



**DNA-Stabilität und -Regenerationsfähigkeit von humanen
Nasenschleimhautzellen in Kulturmodellen**

DNA stability and regeneration capacity of human nasal mucosa in
tissue systems

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse klinische Wissenschaften

Vorgelegt von

Katrin Marie Ickrath

aus

Tübingen

Würzburg 2020



Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald

1. Betreuer: Univ.- Prof. Dr. med. Norbert Kleinsasser MHBA

2. Betreuer: Dr. rer. nat. Maria Steinke

3. Betreuer: apl. Prof. Dr. med. Stephan Hackenberg

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Histologische Grundlagen: Aufbau und Funktion des respiratorischen Epithels	1
1.1.1 Histopathologie: Veranschaulichung des klinischen Zusammenhangs	3
1.2 Laborexperimenteller Transfer: Varianten und Anwendungsgebiete von Nasenschleimhautkulturen	6
1.2.1 Monolayer	6
1.2.2 Cokultur	8
1.3 Genomstabilität: Grundlage der Zellkulturverfahren	8
1.3.1 Reparatur alkylirender DNA-Schädigungen	10
1.4 Ziele der Arbeit und daraus resultierende Fragestellungen	13
2. Methoden	15
2.1 Zellisolierung und -kultivierung	15
2.1.1 Herstellung der verwendeten Lösungen	16
2.1.2 Monokultur	16
2.1.3 Cokultur	18
2.1.4 Kultivierungsmethode im Transwell System	20
2.1.5 Passagierung	21
2.2 Trypanblautest	21
2.3 Comet Assay	21
2.3.1 Herstellung der verwendeten Lösungen	22
2.3.2 Zellbehandlung	23
2.3.3 Durchführung	23
2.3.4 Auswertung	24
2.4 Chromosomenaberrationstest	25
2.4.1 Herstellung der verwendeten Lösungen	26
2.4.2 Kultivierung	26
2.4.3 Zellbehandlung und Objektträgerpräparation	26
2.4.4 Färbung	27
2.4.5 Auswertung	27
2.5 Interleukin-8 (IL-8) ELISA	28
2.5.1 Zellstimulierung	28
2.5.2 Durchführung	29
2.5.3 Auswertung	29
2.6 Rasterelektronenmikroskopie	30
2.6.1 Durchführung	30
2.7 Durchflusszytometrie zum Enzymnachweis	30
2.7.1 Durchführung	30
2.7.2 Auswertung	31
2.8 Vimentinfärbung zum Fibroblastennachweis	32

2.8.1 Herstellung der verwendeten Lösungen	32
2.8.2 Fixierung der Zellen auf Objektträger	32
2.8.3 Färbung	33
2.8.4 Positivkontrolle	33
2.9 Statistische Auswertung und Ergebnisdarstellung	34
3. Ergebnisse	36
3.1 DNA-Stabilität und -Regenerationsfähigkeit nach genotoxischer Einwirkung: Comet Assay	36
3.1.1 Monokultur	36
3.1.2 Cokultur	39
3.1.3 Vergleichende Analyse der Mono- bzw. Cokultur	42
3.2 Chromosomenstabilität innerhalb des Kultivierungsprozesses: Chromosomenaberrationstest	43
3.2.1 Monokultur	43
3.2.2 Cokultur	44
3.3 Funktionsfähigkeit der Zellkulturmodelle: IL-8 ELISA	46
3.3.1 Monokultur	47
3.3.2 Cokultur	48
3.3.3 Vergleich IL-8 ELISA: Mono- und Cokultur	50
3.3.4 Getrennte Analyse der Epithelzellen bzw. Fibroblasten der Cokultur	50
3.3.5 Vergleich IL-8 ELISA: Epithelzelle und Fibroblasten der Cokultur	53
3.4 Durchflusszytometrie: enzymatischer Nachweis der Basenexzisions-reparatur	53
3.5 Vimentinfärbung: Fibroblastennachweis in der Monokultur	54
3.6 Kinoziliennachweis: Rasterelektronenmikroskopie	55
3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse	57
4. Diskussion	59
4.1 Methodikdiskussion	59
4.1.1 Zellisolierung und -kultivierung	59
4.1.2 Genotoxikologische Testverfahren <i>in vitro</i>	62
4.1.3 Testung der Funktionsfähigkeit: IL-8 ELISA und REM	63
4.1.4 Vimentinfärbung zum Fibroblastennachweis	64
4.2 Ergebnisdiskussion	65
4.2.1 Regenerationsfähigkeit respiratorischer Epithelzellen	65
4.2.2 Chromosomenstabilität	66
4.2.3 Funktionsfähigkeit der Kulturmodelle	68
4.2.4 Limitationen der Arbeit und Ausblick	70
5. Zusammenfassung	72
6. Summary	74
7. Anhang	76
7.1 Verwendete Materialien	76
7.1.1 Geräte und Software	76

7.1.2 Verbrauchsmaterialien	77
7.1.3 Laborreagenzien	78
7.2 Abkürzungsverzeichnis	81
7.3 Datenübersicht	83
7.3.1 Comet Assay	83
7.3.2 II-8 ELISA	85
7.4 Abbildungsverzeichnis	87
7.5 Literaturangabe	89
7.6 Publikationen und Kongressbeiträge	95
7.7 Danksagung	95
7.8 Eidesstattliche Erklärung	96

1. Einleitung

Kulturmodelle des respiratorischen Epithels werden zur Klärung multipler Fragestellungen herangezogen. Sie dienen zum Beispiel der Untersuchung seltener respiratorischer Erkrankungen, wie der primären Ziliendyskinesie (PCD). Hierbei könnten in Zukunft Kulturmodelle sowohl für diagnostische als auch therapeutische Ansätze verwendet werden. Grundlage der verwendeten *in vitro* Zellkulturverfahren der oberen Atemwege ist der histologische Aufbau des humanen respiratorischen Epithels. Zur Etablierung derartiger Modelle müssen die kultivierten Zellen eine hohe *in vitro-in vivo* Korrelation zeigen.

1.1 Histologische Grundlagen: Aufbau und Funktion des respiratorischen Epithels

Der humane Respirationstrakt zeichnet sich durch einen charakteristischen histologischen Aufbau aus, der optimal auf die Stoffwechsel- und Schutzfunktion des Gewebes abgestimmt ist. Die Schleimhaut der oberen Atemwege, *Tunica mucosa*, setzt sich aus der *Lamina epithelialis* und der aus Bindegewebe bestehenden *Lamina propria* zusammen. Die *Lamina epithelialis* wird aufgrund der Kinozilien tragenden Zellen als Flimmerepithel bezeichnet. Das respiratorische Epithel kleidet den größten Teil der Atemwege aus und reicht von der *Regio respiratoria* der Nase bis hin zu den *Bronchioli respiratorii* der Lunge [Lüllmann-Rauch 2012]. Histologisch ist das Flimmerepithel ein mehrreihiges Epithel, bei welchem sämtliche Zellen Kontakt zur Basalmembran haben, nicht alle jedoch bis an die Oberfläche des Epithels reichen. Letztere Zellen werden als Basalzellen bezeichnet und dienen als Reserve für die Zellneubildung [Ulfig 2015; Lüllmann-Rauch 2012]. In der *Lamina propria* der *Regio respiratoria* finden sich Kapillarnetze, seromuköse Drüsen und ein venöser Schwellkörper, genannt *Corpus cavernosum nasi*. Die Schleimhaut der Nasenhöhle erfüllt im Wesentlichen vier relevante Funktionen. Die Menge des Atemvolumens kann durch ein wechselseitiges An- und Abschwellen des Venengeflechts des *Corpus cavernosum nasi* reguliert werden. Außerdem wird die eintretende Atemluft durch das Kapillarnetz erwärmt, durch die Schleimhaut befeuchtet und durch ziliäre Strukturen bereits in der Nasenhöhle gereinigt [Ulfig 2015].

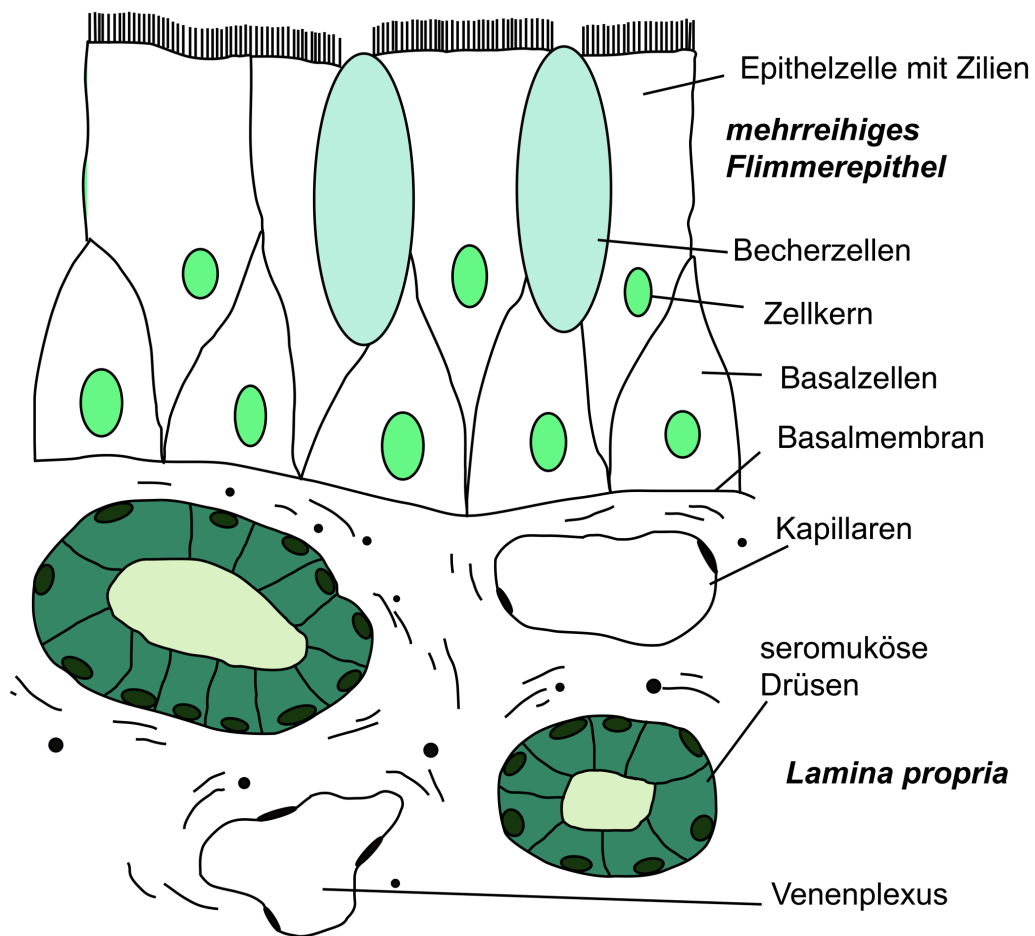


Abbildung 1: schematischer Aufbau der *Tunica mucosa* der Nase frei nach [Ulfig 2015]. Die *Tunica mucosa* setzt sich aus einem mehrreihigen Flimmerepithel mit Epithelzellen, Basalzellen und Becherzellen sowie der bindegewebigen *Lamina propria* zusammen.

Kinozilien sind Oberflächendifferenzierungen des respiratorischen Epithels. Sie sind an Basalkörperchen im Zytoplasma der Epithelzellen verankert. Der Aufbau der Mikrotubuli wird als 9x2+2 Struktur bezeichnet, da die zentral liegenden Mikrotubuli von einem Ring aus neun Mikrotubulipaaren umgeben sind. Nach außen ragen Dyneinarme, die für die Zilienbewegungen zuständig sind. Während eines Zilienschlags werden eine schnelle Vor- und eine langsame Rückwärtsbewegung unterschieden. Die schnelle Bewegung dient dabei dem Abtransport der Schleimschicht [Ulfig 2015]. Im respiratorischen Epithel enthaltene Becherzellen sowie seromuköse Drüsen der *Lamina propria* produzieren Schleim, Muzine. Diese Muzine sind zusammen mit den Kinozilien für die selbstständige Reinigung der Geweboberfläche zuständig. Diese Reinigung wird auch mukoziliäre Clearance genannt und stellt auch eine physiologische unspezifische Erregerabwehr des

Gewebes dar. Mikroorganismen und Schmutzpartikel bleiben im Schleimteppich kleben. Unterhalb dieses Schleimteppichs gewährleistet eine wässrige periziliäre Flüssigkeitsschicht die Beweglichkeit der Kinozilien, sodass der Transport in Richtung Rachen erfolgen kann [Lüllmann-Rauch 2012].

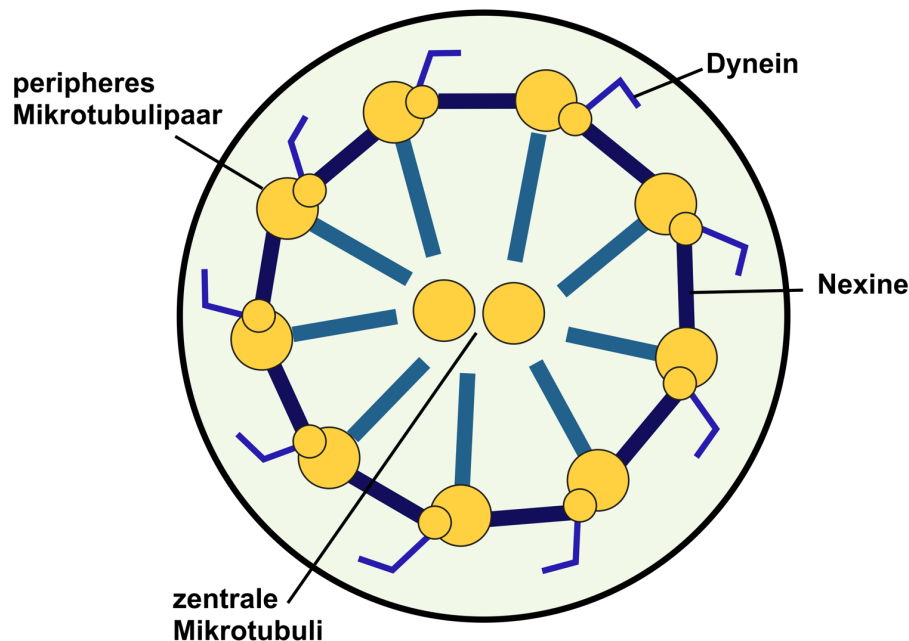


Abbildung 2: Aufbau Kinozilien im Querschnitt mit 9x2+2 Struktur frei nach [Ulfig 2015]. Mittig liegende Mikrotubuli werden von einem Ring aus neuen Mikrotubulipaaren umgeben, die über Nexin verbunden sind.

1.1.1 Histopathologie: Veranschaulichung des klinischen Zusammenhangs

Dysfunktionen der Ziliärstrukturen resultieren in chronischen Erkrankungen des gesamten Respirationstraktes. Zu unterscheiden gilt die primäre von der sekundären Ziliendysfunktion, welche temporär beziehungsweise chronisch aus respiratorischen Infektionskrankheiten resultieren kann. Die PCD stellt hingegen eine seltene Erkrankung mit einer sekundären Entwicklung von chronischen Atemwegsinfekten dar. Bei circa 65% der Erkrankten können verursachende Genveränderungen, wie zum Beispiel Mutationen der Erbinformation, die für den Aufbau des Dynein Arms oder der Mikrotubuli verantwortlich ist, nachgewiesen werden [Frischer 2009; Kuehni et al. 2017]. Die Zilienfunktionsstörung resultiert in der Reduktion der mukoziliären Clearance, die für die selbstständige Reinigung der Atemwege essentiell ist [Afzelius 1976]. Die betroffenen Patienten leiden oft bereits im Neugeborenenalter an Atemwegserkrankungen mit respiratorischer Insuffizienz und im Kindesalter an chronischen Lungenerkrankungen, die zu Bronchiektasien führen können [Zariwala et

al. 1993; Meeks et al. 2000]. Für die Lageausrichtung der inneren Organe während der Embryonalentwicklung sind ziliäre Funktionen des Primitivknotens verantwortlich, weshalb bei ca. 50 Prozent der Patienten mit PCD ebenfalls ein *Situs inversus* vorliegt. Diese Kombination wird dann als Kartagener Syndrom bezeichnet [Werner et al. 2015; O'Callaghan et al. 2007].

Die Diagnostik und Therapie der PCD ist bislang uneinheitlich und oft problematisch. Zudem existiert keine evidenzbasierte Therapieempfehlung [Lesic et al. 2009]. Im Vordergrund der symptomatischen Behandlung steht die individualisierte Atemphysiotherapie und Antibiotikagabe. Begleitende medikamentöse Therapien mit beta-2-Sympathomimetika, rhDNase und N-Acetylcystein zeigen unzureichende Effekte. Bezogen auf das Auftreten von Bronchiektasien konnte für hypertone Salzlösungen ein positiver Einfluss gezeigt werden. Es gibt keine klare Aussage zur Bedeutung der antibiotischen Prophylaxe, respiratorische Infekte sollten hingegen rasch und aggressiv behandelt werden [Lucas et al. 2014]. Zur Diagnostik stehen aktuell verschiedene Methoden mit variabler Sensitivität und Spezifität zur Verfügung [Lucas et al. 2017]. Zu den Diagnoseverfahren zählen die Messung des nasalen Stickstoffgehaltes (NO), die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), die genetische Diagnostik und die Hochgeschwindigkeitsvideoanalyse der Zilienbewegungsmuster und -frequenzen in spezialisierten Zentren [Wodehouse et al. 2003; Knowles et al. 2013; Lucas et al. 2017]. In neueren Publikationen wird beschrieben, dass Zellkulturmodelle mit anschließender Untersuchung der Zilienstrukturen von entscheidender Bedeutung für die Diagnose der PCD sein können [Hirst et al. 2014]. Seltener Verfahren mit unklarer Evidenz sind nuklearmedizinische Clearance-Messungen und Immunfluoreszenzdiagnostik [Barbato et al. 2009; Lucas et al. 2017]. Die European Respiratory Society hat unter Beurteilung der verschiedenen Diagnosemethoden einen Algorithmus zum einheitlichen Vorgehen bei Verdacht auf PCD veröffentlicht [Lucas et al. 2017] (siehe Abbildung 3). Da keine der Methoden allein zu einer sicheren Diagnose bzw. Ausschluss der Erkrankung eingesetzt werden kann, ist ein stufenweises Vorgehen mit Kombination verschiedener Verfahren sinnvoll [Lucas J et al. 2014; Lucas et al. 2017]. Hierdurch wird einerseits eine schnellere Erkennung der erkrankten Patienten ermöglicht, andererseits auch eine Überdiagnostik bei Nichterkrankung vermieden. Von besonderer Bedeutung ist die wiederholte Durchführung von Hochgeschwindigkeitsvideoanalysen der kultivierten Epithelzellen (siehe Schritt 2 der

Abbildung 3). Mit diesen kann die PCD von sekundären Ziliendysfunktionen differenziert werden, wie sie zum Beispiel durch lokale Infektionen oder durch Zellschädigung bei Entnahme entstehen können [Toskala et al. 2005; Pifferi et al. 2009; Hirst et al. 2014]. Die Hochgeschwindigkeitsvideoanalyse nach Zellkultivierung wird bei nicht eindeutigen Ergebnissen in der nasalen NO Messung sowie unklarer Videoanalyse der entnommenen Primärzellen und klinischem Verdacht mit ausgeprägter Symptomatik empfohlen [Chapelin et al. 1997; Rayner et al. 1996]. Zeigt die Videoanalyse der Zellkultur ein auffälliges Ergebnis, ist die Diagnose einer PCD wahrscheinlich. Eine Diagnosesicherung kann anschließend mittels genetischer Testung erfolgen [Lucas et al. 2017]. Als sicher gilt die PCD ebenfalls bei Nachweis des Strukturdefekts in der Transmissionselektronenmikroskopie (siehe Schritt 2 der Abbildung 3).

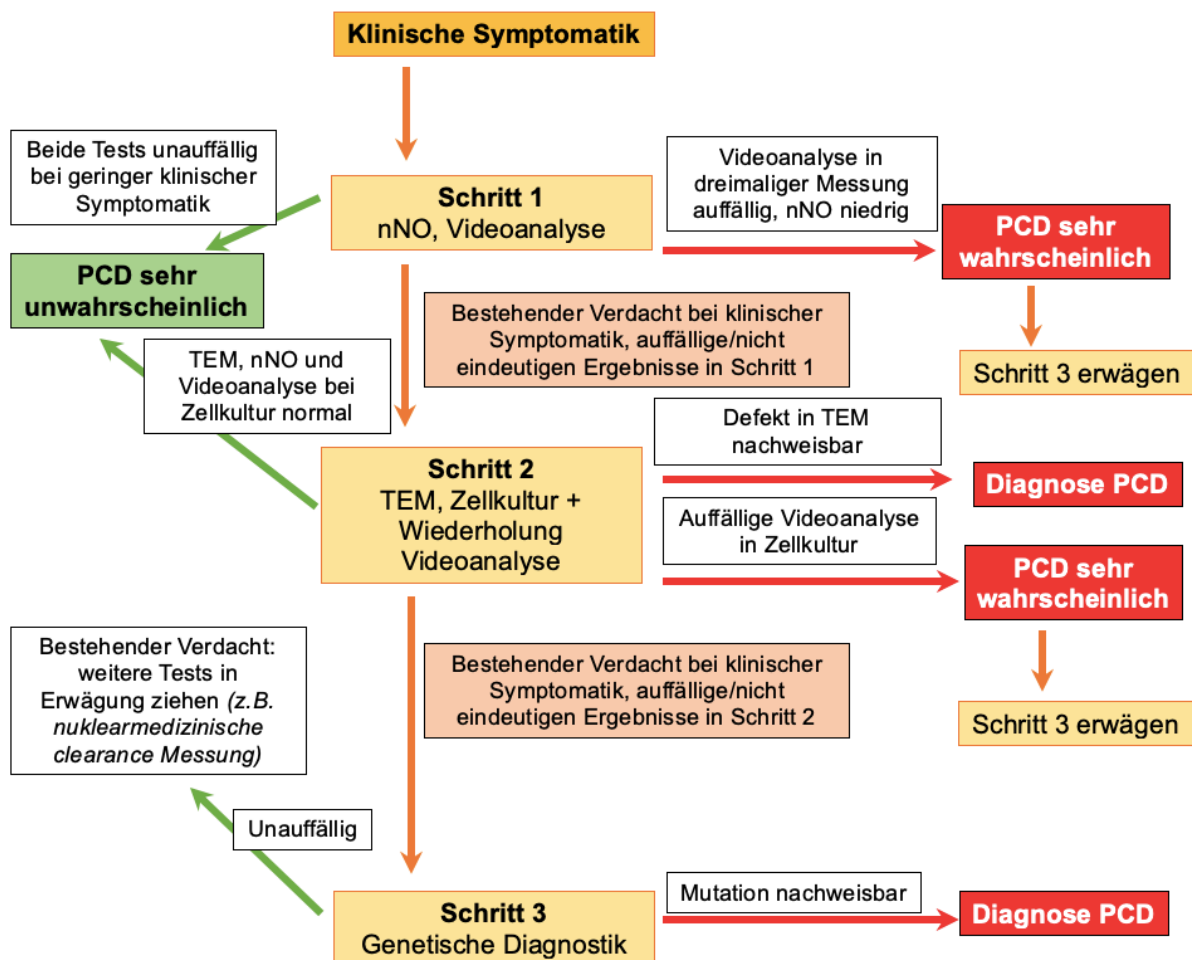


Abbildung 3: schematische Darstellung des empfohlenen Algorithmus zur Diagnostik der PCD nach [Lucas et al. 2017]. Bei bestehender PCD typischer klinischer Symptomatik wird im ersten Schritt die nNO Messung sowie Videoanalysen empfohlen. Bei unklaren Ergebnissen können im TEM, Zellkulturmethoden mit Videoanalyse (Schritt 2) und genetische Diagnostik (Schritt 3) ergänzt werden. nNO = nasales NO, TEM = Transmissionselektronenmikroskopie

Bislang etablierte Zellkulturmodelle zur Untersuchung der ziliären Funktionsfähigkeit beinhalten meist Monokulturen mit respiratorischen Epithelzellen im Air-Liquid Interface [Hirst et al. 2014]. Von großer Wichtigkeit für eine reliable Diagnostik wäre jedoch, wenn die *in vivo* Situation des respiratorischen Epithels bestmöglich simuliert werden könnte. Hierdurch könnten durch den Kultivierungsprozess bedingte sekundäre Ziliendysfunktionen und somit Fehldiagnosen der PCD vermieden werden. Die Entwicklung eines derartigen, die *in vivo* Situation imitierenden Kulturmodells für das humane respiratorische Epithel ist daher von bedeutender Relevanz für die PCD Diagnostik. Natürlich könnte ein solches Zellkulturverfahren auch zur Untersuchung anderer Erkrankungen des Respirationstraktes angewendet werden.

1.2 Laborexperimenteller Transfer: Varianten und Anwendungsgebiete von Nasenschleimhautkulturen

Kulturmodelle des respiratorischen Epithels werden zur Klärung diverser Fragestellungen, wie zum Beispiel des Einflusses chemischer Substanzen auf Nasenschleimhautzellen (NSH), DNA-Schädigung nach Nikotinexposition oder immunologischer Folgereaktionen auf Allergenexposition herangezogen [Kleinsasser NH et al. 2004; Ginzkey et al. 2012; Koehler C 2013]. Zur Erstellung von Kulturmodellen des respiratorischen Epithels besteht die Möglichkeit, Nasenschleimhautzellen allein oder als Kompartiment-getrennte Cokultur mit Fibroblasten zu kultivieren. Zur Gewinnung von Primärzellen aus Nasenschleimhautgewebeproben existieren verschiedene Isolierungsmethoden. Es gibt die Möglichkeit, Epithelzellen durch direkten enzymatischen Verdau mit mechanischem Abschaben zu gewinnen. Außerdem können sowohl Epithelzellen als auch spendergleiche Fibroblasten durch sequenzielles Auswachsen aus Miniorgankulturen gewonnen werden [Schweinlin et al. 2017]. Die Isolierung durch sequenzielles Auswachsen der Zellen erfolgte in der Arbeitsgruppe bereits an NSH-Zellen und Zellen der Glandula parotis. Hierbei wurde das entnommene Gewebe in kleine 1mm³ große Würfel zerkleinert mit nachfolgendem Auswachsen der Zellen als Miniorgankulturen [Ginzkey et al. 2010; Hackenberg et al. 2011b].

1.2.1 Monolayer

Bei den bislang etablierten Kulturmodellen der Atemwege werden die Zellen zumeist unter 2D Kulturbedingungen als Monolayerstruktur kultiviert. Dies entspricht jedoch nicht der Situation *in vivo*, da das humane Flimmerepithel histologisch ein

mehrröhiges Epithel darstellt. Zudem fehlt den oftmals verwendeten respiratorischen Epithelzelllinien meist die Differenzierungsfähigkeit zu Kinozilien tragenden Zellen. Für *in vitro* Kulturmodelle eignen sich daher besser primäre Zellen, deren Verfügbarkeit und Lebensdauer jedoch reduziert sind [Haghi et al. 2014; Ong et al. 2016]. Außerdem sind derartige Isolierungs- und Kultivierungsverfahren von Primärzellen meist technisch und zeitlich anspruchsvoller. Die Standardisierung derartiger Zellkulturmodelle gestaltet sich deutlich schwieriger. Die Gewinnung primärer Nasenschleimhautzellen kann durch Bürstenbiopsien, Wattestäbchen oder operative Eingriffe beim Patienten erfolgen [Stokes et al. 2014]. Bei der Monolayerkultur repräsentieren die kultivierten Zellen nur die *Lamina epithelialis* der *Tunica mucosa* [de Jong et al. 1994]. Zudem werden die respiratorischen Epithelzellen unter kompletter Flutung mit Medium kultiviert. Beides entspricht nicht der eigentlichen *in vivo* Situation und hat zur Folge, dass die Zelldifferenzierung zu einem mehrröhigen Epithel nicht stattfinden kann [Schogler et al. 2017]. Zur besseren Darstellung der *in vivo* Situation können Epithelzellen im dreidimensionalen Air-Liquid Interface System unter dauerhafter Luftexposition kultiviert werden. Die kultivierten Zellen erfüllen hierbei relevante funktionelle und strukturelle Aufgaben des Epithels. Sowohl die Differenzierung zum Zilien tragenden polarisierten Flimmerepithel mit Mukusproduktion als auch die Ausbildung von tight junction Zell-Zell Kontakten können beobachtet werden [Sajjan et al. 2004; Bai et al. 2008]. Darüber hinaus konnte die Zellintegrität über die Messung des transepithelialen Widerstands nachgewiesen werden [Lopez-Souza et al. 2003]. Ein gut differenziertes Gewebe hat zusätzlich die Aufgabe der Schutzbarriere gegenüber viralen und bakteriellen Infektionen. Ebenso wie bei der Mukoviszidose konnten auch bei PCD Patienten vermehrt Infektionen mit *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen werden [Wijers et al. 2017]. Es konnte gezeigt werden, dass mehrröhige Flimmerepithelien widerstandsfähiger als die alleinigen Basalzellen der Monolayer gegenüber viralen Infekten sind [Lopez-Souza et al. 2004; Jakiela et al. 2008]. Demnach sollte gerade für infektiologische Fragestellungen unbedingt das differenzierende Kultivierungsverfahren aus Primärzellen im Air-Liquid Interface System angewendet werden.

1.2.2 Cokultur

Um die tatsächlich vorherrschenden *in vivo* Gegebenheiten des respiratorischen Epithels noch besser zu simulieren, werden Cokulturen eingesetzt. Die Funktionalität der *Tunica mucosa* resultiert aus der Kommunikation zwischen dem respiratorischen Epithel und der bindegewebigen *Lamina propria*. Fibroblasten sind ortsständige Zellen des Bindegewebes und befinden sich somit auch in der *Lamina propria*. Zur Entwicklung eines Cokulturmodells der *Tunica mucosa* mit Epithelzellen eignen sich daher besonders Fibroblasten. Die gemeinsame Kultivierung mit fremden Spender- oder autologe Fibroblasten wurde bereits in dreidimensionalen Kulturmodellen angewandt [Steinke et al. 2014; Schweinlin et al. 2017]. Die Fibroblasten tragen hierbei zur Ausbildung und Funktionalität der Basalmembran bei [Knight et al. 2003]. In den verwendeten Cokulturen konnte ein histologisch gut differenziertes Epithel mit funktionsfähiger Muzinproduktion und Zilienmotilität generiert werden [Steinke et al. 2014; Lodes et al. 2019]. Zusätzliche Fibroblastenkulturen ermöglichen außerdem die Epithelzellkultivierung über mehrere Passagen durch zytokingetriggerte Stimulation der Zellproliferation. Dies führt zu einer Zellzahlvermehrung, die aufgrund der meist geringen Zellausbeute bei Entnahme am Patienten von entscheidender Bedeutung ist [Wiszniewski et al. 2006]. Auch hier kann das oben beschriebene Air-Liquid Interface Kultivierungsverfahren Anwendung finden und eine bessere Epithelzelldifferenzierung mit intakten funktionellen und strukturellen Eigenschaften ermöglichen.

Als Trägerstruktur für die Epithelzellen der Mono- bzw. Cokulturen können porenhaltige Membranen dienen, die in etablierten Transwell Systemen verwendet werden. In bereits angewendeten Cokulturverfahren des respiratorischen Epithels werden die Epithelzellen im apikalen und die Fibroblasten im basolateralen Kompartiment kultiviert [Wiszniewski et al. 2006]. Die porenhaltige Polyester-membran erfüllt einerseits eine Barrierefunktion, andererseits ermöglicht sie auch die Zellkommunikation zwischen den verschiedenen Kompartimenten. In aktuellen präklinischen Forschungsarbeiten werden anstelle porenhaltiger künstlicher Membranen auch biologische Trägersysteme, wie zum Beispiel dezellularisierter Schweinedarm verwendet [Rossi A. 2014; Lodes et al. 2019].

1.3 Genomstabilität: Grundlage der Zellkulturverfahren

In der Literatur existieren bislang kaum Daten zur DNA-Stabilität und -Reparaturfähigkeit innerhalb der beschriebenen Zellkulturverfahren über

mehrere Passagen. Darüber hinaus findet man keine Angaben über Chromosomenveränderungen in Kulturmodellen der oberen Atemwege. Derartige Informationen sind jedoch von essentieller Bedeutung, um den Einsatz von primären Zellen des respiratorischen Epithels zu diagnostischen Zwecken zu validieren. Die Grundlage hierfür ist das Verständnis über das menschliche Genom sowie dessen Reparaturmechanismen. Humane Zellen enthalten einen diploiden Chromosomensatz, d. h. 2x23 Chromosomen. Hierbei sind 22 Autosomen-Paare, die jeweils von der Mutter und vom Vater vererbt werden. Zusätzlich besitzt der Mensch zwei Gonosomen (Mann: X,Y; Frau X,X) [Lüllmann-Rauch 2012]. Das genetische Material, die Desoxyribonukleinsäure (DNA) der menschlichen Zelle liegt gemeinsam mit Proteinen wie den basischen Histonen vor. Zusammen werden sie als Chromatid bezeichnet. Innerhalb des Zellzyklus durchläuft das Chromatid typische Veränderungen. Der Zellzyklus kann in zwei verschiedene Phasen unterteilt werden. Zum einen die längere Interphase, in der sich die Zelle auf die Teilung vorbereitet und die kurze Mitose, M-Phase, bei der durch Zellteilung zwei identische Tochterzellen entstehen. Die Interphase kann wiederum in drei Abschnitte, G1-, S-, G2-Phase, untergliedert werden. In der G1-Phase finden Proteinsynthesen und Zellwachstum statt. Außerdem besteht hier jedes Chromosom aus einem Chromatid. In der S-Phase erfolgt die DNA Replikation, bei der anschließend pro Chromosom zwei Chromatide vorliegen. In der nachfolgenden G2-Phase können vor Eintritt in die Mitose entstanden Replikationsfehler erkannt und repariert werden. Während das Chromatid in der Interphase unstrukturiert vorliegt, kondensiert es zunehmend vor Eintritt in die Mitose. In der Mitose gehen durch Zellteilung zwei identische Tochterzellen hervor. Sie lässt sich ebenfalls in verschiedene Phase untergliedern, Pro-, Prometa-, Meta-, Ana- und Telophase. In der Metaphase der Mitose liegt die DNA dann in maximal kondensierter Form als doppelter Chromosomensatz vor [Lüllmann-Rauch 2012]. An dieser maximalen Verpackung sind die basischen Proteine entscheidend beteiligt, da sie die negativ geladene DNA neutralisieren und somit erst die kompakte Chromosomenstruktur ermöglichen [Schartl 2009]. Die genetische Stabilität humaner Zellen ist die Grundvoraussetzung für ihre Lebens- und Funktionsfähigkeit. Schädigungen der DNA resultieren jedoch nicht unabdingbar in chromosomalen Veränderungen, da die menschliche Zelle über komplexe enzymatische Reparatursysteme verfügt. Werden derartige Reparaturen jedoch nicht durchgeführt, können in der Mitose Tochterzellen mit veränderter DNA hervorgehen. Diese Veränderung des genetischen Materials wird

als Mutation bezeichnet. Oftmals bleibt eine solche Veränderung jedoch ohne Auswirkung, da nur circa 2% des Genoms für Proteine kodiert. Mutationen in nicht kodierenden Bereichen werden demnach als stumm bezeichnet. DNA-Veränderungen in kodierenden Bereichen können hingegen zu effektiven Mutationen mit Störung der Funktionalität des Organismus führen. Die genetisch veränderten Zellen können außerdem bei einer Vielzahl an DNA-Schädigungen den programmierten Zelltod, die Apoptose einleiten [Schartl 2009].

Zum lichtmikroskopischen Nachweis von Chromatid- bzw. Chromosomenaberrationen kann der Chromosomenaberrationstest durchgeführt werden. Er dient als bewährtes genotoxikologisches Testverfahren dem Nachweis numerischer und struktureller Veränderungen auf chromosomaler Ebene [Miller et al. 1998]. Dieses Verfahren wurde bislang häufig an etablierten Zelllinien oder Lymphozyten, aber auch bereits an humanen Ohrspeicheldrüsenzellen angewendet [Preston et al. 1987; Friehs 2010]. Bislang ungeklärt ist eine mögliche Anwendung des Testverfahrens für Primärzellen der oberen Atemwege. Zur Durchführung des Chromosomenaberrationstests eignen sich idealerweise Zellen mit kurzer, regelmäßiger Generationszeit und stabilem Karyotyp [Preston et al. 1981; Preston et al. 1987]. Die Ergebnisse von häufig verwendeten etablierten Zelllinien sind jedoch hierbei nicht uneingeschränkt übertragbar auf Zellen des humanen Organismus. Deshalb und zur Ausweitung wissenschaftlicher Fragestellungen auf Erkrankungen des Respirationstrakts, wäre die Anwendung des Chromosomenaberrationstests bei Primärzellen von großem Interesse. Zur Darstellung der chromosomalen Stabilität respiratorischer Primärzellen der oberen Atemwege liegen bislang keine Daten vor. Inwiefern Isolierungs- und Kultivierungsprozesse der Primärzellen über mehrere Passagen Einfluss auf die Chromosomenstabilität haben, bleibt unklar. Diese Daten wären jedoch für die Etablierung eines Kulturmodells des oberen Respirationstrakts von bedeutender Relevanz.

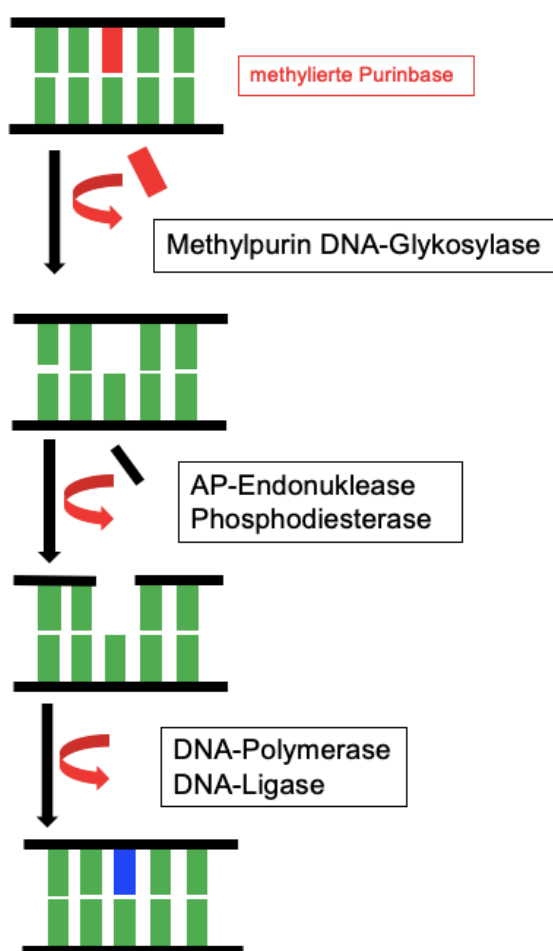
1.3.1 Reparatur alkylierender DNA-Schädigungen

Die DNA-Replikation der humanen Zellen verläuft mit einer geringen Mutationsrate von circa 1 zu 10^9 , wobei ein Großteil der Replikationsfehler bereits direkt durch das Kontrolllesen von DNA-Polymerasen erkannt und repariert werden. Außerdem verfügt der Zellzyklus über Kontrollpunkte beim Übergang der einzelnen Zellzyklusphasen, in denen die Zelle auf DNA-Schäden untersucht wird und falls notwendig

Reparaturmechanismen eingesetzt werden können [Koch et al. 2014]. Um die genetische Stabilität menschlicher Zellen zu bewahren, verfügen diese über unterschiedliche Reparatursysteme. Sowohl endogen als auch exogen verursachte DNA-Schäden können somit repariert werden. Man unterscheidet hierbei die direkte Reparatur, die Basenexzisionsreparatur (BER), die Nukleotidexzisionsreparatur (NER), die Mismatch-Reparatur (MMR) und die Rekombinationsreparatur [Schartl 2009]. Funktionieren diese Reparatursysteme nicht regelrecht, können DNA-Schäden persistieren und somit zu Mutationen im menschlichen Genom führen. Substanzen, die zu einer Veränderung der DNA führen, werden als genotoxisch bezeichnet. Hierbei kann unterschieden werden, ob eine Aberration vom Chromatid- bzw. vom Chromosomentyp verursacht wird. Chromosomenaberrationen können aus Doppelstrangbrüchen hervorgehen, die entweder durch direkte Interaktion oder S-Phase abhängig bei der Replikation entstehen [Schinzel et al. 1976]. Verschiedene chemische Reaktionen wie Desaminierungen, Alkylierungen, Interkalierungen und Oxidationen haben mutagenes Potenzial. Je nach Position der übertragenen Methyl- und Ethylgruppen können Alkylierungen zu Basenfehlpaarungen und bis zum Replikationsabbruch führen oder auch stumm verlaufen [Schartl 2009; Rassow et al. 2012].

Als Positivkontrolle der DNA-Schädigung wird im Rahmen toxikologischer Fragestellungen häufig Methylmethansulfonat (MMS) verwendet. MMS führt als alkylierende Substanz zu den zuvor beschriebenen DNA-Schädigungen. DNA Basen verfügen an unterschiedlichen Positionen über Sauerstoff- und Stickstoffreste. Diese stellen Angriffspunkte für die Alkylierung dar. Bevorzugt entstehen als Addukte nach MMS-Exposition N7-Methylguanin (82%) und N3-Methyladenin (11%), wohingegen Alkylierungen von Pyrimidinen nur in seltenen Fällen vorkommen [Beranek 1990; Wyatt et al. 2006; Nikolova et al. 2010]. N3-Methyladenin führt zu einer Blockade der Replikation [Larson et al. 1985]. N7-Methylguanin ist nicht an der Watson Crick Basenpaarung beteiligt [Watson et al. 1953]. Dieses Addukt führt demnach nicht zur Fehlbasenpaarung, jedoch entstehen durch Instabilität der toxischen N-glykosidischen Bindung AP-Stellen (apurinisch), denen mutagene und toxische Eigenschaften zugesprochen werden [Wyatt et al. 2006; Boysen et al. 2009]. Die direkte Reparatur und die Basenexzisionsreparatur wirken Alkylierungsschädigungen primär entgegen [Wyatt et al. 2006; Rassow et al. 2012]. Als Hauptreparaturmechanismus der MMS-induzierten DNA-Schädigungen wird die

Basenexzisionsreparatur beschrieben [Nikolova et al. 2010]. Außerdem führen Defekte innerhalb der Basenexzisionsreparatur, insbesondere der Polymerasen, zu gehäuftem Auftreten von Doppelstrangbrüchen nach MMS-Exposition [Ochs et al. 1999]. Derartig komplexere DNA-Schädigungen können durch die homologe Rekombination repariert werden [Nikolova et al. 2010]. Da in den durchgeführten Versuchsreihen MMS als Alkylanz zur Induktion einer DNA-Schädigung verwendet wurde, soll der Mechanismus des Hauptreparatorsystems, der Basenexzisionsreparatur, genauer erläutert werden. Spezifische DNA-Glykosylasen sind in der Lage die veränderten Basen zu erkennen und diese von der Desoxyribose abzuspalten. Die hauptsächlich durch MMS induzierten Purinmethylierungen (N7-Methylguanin, N3-Methyl-adenin) werden von sogenannten Methylpurin DNA-Glykosylasen detektiert.



Zurück bleibt eine AP-Stelle mit Phosphat und Zucker, die nachfolgend durch die AP-Endonuklease und Phosphodiesterase entfernt wird. Hierbei entsteht somit ein Einzelstrangbruch der DNA. Nachfolgend wird der fehlende Abschnitt als short, einzelnes Nucleotid oder long patch repair, mehrere Nucleotide mit spezialisierten DNA-Polymerasen (β bzw. δ und ϵ) aufgefüllt. Zum Schluss wird der Einzelstrangbruch über eine DNA-Ligase verschlossen [Schartl 2009; Rassow et al. 2012; Koch et al. 2014] (siehe Abbildung 4).

Abbildung 4: schematischer Ablauf der Basenexzisionsreparatur (BER):

MMS- induziert Methylierung an Purinbasen der menschlichen DNA. Methylpurin DNA-Glykosylasen erkennen und spalten die methylierte Purinbase von der Desoxyribose ab. Entfernung des Phosphats und des Zuckers der AP-Stelle erfolgt durch die AP-Endonuklease und Phosphodiesterase. Die DNA-Polymerasen und -Ligasen füllen die Basenlücke anschließend. Frei nach [Schartl 2009]

1.4 Ziele der Arbeit und daraus resultierende Fragestellungen

Der histologische Aufbau des humanen respiratorischen Epithels dient als Vorlage der *in vitro* Zellkulturmodelle der oberen Atemwege. Die Gewinnung der Primärzellen kann mechanisch mit zusätzlichem enzymatischen Verdau, oder durch sequentielles Auswachsen erfolgen. Die nachfolgende Kultivierung kann sowohl als Mono- wie auch als Cokultur erfolgen. Die Verwendung des Air-Liquid Interface in Transwell Systemen ermöglicht hierbei in beiden Methoden die Differenzierung zu einem Kinozilien tragenden Flimmerepithel. Die Zellkulturmodelle werden bereits zur Klärung verschiedenster Fragestellung sowie in der Diagnostik seltener respiratorischer Erkrankungen, wie der primären Ziliendyskinesie (PCD) verwendet. Voraussetzung dafür ist die genetische Stabilität der Zellen innerhalb des Kultivierungsprozesses.

Auch wenn bereits durch Verwendung von Primärzellen in Mono- bzw. Cokulturen Modelle geschaffen werden konnten, die dem histologischen Zustand *in vivo* nahekommen, stellt sich die Frage, ob eine höhere Zellstabilität auch in toxikologischen Untersuchungen belegt werden kann. Bezogen auf einzelne Passagen des Kultivierungsprozesses existieren bislang kaum Daten zur DNA-Stabilität und -Reparaturfähigkeit induzierter DNA-Schädigungen. Darüber hinaus findet man in der Literatur keine Angaben über Chromosomenveränderungen in Kulturmodellen der oberen Atemwege. Derartige Informationen sind allerdings von essentieller Bedeutung, um den Einsatz von primären Zellen des respiratorischen Epithels zu diagnostischen Zwecken, wie z. B. bei der PCD zu validieren. Ziel der Arbeit ist somit die Analyse der DNA-Stabilität und -Regenerationsfähigkeit von primären Nasenschleimhautzellen zur Etablierung eines Kulturmodells für Primärzellen des Respirationstraktes.

Folgende Fragestellungen sollen hierbei geprüft werden:

1. Ist die Zellkultivierung in den beiden Methoden, Mono- bzw. Cokultur bis zur dritten Passage möglich?
2. Führt allein der Passagierungsprozess zu einer relevanten DNA-Schädigung?
3. Sind die kultivierten Zellen nach Behandlung mit MMS regenerationsfähig und lassen sich dabei Unterschiede innerhalb der Passagen finden?
4. Entstehen im Kultivierungsprozess genetische Instabilitäten, die auf chromosomaler Ebene nachgewiesen werden können?

5. Ist es möglich, die Funktionsfähigkeit des respiratorischen Epithels beider Kulturmodelle zu bestätigen?
6. Lassen sich vergleichend Unterschiede zwischen den beiden verwendeten Isolierungs- und Kultivierungsverfahren finden?

2. Methoden

Mit zwei verschiedenen Verfahren, mechanisches Abschaben und enzymatischer Verdau bzw. sequenzielles Auswachsen von Epithelzellen und Fibroblasten, wurden Primärzellen aus humanem Nasenschleimhaut(NSH)-Gewebe isoliert. Es wurden Epithelzell-Monokulturen und Kompartiment-getrennte Epithelzell-Fibroblasten Co-kulturen im Air-Liquid Interface über drei Passagen kultiviert. Untersucht wurde die DNA-Stabilität und -Reparaturkapazität nach genotoxischer Behandlung mit dem Comet Assay und die Chromosomenstabilität innerhalb des Kultivierungsprozesses mit dem Chromosomenaberrationstest. Die Überprüfung der Funktionsfähigkeit der Zellkulturen erfolgte mit Interleukin-8 (IL-8) ELISAs nach Lipopolysaccharid(LPS)-Stimulation sowie durch Nachweis ziliärer Strukturen im Rasterelektronenmikroskop (REM). Die Detektion von an der Basenexzisionsreparatur beteiligten DNA-Methylpuringlykosylasen (MPG) erfolgte in der Durchflusszytometrie. Außerdem wurden zum Nachweis von Fibroblasten in der Monokultur Vimentinfärbungen durchgeführt.

2.1 Zellisolierung und -kultivierung

Das verwendete Gewebe stammte von Patienten/innen, die in der Hals-Nasen-Ohrenklinik des Universitätsklinikums Würzburg operiert wurden (Ethikvotum 16/06). Es erfolgte dabei keine Selektion nach Alter, Geschlecht, Operationsindikation oder bekannten Vorerkrankungen der Atemwege. Zusätzlich zum Alter der Spender wurde der Rauchstatus und die Tabakmenge anhand der Pack Years miterfasst.

Tabelle 1: Übersicht Rauchstatus Spender NSH

Fallzahl		20
Rauchstatus	aktive und ehemalige Raucher	6
	durchschnittliche Pack Years	7
	Nichtraucher (niemals geraucht)	14

Nach Bereitstellung des Operationsgewebes wurden die Gewebeproben der Nasenschleimhaut innerhalb von 60 Minuten für die zwei verschiedenen Zellisolierungsmethoden, mechanisches Abschaben mit enzymatischem Verdau von Epithelzellen bzw. sequenzielles Auswachsen von Epithelzellen und Fibroblasten aus Miniorgankulturen, aufbereitet, um somit die bestmögliche Stabilität und Vitalität der

Primärzellen zu gewährleisten. Zur Veranschaulichung des geplanten Versuchsablaufes dienen die Abbildung 5 und 6.

2.1.1 Herstellung der verwendeten Lösungen

Minimum Essential Medium Eagle (MEM) wurde in allen Versuchsansätzen und Kultivierungsprozessen verwendet. Zur Herstellung wurde das MEM-Pulver (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) in 1l Aqua bidestillata (Eigenherstellung) gelöst. Hinzugefügt wurden 5ml L-Glutamin (200mM, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), 5ml Penicillin-Streptomycin-Lösung (Biochrom AG, Berlin, Deutschland), 500µl Gentamicin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) und 500µl Fungizin/Amphotericin B (Biochrom AG, Berlin, Deutschland).

2.1.2 Monokultur

Nachfolgend wird die verwendete Methode als "Monokultur" Verfahren bezeichnet. Hierunter ist ein unselektives Zellisolierungsverfahren von Primärzellen der humaner NSH zu verstehen. Während bei vollständiger Flutung der Zellen mit Medium eine Differenzierung zum mehrreihigen Epithel nicht erfolgt, ermöglicht die Zellkultivierung im Air-Liquid Interface diese Entwicklung. Die Kultivierung der Zellen als Monokultur im Transwell System bedarf der Isolation der NSH-Zellen aus dem bereitgestellten Gewebe. Für die Zellisolierung wurde das Gewebe zuerst in einer sterilen Petrischale mit ca. 2ml MEM gewaschen. Danach erfolgte die Überführung in ein 15ml Reaktionsröhrchen unter Zugabe von 9ml MEM und zur enzymatischen Lyse 100µl Protease/DNase (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland). Die Zellyse fand über Nacht gekühlt bei 4°C statt. Am nächsten Tag wurde der Inhalt des Reaktionsröhrchens einschließlich der Gewebeprobe auf eine sterile Petrischale überführt. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 2ml RPMI (Biochrom AG, Berlin, Deutschland), enthält 5% fetales Kälberserum (FCS; Linaris, Wertheim, Deutschland), 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung, 1% nicht-essentielle Aminosäuren (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) und 1% Natrium-Pyruvat-Lösung (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) beendet. Danach erfolgte die mechanische Zellisolierung mit Hilfe von steriler Pinzette und Skalpell. Die Zellsuspension wurde anschließend mit einer 5ml Einmalpipette in ein 50ml Reaktionsröhrchen überführt. Dabei diente eine sterile Kompresse als Zellfilter. Es erfolgte nun die Zentrifugation für fünf Minuten bei 500g und 4°C. Unter Verbleib des Zellpellets wurde der Überstand abgesaugt und mit

circa 11ml Medium resuspendiert. Als Zellnährmedium wurde Bronchial Epithelial Cell Growth Medium (BEGM; PromoCell, Heidelberg, Deutschland) mit Supplement und 1% Penicillin/Streptomycin verwendet. Die isolierten Zellen wurden anschließend auf Kulturflaschen, Transwell Platten und Objektträger verteilt. Die Kultivierung in

Flaschen diente der Expansion und der Passagierung der Zellen. In den verwendeten Transwellplatten wurden die Zellen im Air-Liquid Interface nachfolgend kultiviert und für die genotoxikologischen Untersuchungen verwendet. Die Zellkultivierung auf Objektträgern diente der Versuchsreihen im Chromosomenaberrationstest. Das Medium wurde nachfolgend alle zwei Tage gewechselt. Die Zellkultivierung fand demnach hierbei ab Passage null im Transwell System statt, sodass bereits in dieser Passage genotoxikologische Versuchsreihen mit dem Comet Assay durchgeführt werden konnten.

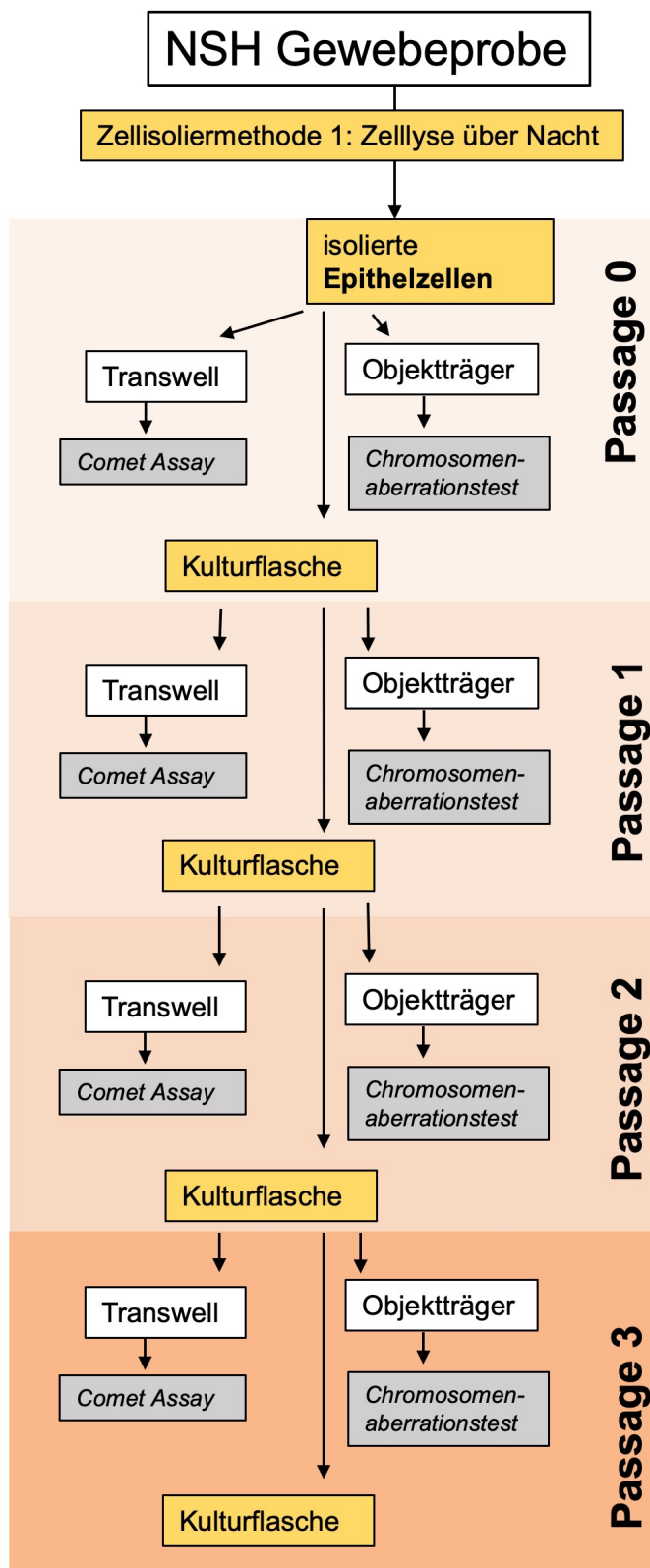


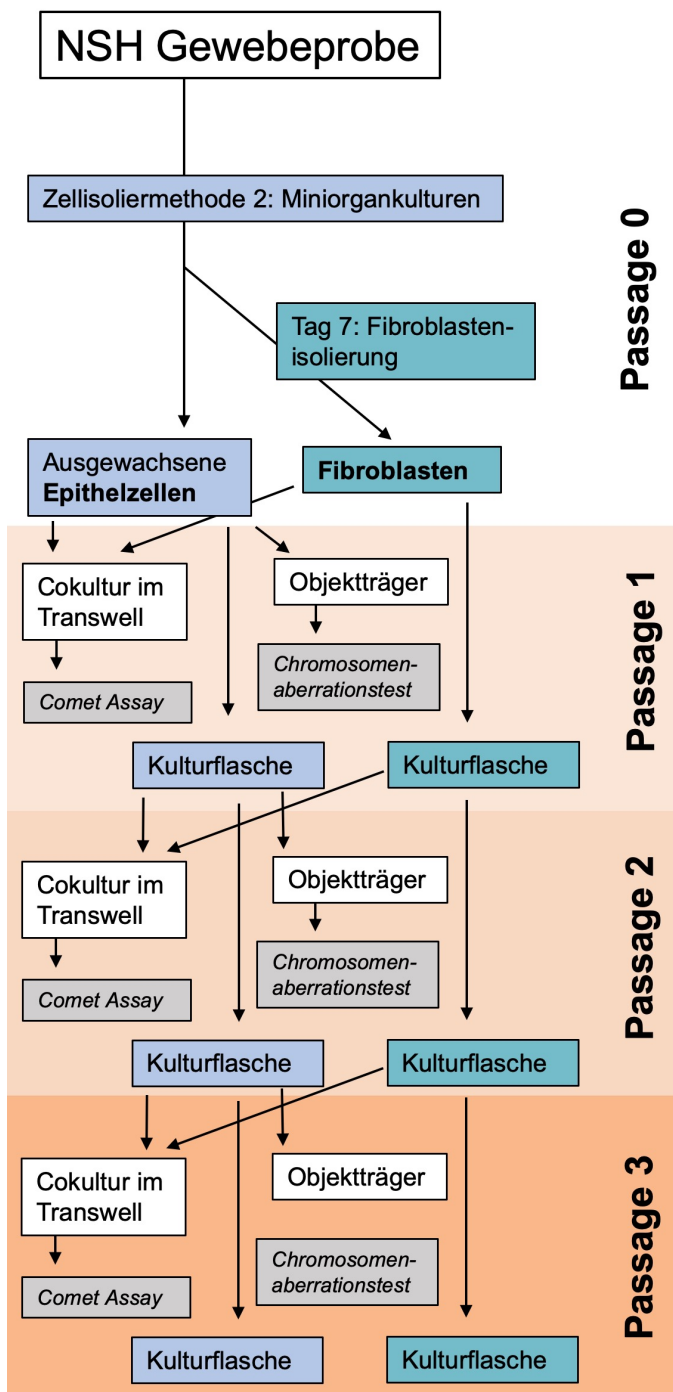
Abbildung 5: Übersicht Ablauf der Zellisolierung und -Kultivierung in der Monokultur über drei Passagen (Passage 0-3).

Zellisolierung durch enzymatischen Verdau und mechanisches Abschaben. Die isolierten Epithelzellen wurden jeweils auf Transwellplatten für den Comet Assay, auf Objektträger für den Chromosomenaberrationstest sowie in Kulturflaschen für die weitere Zellkultivierung verteilt.

NSH=Nasenschleimhaut

2.1.3 Cokultur

Die getrennte Zellisolierung von NSH-Zellen und Fibroblasten aus dem Operationsgewebe ermöglicht die Cokultivierung beider Zelltypen im Transwell unter Air-Liquid Interface Bedingungen. Das hier angewendete Protokoll zur Isolierung beider Zellarten aus der gleichen Gewebeprobe wurde bereits zur Erstellung von dreidimensionalen Kulturmodellen des Respirationstrakts verwendet [Schweinlin et al. 2017; Lodes et al. 2019]. Für diese Methode wurde am ersten Tag das Gewebe ebenfalls mit ca. 2ml MEM gewaschen und in eine sterile Petrischale überführt. Mithilfe



eines sterilen Skalpell wurde das Gewebe in kleine Stücke, sogenannte Miniorgane, zerkleinert. Es wurde dabei darauf geachtet, dass sowohl Blut, Knorpel als auch Fettstücke vollständig entfernt wurden. Die einzelnen Gewebestücke wurden danach auf einer Petrischale verteilt und jeweils drei bis vier Tropfen BEGM hinzugefügt. Die Epithelzellen wuchsen innerhalb der nächsten drei Tage aus den Gewebestücken aus. Nach diesen drei Tagen konnte das Gewebe mit 10ml BEGM geflutet werden und es erfolgte danach ein regelmäßiger Mediumwechsel alle zwei Tage.

Abbildung 6 Übersicht Versuchsablauf Isolierungs- und Kultivierungsmethode in der Cokultur über drei Passagen (1-3).

Es erfolgte eine getrennte Isolierung von Epithelzellen und Fibroblasten. Pro Passage gemeinsame Kultivierung in Transwellplatten mit nachfolgendem Comet Assay der Epithelzellen. Zudem getrennte Kultivierung der Zelltypen in Kulturflaschen und Kultivierung der Epithelzellen auf Objekträgern für den Chromosomenaberrationstest.



Abbildung 7: Zellkultivierung im Cokulturverfahren

Links: Miniorgankultur; präpariertes Gewebe an Tag zwei mit BEGM Tropfen

Rechts: Lichtmikroskopische Aufnahme; Auswachsen von Nasenschleimhautzellen aus den präparierten Gewebestücken innerhalb von sieben Tagen

Die enzymatische Isolierung der Fibroblasten erfolgte nach sieben Tagen. Die Isolierung beider Zelltypen aus dem gleichen Gewebestück bedarf aus Handhabungsgründen diese zeitliche Separation. Hierfür wurden die Gewebestücke aus der Petrischale mit den bereits herangewachsenen Nasenschleimhautzellen in eine neue Petrischale überführt und drei Mal mit PBS Puffer gewaschen. Die Gewebestücke wurden mit Hilfe eines Skalpell ein weiteres Mal mechanisch zerkleinert. Das Gewebe wurde dann mithilfe einer 5ml Einmalpipette unter Zugabe von 5ml Kollagenase Lösung (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) in ein 50ml Reaktionsröhrchen überführt. Die verwendete Petrischale wurde dann mit weiteren 5ml Kollagenase Lösung ausgewaschen und die Lösung ebenfalls in das Reaktionsröhrchen überführt. Danach erfolgte eine 45 Minuten lange Inkubation bei 37°C. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Zellslösung bei 250g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 10ml BEGM gewaschen. Diese zwei Schritte erfolgten noch ein weiteres Mal. Danach wurde das in BEGM resuspendierte Gewebepellet in eine Petrischale überführt. Innerhalb der nächsten Tage wuchsen die isolierten Fibroblasten aus den Gewebestücken aus. Das Medium wurde ebenfalls alle zwei Tage gewechselt. Bedingt durch die getrennte Zellisolierung der Epithelzellen und Fibroblasten war ein gemeinsames Kultivieren in den Transwell Systemen ebenso wie die Kultivierung auf Objektträgern erst ab Passage eins möglich.

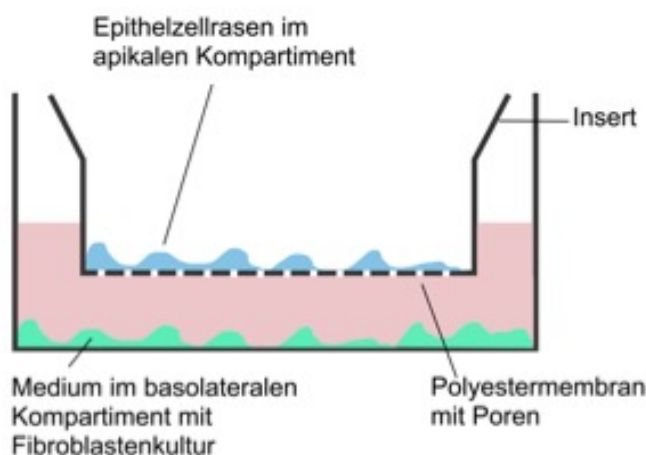
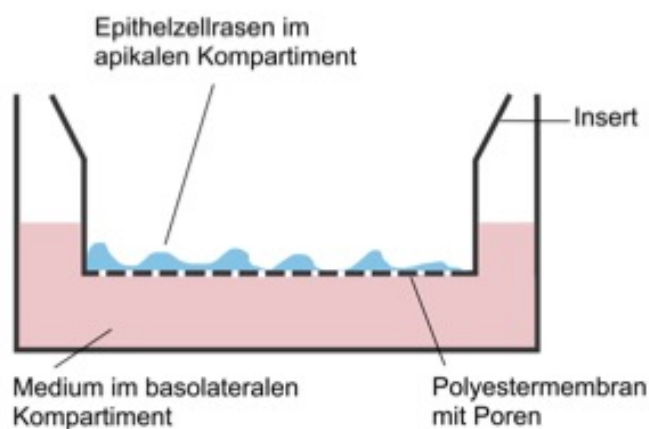
2.1.4 Kultivierungsmethode im Transwell System



Abbildung 8: Zellkulturen im Transwell System: 12-Well-Platten mit Polyester-membraneinsätzen.

Die Ernährung der Zellen erfolgte hierbei in den ersten sieben Tagen sowohl von apikal als auch von basolateral mit BEGM. Die basolaterale Seite kann über eine Öffnung in den Membraneinsätzen erreicht werden. Nach circa sieben Tagen erfolgt die Zellernährung nur noch von basolateral.

Die Zellkultivierung der Mono- bzw. Cokulturen erfolgte in Transwell Systemen. Sie ermöglichen in der Cokultur die Kompartiment-getrennte Kultivierung von Epithelzellen und Fibroblasten. Unter Air-Liquid Interface Bedingungen mit alleiniger basolateraler Ernährung der Zellen lässt sich die dauerhafte Luftexposition des respiratorischen Epithels der Nase simulieren. Bei dem verwendeten System handelte es sich um 12-Well-Platten mit Transwellmembraneinsätzen aus Polyester (siehe Abbildung 8). Durch die Membranporen ist eine Ernährung der Zellen von basolateral



möglich. Ebenso ist die Kommunikation von Zellen auf der Membran und den Zellen im basolateralen Kompartiment realisierbar. In beiden Methoden wurden die isolierten NSH-Zellen auf der Transwellmembran kultiviert. In der Cokultur erfolgte gleichzeitig die Kultivierung von Fibroblasten im basolateralen Kompartiment. Die Anzahl der Fibroblasten entsprach im Verhältnis zu den Epithelzellen

Abbildung 9 a/b: Zellkulturen in Transwells nach dem siebten Tag der Kultivierung

**a: Oben: Skizze Monokultur, NSH-Zellen werden auf Membraneinsätzen kultiviert
b: Unten: Skizze Cokultivierung mit zusätzlicher Fibroblastenkultur im basolateralen Kompartiment**

1:4. Zu Beginn wurden die Zellen sowohl von apikal, als auch von basolateral ernährt. Ab einer 80-prozentigen Konfluenz der Epithelzellen fand die Kultivierung im Air-Liquid Interface unter Luftexposition statt. Hierbei erfolgte eine alleinige Zellernährung mit BEGM von basolateral. Unter diesen Bedingungen wurden die Zellen noch circa weitere sieben Tage kultiviert und nachfolgend für verschiedene Versuchsansätze verwendet.

2.1.5 Passagierung

Die Kultivierung der Zellen erfolgte sowohl in der Mono- als auch in der Cokulturmethode bis zur dritten Passage. Die Zellkulturen in den 50ml Kulturflaschen wurden nach vollständigem Auswachsen passagiert. Hierfür wurden die Zellen mit 2ml PBS gewaschen. Danach erfolgte das enzymatische Ablösen unter Zugabe von 1ml 2,5% Trypsin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) für vier Minuten. Die Reaktion wurde mit 2ml RPMI beendet und die Zelllösung in ein 15ml Röhrchen überführt. Die Zellen wurden dann für fünf Minuten bei 500g zentrifugiert. Der Überstand wurde nachfolgend abgesaugt und die Zellen mit 2ml BEGM resuspendiert. Anschließend konnten die Zellen auf neue Transwellplatten, Kulturflaschen und Objektträger ausgesät werden.

2.2 Trypanblautest

Vor Durchführung des Comet Assays erfolgte jeweils die Bestimmung der Zellzahl und -vitalität mit dem Trypanblautest (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland). Hierbei können durch die Färbung vitale und tote Zellen lichtmikroskopisch unterschieden werden. Während bei einer Zellmembranschädigung der Farbstoff die toten Zellen dunkelblau färbt, erscheinen lebenden Zellen ungefärbt [Gorer et al. 1956]. Der prozentuale Anteil der vitalen Zellen wurde durch Auszählung zweier Quadranten in der Neubauer Zählkammer detektiert.

2.3 Comet Assay

Die Einzelzell-Mikrogelelektrophorese, auch Comet Assay genannt, dient dem Nachweis von DNA Einzelstrangbrüchen und ist eine häufig verwendete Methode zur Klärung von genotoxikologischen Fragestellungen [Speit et al. 1995]. Mit dem Comet Assay wurde auch der Einfluss von Umwelttoxinen auf das respiratorische Epithel der oberen Atemwege untersucht [Kleinsasser et al. 2001; Kleinsasser et al. 2004].

2.3.1 Herstellung der verwendeten Lösungen

Nachfolgend wird die Herstellung der verwendeten Agaroselösungen beschrieben. Vor ihrer Verwendung wurden die Objektträger mit Agaroselösung beschichtet. Hierfür wurde eine Lösung mit 1,5g normal melting point (NMP) Agarose (1,5%; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und 100ml 1x phosphatgepufferte Salzlösung (PBS; Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) angesetzt. Zur Zelleinbettung in Agarose wurde eine Lösung mit 50mg low melting point (LMP) Agarose (0,5%; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) und 10ml 1xPBS angesetzt.

Zur Durchführung des Comet Assays erfolgte die Herstellung des Elektrophoresepuffers. Am Tag zuvor wurden circa 1,6l Aqua bidestillata kaltgestellt. Am Versuchstag wurde der Elektrophoresepuffer frisch angesetzt. Der Puffer enthielt 120ml 5M NaOH Lösung (Merck Biosciences, Schwalbach, Deutschland), 10ml EDTA (0,2M Stammlösung; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland). Das Behältnis wurde auf 2l mit Aqua bidestillata aufgefüllt und bis zur Verwendung kaltgestellt. Die Herstellung der EDTA-Stammlösung (0,2M) erfolgte separat. Für die Stammlösung wurden 14,89g EDTA mit 180ml Aqua bidestillata angesetzt. Danach wurde ein pH-Wert von 10 durch Zugabe von NaOH Plätzchen titriert. Die Lösung wurde mit Aqua bidestillata auf 200ml aufgefüllt, autoklaviert und lichtgeschützt gelagert. Zur Herstellung von 5M NaOH wurden 200g NaOH-Plätzchen in 950ml Aqua bidestillata gelöst. Das Behältnis wurde auf 1l mit Aqua bidestillata aufgefüllt.

Für den Lysepuffer wurden 67ml N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz (30%ige Lösung; Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland), 292,8g NaCl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), 2,4g TRIS (Trisma-Base; Merck Biosciences, Schwalbach, Deutschland) und 74,4g EDTA in 1,8L Aqua bidestillata gelöst. Unter Hinzufügen von 5M NaOH wurde der pH-Wert auf 10 titriert. Anschließend erfolgte der Zusatz von Aqua bidestillata bis zu einer Gesamtmenge von 2l. Die Lyseelösung enthielt 66,75ml Lysepuffer, 7,5ml DMSO (=10%; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) und 0,75ml Triton X-100 (=1%; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland). Sie wurde vor Beginn des Comet Assays neu angesetzt. Danach wurde die Lösung bis zum Gebrauch lichtgeschützt und kühl gelagert.

Nach der Elektrophorese erfolgte die Neutralisation mit dem TRIS-Neutralisationspuffer (0,4M). Für die Pufferherstellung wurden 97g TRIS mit 1950ml Aqua bidestillata aufgefüllt. Mit 5M HCl (Merck Biosciences, Schwalbach,

Deutschland) wurde ein pH-Wert von 7,5 eingestellt und die Gesamtmenge auf 2l mit Aqua bidestillata aufgefüllt. Nachfolgend wurde der TRIS Puffer in 1l Flaschen abgefüllt, autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert. Der 10x TBST (TRIS-gepufferte Salzlösung mit Tween) Puffer wurde mit 12,1g Tris-Base, 40g NaCl, 5ml Tween20 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) und 500ml Aqua bidestillata hergestellt.

Zur Auswertung wurden die Zellen nach der Elektrophorese Fluoreszenz gefärbt. Die für die Färbelösung benötigte DABCO-Lösung wurde mit 25ml PBS, 75ml Glycerin (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und 2,5g DABCO (25mg/ml; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) angesetzt. Nachfolgend wurden 10µl GelRed (Biotium, Californien, USA) mit 990µl Aqua bidestillata gemischt und im Verhältnis 1:4 mit DABCO angesetzt.

2.3.2 Zellbehandlung

Für die nachfolgende toxikologische Versuchsreihe wurden pro Patienten pro Passage, Monokultur ab Passage null, Cokultur ab Passage eins, drei Versuchsansätze im Transwell System verwendet. Der erste Versuchsansatz diente als Negativkontrolle und beinhaltete die unbehandelten Zellen. Im zweiten Versuchsansatz wurden die Zellen eine Stunde mit 300µl MMS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), verdünnt in DMSO ohne nachfolgende Regenerationszeit behandelt. Im dritten Versuchsansatz wurden die Zellen für eine Stunde mit einer Konzentration von 300µl MMS, verdünnt in DMSO behandelt und anschließend weitere 24 Stunden in normalem BEGM kultiviert. Hierbei wurde geprüft, ob die Epithelzellen zu einer Regeneration der DNA-Schädigung nach genotoxischer Behandlung fähig waren.

2.3.3 Durchführung

Grundlage des Versuchs ist die Wanderung von negativ geladenen DNA-Fragmenten durch ein elektrisches Feld in Richtung Anode. Die behandelten Zellen wurden zuvor in Agarose auf Objektträger aufgetragen und lysiert. Durch die Wanderung der DNA-Fragmente entsteht bei hoher DNA-Schädigung eine Art Schweif, der an einen Kometen erinnert, wohingegen die intakte DNA im Kopfteil des Kometen verbleibt. Dieser Effekt kann durch eine Fluoreszenzfärbung sichtbar gemacht und entsprechend ausgewertet werden. Es erfolgte die Bereitstellung der genotoxisch mit MMS behandelten Epithelzellen. Die Zellen wurden im Transwell System mit 500µl

PBS gewaschen und danach über drei Minuten mit 300µl 2,5% Trypsin behandelt. Die Reaktion wurde mit 500µl RPMI Medium beendet. Die Zelllösung wurde in 1,5ml Reaktionsröhrchen überführt und für fünf Minuten bei 500g zentrifugiert. Nachfolgend wurde unter Verbleib von 50µl der Überstand abgesaugt. Danach erfolgte die Zellbeschichtung und -lyse. Die Agaroselösung für die Zellen wurde aufgeköcht und auf einer Heizplatte warmgestellt. Pro Versuchsansatz wurden 10µl Zelllösung mit 180µl Agaroselösung gemischt. Für jeden Versuchsansatz wurden nachfolgend zwei Objektträger vorbereitet. Hierfür wurden 60µl der Zell-Agarosemischung auf einen zuvor mit Agarose beschichteten Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas bedeckt. Die Objektträger wurden für circa fünf Minuten zur Festigung der Agarose gekühlt. Nachfolgend wurden die Deckgläser abgenommen und für eine Stunde lichtgeschützt und gekühlt bei 4°C in den Lysepuffer gestellt. Die Elektrophoresekammer wurde in einer mit Eis gefüllten Wanne bereitgestellt. Nachfolgend wurde der Elektrophoresepuffer in die Kammer gefüllt und Luftblasen entfernt. Nach der Lyse wurden die Objektträger in die Elektrophoresekammer gelegt. Anschließend wurden unbeschichtete Objektträger zur Ergänzung der freien Plätze in der Kammer verwendet. Im abgedunkelten Raum fand die DNA-Entwindung für 20 Minuten im Elektrophoresepuffer statt. Danach wurde bei 25V eine Stromstärke von 300mA für 20 Minuten angelegt. Die verwendete Stromstärke konnte über die Puffermenge eingestellt werden, wobei 1ml in etwa 1mA entsprachen. Nachfolgend wurden die Objektträger aus der Kammer geholt und abgetropft. Danach erfolgte die Neutralisation für fünf Minuten in einer Küvette mit dem TRIS-Neutralisationspuffer. Die Präparate wurden dann kurz in PBS gewaschen und danach für zehn Minuten in eiskaltem Methanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) fixiert. Nachfolgend konnten die Objektträger getrocknet und anschließend für die Auswertung gefärbt werden. Die Präparate wurden mit jeweils 20µl GelRed-Färbelösung gefärbt und mit Deckgläsern eingedeckt. Nach der Färbung der Präparate fand die Auswertung zeitnah statt.

2.3.4 Auswertung

Die Auswertung des Comet Assays erfolgte mit der Software Komet 5.5, wobei die Präparate über eine Verbindung des Computers zum Fluoreszenzmikroskop beurteilt werden konnten. In den fluoreszenzgefärbten Präparaten konnte die DNA-Schädigung der Zellkerne erfasst werden. Während bei einer unbeschädigten Zelle der Hauptteil

der DNA im Kopf des Kometen verblieb, bildeten die DNA Fragmente bei starker DNA-Schädigung einen sichtbaren Kometenschweif aus. Um eine standardisierte Auswertung zu erreichen, erfolgte diese immer nach dem gleichen Prinzip. Ausgewertet wurde beginnend am oberen linken Rand des Deckglases in horizontaler Richtung nach rechts. Pro Versuchsansatz unbehandelt, eine Stunde Behandlung, 24 Stunden Reparaturzeit wurden zwei Objektträger ausgewertet. Pro Objektträger

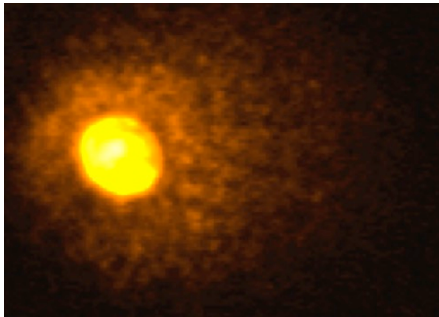


Abbildung 10: Bild eines geschädigten Zellkerns mit starker Fragmentierung:

Erkennbare Schweifbildung, die durch Wanderung der DNA Fragmente in Richtung Anode entstanden sind.

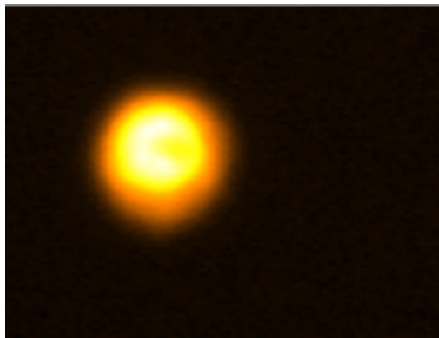


Abbildung 11: Bild eines Zellkerns mit geringer Fragmentierung:

Es ist keine Schweifbildung erkennbar, die hohe Farbintensität im Kopfteil des Kometen entspricht dem intakten DNA Anteil.

wurden 50 Zellen beurteilt und jeweils der Mittelwert mit der zugehörigen Standardabweichung der Tail DNA, beinhaltet prozentualen Anteil der DNA im Schweif, der Tail Length (Schweiflänge) und des Olive Tail Moment berechnet. Der Olive Tail Moment (OTM) errechnet sich aus dem Produkt der DNA Menge im Schweif des Kometens und der mittleren Wegstrecke der DNA-Fragmente [Olive et al. 1990]. Der OTM-Wert wird auch in der nachfolgenden Auswertung als Maß für die DNA-Schädigung verwendet.

2.4 Chromosomenaberrationstest

Numerische und strukturelle Chromosomenveränderungen können lichtmikroskopisch mit dem bewährten genotoxikologischen Testverfahren des Chromosomenaberrationstests nachgewiesen werden [Miller et al. 1998]. Der hierbei angewendete Versuchsablauf findet nach Modifikation des ursprünglich veröffentlichten Protokolls statt [Sonoda et al. 1998] und wurde bereits mehrfache in der Arbeitsgruppe angewendet, z. B. [Hackenberg et al. 2011a].

2.4.1 Herstellung der verwendeten Lösungen

Die Giemsa Lösung erfolgte zur Anfärbung chromosomaler Banden im Chromosomenaberrationstest. Zur Herstellung der Giemsa Lösung wurden 10ml Sörensenpuffer, 80ml Aqua bidestillata und 7ml Giemsa (Merck Biosciences, Schwalbach, Deutschland) verwendet. Zur Herstellung des Sörensenpuffers (Natriumphosphatpuffer) wurden 11,13g Natriumdihydrogenphosphat und 8,5g Kaliumdihydrogenphosphat (Merck Biosciences, Schwalbach, Deutschland) in 500ml Aqua bidestillata gelöst.

Zur Herstellung der Fixanslösung für auf Objektträger kultivierte Zellen wurde 4% Paraformaldehyd (PFA) (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) mit 0,1M Natriumphosphatpuffer (NaPP) verwendet. Die Lösung wurde für den Chromosomenaberrationstest und für die Vimentinfärbung verwendet. Zur Herstellung des 0,1M Natriumphosphatpuffer wurden Lösung A und B angesetzt. Lösung A bestand aus 17,8g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck Biosciences, Schwalbach, Deutschland) und 1.000ml Aqua demineralisata und Lösung B aus 6,9g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck Biosciences, Schwalbach, Deutschland) mit 500ml Aqua demineralisata. Zur Herstellung einer 0,1M Natriumphosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,2 wurden 360 ml der Lösung A und 140ml der Lösung B verwendet.

2.4.2 Kultivierung

Die Zellkultivierung für den Chromosomenaberrationstest erfolgte in einem Vierkammersystem auf sterilen Objektträgern. Hierbei wurden pro Objektträger circa 50.000-250.000 Zellen kultiviert. In der nullten Passage des Monokulturverfahrens



konnte diese Zellzahl aufgrund der geringen Zellausbeute meist nicht erreicht werden.

Abbildung 12: kultivierte Epithelzellen auf Objektträgern im Vierkammersystem mit BEGM

2.4.3 Zellbehandlung und Objektträgerpräparation

Zur Arretierung der Zellen in der M-Phase des Zellzyklus erfolgte die Zugabe von $10\mu\text{l}$ des Spindelgifts Colcemid (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) am Vortag der Objektträgerpräparation. Für die Objektträgerpräparation

wurde das übrige Medium in der Kammer abgekippt. Danach fand eine Behandlung der Zellen mit jeweils 4ml erwärmter hypotoner 0,075M KCl-Lösung (Merck Biosciences Schwalbach, Deutschland) für 20 Minuten statt. Durch die Osmose wurde ein vergrößertes Zellvolumen erreicht, welches eine bessere Darstellung der Chromosomen ermöglichte. Die Erwärmung von Kaliumchlorid verstärkte diese Reaktion. Zur Fixierung wurde ein Gemisch aus Methanol und Essigsäure (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) im Verhältnis 3:1 angesetzt. Dieses Gemisch wurde mindestens 30 Minuten vor Gebrauch eiskalt gestellt. Die nachfolgende Fixierung lief in drei Schritten ab. Zuerst wurde pro Objektträger 1ml des Fixans zum KCl pipettiert. Nach zehn Minuten wurde das Gemisch abgekippt und pro Objektträger 5ml des Fixans für 15 Minuten hinzugeben. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt. Danach wurden die Objektträger aus den Kammern geholt, mit dem Fixans abgespült und für einen Tag im Ofen bei 60°C getrocknet.

2.4.4 Färbung

Für die Chromosomenfärbung wurden die Objektträger für 30 Sekunden mit Trypsinlösung behandelt. Es erfolgte ein Waschschrift in PBS und danach die Färbung in Giemsa Lösung für zwei Minuten. Darauffolgend wurden die Objektträger in drei Küvetten mit destilliertem Wasser gewaschen und dann unter dem Abzug getrocknet. Nachfolgend wurden die Präparate mit Entellan-Lösung (Merck Biosciences, Schwalbach, Deutschland) und Deckgläsern eingedeckt. Durch die Giemsa Färbung konnten daraufhin gefärbte Chromosomenbanden von ungefärbten Reversebanden unterschieden werden.

2.4.5 Auswertung

Nachfolgend wurden die präparierten und gefärbten Objektträger ausgewertet. Hierbei wurden die Präparate auf numerische und strukturelle Aberrationen lichtmikroskopisch untersucht. Bei detektierten dislozierten Fragmenten konnten Chromatid- bzw. Chromosomenbrüchen unterschieden werden. Ein mögliche Wiederanlagern von Fragmenten an andere Chromosomen führt außerdem zu lichtmikroskopisch sichtbaren Chromatiden- bzw. Chromosomentranslokationen. Zur Auswertung der Ergebnisse im Chromosomenaberrationstest erfolgte die Einteilung der beurteilten Objektträger nach den Kategorien „nicht auswertbar“, „unauffällig in 25 Mitosen“, „unauffällig in <25 Mitosen“, „Nachweis eines Bruchs“.



Abbildung 13: Beispielbild für die Auswertung des Chromosomenaberrationstests im Lichtmikroskop.

Pfeilspitze (blau) zeigt einen Bruch des 12. Chromosoms in der zweiten Passage, Pfeil (rot) zeigt auf das Bruchstück. Vergrößerung des Ausschnittes rechts oben.

2.5 Interleukin-8 (IL-8) ELISA

Zur genaueren Analyse und zum Vergleich der Funktionsfähigkeit beider Kulturmodelle wurde die IL-8-Konzentration nach LPS-Stimulation mittels ELISA untersucht [Alberty et al. 2006].

2.5.1 Zellstimulierung

Zum Vergleich der LPS-induzierten IL-8-Stimulierbarkeit der Zellkulturen im Transwell System wurden fünf Gewebe jeweils als Monokultur und Cokultur angelegt und in der jeweils niedrigsten Passage untersucht. Es wurde die IL-8-Konzentration nach $1\mu\text{g/ml}$ und nach $10\mu\text{g/ml}$ LPS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) Stimulation sowie die Konzentration im Überstand der unbehandelten Zellen, BEGM ohne Supplement, in jeweils 10 Versuchsansätzen pro Methode gemessen, d. h., für jedes Gewebe wurden zwei Ansätze untersucht. Die LPS-Stimulation erfolgte über eine Stunde, die anschließende Zellkultivierung in BEGM ohne Supplement über 24 Stunden. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen und bis zur Durchführung des ELISA eingefroren. Da in der Cokultur die zusätzliche Fibroblastenkultur aufgrund der höheren Zellzahl allein bereits zu einer gesteigerten IL-8-Konzentration im Vergleich zur Monokultur führte, wurden in einem zweiten Versuchsansatz die zwei Zelltypen der Cokultur allein untersucht. Hierfür wurden die Zellen zunächst wie zuvor im Transwell System als Cokultur angezchtet. Für die Versuchsansätze im ELISA wurden dann die Membraneinsätze mit den Epithelzellen in neue Wellplatten ohne

basolaterale Fibroblastenkultur überführt. Entsprechend wurden die Epithelzellen bzw. Fibroblasten der Cokultur getrennt voneinander mit LPS stimuliert bzw. jeweils unbehandelt als Negativkontrolle verwendet.

2.5.2 Durchführung

Zur Detektion der IL-8-Konzentrationen im Überstand der Zellkulturen wurden Sandwich-ELISAs verwendet. Der Ablauf des ELISA wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Zuerst wurde die Standardreihe mit abnehmenden IL-8-Konzentrationen durch serielle Verdünnung erstellt (Werte in pg/ml: 2.000, 1.000, 500, 250, 125, 62,5, 0). Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle mit reinem Verdünnungspuffer angelegt. Alle Werte wurden als Duplikate aufgetragen. Für den Sandwich-ELISA wurden mit IL-8-Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatten verwendet. Jeder Versuchsansatz wurde zweifach angelegt. Die eingefrorenen Überstände wurden bei Raumtemperatur schonend aufgetaut und jeweils 100µl unverdünnt auf die Wells pipettiert. Das in den Überständen enthaltene IL-8 wurde daraufhin an der antikörpertragenden Oberfläche der Mikrotiterplatten gebunden. Durch Zugabe eines zweiten IL-8-Antikörpers wurde die Entstehung der den Sandwich-ELISA ausmachenden Antikörper-Antigen-Antikörper Komplexe erreicht. Hierfür wurden jeweils 50µl eines biotinierten IL-8-Antikörpers auf alle Versuchsansätze pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Mikrotiterplatten ausgekippt und es erfolgten drei Waschschrte mit dem Waschpuffer. Der zweite Antikörper wurde anschließend über einen dritten Enzym-gekoppelten Antikörper gebunden. Hierfür wurde 100µl Streptavidin-Horseradish Peroxidase (HRP) Lösung in alle Wells pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur abgedeckt inkubiert. Streptavidin ist ein Protein aus Streptomyces, das mit hoher Affinität Biotin bindet. Nachfolgend wurden die Platten wiederum ausgekippt und drei Mal gewaschen. Als Enzymsubstrat wurden 100µl TMB Lösung in alle Wells gegeben und für 12-15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion wurden jeweils 100µl H₂SO₄ verwendet. Die entstandenen Farbintensitäten korrelierten mit der jeweiligen Interleukin Konzentration im Versuchsansatz.

2.5.3 Auswertung

Im Photometer konnte nachfolgend die Extinktion der einzelnen Versuchsansätze bei einer Wellenlänge von 450nm bestimmt werden. Per linearer Regression konnten aus den gemessenen Extinktionswerten der Versuchsansätze die jeweiligen IL-8-

Konzentrationen ermittelt werden. Pro untersuchtem Gewebe wurden jeweils zwei Versuchsansätze verwendet. Lag der Extinktionswert unterhalb des niedrigsten Standardwertes wurde diese IL-8-Konzentration gleich null gesetzt.

2.6 Rasterelektronenmikroskopie

Zur Untersuchung der Zelldifferenzierung beider Kulturmodelle wurden Rasterelektronenmikroskopie (REM) Aufnahmen durchgeführt. Hierbei sollte überprüft werden, ob ziliäre Strukturen in beiden Verfahren nachweisbar waren.

2.6.1 Durchführung

Für die REM Aufnahmen wurden die Zellen in der jeweilig ersten Passage über vier bis sechs Wochen im Air-Liquid Interface kultiviert. Über Nacht wurden die Zellkulturen auf der Transwellmembran in 6,25% Glutaraldehyd (gelöst in 50mM Phosphatpuffer) fixiert. Die nachfolgenden Arbeitsschritte der Präparation und die Erstellung der Aufnahmen erfolgten im Biozentrum an der Universität Würzburg. Nach der Fixierung wurden die Präparate in Sörensenphosphatpuffer gewaschen und in einer aufsteigenden Aceton-Konzentrationsreihe entwässert. Das Rasterelektronenmikroskop kann nur Aufnahmen von elektrisch leitenden Oberflächen erstellen. Dafür wurden die Proben mit einem Goldfilm bedampft. Nachfolgend wurde jeweils die gesamte Probe auf ziliäre Strukturen im Rasterelektronenmikroskop in 1.000- bis 6.000-facher Vergrößerung abgescannt.

2.7 Durchflusszytometrie zum Enzymnachweis

Als DNA-Reparaturmechanismus für alkylierte Basen ist die Basenexzisionsreparatur mitverantwortlich. Teil dieses Reparatursystems der Zellen sind spezifische DNA-Glykosylasen, die in der Lage sind, modifizierte Basen von der DNA abzuspalten. Die Behandlung der Zellen mit Methylmethansulfonat (MMS) resultiert in einer Alkylierung, insbesondere an den Purinbasen Adenin und Guanin. Menschliche Zellen verfügen über spezifische Methylpurin-glykosylasen, die diese Alkylierung reparieren können [Schartl 2009].

2.7.1 Durchführung

Zur Darstellung dieses Reparaturmechanismus fand der Nachweis von Methylpurin-glykosylasen (MPG) in humanen Nasenschleimhautzellen statt. Hierfür wurden die Zellen ebenfalls im Transwell System kultiviert. Für den Enzymnachweis in der Durchflusszytometrie wurden die Zellen mit 500µl PBS gewaschen und anschließend

mit 300µl 2,5% Trypsin für drei Minuten behandelt. Die enzymatische Reaktion wurde mit 500µl RPMI unterbunden. Danach erfolgte die Überführung in ein 5ml Reaktionsröhrchen. Die Zellsuspension wurde für fünf Minuten bei 500g zentrifugiert und der Überstand anschließend abgekippt. Zur Fixierung wurden die Zellen für zehn Minuten mit 200µl vierfachem Paraformaldehyd bei Raumtemperatur behandelt. Danach wurde die Zelllösung zentrifugiert und es folgte die Membranpermeabilisierung für zehn Minuten mit 200µl 90% eisgekühltem Methanol bei -4°C. Die Zellsuspension wurde dann ein weiteres Mal zentrifugiert. Zur Blockierung der Reaktion wurden die Zellen nachfolgend für 20 Minuten mit 200µl 3% bovines Serumalbumin (BSA) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)/PBS bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde dann wiederum für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Danach erfolgte die Inkubation mit 100µl Anti-MPG Antikörper (Verdünnung 1:20 mit 3%BSA in PBS; Abcam plc, Cambridge, Großbritannien) für 30 Minuten im Dunkeln und gekühlt auf Eis. Dann wurde die Lösung fünf Minuten zentrifugiert mit nachfolgendem Abkippen des Überstands. Anschließend wurde ein Waschschrift mit 200µl eiskaltem PBS durchgeführt. Zum Nachweis des gebundenen Anti-MPG Antikörpers wurde der Fluoreszenzfarbstoffantikörper Alexa Fluor® 488 (Verdünnung 1:2.000; Abcam plc, Cambridge, Großbritannien) verwendet. Die Inkubation erfolgte ebenfalls für 30 Minuten im Dunkeln auf Eis. Die Zelllösung wurde zentrifugiert, der Überstand abgekippt und ein Waschschrift mit 200µl eiskaltem 3%BSA/PBS durchgeführt. Anschließend wurden die pelletierten Zellen in 500µl FACS-Lösung resuspendiert und zeitnah ausgewertet.

2.7.2 Auswertung

In der Durchflusszytometrie werden Zellsuspension mit einem Laserstrahl angeregt und dabei sowohl die Lichtstreuung als auch das Fluoreszenzlicht der Enzymdetektierenden Antikörper registriert. Bei der Lichtstreuung werden die Vorwärtsstreuung FCS (forward scatter) und die Seitwärtsstreuung SSC (Sidewards Scatter) unterschieden. Die Vorwärtsstreuung ist vom Zellvolumen abhängig, während die Seitwärtsstreuung durch die Granularität beeinflusst wird. Anhand dieser zwei Lichtstreuungen kann zu Beginn der Detektion die gesamte Zellpopulation, unabhängig vom Enzymnachweis begutachtet werden. Nachfolgend können die fluorenszenzmarkierten Enzyme mittels Laser registriert werden. Danach wird der

fluoreszenzmarkierte Anteil im Vergleich zur gesamt gemessenen Zellpopulation ermittelt.

2.8 Vimentinfärbung zum Fibroblastennachweis

Vimentin gehört zu den Intermediärfilamenten und ist Bestandteil des Zytoskeletts von Fibroblasten. Vimentinfärbungen können somit für den Nachweis von Fibroblasten verwendet werden [Goodpaster et al. 2008]. Die Zellen wurden zuerst nach der oben beschriebenen Monokultur Isolierungsmethode aus dem Gewebe gewonnen und nachfolgend auf Objektträgern kultiviert. Als Versuchsansätze wurden allein Zellen aus der Monokulturmethode verwendet, um hierbei festzustellen, ob und wenn ja, in welchem Ausmaß eine Fibroblastenkontamination in den drei Passagen stattgefunden hat.

2.8.1 Herstellung der verwendeten Lösungen

Zur Herstellung des Eindeckmittels für die fluoreszenzgefärbten Objektträger wurden 4,88g Mowiol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) in 12ml Glycerol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) eingerührt und für mindestens vier Stunden auf 70°C erwärmt. Danach wurden 12ml Aqua bidestillata hinzugefügt und 24ml 0,2M Tris-Puffer hinzugegeben. Über Nacht wurde die Lösung erwärmt gerührt. Anschließend wurde das Eindeckmittel auf 50ml Reaktionsröhrchen verteilt und bei 5.000g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurde die Lösung auf 2ml Reaktionsgefäße aliquotiert und ebenfalls bei 5.000g für 15 Minuten zentrifugiert. Bis zur Verwendung wurde das Eindeckmittel bei -20°C aufbewahrt.

2.8.2 Fixierung der Zellen auf Objektträger

Nachdem die Zellen auf den Objektträgern kultiviert wurden, mussten sie vor der Färbung fixiert werden. Hierfür wurde 4% PFA in 0,1M NaPP auf 37°C erwärmt. Von dieser Fixanslösung wurden jeweils 1ml pro Objektträger in die Kammer gefüllt und für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Medium-Fixans-Gemisch abgesaugt und pro Kammer 3ml Fixans pipettiert. Es folgte eine Inkubationszeit von 30 Minuten. Anschließend wurde die gesamte Lösung wiederum abgesaugt. Die Objektträger wurden dann in zwei Waschrissen mit 1xTBST gespült und für die nachfolgende Färbung bereitgestellt.

2.8.3 Färbung

Die Vimentin- und DAPI-Färbung erfolgte nicht über den gesamten Objektträger, sondern nur in einem gut angewachsenen Teil, der mit einem Fettstift umrandet und somit markiert wurde. Der Durchmesser der kreisrunden Fläche entsprach circa 2cm. Die nachfolgenden Arbeitsschritte wurden demnach nur für die markierte Fläche und nicht den gesamten Objektträger durchgeführt. Die fixierten Objektträger wurden in eine Aluminiumkammer überführt und anschließend wiederum mit 1xTBST gespült. Zur Nachfixierung wurde kaltes Aceton (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) aus dem Gefrierfach verwendet. Hierfür wurde pro Fläche 50µl Aceton angewendet. Die Inkubation erfolgte für fünf Minuten. Daraufhin folgten drei Waschschrte mit 1xTBST. Zur Blockierung der Reaktion wurden die Zellen für 30 Minuten mit 100µl 10%BSA/1xTBST behandelt. Die Lösung wurde dann vorsichtig abgesaugt. Nun erfolgte die Inkubation mit 200µl des ersten Antikörpers. Als Antikörper wurde Anti-Vimentin (Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande) in einer Verdünnung von 1:100 verwendet (Verdünnung in 1%BSA/1xTBST). Die Objektträger wurden über Nacht in einer feuchten Aluminiumkammer bei 4°C lichtgeschützt gelagert. Am nächsten Tag erfolgten drei Spülschritte mit TBST. In der Zwischenzeit wurde das Mowiol auf 65°C für mindestens eine Stunde erwärmt. Nach den Waschschrten erfolgte die Inkubation mit den zweiten Antikörpern. Hierfür wurde DAPI (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) als Kernfarbstoff in einer Verdünnung von 1:1.000 und Alexa Fluor® 555 (Merck Millipore, Billerica, USA) in einer Verdünnung von 1:500 verwendet (beide Antikörper wurden in 1%BSA/1xTBST verdünnt). Die Objektträger wurden dann für eine Stunde abgedunkelt in der feuchten Aluminiumkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgten wiederum drei Waschschrte. Anschließend wurden die Objektträger mit Mowiol eingedeckt und bis zur Auswertung gekühlt und dunkel gelagert.

2.8.4 Positivkontrolle

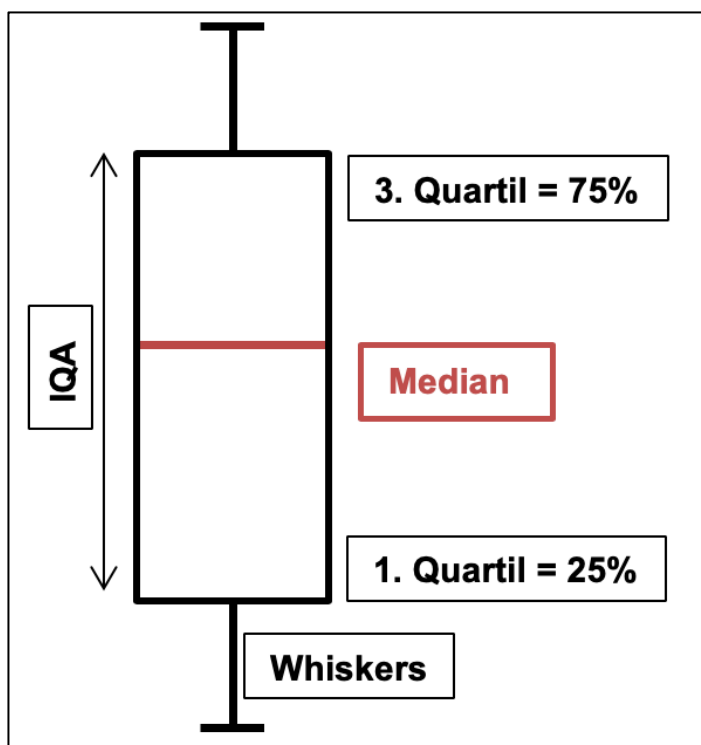
Pro Versuchsansatz wurden Positivkontrollen mit Reinkulturen aus Hautfibroblasten verwendet, um die Funktionsfähigkeit der Färbung zu überprüfen. Die Isolierung von Fibroblasten erfolgte aus humaner Haut, die im Rahmen von Routineoperationen reseziert wurde und nicht der pathologischen Begutachtung zugeschickt werden musste (Ethikvotum 16/06). Die Proben wurden von Fett gereinigt und danach in 2-3mm große Stücke geschnitten und auf 6-Well Platten verteilt. Nachfolgend wurden die Proben bei 37°C und 5% CO₂ für 60 Minuten kultiviert, sodass eine feste Haftung

zum Boden der Platten stattfinden konnte. Anschließend wurden die Hautstücke mit Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen (Thermo Fisher Scientific), Waltham, USA), versetzt mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, geflutet. In den folgenden Tagen wuchsen die Fibroblasten aus den Hautstücken in die Peripherie aus [Gehrke et al. 2017].

2.9 Statistische Auswertung und Ergebnisdarstellung

Sämtliche statistischen Auswertungen, d. h. Häufigkeiten, deskriptive Statistik, statistische Tests und Diagramme wurden mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS erstellt. Zur statistischen Auswertung der erhobenen Versuchswerte wurde der Wilcoxon-Tests verwendet, der ein nicht-parametrisches Testverfahren darstellt. Der Wilcoxon-Test untersucht die Gleichheit der zentralen Tendenz zwischen zwei abhängigen Stichproben. Hierbei wurde ein Signifikanzniveau von 0,05 angewandt. Bei einer Stichprobengröße >30 kann nur die asymptotische Signifikanz berechnet werden. Da jedoch eine kleinere Stichprobe angewendet wurde, erfolgte die Berechnung bei allen Versuchsansätzen mit der exakten 2-seitigen Signifikanz. Aufgrund der fehlenden Annahme über die Richtung der Korrelation wurde der 2-seitige und nicht der einseitige Signifikanztest gewählt. Signifikanzwerte der 2-seitigen Testung sind im Vergleich zur einseitigen größer. Die Wahrscheinlichkeit für einen Fehler 2. Art ist bei der 2-seitigen Testung außerdem höher. Anhand des Wilcoxon-Tests konnte untersucht werden, ob eine signifikante Zunahme der DNA-Schädigung durch genotoxische Behandlung bzw. eine signifikante Abnahme nach der Regenerationszeit auftrat. Der Wilcoxon-Test wurde auch zur Analyse der IL-8-Konzentrationen nach LPS-Stimulation im ELISA verwendet. Auch zum Vergleich der OTM-Werte beider Kulturmodelle wurde der Wilcoxon-Test verwendet. Hierdurch sollte dargestellt werden, ob es Unterschiede zwischen den beiden Methoden, Monokultur und Cokultur, in Bezug auf die DNA-Schädigung und -Reparaturfähigkeit gibt. Zur Untersuchung, ob allein der Kultivierungsprozess zu einer signifikanten DNA-Schädigung in den Negativkontrollen innerhalb beider Kultivierungsverfahren führte, wurden für beide Methoden multiple Testungen angewendet. Diese Testung birgt bei fehlender Anpassung des Signifikanzniveaus das Risiko der Kumulierung von Fehlern 1. Art. Eine Adjustierung des Signifikanzniveaus sollte demnach nach der Bonferroni-Korrektur erfolgen. Hierbei errechnet sich das Signifikanzniveau aus 0,05 geteilt durch die Anzahl der durchgeführten Tests. Diese Korrektur fand bei beiden durchgeführten multiplen Testungen hier Anwendung. Außerdem wurde der Mann-Whitney-U-Test als nicht

parametrischer Test zweier unabhängiger Strichproben zum statistischen Vergleich der beiden Verfahren für die Versuchsreihe im ELISA herangezogen. Auch hier erfolgte die Berechnung der exakten 2-seitigen Signifikanz mit dem Signifikanzniveau von 0,05. Die grafische Darstellung der Ergebnisse der genotoxikologischen Untersuchungen im Comet Assay und der IL-8-Konzentrationen im ELISA erfolgten in Boxplots (siehe Abbildung 14). Dargestellt werden hierbei der Median, das erste bzw. dritte Quartil, Whiskers und Ausreißerwerte. Die eigentliche Box umfasst das erste bis dritte Quartil, wobei der Medianwert durch einen horizontalen Strich markiert wird. Die Länge der Box wird als Interquartilabstand (IQA) bezeichnet. Über die Box hinaus reichenden Linien werden Whiskers genannt. Die maximale Länge entspricht das 1,5-fache des Interquartilabstandes bzw. bei geringerer Abweichung den größten bzw. kleinsten Wert. Alle Werte, die außerhalb dieses Bereichs liegen gelten als Ausreißer. Messwerte, die mehr als das 1,5-fache des Interquartilabstandes entsprechen, gelten



als leichte Ausreißer und sind im Boxplot als Kreise dargestellt. Betragen die Messwerte mehr als das 3-fache des Interquartilabstandes, gelten sie als starke Ausreißer und sind im Boxplot mit einem Sternchen markiert. Da es sich bei den Ausreiserwerten um tatsächliche abweichende Messwerte handelte, erfolgte keine Entfernung der Werte aus dem Datensatz bzw. Limitierung der Höhe der Ausreiser.

Abbildung 14: Skizze Boxplot

Die Box umfasst das erste bis dritte Quartil, wobei die Enden der Whiskers das Maximum beziehungsweise Minimum angeben. Darstellung des Medians innerhalb des Boxplots durch rot markierten horizontale Linie. Die Länge der Box entspricht dem IQA. Keine Darstellung von Ausreißerwerten.

IQA= Interquartilabstand

3. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse des Comet Assays nach genotoxikologischer Testung, des Chromosomenaberrationstests sowie der Durchflusszytometrie zum MPG-Enzymnachweis dargestellt. Außerdem werden die Resultate der Funktionsprüfung der IL-8 ELISAs nach LPS-Stimulation und die REM Aufnahmen aufgeführt. Darüber hinaus erfolgt die Darstellung der Ergebnisse der Vimentinfärbungen zur Detektion einer Fibroblastenkontamination.

3.1 DNA-Stabilität und -Regenerationsfähigkeit nach genotoxischer Einwirkung: Comet Assay

Zur Untersuchung der Zellregenerationsfähigkeit nach MMS-induzierter DNA-Schädigung wurden die dimensionslosen OTM-Werte des Comet Assays herangezogen. In beiden Methoden, Monokultur- bzw. Cokultur, wurden die OTM-Werte über drei Passagen für die Negativkontrolle, nach einstündiger 300 μ M MMS-Exposition und nach 24-stündiger Regenerationszeit bestimmt. In der direkten Zellisolation des Monokulturverfahrens erfolgte die Kultivierung im Transwell und die genotoxikologische Untersuchung bereits ab Passage null. Im Cokulturverfahren war dagegen die Kultivierung im Transwell mit nachfolgender Untersuchung im Comet Assay aufgrund des primären Zellauswachsens aus Gewebestücken erst ab der ersten Passage möglich. Die OTM-Werte wurden sowohl für die grafische als auch für die statistische Darstellung und Auswertung verwendet.

3.1.1 Monokultur

Tabelle 2: deskriptive Statistik der OTM-Werte aus dem Comet Assay der Monokultur Isolierungs- und Kultivierungsmethode

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
Negativkontrolle	39	0,4110	2,2369	0,9297	0,4387
Behandlung 1h	39	1,7090	8,4638	4,3207	1,7718
Regeneration 24h	39	0,4474	4,8652	1,7446	1,0541

Insgesamt wurden 39 Einzelversuche im Comet Assay für die Monokulturmethode untersucht. Die Mittelwerte der OTM-Werte im Comet Assay lagen bei den Positivkontrollen, Behandlung nach 1h, höher als die Werte der unbehandelten

Negativkontrolle. Außerdem zeigte sich eine größere Standardabweichung bei den OTM-Werten der Positivkontrollen, verglichen zu den Negativkontrollen.

Tabelle 3: Übersicht der verarbeiteten Fälle der Monokultur Isolierungs- und Kultivierungsmethode

	Passage	Fälle					
		Gültig		Fehlend		Gesamt	
		N	Prozent	N	Prozent	N	Prozent
Negativkontrolle	0	10	100%	0	0%	10	100%
	1	10	100%	0	0%	10	100%
	2	10	100%	0	0%	10	100%
	3	9	90%	1	10%	10	100%
Behandlung 1h	0	10	100%	0	0%	10	100%
	1	10	100%	0	0%	10	100%
	2	10	100%	0	0%	10	100%
	3	9	90%	1	10%	10	100%
Regeneration 24h	0	10	100%	0	0%	10	100%
	1	10	100%	0	0%	10	100%
	2	10	100%	0	0%	10	100%
	3	9	90%	1	10%	10	100%

Zur graphischen Darstellung und statistischen Auswertung in der direkten Isolierungs- und Kultivierungsmethode konnten bis zur zweiten Passage die OTM-Werte aller angelegten Kulturen verwendet werden. In der dritten Passage konnte ein Ansatz aus 10 aufgrund stagnierenden Wachstums nicht mehr kultiviert und somit nicht ausgewertet werden. Bei den drei fehlenden Werten der dritten Passage, Negativkontrolle, einstündige Behandlung und Regeneration nach 24 Stunden, handelt es sich um zusammenhängende Ansätze der gleichen Zellkultur eines Probanden.

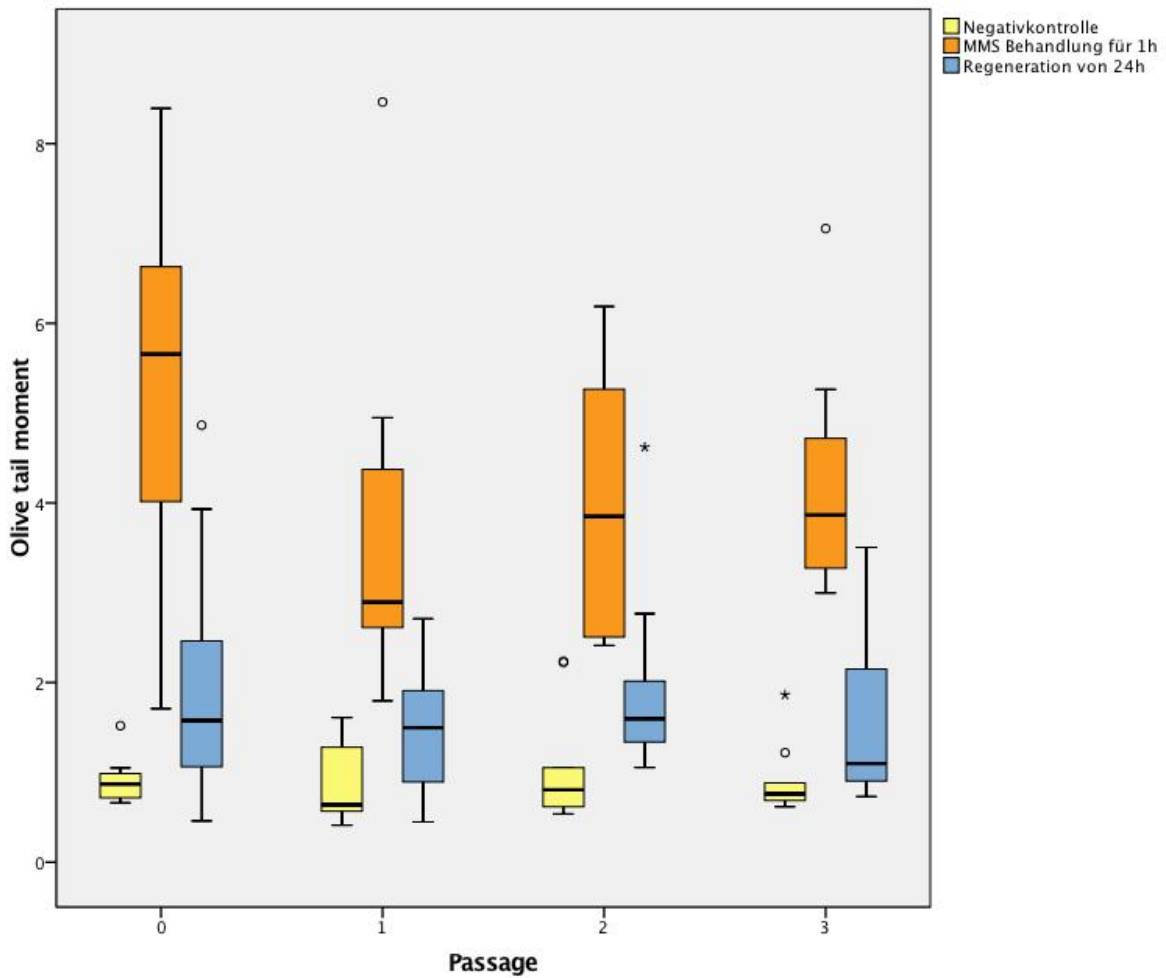


Abbildung 15: Monokultur Isolierungs- und Kultivierungsmethode über drei Passagen.

Auf der x-Achse sind die Passagen null bis drei dargestellt; auf der y-Achse wird das Ausmaß der DNA-Schädigung mittels OTM-Werten dargestellt. Pro Passage sind die drei Versuchsansätze, Negativkontrolle (gelb), Behandlung nach 1h (orange) und Regeneration nach 24h (blau) gruppiert dargestellt.

Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test verwendet. Hierbei konnte untersucht werden, ob sich die OTM-Werte der Zellen mit 24-stündiger Regenerationszeit statistisch signifikant von der Positivkontrolle (einstündige 300 μ M MMS-Exposition) bzw. von der Negativkontrolle unterschieden. Der Wilcoxon-Test wurde getrennt für jede Passage (0, 1, 2 und 3) durchgeführt.

Tabelle 4: Statistik Wilcoxon-Test Monokultur

		Schädigung 24 – Schädigung negativ	Schädigung 1 – Schädigung negativ	Schädigung 24 – Schädigung 1
0. Passage	Exakte Signifikanz	0,014	0,002	0,004
1. Passage		0,010	0,002	0,002

2. Passage	(2-seitig)	0,004	0,002	0,002
3. Passage		0,008	0,004	0,004

In allen Passagen waren die OTM-Werte nach MMS-Behandlung im Vergleich zur Negativkontrolle mit den unbehandelten Zellen signifikant erhöht. Außerdem ergaben sich für die OTM-Werte der regenerierten Zellen über alle Passagen signifikante Unterschiede zur Positiv- bzw. zur Negativkontrolle. Die Zellen zeigten nach der Regenerationszeit eine signifikant niedrigere DNA-Schädigung. Zur Klärung der Fragestellung, ob allein der Kultivierungsprozess zu einer DNA-Schädigung führte, wurden die OTM-Werte der Negativkontrolle über alle Passagen mit dem Wilcoxon-Test statistisch analysiert.

Tabelle 5: Wilcoxon-Test Negativkontrolle Monokultur

	Negativkontrolle Passage 1 - Negativkontrolle Passage 0	Negativkontrolle Passage 2 - Negativkontrolle Passage 0	Negativkontrolle Passage 3 - Negativkontrolle Passage 0
Exakte Signifikanz (2-seitig)	0,322	0,625	0,820
	Negativkontrolle Passage 2 - Negativkontrolle Passage 1	Negativkontrolle Passage 3 - Negativkontrolle Passage 2	Negativkontrolle Passage 3 - Negativkontrolle Passage 1
Exakte Signifikanz (2-seitig)	0,275	0,910	0,426

Hierbei konnte bei keinem der OTM-Werte ein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Das Signifikanzniveau nach der Bonferroni-Korrektur bei multiplen Testungen lag bei 0,83%.

3.1.2 Cokultur

Die Auswertung der OTM-Werte der Cokulturen mit Fibroblasten wurde auf gleiche Weise wie die Monokulturauswertung durchgeführt. Für die Versuchsansätze wurden allein die kultivierten Epithelzellen auf der Transwellmembran verwendet. Aufgrund der durch die Methode bedingten fehlenden nullten Passage findet man in der graphischen Darstellung der OTM-Werte der Cokultur (Abbildung 16) im Vergleich zum Monokulturverfahren (Abbildung 15) eine leere nullte Passage.

Tabelle 6: deskriptive Statistik der OTM-Werte aus dem Comet Assays der Cokultur Isolierungs- und Kultivierungsmethode

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standard-abweichung
Negativkontrolle	23	0,4814	2,4654	1,0110	0,4601
Behandlung 1h	23	2,2371	8,3454	4,1221	1,4567
Regeneration 24h	23	0,6983	3,4618	1,5286	0,7506

Insgesamt wurden für den Comet Assay des Cokulturverfahrens 23 Einzelfälle ausgewertet. Die OTM-Mittelwerte der Positivkontrollen lagen circa vierfach höher als die der Negativkontrolle. Es konnte auch in der Cokultur eine Zunahme in der Standardabweichung der OTM-Werte der behandelten Zellen festgestellt werden.

Tabelle 7: Übersicht der verarbeiteten Fälle der Cokultur Isolierungs- und Kultivierungsmethode

	Passage	Fälle					
		Gültig		Fehlend		Gesamt	
		N	Prozent	N	Prozent	N	Prozent
Negativkontrolle	1	10	100%	0	0%	10	100%
	2	8	80%	2	20%	10	100%
	3	5	50%	5	50%	10	100%
Behandlung 1h	1	10	100%	0	0%	10	100%
	2	8	80%	2	20%	10	100%
	3	5	50%	5	50%	10	100%
Regeneration 24h	1	10	100%	0	0%	10	100%
	2	8	80%	2	20%	10	100%
	3	5	50%	5	50%	10	100%

Während in der ersten Passage noch alle Zellen kultiviert werden konnten, waren es in der zweiten Passage nur noch 8 aus 10 und in der dritten Passage 5 aus 10 Ansätzen. Bei den fehlenden Werten der zweiten und dritten Passage handelt es sich jeweils um die drei zusammenhängenden Versuchsansätze, Negativkontrolle, einstündige Behandlung, Regeneration nach 24 Stunden, eines Probanden. In den fünf fehlenden Werten der dritten Passage sind die zwei Probanden der fehlenden Werte der zweiten Passage ebenso enthalten.

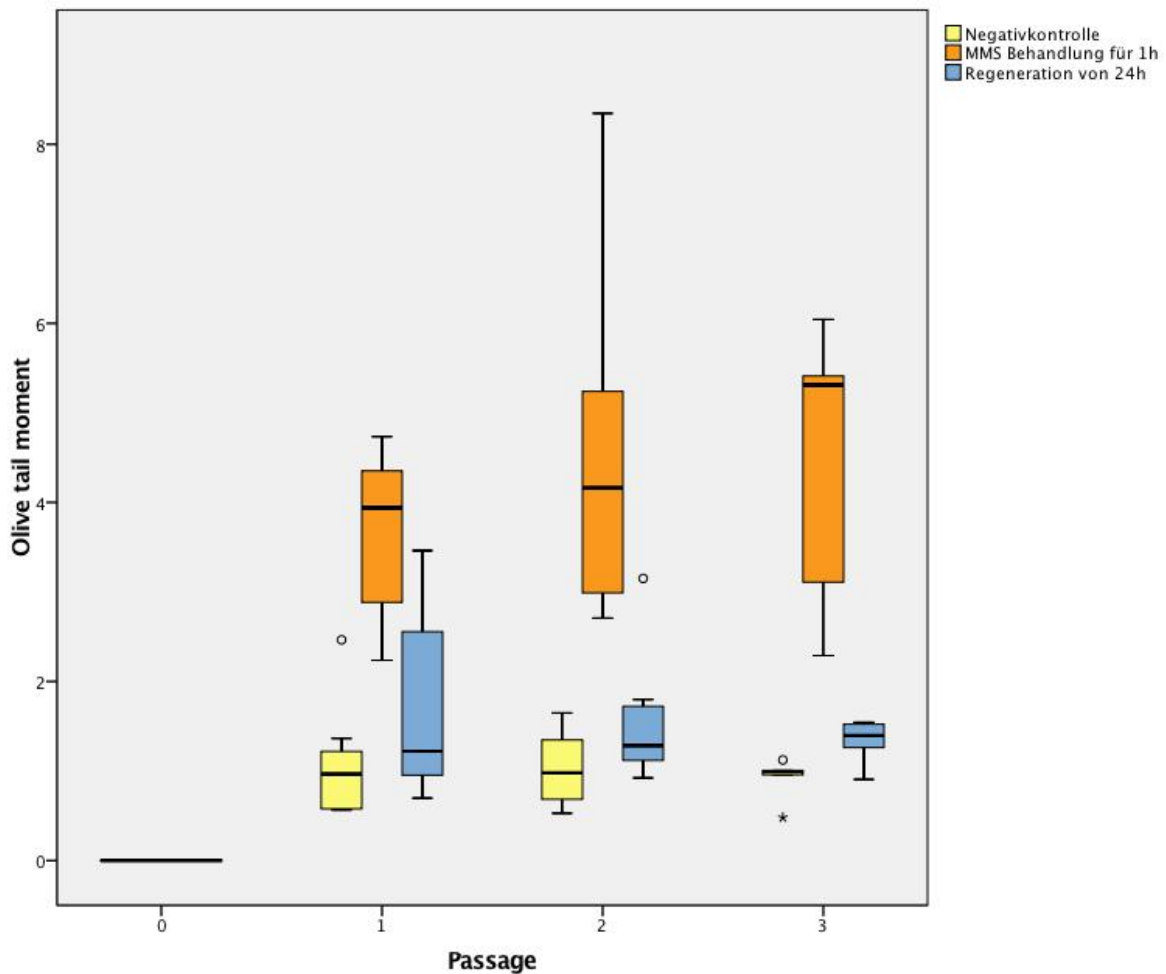


Abbildung 16: Cokultur Isolierungs- und Kultivierungsmethode über drei Passagen.

Auf der x-Achse sind die erste bis dritte Passage dargestellt; auf der y-Achse wird das Ausmaß der DNA-Schädigung mittels OTM-Wert dargestellt. Pro Passage sind die drei Versuchsansätze Negativkontrolle (gelb), Behandlung nach 1h (orange) und Regeneration nach 24h (blau) gruppiert dargestellt.

Im nachfolgenden Wilcoxon-Test wurde wiederum die exakte 2-seitige Signifikanz der OTM-Werte nach der Regenerationszeit zur Positiv- bzw. zur Negativkontrolle untersucht.

Tabelle 8: Statistik Wilcoxon-Test Cokultur

		Schädigung 24 – Schädigung negativ	Schädigung 1 – Schädigung negativ	Schädigung 24 – Schädigung 1
1. Passage	exakte Signifikanz (2-seitig)	0,014	0,002	0,002
2. Passage		0,078	0,008	0,008
3. Passage		0,063	0,063	0,063

In der ersten und zweiten Passage konnte ein signifikanter Anstieg der OTM-Werte nach MMS-Behandlung im Vergleich zur Negativkontrolle nachgewiesen werden. Im Wilcoxon-Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied der OTM-Werte der regenerierten Zellen zur Positiv- bzw. Negativkontrolle in der ersten Passage. In der zweiten Passage unterschieden sich die OTM-Werte der regenerierten Zellen nicht signifikant zur Negativkontrolle der unbehandelten Zellen, in der Tabelle dick markiert, jedoch zur Positivkontrolle nach einstündiger MMS-Behandlung. In der dritten Passage unterschieden sich die OTM-Werte in allen Ansätzen nicht signifikant, in der Tabelle dick markiert.

Zur Untersuchung ob allein der Kultivierungsprozess zu einer DNA-Schädigung führte, wurden die OTM-Werte der Negativkontrolle über alle Passagen mittels Wilcoxon-Test statistisch analysiert.

Tabelle 9: Wilcoxon-Test Negativkontrolle Cokultur

	Negativkontrolle Passage 2 – Negativkontrolle Passage 1	Negativkontrolle Passage 3 – Negativkontrolle Passage 2	Negativkontrolle Passage 3 – Negativkontrolle Passage 1
Exakte Signifikanz (2-seitig)	0,547	0,813	0,313

Auch bei der statistischen Analyse der OTM-Werte der Negativkontrollen in der Cokultur konnte keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden. Das Signifikanzniveau nach der Bonferroni-Korrektur bei multiplen Testungen lag bei 1,6%.

3.1.3 Vergleichende Analyse der Mono- bzw. Cokultur

Zum Vergleich der OTM-Werte der Mono- mit der Cokultur wurde der Wilcoxon Test angewendet. Hierbei wurden jeweils die Negativkontrolle, die Schädigungswerte nach einstündiger MMS-Behandlung und nach 24-stündiger Regenerationszeit beider Methoden auf die statistische Tendenz untersucht. Der Test wurde getrennt für alle Passagen durchgeführt. Da in der Cokultur die 0. Passage fehlt, ist in dieser Passage kein Vergleich zwischen beiden Methoden möglich.

Tabelle 10: Wilcoxon-Test zum Vergleich beider Methoden

	Schädigung negativ	Schädigung 1	Schädigung 24
Statistik für 1. Passage			
Exakte Signifikanz (2-seitig)	0,322	0,625	0,695
Statistik für 2. Passage			
Exakte Signifikanz (2-seitig)	0,844	0,313	0,195
Statistik für 3. Passage			
Exakte Signifikanz (2-seitig)	0,813	0,313	0,438

Bei den untersuchten OTM-Werten (Schädigung Negativ, 1h, 24h) wird die Nullhypothese „die Verteilung der Schädigungswerte ist über die Kategorien Methode, Monokultur und Cokultur, identisch“ beibehalten, da mittels Wilcoxon-Test kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Verfahren nachgewiesen werden konnte.

3.2 Chromosomenstabilität innerhalb des Kultivierungsprozesses: Chromosomenaberrationstest

Nachfolgend werden die Ergebnisse der durchgeführten Chromosomenaberrationsteste der unbehandelten Zellen über 3 Passagen beider Methoden dargestellt.

3.2.1 Monokultur

Zur Auswertung der Ergebnisse im Chromosomenaberrationstest wurden die Häufigkeiten der Kategorien „nicht auswertbar“, „unauffällig in 25 Mitosen“, „unauffällig in <25 Mitosen“, „Nachweis eines Bruchs“ tabellarisch analysiert und graphisch dargestellt. Sowohl in Passage null, als auch in Passage zwei und drei konnten Chromatid- bzw. Chromosomenbrüche nachgewiesen werden. Über alle Passagen hinweg war ein Teil der Objektträger nicht auswertbar bzw. weniger als 25 Mitosen analysierbar.

Tabelle 11: Häufigkeiten Chromosomenaberrationstest Monokultur

	Häufigkeit (Prozent)			
	0. Passage	1. Passage	2. Passage	3. Passage
nicht auswertbar	3 (30)	5 (50)	2 (20)	4 (40)
unauffällig	4 (40)	2 (20)	4 (40)	4 (40)
Bruch	2 (20) ¹	0 (0)	2 (20) ²	1 (10) ³

unauffällig in <25 Mitosen	1 (10)	3 (30)	2 (20)	1 (10)
Gesamt	10 (100)	10 (100)	10 (100)	10 (100)

¹Bei den zwei nachgewiesenen Brüchen handelte es sich jeweils um Chromatidbrüche (13p und 5)

²Bei den zwei nachgewiesenen Brüchen handelte es sich jeweils um Chromosomenbrüche (13q, x)

³Bei dem nachgewiesenen Bruch handelte es sich um einen Chromosomenbruch (Zuordnung des Chromosoms nicht sicher möglich)

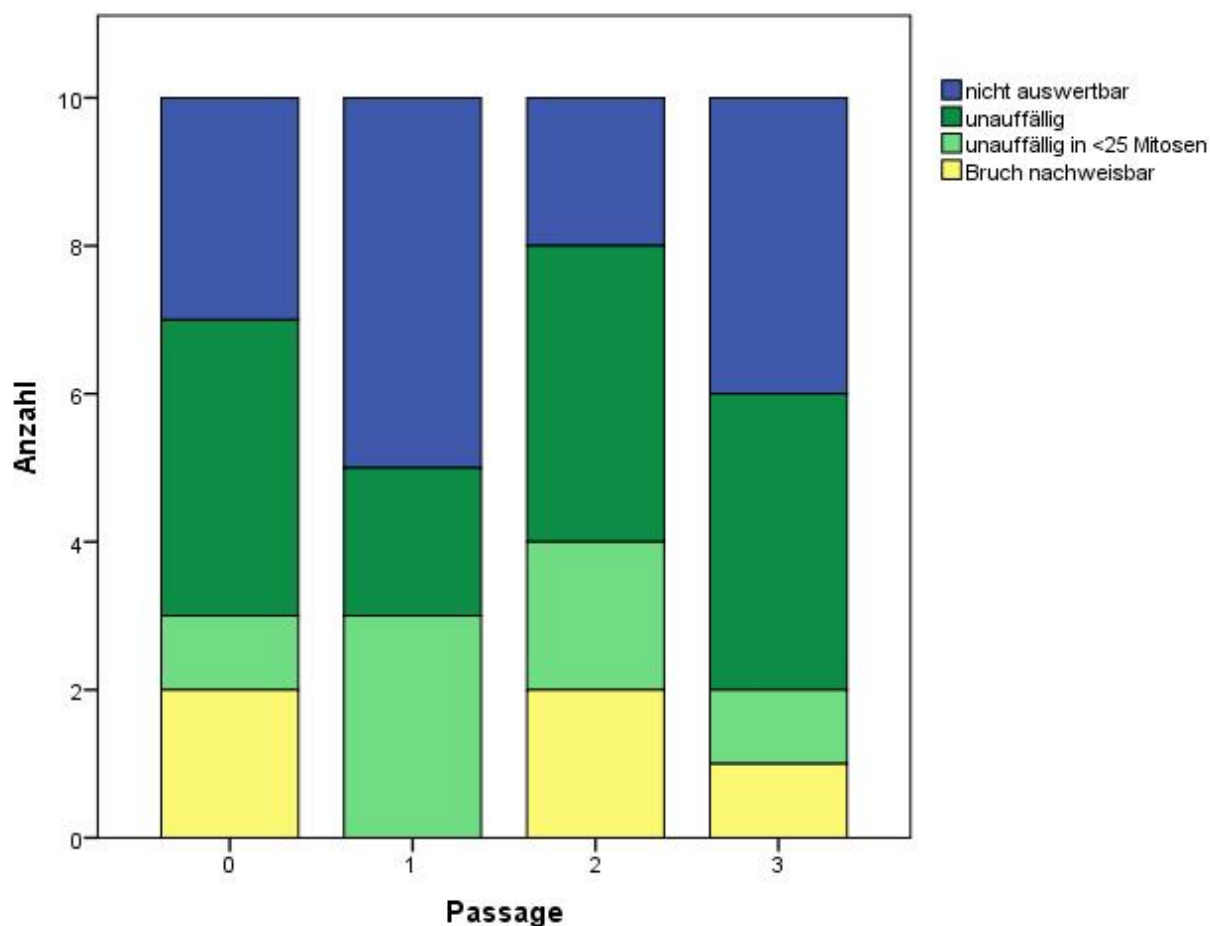


Abbildung 17: grafische Darstellung der Häufigkeiten im Chromosomenaberrationstest über drei Passagen in der Monokultur Methode. Auf der x-Achse sind die nullte bis dritte Passagen untergliedert; auf der y-Achse numerisch die Häufigkeiten der Kategorien. Unterschieden werden die Häufigkeiten der Kategorien nicht auswertbar (blau), unauffällig (dunkelgrün), unauffällig in <25 Mitosen (hellgrün) und nachweisbarer Bruch (gelb).

3.2.2 Cokultur

Zur Auswertung der Ergebnisse im Chromosomenaberrationstest der Cokultur wurden ebenfalls die Häufigkeiten der Kategorien „nicht auswertbar“, „unauffällig in 25 Mitosen“, „unauffällig in <25 Mitosen“, „Nachweis eines Bruchs“ analysiert und nachfolgend in einer Grafik veranschaulicht. Durch die fehlende nullte Passage des

Verfahrens wurde die Säule dieser Passage als nicht auswertbar dargestellt (siehe Abbildung 18). Im durchgeführten Versuchsansatz konnten in der ersten und zweiten Passage Chromosomenbrüche nachgewiesen werden. Ebenso wie in den Versuchsansätzen des Monokultur Verfahrens war ein großer Anteil der Objektträger nicht auswertbar bzw. nur in weniger als 25 Mitosen bewertbar. Hier zeigte sich jedoch ein deutlicher stufenweiser Anstieg der nicht auswertbaren Objektträger im Laufe der Passagen (siehe Abbildung 18 blaue Säule).

Tabelle 12: Häufigkeiten Chromosomenaberrationstest Cokultur

	Häufigkeit (Prozent)		
	1. Passage	2. Passage	3. Passage
nicht auswertbar	2 (20)	3 (30)	7 (70)
unauffällig	3 (30)	4 (40)	1 (10)
Bruch	1 (10) ¹	1 (10) ²	0 (0)
unauffällig in <25 Mitosen	4 (40)	2 (20)	20 (20)
Gesamt	10 (100)	10 (100)	10 (100)

¹ Im nachgewiesenen Bruch handelte es sich um einen Chromosomenbruch (Zuordnung des Chromosoms nicht sicher möglich)

² Im nachgewiesenen Bruch handelte es sich um einen Chromosomenbruch (8q)

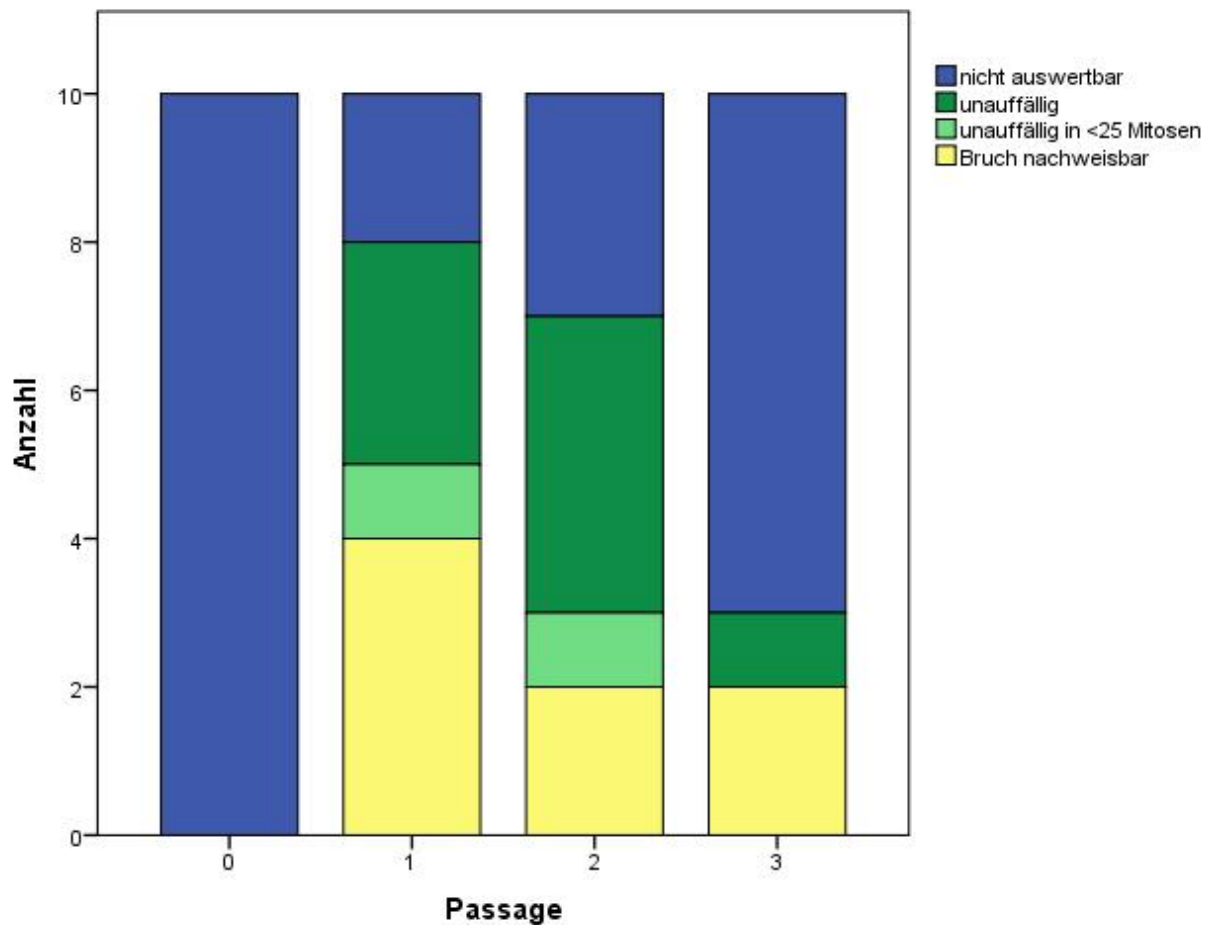


Abbildung 18: grafische Darstellung der Häufigkeiten im Chromosomenaberrationstest über drei Passagen der Epithelzellen in der Cokultur Methode.

Auf der x-Achse sind die nullte bis dritte Passagen untergliedert; auf der y-Achse numerisch die Häufigkeiten der Kategorien. Unterschieden werden die Häufigkeiten der Kategorien nicht auswertbar (blau), unauffällig (dunkelgrün), unauffällig in <25 Mitosen (hellgrün) und nachweisbarer Bruch (gelb).

3.3 Funktionsfähigkeit der Zellkulturmodelle: IL-8 ELISA

Im Folgenden werden die Ergebnisse des IL-8 ELISA nach LPS-Stimulation für beide Kulturen dargestellt. Hierbei wurden, wie in Abschnitt 2 beschrieben, jeweils für beide Methoden 10 Versuchsansätze in der jeweils niedrigsten Passage (d. h. Monokultur: Passage null, Cokultur: Passage eins) verwendet. Dabei wurde die IL-8-Konzentration in pg/ml aus dem Überstand nach 1µg/ml und 10µg/ml LPS-Stimulation sowie von unbehandelten Zellen erfasst. Die grafische Darstellung erfolgte für beide Methoden mit Boxplots.

3.3.1 Monokultur

Tabelle 13: deskriptive Statistik IL-8 ELISA Monokultur

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standard-abweichung
Negativ	10	0,0000	160,8929	49,0090	55,9497
1µg/ml LPS	10	0,0000	285,5357	161,359	107,7443
10µg/ml LPS	10	140,8929	955,1786	510,8333	302,3301

Nach Behandlung der Zellen mit 1µg/ml LPS konnte ein Anstieg der IL-8-Konzentration im Überstand registriert werden. Nach Behandlung mit 10 µg/ml LPS stieg der IL-8-Konzentrationsmittelwert im Vergleich zur Negativkontrolle auf circa das Zehnfache an.

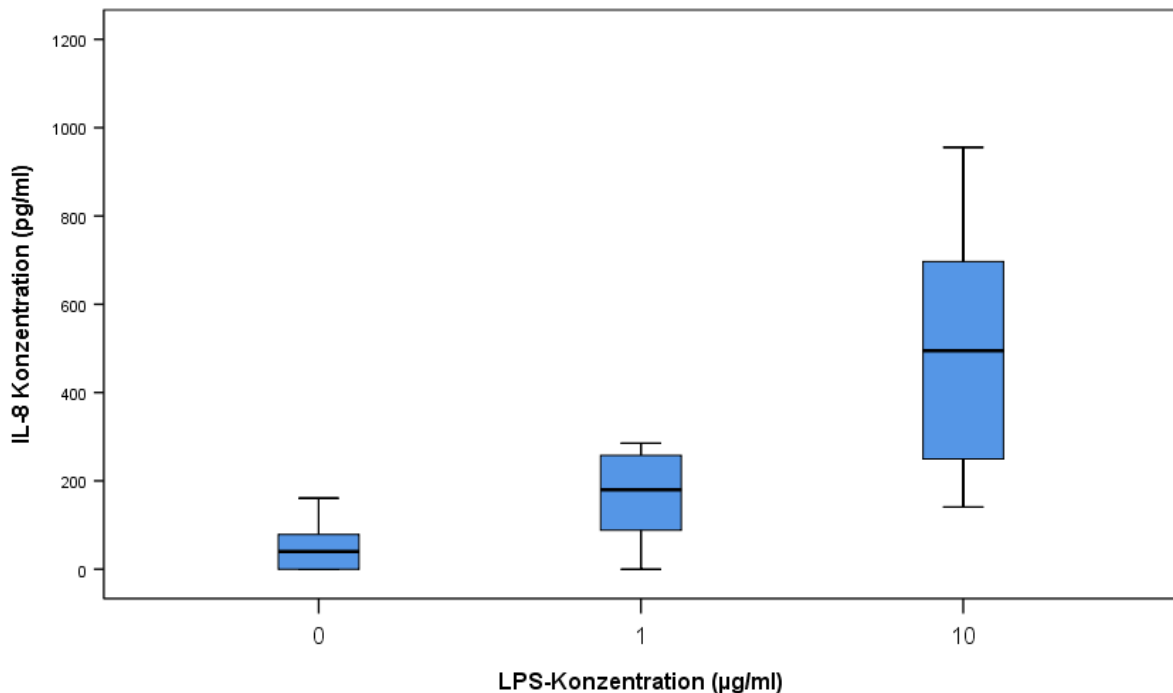


Abbildung 19: Interleukin-8-Konzentrationen, gemessen im Überstand der Monokultur in der nullten Passage unbehandelt und nach LPS-Stimulation (1µg/ml bzw. 10µg/ml). Auf der x-Achse sind die drei Versuchsansätze dargestellt; auf der y-Achse die IL-8-Konzentrationen zwischen null bis 1200 pg/ml.

Zur Untersuchung der statistischen Signifikanz der IL-8-Konzentrationen nach LPS-Stimulation im Vergleich zur Negativkontrolle wurde der Wilcoxon-Test verwendet.

Tabelle 14: Wilcoxon-Test ELISA Monokultur

	Stimulation 1 – Negativ	Stimulation 10 – Negativ
Exakte Signifikanz (2-seitig)	0,008	0,002

Die IL-8-Konzentration der untersuchten Monokulturzellen nach einstündiger Stimulation mit 10 µg/ml und nachfolgender 24-stündiger Ruhezeit unterschied sich signifikant zu der IL-8-Konzentration der unbehandelten Zellen, berechnet für die exakte 2-seitige Signifikanz. Nach Stimulation mit 1µg/ml LPS und 24-stündiger Ruhezeit konnte ebenfalls ein signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle festgestellt werden.

3.3.2 Cokultur

Der gleiche Versuchsaufbau wurde ebenfalls für die Cokultur angewendet. Im ersten Versuchsansatz der Cokultur wurden die IL-8-Konzentrationen nach Stimulation beider Kompartimente der Zellkultur im Air-Liquid Interface gemessen, d. h. die Epithelzellen mit basolateralen Fibroblasten.

Tabelle 15: deskriptive Statistik IL-8 ELISA Cokultur

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standard-abweichung
Negativ	10	105,5357	445,1786	294,1747	151,8208
1µg/ml LPS	10	205,5357	892,9615	451,6203	237,9702
10µg/ml LPS	10	342,6786	1111,4230	713,8286	244,8276

Auch in diesem Versuchsansatz zeigte sich ein Anstieg der IL-8-Konzentration nach Behandlung mit 1µg/ml LPS. Nach Behandlung mit 10µg/ml LPS stieg der Mittelwert der IL-8-Konzentrationen auf circa das 2,5-fache der Negativkontrolle an.

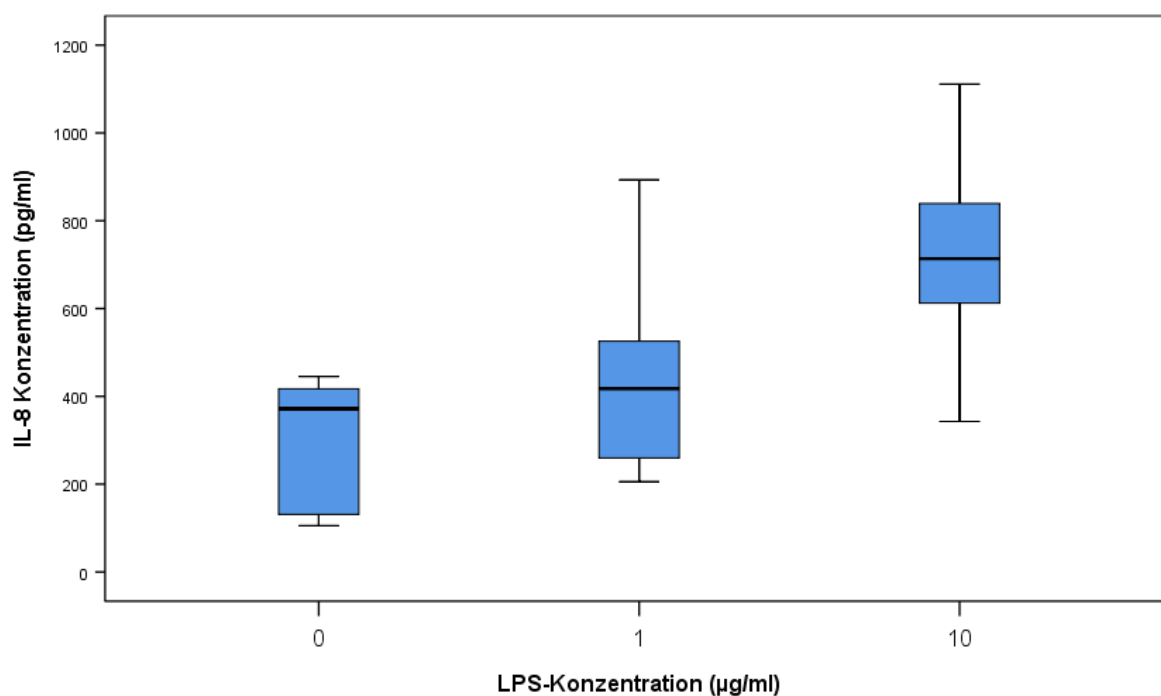


Abbildung 20: Interleukin-8-Konzentration im Überstand der Cokultur (Fibroblasten und Epithelzellen) in der ersten Passage unbehandelt und nach LPS-Stimulation (1µg/ml bzw. 10µg/ml). Auf der x-Achse sind die drei Versuchsansätze dargestellt; auf der y-Achse die IL-8-Konzentrationen zwischen null bis 1200 pg/ml.

Die Überprüfung der statistischen Signifikanz zwischen den IL-8-Konzentrationen im Überstand der stimulierten und der unstimulierten Zellen wurde ebenfalls mit dem Wilcoxon-Test überprüft.

Tabelle 16: Wilcoxon-Test ELISA Cokultur (Fibroblasten und Epithelzellen)

	Stimulation 1 - Negativ	Stimulation 10 - Negativ
Exakte Signifikanz (2-seitig)	0,084	0,010

Die erfassten IL-8-Konzentrationen unterschieden sich für die Stimulation mit 1µg/ml LPS-Konzentration nicht signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Nach Stimulation mit 10µg/ml konnte ein signifikanter Unterschied der IL-8-Konzentration im Vergleich zu Negativkontrolle festgestellt werden.

3.3.3 Vergleich IL-8 ELISA: Mono- und Cokultur

Zum statistischen Vergleich der in beiden Kulturmodellen gemessenen IL-8-Konzentrationen der drei verwendeten Versuchsansätzen (negativ, Stimulation mit 1 µg/ml LPS bzw. 10 µg/ml LPS) wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet.

Tabelle 17: Mann-Whitney-U-Test zum Vergleich beider Methoden

	Negativ	Stimulation 1	Stimulation 10
Mann-Whitney-U	6,000	11,000	29,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	0,000	0,002	0,123

Hierbei konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den IL-8-Konzentrationen der Negativkontrollen und nach Stimulation mit 1µg/ml LPS zwischen den beiden Methoden nachgewiesen werden. Bei der Zellstimulation mit 10µg/ml LPS konnte kein statistisch signifikanter Unterschied mit dem Mann-Whitney-U-Test gezeigt werden.

3.3.4 Getrennte Analyse der Epithelzellen bzw. Fibroblasten der Cokultur

Nachfolgend erfolgte im zweiten Versuchsansatz der Cokultur eine getrennte Stimulation der Epithelzellen und Fibroblasten nach vorheriger Cokultivierung im Air-Liquid Interface.

Tabelle 18: deskriptive Statistik IL-8 ELISA: Epithelzellen der Cokultur

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
Negativ	10	0,0000	335,2414	157,0207	122,9235
1µg/ml LPS	10	5,5862	511,4483	201,7931	198,1283
10µg/ml LPS	10	51,4483	774,5517	356,8966	268,5914

Der IL-8-Mittelwert im Überstand der Epithelzellen aus der Cokultur stieg nach 10µg/ml LPS-Behandlung um mehr als das Doppelte im Vergleich zur Negativkontrolle an.

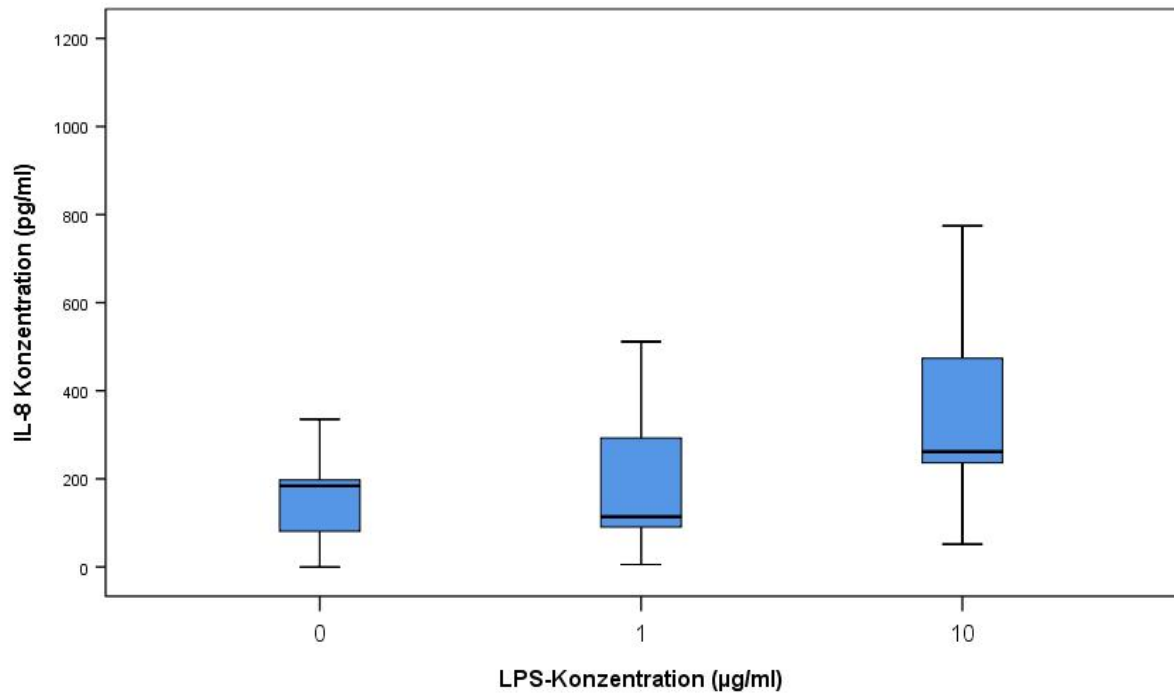


Abbildung 21: Interleukin-8-Konzentration im Überstand der Epithelzellen in der Cokultur in der ersten Passage unbehandelt und nach LPS-Stimulation (1µg/ml bzw. 10µg/ml). Auf der x-Achse sind die drei Versuchsansätze dargestellt; auf der y-Achse die IL-8-Konzentrationen zwischen null bis 1200 pg/ml.

Tabelle 19: deskriptive Statistik IL-8 ELISA: Fibroblasten der Cokultur

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standard-abweichung
Negativ	10	14,2069	389,7241	185,2069	147,8304
1µg/ml LPS	10	0,0000	573,8621	229,0276	235,5077
10µg/ml LPS	10	85,2414	783,5172	398,5172	252,811

Nach Behandlung der Fibroblasten stieg die IL-8-Konzentration sichtbar an. Bei der verwendeten Höchstkonzentration von 10µg/ml LPS war der IL-8-Mittelwert circa zweifach erhöht im Vergleich zu den unbehandelten Zellen.

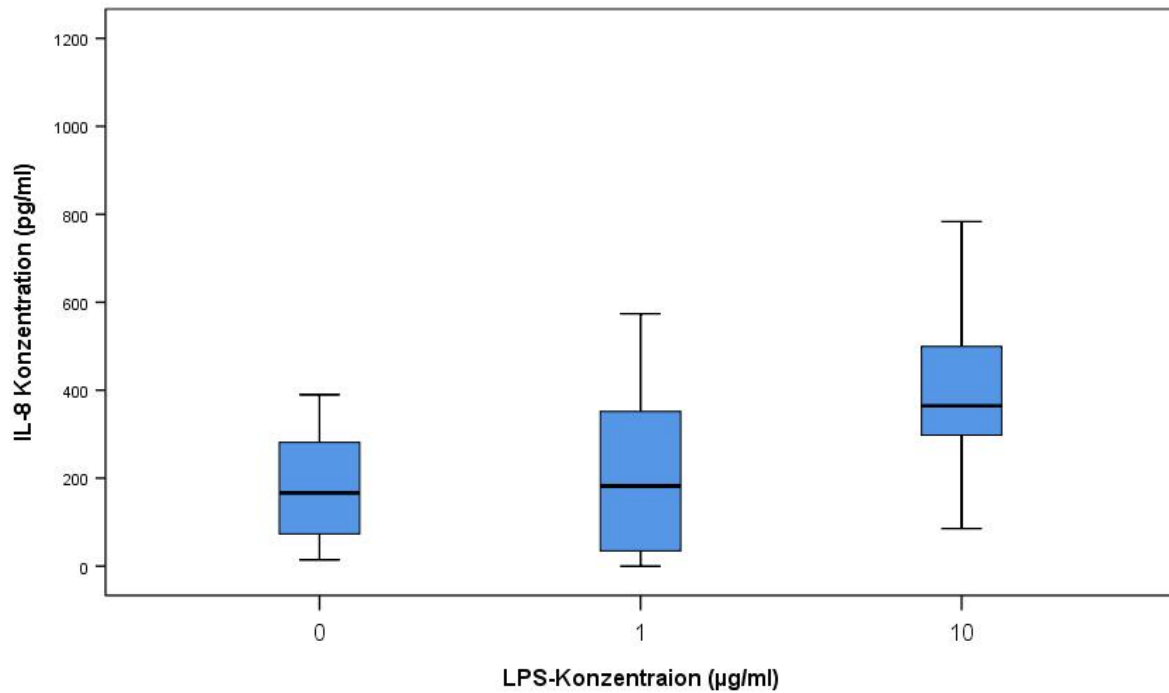


Abbildung 22: Interleukin-8-Konzentration im Überstand der Fibroblasten in der Cokultur in der ersten Passage unbehandelt und nach LPS-Stimulation (1µg/ml bzw. 10µg/ml). Auf der x-Achse sind die drei Versuchsansätze dargestellt; auf der y-Achse die IL-8-Konzentrationen zwischen null bis 1200 pg/ml.

Zur Untersuchung der statistischen Tendenz zwischen den IL-8-Konzentrationen der stimulierten Zellen und der Negativkontrolle wurde der Wilcoxon-Test getrennt für die Epithelzellen und Fibroblasten der Cokultur durchgeführt.

1. Epithelzellen:

Tabelle 20: Wilcoxon-Test Epithelzellen Cokultur

	Stimulation 1 – Negativ	Stimulation 10 – Negativ
Exakte Signifikanz (2-seitig)	0,105	0,002

2. Fibroblasten:

Tabelle 21: Wilcoxon-Test Fibroblasten Cokultur

	Stimulation 1 – Negativ	Stimulation 10 – Negativ
Exakte Signifikanz (2-seitig)	0,232	0,002

Bei beiden Zelltypen der Cokultur konnte ein signifikanter Anstieg der IL-8-Konzentration nach Stimulation mit 10µg/ml LPS, jedoch nicht für 1µg/ml LPS mit dem Wilcoxon-Test nachgewiesen werden.

3.3.5 Vergleich IL-8 ELISA: Epithelzelle und Fibroblasten der Cokultur

Zum Vergleich der IL-8-Konzentrationen im Überstand der Epithelzellen und Fibroblasten im getrennten Versuchsansatz wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet.

Tabelle 22: Mann-Whitney-U-Test zum Vergleich beider Zelltypen der Cokultur

	Negativ	Stimulation 1	Stimulation 10
Mann-Whitney-U	46,000	47,000	39,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	0,779	0,853	0,424

Hierbei konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der IL-8-Konzentration im Überstand der beiden Zelltypen nachgewiesen werden.

3.4 Durchflusszytometrie: enzymatischer Nachweis der Basenexzisionsreparatur

In der Durchflusszytometrie konnte als einmaliger Versuchsaufbau das Enzym Methylpuringlykosylase (MPG) als Teil der Basenexzisionsreparatur in den Nasenschleimhautkulturen nachgewiesen werden. Dieser Mechanismus ist entscheidend an der Reparatur MMS-induzierter DNA-Schädigungen beteiligt. Detaillierte Angaben über den prozentualen Anteil der Zellen konnten aufgrund der geringen Fallzahl nicht getroffen werden.

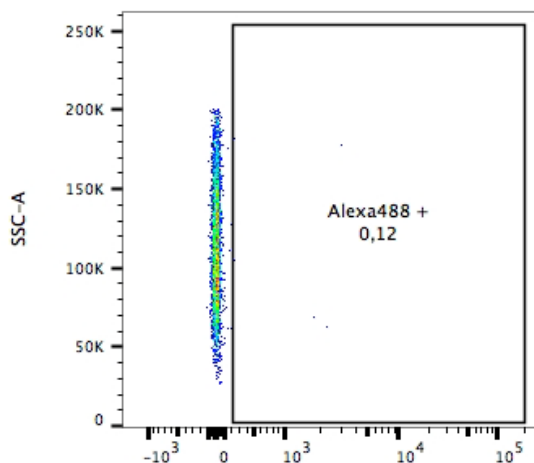


Abbildung 23: Durchflusszytometrie: Negativkontrolle der Epithelzellen ohne Anti-MPG, SSC= side scatter auf der y-Achse, Fluoreszenzintensitätsmessung auf der x-Achse

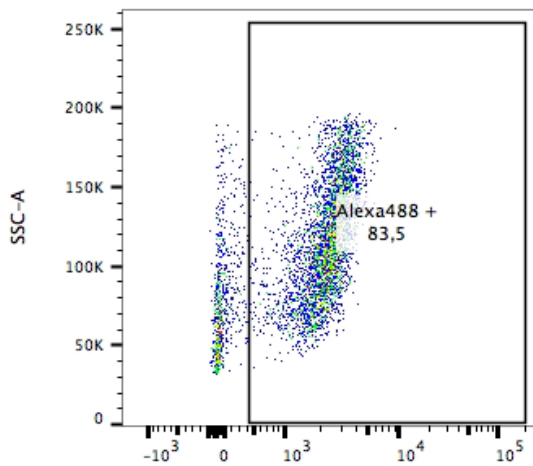


Abbildung 24: Durchflusszytometrie der Epithelzellen mit Anti-MPG und Alexa Fluor® 488,

SSC= side scatter auf der y-Achse, Fluoreszenzintensitätsmessung auf der x-Achse

3.5 Vimentinfärbung: Fibroblastennachweis in der Monokultur

Mit der Vimentin- und DAPI-Zellkernfärbung konnten in der Monokultur Isolierungs- und Kultivierungsmethode ab der nullten Passage Vimentin-positive Zellen nachgewiesen werden. Die Kontamination stieg darüber hinaus mit der Höhe der Passage an. In allen Versuchsansätzen wurden Fibroblasten Reinkulturen als Positivkontrolle der gelungenen Färbung verwendet. Morphologisch zeigten die Fibroblasten der Positivkontrolle einen typischen spindelförmigen Charakter. In den Vimentinfärbungen über drei Passagen der Monokultur erschienen die Vimentin-positiven Zellen breiter und ovalförmig.

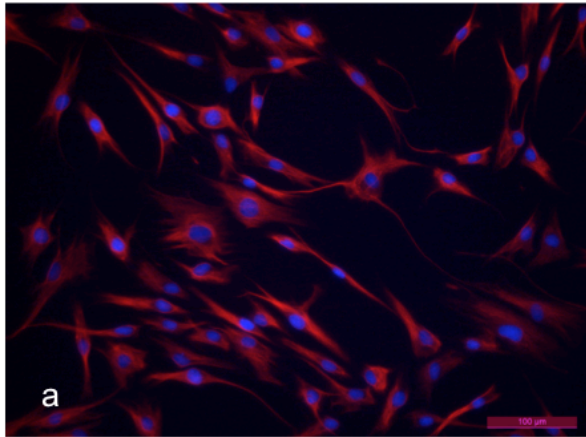
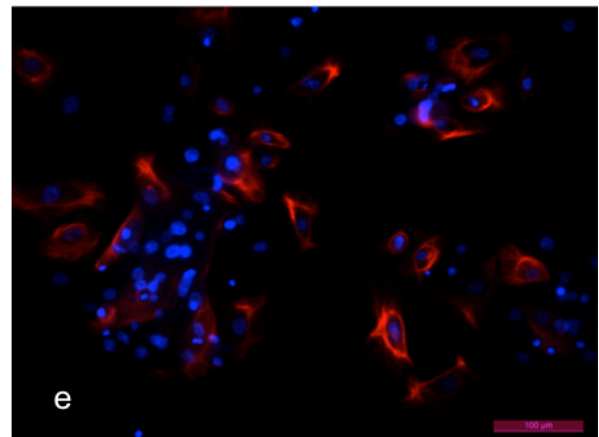
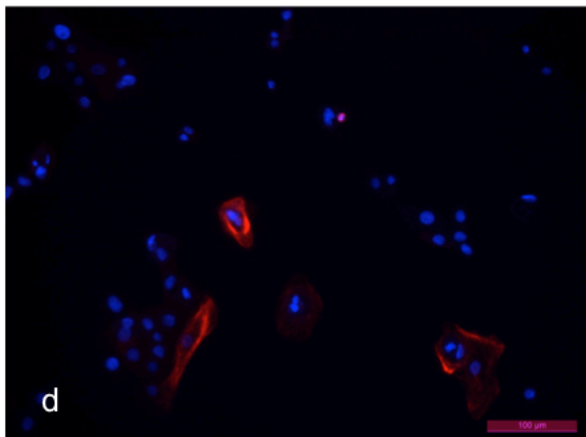
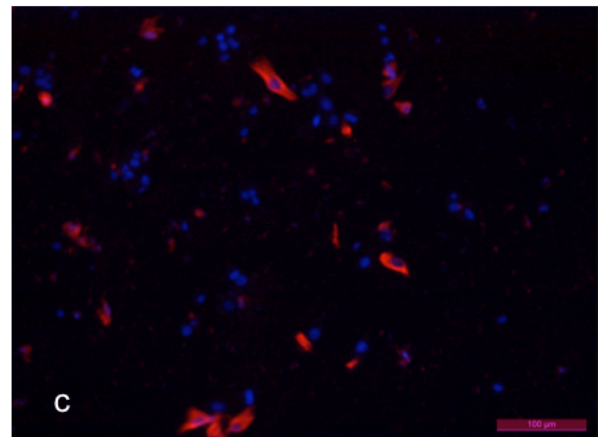
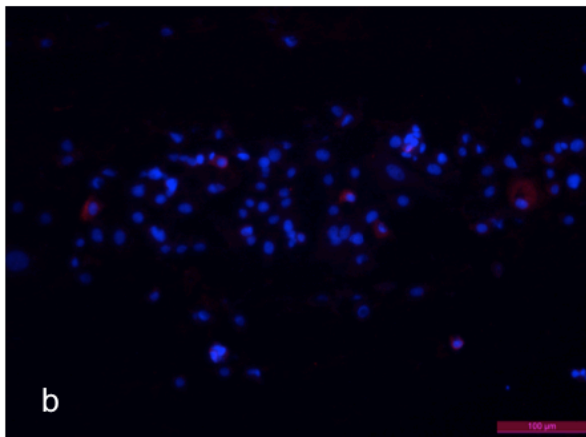


Abbildung 25: Vimentinfärbung zum Fibroblastennachweis in der Monokultur Isolierungs- und Kultivierungsmethode über drei Passagen

Verwendete Färbung: DAPI (blau) zur Zellkernfärbung, Vimentin (erster Antikörper) mit AlexaFluor® 555 (zweiter Antikörper, rot) zum Fibroblastennachweis

a: je Passage wurde eine Reinkultur Fibroblasten als Positivkontrolle verwendet, b: nullte Passage, c: erste Passage, d: zweite Passage, e: dritte Passage



3.6 Kinoziliennachweis: Rasterelektronenmikroskopie

Zur Begutachtung der Oberflächenstrukturen der Nasenschleimhautkulturen im Transwell System wurden rasterelektronenmikroskopische Bilder aufgenommen (siehe Abbildung 26). Hierbei konnten in beiden Methoden ein Bürstensaum aus Mikrovilli nachgewiesen werden, diese könnten auch beginnende Zilienentwicklungen darstellen.

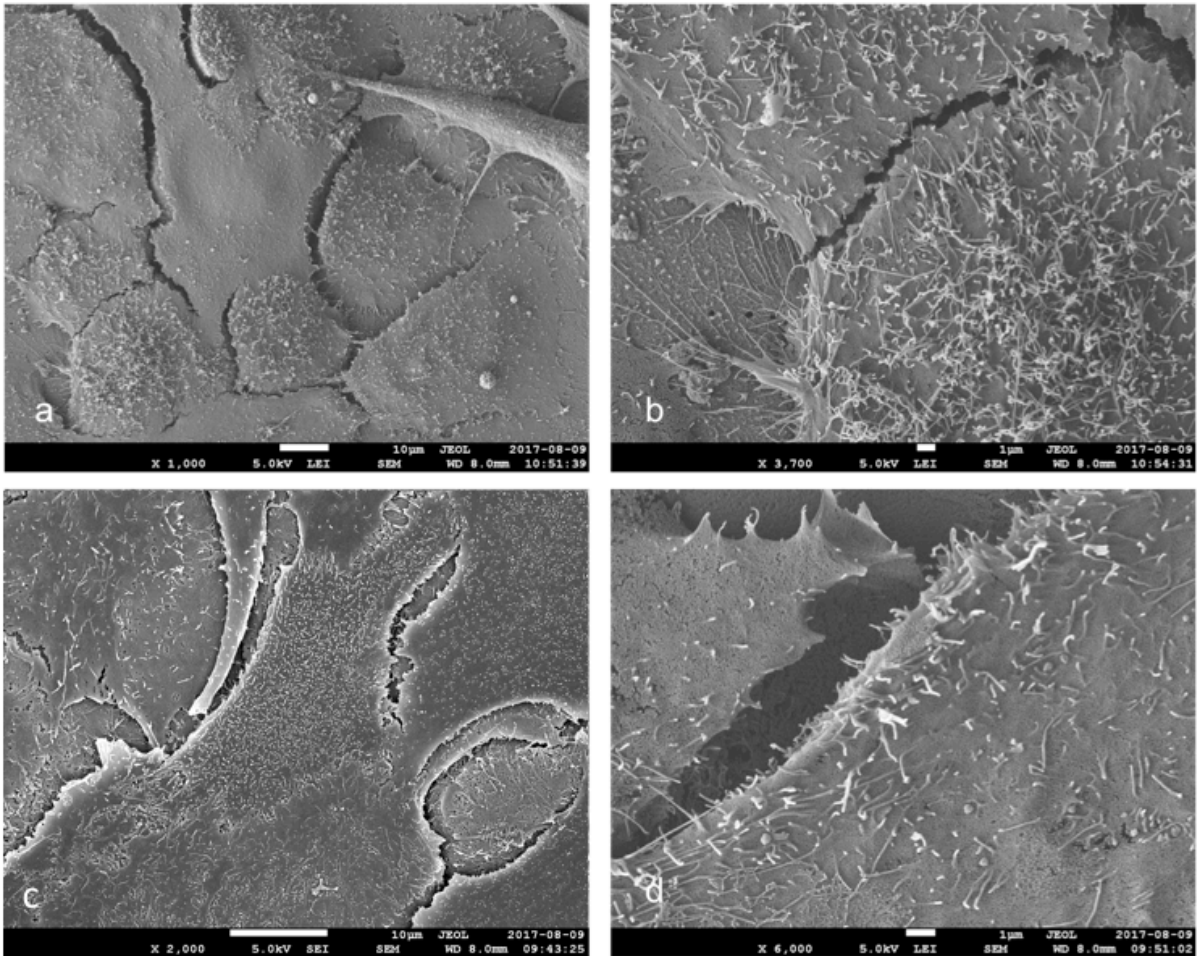


Abbildung 26: REM Aufnahmen zum Nachweis der Ausbildung von ziliären Strukturen in der jeweils ersten Kultivierungspassage (Monokultur: Passage 0, Cokultur: Passage 1); a-b: Monokultur; c-d: Cokultur. In der Übersichtsaufnahme a (1.000fache Vergrößerung) der Monokultur sind polymorphe Epithelzellen und mutmaßlich ein länglich geformter Fibroblast mit irregulären Zellfortsätzen am rechten oberen Rand der Aufnahme erkennbar. Während einige Zellen bereits eine dichtere Oberflächenstruktur ausgebildet haben, erscheint die Oberfläche der mittig angeordneten Zellen eher glatt ohne ausgebildete Oberflächendifferenzierung. In der Nahaufnahme b (3.700fache Vergrößerung) der Monokultur sind offenbar beginnende ziliäre Strukturen an zwei angrenzenden Zellen erkennbar. Hierbei könnte es sich jedoch auch um einen Mikrovilli Bürstensaum handeln. Auch in der Übersichtsaufnahme c (2.000fache Vergrößerung) der Cokultur sind beginnende Oberflächendifferenzierung an polymorph geformten Zellen erkennbar, welche jedoch in ihrer Dichte und Länge variieren. In der Nahaufnahme d (6.000fache Vergrößerung) lassen sich ein Mikrovilli-Bürstensaum an zwei angrenzenden Zellen darstellen.

In der Arbeitsgruppe konnte exemplarisch nach dreiwöchiger Kultivierung der Epithelzellen im Air-Liquid Interface Zilien nachgewiesen werden (siehe Abbildung 27).

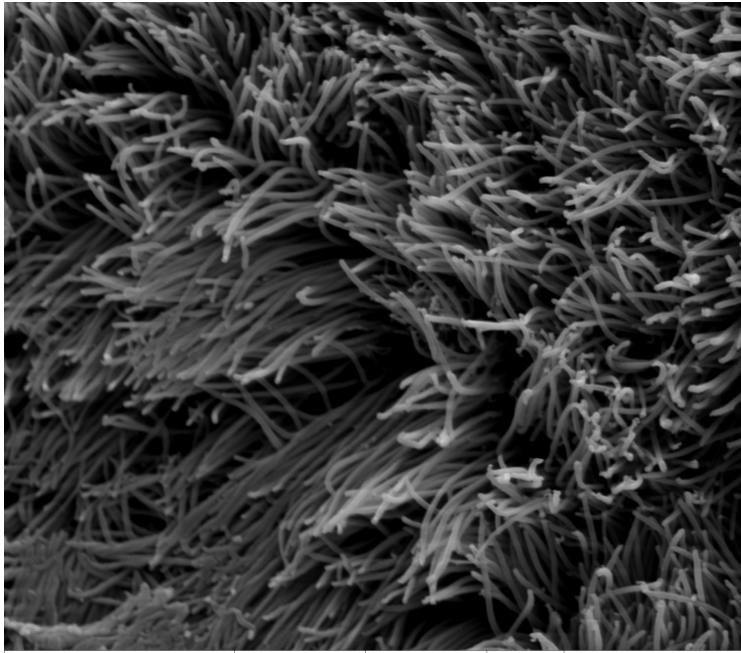


Abbildung 27: REM Aufnahme zum Nachweis von dichtem Flimmerepithel.

5.000fache Vergrößerung: Die Aufnahmen erfolgten nach dreiwöchiger Kultivierung der Epithelzellen in der Monokultur im Air-Liquid Interface.

Beschleunigungsspannung	Arbeitsabstand	Vergrößerung	Präparat	
15 kV	7 mm	5000 x	MOC	—5 µm—

3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend zeigte sich in der genotoxikologischen Versuchsreihe des Comet Assays für beide Kulturmethode über drei Passagen, bis auf die dritte Passage der Cokultur, eine signifikante 24 Stunden-Regenerationsfähigkeit nach MMS-Exposition. Die OTM-Werte der Zellen nach der Regenerationszeit unterschieden sich in der Monokultur statistisch signifikant zur Negativkontrolle über alle Passagen hinweg. In der Cokultur zeigten die Zellen der ersten Passage nach der Regenerationszeit ebenfalls signifikant unterschiedliche OTM-Werte im Vergleich zur Negativkontrolle, jedoch nicht in der zweiten und dritten Passage. Im Vergleich beider Methoden ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede der OTM-Werte der Negativkontrollen im Wilcoxon-Test. Es bestanden Unterschiede in der Kultivierbarkeit der Zellen: Die Monokultur zeigte eine gute Kultivierbarkeit bis in die dritte Passage, die Cokultur jedoch ein stagnierendes Wachstum in den höheren Passagen. Im Chromosomenaberrationstest konnte in beiden Methoden eine gewisse Grundschädigung in allen Passagen nachgewiesen werden. Sowohl in der Mono- als auch in der Cokultur zeigten sich eine hohe Anzahl an nicht auswertbaren bzw. nicht ausreichend auswertbaren Objektträgern. Nach LPS-Stimulation konnten für beide Zellkulturmodelle signifikante Anstiege der IL-8-Konzentration im ELISA nachgewiesen werden. Signifikante Unterschiede ergaben sich im Vergleich der Monokultur mit der Cokultur bei gemeinsamer LPS-Stimulierung beider Zelltypen.

Keine signifikanten Unterschiede zeigten sich beim Vergleich der IL-8-Konzentration nach LPS-Stimulation der Epithelzellen und Fibroblasten in der Cokultur. In der Arbeitsgruppe wurde exemplarisch ein dichtes Flimmerepithel in Zellkulturen auf Transwell Systemen in der Rasterelektronenmikroskopie dokumentiert. Als einmaligen Versuchsansatz wurde das Enzym MPG als Teil der Basenexzisionsreparatur in der Durchflusszytometrie nachgewiesen.

4. Diskussion

Kulturmodelle aus Primärzellen des humanen Respirationstrakts werden vermehrt zur Klärung wissenschaftlicher Fragestellungen sowie im Rahmen der Diagnostik chronischer respiratorischer Erkrankungen, zum Beispiel der primären Ziliendyskinesie (PCD) verwendet. Es stellt sich hierbei jedoch die Frage nach der Zellstabilität und –regenerationsfähigkeit innerhalb des Kultivierungsprozesses. Die *in vitro* Kulturmodelle verwenden sowohl Monokulturen mit Schleimhautepithelzellen als auch Cokulturen in Kombination mit Fibroblasten. Zur Klärung der Fragestellung nach der Zellstabilität und -regenerationsfähigkeit wurden in der Mono- und Cokultur genotoxikologische Versuchsreihen durchgeführt und die Funktionsfähigkeit der Zellkulturen überprüft. Im Folgenden sollen die verwendeten Methoden sowie die Ergebnisse kritisch diskutiert und im Zusammenhang interpretiert werden.

4.1 Methodikdiskussion

4.1.1 Zellisolierung und -kultivierung

Aufgrund der hohen *in vitro-in vivo* Korrelation wurden Primärzellen des oberen Respirationstrakts für die beiden Kulturmodelle verwendet. Sowohl die Zellisolierung als auch die -kultivierung primärer Nasenschleimhautzellen können auf unterschiedliche Weise erfolgen. Die verwendeten Primärzellen in dieser Arbeit stammen aus Gewebsexzidaten von Spendern, die meist aufgrund chronisch-entzündlicher Prozesse (Polypen, Pansinusitis) in der Universitätsklinik Würzburg operiert wurden. Die Proben stammten soweit makroskopisch beurteilbar aus nicht entzündlich veränderter Schleimhaut. Diese mussten im Rahmen der Routineoperationen entfernt werden, um die entzündlichen Areale zu erreichen und zu sanieren. Besteht jedoch bei dem Patienten keine Operationsindikation, sollte auf derart aufwendige und invasive Eingriffe zur Zellgewinnung verzichtet werden. Als wenig invasive Methode könnte sich stattdessen zum Beispiel die Bürstenbiopsie eignen [Schogler et al. 2017]. Die Bürstenbiopsie fand in Studien im Rahmen der PCD Diagnostik bereits Anwendung. Die Zellentnahme ließ sich dadurch deutlich vereinfachen und für den Patienten unkompliziert und schmerzarm gestalten [Pifferi et al. 2009]. Für alle Versuchsreihen dieser Arbeit wurden Zellen aus operativ gewonnenen Gewebestücken isoliert. Inwiefern die Ergebnisse und Aussagen auch für Zellkulturen von Bürstenbiopsien übertragbar wären, sollte in weiteren Versuchsreihen überprüft werden. Sowohl Alter als auch Geschlecht und Schadstoffexposition

der Spender haben Einfluss auf das Ausmaß der induzierten Zellschädigung durch genotoxische Substanzen [Maluf et al. 2000; Bajpayee et al. 2002]. Aus diesem Grund wurde auch der Tabakkonsum anhand der Pack Years der Spender miterfasst. Inwiefern diese oder auch andere, unbekannte Störfaktoren die Ergebnisse beeinflusst haben könnten, ist nicht vollständig zu klären.

Die beiden verwendeten Isolierungs- und Kultivierungsverfahren sind Methoden, die bereits in verschiedenen Arbeiten angewendet wurden. Im Monokulturverfahren werden die Zellen direkt mechanisch und enzymatisch aus dem Gewebe isoliert. Im Gegensatz dazu werden die Zellen im Cokulturverfahren durch Auswachsen aus Gewebestücken gewonnen. In beiden Verfahren wurden die Zellen nachfolgend im Air-Liquid Interface in Transwell Systemen kultiviert. Hierdurch wird im dreidimensionalen Modell die Differenzierung zu einem zilienträgenden respiratorischen Epithel ermöglicht [Yeh et al. 2007]. Somit wurde in den hier angewendeten Versuchsreihen bestmöglich versucht, ein realistisches Kulturmodell zu erzeugen, jedoch sind die Ergebnisse der *in vitro* Kulturen natürlich nur zum Teil auf die respiratorischen Epithelzellen des lebenden Organismus übertragbar. Die Kultivierung erfolgte in beiden Methoden über drei Passagen. In der Literatur ist beschrieben, dass in darüber hinaus gehenden Passagen eine deutlich reduzierte Proliferation und Differenzierungsfähigkeit der Epithelzellen festzustellen ist [Widdicombe et al. 2005; Fulcher et al. 2009]. Eine neue Veröffentlichung von [Lee et al. 2020] zeigte jedoch eine Kultivierbarkeit der Zellen über acht Passagen.

Das Monokulturverfahren mit der direkten Zellisolierung ermöglicht im Vergleich zum Cokulturverfahren eine Beurteilung der Zellstabilität und -regenerationsfähigkeit bereits ab der nullten Passage. Außerdem hat die Methode den Vorteil, dass die Isolierung der Zellen aus dem Gewebe sehr schnell und unkompliziert möglich ist. Die Zellausbeute durch die mechanische und enzymatische Isolierung ist jedoch deutlich geringer als beim Zellauswachsen aus den Gewebestücken. Kritisch zu sehen ist, dass mittels Vimentinfärbung eine mutmaßlich hohe Fibroblastenkontamination über alle Passagen dieses Kulturverfahrens hinweg aufgezeigt werden konnte. Demnach ist in diesem Verfahren wahrscheinlich nur eine eingeschränkte Aussage über das biologische Verhalten respiratorischer Epithelzellen möglich. Insbesondere der passageabhängige Anstieg der Fibroblastenkontamination reduziert die Anwendbarkeit des Verfahrens bei klinischen Fragestellungen in höheren Passagen. Bei zukünftiger Anwendung dieser Methode sollte zuvor der Anteil der Fibroblasten in der

gesamten Kultur bestimmt und eine Mindestanforderung an das Reinheitsmaß festgelegt werden.

Das Cokulturverfahren hat aufgrund der separater Epithelzell- und Fibroblastenkultivierung im Vergleich zum Monokulturverfahren einen entschiedenen Vorteil. Die gesonderte Fibroblastenisolierung ermöglicht die getrennte Untersuchung der beiden Zelltypen. Das hier angewendete Cokulturverfahren hat zudem den Vorteil der Verwendung spendergleicher Fibroblasten [Schweinlin et al. 2017]. Inwiefern Cokulturen mit spenderfremden Fibroblasten zu gleichwertigen Ergebnissen führen, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Die histologische Gliederung der *Tunica mucosa* in *Lamina epithelialis* und *Lamina propria* wird durch die zweischichtige Kompartimentierung der Cokultur im Transwell teils nachgeahmt. Verglichen zur Monokultur wird hierdurch eine *in vivo* ähnlichere histologische Gewebedifferenzierung erzielt. Inwiefern diese Kompartimentierung der tatsächlichen histologischen Gliederung entspricht, sollte jedoch weiter untersucht werden. Die Isolierung der Zellen durch Auswachsen aus Gewebestücken ist deutlich aufwendiger als die direkte Zellisolierung. Darüber hinaus verlängert sich der Kultivierungsprozess durch die zeitversetzte spendergleiche Fibroblastenisolierung aus den Gewebestücken. Um eine Kultivierung über mehrere Passagen zu ermöglichen, wurden die Epithelzellen bzw. die Fibroblasten getrennt in Kulturflaschen kultiviert. Die tatsächliche Cokultivierung beider Zellen erfolgte deshalb nur in den Transwell Platten. Es ist daher zu berücksichtigen, dass durch die getrennten Kultivierungszeiten die Fibroblasten den Epithelzellen nicht als Kommunikationspartner zur Verfügung standen. Dieses Fehlen könnte einen negativen Einfluss auf die Kulturfähigkeit der Epithelzellen gehabt haben. Den Epithelzellkulturen des Monokulturverfahrens standen durch die beschriebene Kontamination jedoch Fibroblasten als Kommunikationspartner während der gesamten Kultivierungszeit zur Verfügung. Es lässt sich mutmaßen, dass diese Gegebenheiten die unterschiedliche Zellkultivierbarkeit in den beiden Verfahren mit bedingte. Welche Rolle die Fibroblasten jedoch tatsächlich für die Kulturfähigkeit respiratorischer Epithelzellen spielen, sollte in Zukunft näher untersucht werden.

Die Polyestermembran in den Transwells schafft einerseits eine Barriere, andererseits ermöglicht sie durch die Poren die Kommunikation zwischen den zwei Zellkulturen und die Ernährung der Zellen durch das basolaterale Medium. Sie erfüllt hierbei zwar Funktionen ähnlich der Basalmembran in humanen Epithelien, jedoch wird die

tatsächliche Grenzstruktur nur annähernd dargestellt. Im Vergleich zu vaskularisierten Trägersystemen, wie zum Beispiel azellularisiertem Schweinedarm, sind die Transwell Platten für große Versuchsreihen leichter und schneller verfügbar. Bis auf die Beschichtung mit Kollagen (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) ist hierbei keine weitere Vorbereitung der Platten notwendig. Für die Etablierung eines Kulturmodells als Diagnostikmethode der PCD ist ein derart einfach durchzuführendes Kultivierungsverfahren notwendig. Inwiefern die Ergebnisse dieser Arbeit übertragbar auf Kulturmodelle mit vaskularisierten Trägersystemen sind, sollte überprüft werden.

4.1.2 Genotoxikologische Testverfahren *in vitro*

Der Comet Assay dient heute als Standardverfahren zur Detektion von DNA-Schädigungen in Einzelzellen und ist prinzipiell mit allen eukaryotischen Zellen durchführbar [Tice et al. 1991]. Durch Modifikation des Verfahrens als alkalische Variante wird eine hohe Sensitivität erreicht [Singh et al. 1988]. Im Comet Assay werden sowohl Strangbrüche als auch alkalilabile Stellen und DNA-Crosslinks erfasst [Tice et al. 2000]. Insbesondere Einzelstrangbrüche, wie sie durch Alkylanzien entstehen, können nachgewiesen werden [Speit et al. 1995]. Zur Induktion eines DNA-Schadens in den primären Nasenschleimhautzellen wurde MMS als Alkylanz verwendet. Der Comet Assay dient als optimales Testverfahren zur Quantifizierung der MMS-induzierten DNA-Schädigung und zur Überprüfung einer Regeneration nach 24 Stunden. Durch seine einfache und schnelle Durchführbarkeit eignet sich der Comet Assay insbesondere zur Untersuchung einer großen Menge an Versuchsansätzen, wie sie in dieser Arbeit vorlagen. Außerdem liefern Isolierungsmethoden von Primärzellen aus kleinen Gewebestücken meist nur eine geringe Zellausbeute. Da im Comet Assay nur eine geringe Zellmenge notwendig ist, lässt sich der Test ideal bei Primärzellkulturen anwenden.

Der Chromosomenaberrationstest dient dem Nachweis struktureller oder numerischer Chromosomenveränderungen und eignet sich ebenfalls als Nachweisverfahren genotoxischer Ereignisse [Miller et al. 1998]. Derartige Chromosomenaberrationen können somatische oder Keimbahn Mutationen zur Folge haben. Inwiefern chromosomale Veränderungen allein durch den *in vitro* Kultivierungsprozess von Primärzellen verursacht werden könnten, ist bislang nicht untersucht. Diese Information wäre jedoch für die Entwicklung eines schonenden Isolierungs- und Kultivierungsverfahrens zur Etablierung eines Kulturmodells von großem Interesse, weshalb der Test in dieser Arbeit Anwendung fand. Ergänzend zum durchgeführten

Comet Assay liefert der Chromosomenaberrationstest als genotoxikologisches Verfahren zusätzliche Informationen über die DNA-Stabilität der humanen Primärzellen. Der Chromosomenaberrationstest wird bevorzugt an stabilen Zellen mit einer kurzen Regenerationszeit angewendet [Preston et al. 1987]. Verwendet wurde das Verfahren bislang insbesondere bei etablierten Zelllinien. In der Arbeitsgruppe erfolgte bereits die Anwendung des Chromosomenaberrationstest an Primärzellen der Glandula parotis [Friehs 2010]. In dieser Arbeit wurde das Verfahren erstmals an einer größeren Stichprobe von Primärzellen des oberen Respirationstrakts durchgeführt. Der Chromosomenaberrationstest ist als Verfahren im Vergleich zum Comet Assay deutlich aufwendiger und komplexer in der Durchführbarkeit.

Zur spezifischen Detektion von DNA-Schädigungen sollten mehrere Verfahren mit unterschiedlichen Endpunkten, im Sinne des Comet Assays, Mikrokern- und Chromosomenaberrationstests angewendet werden. Im Mikrokerntest können bei fehlerhafter Zellteilung aufgrund Genominstabilität zusätzlich zum Zellkern chromatinhaltige Partikel nachgewiesen werden. Positive Anwendung fand dieses genotoxikologische Testverfahren ebenfalls bereits an Primärzellen [Friehs 2010]. Vorteil ist hierbei der zusätzliche Informationsgewinn über Apoptosen, Mitosen und Proliferation der Zellen. Bei der Anwendung verschiedener genotoxikologischer Tests zeigten sich innerhalb der Arbeitsgruppe durchaus verschiedene Ergebnisse [Zinnitsch 2010; Mickler 2015]. Vorteil des Comet Assay ist die einfache Anwendbarkeit an nicht stimulierten Zellen. Der Mikrokerntest kann gegenüber dem Chromosomenaberrationstest nur eine indirekte Aussage über strukturelle oder numerische Aberrationen liefern. Chromosomale Veränderung, ausgelöst durch genotoxische Substanzen können hingegen im Chromosomenaberrationstest direkt dargestellt werden. In dieser Arbeit wurden die Ergebnisse des Comet Assays durch Chromosomenaberrationstests an unbehandelten Zellen über alle Passagen ergänzt. Der Mikrokerntest fand in dieser Arbeit keine Anwendung.

4.1.3 Testung der Funktionsfähigkeit: IL-8 ELISA und REM

Zur Testung der Funktionsfähigkeit beider Kulturmodelle wurde die IL-8-Sekretion nach LPS-Stimulation mittels ELISA sowie die Entwicklung ziliärer Strukturen im Rasterelektronenmikroskop untersucht. LPS befindet sich auf der Membran gramnegativer Bakterien und bewirkt als Antigen die Detektion bakterieller Infektionen. IL-8 zählt zu einer der potentesten Chemotaxine, welches nach Stimulation durch LPS, Tumornekrosefaktor(TNF)- α , IL-1 und Interferon(IFN)- γ sezerniert wird. Nachfolgend

spielt es eine entscheidende Funktion bei der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und T-Zellen [Fritsch 2009]. Demnach ist dieses Chemokin von großer Bedeutung für die Aktivierung des angeborenen und ebenso des erworbenen Immunsystems. Die Erkennung von Fremdpathogenen, wie LPS ist essentiell für das Überleben eines Organismus. Mit der verwendeten Funktionsfähigkeitsprüfung im IL-8 ELISA konnte exemplarisch ein proinflammatorischer Aktivierungsweg einer *in vivo* komplexen Aktivierungskaskade überprüft werden. Andere proinflammatorische Cytokine wie z.B. IL-1, IL-6 wurden nicht untersucht. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen eignen sich gut zur statischen Darstellung ziliärer Strukturen als Oberflächendifferenzierung des respiratorischen Epithels. Zur detaillierten Beurteilung von Zilien, zum Beispiel zur Detektion ultrastruktureller Defekte bei PCD wird zusätzlich die Transelektronenmikroskopie benötigt, die in dieser Arbeit keine Anwendung fand. Außerdem werden zur Messung der Zilienfrequenz und somit für ein dynamischen Bild Hochfrequenzvideoanalysen benötigt, die im Zuge dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt wurden.

4.1.4 Vimentinfärbung zum Fibroblastennachweis

Der Nachweis von Fibroblastenkontaminationen im Monokulturverfahren erfolgte in dieser Arbeit anhand Vimentinfärbungen auf Objektträger. Methodenbedingt wurde keine Färbung der Zellen direkt auf der Transwellmembran durchgeführt, sodass keine exakte Übertragung der Ergebnisse im zweidimensionalen System auf die Fibroblastenkontamination im Air-Liquid Interface der Monokultur möglich war. Vimentin kommt als Intermediärfilament im Zytoskelett von Fibroblasten vor und eignen sich somit gut zu deren Nachweis. Trotz dessen findet man Vimentin auch in Knorpel- und Knochenzellen, Gefäßendothel, Menigealzellen und in Tumorzellen [Lüllmann-Rauch 2012]. Außerdem zeigen sich Vimentin-positive Zellen bei der epithelio-mesenchymalen Transition (EMT), die auch Teil der Embryogenese ist [Greenburg et al. 1982]. Somit kann die Vimentinfärbung zwar zum Nachweis von Fibroblasten angewendet werden, hat hierbei jedoch eine eingeschränkte Spezifität. Darüber hinaus wurde eine Vimentin-positive Differenzierung auch bei Epithelzellen in *in vitro* Zellkulturen beobachtet [Biddle et al. 1996]. Vimentin-positiven Epithelzellen werden hierbei hauptsächlich im Randbereich der auswachsenden Kultur nachgewiesen [Velez-delValle et al. 2016]. Die Interaktion von Vimentin- und Keratinfilamenten dient dabei als physiologischer Prozess der Zellmigration [Velez-delValle et al. 2016]. In Modellen der Wundheilung wandern Epithelzellen zur

Wiederherstellung der epithelialen Barriere Vimentin-abhängig in den Bereich der Verletzung [Rogel et al. 2011]. Ein Knock-down von Vimentin mRNA beeinträchtigt daher das Wachstum der Zellkulturen [Castro-Munozledo et al. 2015]. Eine exakte Differenzierung zwischen Epithelzellen und Fibroblasten wäre somit nur durch eine zusätzliche Epithelzell-markierende Zytokeratin 14 [Moll et al. 1982] Färbung möglich. Epithelzellen zeigen hierbei im Vergleich zu Fibroblasten einen zusätzlich zur Vimentinfärbung positiven Nachweis für Zytokeratin 14 [Velez-delValle et al. 2016]. Die doppelte Färbung fand in dieser Arbeit keine Anwendung, sodass aufgrund der positiven Vimentinfärbungen nicht exakt auf die Fibroblastenkontamination der Kulturen geschlossen werden kann [Ickrath et al. 2020]. Morphologisch zeigen Fibroblasten einen typischen spindelförmigen Charakter [Lüllmann-Rauch 2012]. Diese typische Zellmorphologie unterschied sich in Teilen der durchgeführten Vimentinfärbungen der Monokultur: Die Vimentin-positiven Zellen erschienen teils breiter und ovalförmig. Dies könnte als Indiz für Vimentin-positive Epithelzellen interpretiert werden. Eine exakte Zuordnung ist aufgrund der singulären Färbung nicht möglich.

4.2 Ergebnisdiskussion

4.2.1 Regenerationsfähigkeit respiratorischer Epithelzellen

Im Comet Assay konnte eine statistisch signifikante Reduktion der MMS-induzierten Schädigung nach 24-stündiger Regenerationszeit für beide Methoden über alle Passagen bis auf die dritte Passage der Cokultur nachgewiesen werden. Die OTM-Werte der Zellen nach der Regenerationszeit unterschieden sich in der Monokultur jedoch weiterhin statistisch signifikant zur Negativkontrolle über alle Passagen hinweg. Dies bedeutet, dass in der Versuchsreihe zwar eine gute Regeneration der Zellen bestätigt werden konnte, jedoch konnten die Zellen die DNA-Schädigung innerhalb von 24 Stunden nicht auf das Niveau der unbehandelten Zellen reduzieren. Somit bestand offenbar keine vollständige Regenerationsfähigkeit der Zellen. Im Vergleich zeigten sich in der ersten Passage der Cokultur gleichwertige Ergebnisse, jedoch konnte darüber hinaus kein signifikanter Unterschied zwischen der Negativkontrolle und dem Versuchsansatz der regenerierten Zellen in der zweiten Passage nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deutet auf eine vollständige Regeneration auf das Anfangsniveau der unbehandelten Zellen hin. In der dritten Passage der Cokultur zeigten sich für alle drei Versuchsansätze keine signifikanten Unterschiede. Dieses Ergebnis wird durch die geringe Fallzahl von 50 Prozent in der dritten Passage der

Cokultur mitbeeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass die Grundschädigung der unbehandelten Zellen nicht mit der Höhe der Passagen anstieg. Der Kultivierungs- und Passagierungsprozess allein führt demnach in beiden Methoden nicht zu einer DNA-Schädigung. Beide Methoden sind demnach prinzipiell für genotoxikologische Untersuchungen über mehrere Passagen geeignet und zeigen im Comet Assay keine Hinweise auf kultivierungsbedingte DNA-Schädigungen, die die Ergebnisse negativ beeinflussen könnten. Im Vergleich der beiden Methoden zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Höhe der DNA-Schädigungen im Wilcoxon-Test. Die nachgewiesene Regenerationsfähigkeit der Primärzellen weist somit auf ein ausgereiftes Reparatursystem hin, das auch im *in vitro* Kulturmodell nach DNA-Schädigung aktiviert wird. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, verfügen humane Zellen über vielfältige Reparaturmechanismen. In der Literatur wird in Zusammenhang mit alkylierenden Substanzen insbesondere die Basenexzisionsreparatur als Mechanismus beschrieben [Wyatt et al. 2006; Rassow et al. 2012]. Als Nachweis des Vorhandenseins dieses Reparaturmechanismus in den Primärzellen konnte als einmaliger Versuch das Reparaturenzym MPG der BER nachgewiesen werden. Aufgrund der geringen Fallzahl ist jedoch keine Aussage über quantitative Enzymmengen möglich. Zur detaillierteren Untersuchung dieses Mechanismus wäre es interessant zu wissen, ob quantitative Unterschiede in der Anwesenheit des Enzyms zwischen den beiden Kulturmethoden oder in Abhängigkeit der Passagenhöhe vorhanden sind. Ergänzend könnte hier eine quantitative PCR für den Enzymnachweis durchgeführt werden. Darüber hinaus wird in der Literatur auch die Induktion von Doppelstrangbrüchen nach MMS-Behandlung mit Reparatur über die homologe Rekombination beschrieben [Ochs et al. 1999; Nikolova et al. 2010]. Da der humane Organismus einen diploiden Chromosomensatz enthält, kann hierbei ein zweiter identischer DNA Abschnitt als Vorlage für die fehlerfreie Reparatur dienen [Koch et al. 2014]. In welchem Verhältnis Einzel- bzw. Doppelstrangbrüche nach der genotoxischen Behandlung mit MMS auftreten, blieb in der durchgeführten Arbeit unbeachtet und sollte in Zukunft genauer untersucht werden. Ebenso sollte die Bedeutung der homologen Rekombination als Reparaturmechanismus in primären Nasenschleimhautzellen detaillierter betrachtet werden.

4.2.2 Chromosomenstabilität

Bislang findet man in der Literatur keine Angaben über die chromosomale Stabilität der NSH-Zellkulturen über mehrere Passagen. Diese Information wäre jedoch von

essentieller Bedeutung, um den Einsatz von Primärzellen für diagnostische Zwecke zu validieren. In dieser Arbeit wurde der Chromosomenaberrationstest für beide Isolierungs- und Kulturverfahren über drei Passagen mit unbehandelten Zellen durchgeführt. Es ist zu betonen, dass der Chromosomenaberrationstest an einer derart großen Stichprobe von Primärzellen des oberen Respirationstraktes bislang keine Anwendung fand. In den Ergebnissen beider Methoden zeigt sich ein großer Anteil an nicht auswertbaren Objektträgern. Es konnte zwar eine gewisse Grundschädigung in allen Passagen vereinzelt nachgewiesen werden, jedoch kann aufgrund der fehlenden Werte keine eindeutige Aussage über entstandene chromosomale Schädigungen getroffen werden. Mehrere Probleme ergaben sich im durchgeführten Versuchsablauf: Die auf Objektträgern auswachsenden Epithelzellen zeigten ein inselförmiges Wachstum. In diesen kompakten Zellhaufen ist es durch Überlagerung kaum mehr möglich, alle Mitosen nach der Präparation und Färbung der Chromosomen abschließend zu beurteilen. Diese kompakte Zellkulturentwicklung lässt sich durch Aussäen einer hohen Anzahl an Einzelzellen und kurzer Kultivierungszeiten auf dem Objektträger vermeiden. Dies ist jedoch besonders in den niedrigen Passagen bei geringer Ausbeute von Primärzellen nicht immer möglich. Durch die gleichzeitige Durchführung des Comet Assays wurde ein Teil der Zellen zudem bereits verwendet. Limitierend war außerdem die stagnierende Proliferation der Zellen insbesondere in höheren Passagen. Der Chromosomenaberrationstest benötigt jedoch für die Verwendbarkeit, im Vergleich zum Comet Assay proliferierende Zellen. Zur Detektion der Chromosomen müssen die Epithelzellen in geringer Dichte auf den Objektträgern ausgesät werden, wohingegen die Epithelzellen für die Proliferation und Differenzierung den Zell-Zell-Kontakt benötigen. Dies könnte zur stagnierenden Proliferation beigetragen haben. Außerdem könnte die reduzierte Proliferation infolge der fehlenden Wachstumstimulation durch die Fibroblasten in der Cokultur mitbedingt sein. Diese standen den Epithelzellen der Monokultur aufgrund der Fibroblastenkontamination hingegen zur Verfügung. Es zeigten sich darüber hinaus große individuelle zeitliche Unterschiede bis zum Erreichen der ideal auswertbaren Kulturgröße auf den Objektträgern. Um die Auswertbarkeit der Objektträger zu erhöhen, wurden pro Versuchsansatz mindestens vier Objektträger mit unterschiedlicher Zellzahl angelegt. Außerdem wurde der Kultivierungszustand täglich kontrolliert, um den idealen Zeitpunkt der Präparation zu erreichen.

Zur Durchführung des Chromosomenaberrationstests war die Zellkultivierung auf Objektträgern notwendig. Da die Objektträger kein dreidimensionales System wie die Transwells darstellen, war nur eine alleinige Epithelzellkultivierung möglich. Hierdurch liefern die Ergebnisse bei alleiniger Betrachtung der Epithelzellen nur eine eingeschränkte Aussagekraft über die Stabilität des Cokulturverfahrens. Inwiefern die Fibroblasten Einfluss auf die nachgewiesenen Stabilitäten bzw. Schädigung im Chromosomenaberrationstest haben, bleibt unberücksichtigt. Die im Monokulturverfahren nachgewiesene Fibroblastenkontamination führt auch im Chromosomenaberrationstest zu einer eingeschränkten Aussagekraft über die chromosomale Stabilität der Epithelzellen. Inwiefern es sich bei den untersuchten Zellen um Fibroblasten handelte, bleibt unklar. Hierfür sollte in Zukunft der Anteil der Fibroblasten und somit der Reinheitsgrad der Zellkultur bestimmt werden.

Zusammenfassend ist eine Aussage über die Stabilität der Zellen in den beiden Kulturmodellen anhand des in dieser Arbeit durchgeführten Chromosomenaberrationstests aufgrund der hohen Anzahl nicht oder unzureichend auswertbarer Versuchsansätze nicht abschließend möglich. Die Durchführung des Chromosomenaberrationstests an einer großen Stichprobe von zehn Spendern über drei Passagen liefert jedoch methodisch die wertvolle Aussage über die prinzipielle Funktionsfähigkeit des Tests an primären Nasenschleimhautzellen. Bislang wurde der Test nicht für die Beurteilung dieser Zellen verwendet. Dieses Ergebnis ist von hoher Relevanz für die mögliche Prüfung der DNA-Stabilität an Primärzellen der oberen Atemwege. Durch Weiterentwicklung des Versuchsablaufs könnte die Ergebnisausbeute verbessert werden und somit wichtige Informationen über die Chromosomenstabilität der kultivierten Zellen liefern. Hierfür könnte die Anzahl der Objektträger mit verschiedenen Zellzahlen nochmals gesteigert werden. Außerdem wäre die erste Passage in beiden Methoden aufgrund der hier verfügbaren Zellzahl mit hoher Proliferation am besten für einen erneuten Versuchsablauf geeignet.

4.2.3 Funktionsfähigkeit der Kulturmodelle

Zur Testung der Funktionsfähigkeit von Zellkulturen ist die Stimulation der Zytokinsekretion ein bewährtes Mittel. Anwendung fand das Verfahren bereits in der Untersuchung der allergischen Rhinitis und chronischen nasalen Polypen [Shiozawa et al. 2015]. Insbesondere die Sekretion von IL-8 wurde bereits bei Patienten mit Mukoviszidose untersucht [Schogler et al. 2017]. Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit beider Kulturmodelle wurde untersucht, inwiefern mittels LPS eine

Entzündungsreaktion mit folgendem IL-8 Anstieg im Zellüberstand simuliert werden konnte. Hierfür wurden der Überstand der Zellen in beiden Methoden in der jeweils ersten Passage im Transwell untersucht. Das Monokulturverfahren zeigte für beide LPS-Konzentrationen ein signifikanter IL-8 Anstieg im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Im ELISA der gesamten Cokultur konnte hingegen nur bei 10 μ g/ml LPS ein signifikanter IL-8 Anstieg nachgewiesen werden. Jedoch unterschied sich die Negativprobe mit unbehandelten Zellen sowie der Versuchsansatz nach Stimulation mit 1 μ g/ml LPS der Cokultur statistisch signifikant zur Monokultur. Es zeigte sich, dass die nativen Zellen der Cokultur bereits ohne Stimulation vermehrt Interleukine produzierten. Die Aussagekraft dieser Ergebnisse ist bei gemeinsamer Analyse beider Zelltypen der Cokultur jedoch eingeschränkt. Allein die höhere Zellzahl könnte zu höheren IL-8 Werten geführt haben. Außerdem kann hierbei die Funktionsfähigkeit der Epithelzellen allein nicht beurteilt werden. Deshalb wurde der Versuch nachfolgend getrennt für beide Zelltypen, Epithelzellen und Fibroblasten, nach abgeschlossener Cokultivierung im Transwell wiederholt. Hierbei konnte für beide Zelltypen ebenfalls ein statistisch signifikanter Anstieg der IL-8-Konzentration nach Stimulation mit 10 μ g/ml LPS nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich im Mann-Whitney-U-Test kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den zwei Ansätzen der Epithelzellen und Fibroblasten. Die proinflammatorische Reaktionsfähigkeit beider Zellarten wurde somit exemplarisch positiv bestätigt. In diesem Versuchsansatz wird ebenfalls die Fibroblastenkontamination im Monokulturverfahren die Ergebnisse mitbeeinflusst haben. Somit ist ebenso wie in den genotoxikologischen Tests die Aussagekraft über die respiratorischen Epithelzellen allein eingeschränkt. Hierbei empfiehlt sich die Bestimmung des Fibroblastengehalts innerhalb der Kultur. In dieser Arbeit wurde der ELISA in der jeweils ersten Passage in beiden Methoden durchgeführt. Inwiefern sich die Funktionsfähigkeit der Epithelzellen jedoch mit der Höhe der Passage verändert oder konstant bleibt wurde nicht untersucht. Die in dieser Arbeit gewählte Überprüfung der Zellfunktionsfähigkeit anhand des IL-8 Anstiegs nach LPS-Stimulation stellt nur einen von vielen möglichen proinflammatorischen Signalwegen dar und könnte durch weitere Testungen ergänzt werden.

Zur weiteren Analyse der Funktionsfähigkeit der Kulturmodelle wurde das Vorhandensein ziliärer Strukturen überprüft. Die Zilien des respiratorischen Epithels dienen als Oberflächendifferenzierung der mukoziliären Clearance. Diese Zilienbewegungen stellen einen entscheidenden Mechanismus der Erregerabwehr in den

Atemwegen dar [Lüllmann-Rauch 2012]. Wie bereits durch verschiedene Arbeitsgruppen beschrieben, ermöglicht die Kultivierung im Air-Liquid Interface die Differenzierung der Epithelzellen zu einem mehrreihigen Epithel [Sajjan et al. 2004]. Zur Etablierung eines Kulturmodells für die PCD Diagnostik muss die Zilienstruktur und -beweglichkeit beurteilbar sein und mit der tatsächlichen Gegebenheit im Patienten übereinstimmen. Zur aussagekräftigen Untersuchung von Zilienpathologien und deren Vergleichbarkeit mit den *in vivo* Gegebenheiten sollten mindestens 60% der Oberfläche mit Zilien bedeckt sein [Feriani et al. 2017]. Sollte der Kultivierungsprozess die Zilienstruktur beeinflussen oder gar schädigen, ist eine sensitive und spezifische PCD Diagnose nicht mehr möglich. In dieser Arbeit wurde ein Bürstensaum mit Mikrovilli in beiden Zellkulturen im Rasterelektronenmikroskop nachgewiesen. Außerdem erfolgte in der Arbeitsgruppe der exemplarische Nachweis von Zilien auf den kultivierten Epithelzellen. Zur detaillierten Beurteilung und zum Vergleich der beiden Verfahren müsste jedoch eine größere Strichprobe untersucht werden. Außerdem könnten die REM Aufnahmen durch Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ergänzt werden. Beide Aufnahmen stellen jedoch als statische Bilder nur das Vorhandensein von Zilien und nicht deren Funktionsfähigkeit dar. Hierfür sollten Hochgeschwindigkeitsvideoanalysen der zilientragenden Epithelzellen für beide Kulturmodelle durchgeführt werden. Somit könnten relevante Informationen über die Zilienfunktion von Primärzellkulturen gewonnen werden, die insbesondere für die PCD Diagnostik von Bedeutung wären. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass die Zellintegrität der Kulturmodelle mittels transepithelialer Widerstandsmessung überprüft werden kann [Lopez-Souza et al. 2003]. Die Methode fand in dieser Arbeit keine Anwendung. Sie könnte jedoch ergänzende Information über die Funktionsfähigkeit der beiden Kulturverfahren liefern.

4.2.4 Limitationen der Arbeit und Ausblick

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit eine gute Regeneration der NSH-Zellen nach genotoxischer Behandlung in beiden verwendeten Kulturmodellen, Mono- bzw. Cokultur, nachgewiesen werden [Ickrath et al. 2020]. In der ersten Methode erfolgte eine direkte mechanisch enzymatische Isolierung der Zellen aus dem Operationsgewebe mit nachfolgender Kultivierung über drei Passagen als Monokultur. Im zweiten Verfahren erfolgte ein sequentielles Auswachsen von spendergleichen Epithelzellen und Fibroblasten mit anschließender Cokultivierung. Insgesamt konnte zwischen den beiden Kultivierungsverfahren kein Unterschied bezüglich Zellstabilität

und -regenerationsfähigkeit festgestellt werden. Ergänzend konnte erstmals die Anwendbarkeit des Chromosomenaberrationstest für NSH-Zellen gezeigt werden. Außerdem wurde die zelluläre Funktionsfähigkeit beider Kulturverfahren exemplarisch mittels IL-8 ELISA und Rasterelektronenmikroskopie positiv überprüft. Auch hierbei konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Methoden festgestellt werden. Die Kultivierung von Primärzellen des oberen Respirationstrakts im Air-Liquid Interface in Transwellplatten ermöglicht für beide Methoden eine gute Darstellung der *in vivo*-Verhältnisse des menschlichen Respirationstrakts. Das Cokulturverfahren beinhaltet mit zeitlich aufwendigerer Zellisolierung eine getrennte Zellkultivierung mit histologischer Gliederung der *Tunica mucosa*, das jedoch nur über zwei Passagen eine gute Kultivierbarkeit zeigte. Die Zellen des Monokulturverfahren konnten zwar über drei Passagen kultiviert werden, jedoch zeigten sich Hinweise auf eine passageansteigende Kontamination durch Fibroblasten.

Zur Etablierung des Chromosomenaberrationstests als genotoxikologisches Testverfahren an primären Nasenschleimhautzellen sollte die hier durchgeführte Versuchsreihe wie beschrieben in umfangreicherem Ausmaß erweitert werden. Hierdurch könnten wertvolle Informationen über die chromosomale Zellstabilität der *in vitro* Kulturen gewonnen werden. Zur detaillierteren Beurteilung der ziliären Oberflächendifferenzierungen wären zusätzliche transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen sinnvoll. Außerdem könnten Hochgeschwindigkeitsvideoanalysen zur abschließenden Bestätigung der ziliären Funktionsfähigkeit durchgeführt werden. Darüber hinaus würden größere IL-8 ELISA Versuchsreihen über mehrere Passagen und Zellintegritätsmessungen weitere Informationen über die Funktionsfähigkeit der Zellen in den Kulturen liefern. Interessant wäre zudem eine genotoxikologische Versuchsreihe mit Zellkulturen PCD erkrankter Spender. Zellkulturverfahren spielen bereits eine relevante Rolle in der PCD Diagnostik [Lucas et al. 2017]. Für die feste Einbindung der Zellkulturen im diagnostischen Algorithmus sollten jedoch detaillierte Analysen über die Sensitivität und Spezifität dieses Verfahrens durchgeführt werden. Besteht bei dem Spender eine Operationsindikation, sollte das Operationspräparat zur Zellgewinnung verwendet werden. Besteht diese Indikation nicht, sollte jedoch keine invasive Probengewinnung durchgeführt werden. Stattdessen dient dann die Bürstenbiopsie als Mittel der Wahl zur Zellgewinnung primärer Nasenschleimhautzellen.

5. Zusammenfassung

Kulturmodelle des respiratorischen Epithels werden zur Klärung multipler Fragestellungen, zum Beispiel der Untersuchung seltener respiratorischer Erkrankungen, wie der primären Ziliendyskinesie (PCD) herangezogen. Hierbei könnten in Zukunft Kulturmodelle integraler Bestandteil des Diagnosealgorithmus werden. Die Isolierung und Kultivierung von Primärzellen des menschlichen Respirationstrakts ist dabei wesentlich komplexer als die Nutzung etablierter Zelllinien. Jedoch ermöglicht die Verwendung der Primärzellkulturen eine exaktere Darstellung des mehrreihigen Flimmerepithels der oberen Atemwege. Die Gewinnung der Primärzellen kann mechanisch mit zusätzlichem enzymatischen Verdau, oder durch sequentielles Auswachsen der Zellen erfolgen. Angewendet werden sowohl Epithelzell-Monokulturen wie auch Cokulturen mit Fibroblasten. Die Nutzung des Air-Liquid Interface in Transwell Systemen ermöglicht in beiden Kulturen die Differenzierung zu einem Kinozilien tragenden Flimmerepithel. Hierbei ist nicht endgültig geklärt, welches Modell die *in vivo* Gegebenheiten besser darstellt und welche Vorteile diese haben. Außerdem liegen bislang keine Daten über die Zellstabilität und -regenerationsfähigkeit nach genotoxischer Behandlung sowie Informationen über chromosomale Veränderungen während des Zellkultivierungsprozesses über mehrere Passagen vor. Derartige Informationen sind allerdings für die Etablierung eines Kulturmodells der oberen Atemwege von essentieller Bedeutung. Das Ziel der Arbeit war die Untersuchung der DNA-Stabilität und -Regenerationsfähigkeit über drei Passagen nach genotoxischer Behandlung, vergleichend für beide Kulturmodelle sowie die Überprüfung der chromosomalen Stabilität innerhalb des Kultivierungsprozesses und der Funktionsfähigkeit beider Zellkulturen.

Zu diesem Zweck wurde eine toxikologische Versuchsreihe von jeweils 10 Spendern für beide Kulturmodelle, Mono- bzw. Cokultur im Air-Liquid Interface über drei Passagen durchgeführt. Hierbei wurde die Grundschädigung, die Schädigung nach einstündiger Behandlung mit 300 μ l des Alkylanz Methylmethansulfonat (MMS) und nach einer 24-stündigen Regenerationszeit mit dem Comet Assay überprüft. Zur Untersuchung der chromosomalen Stabilität innerhalb des Kulturprozesses wurden parallel Chromosomenaberrationstests an unbehandelten Zellen über drei Passagen durchgeführt. Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit der Zellen wurde ein Interleukin-8 (IL-8) ELISA für 10 Versuchsansätze in der jeweils ersten Passage beider

Kulturen verwendet. Hierbei wurde die IL-8-Konzentration im Überstand der unbehandelten Zellkulturen sowie nach 1µg/ml bzw. 10µg/ml Lipopolysaccharid(LPS)-Exposition untersucht. Für die Cokultur wurden sowohl beide Zelltypen gemeinsam als auch die Epithelzellen bzw. die Fibroblasten getrennt betrachtet. In beiden Modellen wurden zusätzlich rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen zur Untersuchung der ziliären Strukturen durchgeführt. Zur Überprüfung der Fibroblastenkontamination in der Monokultur wurden als einmaliger Versuchsablauf Vimentinfärbungen über drei Passagen angewendet.

Mit dem Comet Assay konnte in beiden Modellen eine gute Regeneration der DNA-Integrität nach MMS-induzierter DNA-Schädigung über alle Passagen nachgewiesen werden. Als einmaliger Versuchsansatz wurde das Enzym Methylpuringlykosylase (MPG) als Teil der Basenexzisionsreparatur nachgewiesen. Es ergaben sich Unterschiede in der Kultivierbarkeit der Zellen: die Monokultur zeigte eine gute Zellkultivierbarkeit bis zur dritten Passage. Es konnte jedoch mit der Vimentinfärbung eine Fibroblastenkontamination von Beginn an sowie eine Zunahme mit Höhe der Passage nachgewiesen werden. Es handelt sich hierbei demnach nicht um eine Reinkultur respiratorischer Epithelzellen. Die Cokultur ermöglicht getrennte Epithelzell- bzw. Fibroblastenkulturen, jedoch keine gute Kultivierbarkeit bis in höhere Passage. Methodisch konnte die prinzipielle Funktionsfähigkeit des Chromosomenaberrationstests an primären Nasenschleimhautzellen erstmals für eine große Stichprobenanzahl gezeigt werden. In den durchgeführten Chromosomenaberrationstests konnte eine gewisse Grundschädigung über alle Passagen nachgewiesen werden, jedoch sollten weitere Tests erfolgen, um diese Tendenz zu verifizieren. Die funktionelle Integrität wurde mit dem IL-8 ELISA nach LPS-Exposition sowie durch den Nachweis ziliärer Strukturen im REM exemplarisch bestätigt.

Die erhobenen Daten liefern zusammengefasst wichtige Informationen über die Zellstabilität und -regenerationsfähigkeit der bislang verwendeten Kulturmodelle. Insbesondere Informationen über chromosomale Veränderungen sollten in Zukunft genauer betrachtet werden. Von großem Interesse wäre außerdem die Überprüfung derartige Zelleigenschaften in Zellkulturen von PCD erkrankten Spendern.

6. Summary

Cell culture models of human nasal mucosa are widely used to clarify a broad variety of scientific questions. Particularly the research of orphan disease, like Primary Ciliary Dyskinesia (PCD), may represent a possible field of application. In the future, these models may play a major role in diagnostic algorithms of PCD. The process of isolating and cultivating primary cells is way more complex than using established cell lines. However, it allows a more precise description in analogies to *in vivo* conditions in the human respiratory tract. Primary cells could be extracted by mechanic and enzymatic isolation or by sequential outgrow. Epithelial cells can be cultivated in monocultures or with fibroblasts in cocultures. Using air-liquid interface conditions in Transwell systems enable the differentiation to ciliated respiratory epithelium. It is not yet clarified which model represents *in vivo* situation in a better way and what kind of advantages they have. Data about stability and regenerative capacity after DNA damaging treatment, as well as information about chromosomal alterations during the multi-passages cultivating process, is sparse. This information has a high importance to establish a culture model for primary cells of the respiratory epithelium. This work aimed to explore the DNA stability and regeneration capacity over three passages after genotoxic treatment compared for both culture models. Moreover, the chromosome stability during cultivating process and the functional activity should be verified.

For this purpose, a series of toxicological experiments was conducted. For both models, primary cells of 10 different donors were cultivated over three passages. The comet assay was applied to analyze the baseline DNA damage, the damage after one hour of treatment with 300 μ l of the alkylating agent Methylmethanesulfonate (MMS) and the residual damage after a regeneration period of 24 hours. Moreover, the chromosomal stability throughout the cultivating process was verified by using chromosomal aberration tests for the untreated cells. An Interleukin-8 (IL-8) ELISA was conducted in ten experiments of each model during the first passage to assess an efficient cellular function. Hence, we examined the concentration of IL-8 in supernatant of the untreated cell cultures, as well as after exposure with 1 μ g/ml and 10 μ g/ml of Lipopolysaccharide (LPS). Within the coculture, we examined both cell types jointly and separately for epithelial cells and fibroblast cells. We performed Scanning Electron Microscope (SEM) images of both models to detect kinocilia. To detect the fibroblast

contamination in the monoculture, vimentin staining was performed for three passages in a single test.

The results of the comet assay revealed a good regenerative capacity of DNA integrity after MMS-induced DNA damage in both models for all passages. The enzyme Methylpurineglykosylase (MPG), which is part of the Base excision repair (BER) could be detected in a single test. Differences were seen within the cultivability of both methods. The monoculture showed a good cultivability for all passages. However, the vimentin staining proved a contamination with fibroblasts from the very first passage. Furthermore, an increase of the fibroblast amount in the higher passages was observed. This leads to the conclusion, that the monoculture model is not a pure culture of respiratory epithelium. Instead, the coculture enables a separate culture of fibroblasts and epithelial cells. Nevertheless, the coculture showed a worse cultivability. Applicability of the chromosomal aberration test for nasal mucosa cells could be proved for the first time in a large number of samples. Although the chromosomal aberration test showed a certain baseline damage over all passages, further tests should be done to verify the tendency. Furthermore, aspects of cell functionality were evaluated. The results of the IL-8 ELISA proved the functional activity in both methods. Further, the SEM images exemplary verified kinocilia differentiation.

In summary, our findings deliver important information about the stability and regenerative capacity of the used cell culture models. Especially, data of chromosomal modifications should be examined in the near future. Furthermore, it would be of great interest to examine these cell characteristics within cell cultures of PCD donors.

7. Anhang

7.1 Verwendete Materialien

7.1.1 Geräte und Software

Tabelle 23: Geräte und Software

Geräte	Firma, Ort
Autoklav	SHP Steriltechnik AG, Magdeburg, Deutschland
BD FACSCanto flow cytometer	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Brutschränke CO ₂ Inkubator NU5500E CO ₂ Inkubator Serie CB	NuAire Inc., Plymouth, USA Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Elektrophoresekammer	Renner, Dannstadt, Deutschland
Elektrophoresenetzgerät, EV202	Consort, Turnhout, Belgien
ELISA Mikroplatten Reader, ELx800	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Deutschland
Fluoreszenzlampen, ebq 100 ISOLATED	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Fluoreszenzmikroskop, DM4.000B	Leica, Herbrugg, Schweiz
Heizplatte	CAT/ M. Zipperer GmbH, Staufen, Deutschland
Inkubator	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Küvetten	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Mikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikrowelle	Bauknecht, Schorndorf, Deutschland
Pipettierhilfe	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Schüttelinkubator, Mixing Block MB-102	BIOER technology, Hangzhou, China
Sterile Werkbank, HERAsafe	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland
Vortex, Advamced VR Vortex Mixer ZX4	VELP Scientifica, Usmate, Italien
Waagen	August Sauter, Ebingen, Deutschland

Wasserbad WNB 7-45	Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland
Zählkammer nach Neubauer	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Zentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Software	Firma, Ort
Adobe Photoshop Element	Adope Systems Software, Dublin, Irland
FlowJo	FlowJo LLC, Oregon, USA
Gen5 Datenanalyse-Software	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Deutschland
IBM SPSS Statistics 24	IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland
Komet 5.5	Kinetic Imaging, Liverpool, Großbritannien
LAS V4.8	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA

7.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 24: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Firma, Ort
Deckgläser (24x32mm)	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Einmalpipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Objektträger (76x26 mm)	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Pasteurpipetten	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland

Pen Liquid Blocker	Science Services GmbH, München, Deutschland
Petrischalen (100x20mm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen (0,5-10µl, 200µl, 1.000µl)	Sarstedt AG&CO, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Sarstedt AG&CO, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsröhrchen (15ml, 50ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsröhren (5ml) für Durchflusszytometrie	Sarstedt AG&CO, Nümbrecht, Deutschland
sterile Kompresse (7,5x7,5cm)	Lohmann&Rauscher GmbH&Co. KG, Rengsdorf, Deutschland
Transwells (12mm) mit 0,4µm Polyester Membran Inserts (12 Wellplatten)	Corning Incorporated, Corning, New York, USA
Zellkulturflaschen (50ml, 25cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

7.1.3 Laborreagenzien

Tabelle 25: Laborreagenzien

Chemikalien	Firma, Ort
1,4-Diazabicyclooctan (DABCO) 97%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Aceton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Agarose Medium elektroendosmotisch (MEEO)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Agarose Typ VII low melting point (LMP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488)	Abcam plc, Cambridge, Großbritannien
Anti-MPG-Antikörper	Abcam plc, Cambridge, Großbritannien
Anti-Rabbit IgG (Alexa Fluor® 555)	Merck Millipore, Billerica, USA
Aqua bidestillata	Eigenherstellung
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Colcemid	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O)	Merck Biosciences, Schwalbach, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific), Waltham, USA
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Entellan	Merck Biosciences, Schwalbach, Deutschland
Essigsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Fötales Kälber Serum (FCS)	Linaris, Wertheim, Deutschland
Fungizid/Amphotericin B	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Gel-Red	Biotium, Californien, USA
Gentamicin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Giemsas Azur-Eosin-Methylenblau	Merck Biosciences, Schwalbach, Deutschland
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Human IL-8 ELISA Kit	Diaclone SAS, Besancon, Frankreich

Kaliumchlorid (KCl)	Merck Biosciences ,Schwalbach, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck Biosciences,Schwalbach, Deutschland
Kollagen A (1mg/ml)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
L-Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Lipopolysaccharides from Escherichia coli (LPS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Methylmethansulfonat (MMS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Mowiol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
N-Lauroylsarcosine Na-Salz (30%)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat (NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O)	Merck Biosciences, Schwalbach, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH) Plätzchen	Merck Biosciences, Schwalbach, Deutschland
Natriumpyruvat	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Nicht essentielle Aminosäuren	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Penicillin-Streptomycin (1.000U/1.000µg/ml)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) 10-fach	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Salzsäure rauchend (>37%) (HCl)	Merck Biosciences, Schwalbach, Deutschland

Trishydroxymethyl-aminomethan (TRIS)	Merck Biosciences, Schwalbach, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Trypan 0,4% Blue Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Tween20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Vimentin (Anti-Rabbit)	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande

Nährmedien	Firma, Ort
Bronchial Epithelial Growth Medium (BEGM) mit Supplement Packung	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Minimum Essential Medium Eagle (MEM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Enzyme	Firma, Ort
Collagenase NB4 standard grade	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
DNase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Protease	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Trypsin 2,5%	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

7.2 Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 26: Abkürzungen

Abkürzung	Auflösung
µg	Mikrogramm
°C	Grad Celsius

Abb.	Abbildung
BEGM	Bronchial epithelial growth medium
BER	Basenexzisionsreparatur
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
d. h.	das heißt
DABCO	1,4-diazabicyclo(2.2.2)octan
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMT	Epithelio-mesenchymalen Transition
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fötale Kälber Serum
FSC	Forward scatter
g	Gramm
g	Normalerdschwerebeschleunigung
H	Stunde
HRP	Streptavidin-Horseradish Peroxidase
IL	Interleukin
IFN- γ	Interferon gamma
l	Liter
LMP	Low melting point
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar
mA	Milliampere
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar

MMR	Mismatch Reparatur
MMS	Methylmethansulfonat
MPG	Methylpuringlykosylase
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
nm	Nanometer
NMP	Normal melting point
nNO	Nasaler Stickstoff
NSH	Nasenschleimhaut
OTM	Olive tail moment
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCD	Primäre Ziliendyskinesie
PFA	Paraformaldehyd
pg	Picogramm
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SSC	Sidewards scatter
TBST	Tris-buffered saline with Tween20
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TRIS	Trishydroxymethyl-aminomethan
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
V	Volt
z. B.	zum Beispiel

7.3 Datenübersicht

7.3.1 Comet Assay

Tabelle 27: Datensatz Comet Assay für beide Methoden

Proband	Passage	Methode ¹	Schädigung negativ	Schädigung 24h	Schädigung 1h
1	0	1	1,0502	1,4534	4,0167
1	0	2	-	-	-
2	0	1	0,7129	1,5740	6,0728
2	0	2	-	-	-
3	0	1	0,7170	1,0623	4,3178

3	0	2	-	-	-
4	0	1	0,9040	0,7032	7,7402
4	0	2	-	-	-
5	0	1	1,5192	4,8652	6,6310
5	0	2	-	-	-
6	0	1	0,9725	2,3954	8,3935
6	0	2	-	-	-
7	0	1	0,9863	1,5809	6,1200
7	0	2	-	-	-
8	0	1	0,7894	2,4642	1,7090
8	0	2	-	-	-
9	0	1	0,6611	3,9301	5,2405
9	0	2	-	-	-
10	0	1	0,8358	0,4589	3,1145
10	0	2	-	-	-
1	1	1	1,3228	1,9525	4,3749
1	1	2	1,1929	0,6983	3,9390
2	1	1	0,5671	1,2961	2,7340
2	1	2	0,5950	1,1094	3,3981
3	1	1	1,2791	1,9094	8,4638
3	1	2	1,3647	2,7653	4,3179
4	1	1	0,6592	0,8942	2,6126
4	1	2	2,4654	3,4618	4,5597
5	1	1	1,6100	1,6993	4,9502
5	1	2	1,1662	1,4772	2,2371
6	1	1	0,6209	0,6923	2,5457
6	1	2	0,5753	1,1274	3,9382
7	1	1	0,6880	2,7111	3,0552
7	1	2	0,7680	1,3138	4,3518
8	1	1	0,5817	1,8425	2,7011
8	1	2	1,2198	2,5568	4,7338
9	1	1	0,5405	0,4474	3,4386
9	1	2	0,5787	0,9531	2,8853
10	1	1	0,4110	1,0231	1,7962
10	1	2	0,5646	0,7326	2,4401
1	2	1	0,8374	1,3394	4,0851
1	2	2	0,6562	1,3561	5,0168
2	2	1	0,6183	1,4468	6,1859
2	2	2	1,6478	1,2121	2,7092
3	2	1	0,9870	1,5691	2,5075
3	2	2	0,7123	0,9229	3,0273
4	2	1	1,0524	2,7681	3,6144
4	2	2	-	-	-
5	2	1	2,2235	4,6207	5,5131
5	2	2	1,4471	3,1512	8,3454
6	2	1	0,5368	1,6866	4,9857
6	2	2	0,7447	1,7983	5,2039
7	2	1	2,2369	2,0160	5,2666

7	2	2	1,2479	1,1442	5,2747
8	2	1	0,6928	1,1134	2,4828
8	2	2	-	-	-
9	2	1	0,7736	1,0539	2,4133
9	2	2	1,2155	1,6481	3,3081
10	2	1	0,5949	1,6247	3,1538
10	2	2	0,5295	1,0921	2,9530
1	3	1	-	-	-
1	3	2	-	-	-
2	3	1	0,8822	1,0733	3,4292
2	3	2	0,4814	0,9062	2,2886
3	3	1	0,8442	2,1509	3,0209
3	3	2	1,1242	1,5450	6,0443
4	3	1	0,7615	0,9045	5,2645
4	3	2	-	-	-
5	3	1	0,7600	0,7595	4,7184
5	3	2	-	-	-
6	3	1	0,6870	1,2009	3,8667
6	3	2	1,0053	1,2634	5,4123
7	3	1	0,6405	0,7302	3,2741
7	3	2	-	-	-
8	3	1	1,8632	3,5058	7,0554
8	3	2	-	-	-
9	3	1	1,2191	2,4235	4,6459
9	3	2	0,9582	1,5238	3,1102
10	3	1	0,6183	1,0968	2,9964
10	3	2	0,9929	1,3978	5,3126

¹ unter Methoden wird zwischen der Monokultur =1 und der Cokultur =2 unterschieden

7.3.2 II-8 ELISA

Tabelle 28: Datensatz ELISA IL-8-Konzentrationen nach LPS-Stimulation getrennt nach Methoden

Versuch	Methode ¹	Negativ	1 µg/ml	10 µg/ml
1	1	78,375	197,125	497,125
2	1	53,375	162,4375	492,125
3	1	0,0000	0,0000	188,3929
4	1	0,0000	0,0000	140,8929
5	1	0,0000	88,03571	259,8214
6	1	0,0000	109,4643	249,8214
7	1	27,96154	257,5769	683,3462
8	1	51,80769	246,8077	696,8077
9	1	117,6786	285,5357	944,8214
10	1	160,8929	266,6071	955,1786

1	2	416,9643	461,6071	342,6786
2	2	438,0357	525,5357	365,1786
3	2	368,0357	267,6786	623,75
4	2	445,1786	259,8214	612,3214
5	2	107,6786	225,8929	834,1071
6	2	136,6071	205,5357	839,4643
7	2	375,6538	794,8846	982,5769
8	2	416,8077	892,9615	1111,423
9	2	131,25	508,75	689,1071
10	2	105,5357	373,5357	737,6786

¹ unter Methoden wird zwischen der Monokultur =1 und der Cokultur =2 unterschieden

IL-8 ELISA Cokultur: getrennt Epithelzellen, Fibroblasten

Tabelle 29: Datensatz ELISA IL-8-Konzentration nach LPS-Stimulation getrennt nach Zellart

Proband	Zellart ²	Negativ	1 µg/ml	10 µg/ml
1	1	0,0000	5,586207	51,44828
2	1	0,0000	12,48276	57,31034
3	1	314,5517	499,3793	742,1379
4	1	335,2414	511,4483	774,5517
5	1	81,10345	90,75862	236,2759
6	1	83,86207	91,7931	244,2069
7	1	189,7241	116,2759	279,3793
8	1	181,7931	111,1034	241,7931
9	1	186,6207	286,2759	473,8621
10	1	197,3103	292,8276	468
1	2	15,93103	0,0000	85,24138
2	2	14,2069	6,275862	85,24138
3	2	382,1379	573,8621	764,8966
4	2	389,7241	567,3103	783,5172
5	2	281,4483	351,1034	358
6	2	265,5862	351,7931	370,7586
7	2	157,3103	179,7241	441,4483
8	2	175,5862	184,8966	499,3793
9	2	73,51724	40,41379	297,6552
10	2	96,62069	34,89655	299,0345

² unter Zellart wird zwischen Epithelzellen =1 und Fibroblasten =2 unterschieden

7.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: schematischer Aufbau der <i>Tunica mucosa</i> der Nase.....	2
Abbildung 2: Aufbau Kinozilien im Querschnitt mit 9x2+2 Struktur	3
Abbildung 3: schematische Darstellung des empfohlenen Algorithmus zur Diagnostik der PCD	5
Abbildung 4: schematischer Ablauf der Basenexzisionsreparatur (BER):	12
Tabelle 1: Übersicht Rauchstatus Spender NSH	15
Abbildung 5: Übersicht Ablauf der Zellisolierung und -Kultivierung in der Monokultur über drei Passagen (Passage 0-3).....	17
Abbildung 6: Übersicht Versuchsablauf Isolierungs- und Kultivierungsmethode in der Cokultur über drei Passagen (1-3).....	18
Abbildung 7: Zellkultivierung im Cokulturverfahren	19
Abbildung 8: Zellkulturen im Transwell System: 12-Well-Platten mit Polyester-membraneinsätzen.....	20
Abbildung 9 a/b: Zellkulturen in Transwells nach dem siebten Tag der Kultivierung	20
Abbildung 10: Bild eines geschädigten Zellkerns mit starker Fragmentierung.....	25
Abbildung 11: Bild eines Zellkerns mit geringer Fragmentierung.....	25
Abbildung 12: kultivierte Epithelzellen auf Objektträgern im Vierkammersystem mit BEGM	26
Abbildung 13: Beispielbild für die Auswertung des Chromosomenaberrationstests im Lichtmikroskop	28
Abbildung 14: Skizze Boxplot.....	35
Tabelle 2: deskriptive Statistik der OTM-Werte aus dem Comet Assay der Monokultur Isolierungs- und Kultivierungsmethode	36
Tabelle 3: Übersicht der verarbeiteten Fälle der Monokultur Isolierungs- und Kultivierungsmethode	37
Abbildung 15: Monokultur Isolierungs- und Kultivierungsmethode über drei Passagen.	38
Tabelle 4: Statistik Wilcoxon-Test Monokultur	38
Tabelle 5: Wilcoxon-Test Negativkontrolle Monokultur	39
Tabelle 6: deskriptive Statistik der OTM-Werte aus dem Comet Assays der Cokultur Isolierungs- und Kultivierungsmethode.....	40
Tabelle 7: Übersicht der verarbeiteten Fälle der Cokultur Isolierungs- und Kultivierungsmethode.....	40
Abbildung 16: Cokultur Isolierungs- und Kultivierungsmethode über drei Passagen.....	41
Tabelle 8: Statistik Wilcoxon-Test Cokultur.....	41

Tabelle 9: Wilcoxon-Test Negativkontrolle Cokultur.....	42
Tabelle 10: Wilcoxon-Test zum Vergleich beider Methoden	43
Tabelle 11: Häufigkeiten Chromosomenaberrationstest Monokultur	43
Abbildung 17: grafische Darstellung der Häufigkeiten im Chromosomenaberrationstest über drei Passagen in der Monokultur Methode.....	44
Tabelle 12: Häufigkeiten Chromosomenaberrationstest Cokultur.....	45
Abbildung 18: grafische Darstellung der Häufigkeiten im Chromosomenaberrationstest über drei Passagen der Epithelzellen in der Cokultur Methode.	46
Tabelle 13: deskriptive Statistik IL-8 ELISA Monokultur.....	47
Abbildung 19: Interleukin-8-Konzentrationen, gemessen im Überstand der Monokultur in der nullten Passage unbehandelt und nach LPS-Stimulation (1µg/ml bzw. 10µg/ml).....	47
Tabelle 14: Wilcoxon-Test ELISA Monokultur.....	48
Tabelle 15: deskriptive Statistik IL-8 ELISA Cokultur	48
Abbildung 20: Interleukin-8-Konzentration im Überstand der Cokultur (Fibroblasten und Epithelzellen) in der ersten Passage unbehandelt und nach LPS-Stimulation (1µg/ml bzw. 10µg/ml).	49
Tabelle 16: Wilcoxon-Test ELISA Cokultur (Fibroblasten und Epithelzellen).....	49
Tabelle 17: Mann-Whitney-U-Test zum Vergleich beider Methoden.....	50
Tabelle 18: deskriptive Statistik IL-8 ELISA: Epithelzellen der Cokultur	50
Abbildung 21: Interleukin-8-Konzentration im Überstand der Epithelzellen in der Cokultur in der ersten Passage unbehandelt und nach LPS-Stimulation (1µg/ml bzw. 10µg/ml).	51
Tabelle 19: deskriptive Statistik IL-8 ELISA: Fibroblasten der Cokultur	51
Abbildung 22: Interleukin-8-Konzentration im Überstand der Fibroblasten in der Cokultur in der ersten Passage unbehandelt und nach LPS-Stimulation (1µg/ml bzw. 10µg/ml).	52
Tabelle 20: Wilcoxon-Test Epithelzellen Cokultur	52
Tabelle 21: Wilcoxon-Test Fibroblasten Cokultur.....	52
Tabelle 22: Mann-Whitney-U-Test zum Vergleich beider Zelltypen der Cokultur	53
Abbildung 23: Durchflusszytometrie: Negativkontrolle der Epithelzellen ohne Anti-MPG.....	53
Abbildung 24: Durchflusszytometrie der Epithelzellen mit Anti-MPG und Alexa Fluor® 488	54
Abbildung 25: Vimentinfärbung zum Fibroblastennachweis in der Monokultur Isolierungs- und Kultivierungsmethode über drei Passagen.....	55
Abbildung 26: REM Aufnahmen zum Nachweis der Ausbildung von ziliären Strukturen in der jeweils ersten Kultivierungspassage (Monokultur: Passage 0, Cokultur: Passage 1).....	56
Abbildung 27: REM Aufnahme zum Nachweis von dichtem Flimmerepithel.....	57

Tabelle 23: Geräte und Software	76
Tabelle 24: Verbrauchsmaterialien.....	77
Tabelle 25: Laborreagenzien.....	78
Tabelle 26: Abkürzungen	81
Tabelle 27: Datensatz Comet Assay für beide Methoden	83
Tabelle 28: Datensatz ELISA IL-8-Konzentrationen nach LPS-Stimulation getrennt nach Methoden	85
Tabelle 29: Datensatz ELISA IL-8-Konzentration nach LPS-Stimulation getrennt nach Zellart	86

7.5 Literaturangabe

- Afzelius BA, 1976, A human syndrome caused by immotile cilia, *Science*, 193: 317-9.
- Alberty J, Stoll W and Rudack C, 2006, The effect of endogenous nitric oxide on mechanical ciliostimulation of human nasal mucosa, *Clin Exp Allergy*, 36: 1254-9.
- Bai S, Yang T, Abbruscato TJ and Ahsan F, 2008, Evaluation of human nasal RPMI 2650 cells grown at an air-liquid interface as a model for nasal drug transport studies, *J Pharm Sci*, 97: 1165-78.
- Bajpayee M, Dhawan A, Parmar D, Pandey AK, Mathur N and Seth PK, 2002, Gender-related differences in basal DNA damage in lymphocytes of a healthy Indian population using the alkaline Comet assay, *Mutat Res*, 520: 83-91.
- Barbato A, Frischer T, Kuehni CE, Snijders D, Azevedo I, Baktai G, Bartoloni L, Eber E, Escribano A, Haarman E, Hesselmar B, Hogg C, Jorissen M, Lucas J, Nielsen KG, O'Callaghan C, Omran H, Pohunek P, Strippoli MP and Bush A, 2009, Primary ciliary dyskinesia: a consensus statement on diagnostic and treatment approaches in children, *Eur Respir J*, 34: 1264-76.
- Beranek DT, 1990, Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents, *Mutat Res*, 231: 11-30.
- Biddle D and Spandau DF, 1996, Expression of vimentin in cultured human keratinocytes is associated with cell - extracellular matrix junctions, *Arch Dermatol Res*, 288: 621-4.
- Boysen G, Pachkowski BF, Nakamura J and Swenberg JA, 2009, The formation and biological significance of N7-guanine adducts, *Mutat Res*, 678: 76-94.
- Castro-Munozledo F, Velez-DelValle C, Marsch-Moreno M, Hernandez-Quintero M and Kuri-Harcuch W, 2015, Vimentin is necessary for colony growth of human diploid keratinocytes, *Histochem Cell Biol*, 143: 45-57.
- Chapelin C, Coste A, Reinert P, Boucherat M, Millepied MC, Poron F and Escudier E, 1997, Incidence of primary ciliary dyskinesia in children with recurrent respiratory diseases, *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 106: 854-8.

- de Jong PM, van Sterkenburg MA, Hesseling SC, Kempenaar JA, Mulder AA, Mommaas AM, Dijkman JH and Ponec M, 1994, Ciliogenesis in human bronchial epithelial cells cultured at the air-liquid interface, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 10: 271-7.
- Feriani L, Juenet M, Fowler CJ, Bruot N, Chioccioli M, Holland SM, Bryant CE and Cicuta P, 2017, Assessing the Collective Dynamics of Motile Cilia in Cultures of Human Airway Cells by Multiscale DDM, *Biophys J*, 113: 109-19.
- Friehs G, 2010, *Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades: Genotoxizität von Nikotin in humanem Speicheldrüsengewebe.*
- Frischer T, 2009, Die primäre Ziliendyskinesie, *Wien Klin Wochens*, 121: 601-03.
- Fritsch P, 2009, *Dermatologie und Venerologie für das Studium* (Springer).
- Fulcher ML, Gabriel SE, Olsen JC, Tatreau JR, Gentzsch M, Livanos E, Saavedra MT, Salmon P and Randell SH, 2009, Novel human bronchial epithelial cell lines for cystic fibrosis research, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 296: L82-91.
- Gehrke T, Scherzad A, Hackenberg S, Ickrath P, Schendzielorz P, Hagen R and Kleinsasser N, 2017, Long-term changes in the properties of skin-derived fibroblasts following irradiation of the head and neck, *Oncol Lett*, 14: 3780-86.
- Ginzkey C, Friehs G, Koehler C, Hackenberg S, Voelker HU, Richter E and Kleinsasser NH, 2010, Nicotine and methyl methane sulfonate in mini organ cultures of human parotid gland tissue, *Toxicol Lett*, 197: 69-74.
- Ginzkey C, Stueber T, Friehs G, Koehler C, Hackenberg S, Richter E, Hagen R and Kleinsasser N, 2012, Analysis of nicotine-induced DNA damage in cells of the human respiratory tract, *Toxicol Lett*, 208: 23-9.
- Goodpaster T, Legesse-Miller A, Hameed MR, Aisner SC, Randolph-Habecker J and Coller HA, 2008, An immunohistochemical method for identifying fibroblasts in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue, *J Histochem Cytochem*, 56: 347-58.
- Gorer PA and Ogorman P, 1956, The Cytotoxic Activity of Isoantibodies in Mice, *Transplantation Bulletin*, 3: 142-43.
- Greenburg G and Hay ED, 1982, Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells, *J Cell Biol*, 95: 333-9.
- Hackenberg S, Scherzed A, Kessler M, Hummel S, Technau A, Froelich K, Ginzkey C, Koehler C, Hagen R and Kleinsasser N, 2011a, Silver nanoparticles: evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells, *Toxicol Lett*, 201: 27-33.
- Hackenberg S, Zimmermann FZ, Scherzed A, Friehs G, Froelich K, Ginzkey C, Koehler C, Burghartz M, Hagen R and Kleinsasser N, 2011b, Repetitive exposure to zinc oxide nanoparticles induces dna damage in human nasal mucosa mini organ cultures, *Environ Mol Mutagen*, 52: 582-9.
- Haghi M, Ong HX, Traini D and Young P, 2014, Across the pulmonary epithelial barrier: Integration of physicochemical properties and human cell models to study pulmonary drug formulations, *Pharmacol Ther*, 144: 235-52.
- Hirst RA, Jackson CL, Coles JL, Williams G, Rutman A, Goggin PM, Adam EC, Page A, Evans HJ, Lackie PM, O'Callaghan C and Lucas JS, 2014, Culture of primary ciliary

- dyskinesia epithelial cells at air-liquid interface can alter ciliary phenotype but remains a robust and informative diagnostic aid, *PLoS One*, 9: e89675.
- Ickrath P, Ickrath K, Steinke M, Scherzad A, Kleinsasser N, Lodes N, Bregenzer M, Hagen R and Hackenberg S, 2020, DNA Stability, Regeneration Capacity, and Mucociliary Differentiation of Human Nasal Mucosa Cells in Tissue Systems, *Tissue Eng Part A*.
- Jakiela B, Brockman-Schneider R, Amineva S, Lee WM and Gern JE, 2008, Basal cells of differentiated bronchial epithelium are more susceptible to rhinovirus infection, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 38: 517-23.
- Kleinsasser NH, Juchhoff J, Wallner B, Bergner A, A H, Gamarra F, Bührlen M, Huber RM and Rettenmeier AW, 2004, The use of mini-organ cultures of human upper aerodigestive tract epithelia in ecogenotoxicology, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 561: 63-73.
- Kleinsasser NH, Gamarra F, Bergner A, Wallner BC, Harreus UA, Juchhoff J, Kastenbauer ER and Huber RM, 2001, Genotoxicity of nitroso compounds and sodium dichromate in a model combining organ cultures of human nasal epithelia and the comet assay, *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 63: 141-7.
- Kleinsasser NH, Juchhoff J, Wallner BC, Bergner A, Harreus UA, Gamarra F, Bührlen M, Huber RM and Rettenmeier AW, 2004, The use of mini-organ cultures of human upper aerodigestive tract epithelia in ecogenotoxicology, *Mutat Res*, 561: 63-73.
- Knight DA and Holgate ST, 2003, The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease, *Respirology*, 8: 432-46.
- Knowles MR, Daniels LA, Davis SD, Zariwala MA and Leigh MW, 2013, Primary ciliary dyskinesia. Recent advances in diagnostics, genetics, and characterization of clinical disease, *Am J Respir Crit Care Med*, 188: 913-22.
- Koch H-G, Brix J and Heinrich PC, 2014, DNA-Mutationen und ihre Reparatur, *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie* (Springer Berlin Heidelberg).
- Koehler C TS, Ginzkey C, Hackenberg S, Scherzad A, Burghartz M, Paulus M, Hagen R, Kleinsasser NH, 2013, Nitrogen dioxide is genotoxic in urban concentrations, *Inhal Toxicol.*, 25(6): 341-47.
- Kuehni CE and Lucas JS, 2017, Diagnosis of primary ciliary dyskinesia: summary of the ERS Task Force report, *Breathe (Sheff)*, 13: 166-78.
- Larson K, Sahn J, Shenkar R and Strauss B, 1985, Methylation-induced blocks to in vitro DNA replication, *Mutat Res*, 150: 77-84.
- Lee DDH, Cardinale D, Nigro E, Butler CR, Rutman A, Fassad MR, Hirst RA, Moulding D, Agrotis A, Forsythe E, Peckham D, Robson E, Smith CM, Somavarapu S, Beales PL, Hart SL, Janes SM, Mitchison HM, Ketteler R, Hynds RE and O'Callaghan C, 2020, High-content screening for rare respiratory diseases: readthrough therapy in primary ciliary dyskinesia, *bioRxiv*: 2020.02.28.959189.
- Lesic I, Maurer E, Strippoli MP, Kuehni CE, Barbato A, Frischer T and children ERSToPCDi, 2009, Primary ciliary dyskinesia (Pcd) in Austria, *Wien Klin Wochenschr*, 121: 616-22.
- Lodes N, Seidensticker K, Perniss A, Nietzer S, Oberwinkler H, May T, Walles T, Hebestreit H, Hackenberg S and Steinke M, 2019, Investigation on Ciliary

Functionality of Different Airway Epithelial Cell Lines in Three-Dimensional Cell Culture, *Tissue Eng Part A*.

- Lopez-Souza N, Avila PC and Widdicombe JH, 2003, Polarized cultures of human airway epithelium from nasal scrapings and bronchial brushings, *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 39: 266-9.
- Lopez-Souza N, Dolganov G, Dubin R, Sachs LA, Sassina L, Sporer H, Yagi S, Schnurr D, Boushey HA and Widdicombe JH, 2004, Resistance of differentiated human airway epithelium to infection by rhinovirus, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 286: L373-81.
- Lucas J BA, Mitchison HM, Moya E, Williamson M and Hogg C, 2014, Diagnosis and management of primary ciliary dyskinesia, *Archives of Disease in Childhood*.
- Lucas JS, Barbato A, Collins SA, Goutaki M, Behan L, Caudri D, Dell S, Eber E, Escudier E, Hirst RA, Hogg C, Jorissen M, Latzin P, Legendre M, Leigh MW, Midulla F, Nielsen KG, Omran H, Papon JF, Pohunek P, Redfern B, Rigau D, Rindlisbacher B, Santamaria F, Shoemark A, Snijders D, Tonia T, Titieni A, Walker WT, Werner C, Bush A and Kuehni CE, 2017, European Respiratory Society guidelines for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia, *Eur Respir J*, 49.
- Lucas JS, Burgess A, Mitchison HM, Moya E, Williamson M, Hogg C and National Pcd Service UK, 2014, Diagnosis and management of primary ciliary dyskinesia, *Arch Dis Child*, 99: 850-6.
- Lüllmann-Rauch R, 2012, *Taschenlehrbuch Histologie* (Georg Thieme Verlag KG).
- Maluf SW and Erdtmann B, 2000, Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis assay, *Mutat Res*, 471: 21-7.
- Meeks M and Bush A, 2000, Primary ciliary dyskinesia (PCD), *Pediatr Pulmonol*, 29: 307-16.
- Mickler JA, 2015, *Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades: Veränderungen von mesenchymalen Stammzellen des Fettgewebes auf DNA- und Chromatidebene während ihrer Expansion in vitro*.
- Miller B, Potter-Locher F, Seelbach A, Stopper H, Utesch D and Madle S, 1998, Evaluation of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the in vitro micronucleus test. Gesellschaft für Umwelt-Mutations-forschung, *Mutat Res*, 410: 81-116.
- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B and Krepler R, 1982, The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells, *Cell*, 31: 11-24.
- Nikolova T, Ensminger M, Lobrich M and Kaina B, 2010, Homologous recombination protects mammalian cells from replication-associated DNA double-strand breaks arising in response to methyl methanesulfonate, *DNA Repair (Amst)*, 9: 1050-63.
- O'Callaghan C, Chilvers M, Hogg C, Bush A and Lucas J, 2007, Diagnosing primary ciliary dyskinesia, *Thorax*, 62: 656-7.

- Ochs K, Sobol RW, Wilson SH and Kaina B, 1999, Cells deficient in DNA polymerase beta are hypersensitive to alkylating agent-induced apoptosis and chromosomal breakage, *Cancer Res*, 59: 1544-51.
- Olive PL, Banath JP and Durand RE, 1990, Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay, *Radiat Res*, 122: 86-94.
- Ong HX, Jackson CL, Cole JL, Lackie PM, Traini D, Young PM, Lucas J and Conway J, 2016, Primary Air-Liquid Interface Culture of Nasal Epithelium for Nasal Drug Delivery, *Mol Pharm*, 13: 2242-52.
- Pifferi M, Montemurro F, Cangiotti AM, Ragazzo V, Di Cicco M, Vinci B, Vozzi G, Macchia P and Boner AL, 2009, Simplified cell culture method for the diagnosis of atypical primary ciliary dyskinesia, *Thorax*, 64: 1077-81.
- Preston RJ, Au W, Bender MA, Brewen JG, Carrano AV, Heddle JA, McFee AF, Wolff S and Wassom JS, 1981, Mammalian in vivo and in vitro cytogenetic assays: a report of the U.S. EPA's gene-tox program, *Mutat Res*, 87: 143-88.
- Preston RJ, San Sebastian JR and McFee AF, 1987, The in vitro human lymphocyte assay for assessing the clastogenicity of chemical agents, *Mutat Res*, 189: 175-83.
- Rassow J, Deutzmann R, Netzker R and Hauser K, 2012, *Biochemie Duale Reihe* (Thieme).
- Rayner CF, Rutman A, Dewar A, Greenstone MA, Cole PJ and Wilson R, 1996, Ciliary disorientation alone as a cause of primary ciliary dyskinesia syndrome, *Am J Respir Crit Care Med*, 153: 1123-9.
- Rogel MR, Soni PN, Troken JR, Sitikov A, Trejo HE and Ridge KM, 2011, Vimentin is sufficient and required for wound repair and remodeling in alveolar epithelial cells, *FASEB J*, 25: 3873-83.
- Rossi A, FD, Egnér S., Scheinlin M., Steinke M., Walles H., 2014, Humane 3D-in-vitro-Testsysteme für die präklinische Forschung, *BIOspektrum*, 20: 404-06.
- Sajjan U, Keshavjee S and Forstner J, 2004, Responses of well-differentiated airway epithelial cell cultures from healthy donors and patients with cystic fibrosis to *Burkholderia cenocepacia* infection, *Infect Immun*, 72: 4188-99.
- Schartl M, 2009, *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen* (Elsevier, Urban & Fischer).
- Schinzel A and Schmid W, 1976, Lymphocyte chromosome studies in humans exposed to chemical mutagens. The validity of the method in 67 patients under cytostatic therapy, *Mutat Res*, 40: 139-66.
- Schogler A, Blank F, Brugger M, Beyeler S, Tschanz SA, Regamey N, Casaulta C, Geiser T and Alves MP, 2017, Characterization of pediatric cystic fibrosis airway epithelial cell cultures at the air-liquid interface obtained by non-invasive nasal cytology brush sampling, *Respir Res*, 18: 215.
- Schweinlin M, Rossi A, Lodes N, Lotz C, Hackenberg S, Steinke M, Walles H and Groeber F, 2017, Human barrier models for the in vitro assessment of drug delivery, *Drug Deliv Transl Res*, 7: 217-27.

- Shiozawa A, Miwa M, Ono N, Homma H, Hirotsu M and Ikeda K, 2015, Comparative analysis of cytokine release from epithelial cell cultures of the upper airway, *Rhinology*, 53: 135-41.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR and Schneider EL, 1988, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp Cell Res*, 175: 184-91.
- Sonoda E, Sasaki MS, Buerstedde JM, Bezzubova O, Shinohara A, Ogawa H, Takata M, Yamaguchi-Iwai Y and Takeda S, 1998, Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death, *EMBO J*, 17: 598-608.
- Speit G and Hartmann A, 1995, The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay), *Mutagenesis*, 10: 555-9.
- Steinke M, Gross R, Walles H, Gangnus R, Schutze K and Walles T, 2014, An engineered 3D human airway mucosa model based on an SIS scaffold, *Biomaterials*, 35: 7355-62.
- Stokes AB, Kieninger E, Schogler A, Kopf BS, Casaulta C, Geiser T, Regamey N and Alves MP, 2014, Comparison of three different brushing techniques to isolate and culture primary nasal epithelial cells from human subjects, *Exp Lung Res*, 40: 327-32.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC and Sasaki YF, 2000, Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ Mol Mutagen*, 35: 206-21.
- Tice RR, Andrews PW, Hirai O and Singh NP, 1991, The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells, *Adv Exp Med Biol*, 283: 157-64.
- Toskala E, Haataja J, Shirasaki H and Rautiainen M, 2005, Culture of cells harvested with nasal brushing: a method for evaluating ciliary function, *Rhinology*, 43: 121-4.
- Ulfig N, 2015, *Kurzlehrbuch Histologie* (Georg Thieme Verlag).
- Velez-delValle C, Marsch-Moreno M, Castro-Munozledo F, Galvan-Mendoza IJ and Kuri-Harcuch W, 2016, Epithelial cell migration requires the interaction between the vimentin and keratin intermediate filaments, *Sci Rep*, 6: 24389.
- Watson JD and Crick FH, 1953, Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid, *Nature*, 171: 737-8.
- Werner C, Onnebrink JG and Omran H, 2015, Diagnosis and management of primary ciliary dyskinesia, *Cilia*, 4: 2.
- Widdicombe JH, Sachs LA, Morrow JL and Finkbeiner WE, 2005, Expansion of cultures of human tracheal epithelium with maintenance of differentiated structure and function, *Biotechniques*, 39: 249-55.
- Wijers CD, Chmiel JF and Gaston BM, 2017, Bacterial infections in patients with primary ciliary dyskinesia: Comparison with cystic fibrosis, *Chron Respir Dis*, 14: 392-406.
- Wisniewski L, Jornot L, Dudez T, Pagano A, Rochat T, Lacroix JS, Suter S and Chanson M, 2006, Long-term cultures of polarized airway epithelial cells from patients with cystic fibrosis, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 34: 39-48.

- Wodehouse T, Kharitonov SA, Mackay IS, Barnes PJ, Wilson R and Cole PJ, 2003, Nasal nitric oxide measurements for the screening of primary ciliary dyskinesia, *Eur Respir J*, 21: 43-7.
- Wyatt MD and Pittman DL, 2006, Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks, *Chem Res Toxicol*, 19: 1580-94.
- Yeh TH, Tsai CH, Chen YS, Hsu WC, Cheng CH, Hsu CJ and Lee SY, 2007, Increased communication among nasal epithelial cells in air-liquid interface culture, *Laryngoscope*, 117: 1439-44.
- Zariwala MA, Knowles MR and Leigh MW, 1993, Primary Ciliary Dyskinesia, *GeneReviews(R)* (University of Washington, Seattle).
- Zinnitsch S, 2010, *Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades: DNA-Strangbruchinduktion, Mikrokernbildung, Zellzyklusalteration und Apoptose durch Zahnwerkstoffe in humanen Lymphozyten.*

7.6 Publikationen und Kongressbeiträge

- 90. Jahresversammlung deutscher Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V. Bonn, Berlin 2019, digitale Posterausstellung, Titel „DNA-Stabilität und -Regenerationsfähigkeit von humanen Nasenschleimhautzellen in Kulturmodellen“
- Ickrath P, Ickrath K, Steinke M, Scherzad A, Kleinsasser N, Lodes N, Bregenzer M, Hagen R and Hackenberg S, 2020, DNA Stability, Regeneration Capacity, and Mucociliary Differentiation of Human Nasal Mucosa Cells in Tissue Systems, *Tissue Eng Part A*.

7.7 Danksagung

Mein Dank geht an Herrn Univ.-Prof. Dr. N. Kleinsasser, Herrn apl. Prof. Dr. S. Hackenberg und Frau Dr. M. Steinke für die engagierte Betreuung während meiner Promotionsarbeit. Bei meiner Familie und Johannes möchte ich mich für die Unterstützung und den Rückhalt während meines Studiums und bei der Erarbeitung meiner Dissertation herzlichst bedanken.

In Gedenken an Phillip, der mich bei dieser Arbeit vielseitig unterstützt hat.

7.8 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation DNA-Stabilität und -Regenerationsfähigkeit von humanen Nasenschleimhautzellen in Kulturmodellen eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, 26. September 2020

Ort, Datum

Unterschrift

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled DNA stability and regeneration capacity of human nasal mucosa in tissue systems is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg, 26. September 2020

Place, Date

Signature

