt a 1* (von *Alternaria alternata*) mit einem Molekulargewicht von 14 kD und bisher unbekannter biochemischen Funktion sowie *Pen ch 13* (von *Penicillium chrysogenum*), eine Serinprotease mit einem Molekulargewicht von 34 kD.

2.1.2.3 Allergenpartikel von Milben und Kakerlaken

Die wichtigsten von Milben und Kakerlaken freigesetzte Allergenpartikel bestehen aus ihrem Kot (39;40).

Sehr viele Allergene von Milben und Kakerlaken spielen eine Rolle in deren Verdauungsprozessen. Beispiele hierfür sind die Allergene *Der p 1*, *Der f 1*, und *Eur m 1* (von *Euroglyphus maynei*) der Gruppe 1, welches Cysteinproteasen sind, oder Allergene der Gruppe 3 (beispielweise *Der p 3*), welches Trypsine sind.

2.1.2.4 Allergenpartikel von Säugetieren

Die meisten Allergenpartikel von Säugetieren bestehen aus Teilen von Hautschuppen, Urin, Speichel, Haaren oder Federn. Dies ist abhängig von der jeweiligen Spezies. Die klinisch relevanten Tierarten in Bezug auf Allergenpartikel sind Katzen und Hunde, wohingegen andere Spezies (z.B. Hase, Maus und Ratte) nur geringfügig für Allergenpartikel verantwortlich sind (41). Mit Ausnahme der Katzen-Allergene gehören die Majorallergene der Säugetiere zu der Lipocalin-Familie (42). Diese spielt eine maßgebliche Rolle bei Bindung und Transport von kleinen hydrophoben Molekülen. Beispiele für Allergene der Lipocalin-Familie sind *Equ c 1* (von *Equus caballus*), *Bos d 2* (von *Bos domesticus*), *Can f 1* (von *Canis familiaris*), *Mus m 1* (von *Mus musculus*) und *Rat n 1* (von *Rattus norvegicus*).

2.2 Allergisches Asthma bronchiale

Asthma bronchiale ist eine chronische entzündliche Reaktion der Atemwege. Ein typisches Symptom kann eine zeitweise Verengung der Atemwege und daraus resultierend akute Luftnot sein. Da bisher noch keine Möglichkeit existiert, Asthma bronchiale zu heilen, ist es erforderlich, die einzelnen Phasen und Zusammenhänge dieser Krankheit zu verstehen. Nur so kann zukünftig ein Heilmittel entwickelt werden.

2.2.1 Allergenpartikelaufnahme durch Dendritische Zellen

Im Verlauf einer allergischen Entzündung spielen die Dendritischen Zellen (DC) eine essentielle Rolle. Sie können verschiedene Allergenpartikel aufnehmen, verarbeiten und spezielle Peptide auf ihrer Oberfläche präsentieren. Dies sind wichtige und initiale Schritte bei der Entwicklung von Asthma bronchiale.

DC der intrapulmonalen Atemwege sitzen in einem unreifen Zustand direkt unter der epithelialen Basalmembran (43). Um in Kontakt mit Allergenpartikeln zu kommen, müssen sie deshalb die epitheliale Barriere der Tight Junctions überwinden. Dass DC hierzu prinzipiell in der Lage sind, konnte schon für intestinale DC ausführlich gezeigt werden. Diese senden Fortsätze durch die Tight Junctions hindurch (44;45). Die Integrität der epithelialen Barriere wird hierdurch nicht beeinträchtigt. Dieses schnorchelartige Verhalten wurde auch für Lungen-DC beschrieben (46). Zusätzlich konnte dieses Phänomen auch in einem *in vitro*-System, bestehend aus Epithelzellen (EC), Makrophagen (MO) und DC, gezeigt werden (47). In diesem *in vitro*-System migrierten die DC auch als komplette Zellen auf die luminale Seite.

Die Aufnahme von Allergenen wird durch bestimmte Eigenschaften der Allergene erleichtert. Die Protease-Aktivität vieler Allergene schneidet Tight Junction-Proteine (48;49) und erleichtert somit das Sammeln von Antigenen durch die DC. Bei Patienten mit allergischer Rhinitis konnte so beispielsweise gezeigt werden, dass DC auf die luminale Seite des Epithels migrieren können. Voraussetzung war hierfür eine Schädigung der epithelialen Barriere (50). Diese Migration wurde auch in einem *in vitro*-Modell aufgezeigt (47). Zusätzlich beschrieben die Autoren, dass MO Polystyren-Partikel phagozytierten und anschließend Fortsätze in Richtung der DC ausbildeten. Eventuell haben die Makrophagen eine Interaktion mit DC gesucht, um anschließend Antigene zu übergeben, was eine weitere Möglichkeit der Antigen-Aufnahme durch DC darstellen würde.

2.2.2 Sensibilisierung

Als Sensibilisierung wird ein Vorgang bezeichnet, bei dem ein Organismus nach Erstkontakt zu einem harmlosen Antigen eine spezifische Immunantwort aufbaut.

Nach Aufnahme von Antigenen reifen die DC aus und wandern zu den lokalen Lymphknoten, wo sie die aufgenommenen und prozessierten Antigene auf ihrer Oberfläche den T-Zellen präsentieren. Hierdurch werden die für dieses Allergen spezifischen T-Zellen aktiviert und proliferieren. Nach Proliferation der Antigen-spezifischen T-Zellen wandern diese Zellen in die Lunge ein. Im Falle von Allergen-spezifischen Reaktionen sind dies hauptsächlich T-Helfer-Zellen vom Typ 2 (Th2-Zellen). Aktivierte Th2-Zellen produzieren eine Vielzahl von Mediatoren wie beispielsweise die Zytokine Interleukin (IL)-4, IL-5 und IL-13. Eine entscheidende Rolle spielt hierbei das IL-4. Durch die Freisetzung von IL-4 kommt es bei Antikörper-produzierenden B-Lymphocyten zu einem sogenannten „Isotypen-Switch“ in Richtung Immunglobulin E (IgE). Dieses Allergen-spezifische IgE bindet daraufhin an den Fc ϵ -Rezeptor auf Mastzellen. Fc-Rezeptoren sind Membranrezeptoren für verschiedene Immunglobulin-Isotypen. Die Bindung von IgE an den Fc ϵ -Rezeptor stellt den letzten Schritt der Sensibilisierung eines Individuums dar.

2.2.3 Effektorphase

In sensibilisierten Individuen führt ein erneuter Allergenkontakt durch Bindung und Kreuzvernetzung von IgE zu einer Aktivierung und Degranulierung der Mastzellen. Daraufhin werden verschiedene Mediatoren wie Histamin und Heparin freigesetzt, welche für verschiedene klinische Symptome verantwortlich sind. Beispiele hierfür sind Ödeme der bronchialen Mukosa oder eine Konstriktion der Atemwegsmuskulatur. Weiterhin kommt es zu einer verstärkten Produktion von Mukus und einer massiven Einwanderung von Entzündungszellen in die Lunge (51). Einige Stunden nach dem erfolgten Zweitkontakt mit dem Allergen kommt es zu einer Einwanderung von eosinophilen Granulozyten in die Lunge. Diese wird durch Chemokine, wie beispielsweise Eotaxin, gesteuert (52). Eosinophile Granulozyten degranulieren und schütten verschiedene Mediatoren wie das eosinophile kationische Protein oder eosinophile Peroxidase aus, welche wiederum auf die Mastzellen einwirken. Dies führt zu einer verstärkten Ausschüttung von Histamin. Eine Degranulation der eosinophilen Granulozyten hat eine Schädigung des umliegenden Gewebes zur Folge (53).

2.3 Lungensurfactant

Nachdem Partikel in der Lunge deponiert wurden, können sie mit ihrer Umgebung interagieren. Meist kommt der erste Kontakt deponierter Partikel mit dem epithelialen Flüssigkeitsfilm der Lunge zustande, welcher in den peripheren Atemwegen, den respiratorischen Bronchien und in den Alveolen hauptsächlich aus einer wässrigen Hypophase, die mit einer dünnen Schicht von pulmonalem Surfactant (Surface Active Agent) bedeckt ist, besteht. Surfactant ist somit die erste Barriere in der Lunge, mit der inhalierte Partikel in Kontakt kommen. Die Interaktion mit Surfactant ist entscheidend für das weitere Schicksal des Partikels. Das pulmonale Surfactant besteht hauptsächlich aus Phospholipiden (~ 90 %) und den vier spezifischen Surfactant Proteinen (SP)-A, -B, -C und -D. SP-B (~ 8 kD) und SP-C (~ 4 kD) stellen kleine hydrophobe Proteine dar. Die Hauptfunktion dieser zwei Proteine ist es, gemeinsam mit den Phospholipiden die Oberflächenspannung während der Atmung zu reduzieren. Hierdurch wird ein Kollaps der Alveolen verhindert. SP-A (~ 28-36 kD) und SP-D (~ 43 kD) stellen im Vergleich mit SP-B und SP-C relativ große, hydrophile Proteine dar. SP-A befindet sich teilweise, SP-D befindet sich komplett in der wässrigen Hypophase. Beide Proteine gehören zur Familie der Kollektine (Kollagen-enthaltende Lektine) und sind hauptsächlich ein Bestandteil der angeborenen Immunabwehr. SP-A und SP-D, werden aus Monomeren gebildet (Abbildung 3). Diese bestehen aus vier Regionen:

1. Cystein-reiche Region an der Seite des N-Terminus
2. Kollagen-ähnliche Domäne
3. Alpha-helikale Hals-Region
4. Kohlenhydrat Erkennungs-Domäne (carbohydrate-recognition domain, CRD).

SP-A und SP-D können über die CRD Calcium-abhängig an verschiedene Pathogene, wie Bakterien und Viren binden (54-56), wodurch die körpereigene Immunabwehr moduliert wird.

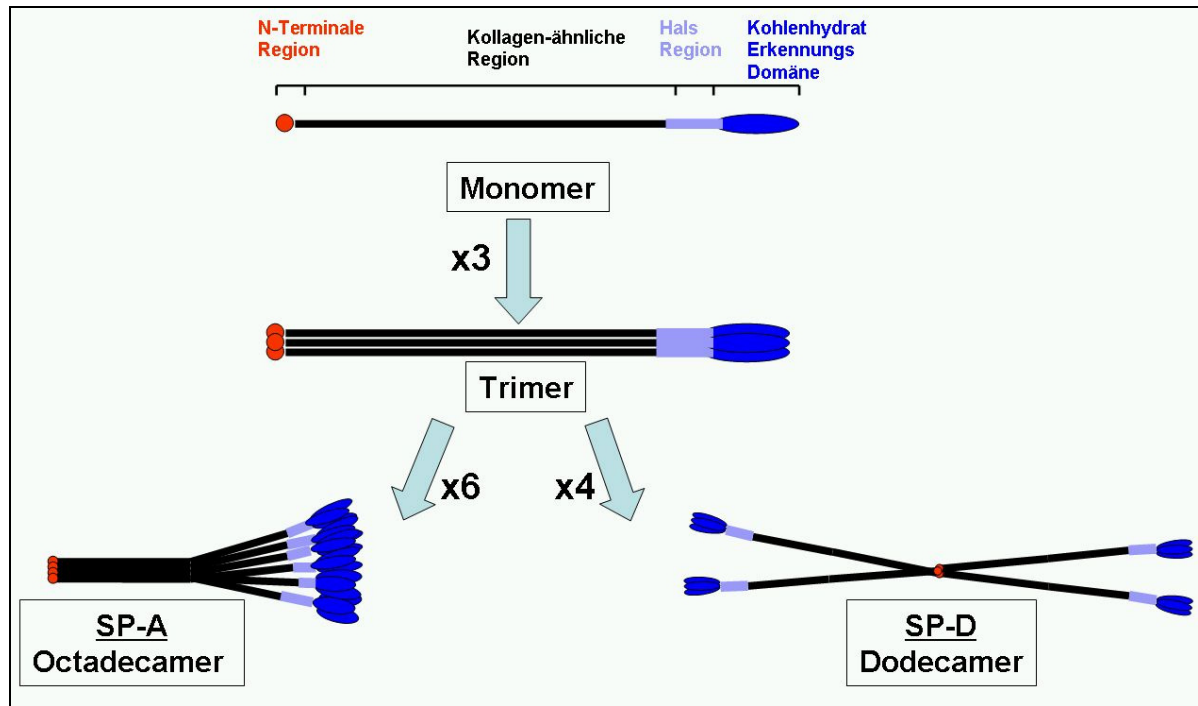


Abbildung 3: Quartärstruktur der Surfactant Proteine A und D

Die Quartärstruktur von SP-A ist ein Octadecamer, welches ein typisches Blumenstrauß-Muster darstellt. Die Quartärstruktur von SP-D hingegen ist ein Dodecamer, welches die Form eines Kreuzes hat. Die Trimere können sich weiterhin zu sehr großen SP-D-Multimeren (> 1 MDa) zusammenlagern (57).

Die einzelnen Schritte des Surfactant-Metabolismus sind in Abbildung 4 zu erkennen. Phospholipide werden in Form von Lamellarkörperchen in Typ II-Pneumozyten durch den Golgi Apparat sowie das Endoplasmatische Reticulum gebildet. Die Lamellarkörperchen verlassen daraufhin die Typ II-Pneumozyten und gelangen in die wässrige Phase des alveolären Lumens. Dort gehen sie in einem nahtlosen Übergang in tubuläres Myelin über. Aus dem tubulären Myelin werden anschließend Phospholipide rekrutiert, die an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht einen oberflächenaktiven Film bilden. Während des Ausatmens wird die Oberfläche an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht in den Alveolen minimiert und Phospholipide werden aus der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht herausgedrückt. In der wässrigen Phase bilden sie nun unilamellare Vesikel, die in den Alveolarmakrophagen katabolisiert sowie in den Typ II-Pneumozyten ebenfalls katabolisiert oder auch wiederverwendet werden (58). Mittels Ultrazentrifugation können die verschiedenen Surfactant-Subfraktionen voneinander getrennt werden. Die oberflächenaktiven Lamellarkörperchen sowie das oberflächenaktive tubuläre Myelin werden pelletiert, wohingegen die inaktiven unilamellaren Vesikel im Überstand verbleiben. Deshalb werden die Lamellarkörperchen und das tubuläre Myelin zusammen als große Aggregate (large

aggregates, LA) und die unilamellaren Vesikel als kleine Aggregate (small Aggregates, SA) bezeichnet.

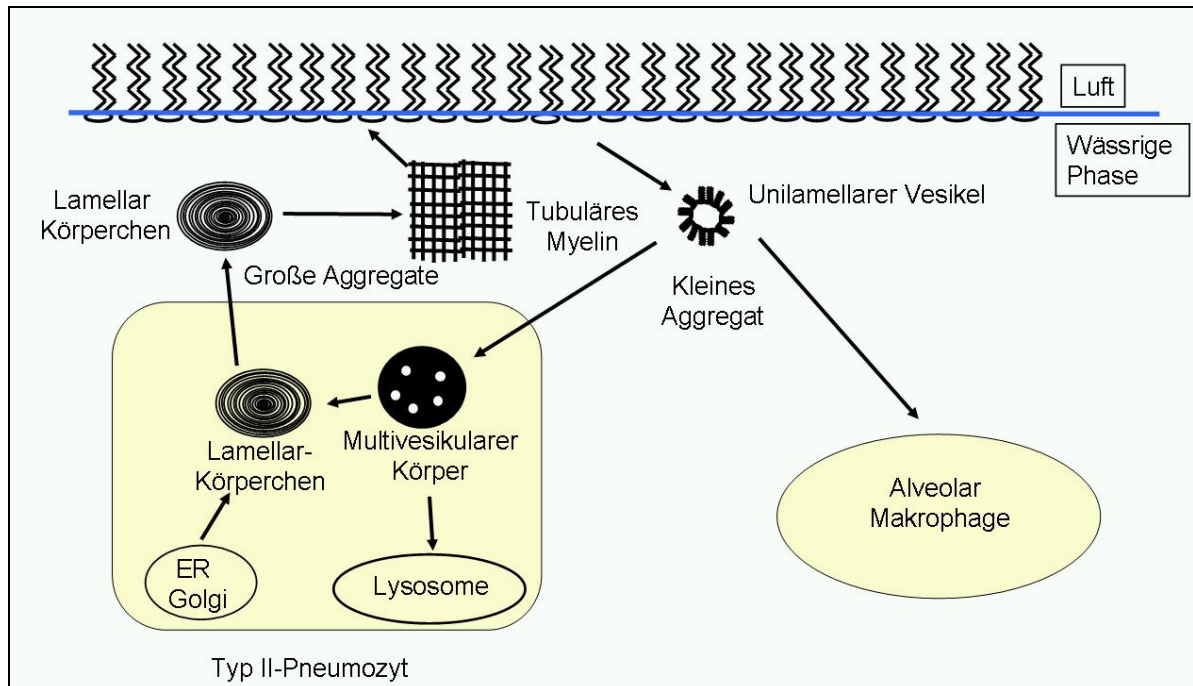


Abbildung 4: Surfactant-Metabolismus (nach Ikegami, 2005)

2.3.1 Interaktionen zwischen Surfactant und Partikeln

Nach der Inhalation erreichen Partikel, abhängig von ihrer Größe, die tieferen Atemwege (Abbildung 1) und kommen dort mit Surfactant in Kontakt. Die genaue Menge der deponierten Partikel ist neben der Größe auch von der elektrischen Ladung der Partikel abhängig. In einer Studie von 1998 wurde gezeigt, dass die Deponierung von elektrisch geladenen 500 nm großen Partikel größer ist, als die von ungeladenen Partikeln der gleichen Größe (59). Eine Erklärung für dieses Phänomen ist, dass elektrisch geladene Partikel mit dem elektrischen Feld, welches von Surfactant ausgeht, interagieren (60). Ob dieses Phänomen auch für größere Mikropartikel oder kleinere Nanopartikel relevant ist, ist noch unbekannt. Nach Deponierung auf dem Surfactant-Film werden Partikel in die wässrige Hypophase weitergeleitet. Das Ausmaß dieser Translokation hängt von der Oberflächenspannung des Surfactants ab (61-63). Eine Translokation von Partikeln in die Hypophase führt zu einem direkten Kontakt mit Makrophagen, was zu einer Erhöhung der Aufnahme durch diese Zellen führen könnte. Allerdings werden Partikel durch die Translokation in die Hypophase auch mit Epithelzellen und Dendritischen Zellen in Kontakt gebracht.

2.3.1.1 Interaktionen zwischen Surfactant und Allergenpartikeln

Direkte Interaktionen von Komponenten des Surfactants mit Allergenpartikeln wurden beispielsweise zwischen SP-A, SP-D und einem Extrakt, welcher aus Milben (*Dermatophagoides pteronyssinus*) hergestellt wurde, gezeigt. Diese Bindung war Kohlenhydrat-spezifisch und abhängig von Calcium, was die Annahme zulässt, dass die Proteine über ihre CRD auf dem Allergen befindliche Kohlenhydrate gebunden haben (64). Auch die Bindung von SP-A an ganze Pollen konnte gezeigt werden (65). Zusätzlich ist bekannt, dass SP-D an Subpollen-Partikel von *Phleum pratense* und *Dactylis glomerata* binden kann. Diese Bindung führte zu einer Aggregation der Subpollen-Partikel sowie zu einer erhöhten Phagozytose durch alveoläre Makrophagen (66). Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass SP-D die Clearance von Allergenpartikeln modulieren kann. Weiterhin ist bekannt, dass SP-A und SP-D die Bindung von Aspergillus-Allergenen an allergenspezifisches IgE, isoliert von Aspergillosis-Patienten, verhindern kann (67). SP-D, aber nicht SP-A, reduziert die Freisetzung von Beta-Hexosaminidase aus passiv sensibilisierten Mastzellen nach Stimulation mit Allergen (68). Zusätzlich ist SP-D in der Lage, die Allergen-induzierte NO-Produktion durch Makrophagen zu inhibieren (69).

Neben der Beeinflussung von Allergenpartikeln durch Surfactant-Komponenten können Allergenpartikel das Surfactant auch direkt beeinflussen. Beispielsweise führte die Bindung der Milbenallergene Der p 1 und Der f 1 an SP-D und SP-A zu einer Degradation beider Proteine. Diese Degradation wurde durch eine Cysteinprotease vermittelt und konnte durch die Abwesenheit von Calcium verstärkt werden. (70)

Des Weiteren sind Allergene in der Lage, eine Erhöhung der Oberflächenspannung in der Lunge zu induzieren. Dies konnte ursprünglich mit dem Modell-Allergen Ovalbumin (ova) gezeigt werden (71). Aller Wahrscheinlichkeit nach wurden diese Effekte indirekt durch einen quantitativen Anstieg von Proteinen in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit (BALF) induziert. Diese Ergebnisse konnten auch auf den Menschen übertragen werden (72). In dieser humanen Studie wurde eine Surfactant-Dysfunktion nach Allergen-Provokation in der BALF von Patienten mit mildem allergischem Asthma gefunden. In der BALF der gesunden Kontrollgruppe konnte nach Provokation keine Beeinträchtigung des Surfactants gefunden werden. Neben dieser indirekt ausgelösten Dysfunktion beschreiben Haczku und Kollegen eine weitere Theorie (73). Nach dieser Theorie könnte die Allergen-induzierte Surfactant-Dysfunktion Konsequenz eines Abfalls der SP-B Konzentration sein. Eventuell wurde dieser Abfall durch IL-4 gesteuert.

Schmiedl und Kollegen fanden in ova-sensibilisierten Ratten eine Veränderung in der Ultrastruktur von intra-alveolärem Surfactant (74). In dieser Studie konnte ein signifikanter Anstieg der inaktiven unilamellaren Vesikel verzeichnet werden. Auch eine Veränderung der Phospholipid-Zusammensetzung konnte detektiert werden. So fanden Hite *et al.* eine Depletion von Phosphatidylglycerol in den großen aktiven Surfactant-Aggregaten (75). Diese Depletion wurde für die Asthma-assoziierte Surfactant-Dysfunktion verantwortlich gemacht.

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Interaktionen zwischen Allergenpartikeln und Surfactant existieren noch weitere indirekte Interaktionen. Eine durch inhalierte Allergenpartikel induzierte Atemwegs-Entzündung kann zu einer Veränderung der Surfactant Protein-Konzentrationen in der Lunge führen (76-80). Es wird weiterhin spekuliert, dass Surfactant direkt an der Entwicklung allergischer Reaktionen beteiligt ist. So konnte beispielsweise die Lungenfunktion von Meerschweinchen verbessert werden, sofern sie ein natürliches Surfactant-Präparat vor der Allergen-Instillation bekommen hatten (81). Des Weiteren sind auch SP-D und SP-A in der Lage die Allergen-induzierte Entzündung der Lunge zu vermindern. Dies wurde für die Allergene von *Aspergillus fumigatus* (80;82-85), der Hausstaubmilbe (86-88) sowie das Modell-Allergen Ovalbumin (89;90) gezeigt.

2.3.1.2 Interaktionen zwischen Surfactant und Nanopartikeln

Aufgrund ihres geringen Durchmessers von < 100 nm weisen inhalierte Nanopartikel eine hohe Depositionsrate im alveolären Bereich von bis zu 50 % auf. Durch den daraus resultierenden ersten Kontakt mit der Schicht des pulmonalen Surfactants kann es zu verschiedenen Interaktionen und Konsequenzen kommen. So wurde für verschiedene Nanopartikel schon eine Bindung von Surfactant-Komponenten gezeigt. Beispielsweise können Phospholipide, wie beispielsweise Palmitoyl-oleoyl-phosphatidylglycerol (POPG), an Gold-NP binden. Da diese Bindung etwa einer 4 nm dicken Schicht entspricht, wird davon ausgegangen, dass POPG als Bilayer an die Gold-NP bindet (91-93). Eine Bilayer-Adsorption wurde auch schon an Silika-NP beobachtet (94). Eine Zugabe von SP-B zu der POPG/Gold-NP Mischung führte zu einer Aggregation der NP. Es bildeten sich lange kettenartige Aggregate. Diese kettenartige Struktur konnte nicht durch Zugabe von Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) anstelle des POPG erreicht werden (91). Weitere NP, welche Phospholipide anlagern können, sind Kohlenstoff-NP. Hier konnte primär die Anlagerung von DPPC entdeckt werden (95). Diese DPPC-Anlagerung führte zu einer Aggregation der Kohlenstoff-NP. Kendall und Kollegen konnten zeigen, dass Lungenspülflüssigkeit die Chemie sowie die Anziehungskräfte auf der Oberfläche von PM_{2.5}

verändern kann. Dies führte zu einer erhöhten Aggregation der Partikel (96). Von den Surfactant-Komponenten, welche aus BALF gewonnen wurden, adsorbierte primär DPPC an die Oberfläche der Partikel (97).

Obwohl Phospholipide an NP binden können, werden sie nach einiger Zeit wieder abgebaut. Intra- und extrazelluläre Phospholipasen trennen Phospholipide von der Oberfläche der Partikel ab (98;99). Diese Abtrennung erfolgt nicht homogen. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass Quarz-Partikel schneller als Kaolin (Aluminiumsilikat)-Partikel adsorbierte Phospholipide verlieren. Die Autoren spekulierten, dass unterschiedliche funktionelle Gruppen auf der Oberfläche der Partikel verantwortlich sind (100). Die Phospholipase-Aktivität wies allgemein eine schnelle erste Rate der Abtrennung auf, welche von einer langsameren, von den jeweiligen Partikeln abhängigen, Rate gefolgt wurde. Dies hängt wahrscheinlich mit der Bilayer-Adsorption der Phospholipide am Partikel zusammen. Eine andere Studie, welche mit Quarz- und Kaolin-Partikeln durchgeführt wurde, zeigte nach Aufnahme der Partikel von Makrophagen hingegen eine einheitliche und monoexponentiale Rate der Phospholipid-Abtrennung (101). Die molekularen Interaktionen zwischen DPPC und Quarz sowie Kaolin wurden von Murray und Kollegen untersucht. Sie entdeckten, dass die molekulare Beweglichkeit der Cholin-Region der auf Quarz-adsorbierten DPPC-Molekülen eingeschränkt war. Die Cholin Gruppen der auf Kaolin-adsorbierten DPPC-Moleküle zeigten sich hingegen mobiler (102). Diese unterschiedliche molekulare Orientierung von DPPC, abhängig vom jeweiligen Partikel, könnte für gezeigte Unterschiede in der lysosomalen Aktivität sowie der Abtrennung der adsorbierten Phospholipide verantwortlich sein. Weiterhin wird spekuliert, dass verschiedene, sich auf Partikel befindliche Oberflächengruppen, unterschiedliche Bindungsenergien mit Phospholipiden eingehen (103).

Da Phospholipide oberflächenaktiv sind, könnten sie in der Lage sein, bestehende Partikel-Aggregate aufzubrechen. Diese Theorie konnte jedoch durch eine Berechnung der verschiedenen benötigten Energien widerlegt werden (104).

Neben den oben beschriebenen Phospholipiden können auch Surfactant Proteine an NP binden. So wurde beispielsweise gezeigt, dass SP-D an ultrafeine Kohlenstoff-Partikel bindet. In dieser Studie wurde auch beschrieben, dass die Bindung wahrscheinlich unabhängig von der Oberflächenchemie ist (95). Es wurde weiterhin gezeigt, dass SP-A und SP-D an Kohlenstoff-Nanoröhren binden können (105). Diese Bindung geschah jedoch nicht direkt an das Rohmaterial der Nanoröhren, sondern mit funktionellen Gruppen, welche während der Nanoröhren-Synthese versehentlich produziert wurden. Eine industriell gewollte

Funktionalisierung von Nanoröhren könnte somit auch die Bindung von Surfactant Proteinen induzieren.

Eine Interaktion von Surfactant und NP kann funktionelle Folgen für den Organismus haben. So konnten Störungen in der biophysikalischen Surfactant-Funktion beobachtet werden. In einer Studie von Bakshi *et al.* konnte beispielsweise erkannt werden, dass Gold-Nanopartikel die biophysikalische Surfactant-Funktion eines semisynthetischen Surfactants, bestehend aus DPPC, POPG und SP-B (70:30:1 Gewichtsprozent) inhibieren kann. In den Versuchen dieser Studie inhibierten Gold-Nanopartikel (2 µg/ml) die Adsorption pulmonalen Surfactants an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht. Weiterhin induzierten Gold-NP eine Dysfunktion während der Kompression des Surfactant-Films und inhibierten die Ausweitung des Surfactant-Films während der Oberflächenvergrößerung (91). Der Mechanismus dieser Inhibition wurde nicht näher untersucht. Die Autoren vermuteten, dass die Gold-Nanopartikel mit Phospholipiden ummantelt wurden, dass diese ummantelten NP an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht adsorbierten und somit die freien Phospholipide daran hinderten, selbst an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht zu adsorbieren. Diese These wird durch eine Studie von Ma und Weber unterstützt. Demnach erhöhten Kaolin, Flugasche, Aluminium-Partikel und Zinkoxid-Partikel die Oberflächenspannung von Lungenspülflüssigkeit aus Ratten sowie DPPC. Nach dem Gebrauch der gleichen Massenkonzentrationen induzierten die Partikel den größten Anstieg in der Oberflächenspannung, welche die höchste Oberfläche aufwies (106). Auch hier spekulierten die Autoren wieder, dass eine Adsorption von Phospholipiden an Partikel zu einer Konkurrenz mit freien Phospholipiden um den Platz an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht führt.

3 Material und Methoden

3.1 Zellkulturen

Zellkultur bezeichnet das Kultivieren von Zellen eukaryotischer Lebewesen. Hierbei wird hauptsächlich zwischen der Kultivierung von Zelllinien und der Kultivierung von Primärzellen, welche direkt aus einem lebenden Organismus gewonnen werden, unterschieden. Während Zelllinien immortal sind und deshalb oft über Monate kultiviert werden können, ist die *in vitro*-Lebensdauer primärer Zellen begrenzter. Zellkulturen werden in speziellen, auf den jeweiligen Zelltyp angepassten, Nährmedien kultiviert, welche die nötigen Aminosäuren, Salze und Vitamine für ein optimales Wachstum der Zellen bereitstellen. Für die Zellkulturexperimente in dieser Arbeit wurden die adhärenzte Zelllinie A549, kommerziell erworbene adhärenzte primäre bronchiale Lungenepithelzellen (Normale Primäre Humane Epithelzellen; NHBE) sowie adhärenzte primäre bronchiale Lungenepithelzellen (Humane Primäre Bronchiale Epithelzellen; HPBEC), welche von gesunden Spendern mittels Bronchialbürste gewonnen wurden (Kapitel 3.1.3), genutzt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C unter einer 5 % CO₂-Atmosphäre. Für die Weiterpassage der Zellen wurde zunächst der Zellrasen mit einfach konzentrierter Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS) oder einer mit HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) gepufferten Lösung gewaschen. Zur Ablösung von der Zellkulturplatte wurden die Zellen anschließend mit der Peptidase Trypsin unter Zusatz von Ethylendiamin-tetraacetat (EDTA) inkubiert. Trypsin ist ein Verdauungsenzym des Dünndarms und spaltet Peptidbindungen. EDTA ist ein Chelator und geht Komplexe mit Kationen (beispielsweise Ca²⁺) ein. Da Ca²⁺ die Zellen in der Kultur stabilisiert, wird durch Zugabe von EDTA zu der Trypsinlösung das Ablösen der Zellen beschleunigt. Der Ablös-Vorgang erfolgte stets im Brutschrank bei 37 °C sowie 5% CO₂ und wurde nach 3 - 6 Minuten durch Zugabe des Zellkulturmediums (inklusive fetalem Kälberserum) oder einer speziellen kommerziell erhältlichen Lösung beendet. Verbleibende Reste des Trypsin / EDTA Gemischs in der Zellsuspension wurden nach Zentrifugation (5 min; 300 g) durch Verwerfen des Überstandes und anschließender Zugabe von frischem Zellkulturmedium entfernt. Zellzahlen wurden mit dem CASY 1 Cell Counter (Innovatis, Reutlingen) bestimmt. Hierfür wurden die Zellen, je nach geschätzter Zellzahl, in einem Verhältnis 1:100 oder 1:1.000 in Casyton (Innovatis, Reutlingen) verdünnt. Da der CASY 1 Cell Counter eine Größenverteilung der gemessenen Zellen anzeigt, kann so zusätzlich die

Qualität der Zellen sowie das Vorhandensein einer eventuellen bakteriellen Verunreinigung überprüft werden.

Im Folgenden wird die Kultur der verschiedenen, in dieser Arbeit verwendeten, Zellen beschrieben.

3.1.1 A549

Material

A549	ATCC, Rockville, MD, U.S.A.
RPMI1640	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin / Streptomycin	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
50 ml-Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
25 ml / 10 ml-Einwegpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
T75-Zellkulturflaschen	BD Biosciences, Heidelberg Deutschland
Sterilbank	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Zentrifuge	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Brutschrank	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Wasserbad	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Pipetten	Labsystem, Vantaa, Finnland
Pipettenspitzen	Biozym, Hess. Oldendorf, Germany

Die Zelllinie A549 wurde im Jahr 1972 aus dem Lungenkarzinom eines 58-jährigen männlichen Patienten isoliert (107). Die Zellen weisen viele Merkmale von Typ II-Pneumozyten auf, wachsen adhärent und bilden ein Monolayer mit einer Verdopplungszeit von etwa 30 Stunden. Die konfluenten Zellen wurden zweimal pro Woche passagiert. Hierbei wurden 10 % der konfluenten Zellen in eine neue T75-Zellkulturflasche (Wachstumsfläche 75 cm²) zuzüglich 20 ml Kulturmedium überführt. Für die Kultur dieser Zellen wurde das Medium RPMI1640 (ursprünglich hergestellt am Roswell Park Memorial Institute) verwendet. Das Medium wurde mit der essentiellen Aminosäure L-Glutamin angereichert. Weiterhin wurden 1 % Antibiotika (Penicillin / Streptomycin) zur Vermeidung bakterieller Kontaminationen sowie 5 % fetales Kälberserum (Fetal Calf Serum, FCS) (Tabelle 1) zugesetzt. FCS wird nach der Schlachtung keimarm aus dem Blut von Rinderföten gewonnen. Für Experimente, die in dieser Arbeit beschrieben sind, wurden A549-Zellen der

Passagen 5-80 genutzt. 1 Million Zellen wurden in wells einer 24-well-Platte in 1 ml Medium überführt. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Experimente durchgeführt.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Kulturmediums zur Kultivierung der Zelllinie A549

Kulturmedium für A549-Zellen
RPMI1640
5 % FCS
1 % Penicilin / Streptomycin

3.1.2 Normale Humane Bronchiale Epithelzellen (NHBE)

Material

Normale Humane Bronchiale Epithelzellen	Lonza, Basel, Schweiz
Bronchial Epithelial Basal Medium	Lonza, Basel, Schweiz
Supplementary Single Quots	Lonza, Basel, Schweiz
Trypsin / EDTA	Lonza, Basel, Schweiz
HEPES Waschlösung	Lonza, Basel, Schweiz
Trypsin Neutralizing Solution	Lonza, Basel, Schweiz
50 ml Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
T25-Zellkulturflaschen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
25 ml / 10 ml-Einwegpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Wasserbad	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Zentrifuge	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Brutschrank	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Sterilbank	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Pipetten	Labsystem, Vantaa, Finnland
Pipettenspitzen	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland

Normale Humane Bronchiale Epithelzellen (NHBE) wurden direkt aus humanen nichtrauchenden Spendern gewonnen. Dies ist wichtig, da regelmäßiges Rauchen zu einer krankhaften Veränderung des Lungenepithels führt. Die exakte Vorgehensweise bei der Gewinnung der Zellen fällt unter das Firmengeheimnis von Lonza und ist deshalb nicht bekannt. Die Zellen wurden in einer Kryoampulle auf Trockeneis geliefert (500.000 Zellen befanden sich in 1 ml Einfriermedium). Sie wurden entweder unmittelbar nach Erhalt aufgetaut und kultiviert oder für wenige Wochen in der Gasphase, welche sich über flüssigem Stickstoff befindet, gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in T25-

Zellkulturflaschen (Wachstumsfläche 25 cm²) überführt (3.500 Zellen/cm²). Nach Erreichen von 80 % Konfluenz wurden die Zellen abgelöst und in 24-well-Platten überführt (3.500 Zellen/cm²). Sobald eine vollständige Konfluenz erreicht war, wurden die Experimente durchgeführt.

Als Kulturmedium wurde ein von Lonza geliefertes Basalmedium inklusive verschiedener Zusätze (Single Quots) genutzt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Zusammensetzung des Kulturmediums der NHBE

Kulturmedium für Normale Humane Bronchiale Epithelzellen (NHBE)
Bronchial Epithelial Basal Medium (BEBM)
0,4 % Rinder-Hypophysenextrakt
0,1 % Rekombinantes Humanes Insulin
0,1 % Rekombinanter Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor
0,1 % Gentamicinsulfat / Amphotericin B
0,1 % Transferrin
0,1 % Epinephrin
0,1 % Hydrokortison
0,1 % Retinolsäure
0,1 % Trijodthyronin

3.1.3 Humane Primäre Bronchiale Epithelzellen (HPBEC)

Material

Airway Epithelial Cell Growth Medium	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Supplement Mix	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Penicilin / Streptomycin / Amphotericin B	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
NaCl-Lösung	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Dispase	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Schüttler	Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland
Zentrifuge	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Sterilbank	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
25 ml / 10 ml-Einwegpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
50 ml-Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
6-well-Platte	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Bronchoskop BF-P160	Olympus Optical, Hamburg, Deutschland

5 mm Olympus Cytology Brush	Olympus Optical, Hamburg, Deutschland
Pipetten	Labsystem, Vantaa, Finnland
Pipettenspitzen	Biozym, Hess. Oldendorf, Germany

HPBEC sind theoretisch mit den kommerziell erworbenen NHBE identisch. Da jedoch die genaue Gewinnungs-Prozedur sowie die Auswirkungen des Einfrierens der NHBE nicht bekannt sind, wurden bronchiale Epithelzellen von gesunden menschlichen Spendern (Humane Primäre Bronchiale Epithelzellen; HPBEC) in der Abteilung für Klinische Atemwegsforschung des Fraunhofer ITEM gewonnen. Anschließend wurden ausgewählte Experimente, welche schon mit NHBE durchgeführt wurden, zusätzlich mit HPBEC durchgeführt. Somit konnten zwei Fragen beantwortet werden:

- 1) Können Humane Primäre Bronchiale Epithelzellen, welche von von gesunden Spendern mittels Bronchialbürste gewonnen werden, kultiviert werden?
- 2) Können die experimentellen Ergebnisse, welche mit den NHBE gewonnen wurden, mit den HPBEC validiert werden?

HPBEC wurden von gesunden und nichtrauchenden Spendern gewonnen. Hierbei wurde ein fiberoptisches Bronchoskop verwendet, durch welches sterile 5 mm-Nylon-Bürsten in die Atemwege geschoben wurden. Anschließend wurde die Mukosa der Bronchien der 4. und 5. Generation mehrmals gebürstet. Die Zellen, welche auf der Bürste hingen, wurden anschließend mit 30 ml steriler 0,9 Natriumchlorid (NaCl)-Lösung in ein 50 ml-Röhrchen gespült und anschließend gevortext. Nun wurden die Zellen für eine Stunde mit 4,8 U/ml Dispase II auf einem Schüttler bei 4 °C inkubiert. Nach Pelletierung (250 g, 10 min, 4 °C) wurden die Zellen in 2 ml Kulturmedium (Tabelle 3) aufgenommen. Die Zellen wurden nun in 6-well-Platten (3 ml Medium pro well) überführt. Nach Erreichen von 80 % Konfluenz wurden die Zellen in 24-well Platten überführt. In konfluentem Zustand wurden die Experimente durchgeführt.

Die HPBEC wurden in einem speziellen Grundmedium zuzüglich verschiedener Zusätze (Supplement Mix) kultiviert (Tabelle 3).

Alle Probanden wurden ausführlich über die Vorgehensweise aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover freigegeben.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Kulturmediums von HPBEC

Kulturmedium für Humane Primäre Bronchiale Epithelzellen (HPBEC)	
Airway Epithelial Cell Growth Medium (AECG)	
0,4 %	Rinder-Hypophysenextrakt
0,1 %	Rekombinantes Humanes Insulin
0,1 %	Rekombinanter Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor
0,1 %	Gentamicinsulfat / Amphotericin B
0,1 %	Transferrin
0,1 %	Epinephrin
0,1 %	Hydrokortison
0,1 %	Retinolsäure
0,1 %	Trijodthyronin

3.1.4 Isolation von Monozyten aus humanem Blut

Material

Buffy Coat	Blutspendedienst Bern, Schweiz
Humanes Blut	Fraunhofer ITEM, Hannover, Deutschland
Ficoll Paque	GE Healthcare, München, Deutschland
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Lonza, Basel, Schweiz
50 ml-Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Zentrifuge	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Sterilbank	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
25 ml / 10 ml-Einwegpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Teile dieser Experimente wurden während eines Forschungsaufenthaltes am Institut für Anatomie der Universität Bern, Schweiz durchgeführt.

Monozyten sind im Blut zirkulierende Vorläuferzellen von Makrophagen und Dendritischen Zellen. Um *in vitro* aus Monozyten Makrophagen und Dendritische Zellen zu generieren, wurden Monozyten aus humanen Buffy Coats und aus humanem Blut mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Buffy Coat ist eine aus dem Blut gewonnene Fraktion, welche mit Leukozyten und Thrombozyten angereichert ist. Monozyten machen etwa 3-8 Prozent der Leukozyten-Population aus. Bei Probanden der Blut-Spende wurde darauf geachtet, dass eine Allergie gegen Gräser vorherrschte.

25 ml Blut oder Buffy Coat wurden in ein 50 ml-Röhrchen gegeben und im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt. Für eine optimale Durchmischung wurde das Röhrchen vorsichtig geschwenkt. 20 ml-Portionen dieses Gemischs wurden in unbenutzte 50 ml-Röhrchen gegeben. Nun wurden 12 ml eiskaltes Ficoll Paque unter das Blut gefüllt. Hierbei musste sehr vorsichtig vorgegangen werden, um Verwirbelungen im Blut zu unterbinden. Das Ficoll Paque durfte sich nicht mit dem Blut vermischen. Es folgte eine 20-minütige Zentrifugation Minuten (520 *g*, 4 °C) bei geringster Beschleunigung und Bremskraft. Durch die niedrige Viskosität, die entsprechende Dichte und die osmotischen Eigenschaften des Ficoll Paques führte diese Zentrifugation zur differenzierten Migration der verschiedenen im Blut oder Buffy Coat enthaltenen Zellen und somit zur Ausbildung von verschiedenen Schichten mit verschiedenen Zelltypen. Mononukleäre Zellen, zu welchen Monozyten gehören, haben eine geringere Dichte als Ficoll Paque und bilden daher eine Interphase direkt auf dem Ficoll Paque, während die Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer höheren Dichte absinken (Abbildung 5).

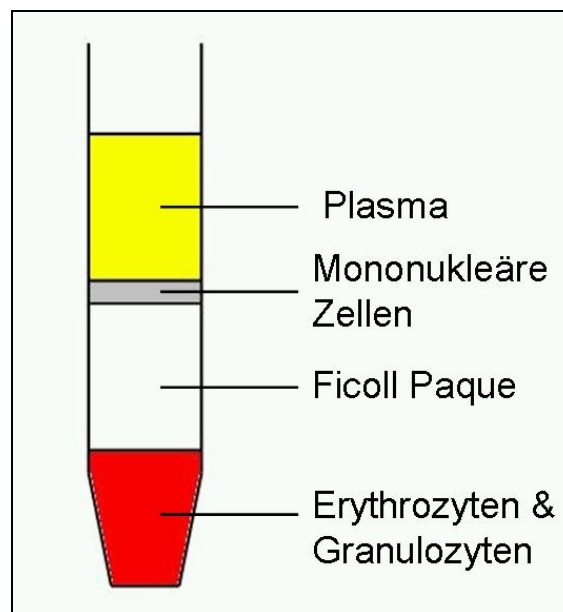


Abbildung 5: Zellseparation von mononukleären Zellen aus Blut oder Buffy Coat nach Dichtegradientenzentrifugation.

Nach dem Abnehmen und Verwerfen des Plasmas wurden die mononukleären Zellen vollständig abgesaugt und in unbenutzte 50 ml Röhrchen überführt. Sie wurden anschließend für die Generierung von Makrophagen und Dendritischen Zellen oder zur Isolation von CD4-positiven T-Zellen, einer Subpopulation von T-Helferzellen, benutzt.

Alle Probanden der Blutspende im Fraunhofer ITEM wurden ausführlich über die Vorgehensweise aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover freigegeben.

3.1.4.1 Generierung von Makrophagen und Dendritischen Zellen

Material

PBS	Lonza, Basel, Schweiz
RPMI1640	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Humanes Serum	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin / Streptomycin	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Interleukin (IL)-4	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Granulocyte macrophage - colony stimulating factor (GM-CSF)	R&D Systems, Oxon, Großbritannien
50 ml Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
25 ml / 15 ml-Einwegpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifuge	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
6-well Platte	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Brutschrank	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Sterilbank	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Zellschaber	Neo Lab, Heidelberg, Deutschland
Pipetten	Labsystem, Vantaa, Finnland
Pipettenspitzen	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland

Die mittels Ficoll Paque gewonnenen mononukleären Zellen wurden im Verhältnis 1:3 mit PBS verdünnt und anschließend für 10 Minuten (270 g, 4 °C, mittlere Beschleunigung, mittlere Bremskraft) zentrifugiert. Das Pellet wurde nun in 24 ml Kulturmedium (Tabelle 4; Plastikadhärenz Monozyten) aufgenommen. Anschließend wurden jeweils 4 ml dieser Zellsuspension in eine Vertiefung einer 6-well-Platte gegeben. Diese Platte wurde für 2 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das Medium gewechselt. Hierdurch wurden die nicht adhärenen Zellen verworfen und die Monozyten durch Plastikadhärenz angereichert. Das nun zugesetzte Medium wurde je nach zu generierendem Zelltyp variiert (Tabelle 4; Makrophagen oder Dendritische Zellen). Die 6-well-Platte wurde anschließend für 1 Woche im Brutschrank platziert. Darauf folgend wurden die Zellen abgeschabt und in ein gemeinsames (sortiert nach Zelltyp) 50 ml Röhrchen gegeben und für das Ansetzen des Triple-Zellkultur-Modells verwendet.

Tabelle 4: Kulturmedien für Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen

Plastikadhärenz Monozyten	Makrophagen	Dendritische Zellen
RPMI1640	RPMI1640	RPMI1640
10 % humanes Serum	5 % humanes Serum	5 % humanes Serum
1 % Penicilin / Streptomycin	1 % Penicilin / Streptomycin	1 % Penicilin / Streptomycin
		50 ng/ml GM-CSF
		1000 IU/ml IL4

3.1.4.2 Isolation von CD4-positiven T-Zellen

Material

CD4+ T Cell Isolation Kit II human	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
PBS	Lonza, Basel, Schweiz
EDTA	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Humanes-Serum-Albumin	Octapharma, Langenfeld, Deutschland
50 ml-Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
25 ml / 15 ml-Einwegpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipetten	Labsystem, Vantaa, Finnland
Pipettenspitzen	Biozym, Hess. Oldendorf, Germany

Der cluster of differentiation (CD) 4 ist ein Glykoprotein, welches an der Oberfläche bestimmter Immunzellen vorkommt. CD4-positive T-Zellen (Helferzellen) spielen eine wichtige Rolle in der Immunabwehr. Sie erkennen Antigene, welche an den Major Histocompatibility Complex (MHC) II antigenpräsentierender Zellen gebunden sind.

Für die Versuche in dieser Arbeit wurden CD4-positive T-Zellen mit einem kommerziell erhältlichen Kit isoliert. Die Isolierung basierte auf dem Prinzip einer "Negativ-Isolierung". Dies bedeutet, dass alle Zellen, welche nicht CD4-positive T-Zellen waren, mit magnetischen Kugeln markiert und mittels eines Magneten entfernt wurden (Abbildung 6). So wurden beispielsweise Zellen durch eine Bindung an CD8 oder CD14 entfernt. CD8 und CD14 sind nicht auf CD4-positiven T-Zellen vorhanden. CD4-positive Zellen blieben weitestgehend unangetastet und unmarkiert, was für eine weitere experimentelle Verarbeitung optimal ist.

Die Isolierung fand detailliert nach der mitgelieferten Anleitung des „CD4+ T Cell Isolation Kit II human“ statt. Nach erfolgter Isolierung wurden die CD4-positiven T-Zellen für eine Woche bei -80 °C gelagert.

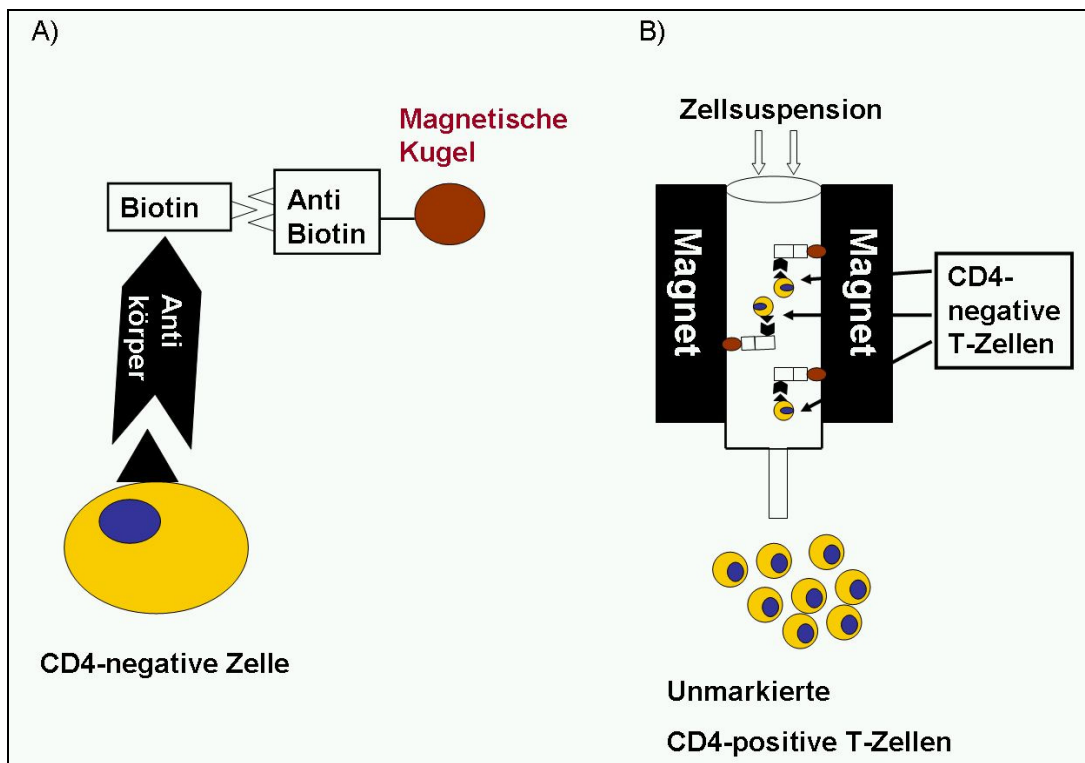


Abbildung 6: Schema des Prinzips der negativen Isolierung von CD4-positiven T-Zellen.

A) Kopplung einer magnetischen Kugel an CD4-negative Zellen. B) CD-4 negative Zellen bleiben an einem Magneten hängen. Nur unmarkierte CD-4 positive T-Zellen können die Magneten passieren und werden gesammelt.

3.1.5 Generierung eines Triple-Zellkultur-Modells

Material

RPMI1640	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Humanes Serum	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin / Streptomycin	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Zellschaber	Neo Lab, Heidelberg, Deutschland
Petrischale	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
25 ml / 15 ml-Einwegpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pasteurpipetten	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
6-well-Platte	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Transwell-Insert	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Zellschaber	Neo Lab, Heidelberg, Deutschland

Brutschrank	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Sterilbank	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Pipetten	Labsystem, Vantaa, Finnland
Pipettenspitzen	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland

Das Triple-Zellkultur-Modell, welches erstmals 2005 beschrieben wurde (108), bietet eine optimale Möglichkeit *in vitro* die Aufnahme von Partikeln zu untersuchen. Im Gegensatz zu Monokulturen eines bestimmten Zelltyps spielen in diesem Modell auch die für die *in vivo*-Situation wichtigen Zell-Zell-Interaktionen eine Rolle. Das hier angewandte Triple-Zellkultur-Modell besteht aus Epithelzellen (Zelllinie A549), Makrophagen und Dendritischen Zellen (beide generiert aus humanen primären Blut-Monozyten).

A549-Zellen (1×10^6) wurden auf eine Membran eines Transwell-Inserts (Wachstumsfläche 4,2 cm²; 3 µm Porengröße, PET Membran) ausgesät. Das Transwell-Insert befand sich in einer 6-well-Platte. In die obere Kammer wurden 2 ml Kulturmedium und in die untere Kammer 3 ml Kulturmedium (Tabelle 1) gegeben. Die Zellen wurden anschließend eine Woche im Brutschrank (37 °C; 5 % CO₂) kultiviert. Darauf folgend wurden Makrophagen und Dendritische Zellen auf bzw. unter die Membran gegeben (Abbildung 7). Hierbei wurde zuerst das Transwell-Insert aus der 6-well-Platte herausgenommen. Die Rückseite der Membran wurde mittels eines Zellschabers von Epithelzellen, welche durch die Membran hindurch gewachsen waren, befreit. Nun wurde die Rückseite der Membran mit reinem RPMI1640-Medium gewaschen. Das Transwell-Insert wurde gedreht und mit der Rückseite nach oben in eine Petrischale gestellt. Die Dendritischen Zellen wurden nun in 300 µl Medium (Tabelle 4; Makrophagen) auf die Rückseite der Membran gegeben (Abbildung 7). Es bildete sich ein kleiner Medium-Hügel auf der Membran. Die Petrischale wurde nun geschlossen und in den Brutschrank (37 °C; 5 % CO₂) gestellt. Hier musste äußerst vorsichtig und erschütterungsfrei gearbeitet werden. Erschütterungen der Petrischale würden das Medium an der Seite des Transwell-Inserts hinablaufen lassen. Ein hoher Verlust von darin enthaltenen DC wäre die Folge. Zusätzlich könnte die Membran austrocknen was zum Absterben der A549-Zellen führen würde. Nach 1,5-stündiger Inkubation wurde das Medium abgesaugt und die Membran einmal mit reinem RPMI1640-Medium gewaschen. Anschließend wurde das Transwell-Insert in eine unbenutzte 6-well-Platte platziert. In der unteren Kammer befanden sich 3 ml Medium. In der oberen Kammer befand sich 1 ml Medium (Tabelle 4; Makrophagen) zuzüglich Makrophagen. Diese 6-well-Platte wurde nun für 2 Stunden in den Brutschrank gestellt. Anschließend wurde das Medium verworfen und frisches Medium zugegeben (3 ml unten, 2 ml oben). Die Platte

wurde über Nacht zurück in den Brutschrank gestellt und am darauf folgenden Morgen für die Versuche eingesetzt.

Anmerkungen zur Zellzahl: Für die Versuche zur Quantifizierung der Partikel-Aufnahme wurden die Triple-Zellkultur-Modelle mit insgesamt 300 μl Medium (Dendritische Zellen) und 1 ml Medium (Makrophagen) angesetzt (aus dem gesamten Pool der generierten Zellen). Eine genaue Quantifizierung der aufgetragenen Zellzahl wurde nicht durchgeführt. Die Zellzahl war im Mittelwert: $411,4 \pm 77,4$ Dendritische Zellen pro mm^2 und $230,6 \pm 45,4$ Makrophagen pro mm^2 der Membran (47). Um die Schwankungen in der Anzahl der Zellen zu minimieren wurde für die folgenden Experimente (Messung von Zytokinen und Chemokinen) das Triple-Zellkultur-Modell optimiert und standardisiert. In den 300 μl Medium, die auf der Unterseite der Membran aufgetragen wurden, befanden sich nun 175.000 DC. 100.000 MO befanden sich in 1 ml Medium, welches auf die Oberseite der Membran aufgetragen wurde. Diese entsprechen den Zellzahl-Mittelwerten, welche während des ersten Teils der Experimente (Quantifizierung der SPP-Aufnahme) auf das Triple-Zellkultur-Modell aufgetragen wurden.

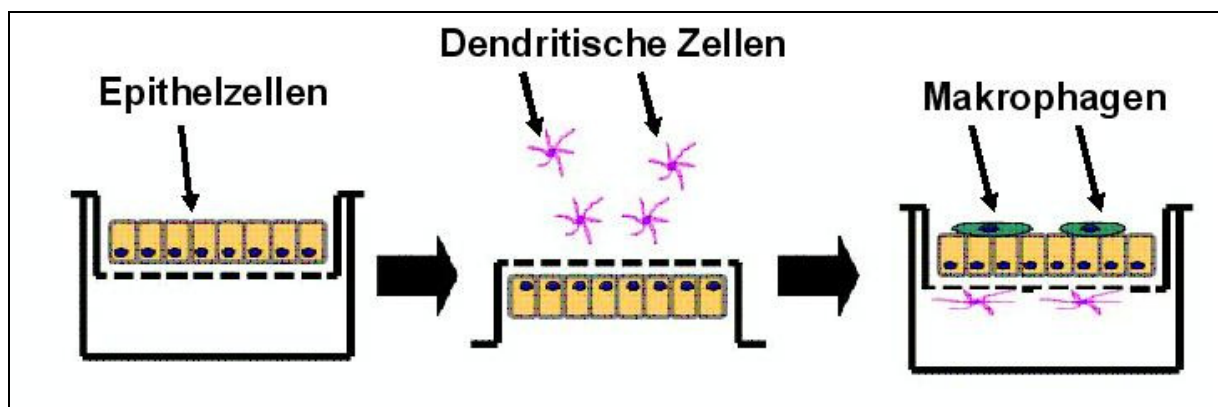


Abbildung 7: Ansetzen des Triple-Zellkultur-Modells.

Nach dem Kultivieren der Epithelzellen (linkes Bild), wurde die Membran gedreht und die Dendritischen Zellen wurden auf der Unterseite der Membran kultiviert (mittleres Bild). Die Makrophagen wurden anschließend auf den Epithelzellen kultiviert (rechtes Bild).

3.1.6 Langzeitkonservierung von Zellen

Material

Jeweiliges Zellkulturmedium	siehe Kapitel zu jeweiligem Zelltyp
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Einfrierbox	Stratagene, La Jolla, USA
Kryoampullen	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sterilbank	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Pipetten	Labsystem, Vantaa, Finnland
Pipettenspitzen	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland

Das Einfrieren von Zellen ermöglicht es, Zellen junger Passagen an späteren Zeitpunkten zur Verfügung zu haben. Dies ist wichtig, da Zellen in hohen Passagen ihre Eigenschaften verändern können. Zudem verhindert das Einfrieren einen Verlust einer ganzen Zelllinie, beispielsweise auf Grund von Kontaminationen. Da beim Einfrieren von Zellen Eiskristalle entstehen können, was zu einer Schädigung der Zelle führt, wurde dem Einfriermedium 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) zugesetzt. Dies verhinderte die Eiskristall-Bildung. Des Weiteren wurde die Einfrier-Temperatur langsam reduziert. Zur Optimierung des Einfrierprozesses wurde eine spezielle Einfrierbox eingesetzt. Es wurde eine Zellzahl von 1 Million Zellen pro 1 ml Einfriermedium eingestellt. Als Einfriermedium wurde das jeweilige Kulturmedium unter Zugabe von 10 % DMSO verwendet. Eine Ausnahme waren die CD4-positiven T-Zellen, welche in FCS und zugegebenen 10 % DMSO eingefroren wurden. Das Einfriermedium wurde auf 4 °C vorgekühlt. Die Zellen wurden in Einfriermedium suspendiert und in Kryoampullen gegeben. Diese Kryoampullen wurden in die auf 4 °C vorgekühlte Einfrierbox gegeben. Die Einfrierbox wurde im Anschluss bei -80 °C für 24 Stunden gelagert. Daraufhin wurden die Kryoampullen entnommen und direkt in der Gasphase flüssigen Stickstoffs gelagert. Mithilfe dieser Kryokonservierung in der Gasphase flüssigen Stickstoffs kommen Stoffwechsel-Aktivitäten vollständig zum Erliegen. Auch genetische Veränderungen innerhalb der Zellen werden so verhindert. Dieser Vorgang der Kryokonservierung ist reversibel, so dass durch das Auftauen jederzeit wieder Zellen junger Passagen zur Verfügung stehen.

Zellen, die nur für eine Woche gelagert wurden, verblieben bei -80 °C und wurden nicht in die Gasphase flüssigen Stickstoffs umgelagert.

3.1.7 Das Auftauen langzeitkonservierter Zellen

Material

Jeweiliges Zellkulturmedium	siehe Kapitel zu jeweiligem Zelltyp
50 ml-Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
25 ml / 15 ml-Einwegpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifuge	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Brutschrank	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Sterilbank	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Wasserbad	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Pipetten	Labsystem, Vantaa, Finnland
Pipettenspitzen	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland

Langzeitkonservierte Zellen befinden sich in der Gasphase flüssigen Stickstoffs. Im Gegensatz zum Einfrieren sollte das Auftauen von Zellen sehr schnell erfolgen. Das benötigte Kulturmedium muss bereits auf 37 °C vorgewärmt sein und wurde kurz vor dem Auftauen der Zellen in einem Gefäß bereitgestellt. Die Kryoampulle wurde nun umgehend nach der Entnahme aus der Gasphase des flüssigen Stickstoffs in ein 37 °C warmes Wasserbad überführt. Der Transport vom flüssigen Stickstoff bis zum Wasserbad sollte auf Eis erfolgen. Umgehend nach Verschwinden des letzten Eiskristalls werden die Zellen in das bereits vorgelegte Kulturmedium überführt. Um das zellschädigende DMSO aus der Kultur zu waschen, wurden die Zellen pelletiert (5 min; 300 g). Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Pellet in frischem Zellkulturmedium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt. Die Zellen wurden bei 37 °C und einer 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Da die Zellen beim Prozess des Auftauens erheblichem Stress ausgesetzt sind, wurden sie frühestens nach 14 Tagen Kultur für Experimente verwendet. Eine Ausnahme waren die CD4-positiven T-Zellen, welche noch am gleichen Tag für die Experimente eingesetzt wurden.

3.2 Verwendete Partikel sowie Surfactant Proteine

Für die Experimente, welche in dieser Arbeit beschrieben sind, wurden Subpollen-Partikel (SPP) von *Phleum pratense* sowie kommerziell erworbene industriell synthetisierte Partikel verwendet.

3.2.1 Isolation der Subpollen-Partikel (SPP)

Material

Pollen von <i>Phleum pratense</i>	Allergon, Ängelholm, Schweden
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Molecular Probes, Eugene, USA
PBS	Lonza, Basel, Schweiz
50 ml-Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
25 ml / 10 ml-Einwegpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifuge	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Sterilbank	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Vortexer	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
5 µm-Filter	VWR International, Hannover, Deutschland
Pipetten	Labsystem, Vantaa, Finnland
Pipettenspitzen	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland

Subpollen-Partikel wurden aus Gräserpollen des Wiesenlieschgrases (*Phleum pratense*) mittels osmotischem Schock isoliert. Etwa 300 mg Pollen wurden hierfür in ein 50 ml-Gefäß gegeben, welches mit 40 ml deionisiertem und autoklaviertem Wasser aufgefüllt wurde. Anschließend wurde das Gefäß kräftig geschüttelt und für 3 Minuten gevortext. Das Gemisch wurde zentrifugiert (4 min, 50 g, ohne Bremskraft) und die SPP, welche sich im Überstand befanden, wurden mittels einer Filtration (Porengröße 5 µm) von übrigen ganzen Pollen sowie Pollenfragmenten getrennt. Anschließend wurden die SPP pelletiert (10 min, 2.500 g, ohne Bremskraft). Um eine hohe Reinheit an SPP zu erhalten, wurden die SPP in 20 ml deionisiertem und autoklaviertem Wasser aufgenommen und nochmals filtriert (Porengröße 5 µm). Nach einer erneuten Zentrifugation (10 min, 2.500 g, ohne Bremskraft) wurden die SPP entweder in Natriumhydrogencarbonat (für eine anschließende Färbung) oder in PBS (für den direkten Einsatz im Experiment) aufgenommen. Die Reinheit der Isolation sowie die genaue Anzahl der SPP wurde in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Partikel wurden bei 4 °C gelagert und innerhalb von 2 Wochen für die Experimente verwendet.

3.2.2 Fluoreszenzmarkierung der Subpollen-Partikel

Material

SPP <i>Phleum pratense</i>	siehe Kapitel 3.2.1
ALEXA488	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Natriumhydrogencarbonat	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
PBS	Lonza, Basel, Schweiz
50 ml Röhrrchen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
25 ml / 15 ml-Einwegpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifuge	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Sterilbank	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Rotator	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Pipetten	Labsystem, Vantaa, Finnland
Pipettenspitzen	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland

Direkt nach der Isolation der SPP wurden die Partikel mit dem Fluoreszenzfarbstoff ALEXA488 markiert. Hierfür wurde ein Farbstoff genutzt, welcher an Proteine bindet. Da SPP verschiedene Proteine im gesamten partikulären Träger enthalten, wurde das SPP durchgehend fluoreszent. Für die Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff wurde eine Partikelzahl zwischen 1×10^9 - 4×10^9 SPP in 1 ml NaHCO_3 (0,1 M) eingesetzt. Der Magnet, welcher sich in dem Farbstoff-Röhrrchen befand, wurde entfernt und die SPP in das Röhrrchen hinein gegeben. Anschließend wurde das Röhrrchen lichtundurchlässig verpackt und bei 0,43 Hz für eine Stunde mittels eines Rotators gedreht. Nach dieser Stunde wurden die Partikel in 12 ml PBS aufgenommen, pelletiert (12 min, 2500 g; ohne Bremskraft) und in 1 ml PBS resuspendiert. Unter Fluoreszenzlicht wurde die Färbung kontrolliert sowie die SPP in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die SPP wurden nun in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und im Dunkeln bei 4 °C gelagert. Innerhalb von zwei Wochen wurden sie für die Experimente genutzt.

3.2.3 Industriell synthetisierte Partikel

Material

TiO ₂ -Nanopartikel	Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland
TiO ₂ -Mikropartikel	Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland
Polystyren-Nanopartikel	Micromod, Rostock, Deutschland
Polystyren-Mikropartikel	Micromod, Rostock, Deutschland
Quarz-Mikropartikel	Quarzwerte, Frechen, Deutschland

TiO₂-Partikel in 2 verschiedenen Größen wurden als Pulver gekauft. Polystyren-Partikel in 2 verschiedenen Größen wurden als Suspension in destilliertem Wasser gekauft. Sikron SF 800 Quarz-Staub wurde als Pulver gekauft. Die Partikel wurden in deionisiertem und autoklaviertem Wasser in Konzentrationen von 10 mg/ml, 25 mg/ml oder 50 mg/ml bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt. Vor jedem Gebrauch wurden die Partikel mit Ultraschall behandelt, was zu einer Aufbrechung der Partikelaggregate führte. Die Partikeldurchmesser sind den Angaben der Hersteller entnommen (Tabelle 5), wurden jedoch mittels Transmissionselektronenmikroskopie überprüft. In Einzelfällen wurden die von den Herstellern angegebenen Durchmesser der Partikel über- bzw. unterschritten. Der überwiegende Großteil der Partikel lag jedoch im angegebenen Größenbereich. Die Oberflächen der TiO₂-Partikel und der Quarz-Partikel wurden vom Hersteller mit der BET-Methode (entwickelt von Stephen Brunauer, Paul Hugh Emmett und Edward Teller) ermittelt. Die Oberflächen der polystyrenen Partikel wurden anhand der Oberflächen der einzelnen Partikel, welche eine exakte Kugelform aufweisen, berechnet.

Tabelle 5: Charakteristika der verwendeten industriell synthetisierten Partikel

	Partikelgröße [nm]	Oberfläche [m²/g]	Kristallstruktur
TiO₂-NP	5	210	Anatas
TiO₂-MP	900-1600 (d50%:1220)	4,2	Rutil
Polystyren-MP	50	114	-----
Polystyren-NP	1000	5,7	-----
Quarz-MP	100-16000 (d50%: 2000)	6	Alpha-Quarz

3.2.4 Surfactant Proteine

Ein rekombinantes Fragment des humanen SP-D (rfhSP-D) wurde uns freundlicherweise von Altana Pharma (Konstanz, Deutschland) überlassen. Es besteht aus der trimeren Hals-Region sowie der Kohlenhydrat-Erkennungs-Domäne.

Rekombinantes Ratten Surfactant Protein D (SP-D) wurde in CHO-Zellen wie von Dong *et al.* beschrieben hergestellt (109).

3.3 Messung der Partikelaufnahme mittels Durchflusszytometrie

Material

SPP <i>Phleum pratense</i>	siehe Kapitel 3.2.1 und 3.2.2
RPMI1640	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
PBS	Lonza, Basel, Schweiz
Trypsin / EDTA	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd (4 %)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Penicilin / Streptomycin	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
TO-PRO-3 Iodid	Molecular Probes, Eugene, USA
50 ml-Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
25 ml / 15 ml-Einwegpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifuge	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Sterilbank	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Polypropylen-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Polystyren-Partikel (1 µm)	Molecular Probes, Eugene, USA
Brutschrank	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Durchflusszytometer	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
Pipetten	Labsystem, Vantaa, Finnland
Pipettenspitzen	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Emission von optischen Signalen, welche von einer Zelle ausgehen, sobald sie Laserstrahl passiert. Hierfür werden einzelne Zellen der jeweiligen Probe durch eine Kapillare angesaugt. Wurde die Zelle zuvor mittels eines Fluoreszenzfarbstoffs markiert, so kann diese Fluoreszenz nun gemessen werden.

Epithelzellen wurden in 24-well-Platten bis zur Konfluenz inkubiert. Am Morgen des Versuchstages wurde 1 ml frisches Medium auf die Zellen gegeben. In dem Medium waren SPP sowie Proteine enthalten. Als Vergleichspartikel wurden fluoreszente Polystyren-Partikel (Durchmesser 1 μm) verwendet. Die Zellen wurden für 8 Stunden im Brutschrank (37 °C; 5 % CO_2) inkubiert. Um alle freien SPP zu verwerfen, wurden die Zellen anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden nun mit Trypsin / EDTA (200 μl) über 3-6 Minuten im Brutschrank (37 °C, 5 % CO_2) abgelöst und in Polypropylen-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (5 min, 300 g) und im Dunkeln mit 1 ml Paraformaldehyd (4 %) für 30 Minuten fixiert. Hierdurch wurden die Proteine der Zellen miteinander vernetzt. Die Zellen wurden nun erneut pelletiert und in PBS zuzüglich TO-PRO-3 Iodid (1:500) aufgenommen. Dies führte zu einer Färbung der Desoxyribonukleinsäure und somit des Zellkerns. Nach 30 Minuten wurden die Zellen pelletiert (5 min, 300 g) und in 400 μl PBS aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde anschließend für die Messung im Durchflusszytometer genutzt.

Trotz der vielen Waschschrte waren noch immer freie SPP in der Zellsuspension enthalten. Da das Durchflusszytometer nicht ohne weiteres erkennen kann, ob eine Zelle oder ein freies SPP(-Aggregat) im Fokus liegt, wurden die Zellen mittels des Kernfarbstoffs vorsortiert (Abbildung 8). Durch die Fokussierung auf die TO-PRO 3-positiven Events (Abbildung 8) konnte sichergestellt werden, dass nur Zellen und keine freien SPP untersucht wurden.

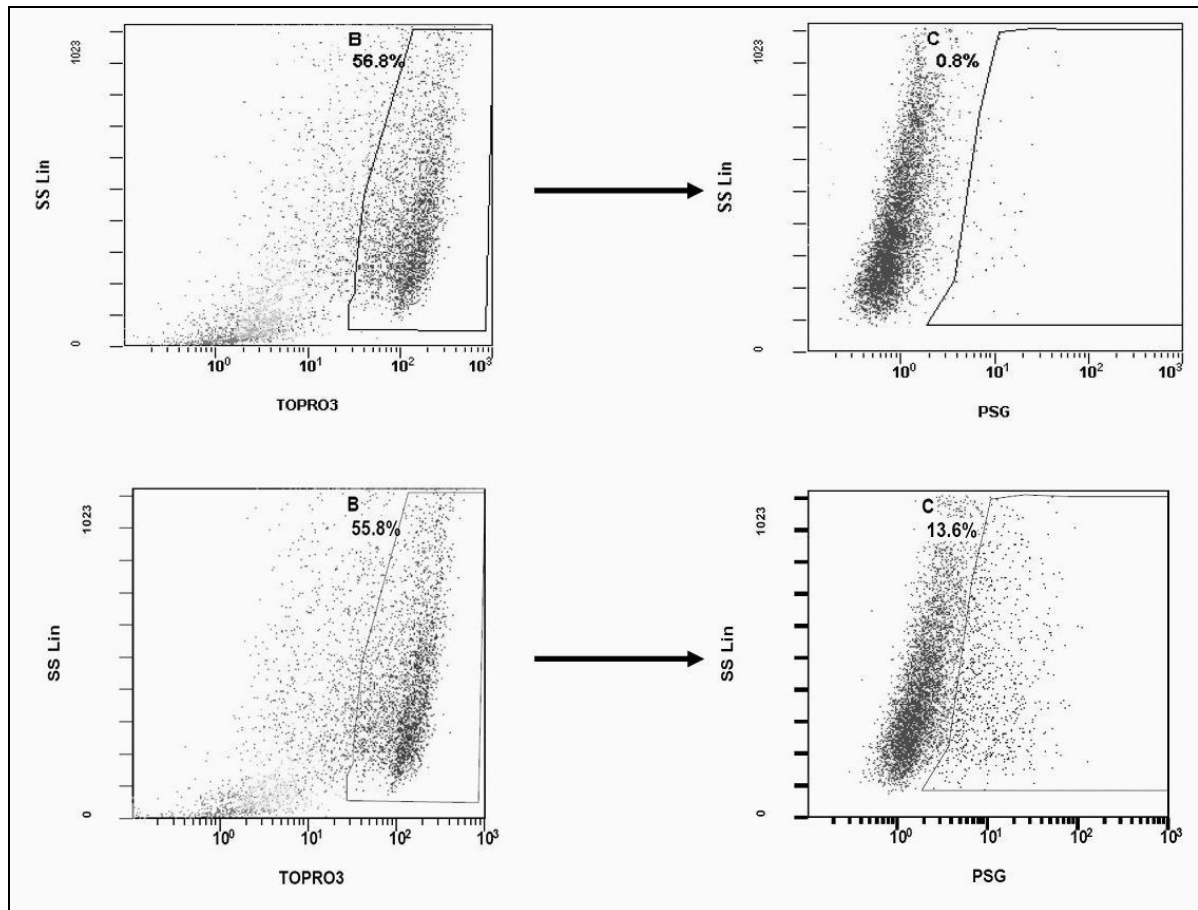


Abbildung 8: Gating-Strategie der Auswertung der epithelialen SPP-Aufnahme und -Adhäsion. Auf der linken Seite ist das Gating auf die TO-PRO-3 (Kernfarbstoff) positiven Events zu erkennen. Auf der rechten Seite wurden ausschließlich Zellen (TO-PRO-3 positiven Events) in den Fokus genommen. Hier wurden anschließend die SPP-positiven Zellen quantifiziert. In der oberen Probe wurden keine SPP zugefügt. Das Gating-Fenster umfasst deshalb den ALEXA488-(SPP Farbstoff) positiven Bereich rechts der Zellen. In der unteren Probe wurden SPP zugefügt und der ALEXA488 positive Bereich der Kontrolle beibehalten.

Die Anzahl der SPP-positiven Zellen (Zellen, die für ALEXA488 positive waren) konnte nun abgelesen werden. Zusätzlich konnte über die mean fluorescence intensity (MFI) der SPP-positiven Zellen eine relative Aussage darüber getroffen werden, wie viele SPP pro Zelle aufgenommen oder assoziiert waren.

3.4 Untersuchungen mittels konfokaler Mikroskopie

Ein Durchflusszytometer kann nicht unterscheiden, ob eine SPP-positive Zelle das fluoreszierende Partikel aufgenommen hat oder ob das Partikel an der Zellmembran gebunden ist. Durch das Erstellen 3-dimensionaler Bilder mittels konfokaler Mikroskopie ist dies möglich.

Für die Experimente, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurde ein Zeiss LSM 510 Meta mit einem inversen Zeiss Mikroskop (Axiovert 200M, Lasers: HeNe 633nm, HeNe 543nm, and Ar 488nm) verwendet.

3.4.1 Aufnahme von SPP in Epithelzell-Monokulturen

Material

Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
TO-PRO-3 Iodid	Molecular Probes, Eugene, USA
Rhodamin phalloidin	Molecular Probes, Eugene, USA
8-well-chamberslides	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
IMARIS	Bitplane, Zürich, Schweiz
Brutschrank	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
PBS	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Konfokales Mikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Pipetten	Labsystem, Vantaa, Finnland
Pipettenspitzen	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland

Epithelzellen wurden in 8-well-chamberslides ausgesät und bis zum Erreichen der Konfluenz inkubiert. Anschließend wurden fluoreszierende Partikel sowie SP-D in 400 µl frischem Medium zugegeben. Die Zellen wurden für 8 Stunden im Brutschrank (37 °C; 5 % CO₂) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um alle freien Partikel zu verwerfen. Mittels 500 µl Paraformaldehyd (4 %) wurden die Zellen in den Chamberslides über 30 Minuten im Dunkeln fixiert. Anschließend wurde der Kern mittels TO-PRO-3 Iodid (1:500) sowie das Zytoskelett durch Rhodamin phalloidin, gekoppelt mit dem Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodamin (1:100), gefärbt. Mindestens 10 dreidimensionale Bilder wurden von jeder Probe erstellt. Ungefähr 30 Zellen wurden pro Bild aufgenommen und einzeln auf gebundene oder aufgenommene Partikel analysiert. Repräsentative Bilder wurden mit der Software IMARIS visualisiert.

3.4.2 Aufnahme von SPP in Zellen eines Triple-Zellkultur-Modells

Material

RPMI1640	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
8-well-chamberslides	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
TO-PRO-3 Iodid	Molecular Probes, Eugene, USA
Rhodamin phalloidin	Molecular Probes, Eugene, USA
IMARIS	Bitplane, Zürich, Schweiz
Brutschrank	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Skalpell	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
PBS	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Petrischale	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
CD14 (Maus anti-human)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
CD86 (Maus anti-human)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Cyanine 5 (Ziege anti-Maus)	VWR International AG, Luzern Schweiz
Rhodamine phalloidin	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Objektträger	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Mowiol	VWR, Darmstadt, Deutschland
Pipetten	Labsystem, Vantaa, Finnland
Pipettenspitzen	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland
Konfokales Mikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Software Diacount	Semasopht, Lausanne, Schweiz
Software IMARIS	Bitplane, Zürich, Schweiz

Am Tag des Experiments wurde frisches Medium in den oberen Teil (1 ml) sowie den unteren Teil (3 ml) des Transwell-Inserts gegeben. Im Medium der oberen Kammer waren fluoreszierende SPP sowie SP-D vorhanden. Die Zellkulturen wurden anschließend für 8 Stunden im Brutschrank (37 °C; 5 % CO₂) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Membranen der Transwell-Inserts oben und unten zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen oberhalb und unterhalb der Membran mittels Paraformaldehyd (3 %) über 15 Minuten im Dunkeln fixiert. Nach weiteren 2 Waschgängen wurden die Zellen 5 Minuten mit 0,1 M Glycin inkubiert. Es folgten erneut 2 Waschgänge. Nun wurden die Zellen mit Triton-X-100 (0,2 % in PBS) über 15 Minuten permeabilisiert. Die Membranen wurden anschließend ausgeschnitten und halbiert. In einer Petrischale, in

welcher sich feuchte Tücher befanden, wurden die Zellen nun mit den Antikörpern für jeweils 60 Minuten inkubiert. Die Antikörper wurden in PBS wie folgend verdünnt: Maus anti-human CD14 1:20, Maus anti-human CD86 1:20, Ziege anti-Maus Cyanine 5 1:50 und Rhodamine phalloidin 1:500. Nach den Färbungen wurden die Membranen zweimal in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Membranen in PBS:Glycerol (2:1) zuzüglich 170 mg/mL Mowiol auf Objektträger eingebettet.

Die auf Objektträger eingebetteten Triple-Zellkultur-Modelle wurden mit einem konfokalen Mikroskop untersucht. Die Proben wurden in jedem Experiment an zufällig ausgewählten Stellen gescannt. Für die Partikel-Quantifizierungen wurden die Rohdaten und die Software Diacount verwendet. Repräsentative 3D-Rekonstruktionen der Bilder wurden mit der Software IMARIS® erstellt.

3.4.3 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Material

IL-8 Duoset	R&D, Wiesbaden, Deutschland
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
TMB One (Enzym-Substrat)	Biotrend, Köln, Deutschland
Fetales Kälberserum	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bovines Serum-Albumin	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Sucrose	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS-Tween Tabletten	Medicago, Uppsala, Schweden
Microwell-Platten Maxisorp	NUNC, Wiesbaden, Deutschland
ELISA reader	Dynatech, Deisendorf, Deutschland
Pipetten	Labsystem, Vantaa, Finnland
Pipettenspitzen	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland

Mittels eines ELISAs können Proteine im Zellkulturüberstand gemessen werden. In dieser Arbeit wurde IL-8 mittels ELISA gemessen. Die Durchführung fand exakt nach, von der Firma geliefertem, Protokoll statt. Das Detektionslimit war der unterste Standard-Wert. Das Quantifizierungslimit war der unterste Standard-Wert, der bei einer Doppel-Bestimmung einen Variations-Koeffizient unter 0,2 aufwies und dessen Wert mindestens fünfmal höher als der Leerwert war.

3.4.4 Bead-basierende Messung von Zytokinen

Material

Bead-array kit	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Bioplex 200 System	Biorad, München, Deutschland
Pipette	Labsystem, Vantaa, Finnland
Pipettenspitzen	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland

Die bead-basierende Messung von Zytokinen und Chemokinen wurde mit einem Bioplex 200 System durchgeführt. Sie erlaubt es im Zellkulturüberstand viele verschiedene Proteine zur gleichen Zeit zu bestimmen. Dies stellt einen erheblichen Vorteil gegenüber einem ELISA dar, mit welchem nur ein Protein zur gleichen Zeit bestimmt werden kann. Alle in dieser Arbeit gemessenen Zytokine und Chemokine, mit Ausnahme von IL-8, wurden mittels Bead-basierender Messung bestimmt. Das Detektionslimit war der unterste Standard-Wert. Das Quantifizierungslimit war der unterste Standard-Wert, der bei einer Doppel-Bestimmung einen Variations-Koeffizient unter 0,2 aufwies und dessen Wert mindestens fünfmal höher als der Leerwert war.

3.4.5 Messung der biophysikalischen Surfactantfunktion

Material

Verschiedene Partikel	siehe Kapitel 3.2.3
Ringer-Lactat-Lösung	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Curosurf®	Asche Chiesi, Hamburg, Deutschland
Pulsierendes Blasen Surfactometer	Electronetics, Amherst, USA
Probenkammer	Electronetics, Amherst, USA
Pipetten	Labsystem, Vantaa, Finnland
Pipettenspitzen	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland

Die Messung der biophysikalischen Surfactantfunktion wurde mit dem Pulsierenden-Blasen-Surfactometer durchgeführt. Die Messdaten wurden digitalisiert und mittels eines Computerprogramms dargestellt. Das Pulsierende-Blasen-Surfactometer wurde 1977 von Goran Enhörning erstmalig beschrieben (Abbildung 9).

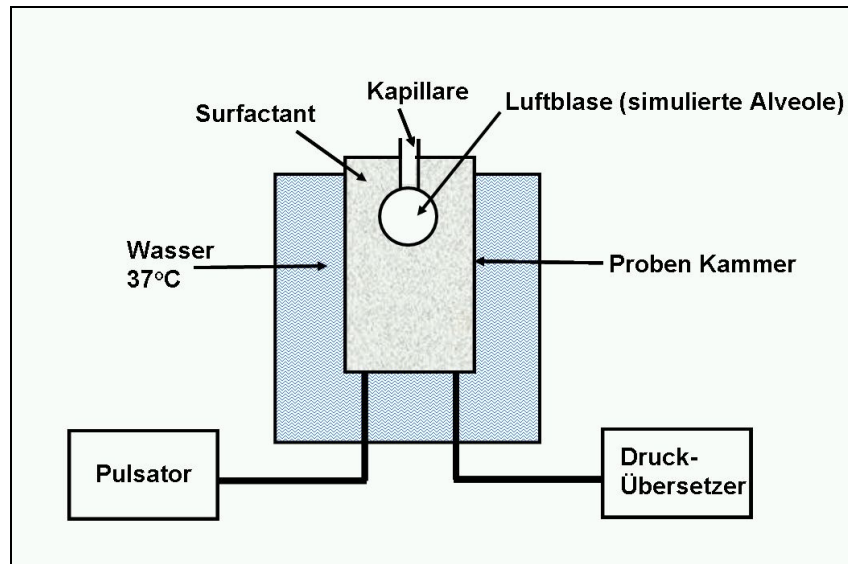


Abbildung 9: Schematischer Aufbau des Pulsierenden-Blasen-Surfactometers

Eine mit surfactanthaltiger Lösung gefüllte Probenkammer steht über eine Kapillare mit der Raumluft in Kontakt. Über diese Kapillare wird Luft angezogen. Eine Luftblase wird am Ende der Kapillare in der Surfactant-Lösung erstellt. Durch ein Okular wird diese auf einen bestimmten Radius (r) eingestellt. Da neben dem Radius auch der Blasendruck bekannt ist (wird vom Pulsierenden-Blasen-Surfactometer gemessen) kann nun auf der Grundlage des Gesetzes von Laplace ($\Delta P = 2\gamma/r$) die an der Grenzfläche zwischen surfactanthaltiger Lösung und Luftblase bestehende Oberflächenspannung (γ ; [mN/m]) errechnet werden. Da der Blasendruck durchgehend gemessen wird, kann die Berechnung an jedem Zeitpunkt stattfinden. Zur Optimierung der Resultate muss, über das im Gerät integrierte Mikroskop, eine kontinuierliche Beobachtung der Luftblase (simulierte Alveole) erfolgen. Gegebenenfalls muss der Radius der Luftblase manuell nachjustiert werden.

In den Versuchen, welche dieser Arbeit zu Grunde liegen, wurde Curosurf[®], eine natürliche Surfactant-Präparation, welche aus Schweinelungen gewonnen wird, eingesetzt. Die Curosurf[®]-Original-Fraktion wurde mit Ringer-Lactat-Lösung auf eine Phospholipid-Konzentration von 1,5 mg/ml eingestellt. Dieser Gebrauchslösung wurden Partikel [50 – 500 µg/ml] zugesetzt. Nach kurzer Inkubationszeit wurde die Oberflächenspannung dieser Lösung im Pulsierenden-Blasen-Surfactometer gemessen.

40 µl der Surfactant / Partikel Mischung wurden in die Probenkammer gefüllt und in dem Surfactometer platziert. Es wurde eine Luftblase gebildet und anschließend 2 Minuten gewartet, sodass die Surfactant-Lösung die Temperatur des Wasserbades (37 °C) annehmen konnte. Im Anschluss wurde die Messung gestartet. Die Luftblase wurde eingezogen und neu erstellt. Nach einer statischen Phase von 10 Sekunden begann der

Pulsations-Prozess der Blase (20 Zyklen pro Minute). Nach 330 Sekunden wurde die Messung gestoppt. Es wurden 2 Parameter für die Auswertung dieser Versuche genutzt. Die Adsorptionsoberflächenspannung (γ_{ads}) wurde nach 10 Sekunden im noch statischen Blasen Zustand gemessen. Der 2. Parameter war die minimale Oberflächenspannung (γ_{min}), welche die Oberflächenspannung bei minimaler Blasengröße während des Pulsationsprozesses der Blase darstellt. Alle Messungen wurden in zweifacher Bestimmung durchgeführt. Die Mittelwerte wurden für die Auswertung genutzt. Am Beginn eines jeden Messtages wurde das Surfactometer kalibriert. Mit bekannten Referenz-Substanzen (Wasser, Methanol sowie ein 1:1 Wasser / Methanol-Gemisch) wurde täglich die Funktionalität überprüft.

3.4.6 Surface area cycling

Material

Verschiedene Partikel	Beschrieben in Kapitel 3.2.3
Curosurf [®]	Asche Chiesi, Hamburg, Deutschland
Rotator	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Wärmeschrank	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
12 x 75 mm Plastik-Röhrchen	BD, Heidelberg, Deutschland

Surface area cycling simuliert *in vitro* die *in vivo*-Umwandlung der oberflächenaktiven Surfactant-Subtypen (tubuläres Myelin, Lamellarkörper) in großteils inaktive Subtypen (unilamellare Vesikel). Für eine genauere Beschreibung siehe Kapitel 2.3. Ziel der Versuche war es, den Einfluss von industriell synthetisierten Partikeln während des Umwandlungsprozesses zu erkunden. Zu diesem Zweck wurden Surfactant / Partikel Mischungen mit Partikelkonzentrationen von 50-500 $\mu\text{g/ml}$ (Phospholipidkonzentration 1,5 mg/ml) hergestellt und in 12 x 75 mm Plastik-Röhrchen gefüllt. Die Surfactant-Mischungen wurden anschließend 8 h mit 0,43 Hz im Dunkeln bei 37 °C gedreht. Hierdurch wechselte die Oberfläche zweimal pro Drehung von 1,1 cm^2 zu 9 cm^2 . Anschließend wurde die Oberflächenspannung der Surfactant-Partikel-Mischung im Pulsierenden-Blasen-Surfactometer gemessen.

3.5 Transmissionselektronenmikroskopie

Schnelle Elektronen weisen eine sehr viel kleinere Wellenlänge auf als sichtbares Licht. Deshalb kann mit einem Elektronenmikroskop eine deutlich höhere Auflösung (bis etwa 0,1 nm) als mit einem konventionellen Lichtmikroskop (Auflösung etwa 1 μm) erreicht werden. Die zu untersuchende Probe wird hierbei von Elektronen durchdrungen. Magnetspulen können anschließend die Elektronenstrahlen bündeln und das stark vergrößerte Bild auf einen Leuchtschirm projizieren.

3.5.1 Elektronenmikroskopie der Surfactant-Ultrastruktur

Material

Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
HEPES	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS	Lonza, Basel, Schweiz
Osmiumtetroxid	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Uranylacetat	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Aceton	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Epon	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Ultramikrotom	Leica, Wien, Österreich
Philips cm12 TEM	Philips Electron Optics, Zürich, Schweiz

Elektronenmikroskopische Bilder der Surfactant Ultrastruktur wurden in Kooperation mit Dr. Christian Mühlfeld, Institut für Anatomie, Universität Bern, Schweiz und Prof. Dr. Andreas Schmiedl, Abteilung für funktionelle und angewandte Anatomie, Medizinische Hochschule Hannover, Deutschland angefertigt.

500 μl der Surfactant Mischung wurden mit 500 μl des Fixans (1,5 % Glutaraldehyd und 1,5 % Paraformaldehyd in 0,15 M HEPES-Puffer) gemischt. Die Proben wurden für 1 Stunde bei Raumtemperatur sowie mindestens 24 h bei 4 $^{\circ}\text{C}$ gelagert und. Anschließend wurden die Proben bei 10.000 g (20 min) zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mehrmals gewaschen und anschließend in Osmiumtetroxid und halb-gesättigtem wässrigem Uranylacetat postfixiert. Anschließend folgten mehrere Dehydrierungsschritte mit Aceton in ansteigenden Konzentrationen. Darauf Folgend wurden die Proben bei 60 $^{\circ}\text{C}$ in

Epon eingebettet. Mittels eines Ultramikrotoms wurden 50 nm-Schnitte angefertigt. Die Bildaufnahme erfolgte mit einem Philips cm12 Transmissionselektronenmikroskop.

3.5.2 Repräsentative Bilder der Partikel

Material

Formvar beschichtete 75 Mesh Kupfergrids	Plano, Wetzlar, Deutschland
109T Transmissionselektronenmikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Bilder der verwendeten Partikel wurden in Kooperation mit Dr. Karin Pulskamp, Institut für Toxikologie und Genetik, Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Deutschland angefertigt.

Die Partikel wurden auf mit Formvar beschichtete 75 Mesh Kupfergrids aufgetropft. Anschließend wurden die Proben bei Raumtemperatur getrocknet. Die Analyse erfolgte mittels eines Zeiss 109T Transmissionselektronenmikroskop.

3.6 Statistische Auswertungen

Mittelwerte \pm SD wurden angegeben. Die statistische Analyse wurde mit GraphPad Prism[®], Version 4.03, durchgeführt.

Im Falle einer vermuteten monotonen Dosis-Wirkungs-Beziehung wurden die Mittelwerte paarweise mit der jeweiligen Kontroll-Gruppe verglichen. Deshalb konnte das Prinzip von sogenannten "closed test procedures" in Verbindung mit hierarchisch angeordneten Hypothesen verwendet werden (110-112). Dementsprechend wurden die Hypothesen Dosis-abhängig angeordnet. Mit der höchsten Dosis wurde der Vergleich begonnen und das Signifikanz-Level wurde auf $\alpha = 0,05$ gesetzt. Die Vergleichs-Prozedur wurde beim ersten nicht-signifikanten Resultat gestoppt. Daraus folgt, dass alle Werte $p < 0,05$, die nach dem ersten nicht-signifikanten Vergleich getestet werden, als nicht signifikant deklariert werden.

Wurden keine monotonen Dosis-Wirkungs-Beziehungen vermutet, wurden die Mittelwerte paarweise mittels t-test und anschließender Bonferroni-Korrektur auf Signifikanzen getestet.

4 Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit beschreiben die Interaktionen zwischen Feinstaub-Partikeln und pulmonalem Surfactant. Des Weiteren werden pathophysiologische Konsequenzen dieser Interaktionen beschrieben. Durch die Wahl verschiedener Partikel, verschiedener Surfactant-Komponenten sowie verschiedener *in vitro*-Systeme wird im Folgenden auf drei unterschiedliche Blöcke eingegangen:

1. Die Interaktion zwischen Surfactant Protein D und Allergenpartikeln sowie die Konsequenz dieser Interaktion auf die Aufnahme der Partikel in Epithelzell-Monokulturen. Der Einfluss auf die Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren wird ebenfalls beschrieben.
2. Die Interaktion zwischen Surfactant Protein D und Allergenpartikeln sowie die Konsequenz dieser Interaktion auf die Aufnahme der Partikel in Zellen eines Triple-Zellkultur-Modells, bestehend aus Makrophagen, Epithelzellen und Dendritischen Zellen. Der Einfluss auf die Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren wird ebenfalls dargestellt.
3. Die Interaktion zwischen industriell synthetisierten TiO₂-Nanopartikeln und einer natürlichen Surfactantpräparation (Curosurf®). Die Auswirkungen dieser Interaktion auf die biophysikalische Surfactant-Funktion sowie auf die Surfactant-Ultrastruktur werden beschrieben.

4.1 Einfluss von Surfactant Protein D auf die Allergenpartikelaufnahme in Epithelzell-Monokulturen

In diesem Kapitel wird die Aufnahme und Assoziation von Subpollen-Partikeln (SPP) in beziehungsweise an Epithelzellen der Lunge, kultiviert in einer Monokultur, beschrieben. Des Weiteren wird auf die Modulation dieser Aufnahme durch Surfactant Protein D (SP-D) eingegangen. Inerte Polystyren-Partikel (PP; Durchmesser 1 µm) dienen als Vergleichs-Partikel. Zusätzlich wird die Ausschüttung verschiedener proinflammatorischer Mediatoren beschrieben.

Mit drei verschiedenen Epithelzell-Monokulturen wurde während dieser Versuche gearbeitet:

1. Menschliche primäre bronchiale Epithelzellen, welche kommerziell erworben wurden (Normale Humane Bronchiale Epithelzellen; NHBE). Mit diesen Zellen wurde der Großteil der Experimente durchgeführt.
2. Humane Primäre Bronchiale Epithelzellen (HPBEC), welche von gesunden Probanden mittels Bürstenabstrich gewonnen wurden. Mit diesen Zellen wurden ausgewählte Experimente, welche mit den NHBE durchgeführt wurden, wiederholt. Eine partielle Validierung der Ergebnisse sollte so erfolgen.
3. A549-Zellen. In diesen Versuchen sollte überprüft werden, ob die Zelllinie A549 ein geeignetes Zellsystem für diese Versuche ist.

4.1.1 Normale Humane Bronchiale Epithelzellen

Wie in Abbildung 10 zu erkennen ist, sind NHBE grundsätzlich in der Lage SPP aufzunehmen.

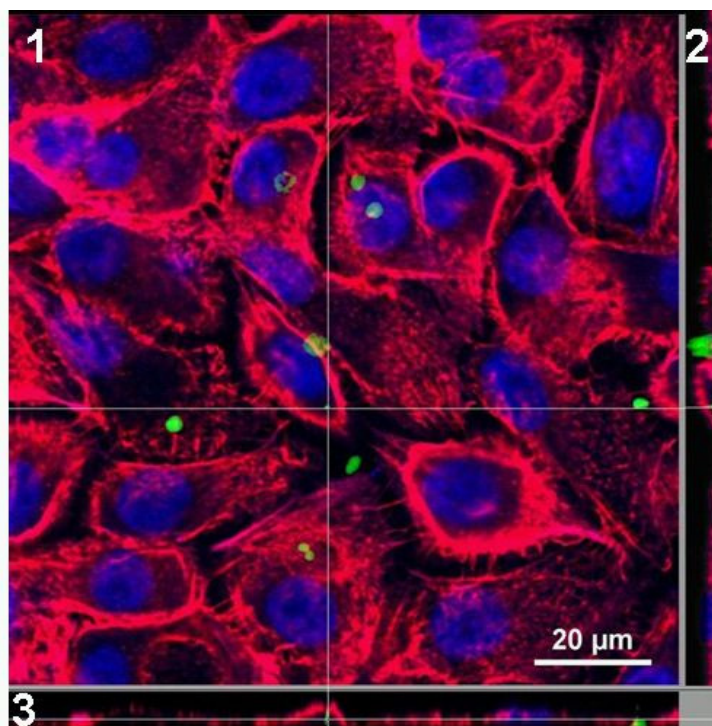


Abbildung 10: Repräsentatives Bild eines von Normalen Humanen Bronchialen Epithelzellen (NHBE) internalisierten, Subpollen-Partikels (SPP).

Das Bild wurde mit einem konfokalen Mikroskop erstellt und zeigt 3 verschiedenen Schnittebenen durch eine NHBE-Monokultur, welche mit SPP inkubiert wurde. Die weißen Linien zeigen die Schnittflächen in der Ebene 1. Die Querschnitte sind in den Ebenen 2 und 3 zu erkennen. Ein aufgenommenes SPP liegt in der Mitte des Fadenkreuzes. Grün: ALEXA488 (SPP); Rot: Rhodamin phalloidin (F-Aktin Zytoskelett); Blau: Topro-3-Iodid (Zellkerne)

Eine Quantifizierung mittels eines Durchflusszytometers ergab, dass die Anzahl der positiven Zellen (Epithelzellen, welche mindestens 1 Partikel aufgenommen oder gebunden hatten) einer Dosis-Wirkungsbeziehung folgte (Abbildung 11A). Nach Verdopplung der Partikelkonzentration von 5×10^6 SPP/cm² auf 10×10^6 SPP/cm² stieg die Anzahl der SPP-positiven Zellen von $8,7 \pm 4,5$ % auf $13,4 \pm 6,0$ % ($p < 0,05$). Eine weitere Verdopplung der Partikelkonzentration führte zu einer signifikanten Erhöhung auf $20,7 \pm 8,3$ % positive Zellen. Auch die Anzahl der PP-positiven Zellen stieg mit steigender Partikelkonzentration. Eine 8 h Inkubation mit 5×10^6 PP/cm² führte zu $33,9 \pm 9,9$ % positiven Zellen. Eine Erhöhung der Partikelkonzentration auf 10×10^6 PP/cm² und 20×10^6 PP/cm² führte zu signifikanten Erhöhungen der Anzahl der positiven Zellen. Werte von $44,5 \pm 8,6$ % und $57,6 \pm 14,2$ % wurden erreicht. Nach Inkubationen mit gleichen Partikeldosen waren also mehr NHBE PP-positiv als SPP-positiv ($p < 0,05$; Abbildung 11A). Die durchschnittliche mean fluorescence intensity (MFI), welche ein Parameter für die relative Anzahl der Partikel pro einzelne Zelle ist, blieb mit steigender Partikelkonzentration für beide Partikelsorten statistisch unverändert (Abbildung 11B). Dies lässt darauf schließen, dass die Anzahl der durchschnittlich aufgenommenen und gebundenen Partikel je einzelne Zelle nicht signifikant verändert wurde.

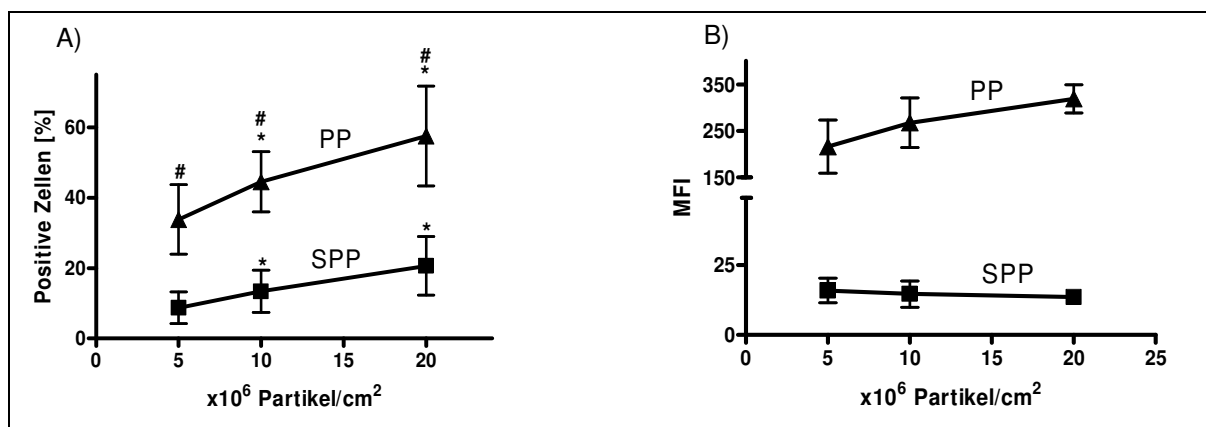


Abbildung 11: Quantifizierung der Aufnahme und Adhäsion von Partikeln in und an Normale Humane Bronchiale Epithelzellen (NHBE).

A) Anzahl der Subpollen-Partikel (SPP)- und Polystyren-Partikel (PP)-positiven Zellen, gemessen im Durchflusszytometer. B) Mean Fluorescence Intensity (MFI) der SPP- und PP-positiven Zellen. Angezeigt sind Mittelwerte aus mindestens 4 Experimenten \pm SD. * $p < 0,05$ gegen den eigenen Kontrollwert (5×10^6 Partikel/cm²). # $p < 0,05$ gegen den Wert der gleichen Partikelkonzentration der SPP-positiven Zellen.

Eine gleichzeitige Inkubation von SPP mit SP-D (SP-D) führt zu einer signifikanten Erhöhung der positiven NHBE. Repräsentative Bilder sind in Abbildung 12 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass bei gleichzeitiger Zugabe von $10 \mu\text{g/ml}$ SP-D mehr SPP aufgenommen bzw. gebunden wurden (Abbildung 12A und B) als bei einer Inkubation ohne SP-D (Abbildung 12C und D).

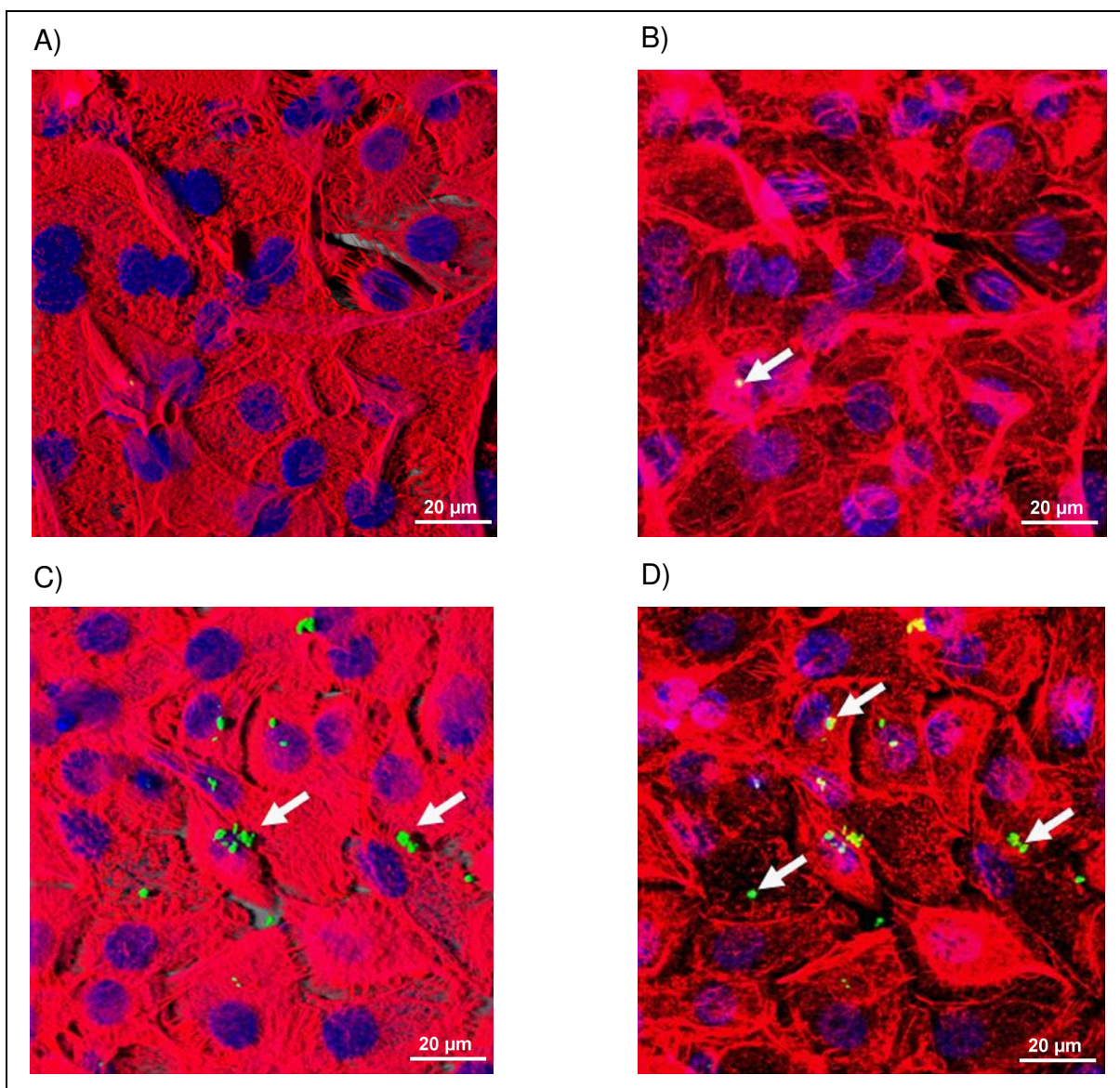


Abbildung 12: Repräsentative Darstellung des Effekts von Surfactant Protein D (SP-D) auf die Aufnahme und Adhäsion von Subpollen-Partikeln (SPP) in beziehungsweise an Normale Humane Bronchiale Epithelzellen (NHBE).

A) Aufsicht auf die NHBE nach Inkubation mit 5×10^6 SPP/cm². B) Durchsicht durch die NHBE nach Inkubation mit 5×10^6 SPP/cm². C) Aufsicht auf die NHBE nach Inkubation mit 5×10^6 SPP/cm² + 10 µg/ml SP-D. D) Durchsicht durch die NHBE nach Inkubation mit 5×10^6 SPP/cm² + 10 µg/ml SP-D. Grün: ALEXA488 (SPP); Rot: Rhodamin phalloidin (F-Aktin Zytoskelett); Blau: Topro-3-Iodid (Zellkerne).

Eine anschließende detaillierte Quantifizierung ergab, dass nach gleichzeitiger Inkubation mit 10 µg/ml SP-D sowie 5×10^6 SPP/cm² ein signifikanter Anstieg im Vergleich zu einer Inkubation ohne SP-D von $8,6 \pm 4,6$ % auf $14,6 \pm 7,2$ % positiven NHBE vorlag (Abbildung 13A). Die MFI positiver Zellen blieb erneut unbeeinflusst (Abbildung 13C). Die Anzahl der Epithelzellen, welche PP aufgenommen oder gebunden hatten, sowie die MFI der PP-positiven Zellen wurde durch SP-D [1-10 µg/ml] nicht beeinflusst (Abbildung 13B und D).

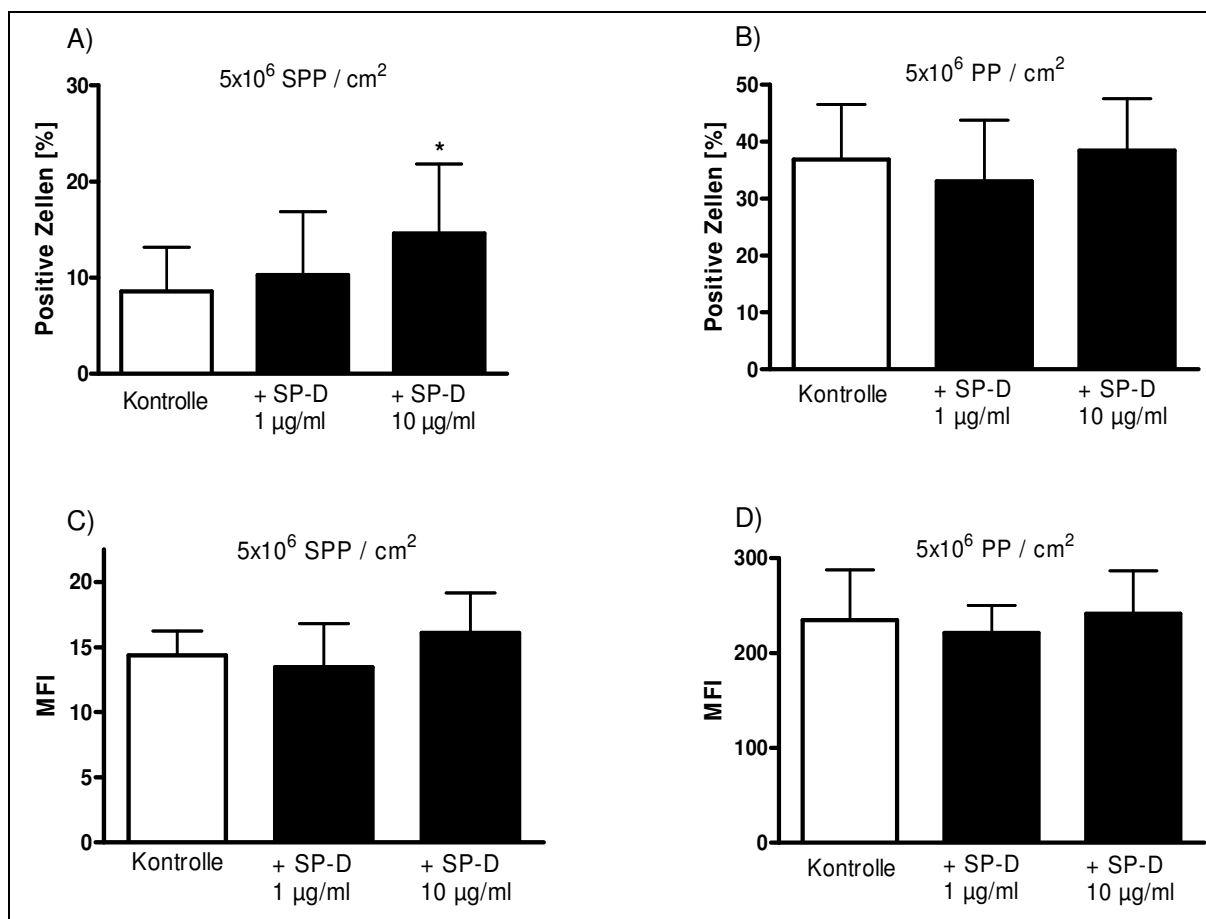


Abbildung 13: Quantifizierung des Einflusses von Surfactant Protein D (SP-D) auf die Aufnahme und Adhäsion von Partikeln in beziehungsweise an Normale Humane Bronchiale Epithelzellen (NHBE).

A) Einfluss von SP-D auf die Anzahl der Subpollen-Partikel (SPP)-positiven Zellen, gemessen im Durchflusszytometer. B) Einfluss von SP-D auf die Anzahl der Polystyren-Partikel (PP)-positiven Zellen. C) Einfluss von SP-D auf die mean fluorescence intensity (MFI) SPP-positiver Zellen. D) Einfluss von SP-D auf die MFI PP-positiver Zellen. Angezeigt sind Mittelwerte aus mindestens 3 Experimenten ± SD. * $p < 0.05$.

Da durch eine Analyse mittels Durchflusszytometrie nicht unterschieden werden kann, ob eine positive Zelle SPP aufgenommen oder gebunden hat, wurden Bilder mit einem konfokalen Mikroskop erstellt. Jede einzelne Zelle wurde auf intrazelluläre und gebundene SPP untersucht (Abbildung 14). Nach 8-stündiger Inkubation mit 5×10^6 SPP/cm² wurden $6,8 \pm 7,0$ % NHBE gefunden, welche mindestens 1 SPP internalisiert hatten. Diese Zellen konnten zusätzlich auch SPP gebunden haben. Weitere $5,8 \pm 6,6$ % hatten SPP ausschließlich gebunden und keine SPP internalisiert. Nach Koinkubation mit 1 µg/ml SP-D blieb die Zahl der Zellen, welche mindestens ein SPP internalisiert hatten, konstant. Jedoch stieg die Zahl der NHBE, die SPP ausschließlich gebunden hatten, auf $12,3 \pm 9,9$ % an ($p=0,05$). Dieser Werte wurde durch Koinkubation mit 10 µg/ml SP-D auf $24,2 \pm 12,0$ % gesteigert ($p=0,07$). Auch bei dieser SP-D Konzentration bleibt die Anzahl der Zellen, welche mindestens 1 SPP internalisiert hatten, konstant.

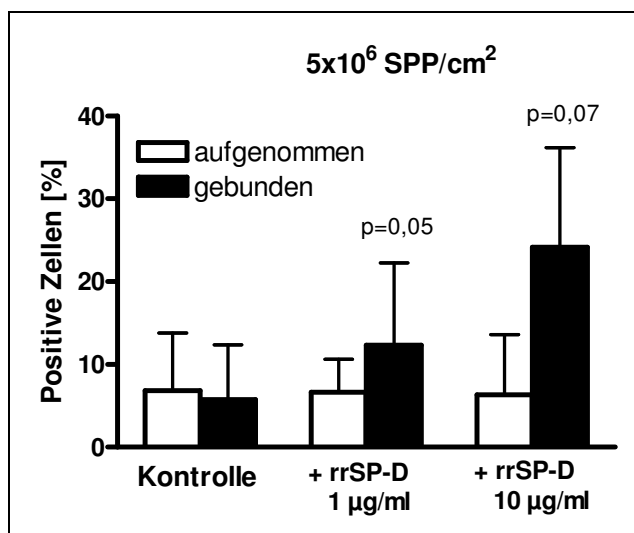


Abbildung 14: Differenzierung zwischen Normalen Humanen Bronchialen Epithelzellen (NHBE), die Subpollen-Partikel aufgenommen oder ausschließlich gebunden hatten.

NHBE, welche mindestens 1 SPP aufgenommen hatten wurden als "aufgenommen" bezeichnet. Diese Zellen konnten zusätzlich SPP gebunden haben. NHBE, welche SPP ausschließlich gebunden hatten, wurden als "gebunden" bezeichnet. Mindestens 10 Bilder mit je 30 Zellen wurden mittels eines konfokalen Mikroskops erstellt. Jede einzelne Zelle wurde auf intrazelluläre SPP untersucht. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD. p-Werte wurden gegen die jeweilige Kontrolle berechnet.

Neben der Inkubation mit dem vollständigen SP-D, führte auch die Inkubation mit einem rekombinanten Fragment des humanen SP-D (rfhSP-D) zu einer Erhöhung der Anzahl der positiven NHBE (Abbildung 15A). Ein Anstieg von $8,7 \pm 4,5$ % auf $13,4 \pm 4,9$ % ($p < 0,05$) konnte jedoch erst ab einer hohen Konzentration von $30 \mu\text{g/ml}$ rfhSP-D beobachtet werden. Im Gegensatz zu einer Inkubation mit SP-D, führte eine Inkubation mit $30 \mu\text{g/ml}$ rfhSP-D auch zu einer Erhöhung der NHBE, welche PP aufgenommen oder gebunden hatten (Abbildung 15B). Ein signifikanter Anstieg von $33,9 \pm 9,9$ % auf $55,5 \pm 16,8$ % wurde verzeichnet. Die MFI positiver Zellen blieb für beide Partikelsorten nach gleichzeitigen Inkubationen mit rfhSP-D [$1-30 \mu\text{g/ml}$] unverändert (Abbildung 15C und D).

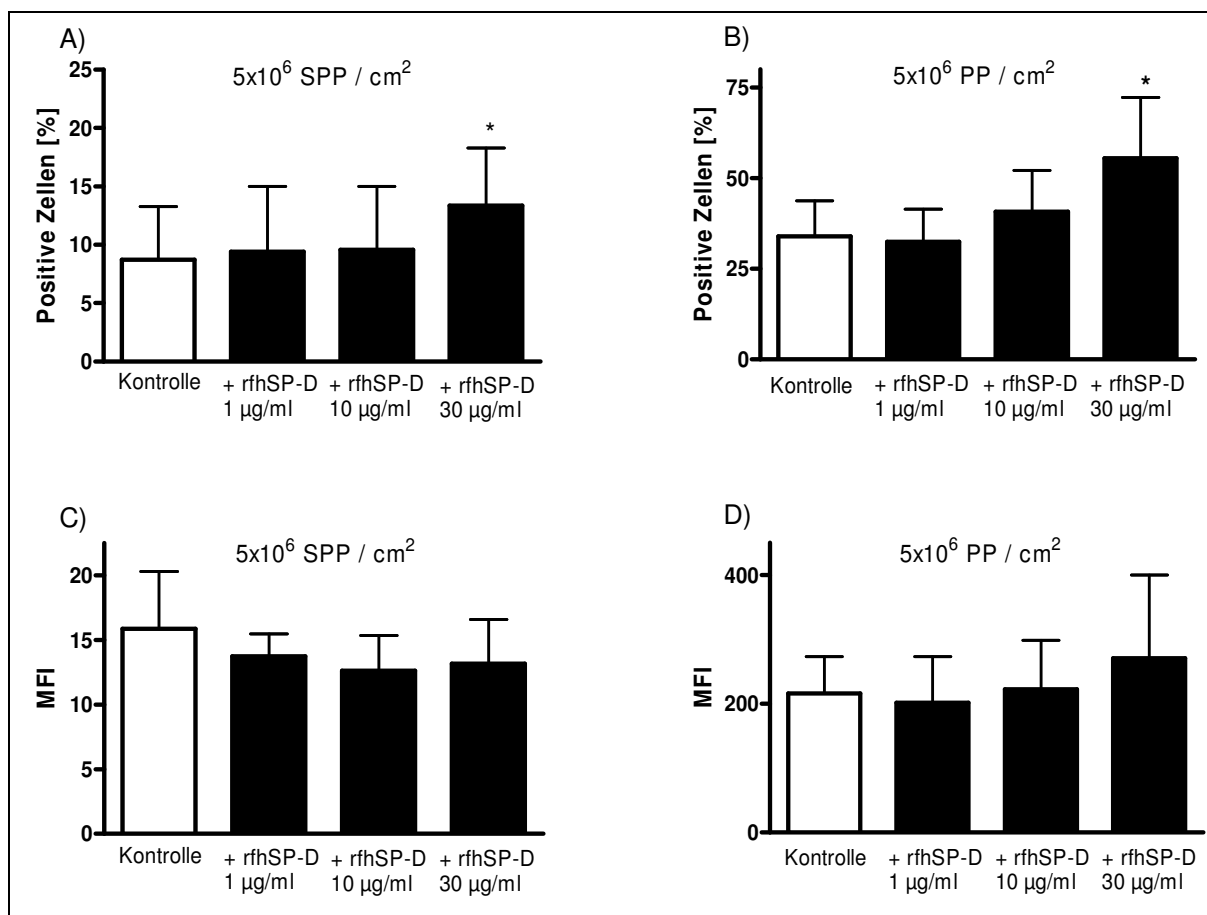


Abbildung 15: Quantifizierung des Einflusses eines rekombinanten Fragments des humanen Surfactant Protein D (rfhSP-D) auf die Aufnahme und Adhäsion von Partikeln in beziehungsweise an Normale Humane Bronchiale Epithelzellen (NHBE).

A) Einfluss von rfhSP-D auf die Anzahl der Subpollen-Partikel (SPP)-positiven Zellen, gemessen im Durchflusszytometer. B) Einfluss von rfhSP-D auf die Anzahl der Polystyren-Partikel (PP)-positiven Zellen. C) Einfluss von rfhSP-D auf die mean fluorescence intensity (MFI) der SPP-positiven Zellen. D) Einfluss auf von rfhSP-D auf die MFI PP-positiver Zellen. Angezeigt sind Mittelwerte aus mindestens 4 Experimenten \pm SD. * $p < 0.05$.

Der Effekt von rfhSP-D konnte nur in einer sehr hohen Konzentration von 30 $\mu\text{g/ml}$ beobachtet werden. Um zu überprüfen, ob dies ein spezifischer oder ein unspezifischer Protein-Effekt ist, wurden die NHBE mit der gleichen Dosis an SPP oder PP plus zusätzlich Humanem-Serum-Albumin (HSA) [1-30 $\mu\text{g/ml}$] inkubiert. HSA wurde hier als Modell für ein weiteres Protein gewählt.

Weder für die Anzahl der SPP- und PP-positiven Zellen noch für die mean fluorescence intensity der SPP- und PP-positiven Zellen konnte nach Inkubation mit HSA ein Anstieg detektiert werden (Graphen nicht dargestellt).

4.1.1.1 Messung verschiedener Zytokine

Um ein mögliches inflammatorisches Potential der Partikelaufnahme zu erkennen, wurden verschiedene proinflammatorische Mediatoren im Zellkulturüberstand der NHBE an zwei verschiedenen Zeitpunkten gemessen: direkt nach der 8-stündigen Inkubation mit Partikeln und SP-D sowie nach weiteren 72 h Inkubation. Hierbei wurde nach 8 h das Kulturmedium über den Epithelzellen gewechselt und somit die sich im Zellkulturmedium befindlichen freien Partikel und Proteine verworfen. So sollte zum einen die direkte kurzfristige Produktion der Zytokine bzw. Chemokine gemessen werden. Weiterhin konnte so eine langfristige Konsequenz dieser 8-stündigen Aufnahme betrachtet werden.

Interleukin (IL)-8 wurde von den Epithelzellen in hohem Maße ausgeschüttet. Nach 8-stündiger Inkubation mit 5×10^6 SPP/cm² stieg der ausgeschüttete IL-8-Grundwert von $55,5 \pm 25,4$ pg/ml auf $329,4 \pm 100,4$ pg/ml (Abbildung 16A). Dieser Wert konnte nach Vervierfachung der SPP-Dosis weiter auf $395,0 \pm 105,7$ pg/ml gesteigert werden ($p < 0,05$). Eine zusätzliche Inkubation mit SP-D führte zu einer weiteren signifikanten Erhöhung des IL-8-Wertes. Inkubation mit 5×10^6 SPP + 10 µg/ml SP-D erhöhte den IL-8 Wert auf $397,1 \pm 88,5$ ($p < 0,05$). Nach weiteren 72 h Inkubation mit frischem Zellkultur-Medium war dieser erhöhende Effekt durch SP-D jedoch nicht mehr zu detektieren (Abbildung 16B). Es war jedoch noch immer eine signifikant höhere Ausschüttung von IL-8 nach Inkubation mit 20×10^6 SPP/cm² im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle messbar. Werte von $342,9 \pm 98,4$ pg/ml (Kontrolle) und $700,4 \pm 150,4$ pg/ml (20×10^6 SPP/cm²) wurden erkannt. Auch Polystyren-Partikel führten zu einer erhöhten Ausschüttung von IL-8 durch NHBE. Diese Werte waren jedoch bei gleicher Partikelkonzentration geringer als die durch SPP induzierte Ausschüttung. Eine 8-stündige Inkubation mit 20×10^6 PP/cm² erhöhte die Ausschüttung von IL-8 im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle von $85,9 \pm 9,1$ pg/ml auf $203,2 \pm 38,7$ pg/ml (Abbildung 16C). Diese Erhöhung hatte auch nach 72 Stunden bestand. Der Kontrollwert von $209,3 \pm 24,0$ wurde signifikant auf $638,3 \pm 50,7$ erhöht (Abbildung 16D).

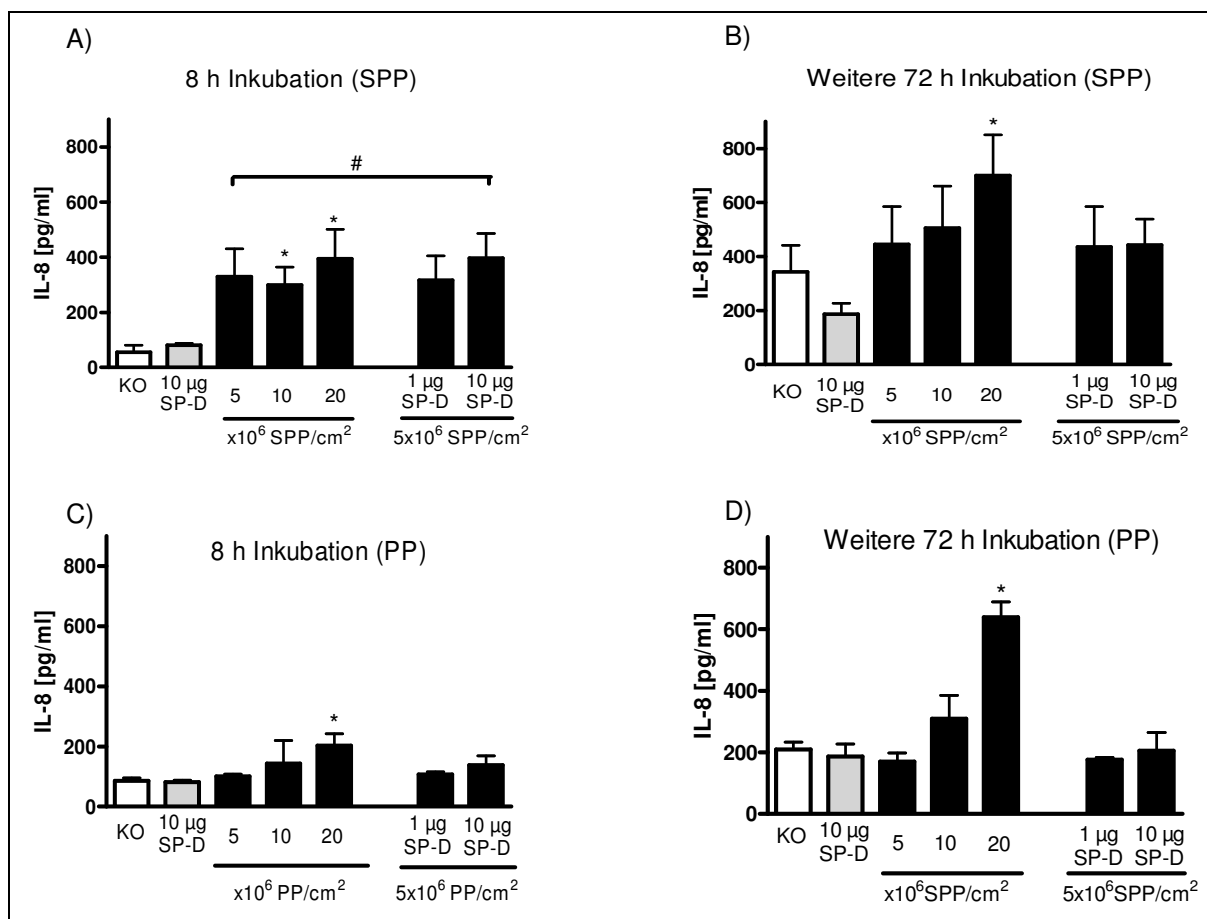


Abbildung 16: Messung von Interleukin-8 nach Inkubation von Normalen Humanen Primären Bronchialen Epithelzellen (NHBE) mit Partikeln.

A) 8-stündige Inkubation mit Subpollen-Partikeln (SPP) und Surfactant Protein D (SP-D). B) Weitere 72 h Inkubation mit frischem Medium. C) 8-stündige Inkubation mit Polystyren-Partikeln (PP) und SP-D. D) Weitere 72 h Inkubation mit frischem Medium. Angezeigt sind Mittelwerte aus mindestens 3 Experimenten \pm SD; * $p < 0.05$ gegen die Kontrolle (KO; Zellen ohne Zusätze).

Neben IL-8 wurde auch der Einfluss von SPP und PP auf die Ausschüttung von Eotaxin, MCP-1, IL-1-alpha, RANTES und GM-CSF gemessen. Dies sind proinflammatorische Zytokine und Chemokine. Eine Inkubation mit SPP führte durchweg zu sehr geringer Ausschüttung dieser Mediatoren nach 8 h und weiteren 72 h (Tabelle 6). Die ausgeschütteten Mengen lagen durchweg unter dem Quantifizierungslimit.

Tabelle 6: Messungen von verschiedenen Zytokinen und Chemokinen im Überstand von Normalen Humanen Bronchialen Epithelzellen.

8 h Inkubation mit Subpollen-Partikeln						
	Kontrolle	5x10 ⁶ SPP/cm ²	10x10 ⁶ SPP/cm ²	20x10 ⁶ SPP/cm ²	5x10 ⁶ SPP/cm ² + 1 µg/ml SP-D	5x10 ⁶ SPP/cm ² + 10 µg/ml SP-D
EOTAXIN	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.
MCP-1	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.
IL-1-alpha	7,1±1,4	7,3±3,2	5,6±2,0	7,1±1,6	7,6±2,0	11,2±10,3
RANTES	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.
GM-CSF	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.
Weitere 72 h Inkubation mit frischem Medium						
	Kontrolle	5x10 ⁶ SPP/cm ²	10x10 ⁶ SPP/cm ²	20x10 ⁶ SPP/cm ²	5x10 ⁶ SPP/cm ² + 1 µg/ml SP-D	5 x10 ⁶ SPP/cm ² + 10 µg/ml SP-D
EOTAXIN	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.
MCP-1	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.
IL-1-alpha	38,2±12,8	17,3±6,2	13,7±6,2	13,8±4,5	14,4±7,0	13,7±14,6
RANTES	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.
GM-CSF	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.	16,1±10,5	b.q.l.	16,6±7,3

Zeitpunkt der Messung war nach 8-stündiger Inkubation mit Subpollen-Partikeln (SPP) und Surfactant Protein D (SP-D) sowie nach weiteren 72 h Inkubation mit frischem Medium. bql: below quantification limit (jedoch oberhalb des Detektionslimits). nd: not detected (unterhalb des Detektionslimits). Das Detektionslimit lag jeweils 3.2 pg/ml; Das Quantifizierungslimit war jeweils: EOTAXIN 400 pg/ml; MCP-1 16 pg/ml; IL-1-alpha 3,2 pg/ml; RANTES 16 pg/ml; GM-CSF 16 pg/ml.

Eine Inkubation mit PP führte, im Gegensatz zu einer Inkubation mit SPP, zu überhaupt keiner messbaren Ausschüttung von Eotaxin, MCP-1, IL-1-alpha, RANTES und GM-CSF (Tabelle 7).

Tabelle 7: Messungen von verschiedenen Zytokinen und Chemokinen im Überstand von Normalen Humanen Bronchialen Epithelzellen.

8 h Inkubation mit Polystyren-Partikeln						
	Kontrolle	5x10⁶ PP/cm²	10x10⁶ PP/cm²	20x10⁶ PP/cm²	5x10⁶ PP/cm² + 1 µg/ml SP-D	5x10⁶ PP/cm² + 10 µg/ml SP-D
EOTAXIN	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
MCP-1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL-1-alpha	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RANTES	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GM-CSF	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Weitere 72 h Inkubation mit frischem Medium						
	Kontrolle	5x10⁶ PP/cm²	10x10⁶ PP/cm²	20x10⁶ PP/cm²	5x10⁶ PP/cm² + 1 µg/ml SP-D	5 x10⁶ PP/cm² + 10 µg/ml SP-D
EOTAXIN	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
MCP-1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL-1-alpha	n.d.	b.q.l.	n.d.	b.q.l.	n.d.	b.q.l.
RANTES	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GM-CSF	n.d.	n.d.	n.d.	b.q.l.	b.q.l.	n.d.

Die Messung erfolgte nach 8-stündiger Inkubation mit Polystyren-Partikeln (PP) und Surfactant Protein-D (SP-D) sowie nach weiteren 72 h Inkubation mit frischem Medium. b.q.l.: below quantification limit (jedoch oberhalb des Detektionslimits). n.d.: not detected (unterhalb des Detektionslimits); Das Detektionslimit war jeweils 3,2 pg/ml; Das Quantifizierungslimit war jeweils: EOTAXIN 400 pg/ml; MCP-1 16 pg/ml; IL-1-alpha 3,2 pg/ml; RANTES 16 pg/ml; GM-CSF 16 pg/ml.

4.1.2 Humane Primäre Bronchiale Epithelzellen

Um die Qualität der Ergebnisse, welche mit den kommerziell erworbenen Normalen Humanen Primären Epithelzellen gewonnen wurden, zu überprüfen, wurden ausgewählte Experimente mit Humanen Primären Bronchialen Epithelzellen (HPBEC), welche mittels Bürstenabstrich von gesunden Probanden gewonnen wurden, wiederholt. So konnte eine partielle Validierung durchgeführt werden.

Auch HPBEC sind grundsätzlich in der Lage SPP aufzunehmen (Abbildung 17).

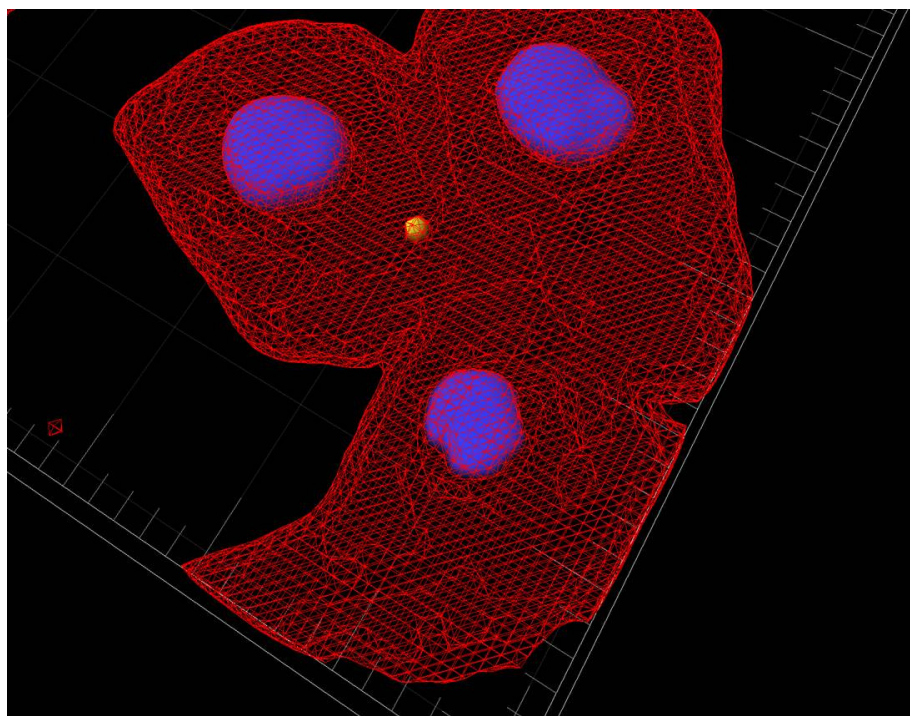


Abbildung 17: 3D-Rekonstruktion eines repräsentativen Bildes, welches die SPP-Aufnahme in Humane Primäre Bronchiale Epithelzellen (HPBEC) zeigt. Das Bild wurde mit einem konfokalen Mikroskop aufgenommen und mit der Software IMARIS[®] ausgewertet. Gelb: ALEXA488 (SPP); Rot: Rhodamin phalloidin (F-Aktin Zytoskelett); Blau: Topro-3-Iodid (Zellkerne).

Die Anzahl der positiven Zellen folgte, analog zu den NHBE, auch bei den HPBEC einer Dosis-Wirkungs-Beziehung. Eine 8-stündige Inkubation mit 5 Millionen SPP/cm² führte zu $8,4 \pm 4,9$ % positiven Zellen (Abbildung 18A). Eine Verdopplung der Partikelkonzentration steigerte diesen Wert auf $11,2 \pm 8,6$ %. Eine weitere Verdopplung führte zu $16,1 \pm 13,0$ % positiven Zellen ($p=0,08$). Eine Koinkubation mit SP-D steigerte tendenziell die Anzahl der positiven HPBEC (Abbildung 18B). $1 \mu\text{g/ml}$ steigerte den Grundwert von $7,8 \pm 5,1$ % auf $12,3 \pm 6,8$ % ($p=0,06$). $10 \mu\text{g/ml}$ SP-D führten zu einer weiteren Erhöhung auf $16,6 \pm 12,9$ % ($p=0,09$). Wie auch bei den kommerziell erworbenen primären Epithelzellen, erhöhte sich die MFI einzelner positiver Zellen nicht mit steigender Partikelkonzentration (Abbildung 18C). Eine signifikante Erhöhung der MFI konnte jedoch nach Zugabe von SP-D detektiert werden (Abbildung 18D). Eine Steigerung von $37,9 \pm 17,8$ auf $50,0 \pm 22,2$ konnte so nach Inkubation mit $10 \mu\text{g/ml}$ SP-D erreicht werden ($p < 0,05$).

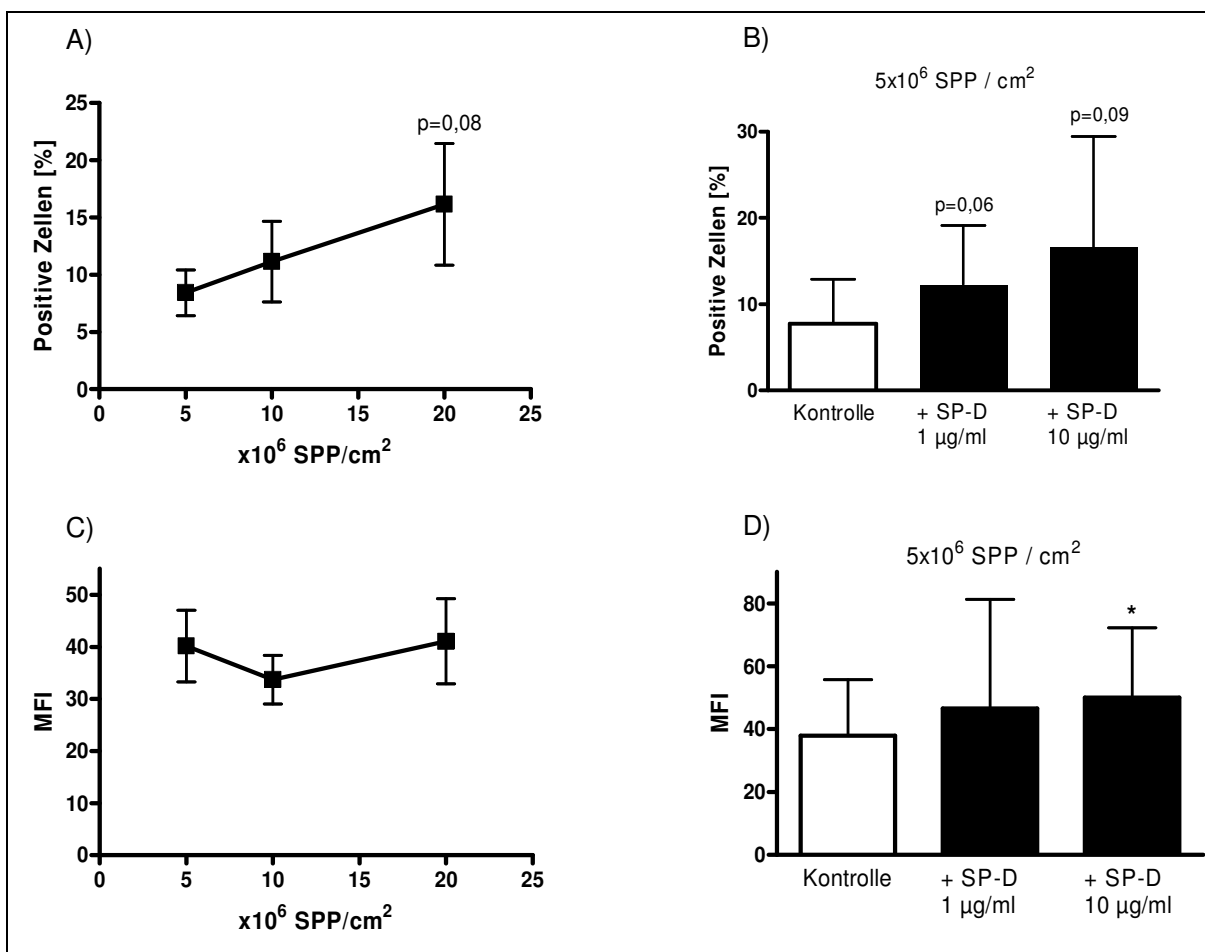


Abbildung 18: Quantifizierung der Aufnahme und Adhäsion von Subpollen-Partikeln (SPP) in beziehungsweise an Humane Primäre Bronchiale Epithelzellen (HPBEC).

A) Anzahl positiver HPBEC nach 8-stündiger Inkubation mit verschiedenen SPP-Konzentrationen. B) Einfluss von Surfactant Protein D (SP-D) auf die Anzahl positiver HPBEC. C) Einfluss verschiedener SPP-Konzentrationen auf die mean fluorescence intensity (MFI) positiver Zellen. D) Einfluss von SP-D auf die MFI positiver Zellen. Angezeigt sind Mittelwerte aus mindestens 5 Experimenten \pm SD. * $p < 0,05$ gegen die Kontrolle (5×10^6 SPP/cm²).

4.1.3 A549-Zellen

Im Gegensatz zu primären Epithelzellen bieten A549-Zellen mehrere Vorteile: sie sind kostengünstiger und lassen sich aufgrund ihrer Immortalisierung leichter und länger kultivieren. Allerdings ist auch gerade diese Immortalisierung ein entscheidender Nachteil. So ist die Zelllinie A549 eine Krebs-Zelllinie und keine gesunde Lungen-Epithelzelle mehr. Deshalb muss für jeden Versuchsansatz von neuem kritisch durchdacht und überprüft werden, ob A549-Zellen geeignet sind die jeweilige Fragestellung zu bearbeiten.

Prinzipiell sind A549-Zellen in der Lage, SPP aufzunehmen. Dies konnte durch konfokale Mikroskopie gezeigt werden (Abbildung 19).

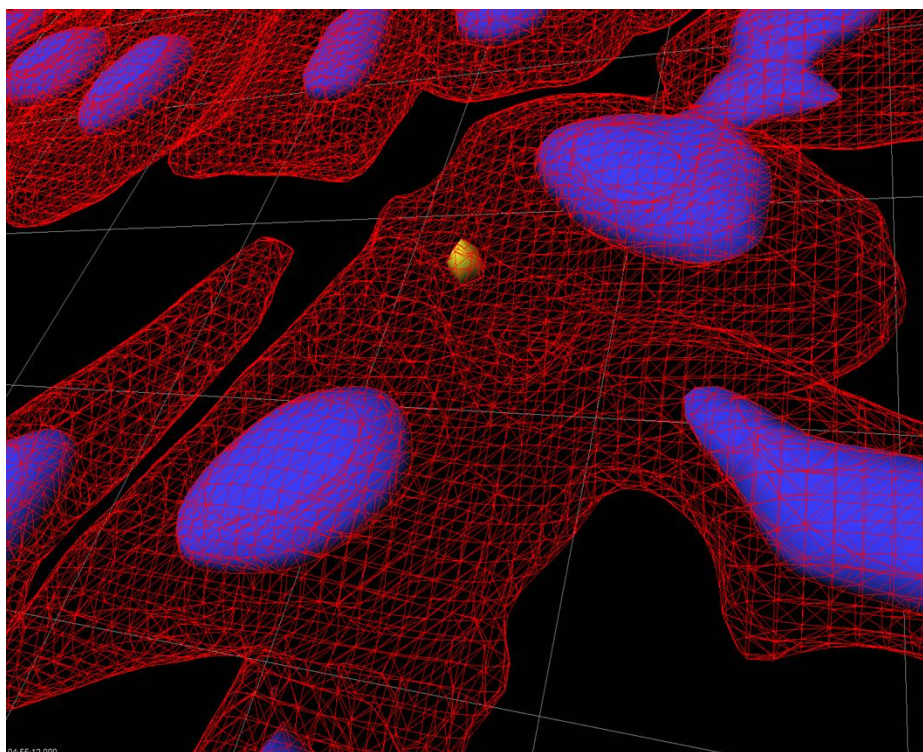


Abbildung 19: 3D-Rekonstruktion eines repräsentativen Bildes, welches die SPP-Aufnahme in A549-Zellen zeigt. Das Bild wurde mit einem konfokalen Mikroskop aufgenommen und mit der Software IMARIS® ausgewertet. Gelb: ALEXA488 (SPP); Rot: Rhodamin phalloidin (F-Aktin Zytoskelett); Blau: Topro-3-Iodid (Zellkerne).

Nach 8-stündiger Inkubation der A549-Zellen mit SPP und PP in ansteigenden Dosen konnte bezüglich der Anzahl der positiven Zellen eine Dosis-Wirkungsbeziehung beobachtet werden (Abbildung 20A). Inkubation mit 5 Millionen SPP/cm² führte zu 15,4 ± 12,3 % positiven Zellen. Eine Verdopplung dieser Dosis erhöhte die Anzahl der positiven Zellen signifikant auf 26,9 ± 21,6 %. Eine weitere Verdopplung der SPP-Menge führte zu einer Steigerung auf 38,0 ± 26,3 % positive Zellen ($p < 0,05$). Auch für PP konnte eine Dosis-Wirkungs-Beziehung bezüglich Partikelaufnahme und Partikeladhäsion beobachtet werden ($p < 0,05$). Inkubation mit 5, 10 und 20 Millionen PP/cm² führte zu 27,5 ± 17,9 %, 38,7 ± 21,7 % sowie 55,7 ± 23,2 % positiven A549-Zellen. Die MFI positiver Zellen zeigte eine leichte Steigerung mit steigender PP-Dosis ($p < 0,05$; Abbildung 20B). Für die SPP konnte diese Steigerung der MFI nicht beobachtet werden (Abbildung 20B).

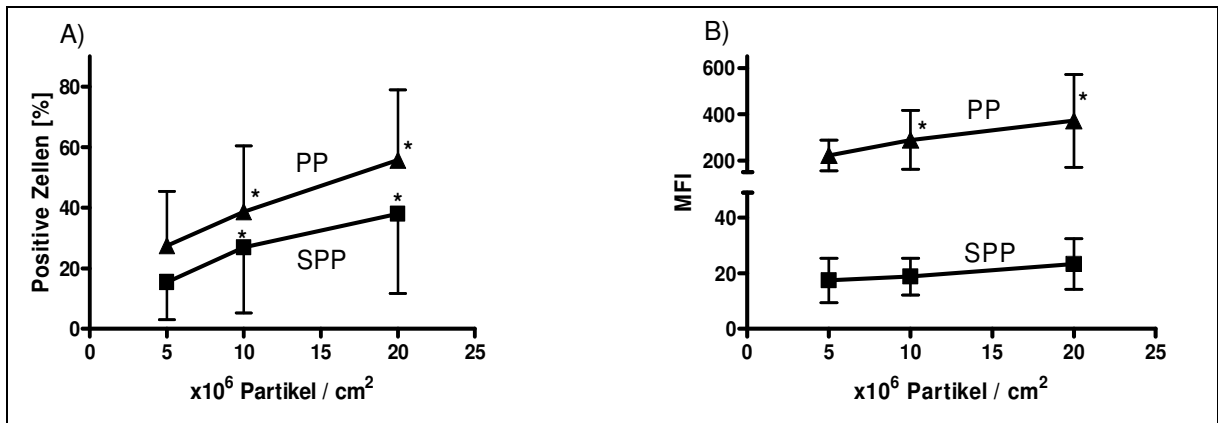


Abbildung 20: Quantifizierung der Aufnahme und Adhäsion von Partikeln in beziehungsweise an A549-Zellen. A) Anzahl der Subpollen-Partikel (SPP)- und Polystyren-Partikel (PP)-positiven Zellen, gemessen im Durchflusszytometer. B) Mean fluorescence intensity (MFI) der SPP- und PP-positiven Zellen. Angezeigt sind Mittelwerte aus mindestens 4 Experimenten \pm SD. * $p < 0.05$ gegen den Grundwert ($5x10^6$ Partikel/ cm^2)

Im Gegensatz zu NHBE hatte SP-D [1-10 μ g/ml] keinen Einfluss auf die SPP-Aufnahme und Adhäsion in beziehungsweise an A549-Zellen (Abbildung 21). Weder die Anzahl der positiven A549-Zellen noch die MFI einzelner positiver Zellen wurde für SPP sowie PP durch SP-D moduliert.

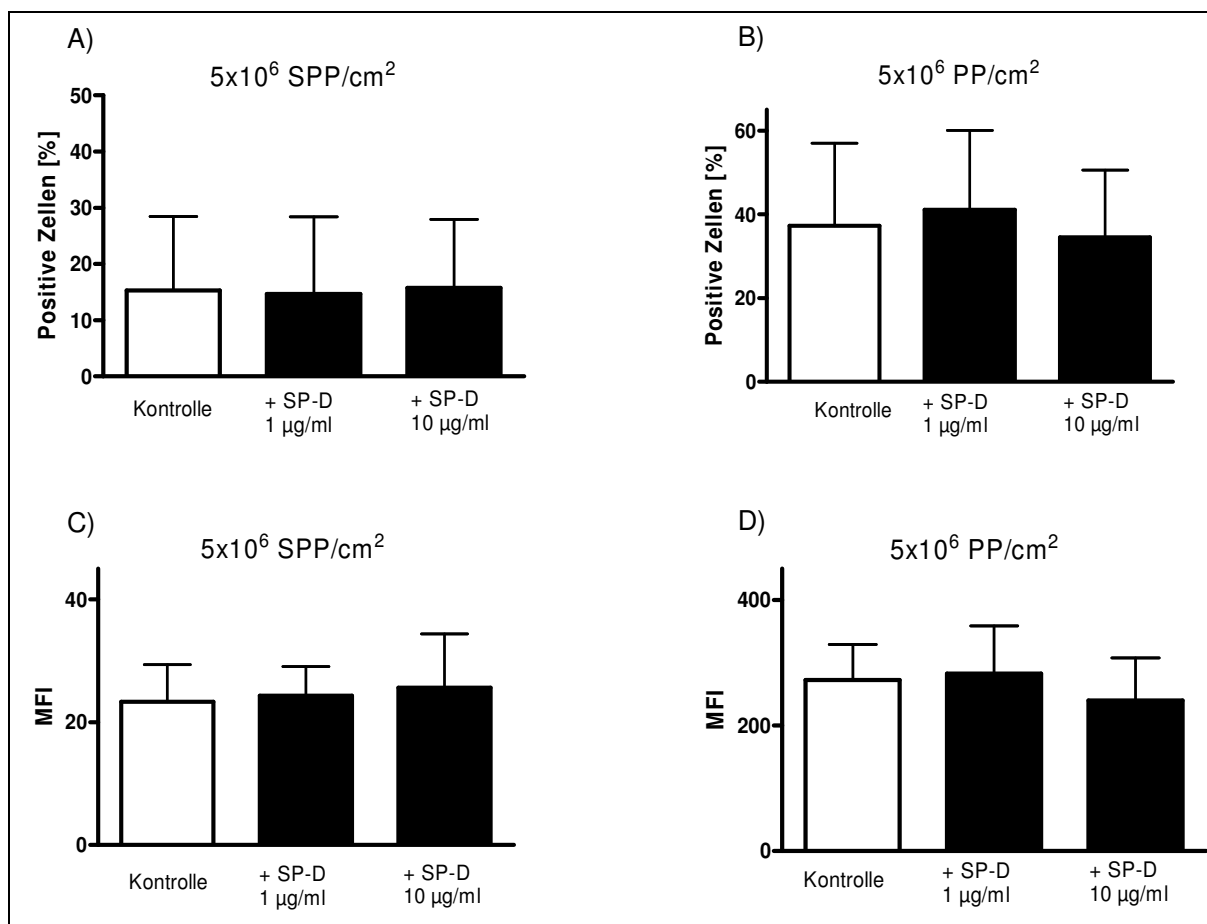


Abbildung 21: Quantifizierung des Einflusses von Surfactant Protein D (SP-D) auf die Aufnahme und Adhäsion von Partikeln in beziehungsweise an A549-Zellen.

A) Einfluss von SP-D auf die Anzahl der Subpollen-Partikel (SPP)-positiven Zellen, gemessen im Durchflusszytometer. B) Einfluss von SP-D auf die Anzahl der Polystyren-Partikel (PP)-positiven Zellen. C) Einfluss von SP-D auf die mean fluorescence intensity (MFI) der SPP-positiven Zellen. D) Einfluss von SP-D auf die MFI PP-positiver Zellen. Angezeigt sind Mittelwerte aus mindestens 3 Experimenten \pm SD. * $p < 0,05$ gegen die Kontrolle.

Auch eine Betrachtung des Einflusses des rekombinanten Fragments von humanem SP-D (rhSP-D) zeigte, dass sich A549-Zellen anders als NHBE verhalten. Inkubation mit rhSP-D [1-30 µg/ml] führt zu keiner statistisch nachweisbaren Veränderung der Anzahl der SPP- oder PP-positiven Zellen (Abbildung 22A und B). Auch die MFI positiver Zellen zeigte sich unverändert (Abbildung 22C und D).

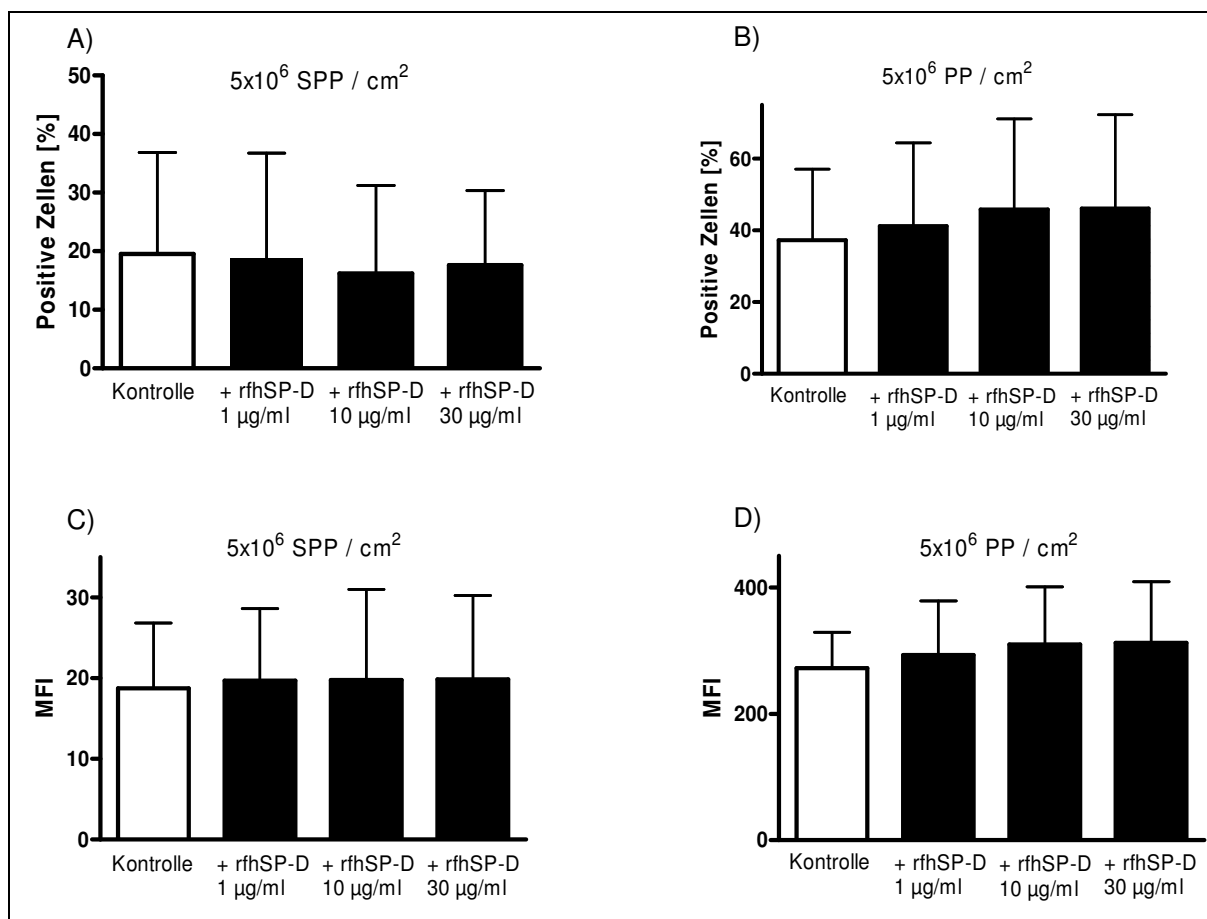


Abbildung 22: Quantifizierung des Einflusses eines humanen rekombinanten Fragments des Surfactant Protein D (rfhSP-D) auf die Aufnahme und Adhäsion von Partikeln in beziehungsweise an A549-Zellen. A) Einfluss von rfhSP-D auf die Anzahl der Subpollen-Partikel (SPP)-positiven Zellen, gemessen im Durchflusszytometer. B) Einfluss von rfhSP-D auf die Anzahl der Polystyren-Partikel (PP)-positiven Zellen. C) Einfluss von rfhSP-D auf die MFI SPP-positiver Zellen. D) Einfluss von rfhSP-D auf die MFI PP-positiver Zellen. Angezeigt sind Mittelwerte aus mindestens 4 Experimenten \pm SD. * $p < 0.05$ gegen die Kontrolle.

4.2 Vergleich der Epithelzell-Monokulturen

Um einen direkten Vergleich der Epithelzellen, kultiviert in Monokulturen, durchführen zu können, werden in Tabelle 8 wichtige Parameter nebeneinander dargestellt. Hierbei wird die Anzahl der positiven NHBE, HPBEC sowie A549 nach 8-stündiger Inkubation mit 5×10^6 SPP/cm², 10×10^6 SPP/cm², 20×10^6 SPP/cm² sowie nach 8-stündiger Inkubation mit 5×10^6 SPP/cm² + SP-D [1 -10 µg/ml] dargestellt.

Bei jedem verwendeten Zelltyp ist eine Dosis-Wirkungs-Beziehung für die Anzahl der Zellen, welche an der Aufnahme und Adhäsion der SPP beteiligt waren (positive Zellen) nach Inkubationen mit steigenden SPP-Konzentrationen zu erkennen. Im Falle der NHBE und A549 sind diese Steigerungen signifikant. SP-D [10 µg/ml] sorgte für einen signifikanten

Anstieg positiver NHBE sowie für einen tendenziellen Anstieg positiver HPBEC. Die Anzahl SPP-positiver A549-Zellen wurde durch SP-D nicht beeinflusst.

Tabelle 8: Direkter Vergleich zwischen Monokulturen von NHBE, HPBEC sowie A549

	NHBE	p	HPBEC	p	A549	p
5x10⁶ SPP (KO)	8,7 ± 4,5		8,4 ± 4,9		15,4 ± 12,3	
10x10⁶ SPP	13,4 ± 6,0	*	11,2 ± 8,6	n.s.	26,9 ± 21,6	*
20x10⁶ SPP	20,7 ± 8,3	*	16,1 ± 13,0	n.s.	38,0 ± 26,3	*
5x10⁶ SPP + 1 µg/ml SP-D	10,3 ± 6,6	n.s.	12,3 ± 6,8	n.s.	14,6 ± 5,2	n.s.
5x10⁶ SPP + 10 µg/ml SP-D	14,6 ± 7,2	*	16,6 ± 12,9	n.s.	15,8 ± 4,6	n.s.

Dargestellt ist die Anzahl der an der Aufnahme beteiligten Normalen Humanen Bronchialen Epithelzellen (NHBE), Humanen Primären Bronchialen Epithelzellen (HPBEC) und A549-Zellen nach 8-stündiger Inkubation mit Subpollen-Partikel (SPP) sowie Surfactant Protein D (SP-D). * p < 0,05 gegen die jeweilige Kontrolle (5x10⁶ SPP). n.s.: p > 0,05 gegen die Kontrolle.

4.3 Einfluss von Surfactant Protein D auf die Allergenpartikel Aufnahme in Zellen eines Triple-Zellkultur-Modells

Epithelzellen in einer Monokultur weisen zwar untereinander Zell-Zell-Kontakte auf, die in einer *in vivo*-Situation wichtigen Kontakte zu anderen Zelltypen fehlen hingegen völlig. Um diese *in vivo*-Situation besser abbilden zu können, wurde die SPP-Aufnahme sowie der Einfluss von SP-D auf diese Aufnahme nach 8-stündiger Inkubation in Zellen eines Triple-Zellkultur-Modells untersucht. Da die Aufnahme nicht mit einem Durchflusszytometer, sondern ausschließlich mittels eines konfokalen Mikroskops untersucht wurde, konnte in diesen Versuchen eindeutig gezeigt werden, welche Zellen SPP aufgenommen hatten. Eine Adhäsion der Partikel fand hier keine Berücksichtigung. Des Weiteren wurde durch eine spezielle Software (Diacount[®]) eine absolute Quantifizierung der Partikel Aufnahme durchgeführt. Mit dieser Software konnten die aufgenommenen SPP einzeln gezählt werden.

Jeder der im Triple-Zellkultur-Modell-verwendeten Zelltypen war in der Lage Subpollen-Partikel aufzunehmen. Dies konnte für Makrophagen (Abbildung 23A), Epithelzellen (Abbildung 23B) und Dendritische Zellen (Abbildung 23C) gezeigt werden.

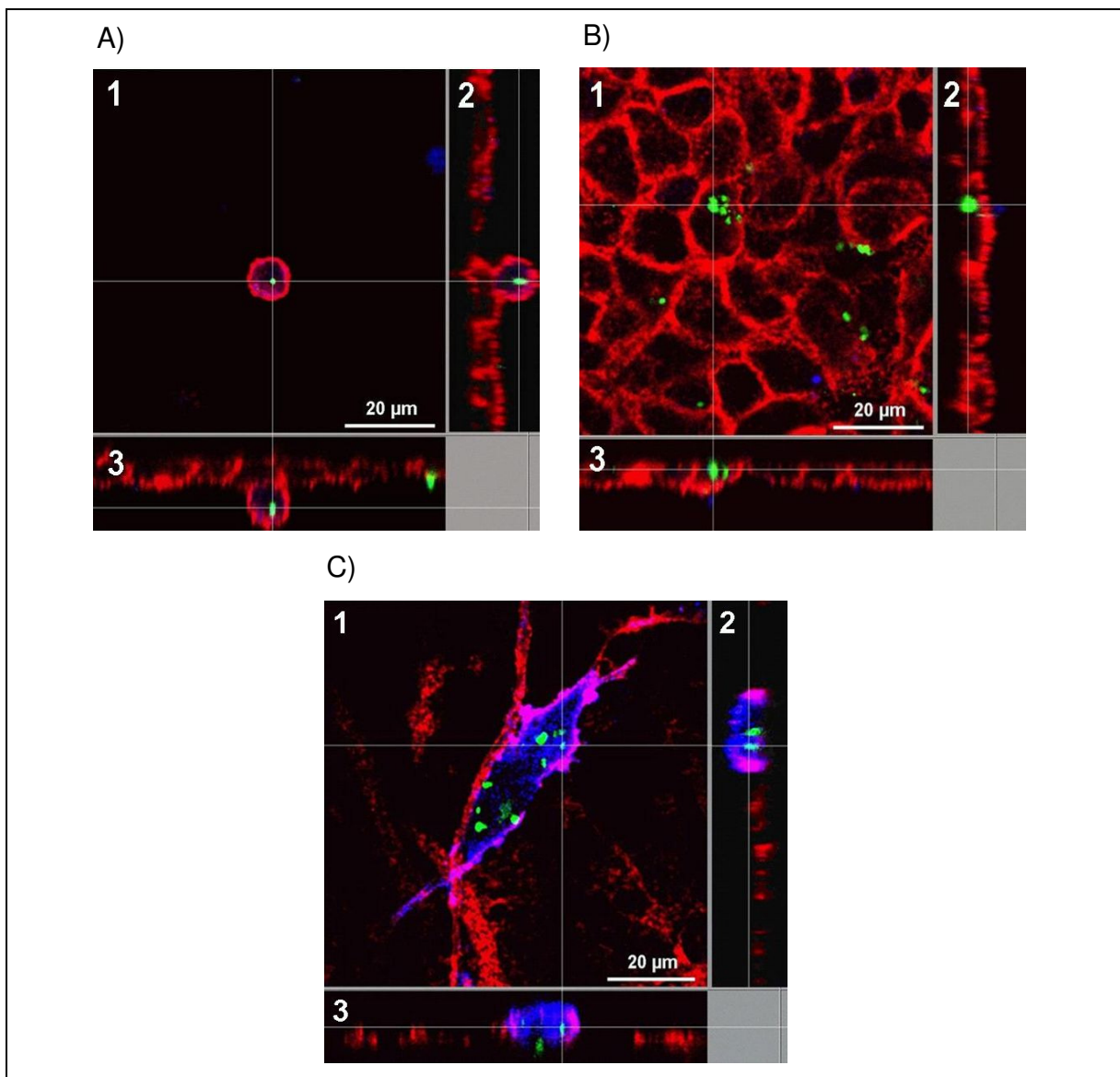


Abbildung 23: Repräsentative Bilder internalisierter Subpollen-Partikel (SPP).

Die Bilder wurden mit einem konfokalen Mikroskop erstellt und zeigen jeweils 3 verschiedenen Schnittebenen durch einen Makrophagen (A), eine Epithelzelle (B) sowie eine Dendritische Zelle (C). Die weißen Linien zeigen die Schnittflächen in der Ebene 1. Die Querschnitte sind in den Ebenen 2 und 3 zu erkennen. Ein aufgenommenes SPP liegt jeweils in der Mitte des Fadenkreuzes. Grün: ALEXA488 (SPP); Rot: Rhodamin phalloidin (F-Aktin Zytoskelett); Blau: CD14 (A) sowie CD86 (C).

Nach Inkubation mit insgesamt 10 Millionen SPP (Wachstumsfläche der Zellen $4,2 \text{ cm}^2$), hatten $43,0 \pm 24,1 \%$ der Makrophagen, $2,9 \pm 0,8 \%$ der Epithelzellen sowie $47,9 \pm 31,9 \%$ der Dendritischen Zellen mindestens 1 SPP aufgenommen (Abbildung 24). Nach Koinkubation mit SP-D [$1-10 \mu\text{g/ml}$] konnten diese Werte signifikant erhöht werden. $75,4 \pm 10,0 \%$ der Makrophagen sowie $18,7 \pm 10,0 \%$ der Epithelzellen waren nach zusätzlicher Inkubation mit $10 \mu\text{g/ml}$ SP-D positiv und hatten mindestens 1 SPP aufgenommen.

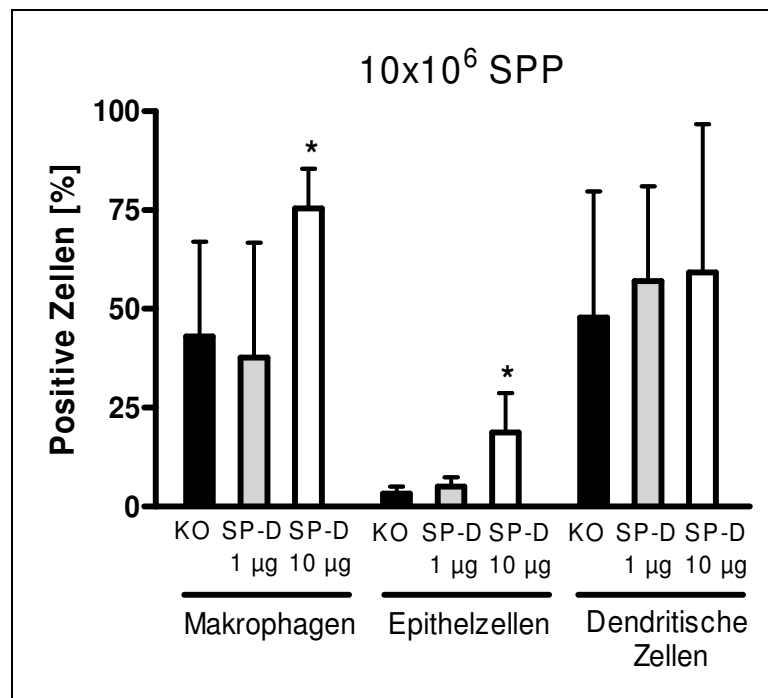


Abbildung 24: Anzahl der Zellen in einem Triple-Zellkultur-Modell, welche mindestens 1 Subpollen-Partikel (SPP) aufgenommen haben. Angezeigt sind Mittelwerte aus mindestens 6 Experimenten \pm SD. * $p < 0.05$.

Diese Änderung der Anzahl der aufnehmenden Zellen kann mittels repräsentativen Bildern visualisiert werden (Abbildung 25).

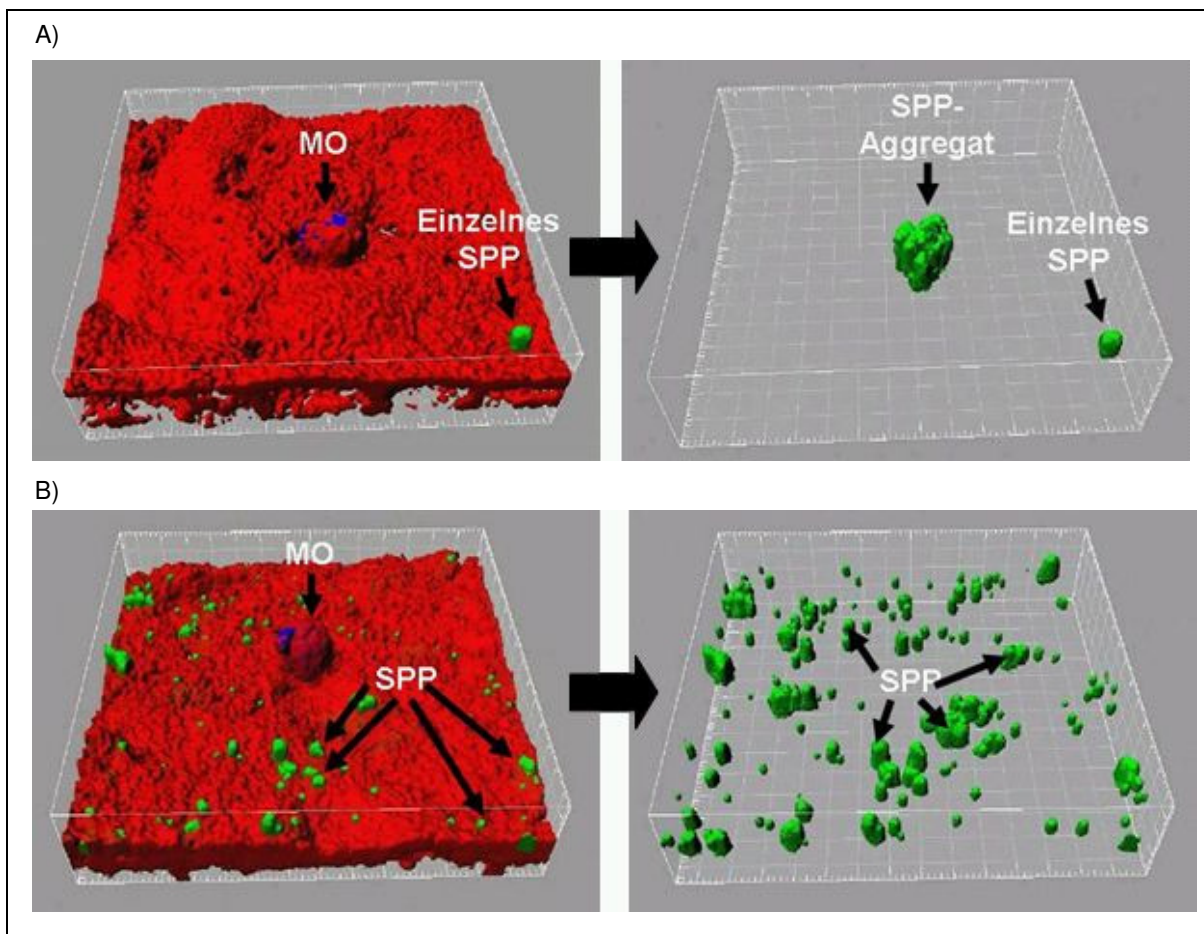


Abbildung 25: Repräsentative Bilder über den Einfluss von Surfactant Protein D (SP-D) auf die Aufnahme von Subpollen-Partikeln (SPP).

Die Bilder wurden mit einem konfokalen Mikroskop erstellt. Die 3-dimensionale Rekonstruktion der Bilder erfolgte mit der Software IMARIS®. Links ist eine Aufsicht auf das Triple-Zellkultur-Modell zu erkennen. Rechts wurden die Zellgrenzen ausgeblendet und es sind nur noch die SPP zu erkennen, welche sich in Zellen des Modells befinden. A) Inkubation mit 10 Millionen SPP über 8 Stunden. Ein großes SPP-Aggregat befindet sich im Makrophagen (MO) B) Inkubation mit 10 Millionen SPP + 10 µg/ml SP-D. SPP befinden sich verteilt in den Zellen. Grün: ALEXA488 (SPP); Rot: Rhodamin phalloidin (F-Aktin Zytoskelett); Blau: CD14

Anders verhält sich eine Quantifizierung der Anzahl der aufgenommenen SPP pro positiver Zelle. Hatte ein positiver Makrophage nach Inkubation mit 10 Millionen SPP durchschnittlich $21,5 \pm 17,5$ SPP aufgenommen, verringerte sich dieser Wert tendenziell nach Inkubation mit SP-D auf $15,5 \pm 11,7$ [1 µg/ml] und $10,7 \pm 9,5$ [10 µg/ml]. Auch die Dendritischen Zellen nahmen tendenziell weniger SPP auf. Aus anfänglich $31,2 \pm 40,7$ aufgenommenen SPP je positiver DC wurden nach Inkubation mit 1 µg/ml SP-D $19,9 \pm 28,7$ sowie $10,1 \pm 6,4$ aufgenommene SPP nach Inkubation mit 10 µg/ml SP-D. Die Anzahl der aufgenommenen SPP je positiver Epithelzelle blieb nach Inkubation mit SP-D [1-10 µg/ml] nahezu unverändert.

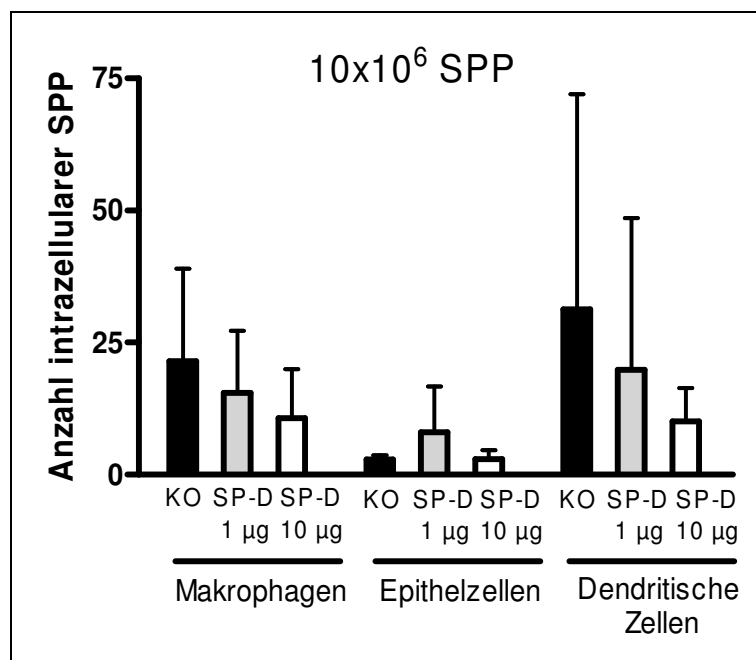


Abbildung 26: Quantifizierung der Anzahl aufgenommener Subpollen-Partikel (SPP) je einzelner positiver Zelle. Angezeigt sind Mittelwerte aus mindestens 6 Experimenten \pm SD. * $p < 0.05$. SP-D: Surfactant Protein D

4.3.1 Messung verschiedener Zytokine

Die Zellen im Triple-Zellkultur-Modell wurden 8 Stunden mit den SPP sowie SP-D inkubiert. Anschließend wurden sämtliche freien SPP sowie das freie SP-D abgewaschen, die Membran ausgeschnitten und mit der Unterseite nach oben in eine neue well-Platte gegeben. Die Dendritischen Zellen zeigten nun nach oben. Autologe T-Zellen wurden nun in 2 ml Medium zugegeben. Nach 72-stündiger Inkubation wurden die Zellkulturüberstände entnommen und verschiedene proinflammatorische Zytokine und Chemokine wurden gemessen.

Eine Inkubation mit 10 Millionen SPP führte zur erhöhten Ausschüttung verschiedener Zytokine. So wurde unter anderen IL-1-alpha nach Inkubation mit 10 Millionen SPP verstärkt ausgeschüttet. Eine signifikante Erhöhung von $108,2 \pm 66,0$ pg/ml auf $170,6 \pm 121,7$ pg/ml konnte verzeichnet werden. Zugaben von SP-D veränderten diese Ausschüttung nicht. Auch eine Erhöhung von G-CSF konnte gemessen werden. 10 Millionen SPP erhöhten die Ausschüttung von 1853 ± 1303 pg/ml auf 2823 ± 1870 pg/ml ($p=0,07$). Eine Koinkubation mit SP-D [1-10 µg/ml] führte hier zu einem leichten, jedoch nicht signifikanten Abfall in der G-CSF Konzentration im Medium. Auch TNF-alpha wurde nach Inkubation mit 10 Millionen SPP erhöht vorgefunden. Der Kontrollwert von $150,9 \pm 129,7$ pg/ml wurde auf $339,4 \pm 355,4$ pg/ml erhöht ($p=0,05$). Auch hier war eine leichte, jedoch nicht signifikante Modulation

in Richtung einer verminderten Ausschüttung durch SP-D zu detektieren. Mip-1beta konnte nach Inkubation mit 10 Millionen SPP gesteigert gemessen werden. Der Grundwert von $1211 \pm 298,7$ pg/ml wurde auf $1408 \pm 406,2$ pg/ml erhöht ($p < 0,05$). Dieser Wert wurde nicht durch SP-D moduliert. Zu einer Verdopplung der Ausschüttung kam es nach Inkubation mit 10 Millionen SPP im Falle von IL-6. Der Grundwert von $1119 \pm 887,6$ pg/ml wurde auf 2327 ± 1732 pg/ml gesteigert ($p < 0,05$). Hier kam es wieder zu einem Trend einer Verminderung der Ausschüttung von IL-6 durch SP-D.

Tabelle 9: Messung verschiedener Zytokine im Überstand des Triple-Zellkultur-Modells.

72 Stunden Inkubation					
	Kontrolle	10×10^6 SPP	10×10^6 SPP + 1 μ g/ml SP-D	10×10^6 SPP + 10 μ g/ml SP-D	10 μ g/ml SP-D
IL-1-alpha	$108,2 \pm 66,0$	$170,6 \pm 121,7$ *	$149,6 \pm 101,2$	$192,7 \pm 172,3$	$102,0 \pm 72,5$
G-CSF	1853 ± 1303	2823 ± 1870	2665 ± 1700	2534 ± 1585	2596 ± 1586
TNF-alpha	$150,9 \pm 129,7$	$339,4 \pm 355,4$	$250,2 \pm 307,1$	$268,8 \pm 310,0$	$235,3 \pm 363,8$
MIP-1beta	$1211 \pm 298,7$	$1408 \pm 406,2$ *	$1297 \pm 660,5$	$1448 \pm 518,8$	$1224 \pm 505,2$
IL-6	$1119 \pm 887,6$	2327 ± 1732 *	$1717 \pm 854,3$	1812 ± 1166	$1051 \pm 429,1$

Die Zellen wurden für 8 Stunden mit Subpollen-Partikeln (SPP) und Surfactant Protein-D (SP-D) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach Zugabe von autologen CD4-positiven T-Zellen weitere 72 h mit frischem Medium inkubiert. Angezeigt sind Mittelwerte [pg/ml] aus mindestens 8 Experimenten \pm SD. * $p < 0,05$ gegen die Kontrolle (Zellen ohne Partikel und Proteine). Das Detektionslimit war jeweils 3,2 pg/ml; Das Quantifizierungslimit war jeweils: IL-1-alpha 80 pg/ml; G-CSF 80 pg/ml; TNF alpha 80 pg/ml; Mip 1 beta 80 pg/ml; IL-6 16 pg/ml

Eine Inkubation mit SPP führte zu einer hohen Ausschüttung von IL-8. Bereits nach 8 Stunden wurde der hohe Grundwert von $25,5 \pm 13,3$ ng/ml auf $42,4 \pm 32,7$ ng/ml durch Inkubation mit 10 Millionen SPP erhöht ($p=0,09$). Dieser Wert konnte durch eine Koinkubation mit SP-D moduliert werden. 10 μ g/ml SP-D führten zu einer signifikanten Verringerung auf $28,5 \pm 16,6$ ng/ml. Dies hatte auch nach 72 Stunden noch Bestand. Eine Koinkubation mit 10 μ g/ml SP-D verringerte den IL-8 Wert von $103,3 \pm 54,3$ ng/ml signifikant auf $50,5 \pm 23,4$ ng/ml.

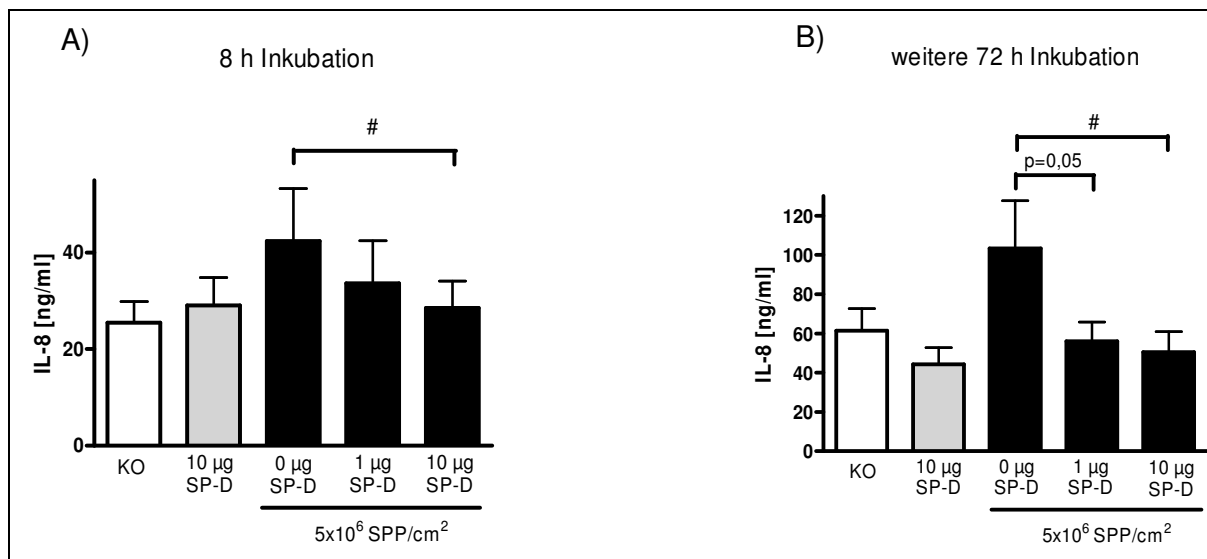


Abbildung 27: Messung von Interleukin (IL)-8 im Überstand des Triple-Zellkultur-Modells.

A) Nach 8 Stunden Inkubation mit Subpollen-Partikeln (SPP) und Surfactant Protein D (SP-D). B) Nach diesen 8 h wurde das Kulturmedium gewechselt, CD4-positive T-Zellen zugegeben und weitere 72 h inkubiert. Angezeigt sind Mittelwerte aus mindestens 5 Experimenten \pm SD. * $p < 0,05$ gegen die Kontrolle (Zellen ohne Partikel und Proteine); # $p < 0,05$. Das Detektionslimit war bei 3,2 pg/ml; Das Quantifizierungslimit lag bei 64 pg/ml.

Eine Messung von IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL12p70, IL-13 und IFN-gamma ergab äußerst geringe oder nicht detektierbare Werte (Tabelle 10). Alleine IP-10 konnte teilweise in hohem Maße gemessen werden. Eine erhöhte Ausschüttung deutete sich nach Inkubation mit 10 Millionen SPP an. Auch ist tendenziell einer Verringerung dieses Wertes durch Koinkubation mit SP-D [1-10 µg/ml] zu erkennen. Allerdings waren die IP-10 Werte, abhängig vom jeweiligen Spender der Zellen, sehr variabel, weshalb keine klare Aussage getroffen werden konnte.

Tabelle 10: Messungen von verschiedenen Zytokinen im Überstand des Triple-Zellkultur-Modells zuzüglich CD4-positiver T-Zellen.

72 Stunden Inkubation					
	Kontrolle	10x10 ⁶ SPP	10x10 ⁶ PP + 1 µg/ml SP-D	10x10 ⁶ SPP + 10 µg/ml SP-D	10 µg/ml SP-D
IL-2	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.
IL-4	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.
IL-5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL-10	b.q.l.	28,6 ± 36,2	24,1 ± 35,3	17,5 ± 17,3	23,8 ± 44,3
IL-12p70	n.d.	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.	n.d.
IL-13	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.
IFN-gamma	b.q.l.	95,0 ± 207,7	b.q.l.	b.q.l.	b.q.l.
IP-10	476,8 ± 742,0	774,1 ± 796,1	b.q.l.	676,6 ± 737,2	620,0 ± 608,5

Zeitpunkt der Messung war 72 h nachdem CD4-positive T-Zellen in frischem Medium zugegeben wurden. Zuvor wurden die Zellen 8 Stunden mit Subpollen-Partikeln (SPP) und Surfactant Protein D (SP-D) inkubiert. Angezeigt sind Mittelwerte aus mindestens 5 Experimenten ± SD. b.q.l.: below quantification limit (jedoch oberhalb des Detektionslimits); n.d.: not detectable (unterhalb des Detektionslimits) Das Detektionslimit war jeweils bei bei 3,2 pg/ml; Das Quantifizierungslimit lag jeweils bei: IL-2 16 pg/ml; IL-4 80 pg/ml; IL-5 3.2 pg/ml; IL-10 16 pg/ml; IL12p70 80 pg/ml; IL-13 16 pg/ml; IFN-gamma 80 pg/ml; IP-10 400 pg/ml

4.4 Interaktionen zwischen Nanopartikeln und Surfactant

Im ersten Teil dieses Ergebnis-Blockes werden repräsentative Bilder der verwendeten industriell synthetisierten TiO₂-Nanopartikel sowie der verwendeten Vergleichs-Partikel dargestellt. Mit diesen sollten die Partikel-Charakteristika (Größe und Form), welche von den Produzenten der Partikel bereitgestellt wurden (Tabelle 5), überprüft werden. Im Anschluss daran werden die Effekte von TiO₂-Nanopartikeln auf die biophysikalische Surfactant-Funktion sowie auf die biophysikalische Surfactant-Funktion nach *surface area cycling* beschrieben. Um einen Hinweis zu erhalten, von welcher Partikeleigenschaft eventuell auftretende Effekte abhängen, wurden vergleichsweise TiO₂-MP sowie Polystyren-NP, Polystyren-MP und Quarz-MP untersucht.

4.4.1 Repräsentative Bilder der Partikel

Die Partikel befanden sich weitestgehend in den von den Herstellern angegebenen Größenbereichen (Abbildung 28). Vereinzelt wichen Partikel davon ab. Diese Abweichungen waren jedoch in der Minderheit und wurden vernachlässigt. Wie vom Hersteller angegeben, lagen die TiO₂-NP, sowie die polystyrenen NP und MP in einer einheitlichen Größe vor. Die TiO₂-MP und Quarz-MP hingegen lagen in einer Größenverteilung vor. Auch hier waren vereinzelt Nanopartikel zu finden. Aufgrund ihrer durchschnittlichen Größe, welche größer 1 µm ist, wurden sie jedoch als Mikropartikel definiert.

Alle Partikelsorten lagerten sich größtenteils zu Aggregaten zusammen. Einzelne freie Nanopartikel wurden jedoch auch gefunden.

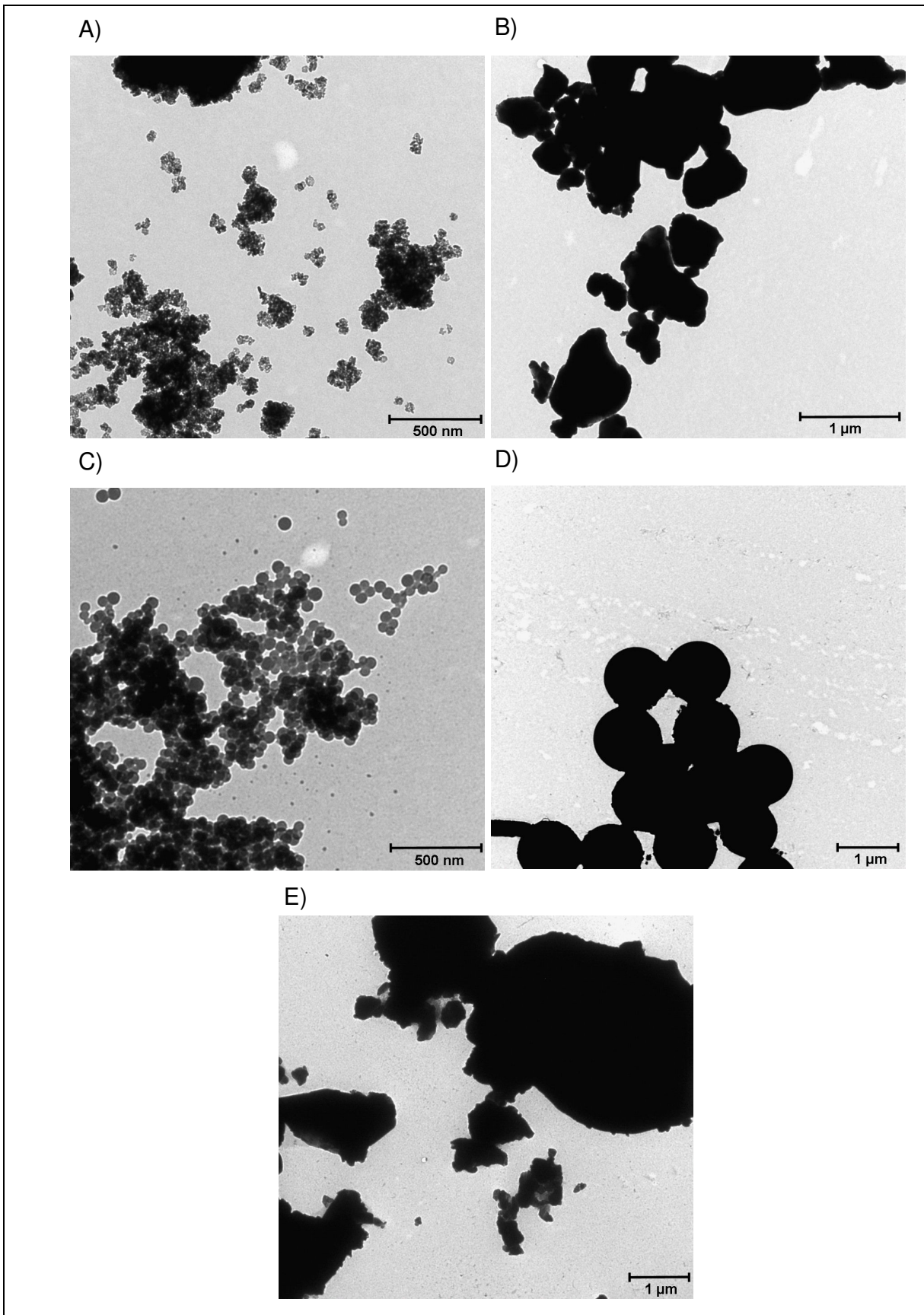


Abbildung 28: Repräsentative Bilder der verwendeten industriell synthetisierten Partikel. Bilder wurden mit einem Transmissionselektronenmikroskop erstellt. A) TiO_2 -Nanopartikel; B) TiO_2 -Mikropartikel; C) Polystyren-Nanopartikel; D) Polystyren-Mikropartikel; E) Quarz-Mikropartikel

4.4.2 Einfluss von Partikeln auf die Surfactant-Funktion

Um zu untersuchen, ob industriell synthetisierte TiO_2 -NP einen Einfluss auf die biophysikalische Funktion des pulmonalen Surfactants haben, wurden TiO_2 -NP [50-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$] mit einer natürlichen Surfactant-Präparation (Curosurf®) inkubiert. Unmittelbar im Anschluss wurde die biophysikalische Surfactant-Funktion im Pulsierenden-Blasen-Surfactometer gemessen.

Surfactant alleine wies eine Adsorptionsoberflächenspannung (γ_{ads}) von ~ 28 mN/m auf. Dieser Wert wurde durch Zugabe von 50-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TiO_2 -NP nicht beeinflusst (Abbildung 29A). Eine Addition von 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TiO_2 -NP führte jedoch zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der Oberflächenspannung auf $30,8 \pm 6,1$ mN/m und $32,5 \pm 8,3$ mN/m (Abbildung 29A). Eine Zugabe von TiO_2 -MP [50-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$] hingegen beeinflusste die Surfactant-Funktion nicht (Abbildung 29b). Wie γ_{ads} so wurde auch die minimale Oberflächenspannung (γ_{min}) durch TiO_2 -NP signifikant erhöht. Eine leichte aber signifikante Steigerung konnte von ≤ 5 mN/m, was aktives Surfactant darstellt, auf $8,2 \pm 4,5$ mN/m nach Inkubation mit 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ festgestellt werden (Abbildung 29C). TiO_2 -MP [50-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$] zeigten erneut keine Auswirkung auf die Oberflächenspannung (Abbildung 29D). Um eine direkte Vergleichbarkeit der Partikel nicht nur durch die Massenkonzentration, sondern auch bezüglich der eingesetzten Oberfläche (m^2/g) zu erreichen, wurde zusätzlich eine sehr hohe Konzentration von TiO_2 -MP eingesetzt. Diese lag in dem Größenbereich, welcher bei TiO_2 -NP eine Surfactant-Dysfunktion induziert hatte. Ein Zusatz von ~ 10 mg/ml führte zu einer Erhöhung der Oberflächenspannung auf $15,9 \pm 3,1$ mN/m ($n=6$, $p < 0.05$; nicht graphisch dargestellt).

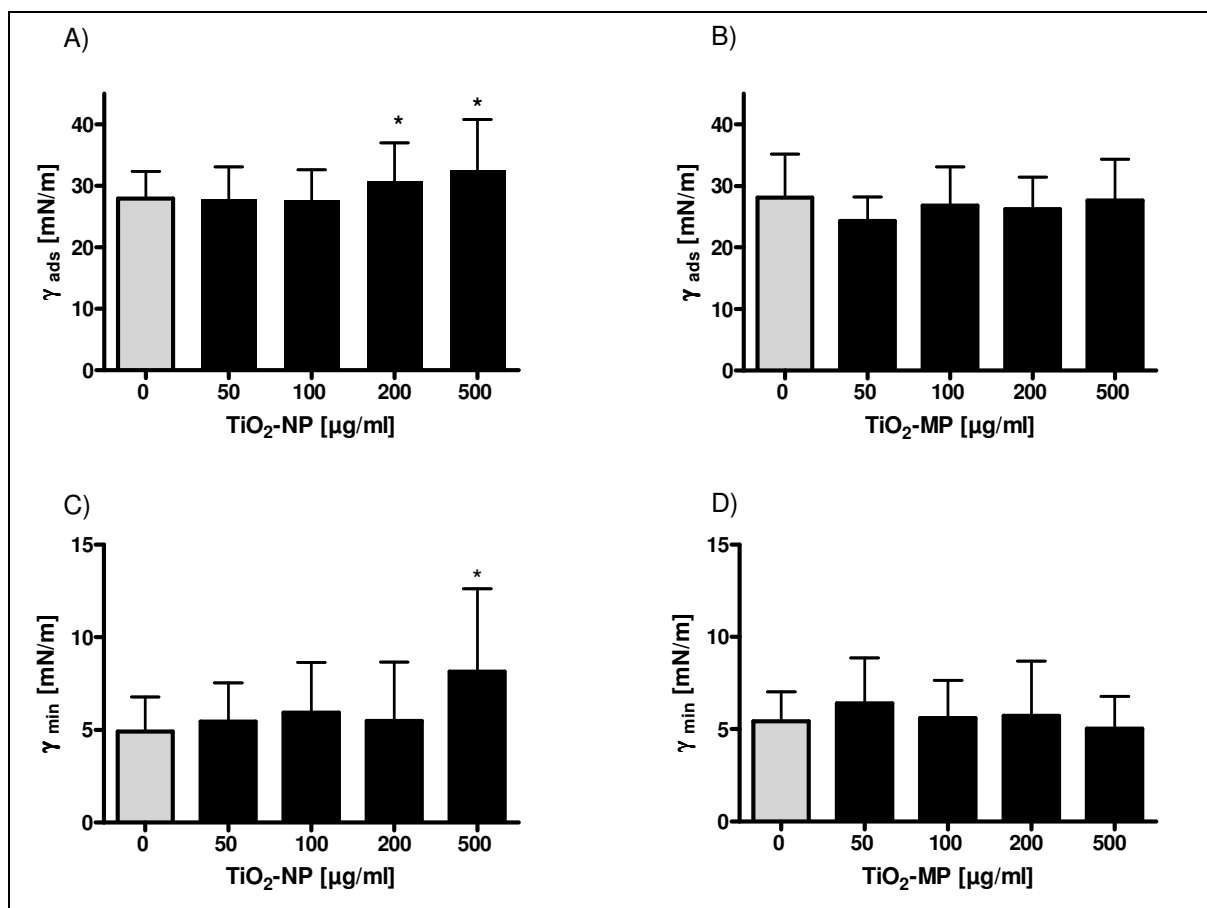


Abbildung 29: Oberflächenspannung von Surfactant nach Inkubation mit TiO₂-Partikeln.

Werte wurden mit einem Pulsierenden-Blasen-Surfactometer ermittelt. A) Adsorptionsoberflächenspannung (γ_{ads}) nach Inkubation mit TiO₂-Nanopartikeln (NP) während eines statischen Blasen Zustandes. B) Einfluss von TiO₂-Mikropartikeln (MP) auf γ_{ads} . C) Einfluss von TiO₂-NP auf die Oberflächenspannung während der Pulsation bei minimaler Blasengröße (γ_{min}). D) γ_{min} nach Inkubation mit TiO₂-MP. Gezeigt sind Mittelwerte aus mindestens 4 Experimenten \pm SD. * $p < 0,05$ zur 0 $\mu\text{g/ml}$ Kontrolle.

Ähnliche Auswirkungen zeigten sich auch bei den Referenz-Partikeln. Eine signifikante Erhöhung der Adsorptionsoberflächenspannung konnte durch 200 $\mu\text{g/ml}$ und 500 $\mu\text{g/ml}$ der polystyrenen Nanopartikel induziert werden. Die minimale Oberflächenspannung wurde durch eine 500 $\mu\text{g/ml}$ Partikelkonzentration signifikant erhöht (Tabelle 11). Die Referenz-Mikropartikel (Polystyren und Quarz) beeinflussten die biophysikalische Surfactant-Funktion nicht (Tabelle 11). Erneut wurden zur Vergleichbarkeit der Oberflächen-Effekte eine hohen Dosis von MP (~ 10 mg/ml Quarz) getestet. Hier wurde eine Erhöhung der γ_{min} auf $15,5 \pm 4,0$ mN/m ($n=5$, $p < 0,05$; nicht graphisch dargestellt) erreicht. Weiterhin wurden kommerziell erworbene Gold-NP (Durchmesser 5 nm; Ziträt-Gruppen auf der Oberfläche) in ausgewählten Konzentrationen zu Vergleichszwecken getestet ($n=4$). 200 $\mu\text{g/ml}$ erhöhten die minimale Oberflächenspannung auf $7,7 \pm 5,7$ mN/m. 500 $\mu\text{g/ml}$ führten zu $13,2 \pm 10,7$ mN/m (nicht graphisch dargestellt).

Tabelle 11: Oberflächenspannung von Surfactant nach Zugabe verschiedener Partikel.

γ_{ads} [mN/m]			
	Polystyren-NP	Polystyren-MP	Quarz-MP
0 $\mu\text{g/ml}$	28,8 \pm 5,4	28,9 \pm 6,5	25,9 \pm 4,6
50 $\mu\text{g/ml}$	27,9 \pm 5,1	28,3 \pm 5,3	25,0 \pm 4,7
100 $\mu\text{g/ml}$	30,2 \pm 7,9	28,6 \pm 5,7	25,0 \pm 5,9
200 $\mu\text{g/ml}$	32,4 \pm 7,6*	30,1 \pm 7,5	26,3 \pm 8,7
500 $\mu\text{g/ml}$	33,3 \pm 8,3*	28,3 \pm 5,7	25,2 \pm 4,3
γ_{min} [mN/m]			
	Polystyren-NP	Polystyren-MP	Quarz-MP
0 $\mu\text{g/ml}$	3,8 \pm 3,3	2,4 \pm 3,0	4,9 \pm 1,4
50 $\mu\text{g/ml}$	4,8 \pm 3,5	2,2 \pm 2,1	4,1 \pm 2,7
100 $\mu\text{g/ml}$	3,8 \pm 3,4	2,8 \pm 4,3	4,6 \pm 2,3
200 $\mu\text{g/ml}$	4,7 \pm 3,9	3,1 \pm 3,2	4,1 \pm 2,8
500 $\mu\text{g/ml}$	6,4 \pm 4,3*	3,0 \pm 3,8	5,0 \pm 2,1

Die Messungen wurden mit einem Pulsierenden-Blasen-Surfactometer direkt nach Partikel-Zugabe durchgeführt. Die Adsorptionsoberflächenspannung γ_{ads} wurde in einem statischen Blasen Zustand gemessen. γ_{min} wurde während der Pulsation bei minimaler Blasengröße bestimmt. Die Mittelwerte aus mindestens 4 Experimenten \pm SD wurden dargestellt.* $p < 0,05$ gegen die jeweilige 0 $\mu\text{g/ml}$ Kontrolle. NP: Nanopartikel; MP: Mikropartikel

4.4.3 Einfluss von Partikeln während *surface area cycling*

Surface area cycling ist ein dynamischer Prozess, welcher zur Konversion der oberflächenaktiven Surfactant-Lamellarkörperchen sowie des tubulären Myelins in großteils inaktive unilamellare Vesikel führt. Dieser Prozess, der *in vivo* während der Atmung in den Alveolen geschieht, kann so *in vitro* simuliert werden.

Surface area cycling von reinem Surfactant führte zu einer Erhöhung der Adsorptionsoberflächenspannung von ~ 28 auf ~ 45 mN/m (Abbildung 30). Eine Anwesenheit von 200 $\mu\text{g/ml}$ oder 500 $\mu\text{g/ml}$ TiO_2 -NP während des Dreh-Prozesses führte zu einer weiteren Erhöhung der Adsorptionsoberflächenspannung ($p < 0,05$) auf $53,3 \pm 3,2$ mN/m und $63,6 \pm 1,0$ mN/m (Abbildung 30A). Eine Inkubation des Surfactants mit TiO_2 -MP bis zu einer Konzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$ führte zu keiner Beeinflussung dieser Oberflächenspannung (Abbildung 30B). Der Einfluss von TiO_2 -NP auf die minimale Oberflächenspannung war beachtlich. 100 $\mu\text{g/ml}$ erhöhten die Oberflächenspannung von $1,1 \pm 0,2$ mN/m signifikant auf $8,2 \pm 6,3$ mN/m (Abbildung 30C). Eine weitere Erhöhung der

Partikel-Dosis induzierte eine starke Surfactant Dysfunktion mit γ_{\min} -Werten von $18,3 \pm 3,4$ mN/m ($200 \mu\text{g/ml}$) und $21,1 \pm 0,7$ mN/m ($500 \mu\text{g/ml}$). TiO_2 -MP führten zu einer leichten, aber nicht signifikanten Erhöhung der minimalen Oberflächenspannung (Abbildung 30D).

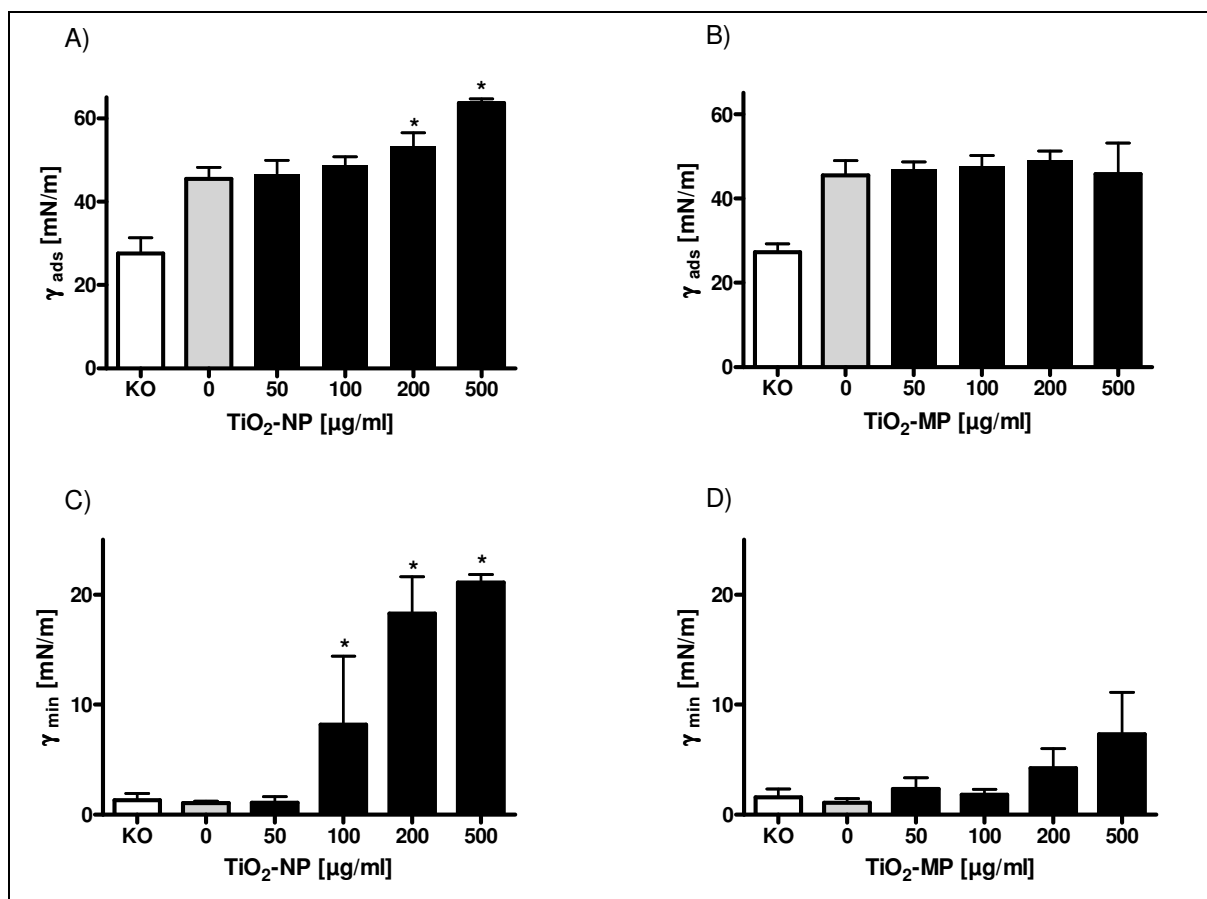


Abbildung 30: Oberflächenspannung nach *surface area cycling* in Anwesenheit von TiO_2 -Partikeln. Die Oberflächenspannung wurde nach 8 stündiger Rotation bei 0,43 Hz und 37 °C gemessen. A) Adsorptionsoberflächenspannung (γ_{ads}) nach Inkubation mit TiO_2 -Nanopartikeln (NP). B) Einfluss von TiO_2 -Mikropartikeln (MP) auf γ_{ads} . C) Einfluss von TiO_2 -NP auf die Oberflächenspannung während der Pulsation bei minimaler Blasengröße (γ_{\min}). D) γ_{\min} nach Inkubation mit TiO_2 -MP. Mittelwerte aus mindestens 4 Experimenten \pm SD wurden dargestellt. * $p < 0,05$ gegen die rotierte $0 \mu\text{g/ml}$ Kontrolle (grauer Balken). KO / weißer Balken: Kontrolle welche über 8 Stunden statisch im Brutschrank platziert wurde

Polystyren-NP [$500 \mu\text{g/ml}$] führten zu einer leichten Erhöhung der Adsorptionsoberflächenspannung nach *surface area cycling* von $45,4 \pm 2,8$ mN/m auf $51,8 \pm 2,3$ mN/m ($p < 0,05$) (Tabelle 12). Die untersuchten MP [50 - $500 \mu\text{g/ml}$] zeigten keine Auswirkungen auf γ_{ads} . Auch die minimale Oberflächenspannung wurde durch MP nicht beeinflusst (Tabelle 12). Polystyren-NP hingegen induzierten eine starke Surfactant-Dysfunktion bei minimaler Blasengröße. Eine Inkubation mit $500 \mu\text{g/ml}$ der Polystyren-NP während des *surface area cyclings* führte zu einem signifikanten Anstieg der Oberflächenspannung auf $17,4 \pm 2,5$ mN/m (Tabelle 12).

Tabelle 12: Oberflächenspannung nach *surface area cycling* in Anwesenheit verschiedener Partikel

γ_{ads} [mN/m] nach <i>surface area cycling</i>			
	Polystyren-NP	Polystyren-MP	Quarz-MP
Kontrolle	27,2 ± 4,2	27,4 ± 5,4	28,1 ± 1,5
0 µg/ml	45,4 ± 2,8	46,4 ± 2,7	43,7 ± 1,6
50 µg/ml	41,8 ± 6,1	43,7 ± 4,4	47,1 ± 1,9
100 µg/ml	46,8 ± 3,6	43,1 ± 1,5	45,8 ± 5,6
200 µg/ml	45,7 ± 5,8	45,3 ± 4,6	45,4 ± 6,2
500 µg/ml	51,8 ± 2,3*	42,7 ± 3,4	48,4 ± 2,6
γ_{min} [mN/m] nach <i>surface area cycling</i>			
	Polystyren-NP	Polystyren-MP	Quarz-MP
Kontrolle	1,0 ± 0,3	1,1 ± 0,4	1,2 ± 0,7
0 µg/ml	1,1 ± 0,3	1,1 ± 0,3	1,7 ± 0,8
50 µg/ml	1,6 ± 0,8	1,1 ± 0,8	0,9 ± 0,6
100 µg/ml	1,6 ± 0,8	1,2 ± 0,4	2,1 ± 1,7
200 µg/ml	7,5 ± 7,6	1,8 ± 1,1	2,8 ± 1,4
500 µg/ml	17,4 ± 2,5*	1,9 ± 1,0	1,0 ± 0,5

Die Oberflächenspannung wurde nach 8-stündiger Rotation bei 0,43 Hz und 37 °C unter Anwesenheit von verschiedenen Partikeln mit einem Pulsierenden-Blasen-Surfactometer gemessen. Die Adsorptionsoberflächenspannung γ_{ads} wurde in einem statischen Blasen Zustand gemessen. γ_{min} wurde während der Pulsation bei minimaler Blasengröße bestimmt. Mittelwerte aus mindestens 4 Experimenten ± SD wurden dargestellt. * $p < 0.05$ gegen den rotierten Kontroll-Wert [0 µg/ml]. Kontrolle: Kontrolle welche über 8 Stunden statisch im Brutschrank platziert wurde

4.4.4 Effekte von Partikeln auf die Surfactant-Ultrastruktur

Curosurf[®], was in dieser Studie eingesetzt wurde, bestand hauptsächlich aus Lamellar-Körper-ähnlichen (lamellar body like) Formen. Unilamellare Vesikel waren kaum vorhanden (Abbildung 31A und B). Nach Zugabe von 100 µg/ml TiO₂-NP zeigte sich, dass die lamellar-body-like Formen verkleinert und deformiert wurden (Abbildung 31C). Kleine TiO₂-NP Aggregate akkumulierten zwischen einzelnen Lamellen (Abbildung 31D). Weiterhin wurde ein Anstieg in der Menge der unilamellaren Vesikel detektiert. Eine Rotation des reinen Surfactants führt zu einer Konversion der lamellar-body-like Formen hin zu unilamellaren Vesikeln (Abbildung 31E). Die Anwesenheit von TiO₂-NP [100 µg/ml] während der Rotation verändert diese Konversion nicht (Abbildung 31F). Interessanterweise konnten große TiO₂-

Aggregate nach der Rotation gefunden werden. Diese Aggregate waren größer als diejenigen TiO_2 -Aggregate, die in den nicht-rotierten Proben gefunden wurden.

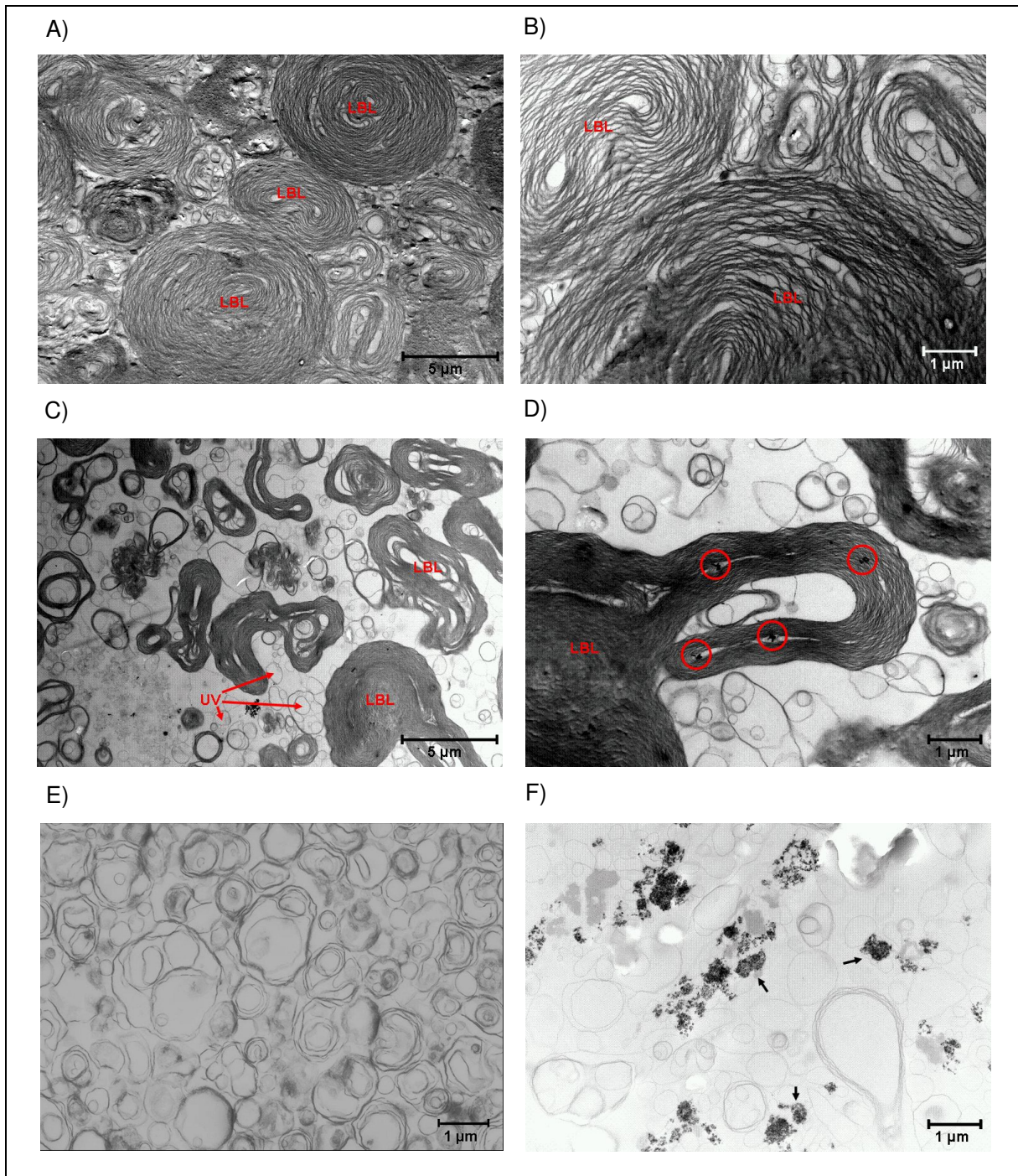


Abbildung 31: Repräsentative Bilder der Surfactant-Ultrastruktur.

Die Bilder wurden mit einem Transmissionselektronenmikroskop erstellt. A) und B) Unbehandeltes Surfactant. C) und D) Surfactant nach Addition von $100 \mu\text{g/ml}$ TiO_2 -Nanopartikel (NP). Rote Kreise zeigen kleine TiO_2 -NP Aggregate. E) Kontroll-Surfactant nach 8-stündiger Rotation bei $0,43 \text{ Hz}$ und $37 \text{ }^\circ\text{C}$. F) Surfactant nach 8-stündiger Rotation bei $0,43 \text{ Hz}$ und $37 \text{ }^\circ\text{C}$ in der Anwesenheit von TiO_2 -NP [$100 \mu\text{g/ml}$]. Schwarze Pfeile zeigen große TiO_2 -NP-Aggregate an. LBL: lamellar body like Formen. UV: unilamellare Vesikel

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit hat die Interaktion von Surfactant mit Partikeln beziehungsweise den Einfluss verschiedener Surfactantkomponenten auf Partikel untersucht. Während im ersten Teil der Arbeit die Modulation der (Allergen-) Partikel Aufnahme durch Surfactant Protein D in unterschiedliche Zellen der Lunge in Mono- und Multizellkultur untersucht wurde, standen im zweiten Teil der Arbeit biophysikalische Veränderungen des Surfactant-Systems durch Nanopartikel im Vordergrund.

5.1 Der Einfluss von SP-D auf die Allergenpartikel-Aufnahme in Zellen der Lunge

In den oben beschriebenen Experimenten konnte erstmalig gezeigt werden, dass primäre humane bronchiale Epithelzellen, kultiviert in einer Monokultur, Subpollen-Partikel (SPP) aufnehmen und binden. Des Weiteren wurde beobachtet, dass Surfactant Protein-D diese Aufnahme und Adhäsion moduliert. Diese Modulation führte zu einer erhöhten Ausschüttung des proinflammatorischen Chemokins Interleukin-8. Auch ein rekombinantes Fragment des humanen SP-D (rfhSP-D), welches aus der trimeren Hals-Region sowie der trimeren Kohlenhydrat-Erkennungs-Domäne aufgebaut ist, konnte die Anzahl der primären Epithelzellen, welche an der Aufnahme oder Adhäsion der Partikel beteiligt waren, erhöhen.

Ein Teil der Experimente wurde mit kommerziell erworbenen primären Lungen-Epithelzellen (Normalen Humanen Bronchialen Epithelzellen; NHBE) durchgeführt. Diese Epithelzellen wurden von menschlichen Spendern gewonnen und erlauben es daher mit Material, welches direkt die *in vivo*-Situation abbilden soll, zu arbeiten. Diese Vorteile wurden schon für verschiedene Untersuchungen eingesetzt (113-115). Des Weiteren konnten die erhaltenen Ergebnisse mit primären bronchialen Epithelzellen (Humane Primäre Bronchiale Epithelzellen; HPBEC), gewonnen von gesunden Probanden mittels Bronchialbürste, partiell validiert werden. Diese Epithelzellen wurden unmittelbar nach der Gewinnungsprozedur kultiviert. Ein Einfrieren und Auftauen der Zellen, wie es bei den NHBE durchgeführt wurde, fand nicht statt. Im Vergleich zu den NHBE wurden mit den HPBEC nahezu identische Aufnahmemuster bezüglich der Dosis-Abhängigkeit und des SP-D-Effektes gefunden (Tabelle 8). Zwar waren die Werte der HPBEC, im Gegensatz zu den NHBE, statistisch nicht signifikant, jedoch kann dies mit der Anzahl der durchgeführten Experimente erklärt werden. In einer neuen Studie sollte eine höhere Anzahl von Epithelzell-spendenden Probanden eingeplant werden. Einzig die MFI, welche die durchschnittliche SPP-Fluoreszenz je positive

Zelle angibt, zeigte sich bei den HPBEC bezüglich des SP-D-Effekts leicht erhöht ($p < 0,05$). Dies bedeutet, dass mehr fluoreszente Partikel mit einer einzelnen Zelle assoziiert waren. Diese leichte Erhöhung war bei den NHBE nicht zu detektieren.

Neben den Monokulturen mit primären Epithelzellen wurde auch mit der Zelllinie A549 gearbeitet. Hier zeigte sich, dass A549-Zellen, wie auch NHBE und HPBEC, Dosis-abhängig SPP aufnehmen und gebunden hatten (Tabelle 8). Eine Koinkubation mit SP-D war jedoch nicht in der Lage die Aufnahme und Bindung zu modulieren.

Diese Ergebnisse deuten an, dass sowohl kommerziell erhältliche primäre Epithelzellen (NHBE), als auch mittels Bürstenabstrich gewonnene primäre Epithelzellen (HPBEC) für Monokultur-Experimente, welche die Wirkung von SP-D erforschen, genutzt werden können. A549-Zellen, kultiviert in einer Monokultur, zeigen diesbezüglich ein anderes Verhalten und sollten nicht vorbehaltlos eingesetzt werden.

Unterschiede in der Aufnahme und Adhäsion von SPP und PP

Pulmonale Epithelzellen sind grundsätzlich in der Lage einzelne Allergene (116;117) und auch partikuläres Material (47;118) aufzunehmen und zu binden. In den hier vorliegenden Experimenten konnte die Aufnahme und Adhäsion von SPP (Allergene in einem partikulären Träger) und PP (Polystyren-Partikel; inertes Material) in und an NHBE gezeigt werden (Abbildung 10). Bei gleicher Partikelkonzentration waren weniger NHBE an der Aufnahme sowie Adhäsion der SPP im Vergleich zu PP beteiligt (Abbildung 11).

Eine Adhäsion, insbesondere aber auch die Aufnahme von Partikeln, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Ein wichtiger Parameter ist die Partikelgröße (25;119;120). Subpollen-Partikel, isoliert aus *Phleum pratense*, haben eine Größe zwischen 320 nm und 2.97 μm (unpublizierte Daten). Die verwendeten polystyrenen Partikel hingegen haben eine exakt definierte Größe von 1 μm (Angaben des Herstellers).

Ein weiteres wichtiges Merkmal ist die Beschaffenheit der Partikeloberfläche. Kato und Mitarbeiter haben beispielsweise gezeigt, dass mit Lektinen beschichtete Polystyren-Partikel ($d = 245 \text{ nm}$), von Epithelzellen der Lunge aufgenommen werden. Im gleichen Versuch wurden allerdings unbeschichtete Polystyren-Partikel der gleichen Größe nicht internalisiert (121). In anderen Studien konnte jedoch die Aufnahme von unbeschichteten polystyrenen Partikeln ($d = 1 \mu\text{m}$) in Epithelzellen gezeigt werden (108;122). Dieser wichtige Einfluss von Oberflächenbeschichtungen konnte auch schon für Quarz-Partikel beobachtet werden. Die quantitative Aufnahme in Epithelzellen hing bei gleicher Größe stark von verschiedenen Oberflächenbeschichtungen ab (123).

Subpollen-Partikel weisen auf ihrer Oberfläche eine Vielzahl von Allergenen auf, welche in ihren physiochemischen Eigenschaften und ihrer Struktur variieren (124). Sie unterscheiden sich von den in dieser Studie verwendeten polystyrenen Partikeln demnach nicht nur durch ihre Größe, sondern auch durch ihre Oberflächenbeschaffenheit. Voraussichtlich sind dies die zwei maßgeblichen Faktoren, welche für die unterschiedlichen Mengen der Aufnahmen und Adhäsionen der SPP und PP verantwortlich sind.

Die durchschnittliche Partikel-Fluoreszenz (mean fluorescence intensity; MFI) einzelner SPP- und PP-positiver Zellen konnte durch eine Erhöhung der Partikel-Dosis nicht signifikant erhöht werden (Abbildung 11). Dieses deutet das Erreichen eines Plateaus an, welches auch schon für die Aufnahme der aufgereinigten Allergene *Phl p 1* und *Phl p 6* beobachtet wurde (116).

Leider konnte keine Aussage darüber getroffen werden, ob insgesamt eine größere Menge an SPP oder PP in und an einzelnen Zellen vorhanden waren. Nur eine relative Aussage bezogen auf eine einzelne Partikelsorte kann getroffen werden. Da die absolute Fluoreszenz der reinen PP sehr viel höher als die der SPP war, können die Fluoreszenzstärken an sich nicht miteinander verglichen werden.

Durch die relative Aussage, dass sich eine konstante Partikel-Menge in oder an einzelnen Zellen befand, sowie durch die Ergebnisse dass sich durch eine Erhöhung der Partikeldosis sowie durch eine Zugabe von SP-D die Menge der aufnehmenden und bindenden Zellen erhöhte, kann auf eine absolute Erhöhung der Aufnahme und Adhäsion von Partikeln in beziehungsweise an Monokulturen der hier verwendeten NHBE geschlossen werden.

Der Einfluss von SP-D

In den Versuchen dieser Arbeit konnte SP-D die Anzahl der NHBE, welche an der Aufnahme und Adhäsion von SPP beteiligt waren, erhöhen (Abbildung 13). Die Anzahl der SPP pro einzelne Zelle blieb jedoch konstant. Eine ähnliche Modulation durch SP-D wurde bereits für Bakterien und Dendritische Zellen gezeigt (125). Hansen *et al.* fanden in dieser Studie eine erhöhte Anzahl von aufnehmenden Dendritischen Zellen. Die Anzahl der Bakterien, welche von einzelnen Zellen aufgenommen wurden, blieb jedoch konstant.

Weiterhin konnte in den Versuchen der vorliegenden Doktorarbeit erstmalig der Einfluss von SP-D auf die Allergenpartikelaufnahme in Zellen eines komplexen Triple-Zellkultur-Modells gezeigt werden (Abbildung 26). SP-D führte hier zu einer Erhöhung der an der Aufnahme beteiligten Makrophagen und Epithelzellen. Eine Tendenz zu einer verminderten Partikelzahl je einzelne Zelle konnte für Makrophagen und Dendritische Zellen beobachtet werden.

Bisher sind die Effekte von SP-D auf die Aufnahme partikulärer Substanzen nur für Monokulturen von Makrophagen und Dendritische Zellen beschrieben. So ist bekannt, dass SP-D an *Pseudomonas aeruginosa* bindet und die Phagozytose durch Alveolarmakrophagen erhöht (54). Auch die Phagozytose von SPP durch Alveolarmakrophagen wurde durch SP-D erhöht (66). Des Weiteren konnte eine SP-D-modulierte erhöhte Phagozytose von apoptotischen neutrophilen Granulozyten sowie eosinophilen Granulozyten gezeigt werden (126;127). Für Dendritische Zellen konnte eine SP-D-modulierte erhöhte Aufnahme von Bakterien gezeigt werden (128).

Für die Modulation der Aufnahme und Adhäsion durch SP-D kommen verschiedene Rezeptoren, welche mit SP-D interagieren können, in Frage. Von besonderer Bedeutung ist hierbei der Calreticulin-CD91-Komplex. SP-D bindet über die Kollagen-ähnliche Domäne an Calreticulin (129), welches wiederum mit CD91 interagiert (130;131). Dies führt zu einer erhöhten Phagozytose von Pathogenen, welche an die CRD des SP-D gebunden sind. Obwohl dieser Rezeptorkomplex hauptsächlich für professionelle Phagozyten wichtig ist, wird Calreticulin von fast allen Zellen auf der Oberfläche exprimiert und wurde auch schon auf Lungen-Epithelzellen detektiert (129;132-134). Er kommt deshalb neben Makrophagen und Dendritischen Zellen auch in Frage, die Erhöhung der Bindung und Aufnahme von SPP an und in Lungenepithelzellen zu modulieren, wie es für Monokulturen von NHBE, HPBEC sowie A549-Zellen im Triple-Zellkultur-Modell beobachtet wurde.

Rekombinantes SP-D, was in den Versuchen dieser Arbeit eingesetzt wurde, liegt teilweise als Dodekamer sowie hauptsächlich als höher organisiertes Multimer vor (unpublizierte Daten). Dies bedeutet, dass die Kollagen-ähnliche Domäne innerhalb des Proteins liegt und somit nicht für eine Bindung an den Calreticulin-CD91-Komplex zur Verfügung steht (57). Hierfür muss das Protein in Trimere zerfallen. Dies kann durch eine direkte Bindung an ein Pathogen erfolgen (57). Ob dies speziell durch eine Bindung an SPP geschieht, ist bisher nicht bekannt. Eine andere Möglichkeit für ein Zerfallen von höher organisiertem SP-D in Trimere wäre die Einwirkung von Stickstoffmonoxid (NO). NO kann zu einer S-Nitrosylierung der Cysteine am N-terminalen Ende des SP-D führen (57). Dies wiederum führt zu einem Zerfallen der Dodekamere sowie Multimere in Trimere. Da bekannt ist, dass Stickstoffmonoxid von Lungenzellen nach Kontakt zu Partikeln produziert werden kann (135;136), könnte dies ein möglicher Mechanismus für das Zerfallen von höher organisiertem SP-D in Trimere sein. SP-D könnte daraufhin über die Kohlenhydrat-Erkennungs-Domäne an SPP und gleichzeitig mit der Kollagen-ähnlichen Domäne an Calreticulin auf der Oberfläche von Epithelzellen binden. Dies würde primär die Bindung der SPP an Epithelzellen erhöhen, was in den hier vorliegenden Experimenten mit NHBE

beobachtet wurde (Abbildung 14). Allerdings sorgt der Calreticulin-CD91-Komplex auch für eine erhöhte Aufnahme von gebundenen Antigenen, was in den hier vorliegenden Experimenten nach 8 Stunden nicht beobachtet wurde. Es ist allerdings denkbar, dass die gebundenen SPP im Laufe weiterer Stunden aufgenommen werden.

Eine weitere Rezeptor-Kandidat, welche die Aufnahme von Pathogenen SP-D-abhängig modulieren kann, ist der Sirp-alpha Rezeptor, welcher hauptsächlich eine wichtige Rolle auf Makrophagen und Dendritischen Zellen spielt (137;138). Der Rezeptor ist jedoch auch auf pulmonalen Epithelzellen vorhanden (139). An diesen Rezeptor kann SP-D bevorzugt über die Kohlenhydrat-Erkennungs-Domäne binden. Der Kontakt mit Sirp-alpha führt allerdings eher zu einer Supprimierung der Aufnahme von Pathogenen. In den Versuchen mit primären Epithelzellen, kultiviert in einer Monokultur, welche in der hier vorliegenden Arbeit beschrieben werden, konnte eine Erhöhung der SPP-Bindung, nicht jedoch der Aufnahme gezeigt werden (Abbildung 14). Eine Beteiligung dieses Rezeptors ist demnach möglich. Eine gleichzeitige Bindung über die CRD an die SPP und den Rezeptor könnte die Bindung der Partikel an Epithelzellen erhöhen. Allerdings konnte kein Abfall der aufgenommenen SPP je einzelner primärer Epithelzelle beobachtet werden, was für eine Beteiligung von Sirp-alpha typisch wäre.

Dies macht jedoch eine Beteiligung des Sirp-alpha-Rezeptors im Triple-Zellkultur-Modell wahrscheinlich. SP-D, was über die CRD an SPP gebunden ist, könnte über freie CRD eine Bindung an Sirp-alpha auf einzelnen Zellen suchen. Hierdurch wäre eine bessere Verteilung der SPP an die verschiedenen Zellen möglich. Durch die gleichzeitige Hemmung der Aufnahme der SPP (139) kommt es zu einer geringeren Anzahl der SPP je positiver Zelle, was in den Versuchen dieser Doktorarbeit für Makrophagen und Dendritische Zellen beobachtet wurde (Abbildung 26).

Ohne eine systematische Untersuchung der beteiligten Rezeptoren kann jedoch keine definierte Aussage darüber getroffen werden, welche Rezeptoren für die Modulation der Aufnahme und Adhäsion durch SP-D verantwortlich sind. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass mehrere Rezeptoren gleichzeitig daran beteiligt sind.

Unterschiedliche Effekte von SP-D auf die Modulation von SPP und PP

Es ist bekannt, dass SP-D über die Kohlenhydrat-Erkennungs-Domäne an SPP bindet (66). Diese Bindung führt zu einer Aggregation der SPP. Polystyren-Partikel haben keine Kohlenhydrat-Strukturen auf ihrer Oberfläche. Obwohl schon gezeigt wurde, dass SP-D auch an bestimmte funktionellen Gruppen auf Partikel binden kann (105), ist es

unwahrscheinlich, dass SP-D über ihre CRD spezifisch an Polystyren-Partikel bindet. Funktionelle Gruppen sind laut Informationen des Herstellers nicht auf den PP zu finden. In den Versuchen dieser Arbeit konnte auch keine Aggregation der PP nach Inkubation mit SP-D beobachtet werden (Ergebnis nicht graphisch dargestellt). Da keine spezifische Bindung von SP-D an die PP stattfand, wurde dementsprechend auch nicht die Aufnahme sowie Adhäsion der PP in oder an NHBE erhöht.

Der Einfluss von rfhSP-D

Die Aufnahme und Adhäsion von SPP wie auch von PP konnte zusätzlich durch rfhSP-D in sowie an primäre Epithelzellen, kultiviert in einer Monokultur, erhöht werden. Dies steht im Gegensatz zu Experimenten mit Makrophagen. Konzentrationen von 1-30 µg/ml an rfhSP-D führten nicht zu einer erhöhten Aufnahme sowie Adhäsion der SPP in Makrophagen (66). In den Versuchen der hier vorliegenden Doktorarbeit wurde die Anzahl der positiven Epithelzellen nur in einer sehr hohen Konzentration von 30 µg/ml rfhSP-D erhöht. Dies legt die Vermutung nahe, dass ein unspezifischer Protein-Effekt aufgetreten ist. Deshalb wurden identische Experimente mit einem weiteren Protein, Humanem-Serum-Albumin (HSA), durchgeführt (Ergebnisse nicht als Graph dargestellt). HSA war jedoch nicht in der Lage die Anzahl der positiven Epithelzellen zu erhöhen, was auf einen spezifischen rfhSP-D-Effekt schließen lässt.

Der Calreticulin-CD91-Komplex, welcher ein Kandidat für die Vermittlung von SP-D-Effekten ist, benötigt einen Kontakt zu der Kollagen-ähnlichen Domäne. Dies schließt ihn für die Effekte von rfhSP-D aus. rfhSP-D beinhaltet keine Kollagen-ähnliche Domäne. Eine Erklärung für die rfhSP-D-Effekte wäre demnach eine Verunreinigung des rfhSP-D mit dodekamerem oder multimerem SP-D. Dies könnte auch erklären, warum die Effekte erst bei einer Konzentration von 30 µg/ml (in diesem Falle Gesamtprotein - der SP-D-Anteil wäre geringer) auftraten. Da allerdings die rfhSP-D-Effekte sowohl bei SPP als auch bei PP auftraten, kann der Effekt einer Verunreinigung ausgeschlossen werden. SP-D zeigte keinerlei Auswirkungen auf die Modulation der PP-Aufnahme und Adhäsion (Abbildung 13). Demzufolge ist es wahrscheinlich, dass ein spezifischer rfhSP-D Effekt vorliegt. Dies macht eine Beteiligung von Sirp-alpha möglich. Für eine Interaktion mit diesem Rezeptor wird hauptsächlich die CRD benötigt. Dass der Effekt der SPP-Modulation erst bei einer sehr hohen Konzentration auftrat, kann mit unterschiedlichen Bindungsspezifitäten bei unterschiedlicher Faltung des Proteins erklärt werden (140;141). Der rfhSP-D-modulierende Effekt bei den PP, welcher mit oligomerem SP-D nicht beobachtet werden konnte, kann entweder auch mit unterschiedlichen Bindungsspezifitäten der CRD erklärt werden, oder durch eine (unspezifische) Bindung von PP an die trimere Hals-Region.

Aufnahme der Partikel in A549-Zellen

A549-Zellen, kultiviert in einer Monokultur, zeigten eine unterschiedliche Quantität der Aufnahme der Partikel im Vergleich zu primären bronchialen Epithelzellen (Abbildung 20). Weiterhin konnte, im Gegensatz zu Monokulturen primärer bronchialer Epithelzellen, kein Einfluss von SP-D [1-10 µg/ml] erkannt werden (Abbildung 21).

Diese Unterschiede können im unterschiedlichen Ursprung der Zellen begründet sein. Die primären Zellen wurden aus der bronchialen Region von Spendern gewonnen. A549-Zellen entsprechen weitestgehend Typ II-Pneumozyten. Eine eigenständige Produktion von SP-D durch die A549-Zellen kann jedoch ausgeschlossen werden (142).

Im Gegensatz zu den Experimenten mit Monokulturen, konnte die Aufnahme von SPP in A549-Zellen, eingebettet in weitere Zelltypen innerhalb eines Triple-Zellkultur-Modells, durch SP-D moduliert werden (Abbildung 24). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass A549-Zellen den Kontakt mit anderen Zelltypen benötigen, um ein ähnliches Verhaltensmuster wie primäre Lungeneithelzellen zu zeigen.

NHBE-Monokulturen: Ausschüttung von Chemokinen und Zytokinen

In den Versuchen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass IL-8 von primären Epithelzellen, kultiviert in einer Monokultur, ausgeschüttet wird (Abbildung 16). IL-8 ist ein proinflammatorisches Chemokin, was zur Chemotaxis von Neutrophilen dient. Eine Inkubation mit SPP und PP erhöhte diese Ausschüttung (Abbildung 16). SP-D führte zu einer signifikanten Erhöhung der SPP-induzierten Ausschüttung von IL-8. Die PP-induzierte Ausschüttung von IL-8 wurde durch SP-D nicht verändert. Dementsprechend ist also nicht nur ein SP-D-Kontakt zur Epithelzelle, sondern auch zum jeweiligen Partikel notwendig. Hier könnte wieder der Calreticulin-CD91-Komplex eine Rolle spielen. Eine Bindung von SP-D an SPP könnte zum Auftreten von SP-D Trimeren führen. Diese könnten über ihre Kollagen-ähnliche Domäne an Calreticulin binden, was eine proinflammatorische Antwort zur Folge haben kann (139).

Neben der Produktion von IL-8 sind pulmonale Epithelzellen auch grundsätzlich in der Lage weitere Zytokine und Chemokine nach Kontakt mit Allergenen und Partikeln auszuschütten. Epithelzellen können beispielsweise EOTAXIN ausschütten, nachdem sie mit Allergenen von Hausstaubmilben in Kontakt kamen (143). Eine Ausschüttung von EOTAXIN führt zur Chemotaxis eosinophiler Granulozyten.

Nach 8-stündiger Inkubation mit SPP und PP konnten in den Versuchen dieser Arbeit keine messbaren Werte von EOTAXIN, MCP-1 (führt zu Chemotaxis von Monozyten sowie Dendritischen Zellen), IL-1-alpha (unterstützt die Migration von Leukozyten), RANTES (führt zur Chemotaxis von T-Zellen, eosinophilen Granulozyten und basophilen Granulozyten) und GM-CSF (stimuliert die Produktion von Monozyten sowie Granulozyten) detektiert werden (Tabelle 6 und Tabelle 7). Eventuell ist eine 8-stündige Inkubation mit den gewählten Partikelkonzentrationen ein zu geringer Stimulus, um für eine Produktion bestimmter Zytokine und Chemokine zu sorgen. Eine Erhöhung der Partikeldosis oder eine Verlängerung der Inkubationszeit könnte für eine Sekretion sorgen und somit eine Möglichkeit schaffen, den Effekt von SP-D auf diese Sekretion zu untersuchen.

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurden primäre Epithelzellen von humanen Spendern untersucht. Die Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen hängt vom Gesundheitsstatus des jeweiligen Spenders ab. So ist beispielsweise bekannt, dass Zellen von Spendern mit schwerem Asthma ein anderes Zytokinprofil aufweisen als Zellen aus Spendern mit mildem Asthma (144). Da nicht bekannt ist, ob die Spender der Zellen eine allergische Erkrankung aufwiesen, könnte eine Selektion der Probanden nach bestimmten Atemwegserkrankungen die Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen erhöhen.

Triple-Zellkultur-Modell: Ausschüttung von Chemokinen und Zytokinen

Eine Inkubation mit 10 Millionen SPP über 8 Stunden führte durch die Zellen des Triple-Zellkultur-Modells zu einer erhöhten Ausschüttung verschiedener proinflammatorischer Mediatoren. Es kam hierbei zu einer tendenziellen Erhöhung von G-CSF (stimuliert die Produktion von Granulozyten), TNF-alpha (stimuliert Migration neutrophiler Granulozyten sowie die Produktion weiterer proinflammatorischer Zytokine) und IL-8. Signifikant erhöht wurden IL-1-alpha, Mip1beta (führt zur Chemotaxis CD4-positiver T-Zellen) sowie IL-6 (Lymphozyten-stimulierender Faktor) Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Studien, welche zeigen, dass Allergene zur Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren aus Epithelzellen (145-147), Makrophagen (148;149) und Dendritischen Zellen (150;151) führen.

SP-D reduzierte tendenziell die Ausschüttung von G-CSF, TNF-alpha und IL-6 (Tabelle 9). Eine signifikante Reduktion konnte für IL-8 gezeigt werden. SP-D zeigt demnach im Triple-Zellkultur-Modell antiinflammatorische Effekte nach Koinkubation mit SPP. Ähnliche antiinflammatorische Effekte konnten auch schon in verschiedenen Studien mit Monokulturen verschiedener Zellen gezeigt werden. SP-D war beispielsweise in der Lage, die Produktion von TNF-alpha durch Makrophagen oder Dendritischen Zellen zu verringern

(152). Desweiteren konnte schon eine verminderte Ausschüttung von Mip-2, TGF-beta und MCP-1 von Makrophagen nach Koinkubation mit SP-D gezeigt werden (139). Diese antiinflammatorische Wirkungen wurden über den Sirp-alpha Rezeptor vermittelt.

Unter Betrachtung der SPP-Aufnahme im Triple-Zellkultur-Modell, welche auf eine Beteiligung des Sirp-alpha-Rezeptors schließen lässt, liegt es nahe, dass die antiinflammatorische Wirkung auch in den hier durchgeführten Versuchen durch den Sirp-alpha-Rezeptor vermittelt wurde.

Warum im Triple-Zellkultur-Modell antiinflammatorische Effekte, in Epithelzell-Monokulturen jedoch proinflammatorische Effekte durch SP-D induziert wurden, ist nicht bekannt und bedarf noch weiterer Untersuchungen. Die Beteiligung unterschiedlicher Rezeptoren sowie die direkte Beeinflussung durch Mediatoren, sekretiert von anderen Zellen, liegt Nahe.

In der hier vorliegenden Doktorarbeit wurden nicht nur Zytokine der Makrophagen, Dendritischen Zellen sowie der Epithelzellen untersucht. Ein Augenmerk lag auch auf der Ausschüttung von T-Zell-Zytokinen sowie von T-Zell-abhängigen Zytokinen. Diese Untersuchung wurde durch eine Zugabe von CD4-positiven T-Zellen zum Triple-Zellkultur-System ermöglicht.

Obwohl die Makrophagen, Dendritischen Zellen sowie die T-Zellen aus Blut von gräserallergischen Spendern generiert wurden, konnten nach Inkubation mit Subpollen-Partikel von *Phleum pratense* keine oder eine nur sehr geringe Ausschüttung von IL-2 (führt zur Proliferation von T-Helferzellen), IL-4 (stimuliert B-Zell-Aktivierung sowie IgE-Produktion), IL-5 (wirkt chemotaktisch auf eosinophile Granulozyten), IL-10 (hemmt Makrophagen), IL-12p70 (stimuliert Differenzierung von T-Zellen), IL-13 (stimuliert die Bildung und Differenzierung von B-Lymphozyten) und IFN-gamma (aktiviert Makrophagen) detektiert werden (Tabelle 10). IP-10 (stimuliert Monozyten sowie die Migration von T-Zellen), was nicht von T-Zellen ausgeschüttet wird, dessen Ausschüttung jedoch direkt von IFN-gamma induziert wird, wurde Spender-abhängig vorgefunden. Hier deutete sich eine erhöhte Produktion nach Inkubation mit SPP an, was eine proinflammatorische Wirkung darstellt. Eine verminderte Produktion durch SP-D deutete sich an, war jedoch durch die hohen Schwankungen der gemessenen Werte nicht zu verifizieren.

Für die sehr geringen oder nicht vorhandenen Ausschüttungen der T-Zell-Mediatoren kommen mehrere Erklärungen in Betracht:

1) Die T-Zellen wiesen eine zu geringe Vitalität auf

Concancavalin A, ein T-Zell-Mitogen, war über die gesamte Dauer von 72 h in der Lage, die Ausschüttung von Zytokinen durch T-Zellen zu induzieren (Ergebnisse nicht dargestellt). Eine hohe Vitalität der T-Zellen war dementsprechend gegeben.

2) Die Typ II-Pneumozyten induzierten eine Toleranz

Typ II-Pneumozyten, welche sich in Form von A549-Zellen im System befanden sind in der Lage eine Toleranz gegenüber bestimmten Antigenen hervorzurufen (153). Um zu überprüfen, ob die A549-Zellen auch im Triple-Zellkultur-Modell eine Toleranz gegenüber den *Phleum pratense*-Allergenen induziert haben, wurden ausgewählte Experimente ohne eine Zugabe von A549-Zellen durchgeführt. In diesen Experimenten wurde nur mit Dendritischen Zellen und Makrophagen gearbeitet. Allerdings konnten auch hier nur geringe Ausschüttungen an Interleukin-2, welche unterhalb des Quantifizierungs-Limits des ELISAs lagen, gemessen werden (Daten nicht graphisch dargestellt). Eine A549-induzierte Toleranz kann demnach ausgeschlossen werden.

3) Die SPP stellten ein zu schwaches Antigen dar

Eventuell sind SPP in der eingesetzten Konzentration ein zu schwaches Antigen um eine Reaktion der T-Zellen auszulösen. Um dies zu untersuchen, wurden in einzelnen Experimenten die SPP durch einen hochkonzentrierten Extrakt, hergestellt aus den Allergenen von *Phleum Pratense*, ersetzt. Dieser induzierte jedoch eine ähnlich geringe Ausschüttung von IL-2, verglichen mit den Resultaten, welche mit SPP erzielt wurde (Daten nicht graphisch dargestellt).

4) Die Konzentration der T-Zellen im Medium war zu gering

Dass zu wenige T-Zellen in zu viel Medium vorhanden waren, ist die naheliegendste Erklärung für die geringen Ausschüttungen der T-Zell-Zytokine. Da die Rekrutierung der Probanden der Blutspende großteils im Herbst und Winter durchgeführt wurde, war aller Voraussicht nach die Anzahl der allergen-spezifischen T-Zellen, welche im Blut der Spender zu finden waren, relativ gering (im Vergleich zur Anzahl während der Blütezeit der Gräser). Bei einem Verhältnis von 1,7 Millionen T-Zellen zu 170.000 Dendritischen Zellen gab es deshalb relativ wenige allergen-spezifische T-Zell-DC Kontakte. Auch die große Wachstumsfläche der Membran, auf der die DC kultiviert wurden ($4,2 \text{ cm}^2$), führte zu geringen T-Zell-DC-Kontakten. Wenige Proliferations-Cluster, die vom Ort der direkten DC-T-Zell Interaktion ausgehen, waren vermutlich die Folge. Die sich daraus ergebende Menge

an Zytokinen war demnach zu gering, als dass sie in dieser großen Menge Kulturmedium gemessen werden konnte.

5.2 Die Interaktion von TiO₂-Nanopartikeln mit pulmonalem Surfactant

Die in dieser Arbeit beschriebenen Daten belegen, dass Nanopartikel, im Gegensatz zu Mikropartikel, in den untersuchten Konzentrationen eine Dysfunktion des pulmonalen Surfactants induzieren können. TiO₂-Nanopartikel sowie Polystyren-Nanopartikel induzierten in hohen Konzentrationen eine biophysikalische Surfactant-Dysfunktion *in vitro*. *Surface area cycling* verstärkte diese Dysfunktion. Die durch TiO₂ induzierten biophysikalischen Veränderungen des Surfactants wurden zudem von Veränderungen der Surfactant-Ultrastruktur begleitet. Neben einer Deformation der aktiven Lamellarkörperchen konnte ein vermehrtes Auftreten von weitestgehend inaktiven unilamellaren Vesikeln beobachtet werden.

Die wahrscheinlichste Erklärung für das Auftreten der Surfactant Dysfunktion ist eine direkte Interaktion zwischen den Partikeln und Surfactant-Komponenten. So ist beispielsweise bekannt, dass Phospholipide an Partikel (91;94;142) und an TiO₂-Strukturen (154;155) binden können. Demzufolge könnte die in dieser Arbeit eingesetzte Partikel-Oberfläche (pro Masseneinheit) das ausschlaggebende Merkmal sein, welches die biophysikalischen und ultrastrukturellen Veränderungen hervorrief. Dies wird auch in den Ergebnissen der Kapitel 4.4.2 sowie 4.4.3 angedeutet. Diejenigen Partikel mit der größten Oberfläche pro Masseneinheit (TiO₂-NP und Polystyren-NP) induzierten die stärksten Veränderungen. Mikropartikel mit einer vergleichsweise geringen Oberfläche induzierten in den eingesetzten Konzentrationen keine Surfactant-Dysfunktion. Um dies näher zu untersuchen, wurden in einzelnen Experimenten ähnliche Partikeloberflächen durch den Einsatz von sehr hohen Mikropartikel-Massenkonzentrationen eingesetzt. Eine Partikelkonzentration von etwa 10 mg/ml TiO₂-MP und Quarz-MP induzierte eine starke Surfactant-Dysfunktion. Allerdings waren die experimentellen Bedingungen in diesen Ansätzen limitiert. Mikropartikel in diesen hohen Konzentrationen aggregierten innerhalb kürzester Zeit und sedimentierten in Sekunden am Boden der Proben-Kapillare. Durch dieses Absinken wurde die Phospholipid-Konzentration in der Probenflüssigkeit reduziert, was einen direkten Vergleich der NP mit den MP schwer möglich macht.

Bakshi und Mitarbeiter haben in einer Studie gezeigt, dass 2 µg/ml Gold-Nanopartikel eine gravierende Surfactant-Dysfunktion induzieren können (91). Im Gegensatz hierzu konnte eine durch TiO₂-NP induzierte Surfactant-Dysfunktion nur in sehr viel höheren Partikel-

Konzentrationen festgestellt werden (Abbildung 29). Des Weiteren war der Grad der TiO₂-NP-induzierten Surfactant-Dysfunktion sehr viel schwächer als in der Studie von Bakshi *et al.* Um diese Diskrepanz erklären zu können, müssen drei essentielle Unterschiede zwischen den Versuchen betrachtet werden:

1) Die Messsysteme

Beide Messsysteme, das Pulsierende-Blasen-Surfactometer und das bei Bakshi verwendete Captive Bubble Surfactometer (CPS) sind in der Lage, geringe Oberflächenspannungen wiederzugeben (156). Das CPS tendiert sogar dazu, geringere Werte anzugeben (157). Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass die Verwendung der verschiedenen Messsysteme für die unterschiedlich starken Surfactant-Dysfunktionen verantwortlich sind.

2) Die Surfactant-Präparationen

In den hier vorliegenden Versuchen wurde Curosurf[®], eine natürliche Surfactant-Präparation, welche aus Schweine-Lungen gewonnen wird (158), eingesetzt. Bakshi benutzte eine semi-synthetische Surfactant-Präparation, welche aus 2 verschiedenen Phospholipiden zuzüglich SP-B bestand. Beide Surfactant-Präparationen können nachweislich eine ausgezeichnete Oberflächenaktivität aufweisen und auch minimale Oberflächenspannungen unter Kompression erreichen. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die verschiedenen Zusammensetzungen der beiden Surfactant-Präparationen vollständig für die unterschiedlichen Effekte verantwortlich sind.

3) Die verwendeten Nanopartikel

Am Wahrscheinlichsten ist es, dass die materiellen Eigenschaften der Nanopartikel (Größe, Oberfläche, Ladung), für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich sind. Da die Gold-Nanopartikel Zitrat-Gruppen auf ihrer Oberfläche aufwiesen, wurde eine Partikel-Aggregation weitestgehend verhindert (159). Die eingesetzten TiO₂-NP aggregierten hingegen in einem hohen Maße. Obwohl die Oberfläche der Gold-NP aus Bakshis Studie nicht bekannt ist, ist es deshalb sehr wahrscheinlich, dass die Oberfläche pro Masseneinheit größer ist als bei den TiO₂-NP. Dies kann eine Erklärung für die sehr viel stärkere Surfactant-Dysfunktion nach Inkubation mit Gold-NP sein. Mehr Surfactant-Komponenten adsorbierten an der größeren Oberfläche der Gold-NP und waren deshalb nicht verfügbar, um die Oberflächenspannung an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht zu reduzieren.

Zum direkten Vergleich der TiO₂-NP und Bakshis Gold-NP (~15 nm) wurden in einzelnen Experimenten kommerziell erhältliche Zitrat-beschichtete Gold-NP (5 nm) eingesetzt. Diese

Gold-NP induzierten, verglichen mit TiO₂-NP, bei gleichen Massenkonzentrationen eine stärkere Surfactant-Dysfunktion. Allerdings war diese Dysfunktion schwächer, als die Dysfunktion, die Bakshi in seiner Studie beobachtet hatte. Aller Wahrscheinlichkeit nach können diese Unterschiede auf die eingesetzte Oberfläche je Masseneinheit Gold-NP sowie auf die unterschiedlichen Surfactant Präparationen zurückgeführt werden.

Die *in vivo* stattfindende Konversion von aktiven große Surfactant-Aggregaten (large aggregates; LA) in weitestgehend inaktive kleine Surfactant-Aggregate (small aggregates; SA) kann *in vitro* durch eine Methode namens *surface area cycling* (Kapitel 3.4.6) simuliert werden (160). Mit Hilfe dieser Methode wurde bereits der Einfluss verschiedener Stoffe wie Mekonium, Serum-Proteine oder Surfactant-Proteine während des Konversions-Prozesses untersucht (161-164). In den hier beschriebenen Versuchen wurde der Einfluss von TiO₂-NP während der Konversion untersucht. Es wurde ein Dosis-abhängiger Anstieg in der Oberflächenspannung festgestellt (Abbildung 30). Dieser TiO₂-NP-vermittelte Effekt war um ein vielfaches höher, als die leichte Dysfunktion, welche ohne *surface area cycling* detektiert wurde. Bilder, die mit Hilfe eines Transmissionselektronenmikroskops erstellt wurden, zeigten, dass die Generierung der unilamellaren Vesikel unabhängig von der Anwesenheit der NP während des *surface area cyclings* stattfand (Abbildung 31). Eine mögliche Erklärung für den Abfall in der Oberflächenaktivität des Surfactants nach *surface area cycling* in der Anwesenheit von TiO₂-NP kann deshalb die Bindung von SP-B und der daraus folgende Verlust von SP-B an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht sein. SP-B wird *in vivo* durch eine Serin-aktive Carboxylesterase namens Konvertase gespalten (165-167). Da Curosurf[®] mittels einer Chloroform-Extraktion präpariert wurde, enthält es keine Konvertase (168). Aller Voraussicht nach ist deshalb intaktes SP-B in Curosurf[®] auch nach *surface area cycling* vorhanden. Eine Hypothese ist deshalb, dass freies SP-B durch Bindung an TiO₂-NP depletiert wird. Dies trägt zu einer gestörten Oberflächenaktivität bei. Dass SP-B eine hohe Affinität aufweist, während des *surface area cyclings* an Oberflächen zu binden, konnte schon in einer vorherigen Studie gezeigt werden. In diesen Versuchen band SP-B an die Wände des Test-Röhrchens (169). Leider war es uns nicht möglich, mittels Transmissionselektronenmikroskopie eine direkte Bindung von SP-B an die TiO₂-NP zu zeigen. Die Fixierung des Surfactants, welche für die Immun-Elektronenmikroskopie von SP-B notwendig ist, machte es unmöglich, ultradünne Schnitte des Surfactants herzustellen.

In den beschriebenen Versuchen wurde gezeigt, dass TiO₂-NP eine biophysikalische Dysfunktion sowie ultrastrukturelle Veränderungen des Surfactants induzieren können. Dies waren jedoch ausschließlich *in vitro*-Experimente. Die Ergebnisse können somit nicht 1:1 auf die *in vivo*-Situation übertragen werden. Des Weiteren traten die Effekte nur bei hohen

Konzentrationen ab 100 µg/ml auf, welche zwar bei einem arbeitstechnischen Unfall inhaliert werden könnten, unter normalen Umständen aber nicht *in vivo* in der Lunge deponiert werden. Unter der Annahme, dass die alveoläre Oberfläche etwa 100 m² beträgt und unter der Annahme, dass die durchschnittliche Stärke des alveolären Flüssigkeitsfilms etwa 200 nm beträgt (170), kann die Menge des alveolären Flüssigkeitsfilms mit etwa 20 ml berechnet werden. In Übereinstimmung mit dieser Rechnung wurde in einer anderen Studie die Menge des gesamten epithelialen Flüssigkeitsfilms mit 6 ml/L totale Lungenkapazität beschrieben (171). Dies würde 40 ml betragen. Unter der weiteren Annahme, dass eine Partikelkonzentration von 100 µg/m³, welche durchaus in größeren Städten erreicht werden kann, in der Umgebungsluft zu finden ist, und unter der Annahme, dass die alveoläre Depositionsrate etwa 50 % beträgt, würde die Partikeldosis in den Alveolen nach 24 Stunden ungefähr 360 µg betragen. Dies entspricht etwa 10 µg/ml alveolärem Flüssigkeitsfilm. Diese Partikelkonzentration liegt weit unter der Partikelkonzentration, welche in der hier vorliegenden Arbeit eine Surfactant-Dysfunktion ausgelöst hat. Weiterhin werden deponierte Partikel aus der Lunge heraustransportiert, und Surfactant wird neu produziert. Dies verändert das Partikel / Surfactant-Verhältnis. Alles dies muss beachtet werden, sofern das Risiko für den Menschen abgeschätzt werden soll.

Obwohl diese Berechnungen vermuten lassen, dass TiO₂-NP keine direkte Gefahr für gesunde Individuen darstellen, muss der Einfluss von NP trotzdem beachtet werden. Besonders der Einfluss auf kranke und vorgeschädigte Personen sollte berücksichtigt werden. Hier könnten die Auswirkungen von TiO₂-NP Bestandteil eines kumulativen Effekts sein. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine pulmonale Surfactant-Dysfunktion für ein Krankheitsbild verschiedener Atemwegserkrankungen wie Asthma (72) und Mukoviszidose (172) typisch ist. Zusätzlich kann eine Surfactant-Dysfunktion nach einer Lungentransplantation detektiert werden (173). Insbesondere das Einströmen von Plasma-Proteinen in das Atemwegs-Lumen ist hierfür bei Atemwegserkrankungen verantwortlich (174;175). Dieser Umstand kann äußerst wichtig für inhalierte Nanopartikel sein. Es ist bekannt, dass NP eine Atemwegsentzündung induzieren (176-178) oder verstärken (179;180) können. Da eine Atemwegsentzündung von einem Protein-Einstrom in das Atemwegs-Lumen begleitet wird, kann dies zu einer Surfactant-Dysfunktion führen. Weiterhin können NP oxidativen Stress und Lipid-Peroxidation auslösen (181-183). Oxidativer Stress mit nachgeschalteter Lipid-Peroxidation kann einen Anstieg in der Oberflächenspannung induzieren (184;185). Weiterhin können von Motoren produzierte NP mit Alkanen und Sulfaten verunreinigt sein (186). Da bekannt ist, dass Eicosan, ein spezifisches n-Alkan, was ein Bestandteil von Dieselabgasen ist, die biophysikalische Surfactant-Funktion negativ beeinflussen kann (187), können so Verunreinigungen von

Nanopartikeln eine Surfactant Dysfunktion auslösen. All diese Phänomene können additiv zu der in dieser Arbeit beschriebenen direkten Interaktion von NP und Surfactant auftreten. Nanopartikel könnten deshalb in der Lage sein, *in vivo* Veränderungen des pulmonalen Surfactants zu verstärken, was besonders für atemwegskranke Personen problematisch sein kann.

5.3 Schlussfolgerung

Komponenten des pulmonalen Surfactants können mit inhalierten Partikeln, welche die Alveolen erreichen, interagieren. Hierbei kann die biophysikalische Surfactant-Funktion inhibiert werden. Weiterhin kann die Ultrastruktur des Surfactants verändert werden. Die ausschlaggebenden Parameter sind hierbei vermutlich die Größe sowie die Oberfläche der eingesetzten Partikel.

Des Weiteren können Komponenten des Surfactants nach der Interaktion mit Partikeln auch deren Aufnahme in verschiedene Zellen modulieren. Eine inflammatorische Reaktion der Zellen kann somit beeinflusst werden.

Viele verschiedene Krankheiten werden von einer Surfactant-Dysfunktion begleitet. Weiterhin ist Interleukin-8 ein wichtiges Chemokin, was zur Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten führt. Ein vermehrtes Auftreten von neutrophilen Granulozyten im alveolaren Lumen ist eines der Hauptcharakteristika bestimmter Entzündungsreaktionen. Die Interaktion von Surfactant(-Komponenten) mit inhalierten Feinstaub-Partikeln kann demnach den pathophysiologischen Zustand der Lunge verändern.

Dies könnte ein vielversprechender Ansatz für eine Medikamentenentwicklung sein. Ein Medikament auf der Basis von Surfactant Protein D könnte den bei verschiedenen Atemwegserkrankungen vorherrschenden Entzündungsstatus der Lunge reduzieren.

Weiterhin könnte eine nanotechnologische Funktionalisierung produzierter Nanopartikel für ein minimiertes gesundheitsschädigendes Risiko nach Inhalation sorgen. Hierfür müsste darauf geachtet werden, dass keine Surfactant-Komponenten an die Nanopartikel binden. Eine Surfactant-Dysfunktion könnte so verhindert werden.

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit sollten bereits publizierte aber auch künftige (*in vitro*-) Experimente kritisch analysiert werden. In der Literatur werden oft Experimente beschrieben, welche die Auswirkungen von Partikeln auf Zellkulturen beschreiben. Fehlen in den

Versuchsansätzen Surfactant-Komponenten, könnten falsch positive beziehungsweise falsch negative Resultate das Ergebnis sein.

A549-Zellen sind eine unter Wissenschaftlern beliebte Zelllinie, da sie häufig verwendet und dementsprechend gut charakterisiert sind. Allerdings zeigte sich in den Versuchen dieser Arbeit, dass sie sich in einer Monokultur nicht wie primäre Epithelzellen verhalten. Eine Integration in ein komplexes Zellsystem führte jedoch zu einem geänderten Verhalten der Zellen. Während sie in einer Monokultur nicht durch SP-D moduliert wurden, reagierten sie im Triple-Zellkultur-Modell auf Zugabe von SP-D. Dieses Verhalten war identisch mit dem von primären Zellen, welche in einer Monokultur kultiviert wurden. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass A549-Zellen eine Einbettung in andere Zellschichten benötigen, um selbst ein *in vivo*-ähnliches Verhalten zu zeigen.

5.4 Ausblick

Nanopartikel können die biophysikalische Funktion des Surfactants inhibieren sowie dessen Ultrastruktur verändern. Dies wurde in einem *in vitro*-System gezeigt. Um die *in vivo*-Relevanz zu überprüfen, sollten TiO₂-NP vernebelt und über wenige Stunden von Versuchstieren eingeatmet werden. Anschließend sollte Surfactant isoliert und die Funktion des Surfactants im Pulsierenden-Blasen-Surfactometer überprüft werden. Weiterhin sollten die Lunge und das intraalveoläre Surfactant fixiert werden, um eine elektronenmikroskopische Untersuchung der Surfactant-Ultrastruktur zu ermöglichen. Besonders sollte hierbei beachtet werden, dass während der Inhalation der Partikel keine Entzündungsreaktion in der Lunge auftritt. Dies würde zu einem Protein-Einstrom in die Lunge führen, was selbst einen Effekt auf die Funktion des Surfactants ausüben würde.

Des Weiteren sollten verschiedene Funktionalisierungen der Nanopartikel getestet werden. Nanopartikel, welche nicht direkt an Surfactant-Komponenten binden, könnten so eine Surfactant-Dysfunktion verhindern. Dies macht einen Einsatz der Nanopartikel für klinische Studien (Medikamententransport, etc.) vielversprechender.

Auch bezüglich der Interaktionen von SP-D mit SPP gibt es weitere offene Fragestellungen. Der genaue Mechanismus der Modulation der Aufnahme sowie der Zytokin-Ausschüttung stellt einen vielversprechenden Ansatz für weitere Forschungen dar. Eine detaillierte Erkenntnis der involvierten Mechanismen der möglichen antiinflammatorischen Wirkung wäre ein weiterer Schritt in Richtung eines (synthetischen) Medikamenten-Wirkstoffs.

Das Triple-Zellkultur-Modell sollte optimiert werden. Eine größere Dichte an T-Zellen und Dendritischen Zellen sollte eine Untersuchung allergen-spezifischer T-Zell-DC-Interaktionen ermöglichen. So könnte das Modell für weitere Fragestellungen eingesetzt werden.

Da sich gezeigt hat, dass eine Zelllinie in diesem Modell ein *in vivo*-ähnliches Verhaltensmuster aufweist, sollte versucht werden, dieses Modell komplett mit Zelllinien aufzubauen. Eine bessere Standardisierung der Ergebnisse wäre somit möglich. Dieses Modell, validiert am Modell mit primären Zellen, wäre vielversprechend und könnte künftig helfen, Tierversuche zu ersetzen.

6 Anhang

A1. LITERATURVERZEICHNIS

1. Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113:823-839 (2005).
2. Semmler-Behnke M, Kreyling WG, Lipka J, Fertsch S, Wenk A, Takenaka S, Schmid G, Brandau W. Biodistribution of 1.4- and 18-nm gold particles in rats. *Small* 4:2108-2111 (2008).
3. Elder A, Gelein R, Silva V, Feikert T, Opanashuk L, Carter J, Potter R, Maynard A, Ito Y, Finkelstein J, Oberdorster G. Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environ Health Perspect* 114:1172-1178 (2006).
4. Li N, Xia T, Nel AE. The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. *Free Radic Biol Med* 44:1689-1699 (2008).
5. Possmayer F, Yu SH, Weber JM, Harding PG. Pulmonary surfactant. *Can J Biochem Cell Biol* 62:1121-1133 (1984).
6. Wright JR. Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat Rev Immunol* 5:58-68 (2005).
7. Wichmann HE, Spix C, Tuch T, Wolke G, Peters A, Heinrich J, Kreyling WG, Heyder J. Daily mortality and fine and ultrafine particles in Erfurt, Germany part I: role of particle number and particle mass. *Res Rep Health Eff Inst* 5-86 (2000).
8. Dockery DW, Pope CA, III, Xu X, Spengler JD, Ware JH, Fay ME, Ferris BG, Jr., Speizer FE. An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N Engl J Med* 329:1753-1759 (1993).
9. Li N, Hao M, Phalen RF, Hinds WC, Nel AE. Particulate air pollutants and asthma. A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects. *Clin Immunol* 109:250-265 (2003).
10. Kirkham P, Rahman I. Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacol Ther* 111:476-494 (2006).
11. Goss CH, Newsom SA, Schildcrout JS, Sheppard L, Kaufman JD. Effect of ambient air pollution on pulmonary exacerbations and lung function in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 169:816-821 (2004).

12. Collaco JM, Vanscoy L, Bremer L, McDougal K, Blackman SM, Bowers A, Naughton K, Jennings J, Ellen J, Cutting GR. Interactions between secondhand smoke and genes that affect cystic fibrosis lung disease. *JAMA* 299:417-424 (2008).
13. Zimmer AT. The influence of metallurgy on the formation of welding aerosols. *J Environ Monit* 4:628-632 (2002).
14. Dennekamp M, Howarth S, Dick CA, Cherrie JW, Donaldson K, Seaton A. Ultrafine particles and nitrogen oxides generated by gas and electric cooking. *Occup Environ Med* 58:511-516 (2001).
15. Anderson PJ, Wilson JD, Hiller FC. Particle size distribution of mainstream tobacco and marijuana smoke. Analysis using the electrical aerosol analyzer. *Am Rev Respir Dis* 140:202-205 (1989).
16. Marshall JD, Behrentz E. Vehicle self-pollution intake fraction: children's exposure to school bus emissions. *Environ Sci Technol* 39:2559-2563 (2005).
17. Zhu Y, Eiguren-Fernandez A, Hinds WC, Miguel AH. In-cabin commuter exposure to ultrafine particles on Los Angeles freeways. *Environ Sci Technol* 41:2138-2145 (2007).
18. Pirjola L, Paasonen P, Pfeiffer D, Hussein T, Hameri K, Koskentalo T, Virtanen A, Ronkko T, Keskinen J, Pakkanen TA, Hillamo RE. Dispersion of particles and trace gases nearby a city highway: Mobile laboratory measurements in Finland. *Atmospheric Environment* 40:867-879 (2006).
19. Masciangioli T, Zhang WX. Environmental technologies at the nanoscale. *Environ Sci Technol* 37:102A-108A (2003).
20. Sawant KK, Dodiya SS. Recent advances and patents on solid lipid nanoparticles. *Recent Pat Drug Deliv Formul* 2:120-135 (2008).
21. Kreuter J, Shamenkov D, Petrov V, Ramge P, Cychutek K, Koch-Brandt C, Alyautdin R. Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier. *J Drug Target* 10:317-325 (2002).
22. Tosi G, Costantino L, Rivasi F, Ruozi B, Leo E, Vergoni AV, Tacchi R, Bertolini A, Vandelli MA, Forni F. Targeting the central nervous system: in vivo experiments with peptide-derivatized nanoparticles loaded with Loperamide and Rhodamine-123. *J Control Release* 122:1-9 (2007).
23. Thiesen B, Jordan A. Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 24:467-474 (2008).
24. Poland CA, Duffin R, Kinloch I, Maynard A, Wallace WA, Seaton A, Stone V, Brown S, MacNee W, Donaldson K. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat Nanotechnol* 3:423-428 (2008).

25. Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schurch S, Kreyling W, Schulz H, Semmler M, Im H, V, Heyder J, Gehr P. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect* 113:1555-1560 (2005).
26. Borm PJ, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, Schins R, Stone V, Kreyling W, Lademann J, Krutmann J, Warheit D, Oberdorster E. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Part Fibre Toxicol* 3:11 (2006).
27. Donnell AT, Grammer LC. An overview of allergens. *Allergy Asthma Proc* 25:S2-S4 (2004).
28. Stewart GA, Thompson PJ. The biochemistry of common aeroallergens. *Clin Exp Allergy* 26:1020-1044 (1996).
29. Hoehne JH, Reed CE. Where is the allergic reaction in ragweed asthma? *J Allergy Clin Immunol* 48:36-39 (1971).
30. Wilson AF, Novey HS, Berke RA, Surprenant EL. Deposition of inhaled pollen and pollen extract in human airways. *N Engl J Med* 288:1056-1058 (1973).
31. Suphioglu C, Singh MB, Taylor P, Bellomo R, Holmes P, Puy R, Knox RB. Mechanism of grass-pollen-induced asthma. *Lancet* 339:569-572 (1992).
32. Knox RB. Grass pollen, thunderstorms and asthma. *Clin Exp Allergy* 23:354-359 (1993).
33. D'Amato G, Liccardi G, Frenguelli G. Thunderstorm-asthma and pollen allergy. *Allergy* 62:11-16 (2007).
34. D'Amato G, Cecchi L, Bonini S, Nunes C, Annesi-Maesano I, Behrendt H, Liccardi G, Popov T, van Cauwenberge P. Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy* 62:976-990 (2007).
35. Makimura K, Hanazawa R, Takatori K, Tamura Y, Fujisaki R, Nishiyama Y, Abe S, Uchida K, Kawamura Y, Ezaki T, Yamaguchi H. Fungal flora on board the Mir-Space Station, identification by morphological features and ribosomal DNA sequences. *Microbiol Immunol* 45:357-363 (2001).
36. Horner WE, Helbling A, Salvaggio JE, Lehrer SB. Fungal allergens. *Clin Microbiol Rev* 8:161-179 (1995).
37. Geiser M, Leupin N, Maye I, Hof VI, Gehr P. Interaction of fungal spores with the lungs: distribution and retention of inhaled puffball (*Calvatia excipuliformis*) spores. *J Allergy Clin Immunol* 106:92-100 (2000).

38. Green BJ, Tovey ER, Sercombe JK, Blachere FM, Beezhold DH, Schmechel D. Airborne fungal fragments and allergenicity. *Med Mycol* 44 Suppl 1:S245-S255 (2006).
39. Tovey ER, Chapman MD, Platts-Mills TA. Mite faeces are a major source of house dust allergens. *Nature* 289:592-593 (1981).
40. Lowenstein H, Gravesen S, Larsen L, Schwartz B. Indoor allergens. *J Allergy Clin Immunol* 78:1035-1039 (1986).
41. Spitzauer S. Allergy to mammalian proteins: at the borderline between foreign and self? *Int Arch Allergy Immunol* 120:259-269 (1999).
42. Mantylarvi R, Rautiainen J, Virtanen T. Lipocalins as allergens. *Biochim Biophys Acta* 1482:308-317 (2000).
43. Vermaelen K, Pauwels R. Pulmonary dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med* 172:530-551 (2005).
44. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2:361-367 (2001).
45. Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA, Vyas JM, Boes M, Ploegh HL, Fox JG, Littman DR, Reinecker HC. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 307:254-258 (2005).
46. Jahnsen FL, Strickland DH, Thomas JA, Tobagus IT, Napoli S, Zosky GR, Turner DJ, Sly PD, Stumbles PA, Holt PG. Accelerated antigen sampling and transport by airway mucosal dendritic cells following inhalation of a bacterial stimulus. *J Immunol* 177:5861-5867 (2006).
47. Blank F, Rothen-Rutishauser B, Gehr P. Dendritic cells and macrophages form a transepithelial network against foreign particulate antigens. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36:669-677 (2007).
48. Runswick S, Mitchell T, Davies P, Robinson C, Garrod DR. Pollen proteolytic enzymes degrade tight junctions. *Respirology* 12:834-842 (2007).
49. Tai HY, Tam MF, Chou H, Peng HJ, Su SN, Perng DW, Shen HD. Pen ch 13 allergen induces secretion of mediators and degradation of occludin protein of human lung epithelial cells. *Allergy* 61:382-388 (2006).
50. Takano K, Kojima T, Go M, Murata M, Ichimiya S, Himi T, Sawada N. HLA-DR- and CD11c-positive dendritic cells penetrate beyond well-developed epithelial tight junctions in human nasal mucosa of allergic rhinitis. *J Histochem Cytochem* 53:611-619 (2005).

51. Broide DH. Molecular and cellular mechanisms of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 108:S65-S71 (2001).
52. Komiya A, Nagase H, Yamada H, Sekiya T, Yamaguchi M, Sano Y, Hanai N, Furuya A, Ohta K, Matsushima K, Yoshie O, Yamamoto K, Hirai K. Concerted expression of eotaxin-1, eotaxin-2, and eotaxin-3 in human bronchial epithelial cells. *Cell Immunol* 225:91-100 (2003).
53. Duguet A, Iijima H, Eum SY, Hamid Q, Eidelman DH. Eosinophil peroxidase mediates protein nitration in allergic airway inflammation in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 164:1119-1126 (2001).
54. Restrepo CI, Dong Q, Savov J, Mariencheck WI, Wright JR. Surfactant protein D stimulates phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* by alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21:576-585 (1999).
55. Barr FE, Pedigo H, Johnson TR, Shepherd VL. Surfactant protein-A enhances uptake of respiratory syncytial virus by monocytes and U937 macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23:586-592 (2000).
56. Tino MJ, Wright JR. Surfactant protein A stimulates phagocytosis of specific pulmonary pathogens by alveolar macrophages. *Am J Physiol* 270:L677-L688 (1996).
57. Guo CJ, Atochina-Vasserman EN, Abramova E, Foley JP, Zaman A, Crouch E, Beers MF, Savani RC, Gow AJ. S-nitrosylation of surfactant protein-D controls inflammatory function. *PLoS Biol* 6:e266 (2008).
58. Ikegami M. Surfactant catabolism. *Respirology* 11 Suppl:S24-S27 (2006).
59. Bailey AG, Hashish AH, Williams TJ. Drug delivery by inhalation of charged particles. *Journal of Electrostatics* 44:3-10 (1998).
60. Leonenko Z, Rodenstein M, Dohner J, Eng LM, Amrein M. Electrical surface potential of pulmonary surfactant. *Langmuir* 22:10135-10139 (2006).
61. Schurch S, Gehr P, Im H, V, Geiser M, Green F. Surfactant displaces particles toward the epithelium in airways and alveoli. *Respir Physiol* 80:17-32 (1990).
62. Gehr P, Geiser M, Im H, V, Schurch S, Waber U, Baumann M. Surfactant and inhaled particles in the conducting airways: structural, stereological, and biophysical aspects. *Microsc Res Tech* 26:423-436 (1993).
63. Geiser M, Schurch S, Gehr P. Influence of surface chemistry and topography of particles on their immersion into the lung's surface-lining layer. *J Appl Physiol* 94:1793-1801 (2003).
64. Wang JY, Kishore U, Lim BL, Strong P, Reid KB. Interaction of human lung surfactant proteins A and D with mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) allergens. *Clin Exp Immunol* 106:367-373 (1996).

65. Malhotra R, Haurum J, Thiel S, Jensenius JC, Sim RB. Pollen grains bind to lung alveolar type II cells (A549) via lung surfactant protein A (SP-A). *Biosci Rep* 13:79-90 (1993).
66. Erpenbeck VJ, Malherbe DC, Sommer S, Schmiedl A, Steinhilber W, Ghio AJ, Krug N, Wright JR, Hohlfeld JM. Surfactant protein D increases phagocytosis and aggregation of pollen-allergen starch granules. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288:L692-L698 (2005).
67. Madan T, Kishore U, Shah A, Eggleton P, Strong P, Wang JY, Aggrawal SS, Sarma PU, Reid KB. Lung surfactant proteins A and D can inhibit specific IgE binding to the allergens of *Aspergillus fumigatus* and block allergen-induced histamine release from human basophils. *Clin Exp Immunol* 110:241-249 (1997).
68. Malherbe DC, Erpenbeck VJ, Abraham SN, Crouch EC, Hohlfeld JM, Wright JR. Surfactant protein D decreases pollen-induced IgE-dependent mast cell degranulation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289:L856-L866 (2005).
69. Liu CF, Chen YL, Chang WT, Shieh CC, Yu CK, Reid KB, Wang JY. Mite allergen induces nitric oxide production in alveolar macrophage cell lines via CD14/toll-like receptor 4, and is inhibited by surfactant protein D. *Clin Exp Allergy* 35:1615-1624 (2005).
70. Deb R, Shakib F, Reid K, Clark H. Major House Dust Mite Allergens *Dermatophagoides pteronyssinus* 1 and *Dermatophagoides farinae* 1 Degrade and Inactivate Lung Surfactant Proteins A and D. *J Biol Chem* 282:36808-36819 (2007).
71. Liu M, Wang L, Holm BA, Enhorning G. Dysfunction of guinea-pig pulmonary surfactant and type II pneumocytes after repetitive challenge with aerosolized ovalbumin. *Clin Exp Allergy* 27:802-807 (1997).
72. Hohlfeld JM, Ahlf K, Enhorning G, Balke K, Erpenbeck VJ, Petschallies J, Hoymann HG, Fabel H, Krug N. Dysfunction of pulmonary surfactant in asthmatics after segmental allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med* 159:1803-1809 (1999).
73. Haczku A, Atochina EN, Tomer Y, Cao Y, Campbell C, Scanlon ST, Russo SJ, Enhorning G, Beers MF. The late asthmatic response is linked with increased surface tension and reduced surfactant protein B in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283:L755-L765 (2002).
74. Schmiedl A, Hoymann HG, Ochs M, Menke A, Fehrenbach A, Krug N, Tschernig T, Hohlfeld JM. Increase of inactive intra-alveolar surfactant subtypes in lungs of asthmatic Brown Norway rats. *Virchows Arch* 442:56-65 (2003).
75. Hite RD, Seeds MC, Bowton DL, Grier BL, Safta AM, Balkrishnan R, Waite BM, Bass DA. Surfactant phospholipid changes after antigen challenge: a role for phosphatidylglycerol in dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288:L610-L617 (2005).

76. Haczku A, Cao Y, Vass G, Kierstein S, Nath P, Atochina-Vasserman EN, Scanlon ST, Li L, Griswold DE, Chung KF, Poulain FR, Hawgood S, Beers MF, Crouch EC. IL-4 and IL-13 form a negative feedback circuit with surfactant protein-D in the allergic airway response. *J Immunol* 176:3557-3565 (2006).
77. Ooi EH, Wormald PJ, Carney AS, James CL, Tan LW. Surfactant protein d expression in chronic rhinosinusitis patients and immune responses in vitro to *Aspergillus* and *alternaria* in a nasal explant model. *Laryngoscope* 117:51-57 (2007).
78. Erpenbeck VJ, Schmidt R, Gunther A, Krug N, Hohlfeld JM. Surfactant protein levels in bronchoalveolar lavage after segmental allergen challenge in patients with asthma. *Allergy* 61:598-604 (2006).
79. Scanlon ST, Milovanova T, Kierstein S, Cao Y, Atochina EN, Tomer Y, Russo SJ, Beers MF, Haczku A. Surfactant protein-A inhibits *Aspergillus fumigatus*-induced allergic T-cell responses. *Respir Res* 6:97 (2005).
80. Atochina EN, Beers MF, Tomer Y, Scanlon ST, Russo SJ, Panettieri RA, Jr., Haczku A. Attenuated allergic airway hyperresponsiveness in C57BL/6 mice is associated with enhanced surfactant protein (SP)-D production following allergic sensitization. *Respir Res* 4:15 (2003).
81. Liu M, Wang L, Li E, Enhorning G. Pulmonary surfactant given prophylactically alleviates an asthma attack in guinea-pigs. *Clin Exp Allergy* 26:270-275 (1996).
82. Erpenbeck VJ, Ziegert M, Cavalet-Blanco D, Martin C, Baelder R, Glaab T, Braun A, Steinhilber W, Luettig B, Uhlig S, Hoymann HG, Krug N, Hohlfeld JM. Surfactant protein D inhibits early airway response in *Aspergillus fumigatus*-sensitized mice. *Clin Exp Allergy* 36:930-940 (2006).
83. Madan T, Reid KB, Singh M, Sarma PU, Kishore U. Susceptibility of mice genetically deficient in the surfactant protein (SP)-A or SP-D gene to pulmonary hypersensitivity induced by antigens and allergens of *Aspergillus fumigatus*. *J Immunol* 174:6943-6954 (2005).
84. Strong P, Reid KB, Clark H. Intranasal delivery of a truncated recombinant human SP-D is effective at down-regulating allergic hypersensitivity in mice sensitized to allergens of *Aspergillus fumigatus*. *Clin Exp Immunol* 130:19-24 (2002).
85. Madan T, Kishore U, Singh M, Strong P, Clark H, Hussain EM, Reid KB, Sarma PU. Surfactant proteins A and D protect mice against pulmonary hypersensitivity induced by *Aspergillus fumigatus* antigens and allergens. *J Clin Invest* 107:467-475 (2001).
86. Liu CF, Chen YL, Shieh CC, Yu CK, Reid KB, Wang JY. Therapeutic effect of surfactant protein D in allergic inflammation of mite-sensitized mice. *Clin Exp Allergy* 35:515-521 (2005).
87. Strong P, Townsend P, Mackay R, Reid KB, Clark HW. A recombinant fragment of human SP-D reduces allergic responses in mice sensitized to house dust mite allergens. *Clin Exp Immunol* 134:181-187 (2003).

88. Wang JY, Shieh CC, Yu CK, Lei HY. Allergen-induced bronchial inflammation is associated with decreased levels of surfactant proteins A and D in a murine model of asthma. *Clin Exp Allergy* 31:652-662 (2001).
89. Schaub B, Westlake RM, He H, Arestides R, Haley KJ, Campo M, Velasco G, Bellou A, Hawgood S, Poulain FR, Perkins DL, Finn PW. Surfactant protein D deficiency influences allergic immune responses. *Clin Exp Allergy* 34:1819-1826 (2004).
90. Takeda K, Miyahara N, Rha YH, Taube C, Yang ES, Joetham A, Kodama T, Balhorn AM, Dakhama A, Duez C, Evans AJ, Voelker DR, Gelfand EW. Surfactant protein D regulates airway function and allergic inflammation through modulation of macrophage function. *Am J Respir Crit Care Med* 168:783-789 (2003).
91. Bakshi MS, Zhao L, Smith R, Possmayer F, Petersen NO. Metal nanoparticle pollutants interfere with pulmonary surfactant function in vitro. *Biophys J* 94:855-868 (2008).
92. Saccani J, Castano S, Desbat B, Blaudez D. A phospholipid bilayer supported under a polymerized Langmuir film. *Biophys J* 85:3781-3787 (2003).
93. Mitra K, Ubarretxena-Belandia I, Taguchi T, Warren G, Engelman DM. Modulation of the bilayer thickness of exocytic pathway membranes by membrane proteins rather than cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4083-4088 (2004).
94. Mornet S, Lambert O, Duguet E, Brisson A. The formation of supported lipid bilayers on silica nanoparticles revealed by cryoelectron microscopy. *Nano Lett* 5:281-285 (2005).
95. Kendall M, Brown L, Trought K. Molecular adsorption at particle surfaces: a PM toxicity mediation mechanism. *Inhal Toxicol* 16 Suppl 1:99-105 (2004).
96. Kendall M, Tetley TD, Wigzell E, Hutton B, Nieuwenhuijsen M, Luckham P. Lung lining liquid modifies PM(2.5) in favor of particle aggregation: a protective mechanism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282:L109-L114 (2002).
97. Kendall M. Fine airborne urban particles (PM2.5) sequester lung surfactant and amino acids from human lung lavage. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293:L1053-L1058 (2007).
98. Hill CA, Wallace WE, Keane MJ, Mike PS. The enzymatic removal of a surfactant coating from quartz and kaolin by P388D1 cells. *Cell Biol Toxicol* 11:119-128 (1995).
99. Keane M, Wallace W. A quantitative in vitro fluorescence imaging method for phospholipid loss from respirable mineral particles. *Inhal Toxicol* 17:287-292 (2005).
100. Wallace WE, Keane MJ, Mike PS, Hill CA, Vallyathan V, Regad ED. Contrasting respirable quartz and kaolin retention of lecithin surfactant and expression of membranolytic activity following phospholipase A2 digestion. *J Toxicol Environ Health* 37:391-409 (1992).

101. Das AR, Cilento EV, Keane MJ, Wallace WE. Intracellular surfactant removal from phagocytized minerals: development of a fluorescent method using a BODIPY-labeled phospholipid. *Inhal Toxicol* 12:765-781 (2000).
102. Murray DK, Harrison JC, Wallace WE. A ¹³C CP/MAS and ³¹P NMR study of the interactions of dipalmitoylphosphatidylcholine with respirable silica and kaolin. *J Colloid Interface Sci* 288:166-170 (2005).
103. Snyder JA, Madura JD. Interaction of the phospholipid head group with representative quartz and aluminosilicate structures: an ab initio study. *J Phys Chem B* 112:7095-7103 (2008).
104. Maier M, Hannebauer B, Holldorff H, Albers P. Does lung surfactant promote disaggregation of nanostructured titanium dioxide? *J Occup Environ Med* 48:1314-1320 (2006).
105. Salvador-Morales C, Townsend P, Flahaut E, Venien-Bryan C, Vlandas A, Green MLH, Sim RB. Binding of pulmonary surfactant proteins to carbon nanotubes; potential for damage to lung immune defense mechanisms. *Carbon* 45:607-617 (2007).
106. Ma JY, Weber KC. Dipalmitoyl lecithin and lung surfactant adsorption at an air-liquid interface by respirable particles. *Environ Res* 41:120-129 (1986).
107. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51:1417-1423 (1973).
108. Rothen-Rutishauser BM, Kiama SG, Gehr P. A three-dimensional cellular model of the human respiratory tract to study the interaction with particles. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32:281-289 (2005).
109. Dong Q, Wright JR. Degradation of surfactant protein D by alveolar macrophages. *Am J Physiol* 274:L97-105 (1998).
110. Ruberg SJ. Dose response studies. II. Analysis and interpretation. *J Biopharm Stat* 5:15-42 (1995).
111. Chi GYH. Multiple testings: Multiple comparisons and multiple endpoints. *Drug Information Journal* 32:1347S-1362S (1998).
112. Bauer P, Rohmel J, Maurer W, Hothorn L. Testing strategies in multi-dose experiments including active control. *Stat Med* 17:2133-2146 (1998).
113. Ge N, Nishioka Y, Nakamura Y, Okano Y, Yoneda K, Ogawa H, Sugita A, Yanagawa H, Sone S. Synthesis and secretion of interleukin-15 by freshly isolated human bronchial epithelial cells. *Int Arch Allergy Immunol* 135:235-242 (2004).

114. Heguy A, Harvey BG, O'Connor TP, Hackett NR, Crystal RG. Sampling-dependent up-regulation of gene expression in sequential samples of human airway epithelial cells. *Mol Med* 9:200-208 (2003).
115. Profita M, Chiappara G, Mirabella F, Di Giorgi R, Chimenti L, Costanzo G, Riccobono L, Bellia V, Bousquet J, Vignola AM. Effect of cilomilast (Ariflo) on TNF-alpha, IL-8, and GM-CSF release by airway cells of patients with COPD. *Thorax* 58:573-579 (2003).
116. Blume C, Foerster S, Gilles S, Becker WM, Ring J, Behrendt H, Petersen A, Traidl-Hoffmann C. Human Epithelial Cells of the Respiratory Tract and the Skin Differentially Internalize Grass Pollen Allergens. *J Invest Dermatol* (2009).
117. Renkonen J, Mattila P, Lehti S, Makinen J, Sormunen R, Tervo T, Paavonen T, Renkonen R. Birch pollen allergen Bet v 1 binds to and is transported through conjunctival epithelium in allergic patients. *Allergy* (2009).
118. Stearns RC, Paulauskis JD, Godleski JJ. Endocytosis of ultrafine particles by A549 cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24:108-115 (2001).
119. Bajanowski T, Brinkmann B, Stefanec AM, Barckhaus RH, Fechner G. Detection and analysis of tracers in experimental drowning. *Int J Legal Med* 111:57-61 (1998).
120. Churg A, Stevens B, Wright JL. Comparison of the uptake of fine and ultrafine TiO₂ in a tracheal explant system. *Am J Physiol* 274:L81-L86 (1998).
121. Kato T, Yashiro T, Murata Y, Herbert DC, Oshikawa K, Bando M, Ohno S, Sugiyama Y. Evidence that exogenous substances can be phagocytized by alveolar epithelial cells and transported into blood capillaries. *Cell Tissue Res* 311:47-51 (2003).
122. Blank F, Rothen-Rutishauser BM, Schurch S, Gehr P. An optimized in vitro model of the respiratory tract wall to study particle cell interactions. *J Aerosol Med* 19:392-405 (2006).
123. Schins RP, Duffin R, Hohr D, Knaapen AM, Shi T, Weishaupt C, Stone V, Donaldson K, Borm PJ. Surface modification of quartz inhibits toxicity, particle uptake, and oxidative DNA damage in human lung epithelial cells. *Chem Res Toxicol* 15:1166-1173 (2002).
124. Andersson K, Lidholm J. Characteristics and immunobiology of grass pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 130:87-107 (2003).
125. Hansen S, Lo B, Evans K, Neophytou P, Holmskov U, Wright JR. Surfactant protein D augments bacterial association but attenuates major histocompatibility complex class II presentation of bacterial antigens. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36:94-102 (2007).
126. Schagat TL, Wofford JA, Wright JR. Surfactant protein A enhances alveolar macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils. *J Immunol* 166:2727-2733 (2001).

127. Mahajan L, Madan T, Kamal N, Singh VK, Sim RB, Telang SD, Ramchand CN, Waters P, Kishore U, Sarma PU. Recombinant surfactant protein-D selectively increases apoptosis in eosinophils of allergic asthmatics and enhances uptake of apoptotic eosinophils by macrophages. *Int Immunol* 20:993-1007 (2008).
128. Brinker KG, Martin E, Borron P, Mostaghel E, Doyle C, Harding CV, Wright JR. Surfactant protein D enhances bacterial antigen presentation by bone marrow-derived dendritic cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281:L1453-L1463 (2001).
129. Kishore U, Greenhough TJ, Waters P, Shrive AK, Ghai R, Kamran MF, Bernal AL, Reid KB, Madan T, Chakraborty T. Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. *Mol Immunol* 43:1293-1315 (2006).
130. Basu S, Binder RJ, Ramalingam T, Srivastava PK. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* 14:303-313 (2001).
131. Orr AW, Pallero MA, Murphy-Ullrich JE. Thrombospondin stimulates focal adhesion disassembly through Gi- and phosphoinositide 3-kinase-dependent ERK activation. *J Biol Chem* 277:20453-20460 (2002).
132. Arosa FA, de Jesus O, Porto G, Carmo AM, de Sousa M. Calreticulin is expressed on the cell surface of activated human peripheral blood T lymphocytes in association with major histocompatibility complex class I molecules. *J Biol Chem* 274:16917-16922 (1999).
133. Goicoechea S, Orr AW, Pallero MA, Eggleton P, Murphy-Ullrich JE. Thrombospondin mediates focal adhesion disassembly through interactions with cell surface calreticulin. *J Biol Chem* 275:36358-36368 (2000).
134. Kypreou KP, Kavvadas P, Karamessinis P, Peroulis M, Alberti A, Sideras P, Psarras S, Capetanaki Y, Politis PK, Charonis AS. Altered expression of calreticulin during the development of fibrosis. *Proteomics* 8:2407-2419 (2008).
135. Gurr JR, Wang AS, Chen CH, Jan KY. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology* 213:66-73 (2005).
136. Garcon G, Dagher Z, Zerimech F, Ledoux F, Courcot D, Aboukais A, Puskaric E, Shirali P. Dunkerque City air pollution particulate matter-induced cytotoxicity, oxidative stress and inflammation in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicol In Vitro* 20:519-528 (2006).
137. Matozaki T, Murata Y, Okazawa H, Ohnishi H. Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRPalpha signalling pathway. *Trends Cell Biol* 19:72-80 (2009).
138. Matozaki T, Murata Y, Okazawa H, Ohnishi H. Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRPalpha signalling pathway. *Trends Cell Biol* 19:72-80 (2009).

139. Gardai SJ, Xiao YQ, Dickinson M, Nick JA, Voelker DR, Greene KE, Henson PM. By binding SIRPalpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation. *Cell* 115:13-23 (2003).
140. Crouch EC, Smith K, McDonald B, Briner D, Linders B, McDonald J, Holmskov U, Head J, Hartshorn K. Species differences in the carbohydrate binding preferences of surfactant protein D. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35:84-94 (2006).
141. Hartshorn KL, Holmskov U, Hansen S, Zhang P, Meschi J, Moguees T, White MR, Crouch EC. Distinctive anti-influenza properties of recombinant collectin 43. *Biochem J* 366:87-96 (2002).
142. Blank F, Rothen-Rutishauser BM, Schurch S, Gehr P. An optimized in vitro model of the respiratory tract wall to study particle cell interactions. *J Aerosol Med* 19:392-405 (2006).
143. Chou DL, Daugherty BL, McKenna EK, Hsu WM, Tyler NK, Plopper CG, Hyde DM, Schelegle ES, Gershwin LJ, Miller LA. Chronic aeroallergen during infancy enhances eotaxin-3 expression in airway epithelium and nerves. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33:1-8 (2005).
144. Shannon J, Ernst P, Yamauchi Y, Olivenstein R, Lemiere C, Foley S, Cicora L, Ludwig M, Hamid Q, Martin JG. Differences in airway cytokine profile in severe asthma compared to moderate asthma. *Chest* 133:420-426 (2008).
145. Tomee JF, van Weissenbruch R, de Monchy JG, Kauffman HF. Interactions between inhalant allergen extracts and airway epithelial cells: effect on cytokine production and cell detachment. *J Allergy Clin Immunol* 102:75-85 (1998).
146. Kauffman HF, Tamm M, Timmerman JA, Borger P. House dust mite major allergens Der p 1 and Der p 5 activate human airway-derived epithelial cells by protease-dependent and protease-independent mechanisms. *Clin Mol Allergy* 4:5 (2006).
147. Kauffman HF, Tomee JF, van de Riet MA, Timmerman AJ, Borger P. Protease-dependent activation of epithelial cells by fungal allergens leads to morphologic changes and cytokine production. *J Allergy Clin Immunol* 105:1185-1193 (2000).
148. Gosset P, Tillie-Leblond I, Oudin S, Parmentier O, Wallaert B, Joseph M, Tonnel AB. Production of chemokines and proinflammatory and antiinflammatory cytokines by human alveolar macrophages activated by IgE receptors. *J Allergy Clin Immunol* 103:289-297 (1999).
149. Rosenwasser LJ. New immunopharmacologic approaches to asthma: role of cytokine antagonism. *J Allergy Clin Immunol* 105:S586-S591 (2000).
150. Casas R, Skarsvik S, Lindstrom A, Zetterstrom O, Duchon K. Impaired maturation of monocyte-derived dendritic cells from birch allergic individuals in association with birch-specific immune responses. *Scand J Immunol* 66:591-598 (2007).

151. Lamhamedi-Cherradi SE, Martin RE, Ito T, Kheradmand F, Corry DB, Liu YJ, Moyle M. Fungal proteases induce Th2 polarization through limited dendritic cell maturation and reduced production of IL-12. *J Immunol* 180:6000-6009 (2008).
152. Haczku A. Protective role of the lung collectins surfactant protein A and surfactant protein D in airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 122:861-879 (2008).
153. Lo B, Hansen S, Evans K, Heath JK, Wright JR. Alveolar epithelial type II cells induce T cell tolerance to specific antigen. *J Immunol* 180:881-888 (2008).
154. Jiang C, Gamarnik A, Tripp CP. Identification of lipid aggregate structures on TiO₂ surface using headgroup IR bands. *J Phys Chem B* 109:4539-4544 (2005).
155. Fortunelli A, Monti S. Simulations of lipid adsorption on TiO₂ surfaces in solution. *Langmuir* 24:10145-10154 (2008).
156. Putz G, Goerke J, Tausch HW, Clements JA. Comparison of captive and pulsating bubble surfactometers with use of lung surfactants. *J Appl Physiol* 76:1425-1431 (1994).
157. Rudiger M, Kolleck I, Putz G, Wauer RR, Stevens P, Rustow B. Plasmalogens effectively reduce the surface tension of surfactant-like phospholipid mixtures. *Am J Physiol* 274:L143-L148 (1998).
158. Bernhard W, Mottaghian J, Gebert A, Rau GA, von Der HARD, Poets CF. Commercial versus native surfactants. Surface activity, molecular components, and the effect of calcium. *Am J Respir Crit Care Med* 162:1524-1533 (2000).
159. Kim T, Lee CH, Joo SW, Lee K. Kinetics of gold nanoparticle aggregation: experiments and modeling. *J Colloid Interface Sci* 318:238-243 (2008).
160. Gross NJ, Narine KR. Surfactant subtypes of mice: metabolic relationships and conversion in vitro. *J Appl Physiol* 67:414-421 (1989).
161. Veldhuizen RA, Inchley K, Hearn SA, Lewis JF, Possmayer F. Degradation of surfactant-associated protein B (SP-B) during in vitro conversion of large to small surfactant aggregates. *Biochem J* 295 (Pt 1):141-147 (1993).
162. Veldhuizen RA, Yao LJ, Hearn SA, Possmayer F, Lewis JF. Surfactant-associated protein A is important for maintaining surfactant large-aggregate forms during surface-area cycling. *Biochem J* 313 (Pt 3):835-840 (1996).
163. Ueda T, Ikegami M, Jobe A. Surfactant subtypes. In vitro conversion, in vivo function, and effects of serum proteins. *Am J Respir Crit Care Med* 149:1254-1259 (1994).
164. Kakinuma R, Shimizu H, Ogawa Y. Effect of meconium on the rate of in vitro subtype conversion of swine pulmonary surfactant. *Eur J Pediatr* 161:31-36 (2002).

-
165. Gross NJ, Schultz RM. Requirements for extracellular metabolism of pulmonary surfactant: tentative identification of serine protease. *Am J Physiol* 262:L446-L453 (1992).
 166. Gross NJ, Bublys V, D'Anza J, Brown CL. The role of alpha 1-antitrypsin in the control of extracellular surfactant metabolism. *Am J Physiol* 268:L438-L445 (1995).
 167. Ruppert C, Pucker C, Markart P, Schmidt R, Grimminger F, Seeger W, Sturzebecher J, Gunther A. Selective inhibition of large-to-small surfactant aggregate conversion by serine protease inhibitors of the bis-benzamidine type. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28:95-102 (2003).
 168. Veldhuizen RA, Yao LJ, Lewis JF. An examination of the different variables affecting surfactant aggregate conversion in vitro. *Exp Lung Res* 25:127-141 (1999).
 169. Inchley K, Cockshutt A, Veldhuizen R, Possmayer F. Dissociation of surfactant protein B from canine surfactant large aggregates during formation of small surfactant aggregates by in vitro surface area cycling. *Biochim Biophys Acta* 1440:49-58 (1999).
 170. Bastacky J, Lee CY, Goerke J, Koushafar H, Yager D, Kenaga L, Speed TP, Chen Y, Clements JA. Alveolar lining layer is thin and continuous: low-temperature scanning electron microscopy of rat lung. *J Appl Physiol* 79:1615-1628 (1995).
 171. Effros RM, Feng NH, Mason G, Sietsema K, Silverman P, Hukkanen J. Solute concentrations of the pulmonary epithelial lining fluid of anesthetized rats. *J Appl Physiol* 68:275-281 (1990).
 172. Griese M, Birrer P, Demirsoy A. Pulmonary surfactant in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 10:1983-1988 (1997).
 173. Hohlfeld JM, Tiryaki E, Hamm H, Hoymann HG, Krug N, Haverich A, Fabel H. Pulmonary surfactant activity is impaired in lung transplant recipients. *Am J Respir Crit Care Med* 158:706-712 (1998).
 174. Ikegami M, Jobe A, Jacobs H, Lam R. A protein from airways of premature lambs that inhibits surfactant function. *J Appl Physiol* 57:1134-1142 (1984).
 175. Holm BA, Notter RH, Finkelstein JN. Surface property changes from interactions of albumin with natural lung surfactant and extracted lung lipids. *Chem Phys Lipids* 38:287-298 (1985).
 176. Ferin J, Oberdorster G, Penney DP. Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 6:535-542 (1992).
 177. Sung JH, Ji JH, Yoon JU, Kim DS, Song MY, Jeong J, Han BS, Han JH, Chung YH, Kim J, Kim TS, Chang HK, Lee EJ, Lee JH, Yu IJ. Lung function changes in Sprague-Dawley rats after prolonged inhalation exposure to silver nanoparticles. *Inhal Toxicol* 20:567-574 (2008).

178. Niwa Y, Hiura Y, Sawamura H, Iwai N. Inhalation exposure to carbon black induces inflammatory response in rats. *Circ J* 72:144-149 (2008).
179. Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Hirano S, Sakurai M, Shimada A, Yoshikawa T. Effects of airway exposure to nanoparticles on lung inflammation induced by bacterial endotoxin in mice. *Environ Health Perspect* 114:1325-1330 (2006).
180. Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Ichinose T, Sakurai M, Yoshikawa T. Effects of nano particles on cytokine expression in murine lung in the absence or presence of allergen. *Arch Toxicol* 80:614-619 (2006).
181. Worle-Knirsch JM, Kern K, Schleh C, Adelhelm C, Feldmann C, Krug HF. Nanoparticulate vanadium oxide potentiated vanadium toxicity in human lung cells. *Environ Sci Technol* 41:331-336 (2007).
182. Sayes CM, Marchione AA, Reed KL, Warheit DB. Comparative pulmonary toxicity assessments of C60 water suspensions in rats: few differences in fullerene toxicity in vivo in contrast to in vitro profiles. *Nano Lett* 7:2399-2406 (2007).
183. Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM. Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicol Lett* 179:93-100 (2008).
184. Seeger W, Lepper H, Wolf HR, Neuhof H. Alteration of alveolar surfactant function after exposure to oxidative stress and to oxygenated and native arachidonic acid in vitro. *Biochim Biophys Acta* 835:58-67 (1985).
185. Shelley SA. Oxidant-induced alterations of lung surfactant system. *J Fla Med Assoc* 81:49-51 (1994).
186. Kittelson DB. Engines and nanoparticles: A review. *Journal of Aerosol Science* 29:575-588 (1998).
187. Kanno S, Furuyama A, Hirano S. Effects of eicosane, a component of nanoparticles in diesel exhaust, on surface activity of pulmonary surfactant monolayers. *Arch Toxicol* (2008).

A2. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AECG	Airway Epithelial Cell Growth Medium
BALF	Bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit
b.d.l.	Below detection limit
BEBM	Bronchial Epithelial Basal Medium
BET	Brunnauer, Emmett, Teller
CD	Cluster of differentiation
CRD	Carbohydrate recognition domain
CPS	Captive Bubble Surfactometer
DC	Dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetales Kälberserum
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HSA	Humanes-Serum-Albumin
HPBEC	Humane Primäre Bronchiale Epithelzellen
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
Kollektin	Kollagen-enthaltendes Lektin

LA	Large Aggregates
LBL	Lamellar-Body-Like Forms
MHC	Major Histocompatibility Complex
MO	Makrophagen
MP	Mikropartikel
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
n.d.	not detected
NHBE	Normale Humane Primäre Epithelzellen
NO	Stickstoffmonoxid
NP	Nanopartikel
ova	Ovalbumin
PBS	Phosphat-gepufferte Waschlösung
PM	Particulate Matter
POPG	Palmitoyl-oleoyl-phosphatidylglycerol
PP	Polystyren-Partikel
rfhSP-D	Rekombinantes Fragment des humanen SP-D
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SA	Small Aggregates
sd	Standard deviation
SP	Surfactant Protein
SPP	Subpollen-Partikel
Surfactant	Surface Active Agent

Th2-Zellen	T-Helferzellen vom Typ 2
TiO ₂	Titandioxid
UV	Unilamellare Vesikel
γ	Oberflächenspannung
γ_{ads}	Adsorptionsoberflächenspannung
γ_{min}	Minimale Oberflächenspannung

A3. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Lungengängigkeiten inhalierbarer Partikel (nach Oberdorster <i>et al.</i> , 2005).	5
Abbildung 2: Titelblatt des „Spiegel“ 14/2005	6
Abbildung 3: Quartärstruktur der Surfactant Proteine A und D	15
Abbildung 4: Surfactant-Metabolismus (nach Ikegami, 2005)	16
Abbildung 5: Zellseparation von mononukleären Zellen aus Blut oder Buffy Coat nach Dichtegradientenzentrifugation.	27
Abbildung 6: Schema des Prinzips der negativen Isolierung von CD4-positiven T-Zellen.	30
Abbildung 7: Ansetzen des Triple-Zellkultur-Modells.	32
Abbildung 8: Gating-Strategie der Auswertung der epithelialen SPP-Aufnahme und - Adhäsion.	40
Abbildung 9: Schematischer Aufbau des Pulsierenden-Blasen-Surfactometers	45
Abbildung 10: Repräsentatives Bild eines, von Normalen Humanen Bronchialen Epithelzellen (NHBE) internalisierten, Subpollen-Partikels (SPP).	50
Abbildung 11: Quantifizierung der Aufnahme und Adhäsion von Partikeln in und an Normale Humane Bronchiale Epithelzellen (NHBE).	51
Abbildung 12: Repräsentative Darstellung des Effekts von Surfactant Protein D (SP-D) auf die Aufnahme und Adhäsion von Subpollen-Partikeln (SPP) in beziehungsweise an Normale Humane Bronchiale Epithelzellen (NHBE).	52
Abbildung 13: Quantifizierung des Einflusses von Surfactant Protein D (SP-D) auf die Aufnahme und Adhäsion von Partikeln in beziehungsweise an Normale Humane Bronchiale Epithelzellen (NHBE).	53
Abbildung 14: Differenzierung zwischen Normalen Humanen Bronchialen Epithelzellen (NHBE), die Subpollen-Partikel aufgenommen oder ausschließlich gebunden hatten.	54
Abbildung 15: Quantifizierung des Einflusses eines rekombinanten Fragments des humanen Surfactant Protein D (rhSP-D) auf die Aufnahme und Adhäsion von Partikeln in beziehungsweise an Normale Humane Bronchiale Epithelzellen (NHBE).	55
Abbildung 16: Messung von Interleukin-8 nach Inkubation von Normalen Humanen Primären Bronchialen Epithelzellen (NHBE) mit Partikeln.	57
Abbildung 17: 3D-Rekonstruktion eines repräsentativen Bildes, welches die SPP-Aufnahme in Humane Primäre Bronchiale Epithelzellen (HPBEC) zeigt.	60
Abbildung 18: Quantifizierung der Aufnahme und Adhäsion von Subpollen-Partikeln (SPP) in beziehungsweise an Humane Primäre Bronchiale Epithelzellen (HPBEC).	61

Abbildung 19: 3D-Rekonstruktion eines repräsentativen Bildes, welches die SPP-Aufnahme in A549-Zellen zeigt.	62
Abbildung 20: Quantifizierung der Aufnahme und Adhäsion von Partikeln in beziehungsweise an A549-Zellen.	63
Abbildung 21: Quantifizierung des Einflusses von Surfactant Protein D (SP-D) auf die Aufnahme und Adhäsion von Partikeln in beziehungsweise an A549-Zellen.	64
Abbildung 22: Quantifizierung des Einflusses eines humanen rekombinanten Fragments des Surfactant Protein D (rhSP-D) auf die Aufnahme und Adhäsion von Partikeln in beziehungsweise an A549-Zellen.	65
Abbildung 23: Repräsentative Bilder internalisierter Subpollen-Partikel (SPP).	67
Abbildung 24: Anzahl der Zellen in einem Triple-Zellkultur-Modell, welche mindestens 1 Subpollen-Partikel (SPP) aufgenommen haben.	68
Abbildung 25: Repräsentative Bilder über den Einfluss von Surfactant Protein D (SP-D) auf die Aufnahme von Subpollen-Partikeln (SPP).	69
Abbildung 26: Quantifizierung der Anzahl aufgenommener Subpollen-Partikel (SPP) je einzelner positiver Zelle.	70
Abbildung 27: Messung von Interleukin (IL)-8 im Überstand des Triple-Zellkultur-Modells.	72
Abbildung 28: Repräsentative Bilder der verwendeten industriell synthetisierten Partikel.	75
Abbildung 29: Oberflächenspannung von Surfactant nach Inkubation mit TiO ₂ -Partikeln.	77
Abbildung 30: Oberflächenspannung nach <i>surface area cycling</i> in Anwesenheit von TiO ₂ -Partikeln.	79
Abbildung 31: Repräsentative Bilder der Surfactant-Ultrastruktur.	81

A4. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Zusammensetzung des Kulturmediums zur Kultivierung der Zelllinie A549	23
Tabelle 2: Zusammensetzung des Kulturmediums der NHBE	24
Tabelle 3: Zusammensetzung des Kulturmediums von HPBEC	26
Tabelle 4: Kulturmedien für Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen	29
Tabelle 5: Charakteristika der verwendeten industriell synthetisierten Partikel	37
Tabelle 6: Messungen von verschiedenen Zytokinen und Chemokinen im Überstand von Normalen Humanen Bronchialen Epithelzellen.	58
Tabelle 7: Messungen von verschiedenen Zytokinen und Chemokinen im Überstand von Normalen Humanen Bronchialen Epithelzellen.	59
Tabelle 8: Direkter Vergleich zwischen Monokulturen von NHBE, HPBEC sowie A549	66
Tabelle 9: Messung verschiedener Zytokine im Überstand des Triple-Zellkultur-Modells.	71
Tabelle 10: Messungen von verschiedenen Zytokinen im Überstand des Triple-Zellkultur-Modells zuzüglich CD4-positiver T-Zellen.	73
Tabelle 11: Oberflächenspannung von Surfactant nach Zugabe verschiedener Partikel.	78
Tabelle 12: Oberflächenspannung nach <i>surface area cycling</i> in Anwesenheit verschiedener Partikel	80

A5. VERÖFFENTLICHUNGEN

Publikationen in Peer-Reviewed-Journals

Worle-Knirsch JM, Kern K, **Schleh C**, Adelhelm C, Feldmann C, Krug HF
Nanoparticulate vanadium oxide potentiated vanadium toxicity in human lung cells
Environ Sci Technol, 2007, 41(1): 331-336

Schleh C, Hohlfeld JM

Interaction of nanoparticles with the pulmonary surfactant system
Inhal Toxicol [akzeptiert]

Nassimi M, **Schleh C**, Lauenstein HD, Hussein R, Lübbers K, Pohlmann G, Switalla S,
Müller M, Krug N, Müller-Goymann CC, Braun A
Low Cytotoxicity of solid lipid nanoparticles in in vitro and ex vivo lung models
Inhal Toxicol [akzeptiert]

Schleh C, Mühlfeld C, Pulskamp K, Schmiedl A, Nassimi M, Lauenstein HD, Braun A, Krug
N, Erpenbeck VJ, Hohlfeld JM

Titanium dioxide nanoparticles induce a pulmonary surfactant dysfunction and alter
surfactant ultrastructure
[eingereicht]

Publikationen in Büchern

Schleh C, Hohlfeld JM

Aeroallergen-Lung Interactions

In: Eds. Gehr P, Blank F, Mühlfeld C, Rothen-Rutishauser B. Particle-Lung Interactions,
Second Edition (Lung Biology in Health and Disease). Informa HealthCare, 2 edition
[akzeptiert]

Vorträge auf Kongressen

Schleh C, Veres T, Hoffmann M, Krug N, Hohlfeld JM, Erpenbeck VJ

SP-D erhöht die Aufnahme von Allergenpartikeln in humane Epithelzellen in vitro
Herbsttagung der Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und
Beatmungsmedizin e.V., 03.11.2006 - 04.11.2006, Mainz, Deutschland

Schleh C, Krug N, Hohlfeld JM, Erpenbeck VJ

Effect of nanosized versus microsized titanium dioxide particles on surfactant function
American Thoracic Society (ATS) International Conference, 18.05.2007 - 23.05.2007,
San Francisco, Kalifornien, USA

Schleh C

Engineered nanoparticles induce a pulmonary surfactant dysfunction after *surface area cycling* in vitro

11th International Inhalation Symposium (INIS), 11.06.2008 - 14.06.2008, Hannover,
Germany

Schleh C

Surfactant Protein-D moduliert die Aufnahme von Allergenpartikeln in Epithelzellen
1. Hannoverscher Epithelzell-Workshop, 17.10.2008, Hannover, Deutschland

Posterbeiträge auf Kongressen

Schleh C, Veres T, Hoffmann M, Krug N, Hohlfeld JM, Erpenbeck VJ

SP-D increases the uptake of allergen particles from grass pollen by primary epithelial cells
10th International Inhalation Symposium (INIS), 31.05.2006 - 03.06.2006, Hannover,
Deutschland

Schleh C, Veres T, Hoffmann M, Wright J, Braun A, Krug N, Hohlfeld JM, Erpenbeck VJ

SP-D erhöht die Aufnahme von Allergenpartikeln in humane Epithelzellen
48. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V.,
14.03.2007 - 17.03.2007, Mannheim, Deutschland

Schleh C, Veres T, Hoffmann M, Wright JR, Braun A, Krug N, Hohlfeld JM, Erpenbeck VJ

SP-D increases the uptake of allergen particles from grass pollen by human primary
bronchial epithelial cells and A549 cells
American Thoracic Society (ATS) International Conference, 18.05.2007 - 23.05.2007,
San Francisco, Kalifornien, USA

Schleh C, Krug N, Erpenbeck VJ, Hohlfeld J.

Effect of nanosized particles on pulmonary surfactant function
Eurotox 2007, 07.10.2007 - 10.10.2007, Amsterdam, Niederlande

Schleh C, Rothen-Rutishauser B, Blank F, Gehr P, Krug N, Erpenbeck VJ, Hohlfeld JM
Surfactant Protein D Modulates Allergen Particle Uptake in an Epithelial Airway Model
American Thoracic Society (ATS) International Conference, 18.05.2008 - 21.05.2008
Toronto, Kanada

A6. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. Jens M. Hohlfeld, der es mir ermöglichte, die Arbeit am Fraunhofer ITEM durchzuführen. Er war stets offen für meine Ideen und unterstützte mich tatkräftig in meiner Arbeit. Sein wissenschaftlicher Input war für das Gelingen dieser Arbeit essentiell. Weiterhin unterstützte er mich in meiner weiteren Karriereplanung mit Rat und Tat.

Ein besonderer Dank gebührt auch PD Dr. Dr. Veit J. Erpenbeck. Er begleitete insbesondere die ersten 1,5 Jahre meiner Dissertation. Unsere anregenden und spannenden Diskussionen und Gespräche habe ich, obwohl er auch aus der Ferne stets ein offenes Ohr für mich hatte, in der zweiten Hälfte meiner Dissertation vermisst. Weiterhin möchte ich mich für die Übernahme des Koreferats bedanken.

Prof. Dr. Anaclet Ngezahayo danke ich für die Übernahme der externen Betreuung und des Hauptreferats. Die Diskussionen mit ihm brachten oft eine neue Sichtweise auf meine Arbeit und waren nicht nur wissenschaftlich, sondern auch persönlich ein Gewinn für mich.

Prof. Dr. Huchzermeyer danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

PD Dr. Armin Braun danke ich für die Unterstützung meiner Arbeit, wissenschaftlichen Input sowie interessante und lehrreiche Gespräche über die wissenschaftliche Arbeitswelt. Die Gespräche mit ihm haben mir immer viel Spaß gemacht.

Dr. Wolfgang G. Kreyling vom Helmholtz Zentrum München, der meine Dissertation im Rahmen des Fraunhofer Mentoring Programms über ein Jahr begleitet hat, danke ich für die guten Gespräche und hilfreichen Anregungen.

Prof. Dr. Norbert Krug sowie Dr. Meike Müller danke ich für kritische Anmerkungen und hilfreiche Unterstützung.

Für wissenschaftliche Diskussionen, besonders aber für eine Menge Spaß, danke ich dem Lift-Club.

Den Mitarbeitern der Immunologie sowie der Klinischen Atemwegsforschung danke ich für die gute und freundliche Zusammenarbeit. Insbesondere danke ich auch Sabine und Olaf, die bei den Worten „Kannst Du mal bitte kommen“ stets mit Rat und Tat hilfreich zur Seite standen.

Dem gesamten „Kinderzimmer“ sowie Carla danke ich für gute Nachbarschaft und äußerst angenehme Jahre.

Den Berner Histologen danke ich für drei schöne Monate. Durch die angenehme und kollegiale Atmosphäre habe ich meine Zeit in Bern sehr genossen. Ich bin mir sicher, dass viele Kontakte, die ich dort geknüpft habe, auch noch weiterhin bestehen werden. Zusätzlich hat das Arbeiten mit dem Triple-Zellkultur-Modell meine Doktorarbeit sehr bereichert.

Meinen Eltern danke ich für liebevolle Unterstützungen während meines Studiums und meiner Doktorarbeit.

Der größte und herzlichste Dank gebührt meiner Frau Dani. Sie hat mich während der gesamten Zeit geduldig unterstützt - auch wenn es abends im Labor mal wieder etwas länger gedauert hat. Dani war und ist mir ein steter Rückhalt aus dem ich meine Kraft und Energie schöpfen kann.

A7. LEBENS LAUF

Persönliche Angaben

Name	Schleh
Vorname	Carsten
Geburtsdatum	23.02.1978
Geburtsort	Baden-Baden

Schulbildung

09/1984 bis 07/1988	Grundschule Lichtental, Baden-Baden
09/1988 bis 06/1997	Markgraf-Ludwig-Gymnasium, Baden-Baden (Abschluss: Abitur)

Zivildienst

08/1997 bis 09/1998	Städtisches Forstamt Baden-Baden
---------------------	----------------------------------

Wissenschaftlicher Werdegang

10/1998 bis 08/2005	Universität Karlsruhe (TH), Studium der Biologie (Abschluss: Diplom-Biologe)
08/2002 bis 07/2003	Königliche Technische Hochschule (KTH), Stockholm, Schweden, Austauschstudent
Seit 10/2005	Medizinische Hochschule Hannover, Wissenschaftlicher Mitarbeiter
11/2006 bis 12/2006 & 02/2007	Universität Bern, Schweiz, Forschungsaufenthalt

Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation

„Die Interaktion zwischen pulmonalem Surfactant und inhalierbaren Partikeln“

selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, 14.04.2009

Carsten Schleh