

Entwicklung eines miniaturisierten Biosensors basierend auf humanen Keratinozyten

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl.-Ing.(FH) Ute Hofmann
geboren am 13.05.1985 in Karl-Marx-Stadt

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. habil. Thomas Winckler, Friedrich-Schiller-Universität Jena
2. Prof. Dr. rer. nat. habil. Karl-Heinz Feller, Ernst-Abbe-Fachhochschule Jena
3. Prof. Dr. rer. nat. habil. Thomas Scheper, Leibniz Universität Hannover

Tag der Disputation: 06. September 2013

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Motivation	1
1.2 Gegenstand der Arbeit	2
2 Theoretische Grundlagen	3
2.1 Biosensoren	3
2.1.1 Definition, Aufbau und Klassifizierung	3
2.1.2 Zellbasierte Biosensoren	9
2.1.3 Reporterassays	10
2.1.4 Impedimetrische Assays	12
2.2 Grundlagen der Photolumineszenz	14
2.2.1 Jablonski-Diagramm	15
2.2.2 Charakteristiken der Fluoreszenzemission	17
2.2.3 Fluoreszenzmikroskopie	19
2.3 Potenzial und Methoden der Biomikrosystemtechnik	20
2.4 Aufbau und Funktionen der menschlichen Haut	22
2.5 Toxisch-irritative Kontaktdermatitis	24
2.6 Mechanismen der Keratinozytenaktivierung	25
2.6.1 Signaltransduktion	26
2.6.2 Spezielle Transkriptionsfaktoren	28
2.6.3 Hitzeschockproteine	29
2.7 Möglichkeiten und Grenzen unterschiedlicher Hautmodelle	30
2.7.1 2D-Modelle – die HaCaT-Zelllinie	31
2.7.2 3D-Modelle	32
2.7.3 Biomarker in Hautirritationstests	33

3	Experimentelle Bedingungen	35
3.1	Material	35
3.1.1	Technische Ausrüstung	35
3.1.2	Chemikalien	36
3.1.3	Puffer und Lösungen	36
3.1.4	Zelllinie und Kulturbedarf	37
3.1.5	Bakterienstamm und Kulturbedarf	37
3.1.6	Enzyme	37
3.1.7	Kits	38
3.1.8	Oligonucleotide	38
3.1.9	Vektoren	38
3.1.10	Herstellungsprotokolle der Pflanzenextrakte	39
3.2	Methoden	40
3.2.1	Isolierung genomischer DNA	40
3.2.2	Präparation elektrokompenter Zellen	40
3.2.3	Isolierung von Plasmid-DNA	41
3.2.4	Agarosegelelektrophorese und Gelelution	41
3.2.5	Restriktion und Ligation	41
3.2.6	Polymerase-Kettenreaktion	42
3.2.7	Quantitative Reverse Transcription PCR	42
3.2.8	Kultivierung der humanen Zelllinie HaCaT	45
3.2.9	Zytotoxizitätsmessung mittels MTT-Test	45
3.2.10	Stabile Transfektion	46
3.2.11	Durchflusszytometrie	47
3.2.12	Quantitative Fluoreszenzmikroskopie	48
3.2.13	Impedanz-basiertes Monitoring der Zytotoxizität	49
3.2.14	Inkubator-unabhängige Kultivierung	50
4	Modifizierte Keratinozyten als biologisches Erkennungselement	52
4.1	Reporterassay basierend auf HSP72	53
4.1.1	Identifikation von Biomarkern	53
4.1.2	Etablierung der Sensorzelllinie pHSP72 _p AcGFP1-1	54
4.1.3	Assaycharakterisierung hinsichtlich Sensitivität, Vitalität und Stabilität	57
4.2	Reporterassay basierend auf HSP70B'	61
4.2.1	Genexpressionsanalyse zur Optimierung des Signal-Rausch-Verhältnisses	61

4.2.2	Konstruktion und Evaluierung der Sensorzelllinie pHSP70B _p AcGFP1-1	62
5	Anwendungsspektrum des Biosensors	67
5.1	Risikobewertung von Chemikalien	67
5.2	Beurteilung von Pflanzenextrakten als Bestandteil kosmetischer Produkte	71
6	Inkubatorunabhängige Zellkulturplattform zur Detektion zellschädigender Effekte	78
6.1	Aufbau 1 der Zellkulturplattform	79
6.2	Kontinuierliche Beobachtung der Zellproliferation	81
6.3	Integration der Sensorzelllinie pHSP72 _p AcGFP1-1	82
7	Kombination fluoreszenzoptischer und impedimetrischer Analysen	85
7.1	Impedimetrische Charakterisierung toxischer Effekte	86
7.2	μTAS als Alternative zu Hautirritationstests	88
7.2.1	Design des Chipsystems	88
7.2.2	Aspekte des integrierten Chipsystems (Aufbau 2)	92
8	Diskussion	95
8.1	Alternative Biomarker zur Anwendung in Hautirritationstest	96
8.2	Integration von Biosensoren in mikrofluidische Plattformen	108
8.3	Aspekte der Kombination biosensorischer Verfahren	109
9	Zusammenfassung	114
10	Summary	116
	Literaturverzeichnis	118
A	Anhang	137
	Wissenschaftlicher Werdegang	139
	Danksagung	141
	Selbstständigkeitserklärung	143

Abbildungsverzeichnis

2.1	Konzept des biosensorischen Prinzips	4
2.2	Klassifizierung der Biosensoren nach dem biologischen Erkennungselement	5
2.3	Typische Transducerverfahren angewendet für den Aufbau von Biosensoren	6
2.4	Struktur des Wildtyp-GFP	11
2.5	Prinzip des <i>Electric cell-substrate impedance sensing</i>	13
2.6	Jablonski-Diagramm	16
2.7	Aufbau der menschlichen Haut	23
2.8	Schema intrazellulärer Signalkaskaden in aktivierten Keratinozyten . . .	26
3.1	Vektorkarte pAcGFP1-1 und pAcGFP1-C1	39
4.1	Analyse der Dosis-Wirkungs-Beziehung von CdCl ₂ auf das HaCaT-Zellmodell ausgewertet mittels MTT	53
4.2	Relative Genexpression von HSP72 und HSP27 nach Inkubation mit CdCl ₂ und Wärmehandlung	54
4.3	Analyse der relativen mRNA-Mengen der stressinduzierten Expression des Reportergens AcGFP (pHSP72 _p AcGFP1-1)	56
4.4	Mikroskopische Aufnahmen und Histogramme durchflusszytometrischer Analysen vor und nach Stressinduktion des selektierten Einzelklons der Sensorzelllinie pHSP72 _p AcGFP1-1	57
4.5	Quantitative fluoreszenzmikroskopische Analyse der Sensorzellreaktion (pHSP72 _p AcGFP1-1) auf CdCl ₂	58
4.6	Zellzyklussynchronisierung von HaCaTs durch Serumangel	59
4.7	Einfluss von Zellzyklussynchronisierung und Stressindikation auf Zellvi- talität (Durchflusszytometrie)	60
4.8	Stabilität der Sensorzelllinie pHSP72 _p AcGFP1-1	60
4.9	Relative Genexpression von HSP70B' und HMOX-1 nach Wärmehandlung und Inkubation mit CdCl ₂	62
4.10	Analyse der relativen mRNA-Mengen der stressinduzierten Expression des Reportergens AcGFP (pHSP70B _p AcGFP1-1)	64

4.11	Quantitative fluoreszenzmikroskopische Analyse der Sensorzellreaktion (pHSP70B _p AcGFP1-1) auf CdCl ₂	65
5.1	Einfluss von DNCB auf das HaCaT-Zellmodell (MTT und qRT-PCR) . . .	68
5.2	Induzierbarkeit der Sensorzelllinien durch Chemikalien	69
5.3	Induzierbarkeit der Sensorzelllinien durch Pflanzenextrakte	72
5.4	Einfluss der <i>Arnica montana</i> auf das HaCaT-Zellmodell (MTT und qRT-PCR)	74
5.5	Einfluss vitalitätssteigernder Konzentrationen der <i>Arnica montana</i> auf die Genexpression des HaCaT-Zellmodells	75
5.6	Einfluss des Sesquiterpenlactons Helenalin auf das HaCaT-Zellmodell (MTT)	76
6.1	Labora Aufbau 1 zur kontinuierlichen Beobachtung der Zellkultivierung in μ Slides ^{0,4} Luer	79
6.2	Pumpkonzept der Durchflusskultivierung in μ Slides ^{0,4} Luer (Aufbau 1) . . .	81
6.3	Vergleich des Wachstumsverhaltens von HaCaT-Zellen in einer Zellkulturflasche und in μ Slides ^{0,4} Luer (Aufbau 1)	82
6.4	Mikroskopische Aufnahmen (Vergrößerung 200x) des zeitliches Verlauf der GFP-Expression in Sensorzellen (pHSP72 _p AcGFP1-1)	83
6.5	Quantitative Auswertung des zeitlicher Verlaufs der GFP-Expression in Sensorzellen (pHSP72 _p AcGFP1-1)	84
7.1	Schematische Darstellung der Parametererfassung zur komplexen Beschreibung zellphysiologischer Effekte durch Kombination von optischen und impedimetrischen Analysen	86
7.2	Reaktion der Sensorzellen analysiert mittels ECIS	87
7.3	Design des integrierten Chipsystems	89
7.4	Elektrodenlayout- und fertigung	90
7.5	Ansicht des gefertigten Chipsystems	91
7.6	Einbindung des Chipsystems zur optischen Detektion	92
7.7	HaCaT-Zellen in Zellkulturkammer des Chipsystems	93
8.1	Überblick der in dieser Arbeit dargestellten Beiträge auf dem Gebiet der integrierten Biosensorentwicklung	95
A.1	Grundaufbau des Fluoreszenzmikroskops	137
A.2	Charakteristiken des Filtersatzes HE38 (Carl Zeiss)	138
A.3	Normalisiertes Anregungs- und Emissionsspektrum von AcGFP1 nach Herstellerangaben (Takara Clontech)	138

Tabellenverzeichnis

2.1	Eigenschaften fluoreszierender Proteine	12
4.1	Charakteristiken ausgewählter Einzelklone der Sensorzelllinie pHSP72 _p AcGFP1-1	55
4.2	Charakteristiken ausgewählter Einzelklone der Sensorzelllinie pHSP70B _p AcGFP1-1	63
5.1	Mikroskopische Aufnahmen der Sensorzelllinie pHSP70B _p AcGFP1-1 nach Behandlung mit unterschiedlichen chemischen Stimuli und Wärme- behandlung	70
5.2	Mikroskopische Aufnahmen der Sensorzelllinie pHSP70B _p AcGFP1-1 nach Behandlung mit <i>Arnica montana</i>	73
5.3	Relative Genexpression von HSP72 und HSP70B' nach Extraktbehandlung	73
8.1	Detektion von CdCl ₂ und DNCB mittels 2D-Hautmodellen im Vergleich .	106
8.2	Vergleich der Reaktion von 2D- und 3D-Hautmodellen nach Stan- dardstressbedingungen	107

Abkürzungsverzeichnis

- ARE** *Antioxidant response element*
- CAT** *Chloramphenicol-Acetyl-Transferase*
- CCD** *Charge coupled device*
- COC** *Cyclo-Olefin-Copolymer*
- E. coli** *Escherichia coli*
- EC₅₀** *Half maximal effective concentration*
- ECIS** *Electric cell-substrate impedance Sensing*
- Erk** *Extracellular signal-related kinase*
- FACS** *Fluorescent activated cell sorting*
- FRET** *Förster-Resonanzenergietransfer*
- GAPDH** *Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase*
- GFP** *Green fluorescent protein*
- GUS** *β-Glucuronidase*
- HaCaT** *Human adult low Calcium high Temperature*
- HMOX-1** *Hämoxygenase-1*
- HSE** *Heat shock element*
- HSF** *Heat shock transcription factor*
- HSP** *Hitzechockprotein*
- IKD** *Toxisch-irritative Kontaktdermatitis*
- IKK** *IκB-Kinase-Komplex*

IL *Interleukin*

ITO *Indium tin oxid*

JAK-STAT *Janus kinase - signal transducer and activator of transcription*

JNK *c-Jun N-terminal kinase*

Keap1 *Kelch-like ECH associating protein 1*

lacZ *β-Galactosidase*

LDH *Lactat-Dehydrogenase*

LoC *Lab-on-a-chip*

LOD *Limit of detection*

luc *Luciferase*

MAPK *Mitogen-aktivierte Proteinkinasen*

MCS *Multiple cloning site*

MEMS *Micro-electro-mechanical systems*

NFκB *Nuclear factor κB*

Nrf₂ *Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2*

OECD *Organisation for Economic Co-operation and Development*

p38 *p38 MAP-Kinasen*

PBS *Phosphate buffered saline*

PCR *Polymerase chain reaction*

PDMS *Polydimethylsiloxan*

qRT-PCR *quantitative reverse transcription PCR*

REACH *Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals*

RfS *Reflektometrische Interferenzspektroskopie*

RT *Raumtemperatur*

ROS *Reactive oxygen species*

SPR *Surface Plasmon Resonance*

μTAS *Micro-total analysis system*

TGFα *Tumor growth factor α*

TNFα *Tumor necrosis factor α*

UV *ultraviolett*

Vis *visible*

1 Einleitung

1.1 Motivation

Chemikalien sowie Naturstoffe induzieren verschiedene Formen der Kontaktdermatitis. Die Evaluierung des zellschädigenden Potenzials einer Substanz kann u. a. mit Hilfe von zellbasierten Sensorsystemen erfolgen, die auf Grundlage von *In-vitro*-Modellen die Hautreizung nachempfinden und ein aussagekräftiges Pre-Screening ermöglichen.

Verschiedene für Hautreizungstests vorgeschlagene Modelle rekonstruierter menschlicher Epidermis reichen von Monolayerkulturen konventioneller Keratinozyten oder immortalisierter Hautzelllinien, epidermalen Äquivalenten, bis hin zu Hautäquivalenten und Hautexplantaten. Keratinozyten, der vorherrschende Zelltyp der menschlichen Haut, kommen als erstes mit exogenen Noxen in Kontakt und sind an der Immunreaktion, u.a. durch die Produktion proinflammatorischer Zytokine, beteiligt. Daher eignen sich Keratinozyten als wertvolles Zellkulturmodell zur Untersuchung physiologischer Effekte als Reaktion auf hautschädigende Agenzien. Dennoch ist es mittels dieses einzigen und vergleichsweise einfachen Hautmodells nicht möglich alle dermatologischen Effekte der menschlichen Haut umfassend zu beschreiben, da die dreidimensionale *In-vivo*-Gewebestruktur und einige ihrer einzigartigen Transportwege, z.B. die Penetration durch das *Stratum corneum*, nicht nachempfunden werden können.

Trotzdem besteht innerhalb der wissenschaftlichen Gemeinschaft der Anspruch Standardvorgehensweisen zukünftiger *In-vitro*-Hautreizungstests zu entwickeln, die hinsichtlich Relevanz und Zuverlässigkeit auf international anerkannten Protokollen basieren. Die verbesserte Reproduzierbarkeit und die genauere Prognose der Wirkung bzw. der Toxizität von potenziell hautreizenden Substanzen würde die Leistungsfähigkeit der *In-vitro*-Assays verstärken und damit einen Beitrag zu internationalen Forderungen leisten. Alle Erkenntnisse, die durch weiterentwickelte und/oder kombinierte Kultivierungs- und Detektionsmechanismen im Bereich der dermatologischen Grundlagenforschung als auch auf dem Gebiet der Biosensorik und Mikrofluidik gesammelt werden, könnten in ein solches Validierungsverfahren münden und sind bei derzeit vorhandenen Kenntnissen von außerordentlicher Bedeutung. Neben der Wahl des entsprechenden Hautmodells ist besonders die Erwägung des Biomarkers zum Auslesen der zellschädigenden Effekte ent-

scheidend. Gegenwärtig stehen besonders die Ansätze im Vordergrund, die eine Detektion frühzeitiger Reaktionsmechanismen ermöglichen, bevor eine sichtbare Zellschädigung eintritt. Die *In-vitro*-Zellkultur in mikrofluidischen Systemen (Biomikrosystemtechnik) hat dabei innerhalb der letzten Jahre einen bemerkenswerten Aufschwung erfahren und einen wesentlichen Einfluss auf die Entwicklung der zellbiologischen Forschung ausgeübt.

1.2 Gegenstand der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beinhaltet die Entwicklung eines biosensorischen Detektionsverfahrens zur Beschreibung der physiologischen Wirkung von Chemikalien und Pflanzenextrakten auf intrazelluläre Signalkaskaden durch Nutzung gentechnisch modifizierter Sensorzellen, basierend auf der humanen Keratinozytenzelllinie *Human adult low Calcium high Temperature* (HaCaT).

Die Generierung fluoreszenz-optisch auslesbarer Sensorzelllinien erfolgte durch stabile Transfektion der Zellen mit ausgewählten Stresspromotor-Reporter-Genkonstrukten. Die inkubationszeit- und konzentrationsabhängige Reaktion der Sensorzellen wurde anhand definierter Stressbedingungen (Machbarkeitsnachweis) demonstriert und vergleichend zu einem markerfreien impedimetrischen Readout diskutiert.

Außerdem erfolgte die Etablierung einer mikrofluidischen Plattform, um eine komfortable, sterile und inkubatorunabhängige, mikroskopische Echtzeituntersuchung der Zellen zu ermöglichen. Zielführend sollten hierbei die Justierung einfließender, physikalischer Parameter und die Kombination mit den Anforderungen an eine *Good Laboratory Practice* sein, sodass eine uneingeschränkte Zellkultivierung und eine leistungsfähige Detektion der zellulären Antwort erfolgen kann.

Die Arbeiten münden weiterhin in die Entwicklung eines *Micro-total analysis system* (μ TAS), das gleichzeitig die fluoreszenz-optische und impedimetrische Detektion ermöglicht und so eine umfassende quantitative Beschreibung der metabolischen und morphologischen Änderungen als Reaktion auf eine zellschädigende Substanz realisiert. Durch Registrierung verschiedener Parameter ist eine detaillierte Diskriminierung zwischen konkurrierenden stress- und wachstumsbedingten Effekten möglich, und damit ein völlig neuer Ansatz als Alternative für Hautreizungstests in der Kosmetik- und Pharmaindustrie gegeben.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Biosensoren

Biosensoren stellen eine Schnittstelle zwischen Biologie und Elektronik dar. Mit ihnen werden komplexe chemische Verbindungen oder biologische Moleküle, Interaktionen und physiologische Effekte verzögerungsfrei nachgewiesen. Die Ära der Biosensoren wurde 1962 durch Clark und Lyons eingeleitet, indem sie Glucoseoxidase mit einer Sauerstoffelektrode koppelten [1]. Der zur Glucosebestimmung im Blut konzipierte Biosensor wies aufgrund seines einfachen Aufbaus, seiner Schnelligkeit und Sensibilität sowie seiner einfachen Herstellung und Handhabbarkeit bereits in überzeugender Weise alle wesentlichen Vorteile dieses neuen analytischen Konzepts auf. Noch heute sind die zur Bestimmung des Glucosegehalts eingesetzten Biosensoren auf Basis der Glucoseoxidase oder Glucosedehydrogenase, die am erfolgreichsten kommerzialisierten Biosensoren.

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden viele verschiedene Biosensortypen entwickelt, welche basierend auf einem analytischen Hintergrund unterschiedlichste Anwendung in der Medizin, der Umweltanalytik, der Forschung, der Lebensmittelindustrie, der pharmazeutischen und biotechnologischen Industrie fanden. Derzeitig ist ein Trend hin zu komplex aufgebauten Multianalysesensoren zu beobachten. Darüberhinaus haben Fortschritte in der Elektronikentwicklung und dem Gebiet der *Micro-electro-mechanical system* (MEMS) die Miniaturisierung vieler Biosensoren ermöglicht [2].

2.1.1 Definition, Aufbau und Klassifizierung

Biosensoren werden generell als Anordnungen definiert, die aus einer selektiv erkennenden biologischen Komponente (Biorezeptor) und einem Signalwandler (Transducer) bestehen. Nach IUPAC-Definition ist ein Biosensor, im Unterschied zu biotischen Sensoren oder Biotests, ein in sich geschlossenes integriertes System, das eine spezifische quantitative oder halb-quantitative analytische Information liefert, indem ein biologisches Erkennungselement, welches in Kontakt zu einem Messwandler steht, genutzt wird [3]. Abbildung 2.1 veranschaulicht das konzeptionelle Prinzip des biosensorischen Prozesses [4].

Die Einteilung von Biosensoren kann anhand des biologischen Erkennungselements oder des Transducers erfolgen. Innerhalb der Vielzahl möglicher biologischer Erkennungs-

elemente arbeiten Biosensoren entweder als Metabolismus- oder als Bioaffinitätssensoren (Abbildung 2.2) [5]. Bei den Metabolismussensoren werden in den meisten Fällen Enzyme als selektive Katalysatoren an einer Oberfläche fixiert. Das Enzym katalysiert eine langsame Reaktion, wobei deren Geschwindigkeit ein Maß für die Konzentration des Substrats ist. Generell spricht man von dieser Art Sensoren, wenn der Analyt durch das biologische Erkennungselement, wie neben Enzymen z.B. auch Organellen, intakte Zellen oder Gewebe, spezifisch gebunden und umgesetzt wird. Nach der Reaktion des Analyten liegt der Ausgangszustand des biologischen Erkennungselements wieder vor.

Die Analyterkennung von Bioaffinitätssensoren beruht auf einer spezifischen Komplexbildung zwischen Analyt und biologischem Erkennungselement, die zu messbaren physikochemischen Veränderungen führt. Die anschließende Spaltung des gebildeten Komplexes ist allerdings häufig problematisch. Bioaffinitätssensoren können dabei basierend auf Nukleinsäuren, Antikörpern oder Rezeptorproteinen aufgebaut sein [6]. Eine relativ neue Klasse stellen außerdem die biomimetischen Erkennungsmoleküle –Adaptamere und *Molecularly imprinted polymers* (MIPs)– dar [7].

Enzyme werden aufgrund ihrer spezifischen Bindungseigenschaften und ihrer katalytischen Produktbildungsaktivität besonders häufig als Biorezeptoren eingesetzt. Die katalytische Aktivität ermöglicht das Erreichen wesentlich niedrigerer Nachweisgrenzen, ist allerdings ebenfalls stark abhängig von der Integrität der nativen Proteinkonformation [4].

Biosensoren mit immobilisierten Antikörpern als Rezeptoren werden Immunosensoren genannt. Sie ermöglichen eine spezifische und sensitive Messung von Targets, indem die extrem spezifischen Bindungseigenschaften von Antigen und Antikörper nutzbar gemacht werden. Dieses Phänomen wird zur Entwicklung verwendet und führte z.B. zu dem ersten kommerziell erhältlichen Schwangerschaftstest auf Basis der Messung des humanen Choriongonadotropins [8].

Biosensoren basierend auf DNA, RNA oder Peptid-Nukleinsäuren hingegen, erlangen ihre hohe Sensitivität und Selektivität durch die einzigartige Basenpaaraffinität komplementärer Regionen der Nucleotidstränge. Dieser Mechanismus der Hybridisierung hat aufgrund seiner Bedeutung für die frühzeitige Erkennung von Erkrankungen, wie u.a.

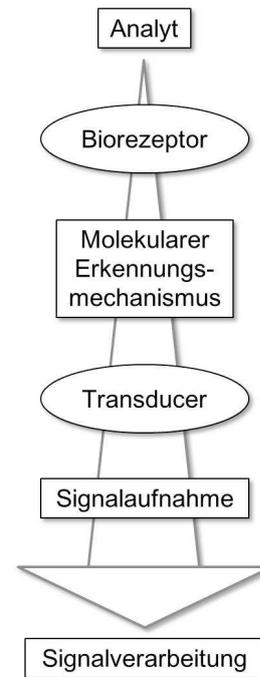


Abbildung 2.1: Konzept des biosensorischen Prinzips (nach [4]). Biosensoren bestehen aus einem Biorezeptor und einem Transducer. Die Interaktion zwischen Analyten und Biorezeptor ist dabei so designt, dass folglich auf Basis eines biochemischen Prozesses ein Effekt mittels Transducer (Signalumwandlung) gemessen werden kann.

Karzinomen, der Hypercholesterinämie, zunehmend an Interesse gewonnen. Die parallele Analyse großer Anzahlen von DNA-Fragmenten wurde durch die Entwicklung von Arraytechniken möglich und führte zur Entwicklung von Bio- bzw. DNA-Chips [7].

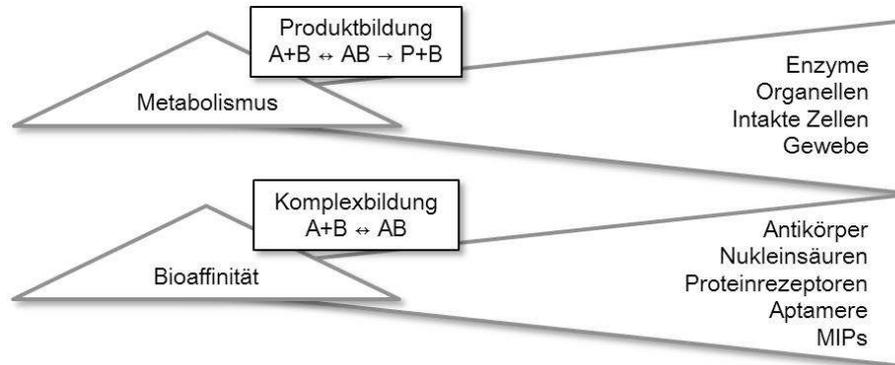


Abbildung 2.2: Klassifizierung der Biosensoren nach dem biologischen Erkennungselement. Innerhalb der Vielzahl möglicher biologischer Erkennungselemente arbeiten Biosensoren entweder als Metabolismussensoren, basierend auf der Umwandlung eines Analyten A in ein Produkt P, oder als Bioaffinitätssensoren, wobei Analyte A und Erkennungselement B einen häufig irreversiblen Komplex AB bilden.

Intakte Zellen, einschließlich Bakterien, Hefen und tierische Zellen, werden ebenfalls als Sensorelemente eingesetzt. Je nach verwendetem Transducerprinzip, werden dafür meist gentechnisch veränderte Zellen genutzt, die fähig sind, ein Signal aufgrund selektiver Erkennung eines Analyten oder einer Analytenklasse zu generieren. Es existieren aber auch labelfreie Methoden, wie z.B. das *Electric cell-substrate impedance sensing* (ECIS). Generelle Vorteile der zellbasierten Biosensoren sind die Fähigkeit zur Generierung eines dosisabhängigen Signals als Antwort auf einen Analyten, die Ableitung von Vorhersagen zur Bioverfügbarkeit bzw. die Generierung von physiologisch relevanten Datensätzen. Der große Nachteil der zellbasierten Biosensoren ist deren, begründet in stattfindenden Diffusionsprozessen und intrazellulär ablaufenden Reaktionsmechanismen, verhältnismäßig langsame Sensorantwort [9, 10].

Allen genannten biologischen Erkennungselementen ist gemein, dass man sich deren einzigartige Spezifität für bestimmte Analyte zunutze macht. Aus einer unbekanntem Probe gelöster Moleküle, die strukturell sehr ähnlich sein können, wird der einzelne Analyt über die biospezifische Reaktion mit einem immobilisierten Biomolekül identifiziert. Die Spezifität des Biosensors wird also durch die biologische Komponente vorgegeben, während die Sensitivität vor allem durch den verwendeten Transducer beeinflusst wird.

Zur Klassifizierung nach der Art des Signalumwandler bzw. Transducers werden hauptsächlich massensensitive, elektrochemische und optische Systeme unterschieden (Abbildung 2.3). Weitere Verfahren nutzen beispielsweise thermische (Kalorimetrie) oder paramagnetische Effekte.

Massensensitive Verfahren beruhen auf der Messung der Schwingung eines Quarzes in Bezug auf die Masse. Sie sind vom Prinzip her kleinste Waagen (Mikrowaagen) auf

Basis des piezoelektrischen Effekts, wobei, hervorgerufen durch elektrische Anregung, die Änderung der Ausbreitung von akustischen Wellen in Substraten zugrunde liegt. Ein besonders sensibler Spezialfall sind die Oberflächenwellensensoren (SAW-Sensoren, *Surface acoustic waves*). Hierbei werden auf einem piezoelektrischen Quarz zwei Beschichtungen aufgebracht, die als Sender bzw. Empfänger dienen und nach elektrischer Anregung akustische Oberflächenwellen aussenden. Immunreaktionen beispielsweise, bewirken durch Bindung eines Antigens an einen Antikörper eine Änderung der Oberfläche und damit eine Änderung der Resonanzfrequenz der Welle [11, 12].

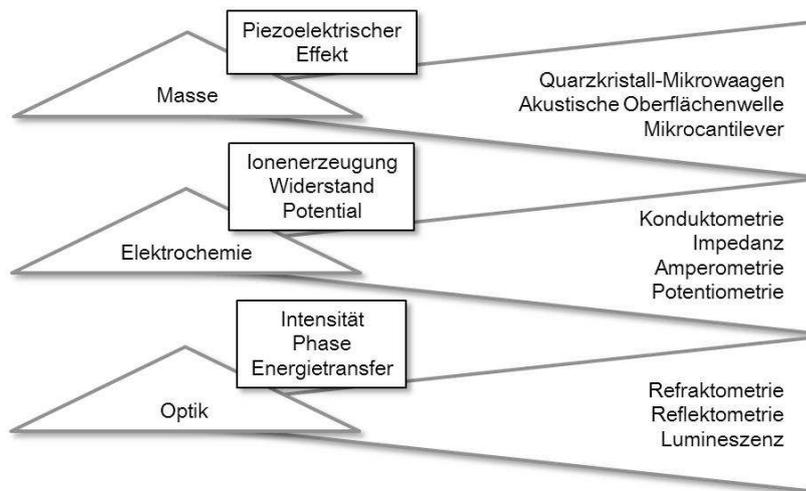


Abbildung 2.3: Typische Transducerverfahren und deren grundlegende Methode bzw. Eigenschaften zur Anwendung im Aufbau von Biosensoren (nach [13]).

Das Basisprinzip elektrochemischer Biosensoren ist, dass die chemische Reaktion zwischen immobilisiertem Biomolekül und Analyte Ionen produziert oder konsumiert und dies messbare elektrische Auswirkungen (z.B. Strom, Potenzial) auf die umgebende Lösung hat [14]. Darauf beruhend sind eine Reihe von Sensoren amperometrischer, potentiometrischer oder konduktiver bzw. impedimetrischer Art bekannt.

Amperometrische Biosensoren, z.B. zur Bestimmung von Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid, sind die am weitesten verbreitete Klasse von Biosensoren. Dabei wird in einer Messkammer an zwei Elektroden bei konstant gehaltener Spannung der Stromfluss gemessen. Sie sind geeignet für Stoffwechselprodukte, die leicht oxidiert oder reduziert werden können und zeichnen sich durch eine hohe Selektivität und Empfindlichkeit aus [15].

Der potentiometrische Signalumwandler hingegen erfasst Änderungen des Potentials einer Indikator- und einer Referenzelektrode bzw. zweier Referenzelektroden separiert durch eine ionenselektive Membran, bei konstant gehaltenem Strom, der üblicherweise gleich null gehalten wird. Die häufigsten potentiometrischen Anordnungen sind pH-Elektroden. Darüber hinaus sind aber auch eine Reihe miniaturisierter Technologien zur

Bestimmung von Harnstoff oder Keratinin beschrieben worden, die allerdings im Bezug auf Störanfälligkeit und Empfindlichkeit den optischen oder piezoelektrischen Sensoren noch nachstehen [16].

Bei konduktometrischen Biosensoren wird die Änderung der Leitfähigkeit zwischen zwei Elektroden auf Grundlage einer Widerstandsmessung detektiert. Bewirkt eine Wechselwirkung zwischen der zu untersuchenden Testkomponente und der vom Biosensor umfassten biologisch aktiven Komponente eine Änderung der Dielektrizitätskonstante, können auch Kapazitätsmessungen für die physikalische Wandlung des Messsignals verwendet werden.

Besondere Bedeutung haben außerdem impedimetrische Biosensoren erlangt. Die Bestimmung der elektrischen Impedanz einer Grenzfläche erfolgt durch Applikation einer Wechselspannung mit festgelegter Frequenz und Messung des resultierenden Stroms. Die Vorteile dieses Verfahrens begründen sich in einer einfachen, schnellen, kostengünstigen und labelfreien Durchführung (siehe Kapitel 2.1.4) [17].

Weiterhin werden heutzutage nahezu alle Wechselwirkungen von Licht und Materie, wie z.B. Absorption, Streuung, Brechung, Lumineszenz und Polarisation, oder die Ausbildung eines elektrischen Feldes an der Grenzschicht des Lichtleiters zum umgebenden Medium zur Beschreibung von Analyte/Sensor-Interaktionen genutzt [15]. Daher ist die optische Signalumwandlung eine sehr vielfältige Klasse der Transducer, wobei zwischen indirekter und direkter optischer Detektion unterschieden wird. Während die indirekte optische Detektion nur durch Einführung eines Labels in das Targetmolekül oder das biologische Erkennungselement möglich ist, können die Moleküle in einem direkten Detektionsansatz in ihrer natürlichen Form untersucht werden. Aufwendige Markierungsverfahren, die zur Änderung der Funktionalität der Moleküle führen können, entfallen [18].

Die meist genutzten Verfahren der direkten optischen Detektion beruhen auf der Physik evaneszenter Wellen [2]. Passiert Strahlung die Grenzfläche zweier Medien, wird diese bei steigendem Brechungsindex hin zur optischen Achse und bei sinkendem Brechungsindex weg von der optischen Achse gebrochen. In letzterem Fall existiert ein Grenzwinkel, der, wenn er überschritten wird, zur Totalreflexion der elektromagnetischen Welle an der Grenzfläche zum Medium mit dem geringeren Brechungsindex führt. Die elektromagnetische Welle wird im Medium geleitet, wobei sie aber nicht schlagartig ihre Ausbreitungsrichtung ändern kann (Maxwell-Gleichungen). Daher bildet sich eine stehende (evaneszente) Welle auf der Oberfläche aus, die ebenfalls in das nachfolgende optisch dünnere Material eindringt. Jeglicher Effekt auf das evaneszente Feld resultiert in der Änderung des effektiven Brechungsindex des Wellenleiters und beeinflusst die Wellenlänge sowie die Geschwindigkeit der Welle [19]. Dieses Phänomen kann durch eine

Reihe von Signalumwandlern registriert werden, wobei besonders die Methode der *Surface plasmon resonance* (SPR) für die Entwicklung kostengünstiger, kompakter und sensibler Anwendungen in der Biosensorik genutzt wird [20]. Das Untersuchungsspektrum der Interaktionen reicht dabei von Antikörpern, Peptiden, Proteinen, Oligonucleotiden, Polysacchariden, Aptameren bis hin zu Phagen und Viren [21, 18]. Die einigen wenigen Anwendungen zur Detektion von intakten Zellen (z.B. Erythrocyten [22], Bakterien [23]) beschränken sich aber noch auf deren Funktion als Analyt, nicht als biologisches Erkennungselement [24]. So konnten Proteoglykane und Rezeptorproteine der Zellen und deren Modifikation aufgrund einwirkender Stimuli untersucht werden, jedoch erfolgte keine direkte Untersuchung intrazellulär ablaufender Prozesse. Einige erste aktuelle Beispiele in der Literatur zeigen, dass sich die Methode der SPR derzeit in einer Weiterentwicklungsphase hin zur Beschreibung intrazellulärer Prozesse befindet. So benutzen Horii *et al.* ein 2D-SPR-System zur Beschreibung der allergischen Reaktionen von Mastzellen nach Antigenstimulation [25]. Das System realisiert die schnelle, labelfreie und sensitive Beobachtung der physiologischen Prozesse, ermöglicht allerdings noch keine quantitativen Aussagen.

Eine zweite Methode der direkten bzw. markierungsfreien optischen Detektion beruht auf der Messung reflektometrischer Änderungen an Schichten. Reflektometrie wurde vor mehreren Jahrzehnten als Ellipsometrie mittels polarisierten Lichts eingeführt. Trifft polarisiertes Licht auf eine dünne Schicht, wird es an jeder Grenzfläche reflektiert. Die Folge ist die Überlagerung elektromagnetischer Wellen. Die resultierende Intensitätsmodulation hängt von der Schichtdicke und dem Brechungsindex ab und beeinflusst die Phase und/oder Amplitude der elektromagnetischen Strahlung [26]. Dieses grundlegende interferometrische Prinzip wurde auf eine einfache und robuste analytische Methode, der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIfS), basierend auf Weißlicht-Interferenzen an transparenten dünnen Schichten übertragen. An jeder Grenzschicht unterschiedlicher Materialien vernachlässigbarer Absorption wird Strahlung teilweise reflektiert bzw. durchgelassen. Die reflektierten Teilstrahlen überlagern sich zu einem Interferenzspektrum, welches über ein Diodenzeilenspektrometer detektiert wird. Durch chemische Modifikation der obersten Schicht wird die Interaktion mit Zielmolekülen realisiert. Diese Interaktion verursacht wiederum eine Änderung der physikalischen Dicke und des Brechungsindex dieser Schicht und hat die Modulation des Interferenzspektrums zur Folge. Beobachtet man die Veränderung des Interferenzspektrums über die Zeit, so ist es möglich, das Bindungsverhalten der Zielmoleküle zu verfolgen [27].

Betrachtet man die Anwendung der Methode hinsichtlich des Auslesens zellbasierter Assays, bietet die RIfS einen entscheidenden Vorteil gegenüber SPR. Begründet in dem Prinzip der RIfS, ermöglicht das Verfahren eine größere Eindringtiefe in das zu untersu-

chende Medium in der Größenordnung des typischen Zelldurchmessers (SPR: 300 nm, RfS: 40 μm) und generiert damit höhere Signale. Daher ist es möglich die Signale, der mit dem Transducer in Kontakt stehenden Zellen, auf molekulare und morphologische Charakteristiken der Untersuchungsobjekte zu übertragen. Ein repräsentatives Beispiel untersucht das induzierte Spreizverhalten von Jurkat-Zellen auf unterschiedlich modifizierten Sensoroberflächen [28].

Wie bereits erwähnt, benötigen indirekte optische Detektionsverfahren grundsätzlich ein gelabeltes Molekül, welches mit dem Analyten interagiert, um daraus abgeleitet ein Signal zu generieren. Das Markierungsmolekül emittiert oder modifiziert elektromagnetische Strahlung. Neben Aufbauten, die auf densitometrischen, kolorimetrischen oder chemolumineszenten Prinzipien beruhen, sind besonders viele der indirekten optischen Detektoren zur Messung der Fluoreszenzintensität, begründet in der außerordentlichen Sensitivität mit Nachweisgrenzen bis hinunter zur Einzelmoleküldetektion, konzipiert. Die detaillierte Diskussion des Phänomens Fluoreszenz erfolgt in Kapitel 2.2.

2.1.2 Zellbasierte Biosensoren

Das zellbasierte *In-vitro*-Monitoring ist zu einem wichtigen Werkzeug der Einschätzung des zellschädigenden, reizenden bzw. zytotoxischen Potenzials geworden. Die Nutzung dieser im Allgemeinen schnellen und kostengünstigen Verfahren kann zur Identifikation potenzieller Giftstoffe in frühen Stadien des *Screenings* von Evaluierungsverfahren beitragen und dabei die Notwendigkeit von kostenintensiven und ethisch schwer vertretbaren *In-vivo*-Modellen minimieren. Eine Vielfalt von Mikroorganismen und Säugerzellen, wie z.B. Bakterien, Hefen, Algen und humane Zellen, werden für die Testung der physiologischen Effekte von Pharmazeutika, Krankheitserregern, Umweltschadstoffen oder anderen in unterschiedlichsten Industriezweigen eingesetzten Chemikalien und Naturstoffen, genutzt [29].

Die heutzutage breitgefächerte Verwendung von zellbasierten Biosensoren begründet sich in unterschiedlichen Vorteilen gegenüber klassischen Tierversuchen, die in der Literatur ausführlich diskutiert wurden [30]. So sind Zellen in der Lage aufgrund externer Stimuli auf entsprechende physiologische Art zu reagieren. Zelltypspezifische Funktionen können gesondert, ohne die Überlagerung von anderen komplexen Organ- oder Körperfunktionen, untersucht werden. Durch die Kultivierung spezifischer Zelltypen in 2D- oder 3D-Konfigurationen ist eine einfachere Detektion unter Nutzung verschiedenster Geräte möglich. Zellbasierte Systeme liefern weiterhin umfassende und komplexe funktionelle Informationen, wie z.B. Aussagen über Signalkaskaden, Proteinsynthesen, apoptotischen oder nekrotischen Zelltod. Zudem ermöglichen sie Einblicke in den reizenden, toxischen oder pathogenen Mechanismus und realisieren nicht nur eine Detektion des entsprechenden

Stimulus, sondern unterstützen ebenso seine Klassifizierung und die Abbildung von Interaktionsmechanismen [31, 32, 33, 34]. Während bakterielle bzw. prokaryotische Systeme z.B. häufig Anwendung in der Umweltkontrolle finden, etwa zur Untersuchung von Wasser- und Bodenproben [35, 36, 37], ist es naheliegend, dass für die Untersuchung kosmetisch, pharmazeutisch bzw. medizinisch relevanter Themen höhere Zellen genutzt werden.

In diesem Zusammenhang wird in den folgenden Kapiteln, neben der wegweisenden Entwicklung von Giaver und Keese zur Methode ECIS [38], die Nutzung von Reporterproteinen in zellbasierten Biosensorsystemen eingehender behandelt.

2.1.3 Reporterassays

Reportergene bzw. -proteine und deren abgeleitete Assays sind sehr wertvolle, kaum verzichtbare Werkzeuge innerhalb der zell- und molekularbiologischen Forschung geworden. Sie werden seit ungefähr 40 Jahren sehr erfolgreich für die Sichtbarmachung und Verfolgung räumlicher und zeitlicher Gen- und Proteinexpressionsmuster verwendet. Das zentrale Konzept aller etablierten Reportergene, wie β -Glucuronidase (GUS), β -Galactosidase (*lacZ*), Luciferase (*luc*), Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT) oder dem grün fluoreszierenden Protein (GFP), beruht auf der Verknüpfung des Reportergens mit einer regulatorischen Sequenz, welche nach Einschleusung in ein biologisches System, abhängig von der modulierten Expression ein einfach zu detektierendes Signal generiert [39].

Gemeinsames Merkmal aller enzymatischen Reportersysteme ist die Anwendung geeigneter niedermolekularer Substrate für den qualitativen (histochemischen) oder quantitativen (photometrischen oder fluorometrischen) Nachweis der Enzymaktivität. Die erforderlichen *In-vitro*-Nachweismethoden sind in der Regel destruktiv (u.a. Zellaufschluss, Herstellung von Proteinextrakten, Applikation geeigneter Substrate) und machen so eine Echtzeitanalyse unmöglich. Eine weitere Voraussetzung für die Anwendung dieser Systeme ist die Abwesenheit entsprechender endogener Aktivitäten in den zu untersuchenden biologischen Systemen, um die Detektion falschpositiver Signale zu vermeiden. Weiterhin muss das entsprechende Substrat die Zellen oder Gewebe vollständig penetrieren können, was problematischer sein kann, je komplexer die Untersuchungsobjekte werden.

Von großer Bedeutung sind heutzutage Licht emittierende Reporterproteine. Luciferasen erzeugen durch oxidative Decarboxylierung Lichtimpulse und zeichnen sich durch hohe Sensitivität sowie ein geringes Hintergrundsignal aus. Nachteilig ist dem eukaryotischen Luciferase-System dennoch der notwendige Zellaufschluss und die Zugabe eines kostenintensiven Substrats, was im Umkehrschluss eine Lebendzellanalyse bzw. Echtzeitmessung in Eukaryoten unmöglich macht [40]. Im Gegensatz dazu wird das Substrat der prokaryotischen Luciferase (LuxAB) durch die Proteine LuxC, D und E produziert, die

alle das *Lux*-Operon (*luxCDABE*) kodiert [41]. Die Limitation des Systems ist allerdings, dass es innerhalb höherer Zellen derzeit noch nicht genutzt werden kann [42].

Das 27 kDa große GFP hingegen kann *in vitro* durch Bestrahlung mit ultraviolettem oder blauem Licht angeregt werden. Bemerkenswert ist, dass GFP ein natürlich fluoreszierendes Protein ist, das das lichtemittierende Chromophor (Fluorophor) in seiner primären Aminosäuresequenz trägt [43]. Es wird aus den drei aufeinanderfolgenden Aminosäuren Ser-Tyr-Gly der Positionen 65-67 über sequenzielle Cyclisierungs- und Oxidationschritte gebildet. Letztlich entsteht ein ausgeprägtes Elektronenresonanzsystem - bestehend aus zwei aromatisierten Ringen und einer dazwischenliegenden Brücke - das für die Lichtabsorption verantwortlich ist. Das GFP besteht aus 238 Aminosäuren, welche in 11 β -Faltblattstrukturen (Abbildung 2.4) wie eine Art Fass um das an eine zentrale α -Helix gebundene Fluorophor zusammengesetzt sind [45]. Diese Einkapselung des Fluorophors begründet dessen hohe physikochemische Stabilität und stellt eine aus geladenen Seitenketten und Wassermolekülen bestehende Umgebung bereit, die für die Fluoreszenzeigenschaften von großer Bedeutung sind [46]. Der vermehrte Einsatz des GFPs in den Folgejahren nach seiner Klonierung 1992 [47], führte allerdings auch zur Aufdeckung einer Reihe von Limitierungen. Hierbei ist besonders die Thermosensitivität (T_{Opt} : 20-23 °C) des Proteins bei der Faltung und die spektralen Eigenschaften zu nennen. Betrachtet man das Fluoreszenzspektrum von wtGFP [48], so erkennt man, dass es Licht der Wellenlängen 395 nm und 475 nm besonders stark absorbiert und bei 508 nm wieder emittiert. Gezielte Mutationen führten einerseits zu verbesserten Absorption-/Emissionseigenschaften (höhere Emissionsintensität) und zur Verschiebung des ansonsten zellschädigenden Absorptionspeaks im UV-Bereich.

Neben der Behebung der genannten Limitierungen und Verbesserung der Eigenschaften des GFPs führten die unterschiedlichen Mutationen, einhergehend mit der Entdeckung weiterer fluoreszierender Proteine (z.B. DsRed aus einer Koralle der Gattung *Discosoma*) zur Generierung einer ganzen Farbpalette von fluoreszierenden Proteinen, welche beispielhaft in Tabelle 2.1 zusammengefasst sind.

Für Forschungszwecke wurde in den letzten Jahren fast ausschließlich EGFP verwendet, da es sich durch zahlreiche Aminosäureaustausche schneller faltet, die Tendenz zur

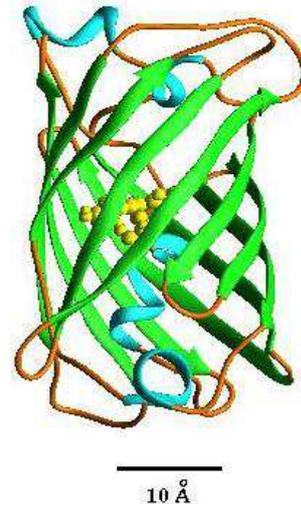


Abbildung 2.4: Struktur des Wildtyp-GFP (aus [44]). Das 27 kDa große GFP besteht aus 238 Aminosäuren, welche in 11 β -Faltblattstrukturen, wie eine Art Fass um das an eine zentrale α -Helix gebundene Fluorophor, zusammengesetzt sind.

Dimerisierung unterdrückt wird, heller leuchtet und eine erhöhte Photostabilität aufweist. Monomere haben gegenüber Dimeren bzw. Tetrameren den Vorteil, dass sie nicht zu unerwünschten Proteinaggregaten führen, wodurch die FPs funktionslos werden. Eine neue und kommerziell erhältliche Alternative zum EGFP stellt das AcGFP isoliert aus der Qualle *Aequorea coerulescens* (Clontech) dar [49]. Das Protein ist sehr stabil und ermöglicht das Beobachten intrazellulärer Vorgänge über einen längeren Zeitraum. Ein weiterer Vorteil liegt in der monomeren Natur (echtes Monomer) des Proteins. Das Chromophor reift nach Herstellerangaben innerhalb von 8-12 h und ermöglicht so eine zeitnahe Betrachtung intrazellulärer Effekte. Außerdem kann AcGFP mittels Durchflusszytometrie detektiert und sortiert werden. Aus den genannten Gründen wurde das AcGFP zur Etablierung der Reporter-genassays innerhalb der vorliegenden Arbeit verwendet.

Tabelle 2.1: Eigenschaften häufig eingesetzter und kommerziell erhältlicher fluoreszierender Proteine (modifiziert nach [50])

Name FP	Anregung (nm)	Emission (nm)	<i>in vivo</i> Struktur	Rel. Helligkeit (% von EGFP)
Wildtyp-GFP	395/475	508	Monomer	48
Grün fluoreszierende Proteine				
EGFP	484	510	Monomer	100
AcGFP	475	505	echtes Monomer	82
ZsGreen	493	505	Tetramer	117
Blau fluoreszierende Proteine				
EBFP	383	445	Monomer	27
Cyan fluoreszierende Proteine				
ECFP	433	475	Monomer/Dimer	39
AmCyan	458	486	Tetramer	31
Gelb fluoreszierende Proteine				
EYFP	514	527	Monomer/Dimer	151
Venus	515	528	Monomer	156
Orange/Rot fluoreszierende Proteine				
mOrange	548	562	Monomer	146
DsRed	558	583	Tetramer	176
mCherry	587	610	Monomer	47

2.1.4 Impedimetrische Assays

Die Impedimetrie-basierten Biosensoren sind eine aufstrebende Klasse der elektrochemischen Biosensoren mit vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten, z.B. in der *Point-of-care*-Diagnostik, bedingt durch ihre verhältnismäßig geringen Kosten, einfache Miniaturisierung und der markierungsfreien Detektion. Neue Forderungen an geeignete sensorische Prin-

zipien zum Auslesen zellulärer Modellsysteme betreffen vor allem die Beschreibung der zeitlichen Dimension einer Zellreaktion, um ihren großen bioanalytischen Informationsgehalt nutzen zu können. Voraussetzung für eine kontinuierliche zeitaufgelöste Beobachtung einer Zellpopulation sind nichtinvasive Methoden, bei denen die Messung selbst ohne Einfluss auf die Zellen bleibt.

Unter einer Reihe von markierungsfreien Ansätzen ist das *Electric cell-substrate impedance sensing* (ECIS) eines der vielfältigsten und technisch am weitesten entwickelte Verfahren. Giaever und Keese etablierten diese Technologie, welche auf der Nutzung von Wechselstrom kleiner Amplitude zur Messung der elektrischem Impedanz zellbedeckter Elektroden beruht, bereits 1984 [38]. Dazu werden Zellen auf planaren Goldfilmelektroden ausgesät, die sich auf dem Boden eines Zellkulturgefäßes befinden. Die Goldfilme dienen einerseits als Kultursubstrat für die Zellen, andererseits als sensorische Oberfläche, wodurch, begründet in der unmittelbaren Nähe von Zellen und Elektrode, eine hochsensitive Messung möglich ist. Wie in Abbildung 2.5 dargestellt, werden zwei Elektroden genutzt, welche über das Zellkulturmedium elektrisch leitend verbunden sind: eine kleine Arbeitselektrode und eine deutlich größere Gegenelektrode (ca. 500fach).

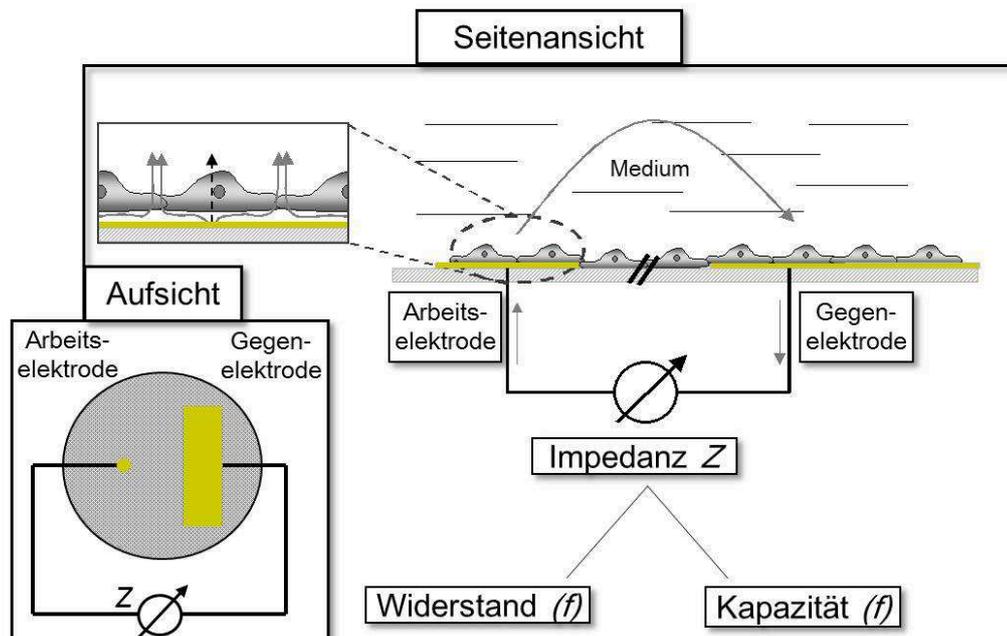


Abbildung 2.5: Prinzip des *Electric cell-substrate impedance sensing* zur kontinuierlichen, nicht-invasiven Beobachtung des Einflusses zytotoxischer Substanzen auf eine konfluente Monolayerschicht (modifiziert nach [51])

Die Grundidee der Methode beruht auf der Applikation einer sinusförmigen nicht-invasiven Wechselspannung variabler Frequenz und kleiner Amplitude (von wenigen mV) zur Anregung des Systems und der Messung des resultierenden Stromes zur Bestimmung des Wechselstromwiderstands in Abhängigkeit von der Frequenz. Für die Messung entscheidend ist, dass aufgrund der, gegenüber der Arbeitselektrode wesentlich größeren

Fläche der Gegenelektrode, deren Impedanzbeiträge zur Gesamtimpedanz des Systems vernachlässigt werden können, d.h. das Messsignal wird von der Arbeitselektrode und den darauf adhärennten Zellen dominiert. Die adhärennten Zellen verhalten sich auf der Elektrodenoberfläche wie isolierende Partikel, die den Strom bei niedrigen und mittleren Frequenzen von $f < 10$ kHz, wie in Abbildung 2.5 links oben dargestellt, zwingen, um sie zwischen Elektrode und Zellmembran herum zu fließen (parazellulärer Stromfluss). Die Spalte unterhalb der Zellen beträgt im Durchschnitt ca. 100 nm und erhöht hauptsächlich die Gesamtimpedanz des Systems in diesem Frequenzbereich. Aussagen zu Veränderungen der Zell-Zell- oder Zell-Substrat-Kontakte können gewonnen werden. Bei hohen Frequenzen $f > 10$ kHz fließt ein Großteil des Stromes kapazitiv durch die Zelle (transzellulärer Stromfluss). So können in diesem Frequenzbereich Informationen über die Zelloberfläche und deren Veränderung extrahiert werden.

Durch Messen der Impedanz bei verschiedenen, individuell zu eruiierenden Frequenzen lässt sich so, analog zur Einstellung der Fokusebene in einem klassischen Mikroskop, festlegen, welcher Teil des Zellkörpers das Messsignal dominieren soll. Die Methode wurde zur Beschreibung einer Reihe von Studien genutzt, um Informationen über die Belegung der Elektrode, d.h. Zelladhäsion und -spreiten [52], sowie über endo- und epitheliale Barrierefunktionen, d.h. die Ausprägung von Zell-Zell-Kontakten [53], zu gewinnen. Ändert sich die Zellform, z.B. infolge eines äußeren Stimulus, so wird diese Änderung ebenfalls mit submikroskopischer Auflösung in einer Änderung der gemessenen Impedanz abgebildet. So untersuchte Xiao *et al.* die konzentrationsabhängige Zytotoxizität verschiedener Giftstoffe an adhärennten Fibroblasten und konnte übereinstimmte EC_{50} -Werte für Cadmiumchlorid, Natriumarsenat und Benzalkonium mit den durch einen konventionellen Vitalitätstest gewonnenen Werten nachweisen [54].

Da Zellen auf nahezu alle chemischen, biologischen und physikalischen Stimuli mit der Änderung ihrer Zellform reagieren, hat sich die ECIS-Technologie aufgrund ihrer enormen Vielseitigkeit als ein sensorisches Verfahren zur markierungsfreien, nichtinvasiven und mit einem zeitauflösenden Vermögen weniger Sekunden bis Wochen [55] vielerorts etabliert. Diese Eigenschaften wurden innerhalb der vorliegenden Arbeit nutzbar gemacht und mit der Leistungsfähigkeit von Reporterassays verglichen.

2.2 Grundlagen der Photolumineszenz

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte biosensorische Detektionsverfahren beruht auf dem Phänomen der Fluoreszenz, weshalb im Folgenden dessen Grundlagen detailliert behandelt werden. Es kam weiterhin ein indirekter optischer Transducer in Form einer *Charge coupled device* (CCD)-Kamera als Komponente eines Mikroskops zur Messung der

Fluoreszenzintensität von GFP zum Einsatz, weshalb außerdem die Betrachtung wichtiger Aspekte der Fluoreszenzmikroskopie erfolgt.

2.2.1 Jablonski-Diagramm

Licht ist der Anteil elektromagnetischer Strahlung, der mit dem menschlichen Auge gesehen werden kann und umfasst ein Wellenlängenspektrum von 380-780 nm. Abhängig von der Energie der Strahlung sind Frequenz und Wellenlänge definiert. Je höher die Energie ist, desto kürzer ist die Wellenlänge, desto größer ist die Frequenz. Betrachtet man den Teilchencharakter der elektromagnetischen Strahlung, spricht man von Lichtteilchen oder Photonen.

Trifft elektromagnetische Strahlung auf eine Substanz, kann die von den Molekülen aufgenommene Energie (Absorption) verschiedene Zustände im Molekül hervorrufen. Für die Absorption im UV/Vis-Bereich sind Elektronenübergänge, ausschließlich in den äußeren Orbitalen eines Moleküls, verantwortlich. Dabei wird ein Molekül aus seinem Grundzustand in einen angeregten Zustand überführt. Die absorbierte Energie kann dann z.B. in Form von Wärme oder Strahlung wieder an die Umgebung abgegeben werden.

Verschiedene Substanzen verfügen jedoch nicht nur über die Fähigkeit Strahlung zu absorbieren, sondern auch zu emittieren. Dieses Phänomen wird Lumineszenz genannt. Wird die Emission durch die vorherige Absorption von Photonen ausgelöst, spricht man von Photolumineszenz, welche sich wiederum in Fluoreszenz und Phosphoreszenz unterteilen lässt.

Die Beobachtung der Fluoreszenz wurde von Sir F. W. Herschel 1845 beschrieben. In der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurden dann die grundlegenden Mechanismen zum Verständnis der Fluoreszenz geklärt. Die Prozesse, die während der Absorption und Emission von Licht auftreten, werden im sogenannten Jablonski-Diagramm (Abbildung 2.6) veranschaulicht. Dieses Diagramm wurde nach A. Jablonski, der als Vater der Fluoreszenzspektroskopie gilt, benannt [56].

Durch Energieaufnahme können Moleküle, die sich bei Raumtemperatur (RT) meist im untersten Schwingungsniveau des Grundzustands S_0 (Singulettzustand) befinden, einen elektronisch angeregten Zustand S_n erreichen. Es werden dabei zwei Arten der Elektronenniveaus unterschieden. Im Singulettzustand haben die Elektronen antiparallelen Spin, im Triplettzustand T_1 parallelen Spin. Weiterhin lassen sich jedem Energieniveau eine Reihe von Schwingungsniveaus (Bezug zur Kernschwingung) mit der Quantenzahl ν zuordnen, wobei der Abstand der Schwingungsniveaus mit steigender Schwingungsquantenzahl abnimmt. Die Wahrscheinlichkeit für einen Singulett-Übergang ist bei einer Lebensdauer von 10^{-5} bis 10^{-8} s wesentlich höher als für den angeregten Triplettzustand mit einer Lebensdauer von 10^{-3} s. Ein direktes Erreichen des Triplettzustands aus dem Grundzustand durch Ab-

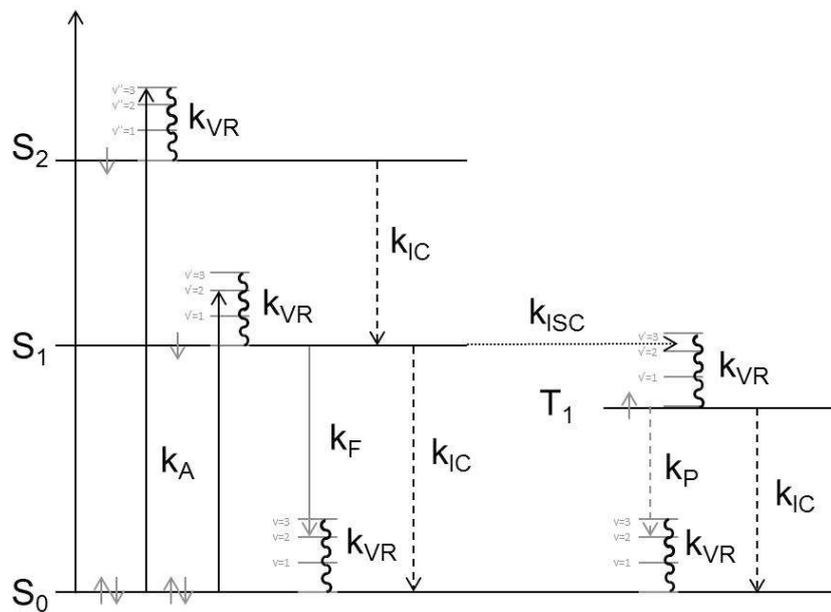


Abbildung 2.6: Jablonski-Diagramm zur Veranschaulichung von Absorptions- und Emissionsvorgängen im Molekül. Absorption (k_A), Singulettzustand (S), Triplettzustand (T), Schwingungsniveau (ν), Schwingungsrelaxation (k_{VR}), Internal conversion (k_{IC}), Intersystem crossing (k_{ISC}), Fluoreszenz (k_F), Phosphoreszenz (k_P), Spinmultiplizität (\uparrow).

sorption ist sehr unwahrscheinlich. Der Triplettzustand wird durch Übergänge aus anderen Anregungszuständen erreicht [57].

Generell geschieht die Anregung der Elektronen innerhalb von 10^{-15} s sehr schnell. In dieser Zeit verändert sich die Kernschwingung (10^{-12} s) nicht. Da die Potenzialkurven der elektronischen Anregungszustände abhängig von der Molekülstruktur gegeneinander verschoben sind, ist die Wahrscheinlichkeit, dass das Elektron ein anderes als das niedrigste der Schwingungsniveaus des entsprechenden Anregungszustands erreicht, erhöht. Indem sich die Kernschwingung anpasst gelangt das Elektron, unter strahlungsloser Energieabgabe, in das niedrigste Schwingungsniveau des angeregten Zustands zurück (V_R). Die Energieabgabe im gleichen Elektronenzustand ist durch thermische Equilibrierung oder durch Relaxation von Schwingungen, letztlich durch Stöße in Form von Wärme an das Lösungsmittel, möglich. Nachfolgende Emissionsvorgänge werden daher immer vom niedrigsten Schwingungszustand betrachtet. Strahlungslose Übergänge bei Änderung des Elektronenzustands können in Form von *Internal conversion* k_{IC} zwischen Elektronenzuständen gleicher Spinmultiplizität auftreten. Kommt es zu Übergängen zwischen Elektronenzuständen unterschiedlicher Spinmultiplizität, wird dieser Vorgang als *Intersystem crossing* k_{ISC} bezeichnet.

Die Fluoreszenz ist einem Übergang aus dem niedrigsten Singulett- in den Grundzustand zuzuordnen. Da die Lebensdauer dieser Übergänge ungefähr 10^{-10} bis 10^{-7} s beträgt, wird Fluoreszenz nur während der Anregung des Moleküls beobachtet. Dem Jablonski-Diagramm kann weiterhin entnommen werden, dass die Energie der Absorptionsvorgänge

grundsätzlich höher ist als die der Emissionsvorgänge. Ein Fluorophor emittiert immer ein Photon niedrigerer oder gleicher Energie, als es absorbiert (Stoke's Shift). Ein Fluoreszenzspektrum ist daher langwelliger als sein Absorptionsspektrum. Der Energieverlust ist auf Elektronenübergänge zu Zwischenschwingungsniveaus und einem damit verbundenen strahlungslosen Energieverlust, durch Effekte des Lösungsmittels, Reaktionen der Moleküle im angeregten Zustand und Energietransfer auf andere Moleküle, zurückzuführen. Bei seiner Rückkehr in den Grundzustand kommt außerdem erneut der Effekt der verschobenen Potenzialkurven zum Tragen. Auch hier ist die Wahrscheinlichkeit des Erreichens eines Zwischenschwingungsniveaus erhöht. Nach einer erneuten Anpassung der Kernschwingung ist der Prozess abgeschlossen. Das Prinzip der Potenzialkurvenverschiebung wird Franck-Condon-Prinzip genannt und erklärt u.a. die Spiegelsymmetrie von Absorptions- und Fluoreszenzspektren [56].

Phosphoreszenz ist mit einem Übergang aus dem Triplettzustand zu beobachten und nur in Verbindung mit *Intersystem crossing*, wodurch es den gleichen Spin wie das Elektron im Grundzustand erhält, dem Übergang von T_1 zu S_0 zuzuordnen. Eine Rückkehr in den Grundzustand ist somit verboten, wodurch sie langsamer vonstatten geht und die Lebensdauer 10^{-3} bis 10 s betragen kann [57, 58].

2.2.2 Charakteristiken der Fluoreszenzemission

Da die Energieabgabe beim S_1 - S_0 -Übergang eines Elektrons durch die konkurrierenden Prozesse der Photonenemission und strahlungsloser Prozesse geschehen kann, ist die Charakterisierung eines Fluorophors durch die Größe der Fluoreszenzquantenausbeute (siehe Gleichung 2.1) maßgeblich. Grundlegend für die Befähigung eines Moleküls zur Fluoreszenzemission sind dessen Aufbau, Polarisierung und sterische Eigenschaften. Aromatische Anteile sowie konjugierte Doppelbindungssysteme sind hierbei bekannte Strukturen. Außerdem muss das Fluorophor eine gewisse Starrheit aufweisen, da sonst die Energiedifferenz beim S_1 - S_0 -Übergang hauptsächlich durch strahlungslose Molekülschwingungen abgebaut wird.

Die Quantenausbeute ist ein Maß für die Effektivität des Fluoreszenzprozesses. Sie beschreibt das Verhältnis zwischen Intensität der absorbierten Photonen I_A relativ zur Anzahl der emittierten Photonen I_F und wird erheblich durch die Geschwindigkeitskonstanten der Fluoreszenz k_F und konkurrierender Desaktivierungsprozesse k_i bestimmt. Wenn $k_i \ll k_F$ kann die Effektivität der Fluoreszenzemission nahezu 100 % betragen. Verschiedene Faktoren, wie die Polarität und Viskosität des das Fluorophor umgebenden Lösungsmittels, pH-Wert und Temperatur oder andere im Medium enthaltene fluoreszenzlöschende Substanzen sowie intramolekulare Veränderungen des Fluorophors, können die strahlungslose Desaktivierung begünstigen oder benachteiligen und haben somit einen entscheidenden

Einfluss auf die Quantenausbeute.

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + \sum_i k_i} = \frac{I_F}{I_A} \quad (2.1)$$

Überlegungen zu den die Emission eines Fluorophors beeinflussenden Faktoren, schließen zunächst unspezifische Lösungsmittelleffekte ein. Die Polarität des Lösungsmittels hat einen entscheidenden Einfluss auf die Lösungsmittelrelaxation. Im nichtangeregten Zustand orientieren sich die Lösungsmitteldipole antiparallel zum Dipolmoment des Fluorophors. Durch die Absorption von Strahlung ändert sich das elektrische Dipolmoment des Fluorophors in Stärke und Orientierung. Dies hat die Anpassung der Lösungsmittelmoleküle zur Folge, da die erneute Einstellung des Gleichgewichts dieser Lage angestrebt wird. Der S_1 -Zustand wird stabilisiert und somit energetisch abgesenkt. Es kommt bei der Rückkehr in den Grundzustand zu einer langwelligeren Emission, welche proportional zur Polarität des Lösungsmittels verläuft (Lippert-Gleichung) [56].

Der Prozess der Lösungsmittelrelaxation ist weiterhin von der Temperatur und der Viskosität des Mediums abhängig. Die Quantenausbeute nimmt bei steigender Temperatur ab, da stärkere Molekülschwingungen die Wahrscheinlichkeit einer Desaktivierung durch strahlungslose Vorgänge begünstigt. Eine Abnahme der Lösungsmittelviskosität, gleichermaßen durch z.B. Erhöhung der Temperatur herbeigeführt, resultiert ebenfalls in einer gestiegenen Wahrscheinlichkeit einer strahlungslosen Umwandlung [59].

Die Intensität der Fluoreszenzquantenausbeute kann ferner durch molekulare Interaktionen beeinträchtigt werden. Die Stern-Volmer-Gleichung (siehe Gleichung 2.2) beschreibt dabei die Abhängigkeit der Quantenausbeute eines Fluorophors von der Konzentration der Stoffe, die die Fluoreszenz löschen (sogenannte *Quencher*). Diskutiert wird an dieser Stelle der Prozess der Stoßlöschung (dynamische Fluoreszenzlöschung), wobei es zur Kollision des Quencher mit dem Fluorophor kommt, jedoch kein Komplex gebildet wird. Befindet sich das Fluorophor bei der Kollision in seinem angeregten Zustand, so geht das Fluorophor aus dem angeregten Zustand in seinen Grundzustand zurück, ohne dabei Photonen zu emittieren. Dabei beschreibt K die Stern-Volmer-Konstante, k_q die bimolekulare Quenchingkonstante und τ_0 die Lebensdauer des angeregten Zustands des Fluorophors in Abwesenheit des Quenchers sowie $[Q]$ die Konzentration des Quenchers. Die Stern-Volmer-Konstante ist ein Maß für die Empfindlichkeit eines Fluorophors auf einen bestimmten Quencher. Durch die biomolekulare Quenchingkonstante kommt die Häufigkeit einer Kollision zweier in Lösung diffundierender Moleküle zum Ausdruck.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q] \quad (2.2)$$

Viele verschiedene Moleküle, z.B. Sauerstoff, Halogene oder Amine, können den Prozess der Stoßlöschung initiieren. Der Mechanismus der Löschung hängt dabei von der Fluorophor-Quencher-Paarung ab und ist z.B. auf Elektronentransfers oder Orbital-Spin-Wechselwirkungen zurückzuführen. Enthalten Lösungsmittel Schweratome, oder sind Substanzen mit Schweratomen gelöst, so nimmt die Fluoreszenzquantenausbeute des betrachteten Moleküls in Lösung ebenfalls ab. Schwer(metall)atome, die sich in engem Kontakt zum Fluorophor befinden, begünstigen den Übergang des *Intersystem crossings* durch Verstärkung der Orbital-Spin-Wechselwirkung [60]. Dies führt zu einer Zunahme der Geschwindigkeit der Triplett-Bildung und einer entsprechenden Abnahme der Fluoreszenzquantenausbeute. Der Prozess der dynamischen Löschung ist maßgeblich von der Zugänglichkeit des Quenchers zum Fluorophor abhängig. Befinden sich Fluorophor und Quencher frei in Lösung ist die Wahrscheinlichkeit für eine Kollision sehr hoch. Dies drückt sich in sehr großen Werten der Stern-Volmer-Konstante K aus. Ist das Fluorophor hingegen in ein Makromolekül eingeschlossen, ist dieses in der Regel für wasserlösliche Quencher nicht erreichbar und resultiert in einem geringen Wert für K bzw. ineffektiven Löschprozessen. Ein Beispiel dafür ist die hervorragende Photostabilität und Quantenausbeute des GFPs. Diese außerordentlichen Eigenschaften sind auf dessen β -Fasstruktur zurückzuführen, die das Chromophor von der unmittelbaren Umgebung abschirmt (siehe Kapitel 2.1.3) [56].

Eine weitere Größe zur Charakterisierung von Fluoreszenzeigenschaften ist die Fluoreszenzlebensdauer (siehe Gleichung 2.3), die den durchschnittlichen Zeitraum, den ein Molekül im angeregten Zustand verweilt und so mit seiner Umwelt interagieren bzw. sich verbreiten kann, beschreibt. Ebenso wie die Fluoreszenzquantenausbeute ist auch die Lebensdauer vom Verhältnis der unterschiedlichen Desaktivierungsprozesse des Fluorophors abhängig. Bei gleicher oder ähnlicher Emissionswellenlänge, können unterschiedliche Fluorophore unter Umständen anhand ihrer Fluoreszenzlebensdauer unterschieden werden. Die Ermittlung der Lebensdauer ist jedoch gerätetechnisch aufwendiger als die Ermittlung der Quantenausbeute.

$$\tau_F = \frac{1}{k_F + \sum_i k_i} \quad (2.3)$$

2.2.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ist heute eine der bedeutendsten Untersuchungsmethoden in den Naturwissenschaften, insbesondere der Life Sciences, die wie kaum eine andere Methode ein enorm breitgefächertes Anwendungspotenzial hat. Von der Darstellung von Strukturen im cm-Bereich bis hin zur Einzelmolekülanalyse werden Fluoreszenztechniken

verwendet. Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine spezielle Form der Lichtmikroskopie und nutzt zur Visualisierung von Proben den physikalischen Effekt der Fluoreszenz nach Anregung mit einer bestimmten Wellenlänge. Im Gegensatz zur Fluoreszenzspektroskopie erfolgt hier die Auswahl der Wellenlängen nicht basierend auf Monochromatoren, sondern auf der Nutzung von optischen Filtern.

Gewöhnlich wird die Fluoreszenzmikroskopie durch den sogenannten Epifluoreszenzaufbau realisiert (Abbildung A.1, s.S. 137). Diese Konfiguration hat den Vorteil, dass ein Großteil des Anregungslichts vom Detektor ferngehalten wird und außerdem die Betrachtung derselben Probenstelle möglich ist. Das zu beobachtende Objekt wird dabei nicht durchstrahlt, sondern durch das Objektiv beleuchtet. Durch Betrachtung der Transmissionsspektren (Abbildung A.2, s.S. 138) der speziell designten optischen Filtersets, bestehend aus Anregungs- und Emissionsfilter sowie einem dichroitischen Strahlenteiler, wird deren Notwendigkeit und Funktion deutlich. Als Lichtquellen werden in der gewöhnlichen Fluoreszenzmikroskopie Quecksilberdampf lampen eingesetzt. Diese emittieren Licht diskontinuierlich über das gesamte sichtbare Spektrum sowie im ultravioletten Bereich. Die für die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs notwendige Wellenlänge wird mithilfe des optischen Filters isoliert und das einfarbige Licht auf das Objekt geleitet. Das emittierte, in der Regel längerwellige Fluoreszenzlicht wird durch das Objektiv gesammelt. Der dichroitische Teilerspiegel ist ein Langpass-Interferenzfilter und ermöglicht somit die Spiegelung der kürzeren Wellenlängen zum Präparat und die Transmission des längerwelligeren Fluoreszenzlichtes zur Beobachtung im Okular des Mikroskops oder auf eine CCD-Kamera [40, 56].

Die Auswahl des Filtersets ist von großer Bedeutung für die Realisierung eines optimalen Fluoreszenzbilds, da dies sowohl auf die spezifische Helligkeit des Fluorophors als auch auf den Kontrast von Fluorophor und Hintergrund einen entscheidenden Einfluss hat. Zwar können bei Verwendung optimaler Kombinationen Hintergrundsignale minimiert werden, was aber gleichzeitig mit dem Sinken der Sensitivität des Systems einhergeht. Da Hintergrundsignale generell nicht zu vermeiden sind, ist das Mitführen entsprechender Negativkontrollen bei allen Analysen unerlässlich.

2.3 Potenzial und Methoden der Biomikrosystemtechnik

Das Forschungsgebiet Biomikrosystemtechnik beschäftigt sich mit der Entwicklung von *Lab-on-a-chip* (LoC), die eine oder mehrere Funktionalitäten eines makroskopischen Labors auf einer Plattform in der Größe weniger Millimeter bis einiger Quadratzentimeter ermöglichen. Sie eröffnen völlig neue Ansätze zur Untersuchung chemisch, physikalisch oder biologisch relevanter Fragestellungen. Die aus MEMS hervorgegangenen neuen

technischen Lösungen realisieren u.a. die Einsaat, Proliferation, Manipulation der Zellen und deren multiple Analyse durch Ausnutzung unterschiedlicher Detektionsmethoden. Daher werden solche Systeme oft auch als μ TAS bezeichnet. Der Begriff Mikrofluidik hingegen beschreibt die mechanische Peripherie, wie notwendige Pumpen, Ventile oder Sensoren, z.B. Viskosimeter oder Durchflussmessgeräte.

Die Biomikrosystemtechnik hat einen entscheidenden Einfluss auf die Biosensorentwicklung und deren vielfältig zu berücksichtigenden Aspekte genommen. Diese schließen neben der Signalumwandlung, einhergehend mit der Verstärkung des Signals bei gleichzeitiger Minimierung des Rauschens, auch die Oberflächenmodifizierung zur effizienten Bindung des biologischen Erkennungselements sowie die Art und Weise der Detektion ein. Neben der Datenanalyse, Ableitung von Interaktionsmechanismen und Analytenkonzentration ist außerdem das fluidische Design zum Zuführen und Transportieren aller notwendigen Komponenten, die Minimierung des Proben- bzw. Reagenzienverbrauchs und ein komfortables Handling des Systems entscheidend.

Dabei zeigte die Integration von *In-vitro*-Assays in mikrofluidische Plattformen in den letzten Jahren verschiedene Vorteile gegenüber konventionellen Labortechniken, insbesondere denen der zeitaufwendigen und kostenintensiven Zellkultur, auf, da konventionelle Methoden automatisiert und im Hochdurchsatz durchgeführt werden können. Die Möglichkeiten zur Optimierung von Probenvolumen, die schnelle und sensitive Detektion sowie eine wirtschaftliche Durchführung haben zur Weiterentwicklung zellbasierter Assays in Zellkulturflaschen und Wellplatten hin zu kontrollier- und reproduzierbareren Prozessen in mikrofluidischen Plattformen geführt. Im Gegensatz zu konventionellen Methoden der Zellkulturtechnik können mithilfe der Mikrofluidik kleine, dennoch komplexe Strukturen die *in-vivo*-nahe Umgebung zellulärer Strukturen nachahmen und dabei einen präzisen Transport sowie die Mischung von Medien, Puffern, Analyten und Stoffwechselprodukten gewährleisten. Aktuelle Forschungsarbeiten zeigten, dass mikrofluidische Zellkultursysteme durch Schaffung optimierter Mikroumgebungen noch verlässlichere Ergebnisse, verglichen zu statischen und makroskalierten Methoden erzielen können [61, 62, 63].

Hervorgegangen aus zwei Jahrzehnten intensiver Forschung und Entwicklung auf dem Gebiet der Mikrosystemtechnik existieren eine Reihe vielversprechender, biotechnologischer Anwendungen miniaturisierter Zellkultur- und Manipulationsplattformen, Biosensoren, Detektionssysteme in der *Point-of-care*-Diagnostik, Hochdurchsatzverfahren zum Wirkstoffscreening sowie Ansätze zur gezielten Pharmakotherapie und neuheitlichen Biomaterialien zum Einsatz auf dem Gebiet des *Tissue engineering*s [64].

Verschiedene LoC, die die Langzeitkultivierung eukaryotischer Zellen [65], die Analyse der zellulären Antwort auf chemische Gradienten [66], die Beobachtung des Differenzierungsverhaltens nach Stimulation mit verschiedenen Substanzen [67], das

Hochdurchsatz-Screening zur Bewertung der toxikologischen Verträglichkeit von Chemikalien [68] oder die Beobachtung von Zellysevorgängen [69] ermöglichen, wurden entwickelt.

Diese Ansätze zur Nutzung mikrofluidischer Plattformen wurden mit der Integration kontinuierlich arbeitender Analysegeräte auf eine nächste Stufe gehoben. Wurden in der Vergangenheit die Mehrzahl zellbasierter Assays eukaryotischer Zellen in Zellkulturflaschen und auch in mikrofluidischen Systemen noch in einem CO₂-Inkubator durchgeführt, werden nun verschiedene Ansätze zur Gewährleistung einer Echtzeitanalyse diskutiert. Der Inkubator schafft die für die Kultur notwendigen physiologischen Bedingungen, wie Sterilität, hohe Luftfeuchtigkeit, Konstanzhaltung der Temperatur und die Regulierung des pH-Werts über den im Zellkulturmedium enthaltenen Bicarbonatpuffer.

Aufgrund der räumlichen Trennung von Analysegeräten und Inkubator ist eine kontinuierliche Überwachung von dynamischen Prozessen allerdings unmöglich. Zwar existieren bereits Systeme, die eine automatisierte Zellkultur und gleichzeitiges Monitoring realisieren, jedoch sind dies meist sehr kostenintensive Geräte, die zusätzlich zur konventionellen Ausstattung angeschafft werden müssen. Die Weiterentwicklung von speziell konzipierten Zellkulturmedien und Puffern sowie die Adaptation von miniaturisierten Heizelementen und Spritzenpumpen an konventionelle Laborausstattungen haben einen flexiblen Weg zur einfachen, kontinuierlichen und sensitiven Analyse von Zellkulturexperimenten geebnet [70, 71]. Die Schaffung optimaler Zellkulturparameter zur Gewährleistung vergleichbarer Proliferationskinetiken ist dennoch nicht allgemeingültig und für den jeweiligen Zelltyp in Zusammenhang mit der Substratauswahl zur Mikrostrukturierung und der vorgesehenen Detektionsmethode zu etablieren [72].

2.4 Aufbau und Funktionen der menschlichen Haut

Die Haut ist das größte, funktionell vielseitigste Organ. Sie bildet die äußere Oberfläche des Organismus und stellt damit die Schranke zwischen Umwelt und innerem Milieu dar. Sie schützt die inneren Gewebe gegen äußere physikalische, chemische und biologische Einflüsse, wie z.B. vor UV-Strahlung, mechanischen Verletzungen und dem Eindringen von Mikroorganismen. Weiterhin verhindert sie eine zu starke Austrocknung, ermöglicht aber gleichzeitig die physiologische Wasserverdunstung (transepidermaler Wasserverlust), fungiert als Kontakt- und Sinnesorgan, und ist maßgeblich an der Regulation der Körpertemperatur und der Immunabwehr beteiligt [73].

Makroskopisch wird die Haut in Epidermis (Oberhaut) mit deren Anhangsgebilden (Drüsen, Haare, Nägel) und Dermis (Lederhaut, Korium) unterschieden. Epidermis und Dermis bilden die Kutis, unter der sich die Subkutis (Unterhautgewebe) befindet

(Abbildung 2.7). Die Epidermis, deren Dicke abhängig von der Körperregion 40 μm bis 1,6 mm beträgt, besteht aus einem mehrschichtigen, verhornten Plattenepithel: dem *Stratum corneum* (Hornschicht), *Stratum granulosum* (Körnerschicht), *Stratum germinativum* (Keimschicht), das nochmals in *Stratum spinosum* (Stachelzellschicht) und *Stratum basale* (Basalschicht) unterteilbar ist. Hauptzellpopulation der Epidermis sind die Keratinozyten, welche im *Stratum basale* gebildet werden und mit zunehmender Differenzierung unter Abflachung und Verhornung als kernloser und kreatinreicher Korneozyt an die äußerste Schicht, dem *Stratum corneum*, gelangen. Neben den Keratinozyten sind pigmentproduzierende Melanozyten, immunologisch aktive Langerhanszellen und Merkel-Zellen, die eine Bedeutung für die Sinneswahrnehmung besitzen, in die Epidermis eingelagert.

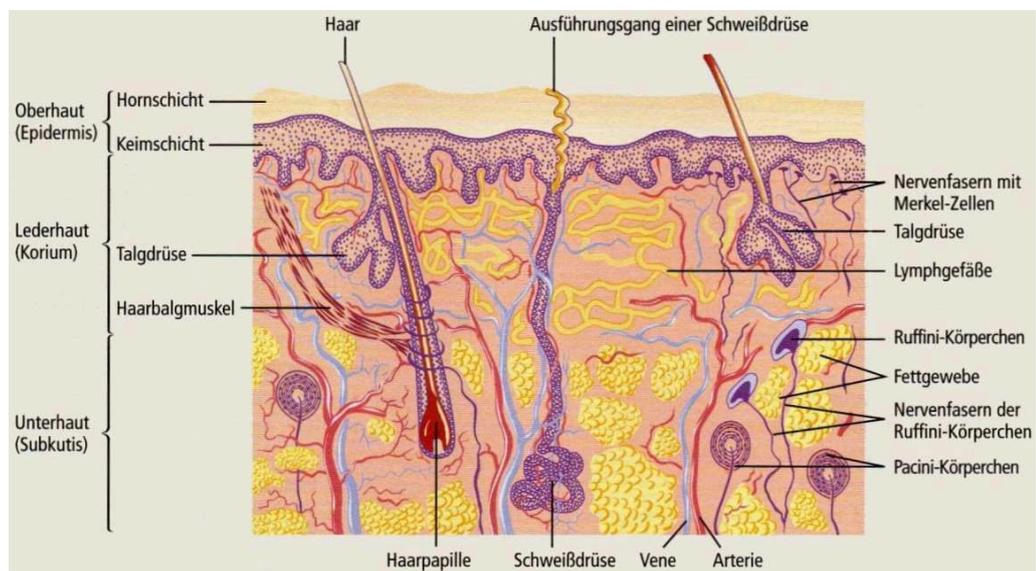


Abbildung 2.7: Aufbau der menschlichen Haut [74]. Die Haut besteht aus Epidermis und deren Anhangsgebilden (z.B. Haare, Talg- und Schweißdrüsen) und dem Korium. Zusammen werden sie als Kutis bezeichnet. Unter der Kutis befindet sich die Subkutis, in die das Korium ohne scharfe Grenze übergeht und die Kutis mit ihrer Unterlage verbindet.

Das *Stratum corneum* besteht aus 10-15 Schichten Korneozyten, die nur einen geringen Wasseranteil, als Hauptbestandteil Keratin und eine Lipidmatrix enthalten, und an der Oberfläche ständig in Form kleiner Schüppchen abschilfern. Die Barriere- und Speicherfunktion der Haut wird dieser Hornschicht, insbesondere der Lipidmatrix, zugeschrieben. Im darunterliegenden *Stratum granulosum* vollzieht sich die Keratinisierung. In dieser Hautschicht werden Ceramid-haltige Granula gebildet. Diese Keratinosomen fusionieren mit der Zellmembran und geben ihre hochlipophilen Bestandteile frei, die für die Barrierefunktion des *Stratum corneum* verantwortlich sind. Das *Stratum spinosum* enthält polygonale, leicht abgeflachte Zellen, die miteinander durch Desmosomen verbunden sind. Keratin-Tonofibrillen bewirken eine weitere Verfestigung des Zellverbands. Die Basalschicht setzt sich aus ruhenden und proliferierenden Zellen zusammen, besitzt eine erhebliche metabolische Kapazität und ermöglicht die Regeneration der Epidermis.

Die Dermis dient der Verankerung und Ernährung der gefäßfreien Epidermis. Sie wird in das *Stratum papillare* sowie das *Stratum reticulare* unterteilt und besteht vorwiegend aus Bindegewebsfasern. Hier versorgt das fein kapillarisierte Blutgefäßsystem (*Stratum papillare*) die Grenzzone zur Epidermis. Das *Stratum reticulare* besteht aus kräftigen Kollagenfasern, welche die Elastizität der Haut gewährleisten. Der Ursprung der Talg- und Schweißdrüsen findet sich ebenfalls in der unteren Lederhaut.

Das Kornium geht ohne scharfe Abgrenzung in die Subkutis über. Diese besteht aus unterschiedlich großen, von Bindegewebssepten umgebenen Fettläppchen in denen größere Blutgefäße, Lymphgefäße, Schweißdrüsen und Nerven eingebettet sind. Das subkutane Fettgewebe dient vor allem dem Kälteschutz und stellt einen Energiespeicher dar [74, 75].

2.5 Toxisch-irritative Kontaktdermatitis

Die Haut ist dem regelmäßigen Kontakt dermatologischer, kosmetischer und pharmazeutischer Produkte und verschiedenster umweltbedingter Einflüsse, die eine toxisch-irritative und/oder allergische Reaktion hervorrufen können, ausgesetzt. Die Kontaktdermatitis (Kontaktexzem) gehört zu den häufigsten Erkrankungen der Haut. Dabei handelt es sich um eine Intoleranzreaktion der Haut gegen Schädigungen der Epidermis durch meist äußerlich einwirkende, nichtinfektiöse Noxen. Die toxisch-irritative Form beruht entweder auf starken akuten oder längerfristig geringgradigen Schädigungen durch unterschiedlichste exogene Faktoren. Den allergischen Kontaktexzemen liegt eine Allergie vom Spättyp zugrunde und ist eine Folge der Schädigung der Hornschicht. Die Unterscheidung der beiden Formen der stattfindenden Entzündungsreaktion ist aus klinischer, histologischer und immunhistologischer Sicht verhältnismäßig schwierig. Eine sichere Diagnose kann nur in Verbindung mit dem Einwirkzeitpunkt und der -dauer erfolgen. Der Patch-Test stellt dabei ein entscheidendes diagnostisches Tool dar [76, 77]. Die toxisch-irritative Kontaktdermatitis ist wesentlich häufiger als die allergische Form und betrifft den alltäglichen Umgang mit unterschiedlichsten Substanzen im Haushalt, im Beruf und in der Freizeit.

Für die Entstehung der toxisch-irritativen Kontaktdermatitis (IKD) sind sowohl exogene als auch endogene Faktoren von Bedeutung. Exogene Faktoren werden dabei in physikalische und chemische Faktoren unterschieden, wobei im Alltag meist eine Kombination beider vorliegt. Häufige physikalische Faktoren können dabei mechanischer, z.B. durch Reibung, Druck oder Okklusion, sowie thermischer Natur sein oder durch UV- oder ionisierende Strahlung hervorgerufen werden. Die Wirkung eines chemischen Irritans auf die menschliche Haut wird größtenteils durch seine chemische Struktur (u.a. Ladung, Molekülgröße Molarität), sowie dessen Konzentration, Gesamtmenge, Penetrationsfähigkeit und Dauer der Applikation beeinflusst [78]. Häufige chemische Irritantien sind dabei

wasserlösliche Stoffe, z.B. Detergentien, Laugen, Säuren, Schwermetalle, aber auch nicht wasserlösliche Substanzen, wie Fette oder organische Lösungsmittel.

Die große interindividuelle Streuung in der Ausbildung von Kontaktdermatidien ist auf endogene Faktoren zurückzuführen. Besondere klinische Bedeutung haben dabei die primäre Hautirritabilität, die atopische Diathese, mangelnde Abhärtungsfähigkeit der Haut, die Beschaffenheit der Hornhautschichtbarriere und das Alter. Eine erhöhte Hautempfindlichkeit lässt sich bei Personen mit gleichzeitig bestehender atopischer Dermatitis (Neurodermatitis) feststellen. Die individuell unterschiedliche Hautempfindlichkeit bei gesunder Haut hingegen wird durch die Eigenschaften der Hornschichtbarriere bestimmt. Ist beispielsweise die Wasserpermeabilitätsbarriere, eine zentrale Funktion der Epidermis, gestört, können exogene Faktoren die Haut besonders leicht penetrieren und so zu einer verstärkten Reaktion führen [79].

Eine akute IKD entsteht, wenn die Haut einem starken, meist chemischen Irritans, ausgesetzt wird. So kommt es z.B. bei Verätzungen mit konzentrierten Säuren oder Laugen innerhalb von Minuten zur Blasenbildung und der Ausprägung von Gewebnekrosen. Schwächere Irritantien hingegen schädigen die Keratinozyten nur subletal und endzündliche Stadien resultieren. Wird die Haut wiederholt exogenen, eine IKD hervorrufende Faktoren ausgesetzt, kann es zur Ausbildung einer chronischen IKD kommen. Meist wird die irritierende Wirkung nicht bemerkt. Erst durch wiederholte Applikation erfolgt das Überschreiten eines Schwellenwerts und die IKD wird sichtbar. Ein allgemeines Beispiel betrifft das besonders häufige Waschen der Haut, wobei die wiederholten Schädigungen in so kurzer Zeit stattfinden, dass sich die Haut nicht regenerieren kann [80].

Generell induzieren die vielen verschiedenen Faktoren in unserer Umwelt unterschiedliche Mechanismen der Irritation. Ist die Permeabilitätsbarriere jedoch erstmal gestört, führt die Einwirkung aller Faktoren sekundär zu einer einheitlichen unspezifischen immunologischen Antwort, die mit der Produktion von Zytokinen und anschließenden intrazellulären Interaktionen der Keratinozyten einhergeht [81, 77].

2.6 Mechanismen der Keratinozytenaktivierung

Um negative Änderungen in ihrer Umwelt zu verarbeiten, haben Keratinozyten vielfältige Strategien entwickelt, die im Umkehrschluss als molekulare Biomarker zur Etablierung eines sensorischen Systems dienen könnten. Diskutiert werden in diesem Zusammenhang sowohl die Stoffwechsellage des oxidativen Stresses als auch komplexe Signalkaskaden, die an der Informationsweiterleitung von der Zelloberfläche zum Zellkern beteiligt sind, wichtige Transkriptionsfaktoren und die Familie der Hitzeschockproteine. Einen Überblick, für die im Rahmen dieser Arbeit wichtigen Zusammenhänge und im Folgenden diskutierten

Sachverhalte, gibt Abbildung 2.8.

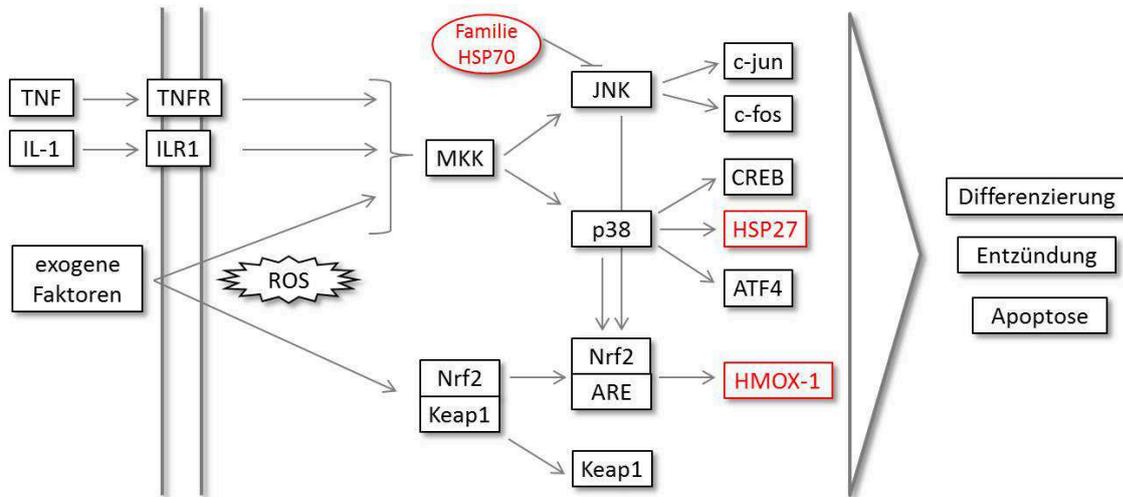


Abbildung 2.8: Schema intrazellulärer Signalkaskaden in aktivierten Keratinozyten. Ausgehend vom Einfluss exogener Faktoren bzw. der Ausschüttung von Zytokinen, wie IL1 und TNF, aktivierter Keratinozyten werden intrazellulär u.a. der MAP-Kinase-Weg (oben) und der Nrf2-Keap1-ARE (unten) hochreguliert. Die Aktivierung der Signalwege bzw. spezieller Transkriptionsfaktoren induziert verschiedene Mitglieder der HSPs (rot hervorgehoben). Diese Vertreter stellen möglicherweise universelle Biomarker zur Detektion zellschädigender Effekte dar.

2.6.1 Signaltransduktion

Aufgrund ihrer exponierten Lage an der Oberfläche des menschlichen Organismus werden Keratinozyten kontinuierlich exogenen Faktoren ausgesetzt, welche zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führen. Der oxidative Stress bezeichnet eine Stoffwechsellage, bei der eine das physiologische Ausmaß überschreitende Menge der ROS gebildet wird bzw. vorhanden ist. Diese Imbalance zwischen Pro- und Antioxidantien kann zu Schäden der zellulären Makromoleküle und zur Zerstörung der Redoxsignalwege, deren Kontrolle und Gleichgewicht führen [82, 83]. Die für den oxidativen Stress verantwortlichen ROS werden in freie radikalische Intermediate (z.B. Hyperoxidanion, Hydroxylradikal, Alkoxyradikal) und nicht radikalische Oxidantien (z.B. Wasserstoffperoxid, Aldehyde, Peroxynitrit) unterteilt [84]. Die Regulation des Redoxstatus ist für die Aufrechterhaltung der intrazellulären Homöostase entscheidend.

Ausgehend von der Einwirkung exogener (UV-Strahlung, Schwermetalle und andere chemische Substanzen) und endogener (zellulärer Metabolismus, pathologische Entzündungsreaktionen) Faktoren aktivieren Keratinozyten eine Reihe von Signalkaskaden, die u.a. einen Einfluss auf den intrazellulären ROS-Gehalt nehmen, entsprechend zum programmierten Zelltod führen oder zum Überleben der Zellen beitragen. Dabei ist die Balance zwischen beiden Szenarien entscheidend für den Verbleib der Zelle. Lebenserhaltende, intrazelluläre Signalkaskaden sind grundsätzlich aktiv und können durch entsprechende exogene Faktoren zusätzlich hochreguliert werden, um dem Stress-aktivierten Zelltod

im Sinne einer unspezifischen nichtimmunologischen Abwehr entgegenzuwirken. Die Aktivierung der involvierten Signalkaskaden in Keratinozyten, wie die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), aber auch die *Janus kinase-signal transducer and activator of transcription* (JAK-STAT) sowie die Caspase-Signalwege, kann dabei direkt oder rezeptorvermittelt verlaufen.

Eines der initialen Signale Stress-aktivierter Keratinozyten ist die Ausschüttung des Zytokins Interleukin IL-1 α . Bei ungestörter homöostatischer Proliferation werden Interleukine als Reserve angelegt und erst durch innere oder äußere Faktoren als Botenstoffe sezerniert. Erst einmal aktiviert, synthetisieren die Keratinozyten zusätzliche Wachstumsfaktoren und proinflammatorische Zytokine, u.a. TGF α , IL-3, IL-6, IL-8, GM-CSF [85]. Diese unterschiedlichen Botenstoffe sind für Leukozyten chemostatisch und wirken parakrin auf Lymphozyten, Fibroblasten und Endothelzellen. Entscheidend dabei ist, dass diese Signalmoleküle ebenfalls autokrin auf die Keratinozyten wirken und dies zu sekundären Effekten führt [86], welche durch ein komplexes Wechselspiel, Überlagerungen und Interaktionen charakterisiert sind.

Die wichtigsten involvierten Oberflächenrezeptoren sind Zytokinrezeptoren, wie z.B. IL1R und IL6R, aber auch der *Epidermal growth factor receptor* (EGFR), der z.B. durch TGF α aktiviert wird. Die Interleukin-Rezeptoren vermitteln u.a. den STAT-Signalweg. Durch Bindung der Liganden erfolgt die Aktivierung der Zytokinrezeptoren, die mit JAK interagieren und die Phosphorylierung von STAT initiieren. Diese werden dadurch aktiviert und translozieren in den Zellkern, wo sie an spezifische DNA-Sequenzen binden und die Transkription von proinflammatorischen Zytokinen beeinflussen. Die regulatorische Spezifität der Zytokinsignale an der Zelloberfläche wird dabei durch entsprechende Aktivierung der STAT-Familie im Zellkern wiedergespiegelt. So wird beispielsweise die Bindung von IL-6 ausschließlich über die Aktivierung von STAT3 vermittelt [86, 87]. EGFR hingegen beeinflusst die als zentrale Vermittler für die Differenzierung-, Entzündung- oder Apoptose-betreffende Prozesse beschriebenen hochkonservierten MAPK [88]. Dieser Signalweg wird durch eine Reihe endogener und exogener Faktoren in einer 3-stufigen Kaskade aktiviert und hat entscheidenden Einfluss auf die Zellzyklusregulierung (siehe Abbildung 2.8, s.S. 26). Zu den MAP-Kinasen zählen drei Unterfamilien, die *Extracellular signal-related kinase* (Erk), die p38 MAP-Kinasen (p38) und die *c-Jun N-terminal Kinase* (JNK), wobei die auch als Stress-aktivierte Proteinkinasen (SAPK) bezeichneten p38 und JNK besonders auf unterschiedlichste Stimuli reagieren.

Wie schon durch ihre Namen gekennzeichnet, besitzen die JNK die Fähigkeit N-terminale Aminosäurereste (Ser63 und Ser73) von c-Jun zu phosphorylieren. Dies korreliert mit einer erhöhten Transkriptionsaktivität. Es werden verschiedene weitere Transkriptionsfaktoren, z.B. ATF-2, Nf-ATC und STAT3, phosphoryliert [89]. Die zweite durch IL-1 oder

andere exogene Faktoren aktivierte Kinase ist p38, die insbesondere als Ser/Thr-Kinase in der Aktivierung und Phosphorylierung des kleinen Hitzeschockproteins HSP27 involviert ist [90]. Dass die SAPKs durch eine Reihe von Faktoren direkt (Generierung von ROS) oder rezeptorvermittelt (u.a. EGFR, IL1R) aktiviert werden und dies in der Regel zur Vermittlung Tod-induzierender Signale führt, konnte ebenfalls für Keratinozyten bewiesen werden [91].

2.6.2 Spezielle Transkriptionsfaktoren

Neben den dargestellten Signalkaskaden gehört auch die Aktivierung spezieller Transkriptionsfaktoren zur Betrachtung der Verarbeitung exogener Signale in Keratinozyten. Als ein entscheidender Faktor gilt der *Nuclear factor* κ B (NF- κ B). NF- κ B liegt inaktiv im Zytoplasma, gebunden an das Protein *Inhibitor of* κ B (I κ B α), vor. Eine exogene Stimulation bewirkt die Änderung der Aktivität zellulärer Signalwege, z.B. der des MAP-Kinase-Wegs. Die gemeinsame Endstrecke der Aktivierung von NF- κ B resultiert in der Stimulation des I κ B-Kinase-Komplexes (IKK), der die I κ B α -Proteine phosphoryliert. Dadurch wird deren Ubiquitinylierung sowie Abbau durch das Proteasom eingeleitet. Die freigesetzten NF- κ B-Moleküle gelangen in den Zellkern, in dem sie ihre spezifischen Funktionen ausüben und die Transkription verschiedener Gene beeinflussen [92]. Charakteristisch für NF- κ B ist die unverzügliche Aktivierung, die schon wenige Minuten nach der Stimulation einsetzt, da keine zeitaufwendige Synthese neuer Proteine, sondern lediglich eine Freisetzung vom Inhibitor notwendig ist [86]. In Epithelzellen nimmt der NF- κ B-Signalweg eine ausbalancierende Funktion im Zuge der Regulation der Zellvitalität und Aufrechterhaltung der Barriereintegrität ein [93].

Ein weiterer im Zusammenhang mit zellschädigenden Einflüssen stehender Mechanismus betrifft Nrf2-Keap1-ARE (siehe Abbildung 2.8, s.S. 26). Der *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) reguliert die Expression von Genen, die das *Antioxidant response element* (ARE) in ihrem Promotor tragen und spielt eine Schlüsselrolle unter den redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren. Die transkriptionelle Aktivierung von Nrf2 ist normalerweise durch die Bindung an *Kelch-like ECH associating protein 1* (Keap1), welches als molekularer Sensor bei Störungen der zellulären Homöostase agiert, inhibiert. Aufgrund verschiedenster exogener Faktoren, wie Schwermetalle, UV-Strahlung und ROS, erfolgt die Modifikation der Cystein-Reste am Keap1 und die Phosphorylierung des Nrf2 durch MAPK. Die Dissoziation des Komplexes ist das Resultat [94]. Nrf2 transloziert in den Zellkern, kann an das ARE binden und fungiert nun als Transkriptionsfaktor für die Expression einer Reihe regulatorischer Proteine, beispielsweise Glutathion-S-Transferase, γ -Glutamylcysteinsynthetase und Hämoxxygenase-1 (HMOX-1) [95]. HMOX-1, welches zur Familie der HSPs gezählt wird, ist ein Enzym, das Häm zu Eisen, Biliverdin und

Kohlenstoffmonoxid oxidiert und abbaut. Das Enzym ist nicht nur unverzichtbar für den Porphyrin-Abbau, sondern ist auch an der Signaltransduktion beteiligt. Es kann durch proinflammatorische Zytokine, Hitze, Schwermetalle und weitere Oxidantien, stark induziert werden. Es zählt zur Gruppe der antioxidativen Mechanismen, um die Balance von Pro- und Antioxidantien zu gewährleisten und ist innerhalb der Verarbeitung von Stresssituation in Eukaryoten essenziell [96].

2.6.3 Hitzeschockproteine

Hitzeschockproteine spielen weiterhin eine entscheidende Rolle in der Betrachtung stress-induzierter Mechanismen. Sie wurden erstmals 1962 im Chromosom der *Drosophila melanogaster* nach einer Hitzebehandlung entdeckt [97]. Diese große und heterogene Gruppe von speziellen Proteinen ist evolutionär hochkonserviert und wird in allen Zellen und Organismen von Prokaryoten bis zum Menschen exprimiert [98]. Die HSPs werden nach ihrem Molekulargewicht klassifiziert und, neben Hitze, auch durch andere Formen des pathophysiologischen Stresses aktiviert. Die Hitzeschockantwort resultiert in einer erhöhten Expression der Proteine und fördert damit das Überleben der Zelle. Viele der HSPs fungieren in der Zelle als molekulare Chaperone, die anderen Proteinen bei der Faltung oder bei der Erhaltung ihrer Sekundärstruktur, deren Transport und Interaktionen, unter Extrembedingungen helfen [99].

Die Einwirkung umweltbedingter Stressfaktoren geht mit einer fundamentalen Änderung physiologischer Proteinsynthesemuster einher. Eine Abnahme der Proteinsyntheseaktivität führt zur spezifischen Transkription HSP-codierender Gene, deren Kontrolle von den *Heat shock elements* (HSE) ausgeht. Aktivierte Transkriptionsfaktoren, die *Heat shock transcription factors* (HSF), binden an die HSE und induzieren die Transkription der HSPs. Von den vier bekannten humanen HSFs sind HSF1 und 2 sehr gut charakterisiert [100]. In ungestressten Zellen liegt HSF1 als phosphoryliertes Monomer hauptsächlich im Zytoplasma vor. Nach Stressexposition transloziert dieser in den Zellkern, bildet Trimere, bindet an die entsprechenden DNA-Regionen und aktiviert die Transkription der HSPs. Gleichzeitig ist dieser Mechanismus in eine Feedback-Kontrollschleife (Thermotoleranz) eingebunden, da sonst eine überhöhte Expression der HSPs gleichermaßen lethal wäre. Verschiedene Ansätze werden dabei in der Literatur diskutiert. So wird durch Bindung von HSP70 die transkriptionale Aktivität von HSF 1 reprimiert [101], gleichermaßen spielt das HSF Binding Protein (HSPB1) eine wichtige Rolle [100] und außerdem wurde die Hyperphosphorylierung der HSFs durch Erk und JNK und deren inhibierende Wirkung auf die Transkriptionsaktivität der HSFs beschrieben [102].

HSP27 und HSP70 sind die am besten in der Biologie der Haut untersuchten Vertreter der HSPs. HSP27 gehört zur Familie der kleineren HSPs, es fungiert als molekulares

Chaperon und schützt Zellen vor umweltbedingtem Stress. Es wird in den höheren Lagen der Epidermis exprimiert und spielt sowohl in der Keratinozytendifferenzierung [103], im Zellwachstum, als auch in der Prävention des programmierten Zelltods und in der Regulation entzündungsvermittelnder Signalwege eine entscheidende Rolle. HSP27 reguliert die TNF α -induzierte Produktion der proinflammatorischen Vermittler Prostaglandin E₂ und IL-8 [104].

Zur Familie der HSP70 zählen verschiedene Vertreter, die z.B. durch die Gene *HSPA1A* (HSP72), *HSPA2* (HSP70-2A) und *HSPA6* (HSP70B') codiert werden. Insgesamt wurden mindestens 11 Vertreter dieser Familie identifiziert, deren codierende Sequenzen auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind. Es existieren konstitutive und induzierbare Isoformen. Das prominenteste induzierbare HSP ist HSP72. Es wurde bereits 1985 kloniert [105] und seither umfassend untersucht. Im Gegensatz zu vielen anderen Zellen des menschlichen Organismus wird insbesondere HSP72 konstitutiv in epidermalen Keratinozyten exprimiert, um die natürliche Barriere gegen potenziellen umweltbedingten Stress ständig aufrechtzuerhalten. Kommt es plötzlich zu einem kritischen exogenen Einfluss wird HSP72 superinduziert. HSP72 trägt zwei konservierte Domänen, eine *ATP-binding domain* (ABD) und eine *Peptide-binding domain* (PBD), die als entscheidend für dessen Funktion als molekulares Chaperon gelten [106]. Darüberhinaus wurde gezeigt, dass HSP72 die apoptotischen Signalwege SAPK und Caspase unterdrückt [107]. HSP72 interagiert und inhibiert den apoptotischen Protease-Aktivierungsfaktor-1 (Apaf-1) und verhindert so die autolytische Aktivierung der Caspase 9 [108]. Außerdem inhibiert HSP72 über seine PBD den JNK-Signalweg (siehe Abbildung 2.8, s.S. 26) [109] und ist an der stressinduzierten Translokation von p38 als molekulares Chaperon beteiligt [110].

HSP70B' ist grundsätzlich nur durch Stress induzierbar und kann in ungestressten Zellen nur sehr schwer nachgewiesen werden. HSP72 und HSP70B' weisen eine 84%ige Sequenzhomologie auf und unterscheiden sich lediglich in der Substratbindungstasche und in ihrem Aktivierungsmechanismus [111]. Das für HSP70B' codierende Gen *HSPA6* wurde erst 1990 als ein neues Gen der HSP70-Familie kloniert [112]. In den Folgejahren konnte mehrfach gezeigt werden, dass auch dieses Gen durch eine Reihe zellulärer Stressoren induziert werden kann [113, 114].

2.7 Möglichkeiten und Grenzen unterschiedlicher Hautmodelle

Verschiedene *In-vitro*-Modelle für Hauttoxizitätsscreenings, die durch spezielle Eigenschaften den unterschiedlichen Bedürfnissen der Anwender genügen, sind ausführlich in der Literatur beschrieben worden. So sind konventionelle Keratinozyten (NHEK) oder

immortalisierte Hautzelllinien (HaCaT) in Monolayerkultur (2D-Kultur), epidermale Äquivalente (z.B. EpiSkin™, EpiDerm™ und SkinEthic™) sowie Hautäquivalente (Testskin) und Hautexplantate verfügbar.

2.7.1 2D-Modelle – die HaCaT-Zelllinie

In sogenannten *Single-cell Assays* wird ein einzelner Zelltyp in konventioneller Zellkultur als Monolayer verwendet. Idealerweise werden in diesen Assays immortalisierte Zelllinien statt Primärkulturen eingesetzt. Die Benutzung von Zelllinien erlaubt die uneingeschränkte Vervielfältigung von Zellen einer Herkunft und eliminiert experimentelle Abweichungen aufgrund unterschiedlicher Spender. Des Weiteren eignen sie sich besonders gut für die Durchführung zeitlich ausgedehnter Studien. Auf dieser Basis können komplexe experimentelle Serien durchgeführt und gegebenenfalls auch wiederholt werden [115]. Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung permanenter Zelllinien für *In-vitro*-Toxizitätsstudien ist die Möglichkeit zur stabilen genetischen Modifikation der Zellen (siehe Kapitel 2.7.3).

Nachteilig ist das Nichtvorhandensein einer Hornhaut (*Stratum corneum*) und damit das Fehlen der natürlichen Barrierefunktion der Haut, weshalb die Monolayerkulturen höchst sensitiv sind. Anhand der Ergebnisse kann deshalb ausgesagt werden, ob eine Substanz zellschädigendes Potenzial hat, jedoch nicht, ob sie durch die natürliche Hornhaut penetrieren würde [116]. Aus den genannten Gründen eignen sich diese Monolayerkulturen immortalisierter Zelllinien also besonders für den Einsatz in präklinischen Hochdurchsatzscreenings [117], wobei die Ergebnisse stets, wegen Abwesenheit der natürlichen Barrierefunktion, kritisch betrachtet werden sollten.

Keratinocyten sind der vorherrschende Zelltyp der humanen Haut und treten zuerst mit exogenen Faktoren in Kontakt. Daher stellen Keratinocyten einen geeigneten Zelltyp zur Untersuchung dermatologischer Effekte dar. In diesem Zusammenhang ist die HaCaT-Zelllinie zu einem wertvollen und vielfältig genutzten Hautmodell geworden, da sie besonders dem Verhalten nativer Keratinocyten gleicht. Die HaCaT-Zellen entstammen der Peripherie eines primären malignen Melanoms der Rückenhaut eines 62-jährigen männlichen Patienten [118]. Etabliert und in vielfältiger Hinsicht charakterisiert wurde die HaCaT-Zelllinie Ende der achtziger Jahre des 20. Jahrhunderts am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg. Es handelt sich um eine permanente, epitheliale humane Zelllinie, die als phänotypisch spontan transformiert, aber nicht tumorigen eingestuft wird. HaCaT-Zellen weisen sowohl in Einzelkultur, als auch in Co-Kultur mit Fibroblasten oder nach Transplantation auf Nacktmäuse die Eigenschaften epidermaler Keratinocyten auf [119, 120, 121]. Eine Besonderheit der HaCaT-Zellen ist der erhaltene Differenzierungsmechanismus und die Fähigkeit, *in vitro* dennoch auf Differenzierungsvermittler wie Calcium und Retinoide zu reagieren [122]. Die breite Verwendung der HaCaT-Zellen lässt sich auf

deren besondere genetische Balance auch über lange Kultivierungsperioden zurückführen, da gezeigt werden konnte, dass HaCaT-Zellen selbst bei sehr hohen Passagen (>300) zwar zahlreiche Translokationen und Deletionen, jedoch keine malignen Transformationen aufweisen [123].

2.7.2 3D-Modelle

Epidermale Äquivalente bestehen aus einer ausdifferenzierten rekonstruierten humanen Epidermis. Hierfür erfolgt zunächst die Aussaat vereinzelter primärer Keratinozyten auf ein geeignetes Trägermaterial. Die Kultur wird für einige Tage von Medium bedeckt inkubiert, um die Proliferation zu stimulieren. Nachfolgend wird der Träger mit der inzwischen dünnen mehrlagigen Schicht von Keratinozyten an die Luft-Medium-Grenze gebracht, um nun ihre Differenzierung zu induzieren. Die Luftexposition der epidermalen Zellen ist ausschlaggebend für das Auftreten eines vielschichtigen Gewebes mit einem kohärenten *Stratum corneum* [124].

Zwei der kommerziell erhältlichen epidermalen Äquivalente (EpiDerm und EpiSkin) sind als vollständiger Ersatz für Hautkorrosionsstudien an Tieren 2007 validiert und akzeptiert worden. Die Zuverlässigkeit und Relevanz der Modelle zur Nachahmung der menschlichen Haut wurde durch Ringvalidierungsstudien unter Beaufsichtigung des Europäischen Zentrums zur Validierung alternativer Methoden ermittelt und die Methoden als offizielle OECD-Testrichtlinie akzeptiert [125].

Weiterhin sind Hautäquivalente bekannt, die nicht nur aus einem epidermalen, sondern auch aus einem dermalen Kompartiment bestehen und damit ein noch komplexeres Modell darstellen. Bei den Vollhautmodellen können Fibroblasten-besiedelte Kollagengele, aber auch dermale Fibroblasten, in die Hautmodelle inkorporiert werden und bilden so eine extrazelluläre Matrix. Dadurch zeigt dieses Modell eine gesteigerte Ähnlichkeit zur natürlichen Haut, jedoch sind zusätzliche Vorteile für das industrielle Screening dieses Modells gegenüber den epidermalen Modellen bis jetzt nicht bekannt. Die Vorteile des Modells für Forschungszwecke sind leichter ersichtlich, da durch die Zell-Zell-Interaktion zwischen den beiden Kompartimenten ein noch physiologischeres Abbild der humanen Haut geschaffen wurde.

Frisch isolierte Hautexplantate sind dennoch allen Hautmodellen bezüglich der Vergleichbarkeit zu den Bedingungen *in vivo* übergeordnet, allerdings stellt deren Bereitstellung ein großes logistisches sowie ethisches Problem dar. Deshalb eignet sich dieses Modell weder für industrielle Screenings noch für ausgedehnte Forschungsaktivitäten [126].

2.7.3 Biomarker in Hautirritationstests

Gleichermaßen wichtig bei der Durchführung von Toxizitätstests zur Evaluierung des zellschädigenden Potenzials einer Substanz ist nicht nur die Auswahl des richtigen Hautmodells, sondern ebenso die Wahl eines aussagekräftigen Biomarkers zum Auslesen der zellulären Effekte.

Viele der heute etablierten *In-vitro*-Untersuchungsmethoden beruhen auf der Quantifizierung der enzymatischen Aktivität metabolisch aktiver Zellen mit Hilfe einfacher kolorimetrischer Messverfahren. Die mitochondriale Succinat-Dehydrogenase ist ein solches Beispiel und bildet die Grundlage für den international validierten MTT-Test. Durch die reduktive Spaltung des löslichen, schwach gelben Tetrazoliumsalzes 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid reichern sich wasserunlösliche violette Formazan-kristalle in lebenden Zellen an [127]. Löst eine applizierte Substanz eine zytotoxische Reaktion in den Zellen aus, ist dies mit einem proportionalen Abfall der Enzymaktivität verbunden. Ähnlich funktionieren die Assays basierend auf den Farbstoffen XTT [128] oder WST-1 [129]. Die Messung der Lactat-Dehydrogenase-Aktivität (LDH) ist ein zweites Beispiel für ein vielfältig in der Literatur angewendetes Standardprotokoll. Die Aktivität der Lactat-Dehydrogenase wird im Überstand der Zellkultur gemessen und bezieht sich auf einen Verlust der Membranintegrität der Zellen infolge der Einwirkung einer toxischen Substanz [130]. Der Neutralrot-Test beruht auf der Aufnahme des Farbstoffs Neutralrot in die Lysosomen vitaler Zellen. Der leicht kationische Farbstoff (bei pH 7,4 ungeladen) gelangt durch nicht-ionische Diffusion in die Zellen und wird dort an anionische Reste der lysosomalen Matrix gebunden. In geschädigten Zellen ist die Fähigkeit zur Aufnahme und Bindung von Neutralrot durch Veränderungen der Zell- sowie der lysosomalen Membran vermindert [131].

Bei allen genannten Methoden liegt der Fokus auf der Detektion einer akuten Toxizität, die mit massiven morphologischen Änderungen der Zellen einhergeht. Da proinflammatorische Zytokine bereits bei subletalen Konzentrationen einer zellschädigenden Substanz von der Epidermis ausgeschüttet werden, hat sich insbesondere die Detektion von IL-1 α als ein Biomarker zur frühzeitlichen Erkennung von Hautirritationen in 2D- sowie 3D-Hautmodellen durchgesetzt [132, 133, 134, 135].

Weitere detaillierte Studien zur Untersuchung der frühzeitigen Antwort der Zellen, vorzugsweise gekoppelt mit einer Echtzeitanalyse, haben mehr und mehr an Interesse gewonnen. Besondere Impulse gehen dabei von den *Omics*-Technologien aus, die auf der unmittelbaren Änderung der Proteinexpression durch sowohl physiologische als auch toxikologische Einflüsse basieren und damit eine strukturelle und funktionelle Charakteristik der Zelle ermöglichen [136]. In diesem Zusammenhang wurden mittels Microarray-Analysen oder qRT-PCR-Studien auf Transkriptomebene [137, 138, 139, 95] sowie durch

2D-PAGE-Experimenten auf Translationsebene [140, 141] verschiedene Biomarker der Hautirritation vorgeschlagen, deren Art trotz des Einsatzes unterschiedlicher Hautmodelle redundant ist. Vorrangig sind Interleukine, u.a. IL-1 α , IL-1 β und IL-8, zu nennen. Während die Detektion von IL-1 α bereits zu den validierten Methoden gehört [125, 126], werden ferner stress-sensitive Proteine häufig vorgeschlagen.

Gleichzeitig hat die Weiterentwicklung gentechnischer Methoden und die Tatsache, dass ein entscheidender Vorteil permanenter Zelllinien deren Möglichkeit zur stabilen genetischen Modifikation ist, zur Generierung unterschiedlich konstruierter Zelllinien geführt, die eine einfache und sensitive Detektion reizender, zellschädigender und toxischer Effekte ermöglichen. Die Nutzung dieser gentechnisch modifizierten Zelllinien, die z.B. einen stresssensitiven Promotor gekoppelt an ein Reporterprotein tragen, erlaubt die Generierung einer funktionellen Information aufgrund des Einflusses exogener Faktoren auf intrazelluläre Signalkaskaden bzw. das Monitoring der intrazellulären Genexpression.

Interleukine werden konstitutiv in Keratinozyten angereichert und nach Keratinozytenaktivierung freigesetzt. Daher eignet sich diese Art der Biomarker nicht zum Einsatz in einem reporter-genassaybasierten *In-vitro*-Testsystem, weshalb stattdessen die Überprüfung verschiedener Hitzeschockproteine zweckmäßig erscheint. Der in Kapitel 2.6.3 beschriebene hochkonservierte Mechanismus der HSPs wurde bereits vielfältig in Reporter-genassays angewendet. In einem ersten Ansatz wurden HeLa-Zellen mit einem Chloramphenicol-Acetyl-Transferase-Reporter-gen, reguliert durch einen HSP70-Promotor, genutzt. Die Ergebnisse zeigen, dass HSP70 durch eine Reihe unterschiedlicher Noxen induziert und eine ausreichende Sensitivität erreicht werden kann [142]. Dem System nachteilig ist die, aufgrund des gewählten Reporterproteins, notwendige Endpunktbestimmung und die mangelnde Übertragbarkeit auf Mechanismen der toxisch-irritativen Kontaktdermatitis aufgrund des in dieser Studie gewählten Zelltyps. In aktuelleren Arbeiten wurden Zellen mit einem HSP70B'-GFP-Konstrukt transfiziert und zur frühen bzw. sehr sensitiven Erkennung zytotoxischer Mechanismen genutzt [143, 144]. Die Experimente wurden u.a. an der NIH/3T3 Mausfibroblasten durchgeführt und in Hinblick auf Echtzeitanalysen optimiert.

Unter den aufgezeigten Hautirritationsmodellen ist die kürzlich entwickelte Zelllinie *KeratinoSens* ein vielversprechendes Tool in der Toxikologie, um sensibilisierende von toxischen Substanzen zu unterscheiden. Die Sensorzelllinie basiert auf einem Luciferasereporter kontrolliert durch eine Kopie des *Antioxidant response elements* (ARE) des humanen Gens AKR1C2, welches in HaCaTs stabil transfiziert wurde [145]. Das Modell wurde zur Analyse einer umfangreichen Palette verschiedener Substanzen genutzt und ermöglicht einen außerordentlich sensitiven Nachweis. Dennoch ist ein bedeutender und ausschlaggebender Nachteil des Systems dessen Limitierung durch die Verwendung eines Luciferasereporters und der damit verbundenen Endpunktbestimmung.

3 Experimentelle Bedingungen

3.1 Material

3.1.1 Technische Ausrüstung

Autoklav VB65	Systec
AxioCam Mrc	Carl Zeiss
AxioCam Mrm	Carl Zeiss
Axio Imager.M2	Carl Zeiss
Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss
Biofuge Fresco	Heraeus
Brutschrank	Binder
CO ₂ -Inkubator HeraCell150	Thermo Scientific
Corbett Rotor-Gene™6000	Qiagen
Elektrophoresekammer	Thermo Scientific
FACSAria IIU BD	Becton Dickinson
Fein- und Präzisionswaagen	Satorius
Filteratz 38HE	Carl Zeiss
Geldokumentationsanlage	Peqlap
Kleinschüttler MS3 digital	IKA
Mastercycler® peronal	Eppendorf
Tecan Infinite® M200	Tecan Group
Objektiv EC Plan-Neofluar 10x/0,3 Ph1	Carl Zeiss
Objektiv EC Plan-Neofluar 20x/0,50 Ph2	Carl Zeiss
Objektiv LD Plan-Neofluar 20x/0,4 Korr Ph2	Carl Zeiss
pH-Elektrode FE20 - FiveEasy™pH	Mettler Toledo
Pipetten Research	Eppendorf
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte
Schüttelinkubator CERATOMAT®	Braun Biotech
Sicherheitswerkbank HeraSafe	Thermo Scientific
Stromversorgung Elektrophorese E844	Consort
Thermomixer compact	Eppendorf
Ultraschallreiniger Sinus Ultra	Carrera
UV/VIS-Spektralphotometer Specord 205	Analytik Jena
Zählkammer Neubauer Improved	LaborOptik
Zentrifuge Heraeus Biofuge Fresco	Thermo Scientific
Zentrifuge Heraeus Labofuge 200	Thermo Scientific
Zentrifuge Heraeus Megafuge 16R	Thermo Scientific

3.1.2 Chemikalien

Agar	Roth
Agarose	Roth
Bacto-Trypton	Becton Dickinson
Cadmiumchlorid (CdCl_2)	Sigma-Aldrich
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Roth
2,4-Dinitrochlorbenzol (DNCB)	Sigma-Aldrich
Eisessig	Merck
Ethanol (EtOH)	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Applichem
Geneticindisulfat (G418)	Roth
Glycerin	Roth
Glycin	Applichem
Hefeextrakt	Roth
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Applichem
Isopropanol	Roth
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Roth
Magnesiumsulfat (MgSO_4)	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Nickelsulfat-Hexahydrat ($\text{NiSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich
Salzsäure (HCl)	Merck
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth
Tryphanblau	Roth

3.1.3 Puffer und Lösungen

FACS-Puffer	2 mM EDTA, 2 % FBS, PBS
Mounting Medium	90 % Glycerol, 50 mM Tris/HCl pH 8,0
PBS/EDTA	0,05 % EDTA, PBS
Sorensen-Glycin-Puffer	0,1 M Glycin, 0,1M NaCl, pH 10.5
TAE-Puffer	2 M Tris, 1 M Eisessig, 0,05 M EDTA

3.1.4 Zelllinie und Kulturbedarf

Zelllinie HaCaT (Humane Keratinozytenzelllinie)	Cell Line Service
Phosphate Buffered Saline (PBS) (1x)	PAA
Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM), Low Glucose CO ₂ -Independent Medium	Biowest Gibco
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biowest
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA
L-Glutamin (200 mM)	Biowest
Komplettmedium (DMEM + 10 % FBS + 2 mM L-Glutamin + 1 % Pen/Strep)	
Mangelmedium (DMEM + 1 % FBS + 2 mM L-Glutamin + 1 % Pen/Strep)	
Unabhängiges Medium (CO ₂ -Ind. Medium + 10 % FBS + 2 mM L-Glutamin + 1 % Pen/Strep)	
Unabhängiges Mangelmedium (CO ₂ -Ind. Medium + 1 % FBS + 2 mM L-Glutamin + 1 % Pen/Strep)	
Transfektionsmedium (DMEM + 2 mM L-Glutamin)	
Einfriermedium (Komplettmedium + 50 % FBS + 10 % DMSO)	

3.1.5 Bakterienstamm und Kulturbedarf

Bakterienstamm <i>E. coli</i> HB101 (F- mcrB mrr hsdS20(<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) recA13 leuB6 ara-14 proA2 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 rpsL20(<i>S m^R</i>) glnV44 λ ⁻)	Invitrogen
LB-Medium (pH 7,0) (1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl) (Für Festagar-Platten wurden 1,5 % Agar zum LB-Medium zugefügt.)	Roth
LB-low-Medium (pH 7,0) (1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl)	Roth
SOC-Medium (1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glucose)	Roth
Ampicillin (100 µg/ml)	Applichem
Kanamycin (50 µg/ml)	Roth

3.1.6 Enzyme

<i>Taq</i> -Polymerase	Jena Bioscience
Firepol®	Solis Biodyne
Phusion™ Hot Start	Thermo Scientific
T4-DNA Ligase	Thermo Scientific
XhoI	Thermo Scientific
XmaI	Thermo Scientific
AgeI	Thermo Scientific

3.1.7 Kits

FlexiGene DNA Kit	Qiagen
First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific
Qiashredder	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Wizard SV Gel and PCR clean-Up System	Promega
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel
NucleoBond® Xtra Midi	Macherey-Nagel
Turbofect™ Transfection Reagent	Thermo Scientific

3.1.8 Oligonucleotide

Primer für qRT-PCR

Primer	Sequenz	Produkt	T _m
GAPDH fwd	5'-TTCGACAGTCAGCCGCATCTTCTT-3'	105 bp	60 °C
GAPDH rev	5'-GCCCAATACGACCAAATCCGTTGA-3'		60 °C
HSPB1 fwd	5'-AACGAGATCACCATCCCAGTCACCTT-3'	97 bp	60 °C
HSPB1 rev	5'-TAAGGCTTTACTTGGCGGCAGTCT-3'		61 °C
HSPA1A fwd	5'-ACCACTTCGTGGAGGAGTTCAAGA-3'	171 bp	59 °C
HSPA1A rev	5'-ACGTGTAGAAGTCGATGCCCTCAA-3'		60 °C
HSPA6 fwd	5'-TGCAAGAGGAAAGCCTTAGGGACA-3'	147 bp	60 °C
HSPA6 rev	5'-TTTGCTCCAGCTCCCTCTTCTGAT-3'		60 °C
AcGFP fwd	5'-TGGAGTACAACCTACAACGCCACA-3'	98 bp	60 °C
AcGFP rev	5'-ATCCTCGATGTTGTGGCGGATCTT-3'		60 °C

Primer zur Amplifikation zu klonierender Inserts

Primer	Sequenz	T _m
HSPA1A fwd	5'-AAAAACTCGAGCACTCTGGCCTCTGATTGGT-3'	60 °C
HSPA1A rev	5'-AAAAACCCGGGACAG GTTCGCTCTGGGAAG-3'	60 °C
HSPA6 fwd	5'-AAAAACTCGAGACCACTGAACCACCAATGCT-3'	60 °C
HSPA6 rev	5'-AAAAACCGGTCTTCTTGTTCGGATGCTGGA-3'	60 °C

Primer zur Überprüfung klonierter Inserts in pAcGFP1.1

Primer	Sequenz	T _m
AcGFP fwd	5'-TAGCGCTACCGGACTCAGAT-3'	60 °C
AcGFP rev	5'-TTGCCATCCTCCTTGAAATC-3'	60 °C

3.1.9 Vektoren

In dieser Arbeit kamen die Vektoren pAcGFP1-1 und pAcGFP1-C1 (Clontech Laboratories, France) zum Einsatz (Abbildung 3.1). Sie codieren das GFP von *Aequorea coerulescens*.

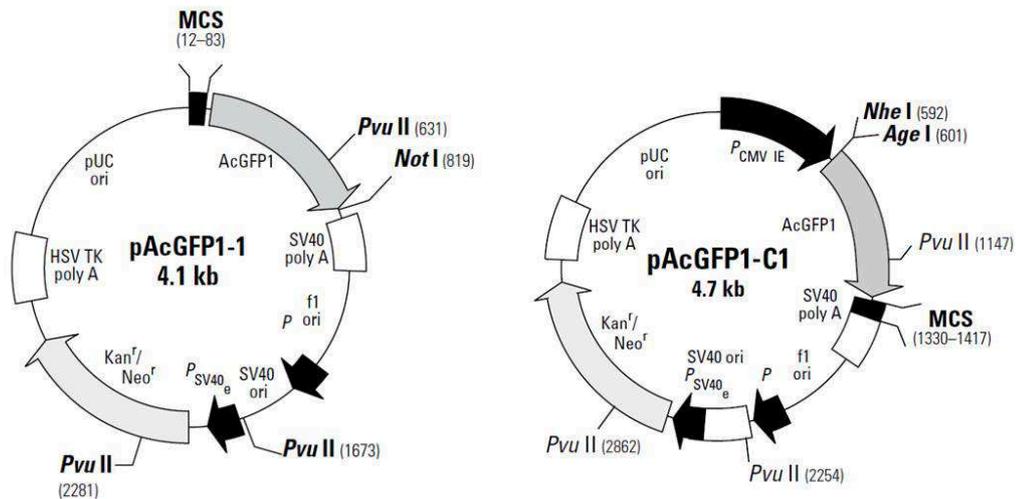


Abbildung 3.1: Vektorkarte pAcGFP1-1 und pAcGFP1-C1. Der promotorlose Vektor pAcGFP1-1 ermöglicht die Beobachtung der Transkription verschiedener, in die MCS eingebrachte, Promotoren. Der Vektor pAcGFP1-C1 ist für die Generierung von Fusionsproteinen konzipiert und verfügt über einen konstitutiven CMV-Promotor. Dieser Vektor diente zur Überprüfung der Transfektionseffizienz.

Das Anregungs- und Emissionsspektrum mit den Maxima bei 475 nm und 505 nm ist in Abbildung A.3 (s.S. 138) enthalten. An mehreren Stellen der codierenden Sequenz des AcGFPs wurden stille Basenaustausche vorgenommen, die den Häufigkeiten des humanen Codongebrauchs entsprechen. Der promotorlose Vektor pAcGFP1-1 ermöglicht die Beobachtung der Transkription verschiedener, in die *Multiple cloning site* (MCS) eingebrachte, Promotoren. Ohne die Insertion eines funktionalen Promotors erfolgt keine Expression des GFP. Der Vektor pAcGFP-C1 ermöglicht die Generierung von Fusionsproteinen und verfügt über einen konstitutiven CMV-Promotor. In der vorliegenden Arbeit diente dieser Vektor lediglich zur Überprüfung der Transfektionseffizienz.

In beiden Vektoren ist die stromaufwärts vom AcGFP1-1 gelegene Kozak-Sequenz entscheidend für die Translationsinitiation und verstärkt die Translationseffizienz in Eukaryoten. Weiterhin besitzen die Plasmide sowohl einen pUC Replikationsstartpunkt für die Vermehrung in *E. coli*, eine Kanamycinresistenz für die Selektion der *E. coli* und eine Neomycinresistenz zur Selektion stabil transfizierter eukaryotischer Zellen mit G418.

3.1.10 Herstellungsprotokolle der Pflanzenextrakte

Die Bereitstellung der Pflanzenextrakte erfolgte durch die PHARMAPLANT Arznei- und Gewürzpflanzen Forschungs- und Saatzucht GmbH Artern. Die pflanzlichen Ausgangsstoffe der *Anthemis cotula* und *Helenium autumnale* wurden beim Unternehmen selbst erzeugt (Ernte des blühenden Krautes 2011), im Falle von *Arnica montana* und *Saponaria officinalis* wurde auf Handelsware zurückgegriffen (Arnikablüten, Spanien, Ernte 2010 bzw. Seifenwurzel, rot, Alfred Galke GmbH, Gitteide/Harz). Die Herstellungsprotokolle sind im Folgenden zusammengefasst:

<i>Extractum</i>	<i>Arnicae flos</i>	<i>Anthemis herba</i>	<i>Helenii herba</i>	<i>Saponariae radix</i>
Stamm-pflanze	<i>Arnica montana</i>	<i>Anthemis cotula</i>	<i>Helenium autumnale</i>	<i>Saponaria officinalis</i>
Extraktions-mittel	Ethanol 70 % (v/v)			
Auszugs-verhältnis	14,5:1 (v/m)	14:1 (v/m)	10,55:1 (v/m)	4,3:1 (v/m)
Extraktions-art	Mazeration, Ultraschallbad			
Temperatur	60 °C			
Extraktions-dauer	36 h	29 h	31 h	36 h
DEV nativ *	7,3:1	5,4:1	6,61:1	4,3:1
Trocknung	Vakuum bei 60 °C nach Einengung im Vakuumrotationsverdampfer 60 °C, 150mbar			
TV SE **	0,62 %	0,9 %	0,76 %	0,52 %

* Droge-Extrakt-Verhältnis ** Trocknungsverlust Siccum-Extrakt

Die Extrakte wurden bei 4 °C gelagert. Die Rücklösung der Extrakte erfolgte in DMSO, wobei die Stammlösungen (50 mg/ml) höchstens 7 Tage gelagert wurden. Zum Einsatz in Zellkulturexperimenten wurden die Stammlösungen in Mangelmedium verdünnt, sodass maximal eine DMSO-Konzentration von 1% auf die Zellen gegeben wurde. Diese Konzentration an Lösungsmittel hatte keinen Einfluss auf die Zellvitalität.

3.2 Methoden

3.2.1 Isolierung genomischer DNA

Zur Isolierung genomischer DNA aus (HaCaT)-Zellen wurden 10^6 Zellen verwendet. Sowohl die Isolierung, als auch die Aufreinigung erfolgte mit dem FlexiGene DNA Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerprotokoll.

3.2.2 Präparation elektrokompenter Zellen

Zur Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen wurden 5 ml LB-Medium (salzarm) mit einer Einzelkolonie der Stammkultur beimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 4 ml der Vorkultur in 200 ml LB-Medium (salzarm) bis zu einer $OD_{600} = 0,5 - 0,6$ bei 37 °C herangezogen. Nach Kühlung der Kultur auf Eis für 30 min wurden die Zellen zentrifugiert, in je 1 Vol kaltem *Aqua dest* und zweimal in 10 % Glycerol (v/v) gewaschen. Das entstandene Zellpellet wurde nun in 2 ml 10 % Glycerol (v/v) resuspendiert und zu je 70 µl aliquotiert. Die Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

Ein gefrorenes Aliquot wurde zur Überprüfung der Transformationseffizienz (μg Plasmid/ Anzahl Kolonien) eingesetzt und mit 10 pg pUC19 transformiert. Nach zügigem Herausspülen des Ansatzes mit 1 ml SOC-Medium aus der Elektroporationsküvette, fand eine Inkubation der Zellen für 1 h bei 37 °C zur Ausprägung der Antibiotika-Resistenz statt. Anschließend wurden 100 μl auf einer LB-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum verteilt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Transformation mittels Elektroporation (2 kV, 200 Ω , 200 μF) wurden ca. 10 ng DNA zu den Zellen gegeben.

3.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Das Plasmid mit dem gewünschten DNA-Fragment wurde im Minimaßstab mit Hilfe des NucleoSpin®Plasmid-Kit isoliert, wobei nach Herstellerprotokoll, ausgehend von 2ml Kultur, verfahren wurde. Im Midimaßstab wurde die Aufreinigung ausgehend von 200 ml Kultur mittels des Kits NucleoBond®Xtra Midi nach Herstellerprotokoll vollzogen.

3.2.4 Agarosegelelektrophorese und Gelelution

Agarosegelelektrophorese erfolgte in 1%igen (w/v) Agarosegelen in 1x TAE-Puffer bei konstanter Spannung von 100 V. Die zu untersuchenden Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 6x DNA Loading Dye versetzt, als Größenstandard diente GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder oder GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Zur Dokumentation der getrennten DNA erfolgte die Färbung des Gels für ca. 20 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 1x TAE).

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System von Promega, Mannheim nach Herstellerprotokoll. Auf gleiche Weise wurden PCR-Ansätze aufgereinigt.

3.2.5 Restriktion und Ligation

Die enzymatische Spaltung von dsDNA wurde zur Vorbereitung von Plasmid und Insert für spätere Ligationen eingesetzt. Zur Anwendung kamen dabei die konventionellen Restriktionsenzyme von Thermo Scientific. Im Allgemeinen wurden für 50 μl Reaktionsansätze 5 μl 10x Puffer, 10 U Restriktionsenzym und 2 μl DNA verwendet, und jeweils 4 h bei 37 °C inkubiert und 15 min bei 80 °C inaktiviert. Für die Doppelverdau wurde nach Herstellerangaben der jeweils optimale Puffer ausgewählt und die Enzymmengen angepasst.

Ligationsansätze wurden in einem Gesamtvolumen von 20 μl nach Herstellerangaben erstellt. Anschließend wurden 2 μl des Ligationsansatzes zur Transformation in elektrokom-

petente Zellen eingesetzt. Zur Kontrolle des Anteils an Religation des Ausgangsvektors wurde grundsätzlich ein Ansatz ohne Insert mitgeführt.

3.2.6 Polymerase-Kettenreaktion

PCR zur Vervielfältigung zu klonierender Inserts

Zur Amplifikation zu klonierender Inserts wurde die Phusion™ Hot Start DNA-Polymerase verwendet. Diese Polymerase besitzt eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität und verfügt daher über eine geringe Fehlerrate, ist sehr prozessiv und hitzestabil.

Ansatz	analytisch	präparativ	Programm		
template (200 ng)	1,0 µl	1,0 µl			
Aqua MP	13,25 µl	56,0 µl	180 s	98 °C	
5x Puffer	5,0 µl	20,0 µl	15 s	98 °C	\
dNTPs (40 mM)	0,5 µl	2,0 µl	30 s	60 °C	30 Zyklen
Primer for (2,5 µM)	2,5 µl	10,0 µl	120 s	72 °C	/
Primer rev (2,5 µM)	2,5 µl	10,0 µl	300 s	72 °C	
Phusion™ (2 U/µl)	0,25 µl	1,0 µl			
	Σ 25,0 µl	Σ 100 µl			

Kolonie-PCR

PCR-Reaktionen mit transformierten Zellen als Matrize wurden durchgeführt, um sie auf Vektoren oder Inserts der gewünschten Länge und Identität zu überprüfen. Hierfür wurde die FIREPol® DNA Polymerase eingesetzt. Diese Polymerase besitzt keine 3'-5'-Exonuklease-Korrekturleseaktivität, ist hochprozessiv und hitzestabil.

Ansatz	analytisch	Programm		
AquaMP	14,3 µl			
10x Puffer B	2,5 µl	180 s	94 °C	
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 µl	30 s	94 °C	\
dNTPs (40 mM)	0,5 µl	30 s	55 °C	30 Zyklen
Primer for (2,5 µM)	2,5 µl	120 s	72 °C	/
Primer rev (2,5 µM)	2,5 µl	300 s	72 °C	
Firepol® (5 U/µl)	0,2 µl			
	Σ 25,0 µl			

3.2.7 Quantitative Reverse Transcription PCR

Die *Quantitative reverse transcription PCR* (qRT-PCR) stellt ein schnelles Verfahren zur Quantifizierung von Nukleinsäuren dar. In einem geschlossenen System werden in einem Schritt Amplifikation, PCR-Produkt-Detektion und -Quantifizierung kombiniert, ohne dass weitere Arbeitsschritte nach der PCR erforderlich sind. Die Methode erlaubt die direkte Detektion der PCR-Produkt-Akkumulation während der log-linearen Phase der

Reaktion über den Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen (Jena Bioscience). Dieser interkaliert in doppelsträngiger DNA und wird durch eine Lichtquelle angeregt. Das Fluoreszenzsignal des Farbstoffs korreliert dabei mit der Menge des PCR-Produkts und kann über eine Software in Echtzeit dargestellt werden. Spezifische Primer dienen dabei zur selektiven Amplifikation einer bestimmten DNA.

Die Aneinanderreihung der einzelnen Fluoreszenzwerte, die nach jedem PCR-Zyklus gemessen werden, ergibt eine sigmoide Amplifikationskurve. In der frühen Phase der PCR übertreffen Hintergrundsignale diejenigen des PCR-Produkts. Abhängig von der initialen Menge an DNA von Interesse im Reaktionsansatz heben sich nach einer bestimmten Zyklenzahl die Fluoreszenzsignale des PCR-Produkts statistisch signifikant von denen des Hintergrunds ab (C_t). Je größer die initiale DNA-Menge ist, umso früher wird der Schwellenwert erreicht und umso kleiner ist demnach der C_t -Wert.

Im Anschluss an die PCR-Reaktion wurde für jede Probe eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dabei wird bei stetigem Temperaturanstieg die Fluoreszenzintensität gemessen und die Änderung der relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) mit der Zeit (T) über der Temperatur aufgetragen. Wird der Schmelzpunkt eines Produkts erreicht, kommt es zu einem schnellen Abfall der Fluoreszenzintensität, da der Farbstoff nicht mehr an die nun einzelsträngig vorliegende DNA binden und fluoreszieren kann. Der Schmelzpunkt (Maximum von $-d(\text{RFU})/dT$) von doppelsträngiger DNA ist definiert als die Temperatur, bei der 50 % der Sequenz als Einzelstränge vorliegen und ist abhängig von der Länge und der Basenzusammensetzung des DNA-Stranges. Alle PCR-Produkte eines bestimmten Primerpaars sollten die gleiche Schmelztemperatur besitzen. Zur Auswertung wurden daher nur Proben herangezogen, bei denen eine Primerdimerisierung, Fehlanslagerung oder die Amplifikation mehrerer Produkte ausgeschlossen werden konnte.

Präparation der totalen RNA und cDNA-Synthese

Die qRT-PCR wurde zur Quantifizierung von mRNA verwendet um Expressionslevel verschiedener Gene zu untersuchen. Da RNA von der Polymerase, die bei der PCR eingesetzt wird, nicht als Template erkannt wird, erfolgte zunächst das Umschreiben in cDNA. Für die RNA-Präparation wurden $3 \cdot 10^5$ Zellen in (25 cm^2)-Kulturflaschen für 24 h in Kompletmedium und anschließend 24 h in Mangelmedium kultiviert. Nach entsprechender Behandlung der Zellen erfolgte die Aufreinigung der gesamten RNA mittels Qiashredder und RNeasy Mini Kits nach Herstellerprotokoll. Zur reversen Transkription mit dem *First Strand cDNA Synthesis Kit* nach Herstellerprotokoll wurden $1 \mu\text{g}$ RNA verwendet und die im Kit enthaltenen Oligo(dT)₁₈-Primer eingesetzt.

PCR-Ansatz

Ansatz	$c_{\text{Primer}}=0,2 \mu\text{M}$	$c_{\text{Primer}}=0,1 \mu\text{M}$	Programm		
AquaMP	12,8 μl	14,4 μl			
10x Puffer	2,0 μl	2,0 μl	120 s	94 °C	
dNTPs (40 mM)	0,4 μl	0,4 μl	30 s	94 °C	\
Primer for (2,5 μM)	1,6 μl	0,8 μl	30 s	60 °C	40 Zyklen
Primer rev (2,5 μM)	1,6 μl	0,8 μl	30 s	72 °C	/
EvaGreen™(50)	0,4 μl	0,4 μl	300 s	72 °C	
template (cDNA)	1,0 μl	1,0 μl			
Taq-Polymerase (5 U/ μl)	0,2 μl	0,2 μl			
	$\Sigma 20,0 \mu\text{l}$	$\Sigma 20,0 \mu\text{l}$			

Ermittlung der Reaktionseffizienz

Die Effizienz eines jeden Primerpaars wurde für unabhängige Experimente neu ermittelt und mit Hilfe einer fünffachen cDNA-Verdünnungsreihe, bestehend aus drei Konzentrationen, bestimmt. Der C_t -Wert hängt dabei linear vom Logarithmus der cDNA-Konzentration ab und wird unmittelbar durch die Reaktionseffizienz beeinflusst [146], welche mit Hilfe der Regressionsgeraden durch diese drei Punkte ermittelt werden kann. Besonderes Augenmerk liegt hierbei auf der Korrelation, die, wenn sie einen Betrag von rund 1 besitzt, eine gleichmäßige Vervielfachung des PCR-Produkts anzeigt. Reaktionen von Primerpaaren, die diese hohe Korrelation nicht aufweisen, wurden zur Auswertung nicht herangezogen. Die Effizienz E der Reaktion lässt sich aus dem Anstieg m der Regressionsgeraden nach folgender Gleichung ableiten [146].

$$E = 10^{(-\frac{1}{m})} - 1 \quad (3.1)$$

Relative Quantifizierung

Die Relative Quantifizierung der erhobenen Daten erfolgte mittels der Delta- C_t -Methode unter Benutzung von GAPDH als Referenzgen und wird im Folgenden zusammengefasst aufgeführt.

Zunächst erfolgt die Ermittlung der Quantität Q einer mRNA unter Berücksichtigung der Effizienz (Gleichung 3.2 [147]). Die Triplets des sample C_t (sC_t) und des kleinsten C_t aller Proben ($\min C_t$) eines Primerpaars werden für diese Auswertung im arithmetischen Mittel zusammengefasst. Die Quantität aller Proben wurde für jedes untersuchte Gen separat ermittelt.

$$Q = (1 + E)^{(\min C_t - sC_t)} \quad (3.2)$$

Die Normalisierung, die aufgrund von möglichen Unterschieden in der eingesetzten Zell-

zahl, in der RNA-Extraktion oder in der Effizienz der c-DNA-Synthese notwendig ist, wird durch die Quantifizierung des Haushaltgens GAPDH in den gleichen Proben realisiert. Zunächst erfolgt die Bestimmung des Normalisierungsfaktors des Haushaltsgens (NF_n) gemäß Gleichung 3.2. In einem zweiten Schritt wird dann das Expressionslevel des *Gene of Interests* (L_{GOI}) bestimmt, indem die Quantität Q der interessierenden Gene (Q_{GOI}) auf den Normalisierungsfaktor NF_n bezogen wird [147].

$$L_{GOI} = \frac{Q_{GOI}}{NF_n} \quad (3.3)$$

3.2.8 Kultivierung der humanen Zelllinie HaCaT

Die Zelllinie HaCaT [118] wurde im Inkubator bei einer Begasung von 5 % CO₂ und 37 °C in Kompletmedium kultiviert. Alle Arbeitsschritte, die mit den lebenden Zellen durchgeführt wurden, erfolgten unter keimfreien Bedingungen in Sicherheitswerkbänken. Bei maximal 90%-iger Konfluenz wurden die Zellen subkultiviert. Dafür wurde das Medium entfernt und die Zellen 10 min in PBS/EDTA inkubiert. Anschließend erfolgte ein Inkubationsschritt mit Trypsin/EDTA-Lösung bis alle Zellen vollständig vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst waren. Nachfolgend wurden die Zellen in 10 ml Medium vorsichtig aber gründlich resuspendiert und 1:3 oder 1:5 verdünnt in neue Flaschen ausgesät. Die PBS/EDTA- und Trypsin/EDTA-Lösung sowie das Medium wurden vor Arbeitsbeginn im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt.

Zum Einfrieren der trypsinisierten Zellen wurde die Suspension schonend für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium resuspendiert und die Suspension durch schrittweises Absenken der Temperatur eingefroren: 30 min bei 4 °C, 2 h bei –20 °C, Lagerung bei –80 °C. Eine schnelle Revitalisierung der Zellen wurde durch Auftauen der gelagerten Tubes im 37 °C warmen Wasserbad und rascher Resuspendierung in vorgewärmten Kompletmedium durchgeführt.

3.2.9 Zytotoxizitätsmessung mittels MTT-Test

Die Zellvitalität wurde mittels MTT-Assay in Anlehnung an Mosmann [127] durchgeführt. Für den Test wurden in eine 96-Well-Platte 1, 5 · 10⁴ Zellen je Well in Kompletmedium ausgesät und für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 24 h in Mangelmedium kultiviert. Zur Vitalitätsbestimmung dienten Reihe 1 als *Blank* ohne Zellen (\overline{OD}_B) und Reihe 2 als unbehandelte Kontrolle (\overline{OD}_C). Die zu untersuchenden Substanzen wurden in unterschiedlichen Konzentrationen, generell hergestellt in einer seriellen Verdünnungsreihe, hinzugefügt und weitere 24 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Spülvorgang mit PBS und die Zugabe von 0,5 mg/ml MTT-Lösung in Mangelmedium.

Nach dreistündiger Inkubation wurde das Medium verworfen, 200 µl DMSO hinzugegeben und für 15 min leicht geschüttelt, um die gebildeten Formazankristalle vollständig zu lösen. Nach Zugabe von 25 µl Sorensen's Glycin-Puffer erfolgte die Messung der Absorption bei 570 nm gegen eine Referenz von 620 nm. Die Berechnung der Vitalität ergibt sich nach Gleichung 3.4 anhand des Vergleichs der OD-Werte der behandelten Zellen (\overline{OD}_S) mit den Kontrollzellen (\overline{OD}_C).

$$\% \text{ Vitalität} = \frac{\overline{OD}_S - \overline{OD}_B}{\overline{OD}_C - \overline{OD}_B} \cdot 100 \quad (3.4)$$

Die mittlere effektive Dosis (EC_{50}) wurde durch Fitting der *Dose Response Function* (Origin Lab®) an die experimentellen Daten durch nichtlineare Regressionsanalyse erhalten.

3.2.10 Stabile Transfektion

Als stabile Transfektion bezeichnet man das dauerhafte Einschleusen von Fremd-DNA in Säugerzellen. Dabei wird unter Selektionsdruck mit einem gegen eukaryotische Zellen wirkenden Antibiotikum eine zufällige Integration des Plasmids ins Genom der transfizierten Zelle erzwungen. Das Einschleusen der Fremd-DNA erfolgte mittels TurboFect (Thermo Scientific). Die sterile Lösung enthält ein kationisches Polymer, welches stabile, positiv geladene Komplexe mit der DNA bildet. Die Komplexe schützen die DNA vor Degradierung und unterstützen den Gentransfer in die eukaryotische Zelle. Für die stabile Transfektion wurden ausschließlich hochreine, konzentrierte Midi-Präparationen verwendet, da dies einen entscheidenden Einfluss auf die Transfektionseffizienz hat.

Zur Durchführung der Transfektion wurden $5 \cdot 10^5$ Zellen je 6-Well eingesät und über Nacht kultiviert. Am folgenden Tag wurden 4 µg Plasmid-DNA in 400 µl Transfektionsmedium verdünnt, 4 µl Transfektionsreagenz zugegeben und 20 min bei RT zur Bildung der Komplexe inkubiert. Die Lösung wurde nun zu den Zellen in Kompletmedium gegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zwei Tage nach der Transfektion wurde durch Zugabe des Antibiotikums G418 Selektionsdruck auf die Zellen ausgeübt. Dies bewirkt, dass nur solche Zellen überleben, die das Plasmid in ihr Genom integrieren. In einem Vorversuch wurde die optimale G418-Dosis bestimmt. Dafür wurde in einem Bereich von 0,1-1,5 mg/ml die niedrigste Konzentration gesucht, die innerhalb einer Woche noch zu einem kompletten Absterben der Zellen führt. Die Durchführung und Auswertung dieses Vorversuchs erfolgte mittels MTT-Test (s. Kap. 3.2.9). Bei der Zelllinie HaCaT sterben die Zellen ab einer Dosis von 1 mg/ml G418 innerhalb einer Woche vollständig ab, weshalb diese Konzentration für die Selektion gewählt wurde. G418 ist in Lösung nicht stabil, deswegen wurde das G418-haltige Selektionsmedium alle zwei bis drei Tage erneuert. Nach ca. 2

Wochen erfolgte die erste Subkultivierung der Zellen und die weitere Kultivierung unter Selektionsdruck für eine Woche. In dieser Zeit starben die letzten nicht stabil transfizierten Zellen, außerdem setzten sich die Zellen durch, welche trotz Insertion des Plasmids noch gut wachstumsfähig sind.

3.2.11 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie basiert auf der Erfassung von Streulicht- und Fluoreszenzsignalen einzelner, in einem Flüssigkeitsstrom fokussierter Partikel. Mittels eines senkrecht zur Flussrichtung gerichteten Laserstrahls lassen sich Aussagen über Größe, Granularität (Anwesenheit von Granulae oder Vesikel in einer Zelle sowie Oberflächenbeschaffenheit) und Fluoreszenzsignale treffen. Eine Anwendungsmöglichkeit ist die Markierung von Zellbestandteilen mit fluoreszierenden Farbstoffen oder die direkte Detektion von fluoreszierenden, in den Zellen enthaltenden Fluorophoren, wie GFP. In der vorliegenden Arbeit wurden mit dieser Methode sowohl der Zellzyklus mittels DAPI als auch die absolute Fluoreszenzemission sowie der dynamische Bereich der GFP-Induktion unter Standardstressbedingungen untersucht.

Zellzyklusanalyse

Eine Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie wurde durchgeführt um Aussagen zum Synchronisierungsstatus der Zellen nach Kultivierung unter Serumangel zu erhalten. Aufgrund der Replikation chromosomaler DNA (S-Phase) in proliferierenden Zellen ist der DNA-Gehalt vor der Zellteilung doppelt so hoch, wie in ruhenden Zellen (G₀/G₁-Phase). Zur Anfärbung der Zellen wurde DAPI, welcher in doppelsträngiger DNA interkaliert, verwendet. Die Proportionalität der Fluoreszenzintensität zum DNA-Gehalt der Zelle wurde genutzt, um den Zellzyklusstatus einer Zelle zu analysieren. Die Mangelkultivierung wurde entsprechend dem Protokoll von Migita *et al.* [144] durchgeführt. Die Färbung mittels DAPI erfolgte gemäß Invitrogen-Protokoll [148].

***Fluorescent activated cell sorting* zur Einzelklonselektion**

Beim *Fluorescent activated cell sorting* (FACS), einer speziellen Form der Durchflusszytometrie ist es möglich, fluoreszenzmarkierte Zellen nicht nur zu charakterisieren, sondern auch zu trennen. Entsprechende Geräte verpacken die Zellen nach dem Durchgang durch den Laserstrahl in winzige Flüssigkeitstropfen, die mit einer positiven oder negativen Ladung versehen sind. Die geladenen Zelltröpfchen lenkt ein elektrisches Feld ab und leitet sie in sterile Auffanggefäße. Auf diese Weise lässt sich eine gewünschte Zellpopulation aus einem Zellgemisch isolieren.

Die Methode wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit zur Einzelklonselektion angewendet, da der Expressionsspiegel des Zielproteins in der mittels Transfektion gewonnenen heterogenen Zellpopulation nach einigen Passagen ohne Selektionsdruck wieder stark abnehmen würde. Um dieses Problem zu umgehen wurden Einzelklone selektiert, deren induzierter Expressionsspiegel des Reporterproteins hoch und vor allem stabil waren. Dafür wurden mittels FACS zunächst die Zellen mit einer konstitutiv hohen GFP-Expression ohne Induktion des funktionalen Promotors eliminiert (negatives Screening). Zellen, die eine marginale GFP-Expression zeigten wurden erneut unter Standardbedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 2 h bei 43 °C in einem Inkubator dem Hitzeschockereignis ausgesetzt und deren GFP-Expression nach 16-stündiger Erholungsphase erneut mittels FACS untersucht. Nur die Zellen, die auf den Hitzeschock mit einer starken GFP-Expression reagierten, wurden für eine Einzelklonselektion gesammelt (positives Screening). Im Folgenden wurde die Population nun auf 30 Zellen/ml verdünnt und in 6-Well-Platten mit Kompletmedium und 0,5 mg/ml G418 verteilt. Vereinzelte, G418-resistente Einzelkolonien wurden dann mittels trypsingetränkten Filterpapieren (Durchmesser 5 mm) geerntet und in 24-Well-Platten überführt. Die Induzierbarkeit der Einzelklone wurde fluoreszenzmikroskopisch und/oder durchflusszytometrisch erneut überprüft.

3.2.12 Quantitative Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde zur quantitativen inkubationszeit- und konzentrationsabhängigen Einschätzung des Expressionsspiegels von GFP in den Sensorzellen genutzt. Dabei kam das motorisierte Mikroskop Axio.Imager M2 mit einer angeschlossenen CCD-Kamera AxioCam MRm (Carl Zeiss) sowohl für die Evaluierung der Sensorzelllinie nach Behandlung mit gewöhnlichen Methoden der Zellkulturpraxis, als auch als optischer Transducer während der kontinuierlichen und miniaturisierten Durchflusskultivierung zum Einsatz. Dafür wurden ausschließlich das Filterset 38 HE und Fluoreszenzobjektive 10x und 20x (Carl Zeiss) verwendet.

Unter normalen Bedingungen wurden $5 \cdot 10^4$ Zellen auf Deckgläschen in 24-Well-Platten und Kompletmedium gesät und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 24 h in Mangelmedium kultiviert. Nach erfolgter Stressbehandlung wurden die Zellen mehrmals mit PBS gespült und für mindestens weitere 16 h in Kompletmedium zur Ausbildung des Fluorophors kultiviert.

Zur quantitativen Grauwertanalyse (Mittelwertbildung unter Nutzung der Software ImageJ) wurden ausschließlich mikroskopische Aufnahmen genutzt, die einen konfluenten Monolayer zeigen. Diese wurden einer Hintergrundkorrektur I_B unterzogen (fluoreszierendes Medium, technische Hintergrundfluoreszenz des Aufbaus) und mit unbehandelten

Kontrollpopulationen I_0 zur Bestimmung der relativen Fluoreszenzintensität RF (Gleichung 3.5) verglichen.

$$RF = \frac{\bar{I} - \bar{I}_B}{\bar{I}_0 - \bar{I}_B} \quad (3.5)$$

Für das kontinuierliche Monitoring der GFP-Expression wurden die in der Software AxioVision (Carl Zeiss) enthaltenen Module *Mark&Find* und *Zeitreihe* genutzt, um über bestimmte Zeitspannen, in definierten Zeitintervallen, an festgelegten Positionen und Vergrößerungen automatisierte mikroskopische Aufnahmen zu generieren. Die dafür notwendige Präparation der Zellen ist im folgenden Kapitel beschrieben. Die Auswertung erfolgte gemäß Gleichung 3.5.

3.2.13 Impedanz-basiertes Monitoring der Zytotoxizität

Die zytotoxische Antwort der etablierten Sensorzellen wurde zeitaufgelöst mittels ECIS durch S. Michaelis an der Universität Regensburg untersucht. Dafür wurden kommerziell erhältliche 8-Well-Elektrodenarrays mit Goldelektroden am Boden jedes einzelnen Wells genutzt (Applied BioPhysics, Typ 8w1e). Die Analysen wurden grundsätzlich in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ durchgeführt. Über einen speziellen Elektrodenhalter (Applied BioPhysics) wurden die Elektroden an das elektronische Equipment außerhalb des Inkubators kontaktiert. Ein Relay ermöglicht dabei das Umschalten zwischen den Elektroden und wurde, ebenfalls wie der Impedanzanalysator, an einen PC angeschlossen. Technische Details zum Aufbau des Systems wurden von Stolwijk *et al.* [149] beschrieben.

Zur Aufnahme der ECIS-Daten wurde mittels Impedanzanalysator eine nicht-invasive Wechselspannung mit einer Amplitude von 70 mV auf die Elektroden appliziert. Die Messung wurde bei 61 ausgewählten, auf einer logarithmischen Skala gleichverteilten Frequenzen (1 Hz-1 MHz) durchgeführt. Der resultierende Strom wurde gemessen und als frequenzabhängige Impedanz des Systems ausgegeben. Als besonders aussagekräftig erwies sich eine Abtastfrequenz von 40 kHz zur Beschreibung auftretender Effekte in Zytotoxizitätsstudien. Die zeitabhängige Impedanz $|Z|$ wurde zu jedem Zeitpunkt mit dem letzten Wert der Impedanz $|Z|$ vor Toxinzugabe normalisiert.

Zur Durchführung der ECIS-Experimente wurden $3,6 \cdot 10^5$ Zellen/ml in Komplettmedium eingesät und über Nacht im CO₂-Inkubator kultiviert. Anschließend folgte der Serumentzug für weitere 24 h. Nach Aufnahme der zugrundeliegenden Impedanz des unbehandelten Zellmonolayers ($t=1$ h) wurde die zu untersuchende Substanz in entsprechenden Zeitintervallen appliziert und die Impedanzänderungen kontinuierlich verfolgt. Nach Ende der Stressexposition wurden die Wells mit PBS gespült und die Erholungsphase der Zellen weiterhin verfolgt.

3.2.14 Inkubator-unabhängige Kultivierung

Um eine an das vorhandene Fluoreszenzmikroskop Axio Imager M2 angepasste, komfortable, sterile, inkubator-unabhängige und kontinuierliche Überwachung der zytotoxischen Antwort der Sensorzellen zu ermöglichen, wurde ein Durchflusssystem zunächst basierend auf μ Slides^{0,4}Luer (Ibidi®) entworfen und aufgebaut. Diese μ Slides verfügen über eine kanalförmige Wachstumsfläche von 2,5 cm² sowie zwei Fluidanschlüsse rechts und links des Kanals, welche über Steckverbindung mit Luer-Konnektoren an Durchflusssysteme angeschlossen werden können. Weiterhin sind diese μ Slides ähnlich wie Standardzellkulturflaschen aus Kunststoff gefertigt. Durch ihre optische Transparenz eignen sie sich hervorragend für unterschiedliche Mikroskopieverfahren und gewährleisten durch ihre physikalische Oberflächenmodifikation (Hydrophilisierung) ein optimales, aber abdaptierfähiges Chipsystem zur Kultivierung in CO₂-Inkubatoren. Daher wurden diese μ Slides in der vorliegenden Arbeit verwendet, um anhand eines voll funktionsfähigen Zellkultursubstrats die inkubatorunabhängige Durchflussperipherie zu etablieren (Aufbau 1). In einem zweiten Schritt flossen die erzielten Ergebnisse und Erfahrungen dann in den modifizierten Aufbau 2 zur Nutzung des eigens entwickelten Chipsystems ein, welcher gleichzeitig die fluoreszenz-optische und impedimetrische Detektion ermöglicht.

Aufbau 1

Zur Realisierung der für humane Zellen notwendigen Umgebungstemperatur von 37 °C wurde ein Heizelement (Thermal-Clear, Minco™) eingesetzt. Diese Heizung besteht aus einem mäanderförmig angelegten Kupferdraht, welcher in eine transparenten Folie eingebettet ist. Durch diese Bauweise ist das Heizelement sehr flach und eignet sich zum Einsatz in der Mikroskopie. Dem Heizelement nachteilig ist die extreme Eigenfluoreszenz des Kunststoffs und die lokale Überhitzung im Zellkultursubstrat über den mäanderförmigen Heizdrähten. Daher wurde ein ca. 2 mm dicker Interferenzfilter (Blocking 350-500 nm) genutzt, der einerseits eine bessere Wärmeverteilung im Chip gewährleistete und andererseits die Hintergrundfluoreszenz des Systems um ca. 90 % minimierte. Das Heizelement wurde an eine Pt-100-basierte Steuerung (Analytik Jena AG) angeschlossen und PC-gestützt bedient.

Um die Heizfolie und den Interferenzfilter an den μ Slides zu pressen, das Pt-100-Sensorelement zu positionieren und das System in die Fixierklammer des Mikroskops einzubauen, wurde ein eigenes Positioniersystem entworfen, welches mittels *3D Rapid prototyping* mit dem Polymer VeroWhite von Objet (Rehovot, Israel) in der Arbeitsgruppe gefertigt wurde.

Die verwendeten Spritzenpumpen neMESYS (Cetoni®) verfügen über lineare An-

triebe, welche die Kolben der Spritzen gleichmäßig voranschieben und so die pulsationsfreie, gleichmäßige und präzise Dosierung von Flüssigkeiten ermöglichen. Durch die Verwendung mehrerer Spritzen sowie zweier 3-Wege-Ventile ist die kontinuierliche Förderung von Flüssigkeiten in einem Kreislauf möglich, da abwechselnd eine Spritze dosieren und eine zweite Spritze neu aufgefüllt werden kann. Das System wurde über eine USB-Schnittstelle mit einem PC verbunden und mittels Software neMESYS UserInterface angesteuert.

In den μ Slide wurden $5 \cdot 10^4$ Zellen/ml in Kompletmedium eingesät und über Nacht unter statischen Bedingungen im CO_2 -Inkubator kultiviert, anschließend folgte der Serumzug und die Gewöhnung an unabhängiges Mangelmedium für 24 h. Nach erfolgter Stressbehandlung wurde der Chip an das Durchflusssystem angeschlossen und mit unabhängigem Medium betrieben (Flussrate: $10 \mu/\text{min}$), um optimale Versorgungsbedingungen nach Stressbehandlung zur GFP-Expression zu gewährleisten. Der vom Hersteller angegebene Scherstress bei verwendeter Flussrate ist im vorliegenden System vernachlässigbar klein und hat daher keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen.

Aufbau 2

Um nachteilige Eigenschaften von Aufbau 1 zu optimieren, wurde für die Temperierung des zweiten Aufbaus, ein mit Indiumzinnoxid (ITO)-beschichteter Glasslide (Sigma-Aldrich) konzipiert, der über Kupferfolie mittels Wärmeleitpaste elektrisch kontaktiert wurde. Indiumzinnoxid ist ein Mischoxid aus Indiumoxid und Zinnoxid und ist halbleitend sowie transparent. Diese Eigenschaften sind günstig für die Herstellung elektrisch leitfähiger Gläser, indem diese mit einer sehr dünnen Schicht Indiumzinnoxid überzogen werden. Der Glasslide wurde ebenfalls über eine Pt-100-basierte Steuerung (Analytik Jena AG) temperiert. Die beschichtete Unterseite wurde vom Chipsystem abgewandt in ein an die neuen Dimensionen angepasstes und gefertigtes Positioniersystem eingelegt und diente damit selbst als Wärmediffuser.

Außerdem wurde der Pumpkreislauf mittels Spritzenpumpen auf einen Schlauchrollenpumpen-basiertes System umgestellt. Da das Chipsystem fünf Eingänge und nur einen Ausgang besitzt, konnte kein nur mittels Spritzenpumpen zu realisierender Kreislauf aufgebaut werden. Ferner sollte der aufwendig zu reinigende und zu sterilisierende Aufbau 1 dahingehend optimiert werden.

Schlauchrollenpumpen besitzen nicht nur den Vorteil, dass nur der Schlauch der Pumpe medienberührend ist und somit die Reinigung und die Sterilisation des Systems unkompliziert, sondern auch die Förderung mehrerer Fluidströme mit einer Pumpe realisierbar und damit der technische Aufwand minimal ist.

4 Modifizierte Keratinozyten als biologisches Erkennungselement

Die Limitierungen traditioneller Toxizitätstests, charakterisiert durch kostenintensive (Tier)modelle mit geringen Durchsatzzahlen, inkonsistenten Ergebnissen, ethischen Fragestellungen und mangelnder Übertragbarkeit auf den menschlichen Organismus, ließen die Forderung nach alternativen Versuchsansätzen zur Risikobewertung von Chemikalien und natürlichen Produkten wachsen. Die Entwicklung neuartiger Strategien, die auf humanen *In-vitro*-Testsystemen entscheidender Signalwege oder molekularen Mechanismen basieren, wird daher zunehmend zur Vorhersage der *In-vivo*-Reaktion verfolgt [150].

Zur Etablierung eines solchen alternativen Toxizitätstests ist die Wahl eines repräsentativen Zellmodells und die Art des Biomarkers zum Auslesen zellschädigender Effekte von immenser Bedeutung. Gegenwärtig stehen die Ansätze im Vordergrund, die eine besonders frühzeitige Erkennung des risikobehafteten Potenzials einer Substanz, vorzugsweise mittels Echtzeitanalyse, ermöglichen und damit eine nennenswerte Alternative zu gewöhnlichen Endpunktbestimmungen darstellen [126].

Der Einsatz von genetisch modifizierten Zellen als Biosensoren, die ein Reporter gen reguliert durch einen stresssensitiven Promotor tragen, ermöglichen die Generierung einer funktionellen Information bezüglich des Einflusses der zellschädigenden Substanz auf die Zellphysiologie [151]. Zellbasierte Biosensoren dieser Art exprimieren ein spektroskopisch aktives Reportermolekül als Antwort auf den chemischen Effektor. Möglichkeiten sowie Grenzen wurden anwendungsspezifisch und ausführlich diskutiert [30, 39, 152]. Trotz des enormen Fortschritts auf dem Gebiet der Etablierung vielfältigster stresssensitiver Reporter gen assays innerhalb der letzten drei Jahrzehnte, scheint die Fusion eines Promotors mit der DNA-Sequenz eines fluoreszierenden Proteins dennoch die Methode der Wahl, um eine sensitive, zeitaufgelöste und verlässliche Messung zu realisieren.

Zur Beschreibung und Visualisierung der auftretenden molekularen Mechanismen einer toxisch-irritativen Kontaktdermatitis wurden in der vorliegenden Arbeit humane Keratinozyten genutzt. Im folgenden Kapitel sind die Ergebnisse zur Etablierung, Optimierung und Validierung zweier optisch auslesbarer Sensorzelllinien und deren Charakteristiken dargestellt. In dieser ersten Machbarkeitsstudie wurde die Zellreaktion der HaCaT-Zelllinie

auf das bekannte Umwelttoxin Cadmiumchlorid (CdCl_2) als Standardstressbedingung gewählt und eine Wärmebehandlung bei $43\text{ }^\circ\text{C}$ als Positivkontrolle mitgeführt.

Zunächst erfolgte die Untersuchung des Effekts von CdCl_2 auf die Zellvitalität mittels MTT ($t=24\text{ h}$) in Kompletmedium (10 % FBS) bzw. Mangelmedium (1 % FBS). Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Dosis-Wirkungs-Kurven sind in Abbildung 4.1 dargestellt.

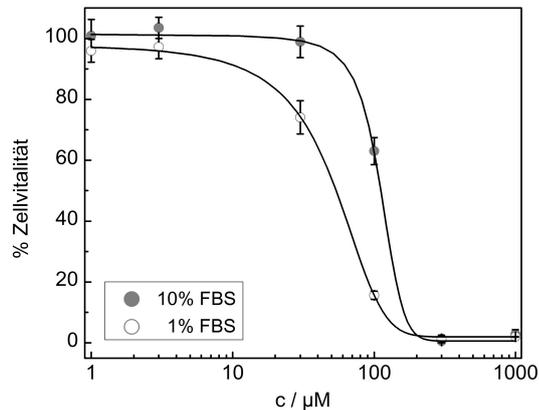


Abbildung 4.1: Analyse der Dosis-Wirkungs-Beziehung von CdCl_2 auf das HaCaT-Zellmodell ausgewertet mittels MTT in Mangel- bzw. Kompletmedium ($t=24\text{ h}$). Die Ergebnisse sind als $\text{mean} \pm \text{SE}$ unabhängiger Experimente ($n=3$) dargestellt. Die Bestimmung des EC_{50} -Werts erfolgte durch Anpassung der vorgegebenen Dosis-Wirkungs-Funktion (Origin Lab®) an die experimentell ermittelten Daten mittels nichtlinearer Regressionsanalyse.

Der EC_{50} -Wert beträgt unter normalen Kulturbedingungen in Kompletmedium (110 ± 10) μM und ist damit etwas höher als unter Serummangel (45 ± 7) μM . Offensichtlich hat der Serumgehalt im Zellkulturmedium einen entscheidenden Einfluss auf die Zytotoxizität. Um den Einfluss von CdCl_2 auf die zelluläre Signaltransduktion näher zu untersuchen, wurden die HaCaT-Zellen im Folgenden grundsätzlich subletalen Konzentrationen des Toxins unter Serummangel und kürzeren Inkubationszeiten ausgesetzt.

4.1 Reportergenassay basierend auf HSP72

4.1.1 Identifikation von Biomarkern

In dieser Phase standen die codierenden Sequenzen von HSP27 (*HSPB1*) und HSP72 (*HSPA1A*) als potenziell induzierbare Stressindikatoren in humanen Keratinozyten besonders im Fokus der Betrachtungen. Die Eignung dieser Gene als Biomarker zum Auslesen der zellschädigenden Effekte im HaCaT-Zellmodell wurde mittels qRT-PCR-Studien nach Einwirkung von $25\text{ }\mu\text{M}$ CdCl_2 sowie einer Hitzebehandlung bei $43\text{ }^\circ\text{C}$ untersucht (Abbildung 4.2). Die Experimente zeigten einen signifikant erhöhten mRNA-Expressionsspiegel von HSP27 nach 2-stündiger Wärmebehandlung und 8-stündiger Inkubation mit $25\text{ }\mu\text{M}$ CdCl_2 . Bei HSP72 wurde eine 8-fache (1 h $43\text{ }^\circ\text{C}$) bzw. 20-fache (2 h $43\text{ }^\circ\text{C}$) Steigerung des mRNA-

Expressionsspiegels als Folge der Wärmebehandlung nachgewiesen. Die 6-stündige Inkubation mit 25 μM CdCl_2 resultierte in einer ca. 20-fachen Überexpression des Proteins, welche in Abhängigkeit von der Inkubationszeit nochmals doppelt gesteigert wurde (Abbildung 4.2).

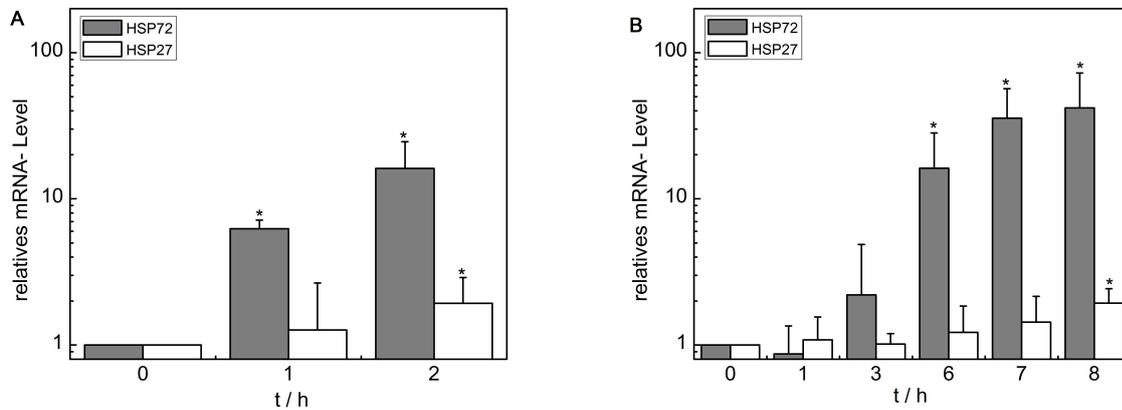


Abbildung 4.2: Relative Genexpression von HSP72 (*HSPA1A*) und HSP27 (*HSPB1*) nach (A) Wärmebehandlung (43 °C; 0, 1, 2 h) und (B) Inkubation mit CdCl_2 (25 μM ; 0, 1, 3, 6, 7, 8 h). Die relative Expression bezieht sich auf die entsprechenden Werte unbehandelter Kontrollzellen festgesetzt als 1 [mean \pm SE; n=3; *p<0,05].

4.1.2 Etablierung der Sensorzelllinie pHSP72_pAcGFP1-1

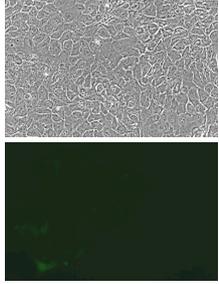
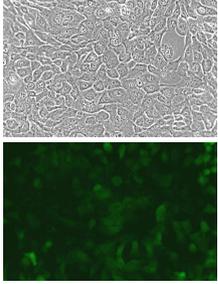
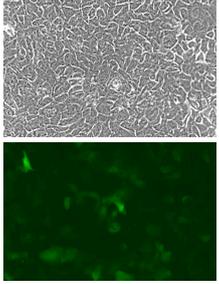
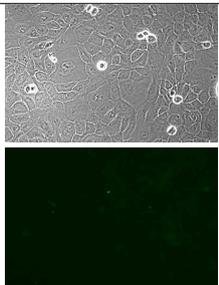
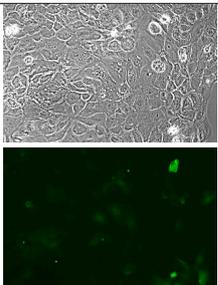
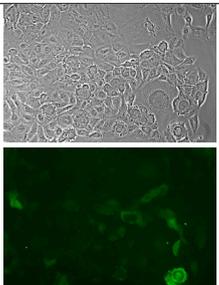
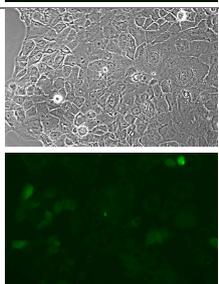
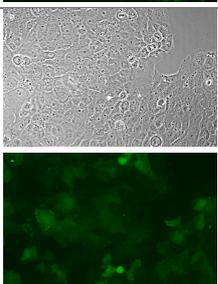
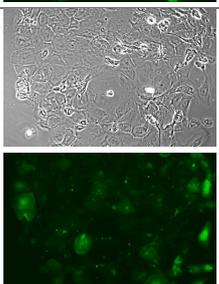
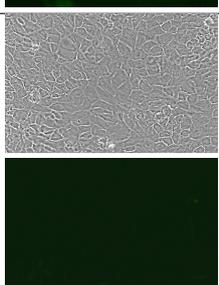
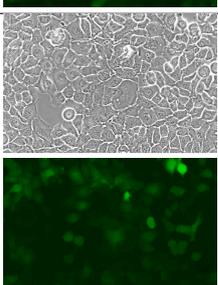
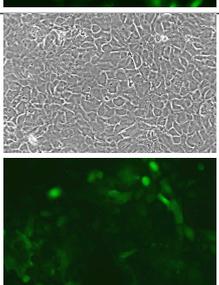
Voraussetzung für die Etablierung einer Sensorzelllinie war die erfolgreiche Klonierung des Konstrukts, welches die stressinduzierte Expression von GFP entsprechend der Kontrolle der funktionellen Promotorregion des Gens *HSPA1A* ermöglicht. Hierfür wurde das nach Morgan 1987 beschriebene DNA-Segment -165 bis +91 mithilfe der Primer *HSPA1A fwd* und *HSPA1A rev* aus genomischer DNA amplifiziert [153]. Das PCR-Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen *XhoI* und *XmaI* in den Expressionsvektor pAcGFP1-1, zur Erzeugung des Plasmids pHSP72_pAcGFP1-1, kloniert und dieses sequenziert.

In einem nächsten Schritt erfolgte die in den Kapiteln 3.2.10 und 3.2.11 beschriebene Durchführung der Transfektion und Einzelklonselektion. Anschließend wurden aus ca. 50 Klonen mittels Fluoreszenzmikroskopie 4 Klone ausgewählt, die erneut den Standardstressbedingungen (2 h 43 °C bzw. 25 μM CdCl_2) ausgesetzt und hinsichtlich ihrer basalen Fluoreszenz, ihrer morphologischen Eigenschaften und des Signal-Rausch-Verhältnisses qualitativ untersucht und bewertet wurden. Eine Übersicht der Ergebnisse zeigt Tabelle 4.1. Dabei wurde deutlich, dass Klon 10 und 30 durch relativ starke Basalfluoreszenz und einem schlechteren Signal-Rausch-Verhältnis, verglichen zu Klon 9 und 44, charakterisiert sind. Außerdem war Klon 30 durch starke morphologische Schäden auffällig. Zur quantitativen Beschreibung der Einzelklonpopulationen mit dem Ziel den geeignetsten Klon zu ermitteln, kamen weiterhin die qRT-PCR und die Durchflusszytometrie zum Einsatz.

Die qRT-PCR ist eine oft genutzte und schnelle Methode zur Untersuchung der Leis-

tungsfähigkeit induzierbarer Konstrukte. Sie schließt zunächst die erfolgreiche Translation und Faltung des Proteins und damit verbundene Fehleinschätzungen des Sensorzellklons aus [154].

Tabelle 4.1: Charakteristiken ausgewählter Einzelklone der Sensorzelllinie pHSP72_pAcGFP1-1

Klon	Kontrolle	2 h 43 °C	6 h 25 µM CdCl ₂	Eigenschaften
9				- basales Level (+++) - Morphologie (+++) - S/N-Verhältnis (+++)
10				- basales Level (++) - Morphologie (++) - S/N-Verhältnis (+)
30				- basales Level (+) - Morphologie (++) - S/N-Verhältnis (+)
44				- basales Level (+++) - Morphologie (+++) - S/N-Verhältnis (+++)

((+++)- sehr gut, (++) - gut, (+) - befriedigend)

Mittels der qRT-PCR-Primer AcGFP fwd und AcGFP rev wurden die mRNA-Expressionsspiegel des AcGFPs in den Zellpopulationen 9, 10, 30 und 44 nach Inkubation bei Standardstressbedingungen überprüft. Abbildung 4.3 zeigt, dass es bei allen Klonpopulationen zu einer signifikanten Steigerung des AcGFP-Expressionsspiegels nach Inkubation mit 25 µM CdCl₂ (t=6 h) kam. Während Klon 30 und 44 verglichen zu Klon 9

und 10 geringere Promotoraktivitäten aufwiesen, bildete Klon 9 besonders reproduzierbar die Aktivität der nativen Genexpression des HSP72 (ca. 20-fache Erhöhung) nach Stressinduktion durch CdCl₂ und Wärmebehandlung ab. Dies wird besonders durch den direkten Vergleich von Klon 9 und 10 nach Wärmebehandlung deutlich, da letzterer unter diesen Bedingungen geringere Aktivitäten als am nativen HaCaT-Zellmodell dokumentierten Genexpressionsmustern zeigte (Vergleich Abbildung 4.2).

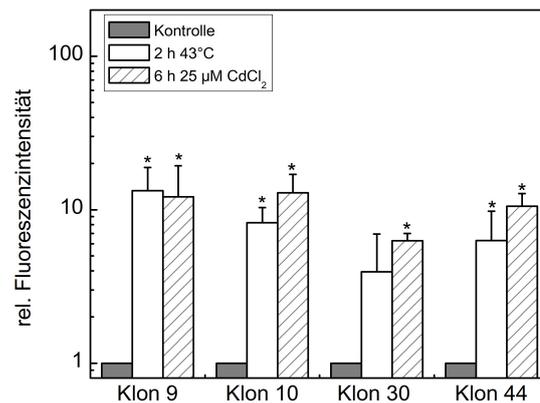


Abbildung 4.3: Analyse der relativen mRNA-Mengen der stressinduzierten Expression des Reportergens AcGFP in ausgewählten selektierten Einzelklonen der Sensorzelllinie pHSP72_pAcGFP1-1 nach Inkubation mit 25 µM CdCl₂ (t=6 h) und Wärmebehandlung (43 °C; t=2 h)[mean±SE; n=3; *p<0,05].

Mittels Durchflusszytometrie wurden weiterhin die absolute Fluoreszenzemission sowie der dynamische Bereich der GFP-Induktion unter Standardstressbedingungen überprüft. Abbildung 4.4 zeigt repräsentativ mikroskopische Aufnahmen und Histogramme durchflusszytometrischer Analysen vor (Kontrolle) und nach Stressinduktion (2 h 43 °C bzw. 6 h 25 µM CdCl₂) eines Klons. Anhand der Histogramme wurde für jede der 4 Einzelklonpopulationen ein Grenzwert der Fluoreszenzintensität bestimmt, der 95 % der Kontrollzellpopulation in der Fraktion GFP- einbezieht (intrinsische Fluoreszenz) und so die Bestimmung des prozentualen Anteils GFP-positiver Zellen ermöglicht. Nach 6-stündiger Inkubation mit 25 µM CdCl₂ stieg die Fraktion GFP+ bei dargestelltem Klon 9 auf 24,1 % (t=4 h) bzw. 47,3 % (t=6 h) und 44,9 % waren nach 2 h Inkubation bei 43 °C GFP-positiv. Klon 10, 30 und 44 wiesen in den mittels Durchflusszytometrie generierten Datensätzen geringere Induktivitäten auf (Daten nicht gezeigt).

Zur Charakterisierung der 4 Einzelklonpopulationen wurden die Fluoreszenzmikroskopie, qRT-PCR und Durchflusszytometrie angewendet. Bei allen Verfahren zeigte Klon 9 hinsichtlich Morphologie, Promotoraktivität und Signal-Rausch-Verhältnis die günstigsten Eigenschaften.

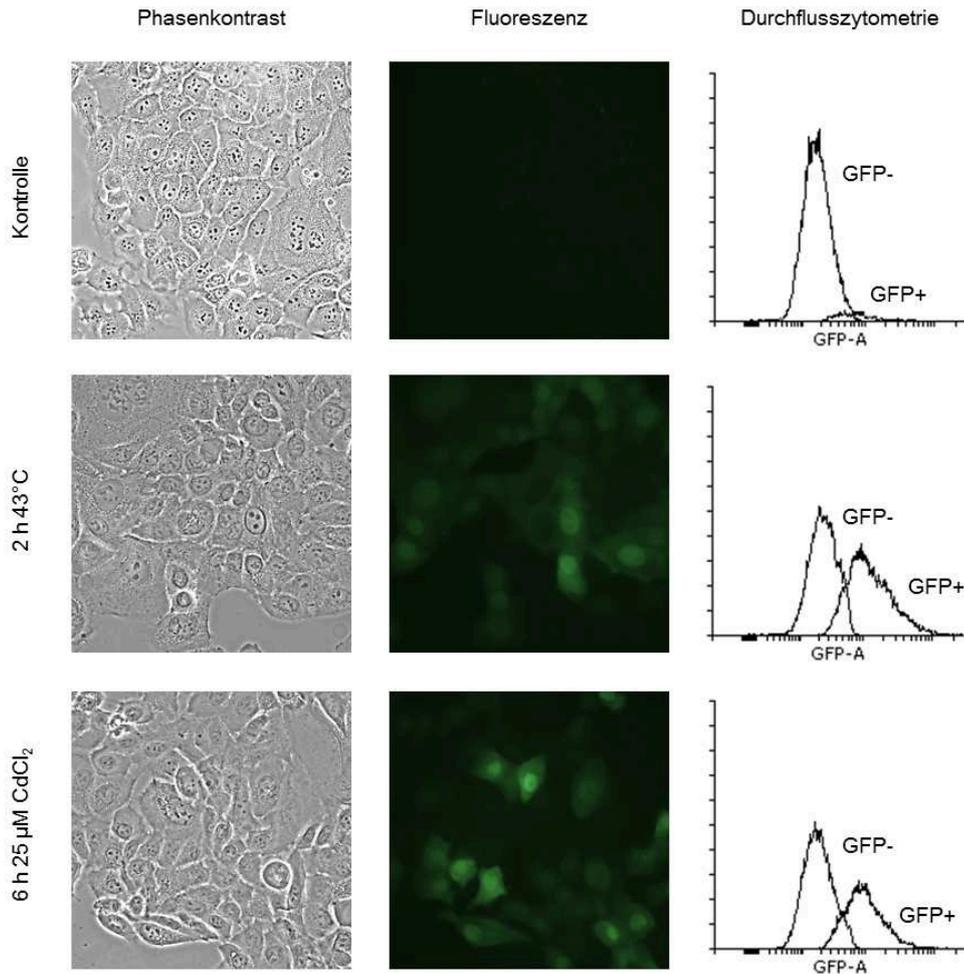


Abbildung 4.4: Mikroskopische Aufnahmen (Vergrößerung 200x) und Histogramme durchflusszytometrischer Analysen vor (Kontrolle) und nach Stressinduktion (2 h 43 °C bzw. 6 h 25 µM CdCl₂) des selektierten Einzelklons der Sensorzelllinie pHSP72_pAcGFP1-1. Die Histogramme stellen die Häufigkeitsverteilung der gemessenen Fluoreszenzintensität der GFP-exprimierenden Sensorzellen dar. Die horizontale Achse gibt dabei die Intensität der Einzelmessungen (log. Skala), die vertikale Achse die Anzahl der Zellen wieder. Unter Kontrollbedingungen exprimierten, relativ zu internen Referenzwerten, 95 % der Population kein GFP (GFP-). Nach 6-stündiger Inkubation mit 25 µM CdCl₂ stieg die Fraktion GFP+ auf 47,3 % und 44,9 % waren nach 2 h Inkubation bei 43 °C GFP+.

4.1.3 Assaycharakterisierung hinsichtlich Sensitivität, Vitalität und Stabilität

In den Experimenten zur Charakterisierung der Sensorzelllinie pHSP72_pAcGFP1-1 wurde ausschließlich der im vorangegangenen Kapitel identifizierte und leistungsfähigste Klon 9 verwendet.

Zur Erstellung eines konzentrations- und inkubationszeitabhängigen Intensitätsprofils wurde die Sensorzelllinie auf Deckgläschen ausgesät und mittels quantitativer Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Nach Inkubation der Sensorzellen mit 15, 25 und 35 µM CdCl₂ wurde ein inkubationszeitabhängiger Anstieg der relativen Fluoreszenzintensität, mit einem Maximum nach 6-stündiger Inkubation und 35 µM CdCl₂, beobachtet

(Abbildung 4.5 (A)). Wurde die Konzentration auf 45 μM erhöht, zeigte die Population nach 4- und 6-stündiger Inkubation bereits eine ungewöhnliche Morphologie und einige Zellen starben, was mit dem beobachteten Abfall der Fluoreszenzintensität einherging.

Außerdem wurde die relative Fluoreszenzintensität für verschiedene Konzentrationen von CdCl_2 zur Bestimmung der Nachweisgrenze nach 6-stündiger Inkubation aufgenommen (Abbildung 4.5 (B)). Die Nachweisgrenze ist dabei definiert als die Konzentration, die eine Fluoreszenzintensität gleich oder größer als die mittlere Fluoreszenz unbehandelter Kontrollzellen und dreimal deren Standardfehler der Messung ergibt. Auf Grundlage dieser Definition wurde für eine Inkubationszeit von 6 h eine Nachweisgrenze von 7 μM CdCl_2 ermittelt. Diese Daten zeigen, dass die Sensorzelllinie für die quantitative Detektion des zytotoxischen Potenzials einer Substanz schon bei subletalen Konzentrationen und kurzen Inkubationszeiten, verglichen mit Endpunktmessungen, möglich ist.

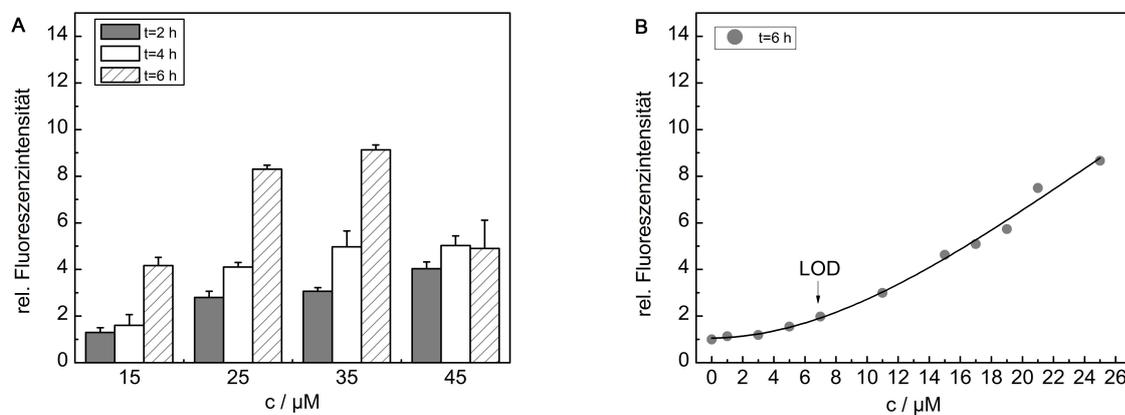


Abbildung 4.5: Quantitative fluoreszenzmikroskopische Analyse der Sensorzellreaktion (pHSP72_pAcGFP1-1) auf CdCl_2 zur (A) Erstellung eines inkubationszeit- und konzentrationsabhängigen Intensitätsprofils und (B) zur Bestimmung der Nachweisgrenze (LOD). (A) Analyse der Fluoreszenzintensität des GFP nach 2-, 4- und 6-stündiger Inkubation mit 15, 25, 35, 45 μM CdCl_2 [means \pm SE; n=3]. (B) Analyse der Fluoreszenzintensität des GFP nach Inkubation mit aufsteigenden CdCl_2 -Konzentrationen (t=6 h).

Weiterhin wurde der Zusammenhang zwischen Zellzyklussynchronisierung und GFP-Expression im Folgenden näher untersucht, da trotz stabiler Transfektion und Einzelklonselektion der Sensorzelllinie keine homogene biosensorische Antwort der Zellen beobachtet werden konnte (siehe Abbildung 4.4, S. 57). Ziel der durchgeführten Experimente war die Steigerung der biosensorischen Antwort durch Zellhomogenisierung mittels Zellzyklussynchronisierung (Anreicherung der Zellen in der G₀-Phase). Hierfür wurden die HaCaT-Zellen für 24 und 48 h in Mangelmedium kultiviert sowie eine Kontrolle in Kompletmedium als auch ein konfluenter Monolayer (Synchronisierung durch Kontaktinhibierung) mitgeführt. Anschließend wurden die fixierten Zellen mit DAPI gefärbt und der Zellzyklusstatus anhand des DNA-Gehalts mittels durchflusszytometrischer Analyse ermittelt. Abbildung 4.6 stellt das Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse der Zellzyklusphasen bei genannten Kultivierungsbedingungen dar. Die Verteilung der Kontrollpopulation innerhalb der 3 Phasen des Zellzyklus (G₀/G₁, S, G₂/M) betrug 70,0 %,

21,9 % und 8,1 %. Nach 24 h unter Serumangel betrug die Verteilung entsprechend 74,5 %, 17,7 % und 7,8 % sowie 82,9 %, 11,2 % und 5,9 % nach 48 h Inkubation in Mangelmedium. Die Kultivierung in Mangelmedium bewirkte eine Zunahme der in der Ruhephase befindlichen Zellen. Entsprechend der prozentualen Zunahme der in der G_0/G_1 -Phase befindlichen Zellen, nahm der Anteil derer in der S- bzw. G_2/M -Phase ab. Die Verteilung der Zellen in den einzelnen Phasen bei Kultivierung eines Monolayers entsprach in etwa der Verteilung nach 24-stündigem Serumangel. Bei der Bildung eines Monolayers kommt es zur Kontaktinhibierung, wodurch die Zellen ebenfalls in den ruhenden Phasen des Zellzyklus verharren.

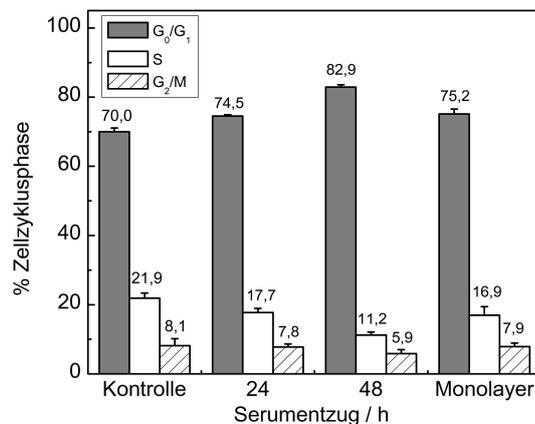


Abbildung 4.6: Durchflusszytometrische Untersuchung der Zellzyklussynchronisierung durch Serumangel (1 % FBS für 24 bzw. 48 h) mittels DAPI-Färbung an PFA-fixierten HaCaTs im Vergleich zu einem konfluenten Monolayer (Kontaktinhibierung) und einer nichtkonfluenten Kontrollpopulation [means±SE; n=3].

Nachdem ein positiver Einfluss des Serumangels zur Zellzyklussynchronisierung in HaCaT-Zellen gezeigt werden konnte, wurde nun der Einfluss der Synchronisierung auf die GFP-Expression in der Sensorzelllinie untersucht. Hierfür wurden diese sowohl in Komplet- als auch in Mangelmedium für 48 h kultiviert und anschließend den etablierten Standardstressbedingungen (2 h 43 °C bzw. 6 h 25 μ M CdCl₂) ausgesetzt. Aufgrund des Einflusses des Serumgehalts auf die Zytotoxizität des CdCl₂ wurde dies ausschließlich in Mangelmedium zugegeben (siehe Abbildung 4.1, S. 53). Im Anschluss erfolgte die durchflusszytometrische Analyse zur Bestimmung des Anteils GFP+ Zellen entsprechend der Einteilung der Fraktionen in Abbildung 4.4, s.S. 57. Es konnte keine reproduzierbare und signifikante Steigerung der biosensorischen Antwort gezeigt und der Effekt der Zellzyklussynchronisierung in HaCaT-Zellen somit nicht positiv genutzt werden.

Weiterhin wurde mittels Durchflusszytometrie in diesem Zusammenhang untersucht, ob der Serumangel und/oder die Standardstressbedingungen einen Effekt auf die Vitalität der Zellen haben. Hintergrund war die zusätzliche Kontrolle, ob sich die bereits ausführlich charakterisierte Sensorzelllinie tatsächlich als Biosensor für subletale Konzentrationen und kürzere Inkubationszeiten verglichen zu einer gewöhnlichen Endpunktmethode wie MTT

eignet und tatsächlich die Mehrheit der Zellen sich in einem physiologisch akzeptablen Zustand befinden. Dafür wurde den oben beschriebenen unfixierten Populationen kurz vor der durchflusszytometrischen Analyse DAPI, welches durch permeabilisierte Membran penetriert und tote Zellen anfärbt, zugegeben. Abbildung 4.7 veranschaulicht die Ergebnisse. Sowohl der 48-stündige Serumentzug als auch die Stresssituationen haben keine Auswirkungen auf die Vitalität der Zellen. Der Anteil toter Zellen betrug bei allen Bedingungen ca. 5 % und ist auf Transportwege zwischen Kultivierung und Analyse zurückzuführen.

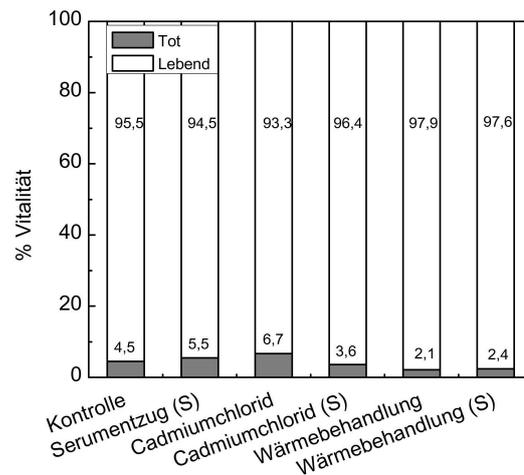


Abbildung 4.7: Durchflusszytometrische Analyse des Einflusses der Zellzyklussynchronisierung und Stressindikation auf die Zellvitalität mittels DAPI-Färbung (Farbstoffaufnahme nur bei toten Zellen). Dargestellt sind anteilig die Fraktionen lebender und toter Zellen unter Kontrollbedingungen, Serumentzug ($t=48$ h), sowie der Stressbedingungen Cadmiumchlorid ($25 \mu\text{M CdCl}_2$, $t=6$ h) und Wärmebehandlung (43°C ; $t=2$ h) mit und ohne vorangegangenen Serumentzug (S) für $t=48$ h.

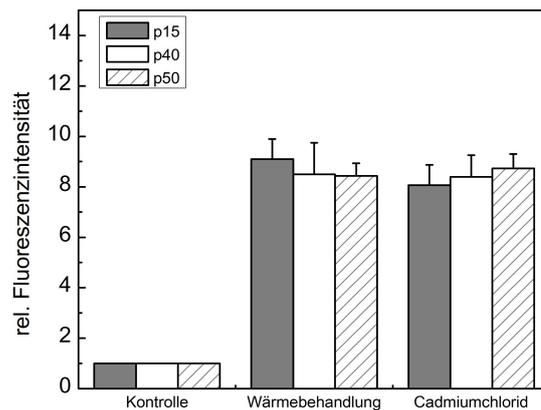


Abbildung 4.8: Untersuchung der Stabilität der Sensorzelllinie pHSP72_pAcGFP1-1 nach 15, 40 und 50 Passagen. Die Sensorzellen wurden über ca. 4 Monate in Kultur gehalten und regelmäßig den Stressbedingungen Cadmiumchlorid ($25 \mu\text{M CdCl}_2$, $t=6$ h) und Wärmebehandlung (43°C ; $t=2$ h) ausgesetzt. Dargestellt ist die anschließend erfolgte Analyse der relativen Fluoreszenzintensität des GFP [means \pm SE; $n=3$].

Abschließend wurde die Stabilität der Induzierbarkeit der Sensorzelllinie pHSP72_pAcGFP1-1 überprüft, indem die Sensorzelllinie über ca. 4 Monate in Kultur gehalten und regelmäßig den Stressbedingungen Cadmiumchlorid ($25 \mu\text{M CdCl}_2$, $t=6$ h)

und Wärmebehandlung (43 °C; t=2 h) ausgesetzt wurde. In Abbildung 4.8 ist das Ergebnis der anschließend erfolgten Analyse des GFP-Expressionspiegels der Sensorzellen in Passage 15, 40 und 50 dargestellt. Auch nach 50 Passagen blieb die Sensorzelllinie im Rahmen der biologischen und technischen Variabilität induzierbar.

4.2 Reporter-genassay basierend auf HSP70B'

4.2.1 Genexpressionsanalyse zur Optimierung des Signal-Rausch-Verhältnisses

Zur weiteren Identifikation von Biomarkern, die sich durch eine höhere Promotoraktivität infolge der Einwirkung der Standardstressbedingungen auszeichnen und dadurch das Signal-Rausch-Verhältnis des Reporter-genassays maßgeblich verbessern könnten, wurde eine Genexpressionsanalyse von HSP70B' und HMOX-1 durchgeführt.

In der Literatur ist beschrieben, dass der mRNA-Expressionsspiegel von HSP70B' durch eine Reihe exogener Faktoren induziert wird. Außerdem ist das basale Level von HSP70B' (*HSPA6*) niedriger als das anderer HSP70-Gene. Ferner besitzt HSP70B' zusätzliche *Heat shock elements* in seiner aktiven Promotorregion [111, 155]. Dadurch ergeben sich bei der Nutzung des HSP70B'-Promotors möglicherweise Vorteile gegenüber den bereits untersuchten anderen HSP-Promotoren. Auch HMOX-1 schützt die Zellen vor einer Reihe exogener Einflüsse und nimmt eine bedeutende Rolle z.B. bei der Verarbeitung von oxidativem Stress ein.

Zunächst erfolgte die Untersuchung dieser beiden genannten Gene im HaCaT-Zellmodell mittels qRT-PCR-Studien nach Einwirkung von 25 µM CdCl₂ sowie einer Hitzebehandlung bei 43 °C. Die Experimente zeigten einen signifikant erhöhten mRNA-Expressionsspiegel bereits nach 3-stündiger Inkubation mit 25 µM CdCl₂ (Abbildung 4.9). Unter diesen Bedingungen ist sowohl die Expression von HSP70B' als auch HMOX-1 bereits um das ca. 150-fache erhöht. Entsprechend konnte eine 100-fache (1 h 43 °C) bzw. 200-fache (2 h 43 °C) Steigerung des mRNA-Expressionsspiegels als Folge der Wärmebehandlung für beide Gene nachgewiesen werden. Unter genannten Standardstressbedingungen zeigten beide Gene eine ähnliche Reaktion bzw. Induktionskinetiken, was auf einen ähnlichen Regulationsmechanismus zurückzuführen ist.

Die Regulation der induzierten Expression von HMOX-1 wird durch zwei *upstream* gelegene, mehrere Kilobasen entfernte *Enhancer* maßgeblich beeinflusst und in Zusammenhang mit dem Nrf2-Keap1-Signalweg gebracht [96]. Um diesen komplexen *Enhancer*-basierten Regulationsmechanismus in einem Reporter-genassay zu nutzen, wären Plasmidkonstrukte von 10 kbp bzw. 20 kbp notwendig. Da weiterhin die stabile Transfektio-

on solcher Konstrukte höchst unwahrscheinlich ist und die Tatsache, dass sich die Antwort des HMOX-1, wie auch von anderen beobachtet [156], nahezu identisch zu dem des HSP70B' verhält, wurde auf die Etablierung HMOX-1-basierter Sensorzellen verzichtet.

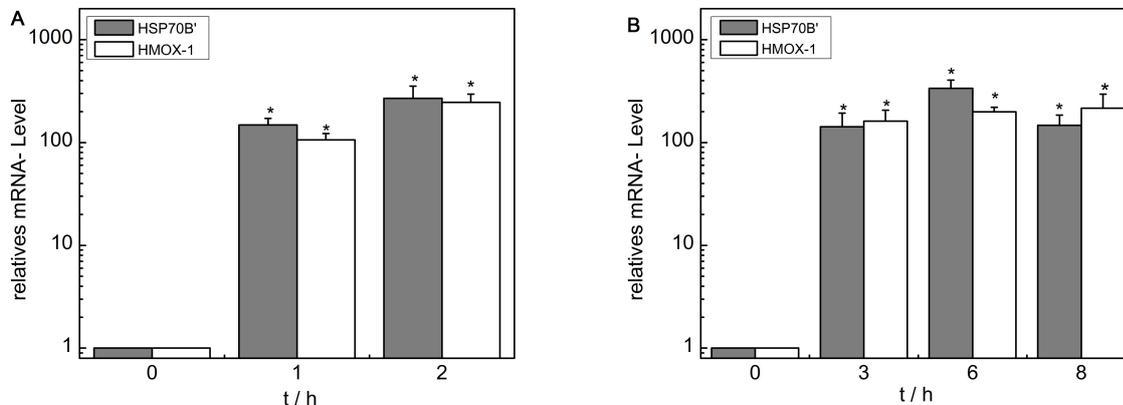


Abbildung 4.9: Relative Genexpression von HSP70B' (*HSPA6*) und HMOX-1 nach (A) Wärmebehandlung (43 °C; 0, 1, 2 h) und (B) Inkubation mit CdCl₂ (25 µM; 0, 3, 6, 8 h). Die relative Expression bezieht sich auf die entsprechenden Werte unbehandelter Kontrollzellen festgesetzt als 1. [mean±SE; n=3; *p<0,05]

4.2.2 Konstruktion und Evaluierung der Sensorzelllinie

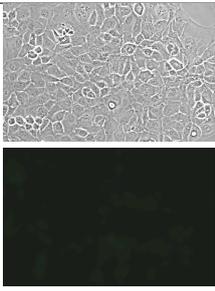
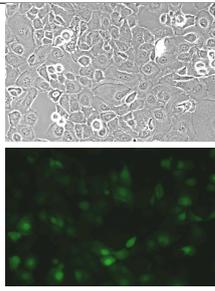
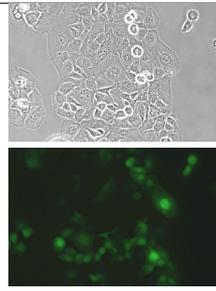
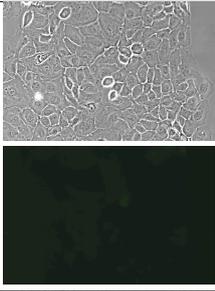
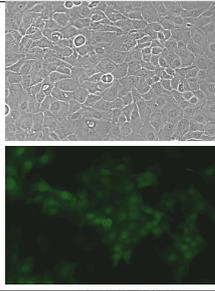
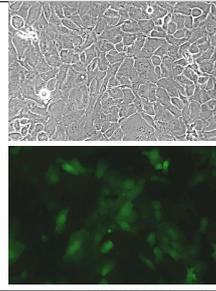
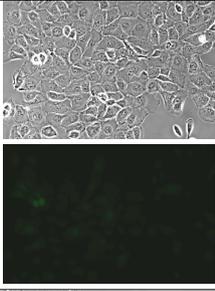
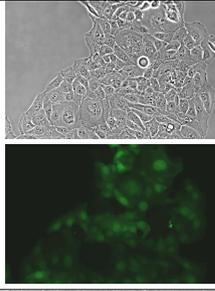
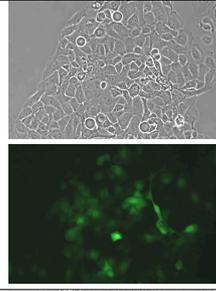
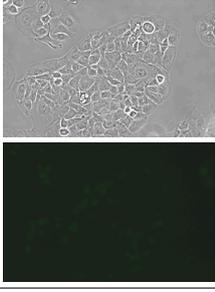
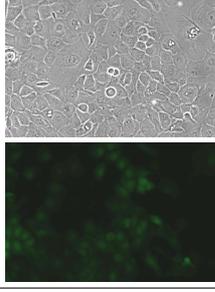
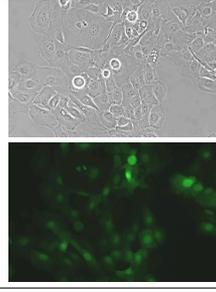
pHSP70B_pAcGFP1-1

Die Etablierung der Sensorzelllinie basierend auf der funktionellen Promotorregion des Gens *HSPA6* erfolgte nach den gleichen Vorgehensweisen und Kriterien wie die der ersten Sensorzelllinie pHSP72_pAcGFP1-1 (s. Kap. 4.1.2).

Zunächst wurde der in der Literatur vorgeschlagene Bereich der funktionellen Promotorregion des HSP70B' (-641 bis +110) mithilfe der Primer HSPA6 fwd und HSPA6 rev aus genomischer DNA amplifiziert [112, 157]. Das PCR-Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen XhoI und AgeI in den Expressionsvektor pAcGFP1-1, zur Erzeugung des Plasmids pHSP70B_pAcGFP1-1, kloniert und dieses sequenziert.

In einem nächsten Schritt erfolgte die in den Kapiteln 3.2.10 und 3.2.11 beschriebene Durchführung der Transfektion und Einzelklonselektion sowie die Auswahl von 4 Klonen mittels Fluoreszenzmikroskopie, entsprechend dem Vorgehen in Kapitel 4.1.2. Eine Übersicht der Ergebnisse zeigt Tabelle 4.2. Dabei wurde deutlich, dass diese Sensorzelllinie bereits nach qualitativer Einschätzung ein deutlich stärkeres Fluoreszenzsignal generiert. Klon 14 und 21 waren dabei durch ein besonders günstiges Signal-Rausch-Verhältnis bei guten morphologischen Eigenschaften gekennzeichnet. Generell zeichneten sich alle Klone jedoch durch eine relativ starke Basalfluoreszenz aus. Zur quantitativen Beschreibung der Einzelklonpopulationen, mit dem Ziel den geeignetsten Klon zu ermitteln, kamen daher weiterhin die qRT-PCR und die Durchflusszytometrie zum Einsatz.

Tabelle 4.2: Charakteristiken ausgewählter Einzelklone der Sensorzelllinie pHSP70B_pAcGFP1-1

Klon	Kontrolle	2 h 43 °C	6 h 25 µM CdCl ₂	Eigenschaften
5				- basales Level (+++) - Morphologie (+++) - S/N-Verhältnis (++)
14				- basales Level (++) - Morphologie (+++) - S/N-Verhältnis (++++)
21				- basales Level (++) - Morphologie (+++) - S/N-Verhältnis (++++)
44				- basales Level (+++) - Morphologie (+++) - S/N-Verhältnis (++)

((+++)- sehr gut, (++) - gut, (+) - befriedigend)

Besonders interessant gestaltete sich dabei die Untersuchung der Promotoraktivität des Konstrukts und die Frage, ob die in Abbildung 4.9 illustrierte ca. 200-fache Steigerung des Expressionsspiegels von HSP70B' mit Hilfe des Reporterassays ebenfalls abbildbar ist. Unter Einsatz der qRT-PCR-Primer AcGFP fwd und AcGFP rev wurden die mRNA-Expressionsspiegel des AcGFPs in den Zellpopulationen 5, 14, 21 und 44 nach Inkubation bei Standardstressbedingungen überprüft. Abbildung 4.10 zeigt, dass es bei allen Klonpopulationen zu einer signifikanten Steigerung des AcGFP-Expressionsspiegels nach Inkubation mit 25 µM CdCl₂ (t=6 h) kam. Dabei zeigten Klon 14 und 21 im Vergleich der Populationen die größtmögliche Steigerung (ca. 50-fache), dennoch war es mithil-

fe der gewählten Promotorregion nicht in dem Maße möglich die Aktivität der nativen Genexpression des HSP70B' nach Stressinduktion durch CdCl₂ und Wärmebehandlung abzubilden.

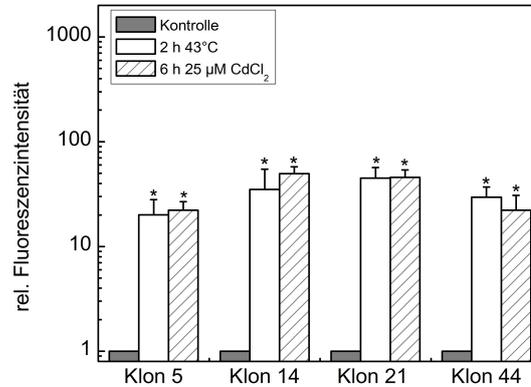


Abbildung 4.10: Analyse der relativen mRNA-Mengen der stressinduzierten Expression des Reportergens AcGFP in ausgewählten selektierten Einzelklonen der Sensorzelllinie pHSP70B_pAcGFP1-1 nach Inkubation mit 25 µM CdCl₂ (t=6 h) und Wärmebehandlung (43 °C; t=2 h).[mean±SE; n=3; *p<0,05]

Weiterhin wurde mittels Durchflusszytometrie die absolute Fluoreszenzemission sowie der dynamische Bereich der GFP-Induktion unter Standardstressbedingungen, gemäß dem in Kapitel 4.1.2, s.S. 57 beschriebenen Kriterien, überprüft. Nach 6-stündiger Inkubation mit 25 µM CdCl₂ stieg die Fraktion GFP+ bei Klon 21 auf 52,5 % (t=6 h) und 49,7 % waren nach 2 h Inkubation bei 43 °C GFP-positiv. Klon 5, 14 und 44 wiesen in den mittels Durchflusszytometrie generierten Datensätzen geringere Induktivitäten auf und wurden daher aus dem Screeningverfahren entfernt (Daten nicht gezeigt).

Zur Erstellung eines konzentrations- und inkubationszeitabhängigen Intensitätsprofils wurde die Sensorzelllinie pHSP70B_pAcGFP1-1 nun ebenfalls auf Deckgläschen ausgesät und mittels quantitativer Fluoreszenzmikroskopie untersucht (Abbildung 4.11 (A)). Nach Inkubation der Sensorzellen mit 15, 25, 35 und 45 µM CdCl₂ wurde ein inkubationszeitabhängiger Anstieg der relativen Fluoreszenzintensität verzeichnet. Im Gegensatz zur Sensorzelllinie basierend auf HSP72 (Abbildung 4.5 (A), s.S. 58) wurde ein Maximum der Fluoreszenzintensität erst nach 6-stündiger Inkubation mit 45 µM CdCl₂ beobachtet. Wurde die Konzentration auf 60 µM erhöht, zeigte die Population sowohl nach 4- als auch 6-stündiger Inkubation eine ungewöhnliche Morphologie und einige Zellen starben, was mit dem beobachteten Abfall der Fluoreszenzintensität einhergeht. Die detektierten Unterschiede beider Sensorzelllinien sind dabei vermutlich nicht auf das Reporterkonstrukt, sondern eher auf die Tatsache zurückzuführen, dass die Messungen auf Basis einer selektierten Einzelklonpopulation beruhen, die sich im Rahmen der genomischen Variabilität in ihrer zellulären Antwort (Widerstandsfähigkeit) unterscheiden.

Außerdem wurde die relative Fluoreszenzintensität für verschiedene Konzentrationen von CdCl₂ zur Bestimmung der Nachweisgrenze nach 6-stündiger Inkubation aufgenom-

men (Abbildung 4.11 (B)). Für die zweite Sensorzelllinie ergibt sich eine Nachweisgrenze von $6 \mu\text{M CdCl}_2$ nach 6-stündiger Inkubation.

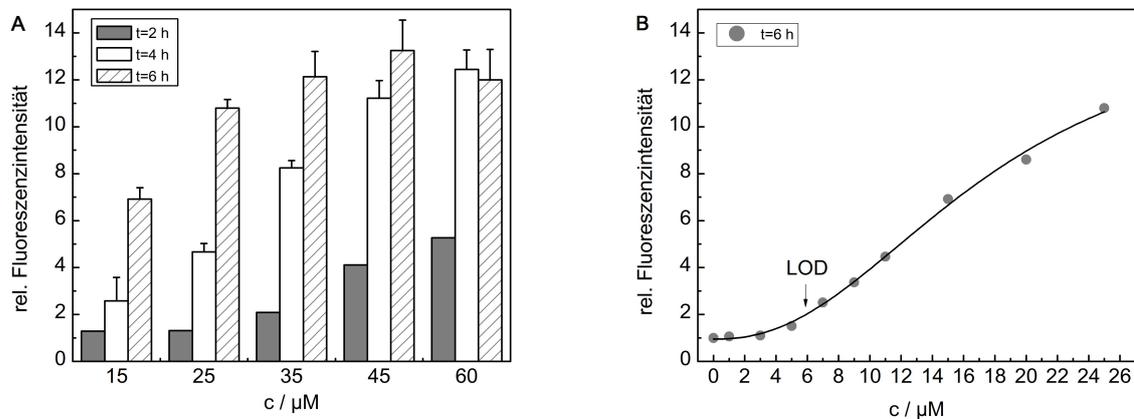


Abbildung 4.11: Quantitative fluoreszenzmikroskopische Analyse der Sensorzellreaktion (pHSP70B_pAcGFP1-1) auf CdCl₂ zur (A) Erstellung eines inkubationszeit- und konzentrationsabhängigen Intensitätsprofils und (B) zur Bestimmung der Nachweisgrenze (LOD). (A) Analyse der Fluoreszenzintensität des GFP nach 2-, 4- und 6-stündiger Inkubation mit 15, 25, 35, 45, 60 $\mu\text{M CdCl}_2$ [means \pm SE; n=3]. (B) Analyse der Fluoreszenzintensität des GFP nach Inkubation mit aufsteigenden CdCl₂-Konzentrationen (t=6 h).

Zusammenfassung

Zur Beschreibung und Visualisierung der auftretenden molekularen Mechanismen einer toxisch-irritativen Kontaktdermatitis wurden in der vorliegenden Arbeit erstmalig auf spontan immortalisierten Keratinozyten (HaCaT) basierende Sensorzelllinien als biologisches Erkennungselement etabliert.

Die Validierung und Optimierung der Sensorzelllinien erfolgte dabei am Beispiel des Umwelttoxins CdCl₂. Aufbauend auf Literaturstudien wurden insgesamt vier stressensitive Biomarker (HSP27, HSP72, HSP70B' und HMOX-1) mittels qRT-PCR untersucht. Dabei wurde zunächst die Expression von HSP72 als sensitiv genug eingeschätzt, um als Sensor für die Detektion von xenobiotischen Stresssituationen in einem Reporterassay mit GFP zu dienen. Es wurde gezeigt, dass sich die zunächst etablierte Sensorzelllinie pHSP72_pAcGFP1-1 für die Detektion zytotoxischer Effekte unter subletalen Bedingungen und kürzeren Inkubationszeiten verglichen zu gewöhnlichen Endpunktmessungen eignet. Neben den durchgeführten DAPI-Färbungen und der Analyse mittels Durchflusszytometrie verdeutlichen dies Experimente zur Evaluierung des zellschädigenden Potenzials von CdCl₂ mittels MTT-Test. Während nach 24-stündiger Inkubation mit 25 $\mu\text{M CdCl}_2$ nur noch 80 % vitale Zellen vorlagen, wurde nach 6-stündiger Toxinbehandlung bei gleicher Konzentration kein signifikanter zytotoxischer Einfluss auf die Zellen detektiert. Für die Sensorzelllinie pHSP72_pAcGFP1-1 wurde eine Nachweisgrenze von 7 $\mu\text{M CdCl}_2$ (t=6 h) ermittelt. Einen möglichen Biomarker, der sich durch eine höhere Promotoraktivität infolge der Einwirkung der Standardstressbedingungen auszeichnet und dadurch das

Signal-Rausch-Verhältnis des Reporterassays maßgeblich verbessern könnte, zeigten Genexpressionsanalysen von HSP70B' auf. Der Expressionsspiegel von HSP70B' ist unter gleichen Stressbedingungen nochmals etwa 10-fach höher als HSP72. Die etablierte Sensorzelllinie pHSP70B_pAcGFP1-1 zeichnete sich jedoch nicht durch ein um Größenordnungen günstigeres Signal-Rausch-Verhältnis aus, da die native Promotoraktivität nicht im Reporterassay abgebildet werden konnte. Dennoch ist sie durch eine höhere absolute Fluoreszenzemission charakterisiert, was für Folgeanwendungen bezüglich auftretender Hintergrundkorrekturen positiv zu bewerten ist.

5 Anwendungsspektrum des Biosensors

Das Hauptziel der wissenschaftlichen Bemühungen auf dem Gebiet der Toxikologie ist die Gefahrenprävention zur Vermeidung möglicher nachteiliger Effekte für den menschlichen Organismus, hervorgerufen durch alle Arten von Chemikalien, einschließlich Medikamente, kosmetische Produkte, Haushaltsmittel, Industrie- und Agrochemikalien. Da die Evaluierung des zellschädigenden Potenzials einer Substanz mithilfe von Tierversuchen bereits verboten und das Screening von Chemikalien im Zuge der EU-Verordnung REACH gefordert ist, werden nicht nur dringend aussagekräftige *In-vitro*-Modelle benötigt, sondern ist deren fortgeschrittene Prüfung sowohl hinsichtlich Funktionalität, Anwendungsspektrum als auch der Übertragbarkeit unbedingt notwendig [124].

Die in dieser Arbeit anhand des physikalischen Stresses der erhöhten Temperatur und des Einflusses des Umwelttoxins CdCl_2 etablierten Sensorzelllinien wurden daher sowohl mit einem Substanzspektrum von Reinstchemikalien als auch verschiedenen Pflanzenextrakten behandelt und deren Reaktion verfolgt. Die gewählten Beispiele ermöglichen einen Einblick in das Anwendungsspektrum des Biosensors in der Risikobewertung von Chemikalien sowie bei der Beurteilung von Pflanzenextrakten als Bestandteile kosmetischer Produkte.

5.1 Risikobewertung von Chemikalien

Neben dem sehr giftigen und umweltgefährdenden Salz des Metalls Cadmium wurde eine zweite, sehr gesundheitsschädliche, zytotoxische Substanz gewählt. Sowohl beim Verschlucken als auch bei der Berührung mit der Haut geht von 2,4-Dinitrochlorobenzol (DNCB) eine ernste Vergiftungsgefahr aus. Zudem hat die elektrophile Substanz hohe sensibilisierende Eigenschaften. Weiterhin wurde Nickel als der häufigste Auslöser für Kontaktallergien, in Form des Salzes der Schwefelsäure gewählt.

Zunächst wurde das zytotoxische Potenzial der Substanzen am HaCaT-Zellmodell in Mangel- und Kompletmedium untersucht. Die Dosis-Wirkungs-Beziehung von DNCB ist in Abbildung 5.1 (A) dargestellt. Die EC_{50} -Werte wurden durch Anpassung der vorgegebenen Dosis-Wirkungs-Funktion (Origin Lab®) an die experimentell ermittelten Daten durch nichtlineare Regressionsanalyse bestimmt und betragen $(11,5 \pm 0,3) \mu\text{M}$ in Mangelmedi-

um und $(11,3 \pm 0,5) \mu\text{M}$ in Kompletmedium. Im Gegensatz zur serumgehaltabhängigen Zytotoxizität von CdCl_2 konnte dieser Effekt bei DNCB nicht beobachtet werden.

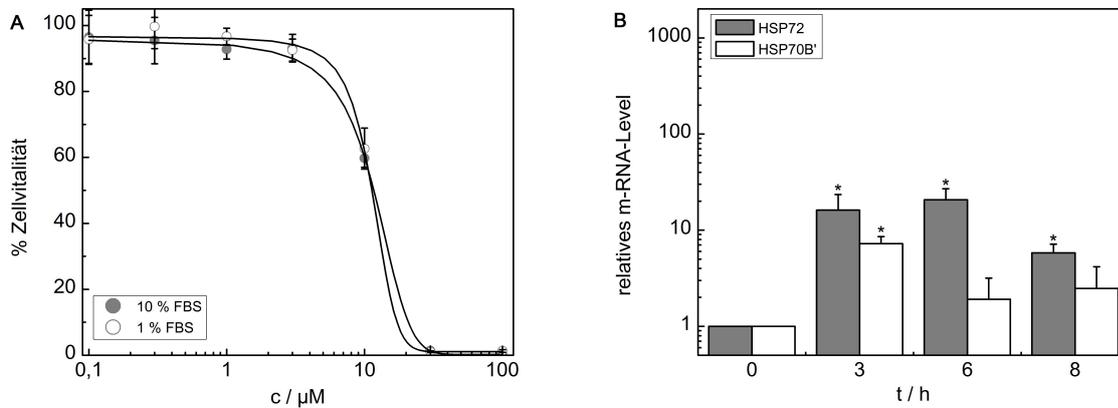


Abbildung 5.1: Einfluss von DNCB auf das HaCaT-Zellmodell. Analyse der Dosis-Wirkungs-Beziehung ausgewertet mittels MTT (A) sowie Bestimmung der relativen Genexpression von HSP72 und HSP70B' nach Inkubation mit DNCB (B). (A) Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte nach 24-stündiger Inkubation mit DNCB in Mangel- bzw. Kompletmedium. Die EC_{50} -Werte wurden durch Anpassung der vorgegebenen Dosis-Wirkungs-Funktion (Origin Lab®) an die experimentell ermittelten Daten durch nichtlineare Regressionsanalyse bestimmt [mean \pm SE; n=3]. (B) Die Zellen wurden 3, 6 und 8 h mit $10 \mu\text{M}$ DNCB in Mangelmedium inkubiert und die relative Genexpression von HSP72 und HSP70B', bezogen auf die entsprechenden Werte unbehandelter Kontrollzellen festgesetzt als 1, bestimmt [mean \pm SE; n=3; *p<0,05].

Einen weiteren interessanten Effekt zeigten die qRT-PCR-Studien zur Genexpressionsanalyse der HSPs nach 3, 6 und 8 h Inkubation mit $10 \mu\text{M}$ DNCB (Abbildung 5.1 (B)). Während bislang grundsätzlich die Verlängerung der Inkubationszeit mit einer Steigerung bzw. Sättigung des Expressionsspiegels der untersuchten Gene einherging, war bei Behandlung der Zellen mit DNCB ein Abfall des Expressionsspiegels nach 8 h zu beobachten. Besonders deutlich war dieser Effekt bei HMOX-1. Bereits nach 3 h war der Expressionsspiegel des Stressproteins um das 64-fache erhöht, entsprechend wurde 62-fach nach 6 h und nur noch 9-fach nach 8 h gemessen (Daten nicht gezeigt). Ähnlich nachzuvollziehen ist diese Beobachtung bei der Induktion von HSP72, welches entsprechend den untersuchten Zeitintervallen von 3, 6 und 8 h eine 16-, 21-, bzw. 5-fache Steigerung des Genexpressionslevels zeigte.

Die Analyse der Dosis-Wirkungs-Beziehung von NiSO_4 erfolgte gleichermaßen mittels MTT (Daten nicht gezeigt). Die EC_{50} -Werte betragen $(550 \pm 17) \mu\text{M}$ in Mangelmedium sowie $(800 \pm 30) \mu\text{M}$ in Kompletmedium und lassen aufgrund der notwendigen, wesentlich größeren Konzentration auf ein weniger starkes zytotoxisches Potenzial schließen. Allerdings ist wie beim Metall Cadmium auch die Zytotoxizität von Nickel stark abhängig vom Serumgehalt des Zellkulturmediums. Daher wurden alle Folgeexperimente in Mangelmedium durchgeführt. Die nicht dargestellten Genexpressionsanalysen, die in qRT-PCR-basierten Studien mit NiSO_4 am HaCaT-Zellmodell durchgeführt wurden, zeigten, dass weder HSP72 oder HSP70B', noch HMOX-1 durch dieses sensibilisierende Metall signifikant gesteigert exprimiert wurden.

Auf der Grundlage zur Einschätzung der Zytotoxizität mittels MTT bzw. der durchgeführten qRT-PCR-Studien am HaCaT-Zellmodell wurden nun die Sensorzellen pHSP72_pAcGFP1-1 und pHSP70B_pAcGFP1-1 mit entsprechenden Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert und die Messung der Fluoreszenzintensität als Maß für den Grad der Zellstressbelastung quantitativ bestimmt. In Abbildung 5.2 sind die Induktivitäten der Reporterkonstrukte nach 6-stündiger Inkubation mit 10 µM DNCB und 400 µM NiSO₄ (t=6 h) vergleichend zu 25 und 35 µM CdCl₂ und der Wärmebehandlung (43 °C; t=2 h) als Positivkontrolle dargestellt. Obwohl die gewählten Konzentrationen von DNCB und NiSO₄ bzw. CdCl₂ (25 µM) den mittels MTT bestimmten EC₈₀-Werten entsprechen, wurden bei Detektion durch die Sensorzellen sehr unterschiedliche Effekte beobachtet. Während mittels Reporteragenassay die Behandlung der Sensorzellen mit DNCB in einer relativen Fluoreszenzänderung von 4,7 bzw. 6,8 resultierte, wurde die Expression von GFP durch NiSO₄, verglichen mit einer unbehandelten Kontrollpopulation, erwartungsgemäß nicht induziert.

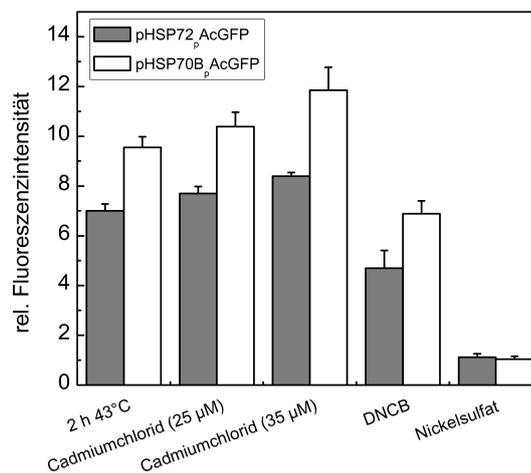
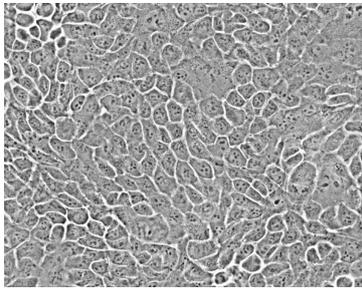
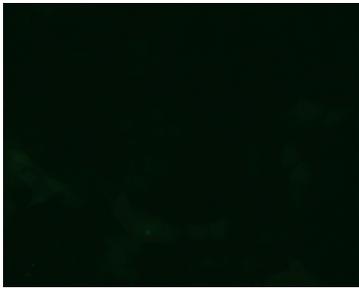
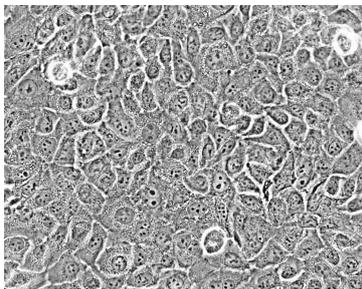
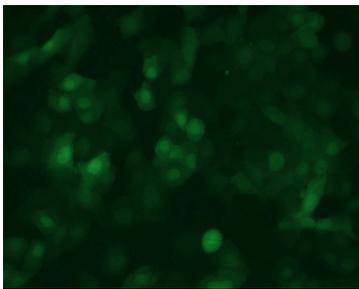
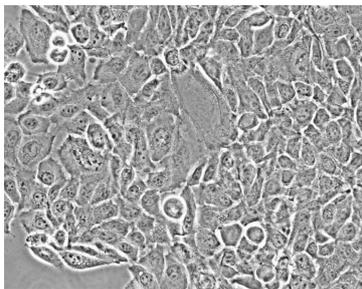
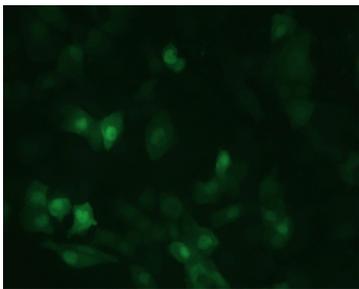
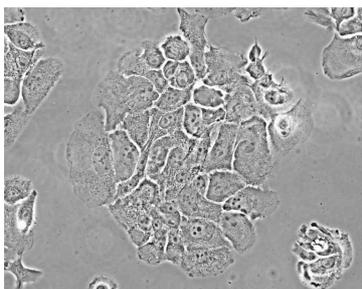
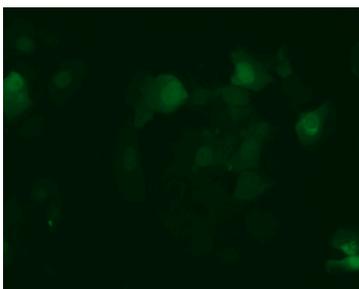
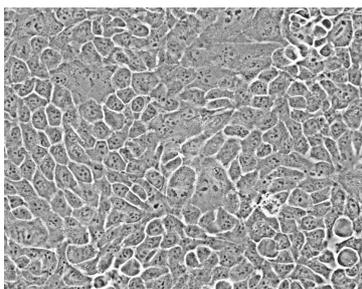
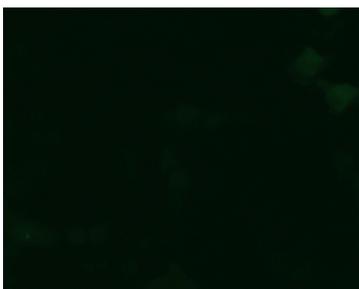


Abbildung 5.2: Vergleich der Induzierbarkeit der Sensorzelllinien pHSP72_pAcGFP1-1 und pHSP70B_pAcGFP1-1 nach Wärmebehandlung (43 °C; t=2 h) sowie Inkubation mit 25 und 35 µM CdCl₂, 10 µM DNCB und 400 µM NiSO₄ (t=6 h), bezogen auf die entsprechenden Werte unbehandelter Kontrollzellen festgesetzt als 1 [means±SE; n=3].

Grundsätzlich jedoch reagieren beide Sensorzelllinien gleichermaßen, wenn auch mit unterschiedlicher Intensität. Dies spricht für unterschiedliche Wirkungsmechanismen der Substanzen, die in ihrer Komplexität durch die erzeugten Sensorzelllinien nicht abgedeckt werden können. Abschließend veranschaulicht Tabelle 5.1 beispielhaft, dass durch Etablierung der Sensorzelllinie pHSP70B_pAcGFP1-1 ein Konzept zur Untersuchung der frühzeitigen Hautreizung realisiert wurde bevor sichtbare morphologische Zellschäden zu beobachten sind. Gezeigt sind mikroskopische Aufnahmen im Phasenkontrast vor und nach Behandlung mit den ausgewählten Chemikalien sowie der Positivkontrolle durch Wärmebehandlung und die entsprechenden Fluoreszenzaufnahmen zur quantitativen Bestimmung des Grads der Zellstressbelastung.

Tabelle 5.1: Mikroskopische Aufnahmen der Sensorzelllinie pHSP70B_pAcGFP1-1 nach Behandlung mit unterschiedlichen chemischen Stimuli und Wärmebehandlung

	Phasenkontrast	Fluoreszenz
Kontrolle		
2 h 43 °C		
6 h 25 µM CdCl ₂		
6 h 10 µM DNCB		
6 h 400 µM NiSO ₄		

5.2 Beurteilung von Pflanzenextrakten als Bestandteil kosmetischer Produkte

Im Mittelpunkt standen bei der Auswahl der Pflanzenextrakte solche mit zytotoxischen, reizenden, eventuell auch entzündungsfördernden und allergieauslösenden Effekten, die möglicherweise bereits Anwendung in entsprechenden Präparaten finden.

Die Bergarnika (*Arnica montana*) wurde bereits seit dem 16. Jahrhundert volksmedizinisch angewendet. Ihre Einführung in die Schulmedizin erfolgte zwei Jahrhunderte später. Seit der Jahrtausendwende wurden ca. 100 Kombinationspräparate, die das Extrakt der Pflanze enthalten, gezählt [158]. Arnikablüten sind wegen ihres enormen Wirkungsspektrums eine altbewährte Arzneidroge. Die Wirkung des ethanolschen Extrakts beruht maßgeblich auf den Sesquiterpenlactonen Helenalin sowie Dihydrohelenalin und ihren Derivaten [159]. Für diese Verbindungen wurden u.a. zytotoxische, antibakterielle, antimykotische, antitumorale, antiphlogistische oder antiarthritische Wirkungen nachgewiesen [160, 161, 162]. Die Droge wirkt auf Haut und Schleimhäute reizend. Obwohl der Arnika eine allergene Wirkung nachgesagt wird, ist gleichzeitig deren entzündungshemmende Wirkung über den Transkriptionsfaktor NF- κ B bewiesen worden [163, 164].

Die Stinkende Hundskamille (*Anthemis cotula*) wird häufig mit der Echten Kamille verwechselt. Das in ersterer enthaltene Sesquiterpenlacton Antheicotulid führt äußerlich bei empfindlichen Personen zu starken Hautreizungen, Bindehautentzündungen und allergischen Reaktionen [165, 159]. Das blühende Kraut der Herbst-Sonnenbraut (*Helenium autumnale*) gilt ebenfalls als bekanntermaßen allergieauslösend, wofür eine Reihe von Sesquiterpenlactonen, z.B. Helenalin, Halshalin und Autumnolid, verantwortlich sind [159]. Weiterhin wurden die Wurzeln des Seifenkrauts (*Saponaria officinalis*) gewählt, da diese wie viele Saponindrogen haemolytisch bzw. zellmembranschädigend wirken [166]. In höheren Konzentrationen treten Reizungen auf. Die Seifenwurzel ist in der Technik und Kosmetik als Waschmittel einsetzbar [158].

Die ausgewählten Pflanzen wurden von der Pharmaplant GmbH Artern kultiviert und mit 70%igem Ethanol extrahiert. Die Extrakte wurden in DMSO gelöst (50 mg/ml). Einzelheiten zum Extraktionsverfahren und das native Droge-Extrakt-Verhältnis sind Kapitel 3.1.10 zu entnehmen.

Zunächst erfolgte die Analyse der Dosis-Wirkungs-Beziehung der Pflanzenextrakte auf das HaCaT-Zellmodell (t=24 h), um Konzentrationsbereiche möglicher zytotoxischer Effekte der Extrakte zu bestimmen und entsprechende subletale Konzentrationsbereiche für die Testung an den Sensorzelllinien zu gewinnen. Die EC₅₀-Werte betragen für die Extrakte *Arnica montana* und *Anthemis cotula* (148,0 ± 19,2) µg/ml bzw. (147,5 ± 5,7) µg/ml. Hohe Zellvitalitäten (> 80 %) wurden bei Konzentrationen bis zu 125 µg/ml bei genannten

Extrakten beobachtet. Als mittlere effektive Konzentration wurden für die Extrakte der Stammpflanzen *Helenium autumnale* und *Saponaria officinalis* ($22,7 \pm 1,2$) $\mu\text{g/ml}$ bzw. ($37,0 \pm 0,6$) $\mu\text{g/ml}$ bestimmt. In der Folge wurden 10 $\mu\text{g/ml}$ des Extrakts der *Helenium autumnale* und 20 $\mu\text{g/ml}$ des Extrakts der *Saponaria officinalis* eingesetzt.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden nun die Sensorzellen mit entsprechenden subletalen Konzentrationen der Formulierungen inkubiert und die Messung der Fluoreszenzintensität als Maß für den Grad der Zellstressbelastung quantitativ bestimmt. In Abbildung 5.3 ist die Änderung der relativen Fluoreszenzintensität nach 6-stündiger Inkubation, bezogen auf eine unbehandelte Kontrollpopulation normiert auf 1 und vergleichend zum Einfluss der Wärmebehandlung ($43\text{ }^\circ\text{C}$; $t=2\text{ h}$) als Positivkontrolle, dargestellt.

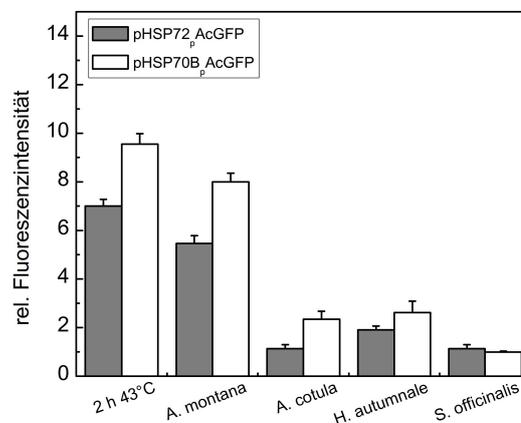
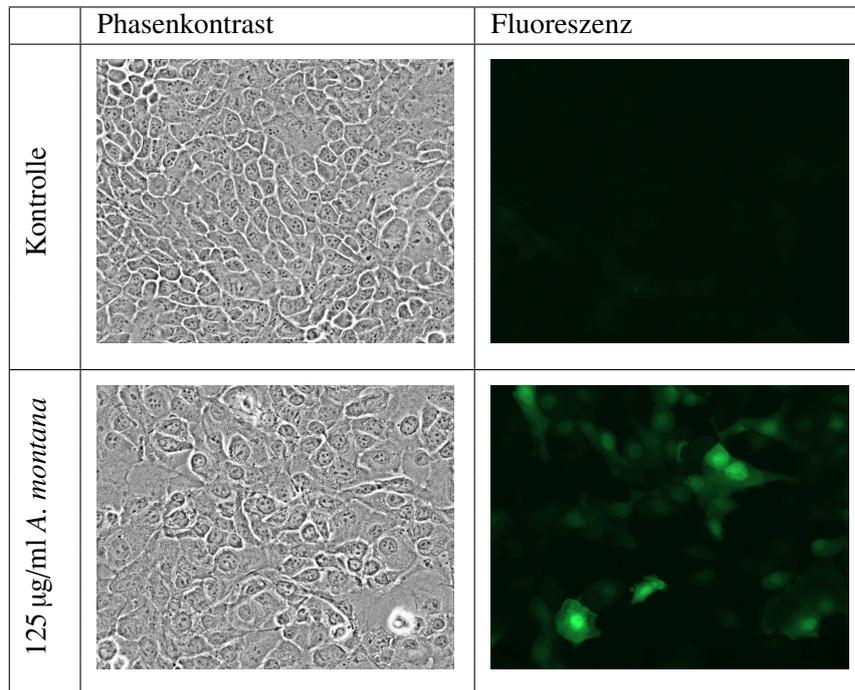


Abbildung 5.3: Vergleich der Induzierbarkeit der Sensorzelllinien pHSP72_pAcGFP1-1 und pHSP70B_pAcGFP1-1 nach Wärmebehandlung ($43\text{ }^\circ\text{C}$; $t=2\text{ h}$) sowie Inkubation mit 125 $\mu\text{g/ml}$ *A. montana* bzw. *A. cotula* sowie 10 $\mu\text{g/ml}$ *H. autumnale* und 20 $\mu\text{g/ml}$ *S. officinalis* ($t=6\text{ h}$), bezogen auf die entsprechenden Werte unbehandelter Kontrollzellen festgesetzt als 1 [means \pm SE; $n=3$].

Während nach Behandlung der Sensorzellen mit dem Extrakt der *Arnica montana* eine deutliche relative Fluoreszenzänderung von 5,5 mittels der Sensorzelllinie pHSP72_pAcGFP1-1 bzw. 8 entsprechend durch pHSP70B_pAcGFP1-1 beobachtet werden konnte, wurde die Expression von GFP durch die Extrakte der Stammpflanzen *Anthemis cotula* und *Helenium autumnale* nur leicht induziert. Erwartungsgemäß erfolgte keine Induktion des Reporterkonstrukts durch das hauptsächlich zellmembranschädigende Extrakt der *Saponaria officinalis*. Die Grundlage zur quantitativen Auswertung bildeten mikroskopische Aufnahmen im Phasenkontrast vor und nach Behandlung mit den ausgewählten Extrakten wie in Tabelle 5.2 exemplarisch für *Arnica montana* zusammengestellt.

Tabelle 5.2: Mikroskopische Aufnahmen der Sensorzelllinie pHSP70B_pAcGFP1-1 nach Behandlung mit *Arnica montana*

Zur Kontrolle der mittels Sensorzellen generierten Datensätze wurden zusätzlich Genexpressionsanalysen von HSP72 und HSP70B' nach 3, 6 und 8-stündiger Behandlung mit entsprechenden Extraktkonzentrationen durchgeführt (Tabelle 5.3).

Tabelle 5.3: Relative Genexpression von HSP72 und HSP70B' nach Extrakthandlung

Pflanzenextrakt	HSP72		HSP70B'	
	3h	6h	3h	6h
<i>A. montana</i> (125 µg/ml)	10,2 ± 1,3	39,7 ± 6,2	325,2 ± 35,1	420,1 ± 50,6
<i>A. cotula</i> (125 µg/ml)	3,8 ± 0,7	6,8 ± 1,6	22,9 ± 6,8	31,5 ± 8,4
<i>H. autumnale</i> (10 µg/ml)	1,3 ± 0,1	3,8 ± 0,4	4,5 ± 0,7	15,5 ± 1,8
<i>S. officinalis</i> (20 µg/ml)	3,8 ± 0,6	4,4 ± 1,1	2,37 ± 0,5	4,4 ± 1,1

Die Ergebnisse der qRT-PCR bestätigten die mittels Sensorzellen generierten Daten einerseits, zeigten andererseits aber auch Limitationen des Reportergenassays auf. Die nahe der Nachweisgrenze beobachtete Antwort der Sensorzellen ist auf eine nur geringfügige Induktion von HSP72 und HSP70B' zurückzuführen. Betrachtet man beispielsweise die Genexpressionsmuster der *A. cotula* wird deutlich, dass die 3- und 6- stündige Inkubation mit dem Extrakt eine signifikante 3,8- bzw. 6,8-fache Expression von HSP72 bewirkt, dies aber dennoch dem Detektionslimit der Sensorzelllinien entspricht. Auch die ebenfalls um fast eine Größenordnung gesteigerte Hochregulierung der Expression von HSP70B' (t=3 h: 22,9 ± 6,8 bzw. t=6 h: 31,5 ± 8,4) wird durch die entsprechende Sensorzelllinie

nicht abgebildet, sondern erst eine durch *A. montana* generierte 10-fache bzw. 325-fache Expression von HSP72 bzw. HSP70B' genügt, um die im Reporterkonstrukt notwendige Expression des GFP zu induzieren. Dies deutet auf einen nativen Schwellenwert des gesteigerten Expressionsspiegels von mindestens 10-fach bei HSP72 bzw. mindestens 100-fach bei HSP70B' hin.

Besonderheiten der *Arnica montana*

Bei oben beschriebenem Vitalitätstest zur Bestimmung der zytotoxischen Antwort des HaCaT-Zellmodells durch das Extrakt der *Arnica montana* wurde in bestimmten Konzentrationsbereichen ein positiver Effekt auf die Zellvitalität beobachtet. Es war mithilfe der beschriebenen Methoden Ziel einen Beitrag zur Aufklärung molekularer Wirkungsmechanismen zu leisten. Daher wurde untersucht, ob und inwieweit die HSP-Überexpression einen Einfluss auf die Zellvitalität hat.

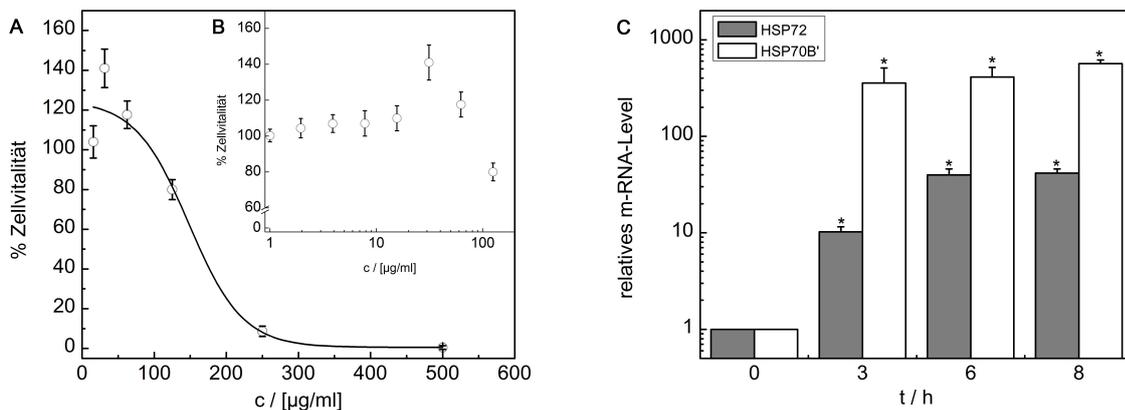


Abbildung 5.4: Einfluss von *Arnica montana* auf das HaCaT-Zellmodell. Analyse der Dosis-Wirkungs-Beziehung ausgewertet mittels MTT (A und B) sowie Bestimmung der relativen Genexpression von HSP72 und HSP70B' (C). (A) Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte nach 24-stündiger Inkubation mit dem rückgelösten Extrakt der *A. montana* in Mangelmedium. Der EC₅₀-Wert wurde durch Anpassung der vorgegebenen Dosis-Wirkungs-Funktion (Origin Lab®) an die experimentell ermittelten Daten durch nichtlineare Regressionsanalyse bestimmt [mean±SE; n=3]. (C) Die Zellen wurden 3, 6 und 8 h mit 125 µg/ml des Extraktes in Mangelmedium inkubiert und die relative Genexpression von HSP72 und HSP70B', bezogen auf die entsprechenden Werte unbehandelter Kontrollzellen festgesetzt als 1, bestimmt [mean±SE; n=3; *p<0,05].

Aufbauend auf der in Abbildung 5.4 (A) dargestellten zytotoxischen Antwort der Zellen in Abhängigkeit hoher Extraktkonzentrationen detektiert mittels MTT, wurden weiterführende Experimente mit Extraktkonzentrationen < 125 µg/ml (t=24 h) durchgeführt (Abbildung 5.4 (B)). Durch zweistufige serielle Verdünnung der Ausgangskonzentration zu 31,25 µg/ml stieg die Zellvitalität, bezogen auf eine unbehandelte Kontrolle, auf 140 % an. Bei noch geringeren Konzentrationen des Extrakts glichen sich die Werte zu denen der unbehandelten Kontrolle an. Die zunächst durchgeführten qRT-PCR-Studien nach Behandlung der Zellen mit 125 µg/ml Extrakt zeigten die inkubationszeitabhängige Regulation der HSP-Genexpressionsspiegel (Abbildung 5.4 (C)), welche in 40-facher Hochregulierung von HSP72 und 450-facher Expression von HSP70B' nach 8 h Inkubationszeit resultierte.

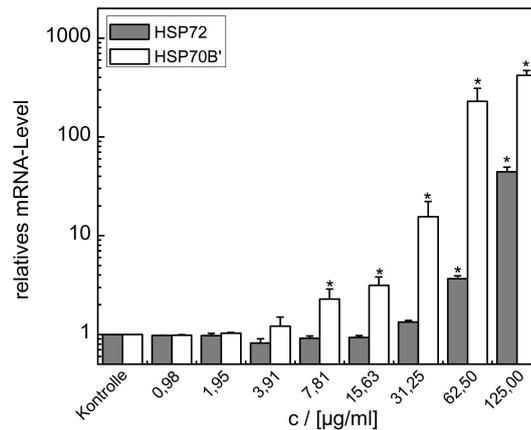


Abbildung 5.5: Einfluss vitalitätssteigernder Konzentrationen der *Arnica montana* auf die Genexpression des HaCaT-Zellmodells. Die Zellen wurden 6 h mit aufsteigenden Konzentrationen des Extrakts inkubiert und die relative Genexpression von HSP72 und HSP70B' bezogen auf die entsprechenden Werte unbehandelter Kontrollzellen festgesetzt als 1 bestimmt [mean±SE; n=3; *p<0,05].

In einem zweiten Schritt wurde die dosisabhängige Wirkung des Extraktes auf die Genexpression von HSP72 und HSP70B' untersucht. Dafür wurden die Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen, jedoch maximal mit 125 µg/ml über ein Zeitintervall von 6 h inkubiert. Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse sind in Abbildung 5.5 dargestellt. Mit steigender Konzentration des Extrakts steigt auch der Expressionsspiegel der untersuchten HSP-Proteine. Bei besonders geringen Konzentrationen bis ca. 4 µg/ml ist kein Effekt auf die Zellen, verglichen zu einer unbehandelten Kontrollpopulation, zu detektieren. Betrachtet man den Bereich zwischen ca. 15 und 60 µg/ml ist die Hochregulierung der HSPs und der damit verbundene Effekt der molekularen Chaperonfunktion der HSPs, induziert durch spezielle Inhaltsstoffe des Extrakts der *Arnica montana*, möglicherweise in einem besonders günstigen Verhältnis. Überschreitet man jedoch diesen Konzentrationsbereich, resultiert die abermals gesteigerte Konzentration des Extrakts (125 µg/ml) zwar in einer noch verstärkten HSP-Expression, gleichzeitig ist jedoch bereits ein Einfluss auf die Zellvitalität (Abbildung 5.4) zu beobachten.

Weiterhin wurde ein Vitalitätstest der kommerziell erhältlichen Reinsubstanz Helenalin durchgeführt (Abbildung 5.6). Obwohl sowohl positive als auch zytotoxische Effekte der *Arnica montana* auf das Sesquiterpenlacton zurückgeführt werden, konnten beim durchgeführten MTT-Test keine mit dem Pflanzenextrakt vergleichbaren vitalitätssteigernden Effekte beobachtet werden (Vergleich Abbildung 5.4). Es wurde ein EC₅₀-Werte von (6,2 ± 1,2) µM ermittelt. Außerdem wurde eine quantitative Bestimmung des Helenalingehaltes in eingesetztem Extrakt mittels GC/MS durch C. Bartzsch in Anlehnung an das Protokoll nach Leven und Willuhn durchgeführt [167]. Demnach waren im Extrakt 0,4 mg Helenalin pro Gramm Trockenmasse Arnika-Blüten enthalten. Im mittels DMSO rückgelöstem Extrakt (50 mg/ml) betrug die Konzentration an Helenalin 144,0 ± 26,7 µg/ml, entsprechend ca. 530 µM. In einer mittleren effektiven Konzentration von 147,5 µg/ml des in Zellkultur-

medium verdünnten und auf die Zellen eingesetzten Extrakts der *Arnica montana* waren demnach 1,6 μM Helenalin enthalten. Dies bedeutet, dass für eine simultane zytotoxische Antwort der Zellen die 3- bis 4-fache Konzentration an Reinstsubstanz Helenalin notwendig war und weitere Inhaltsstoffe wie z.B. das Helenalin-Derivat Dihydrohelenalin und Chamissonolid bzw. unterschiedliche Flavonoide eine entscheidende additive oder auch synergistische Rolle bei der Wirkung des hergestellten Extrakts *Arnica montana* spielen. Zudem zeigte die in Abbildung 5.6 dargestellte Dosis-Wirkungs-Beziehung, dass von Helenalin kein positiver Effekt auf die Zellvitalität ausgeht.

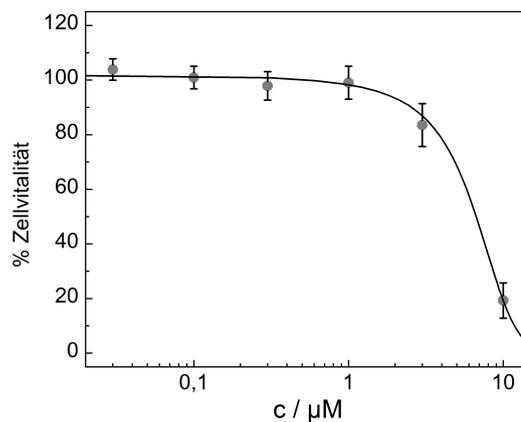


Abbildung 5.6: Einfluss des Sesquiterpenlactons Helenalin auf das HaCaT-Zellmodell. Analyse der Dosis-Wirkungs-Beziehung ausgewertet mittels MTT nach 24-stündiger Inkubation in Mangelmedium. Der EC_{50} -Werte wurde durch Anpassung der vorgegebenen Dosis-Wirkungs-Funktion (Origin Lab®) an die experimentell ermittelten Daten durch nichtlineare Regressionsanalyse bestimmt [mean \pm SE; n=3].

Zusammenfassung

An die Identifikation der Biomarker HSP72 und HSP70B' schloss sich eine umfangreichere Untersuchung des *In-vitro*-Testmodells mit einer erweiterten Auswahl von Testsubstanzen an. Die hinsichtlich ihrer chemischen Struktur und bekannten Wirkungen sehr vielfältigen Substanzen zeigten nicht nur mögliche Anwendungen des etablierten Reporterassays auf, sondern ermöglichten gleichzeitig die umfangreichere Charakterisierung der Sensorzellen.

Besonders durch die Erweiterung des Substanzspektrums um DNCB und NiSO_4 und dem Abgleich mit in der Literatur beschriebenen Wirkungsmechanismen wurde deutlich, dass sich die etablierte Sensorzelllinie besonders als repräsentativer Marker für oxidativen Stress eignet. Während sowohl CdCl_2 als auch DNCB schon bei geringen Konzentrationen die Produktion von ROS in Keratinozyten induzieren, geht von NiSO_4 keine derartige Wirkung aus. Daher konnte ein möglicher zellschädigender Effekt von NiSO_4 bei eingesetzten subletalen Konzentrationen mithilfe der Sensorzelllinien nicht nachgewiesen werden. Dies ist weiterhin unabhängig davon, ob die Substanzen prinzipiell eine toxisch-irritative

(CdCl₂) oder allergische Kontaktdermatitis (DNCB) *in vivo* hervorrufen.

Weiterhin wurden Pflanzenextrakte der *A. montana*, *A. cotula*, *H. autumnale* und *S. officinalis* untersucht. Ausgehend von den Extrakt-Konzentrationen entsprechend der EC₈₀-Werte bestimmt mittels MTT, konnte ein besonders deutliches zellschädigendes Potenzial bei Applikation von *A. montana* auf die Sensorzelllinien nachgewiesen werden. Die zytotoxischen Eigenschaften des Arnika-Extrakts sind dabei auf das Sesquiterpenlacton Helenalin zurückzuführen, dessen in Nierenkarzinomzellen [168] bewiesene Befähigung zur ROS-Generierung möglicherweise auch auf Keratinozyten übertragbar ist.

Der stetig durchgeführte Vergleich der Sensorzelllinien pHSP72_pAcGFP1-1 und pHSP70B_pAcGFP1-1 und die Kontrolle der Genexpressionsmuster der beiden Gene HSP72 und HSP70B' zeigten am Beispiel der Pflanzenextrakte außerdem auf, dass die grundsätzlich um eine Größenordnung höhere Induktion von HSP70B', die bereits in Kapitel 4.2 beschrieben wurde, grundlegend ist, um die Expression des Reportergens GFP zu induzieren. Während eine native 10-fache Induktion von HSP72 ausreicht, um eine ca. 5-fache Änderung der Fluoreszenzintensität des entsprechenden Reporterkonstrukts zu bewirken, ist eine ca. 100-fache Steigerung des mRNA-Levels von HSP70B' notwendig um gleiches mittels Sensorzelllinie pHSP70B_pAcGFP1-1 zu beobachten.

Die Untersuchungen zum Anwendungsspektrum zeigten, dass der etablierte Biosensor sich für die frühzeitige Erkennung der Stoffwechsellage des oxidativen Stresses eignet. Dadurch gelingt der Nachweis unterschiedlichster exogener Faktoren, die sowohl physikalischer (Wärmebehandlung) als auch chemischer Natur (CdCl₂, DNCB) sein können. Weiterhin ist ebenfalls der Nachweis geringster Mengen eines zellschädigenden Stoffs aus komplexen Stoffgemischen, wie dem Pflanzenextrakt *Arnica montana*, möglich. Diese Beispiele untersetzen die potenziellen Anwendungsmöglichkeiten des etablierten sensorzellbasierten *In-vitro*-Testmodells im Prescreening-Verfahren zum Nachweis zellschädigender Effekte durch Behandlung mit Substanzen subletaler Konzentrationsbereiche und kurzen Inkubationszeiten sowohl zur Risikobewertung von Chemikalien als auch der Beurteilung von Pflanzenextrakten für den Einsatz in der Kosmetik- und Pharmaindustrie.

6 Inkubatorunabhängige Zellkulturplattform zur Detektion zellschädigender Effekte

Üblicherweise erfolgt die Kultur der Säugerzellen in einem bestimmten nährstoffhaltigen Medium in Zellkulturflaschen oder Wellplatten, plaziert in einem standardisierten CO₂-Inkubator. Der Inkubator sorgt dabei für die notwendigen Wachstumsbedingungen der Zellen, indem er Sterilität, eine stabile Temperatur, einen konstanten pH-Wert und eine hohe Luftfeuchtigkeit zum Erhalt des osmotischen Drucks gewährleistet. Die Standardzellkulturpraxis ist eine anerkannte und verlässliche Methode, die in der Mehrheit der zellbasierten Experimente Anwendung findet. Dennoch ist diese Vorgehensweise aufgrund der räumlichen Trennung von Analysegeräten und Inkubator stark limitierend, sollen dynamische Prozesse der Zellen untersucht werden [70].

Auf dem Forschungsgebiet der Biomikrosystemtechnik konnten neue Strategien und Lösungsansätze hervorgebracht werden, die eine komfortable Echtzeitanalyse durch Weiterentwicklung von speziell konzipierten Zellkulturmedien und Puffern sowie der Adaptation von miniaturisierten Heizelementen und Spritzenpumpen an konventionelle Laborausstattungen ermöglichen. Die Schaffung optimaler Zellkulturparameter in miniaturisierten und adaptierten Systemen zur Gewährleistung vergleichbarer Proliferationskinetiken ist grundsätzlich nicht allgemeingültig und für den jeweiligen Zelltyp in Zusammenhang mit der Kultursubstratwahl und der vorgesehenen Detektionsmethode zu etablieren [72]. Daher wurde in diesem Teil der Arbeit zunächst eine inkubatorunabhängige Zellkulturplattform unter Berücksichtigung der folgenden Anforderungen geschaffen und validiert:

- Sterilität und Stabilität des Systems (pH, Temperatur)
- Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Abtransport von Stoffwechselprodukten
- Minimaler Substanz- und Mediumsverbrauch
- Minimaler Scherstress im Kultursubstrat
- Weitestgehende Automatisierung
- Kontinuierliche Überwachung der Sensorzelllinie

Zielführend sollte hierbei die Justierung einfließender, physikalischer Parameter und die Kombination mit den Anforderungen an eine *Good Laboratory Practice* sein, sodass eine uneingeschränkte Zellkultivierung und eine leistungsfähige Detektion der integrierten biosensorischen Zelllinie erfolgen kann.

6.1 Aufbau 1 der Zellkulturplattform

Zur Etablierung einer, den oben genannten Anforderungen entsprechenden Zellkulturperipherie wurde unter Einsatz von μ Slides^{0,4}Luer der in Abbildung 6.1 dargestellte Laboraufbau realisiert. Das System besteht aus einem in die Chiphalterung integrierbaren Heizelement und einer über Ventile gesteuerten Kombination zweier Pumpkreisläufe, adaptiert an das vorhandene motorisierte Mikroskop als Detektionseinheit. Alle Komponenten des Aufbaus wurden so gewählt, dass sie entweder durch Autoklavieren oder Spülen mit entsprechenden Lösungsmitteln sterilisiert werden können oder bereits steril verpackt vom Hersteller als Einwegmaterial geliefert werden.

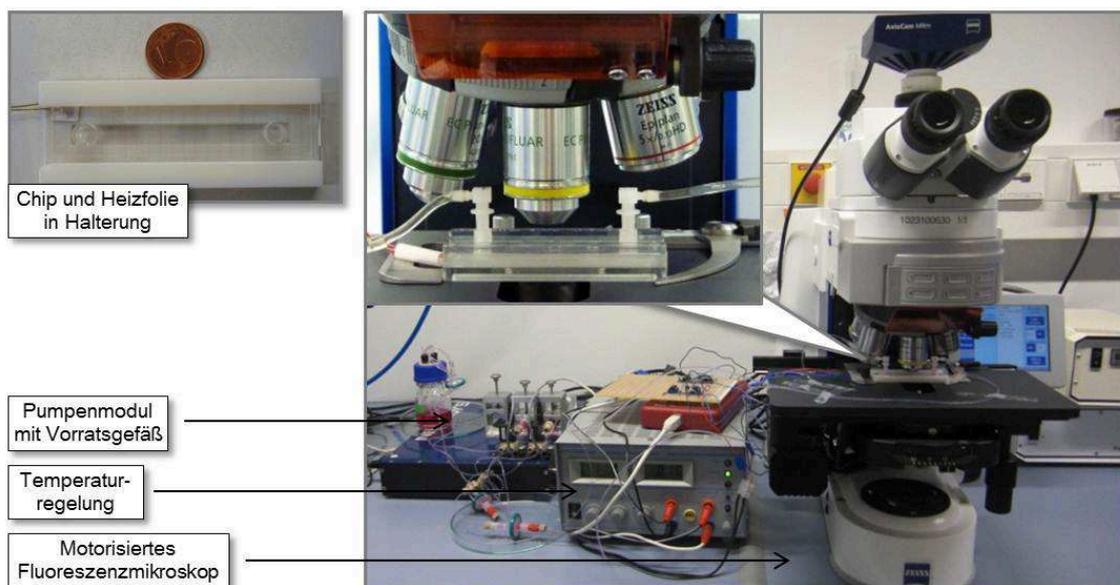


Abbildung 6.1: Laboraufbau 1 zur kontinuierlichen Beobachtung der Zellkultivierung in μ Slides^{0,4}Luer unter Verwendung eines spritzenpumpenbasierten Durchflusssystems mit unabhängigem Medium, einer transparenten Heizfolie und einer Chiphalterung zur Positionierung auf dem motorisierten Fluoreszenzmikroskop Axio Imager M2 (Carl Zeiss).

Im Zentrum des Aufbaus steht das kommerziell erhältliche Chipsystem, welches über rechtwinklige Luer-Konnektoren an die Schläuche der Peripherie angeschlossen wurde. Zum zusätzlichen Schutz vor Kontaminationen wurden vor und nach dem Chipsystem Sterilfilter angebracht. Die standardmäßig durch einen Inkubator realisierten Wachstumsbedingungen von 37 °C bei Konstanthaltung des pH-Werts wurde im vorliegenden System durch Verwendung eines Heizelements einerseits und unabhängigem Mediums andererseits

realisiert. Details des Heizelements und dessen notwendige Anpassungen sind in Kapitel 3.2.14 beschrieben. Abbildung 6.1 zeigt den Chip mit Heizelement und Halterung sowie die Temperaturregelung. In der standardisierten Zellkultur wird der pH-Wert des Mediums über ein Bicarbonat-Puffersystem und einen erhöhten CO₂-Gehalt (5-10 %) in der Inkubatoratmosphäre geregelt. Der atmosphärische CO₂-Gehalt außerhalb des Inkubators allerdings beträgt nur ca. 0,03 %, wodurch das Bicarbonat-Puffersystem innerhalb kürzester Zeit aus dem Gleichgewicht gerät und das pH-Optimum von 7,2-7,6 hin in den basischen Bereich überschritten wird [169]. Zunächst wurde getestet, ob eine Stabilisierung des pH-Werts mit Hilfe von 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) als zusätzliche Puffersubstanz im Medium erreicht werden kann. In den entsprechenden Versuchen zeigte sich allerdings, dass diese Maßnahme nur verhältnismäßig kurzzeitig (ca. 20 h) dem Problem der pH-Wertverschiebung entgegentritt und so eine Langzeitkultivierung über mehrere Tage nicht ermöglicht werden kann. In einem zweiten Schritt wurde das deutlich kostenintensivere CO₂-unabhängige Medium (Gibco) getestet, welches laut Herstellerangaben einen physiologischen pH-Wert unter atmosphärischen Bedingungen für mindestens 72 h gewährleistet [170]. In statischen Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die HaCaT-Zellen ohne Einschränkung ihrer Proliferationsgeschwindigkeit in diesem Medium kultiviert werden können.

Die Versorgung der Zellen mit Nährmedium und der gleichzeitige Abtransport von Stoffwechselprodukten wurde durch Verwendung zweier Spritzenpumpen in einem Recyclingkreislauf gemäß Abbildung 6.2 realisiert. Die durchgezogenen Pfeile stellen den Fluss zur Versorgung der Zellen dar. Die gestrichelten Pfeile zeigen den Weg des recycelten Mediums. Durch Schalten der 3-Wege-Ventile in angegebener Pfeilrichtung ist eine Umkehrung der Flussrichtung zur kontinuierlichen Versorgung der Zellen im μ Slides^{0,4}Luer möglich. Hintergrund dieser Bauweise ist die gegebene Anforderung der ausreichenden Versorgung der Zellen bei gleichzeitig minimalem Mediumsverbrauch. Geht man davon aus, dass in einer Zellkulturflasche mit einer Wachstumsfläche von 25 cm² gewöhnlich 7 ml Medium für 48 h Kultur eingesetzt werden, errechnet sich unter gegebener Wachstumsfläche in Ibidi-Slides ein Verbrauch von 700 μ l für den gleichen Zeitraum. Um dieses Volumen zu fördern und die Zellen gleichermaßen zu versorgen, wäre daher eine minimale Flussrate von ca. 0,2 μ l/min notwendig. Damit jedoch eine pulsationsfreie Förderung und damit eine minimale Scherbelastung der Zellen gewährleistet werden kann, sind die zur Verfügung stehenden Spritzenpumpen nach Herstellerangaben mit einer Flussrate von 10 μ l/min zu betreiben. Dies wiederum würde für ein 2-tägiges Experiment einen Verbrauch von ca. 30 ml Zellkulturmedium bedeuten. Da die Nährstoffe des Mediums aufgrund dessen kurzer Verweildauer im Chipsystem nicht vollständig verbraucht werden, wurde daher ein in sich geschlossenes Recyclingsystem aufgebaut, welches mit ca. 15

ml komplett (Kolben der Spritzenpumpen, Schlauchverbindungen und Vorratsgefäß mit Druckausgleich) befüllt wird und eine sterile Kultur über 3-5 Tage gewährt.

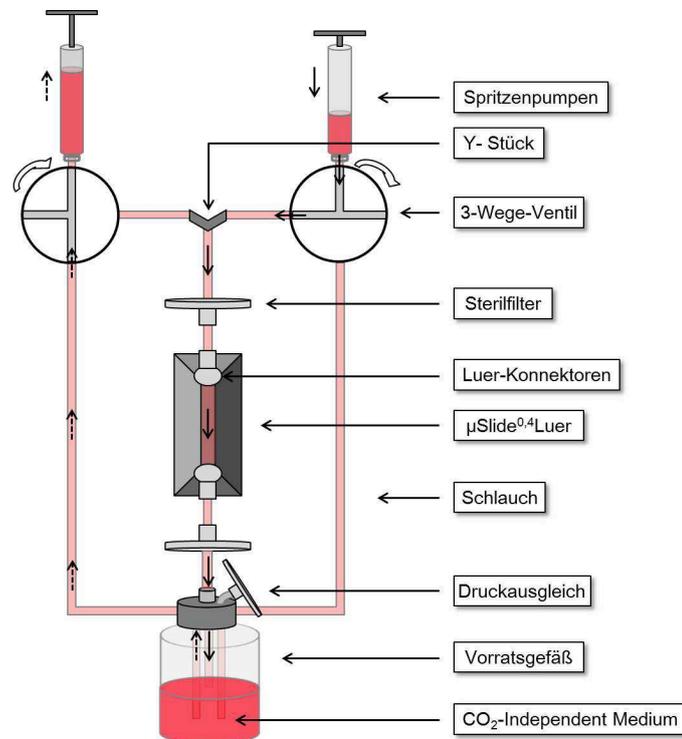


Abbildung 6.2: Schematische Darstellung des Pumpkonzepts der Durchflusskultivierung in µSlides^{0,4}Luer (Ibidi®) in einem Recyclingkreislauf zur Minimierung des Mediumverbrauchs mittels Spritzenpumpen (Aufbau 1). Die durchgezogenen Pfeile verdeutlichen den Fluss des Versorgungsmediums. Die gestrichelten Pfeile zeigen den Fluss des recycelten Mediums. Durch Schalten der 3-Wege-Ventile in angegebener Pfeilrichtung ist eine Umkehrung der Flussrichtung zur kontinuierlichen Versorgung der Zellen im µSlides^{0,4}Luer möglich.

Der Laboraufbau wurde, einschließlich Axio Imager M2, Pumpenmodul und Temperaturregelung an einen mit entsprechender Software ausgestatteten PC angeschlossen. Eine Echtzeitanalyse war daher vollständig automatisiert möglich.

6.2 Kontinuierliche Beobachtung der Zellproliferation

Zur Bestätigung der Funktionsweise der Zellkulturplattform wurde untersucht, ob mithilfe des experimentellen Aufbaus 1 optimale Zellkulturbedingungen vorliegen und verglichen zu den Methoden der Standardzellkultur identische Wachstumsraten erzielt werden können. Dafür wurden Zellen parallel in einer definierten Konzentration in einen µSlides^{0,4}Luer und eine Zellkulturflasche ausgesät. Über einen 3-tägigen Zeitraum wurden von je 9 zufällig ausgewählten Bereichen beider Zellkultursubstrate mikroskopische Aufnahmen alle 24 h zur Erstellung von Wachstumskurven mittels Zellzählung getätigt. Exemplarisch ist ein Set dieser phasenkontrastmikroskopischen Bilder in Abbildung 6.3 gezeigt. Sowohl für die Kultur unter normalen Bedingungen in einer Zellkulturflasche (links) als auch die der in-

kubatorunabhängigen Umgebung in μ Slides^{0,4}Luer (rechts) konnte ein Proliferationsfaktor von ca. 1,9 innerhalb von 24 h bestimmt werden.

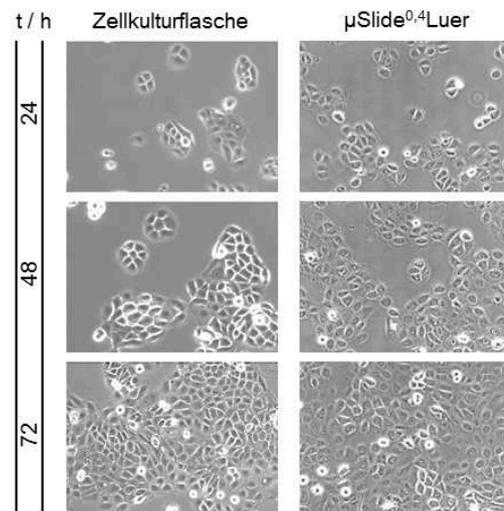


Abbildung 6.3: Vergleich des Wachstumsverhaltens von HaCaT-Zellen unter normalen Kulturbedingungen in einer Zellkulturflasche (links) und der inkubatorunabhängigen Umgebung der Zellkulturplattform (Aufbau 1) in μ Slides^{0,4}Luer (rechts) nach 24, 48 und 72 h (Vergrößerung 100x).

Dieses Ergebnis bildete die Grundlage für weitere Experimente, um eine verlässliche, hochwertige und kontinuierliche fluoreszenzoptische Detektion der Sensorzelllinie in CO₂-unabhängiger Umgebung zu realisieren.

6.3 Integration der Sensorzelllinie pHSP72_pAcGFP1-1

Zur kontinuierlichen Überwachung der zellschädigenden Wirkung toxischer Substanzen wurde nun die etablierte Sensorzelllinie pHSP72_pAcGFP1-1 in Aufbau 1 integriert. Die zelluläre Reaktion des Biosensors auf CdCl₂ wurde untersucht und mit den erzielten Ergebnissen mittels konventioneller Zellkulturpraktiken verglichen.

Die Sensorzellen wurden gemäß Kapitel 3.2.14 vorbereitet und der zeitliche Verlauf der stressinduzierten GFP-Expression mittels Axio Imager M2 kontinuierlich verfolgt. Eine repräsentative Reihe mikroskopischer Aufnahmen ist in Abbildung 6.4 gezeigt. Die Zellen wurden 6 h mit 35 μ M CdCl₂ behandelt und bis zu 24 h nach Toxinzugabe beobachtet. Das Maximum der GFP-Expression ist nach ca. 22 h erreicht. Dieser Verzug ist auf die benötigte Zeit für Transkription, Translation, Reifung und Akkumulation des Reporterproteins in den Sensorzellen zurückzuführen.

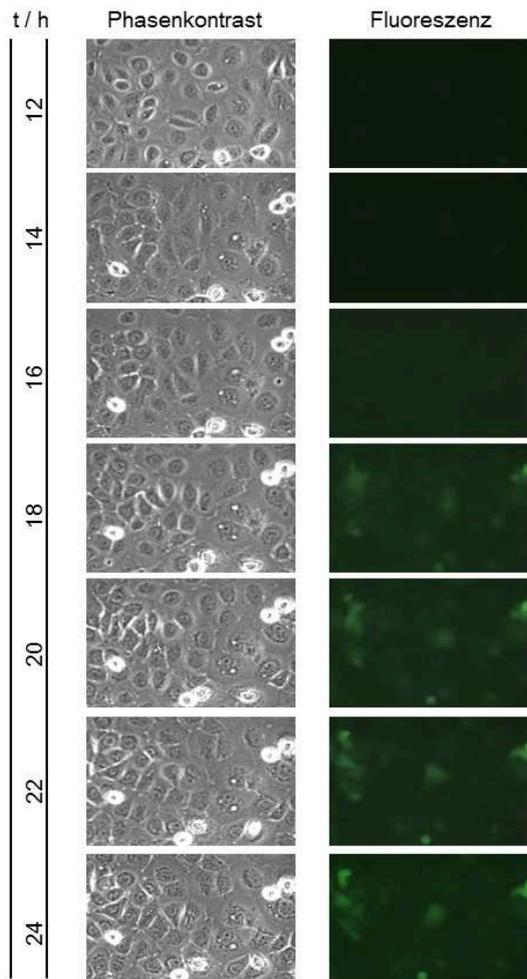


Abbildung 6.4: Phasenkontrast- (links) und fluoreszenzmikroskopische (rechts) Aufnahmen des zeitlichen Verlaufs der GFP-Expression in Sensorzellen (pHSP72_pAcGFP1-1) 12-24 h nach Inkubation mit 35 μM CdCl₂-Konzentrationen in $\mu\text{Slides}^{0,4}$ Luer.

Weiterhin ist in Abbildung 6.5 das Reaktionsprofil der Sensorzellen nach 6-stündiger Inkubation mit 0, 15, 25 und 35 μM CdCl₂ in $\mu\text{Slides}^{0,4}$ Luer dargestellt. Verglichen zu dem konzentrationsabhängigen Profil, erstellt unter normalen Zellkulturbedingungen (Abbildung 4.5 (A), s.S. 58), konnte sowohl eine vergleichbare zelluläre Antwort für unterschiedliche CdCl₂-Konzentrationen (relative Fluoreszenzintensität) als auch eine gleichbleibende basale Fluoreszenzintensität der unbehandelten Kontrolle detektiert werden. Letzteres bestätigte die geschaffenen optimalen, aber inkubatorunabhängigen Wachstumsbedingungen auf der Zellkulturplattform. Erwartungsgemäß stellte sich die Fluoreszenzdetektion im Chipsystem als etwas schwieriger heraus, da höhere Eigenfluoreszenzen des $\mu\text{Slides}^{0,4}$ Luer in Kombination mit dem Heizelement, trotz Verwendung eines Interferenzfilters, die Detektion der Sensorzellen erschweren. Die geringeren relativen Fluoreszenzintensitäten dargestellt in Abbildung 6.5 sind daher vielmehr ein Resultat der durchgeführten Hintergrundkorrektur als eine geringere Sensitivität des in die mikrofluidische Plattform integrierten Biosensors.

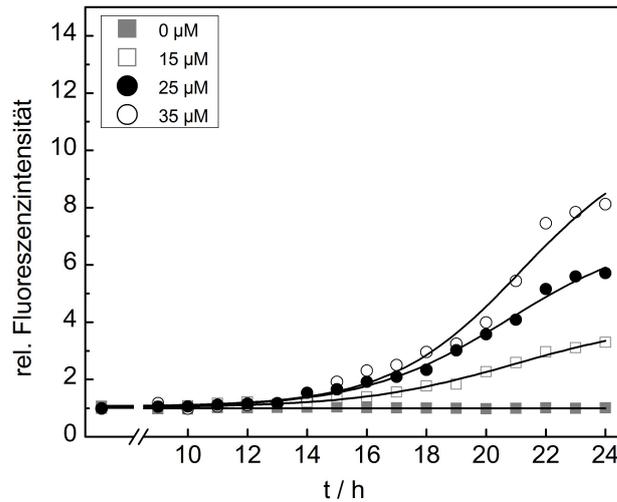


Abbildung 6.5: Quantitative Auswertung des zeitlichen Verlaufs der GFP-Expression in Sensorzellen (pHSP72_pAcGFP1-1) nach 6-stündiger Inkubation mit 0, 15, 25 und 35 μM CdCl₂ in $\mu\text{Slides}^{0.4}\text{Luer}$ (10-24 h nach Start der Inkubationszeit).

Zusammenfassung

Es wurde unter Einsatz kommerziell erhältlicher Slides eine mikrofluidische Zellkulturplattform (Aufbau 1) geschaffen, die die verlässliche und kontinuierliche Kultivierung des HaCaT-Zellmodells in CO₂-unabhängiger Umgebung realisiert. Alle an eine solche Plattform gestellten Anforderungen, wie Sterilität, Kontinuität, weitestgehende Automatisierung und die Schaffung optimaler Wachstumsbedingungen für humane Zelllinien konnten umgesetzt werden. Dies spiegelt neben der mikroskopischen Dokumentation des Zellverhaltens über 72 h auch der in einer Zellkulturflasche ermittelte und mit der inkubatorunabhängigen Kultivierung in $\mu\text{Slides}^{0.4}\text{Luer}$ übereinstimmende Proliferationsfaktor von 1,9 innerhalb von 24 h wider.

Weiterhin erfolgte die Integration der Sensorzelllinie in die mikrofluidische Plattform und die zeitaufgelöste fluoreszenzoptische Detektion toxisch-irritativer Effekte mittels Axio Imager M2. Die Ergebnisse bzw. der geführte Machbarkeitsnachweis zur inkubatorunabhängigen Kultivierung zeigen, dass unter Ausschöpfung des Potenzials mikrosystemtechnischer Methoden die Leistungsfähigkeit von Biosensoren durch Eröffnung kontinuierlicher Detektionsmethoden noch verstärkt werden kann.

7 Kombination fluoreszenzoptischer und impedimetrischer Analysen

Die Verwendung von Reporterzelllinien innerhalb eines biosensorischen Detektionsverfahrens ermöglicht die Beschreibung der physiologischen Wirkung von Chemikalien auf intrazelluläre Signalkaskaden bei Einwirkung subletaler Substanzkonzentrationen. Grundvoraussetzung für die Funktionalität des Reportergenassays ist dabei die Aufrechterhaltung der Zellphysiologie, einschließlich einer ungehemmten Proteinbiosynthese zur Expression des Reportergens GFP. Die so beobachteten zellschädigenden Effekte ermöglichen eine Regeneration und das Überleben der Zellen. Erst durch eine wiederholte Applikation der entsprechenden Substanz tritt eine irreversible, zellschädigende Wirkung auf (subakute Toxizität). Werden jedoch die Grenzwerte einer akuten Toxizität bei Erstapplikation überschritten, sind die für einen Reportergenassay notwendigen Bedingungen nicht mehr gegeben und eine quantitative Beschreibung der zellschädigenden Effekte daher unmöglich.

Durch Kombination der fluoreszenzoptischen Sensorzelllinie mit einem zweiten, von intrazellulären Prozessen unabhängigen Detektionsverfahren könnte eine komplexere Beschreibung der, infolge der Einwirkung einer zellschädigenden Substanz, auftretenden Effekte möglich sein. Neben der Messung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit vom Grad der Zellstressbelastung ist mithilfe der optischen Detektionseinheit die unerlässliche mikroskopische Kontrolle der Zellkultur möglich. Qualitative Aussagen zur Zelldichte, Zelladhäsion und mögliche Kontaminationen sowie der Zellmorphologie können getroffen werden. Das auf den Grundlagen der Impedanzspektroskopie basierende Verfahren ECIS ermöglicht jedoch die passive quantitative Beschreibung morphologischer Änderungen des Zellkörpers und spiegelt die Zellantwort bis zur vollständigen Permeabilisierung bzw. dem Ablösen vom Kultursubstrat wider [55, 171]. Das beschriebene Konzept der multiplen Parametererfassung durch Kombination von optischen und impedimetrischen Analysen ist in Abbildung 7.1 schematisiert.

Es wurde erstmalig die Kombination von optischen und impedimetrischen Detektionsverfahren am HaCaT-Zellmodell angestrebt, um eine umfassende quantitative Charakterisierung von Veränderungen des Zellmetabolismus und der Zellmorphologie als Antwort auf eine schädigende Substanz zu ermöglichen.

Weiterhin münden diese Arbeiten in die Entwicklung eines *Micro-total analysis system* (μ TAS), welches simultan sowohl ein optisches als auch impedimetrisches *Readout* realisiert. Durch Registrierung verschiedener Parameter ist eine detaillierte Diskriminierung zwischen konkurrierenden stress- und wachstumsbedingten Effekten möglich, und damit ein völlig neuer Ansatz als Alternative für Hautreizungstests in der Kosmetik- und Pharmaindustrie gegeben.

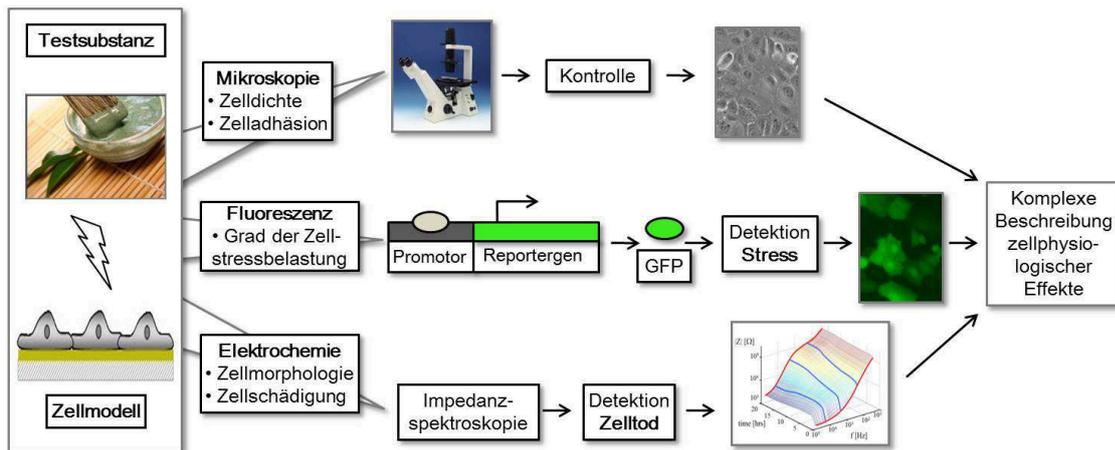


Abbildung 7.1: Schematische Darstellung der Parametererfassung zur komplexen Beschreibung zellphysiologischer Effekte durch Kombination von optischen und impedimetrischen Analysen, einschließlich der mikroskopischen Kontrolle des Zellwachstums, der Detektion der stressinduzierten GFP-Expression und der quantitativen Beschreibung der Zellmorphologie mittels Impedanzspektroskopie.

7.1 Impedimetrische Charakterisierung toxischer Effekte

Zum Nachweis des angestrebten Informationsgewinns durch Kombination des optischen und elektrochemischen Detektionsverfahrens wurde die zytotoxische Antwort der Sensorzellen impedimetrisch ($0\text{--}100\ \mu\text{M CdCl}_2$) durch die Kooperationspartner an der Universität Regensburg analysiert und anschließend im Vergleich zur fluoreszenzbasierten Detektion des Reporters GFP diskutiert.

Ausgehend von einer vollständig mit Sensorzellen (pHSP72_pAcGFP1-1) bewachsenen Elektrode und dem dabei eingestellten Gleichgewichtswert der elektrischen Impedanz erfolgte die Messung der normalisierten Impedanz $|Z|$ bei einer Abtastfrequenz von 40 kHz. Die Reaktion der Sensorzellen wurde kontinuierlich während der Pre-Äquilibration, der Beanspruchung durch CdCl_2 ($t=6\ \text{h}$), sowie der sich anschließenden Erholungsphase unter normalen Kulturbedingungen verfolgt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7.2 dargestellt.

Nach Inkubation der Sensorzellen mit 5 und $15\ \mu\text{M CdCl}_2$ entsprach der zeitliche Verlauf der normalisierten Impedanz in etwa dem der unbehandelten Kontrolle, was auf keinerlei Reaktion der Zellen hindeutete. Wurden die Sensorzellen mit höheren Konzentra-

tionen von 25 und 35 μM CdCl_2 behandelt, konnte ein marginaler Anstieg der Impedanz verzeichnet werden. Erst bei Konzentrationen von 45, 60 und 100 μM CdCl_2 jedoch reagierten die Sensorzellen mit einer deutlichen und konzentrationsabhängigen zellulären Antwort. Unmittelbar nach Toxinzugabe oberhalb einer bestimmten Grenzkonzentration überschritt der Impedanzverlauf ein kurzzeitiges Maximum und fiel im Anschluss in konzentrationsabhängiger Weise. Bei einer Konzentration von 45 μM CdCl_2 konnten die im Reporterassay beobachteten morphologischen Änderungen zwar detektiert werden, eine deutliche morphologische Schädigung sowie die Permeabilisierung und das vollständige Abrunden bzw. die Lyse der Zellen hingegen, wurden erst durch die Applikation der beiden höchsten Konzentrationen quantitativ detektiert. Der Impedanzabfall, ausgelöst durch 60 μM CdCl_2 , verlief dabei etwas langsamer als bei 100 μM und näherte sich den Impedanzwerten einer zellfreien Elektrode erst nach 21 h. Die Inkubation mit 100 μM CdCl_2 beeinflusste die Zellen allerdings so stark, dass der Austausch des Mediums nach 6 h selbst die restlichen Zellen von der Elektrodenoberfläche abspülte. Der geringfügige Anstieg der Impedanz nach 6-stündigem Messverlauf ist durch den Mediumswechsel von CdCl_2 -haltigem auf CdCl_2 -freies Medium zurückzuführen.

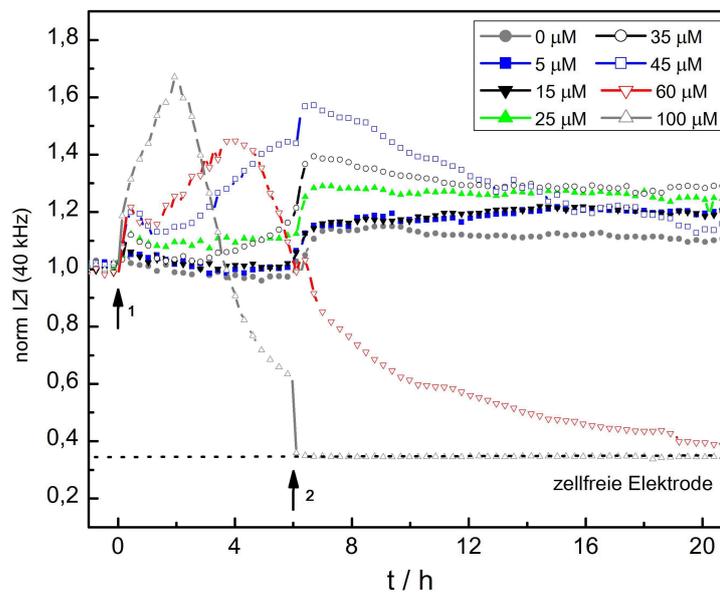


Abbildung 7.2: Reaktion der Sensorzellen analysiert mittels ECIS. Zeitlicher Verlauf der normalisierten Impedanz $|Z|$ bei einer Abtastfrequenz von 40 kHz vor und nach Zugabe von CdCl_2 (Pfeil 1). Nach Inkubation mit CdCl_2 -haltigem Medium ($t=6$ h), wurden die Zellen gespült und mit frischem Medium weiterkultiviert (Pfeil 2). Die Impedanz wurde entsprechend dem letzten Wert vor Zugabe des Toxins normalisiert.

Der direkte Vergleich der labelfreien impedimetrischen Daten in Abbildung 7.2 mit den Ergebnissen des Reporterassays basierend auf HSP72 (siehe Abbildung 4.5, Seite 58), zeigte die individuellen Stärken und Limitationen der beiden Assays am Beispiel der zellschädigenden Wirkung von CdCl_2 auf. Während mittels Reporterassay der Effekt besonders geringer CdCl_2 -Konzentration nach 6-stündiger Inkubation nachgewiesen

werden konnte, erlaubt ECIS die Detektion höherer, eine akute Toxizität hervorrufende Konzentrationen des analysierten Umwelttoxins.

7.2 μ TAS als Alternative zu Hautirritationstests

Die Ergebnisse zur Kombination optischer und impedimetrischer Analysen bildeten die Grundlage und Motivation für die Entwicklung eines integrierten Chipsystems zur komplexen Analyse des reizenden bzw. zytotoxischen Potenzials einer Substanz auf humane Keratinozyten als vereinfachtes Hautmodell, eingebunden in eine inkubatorunabhängige Zellkulturplattform. Bei der Konstruktion des Chipsystems sind dessen Aufbau, eine angepasste Mischerstruktur, die Dimensionen der Zellkulturkammern und die Kombination der Detektionseinheiten kritische Faktoren, um eine kontinuierliche, zeitaufgelöste, nicht-invasive und sensitive Messung zu realisieren.

Das Design des Systems ist dabei durch eine hohe Komplexität und Überschneidung unterschiedlicher Fachgebiete gekennzeichnet, welche berücksichtigt und kombiniert werden müssen, um ein semi-automatisiertes und integriertes μ TAS unter Beachtung der *Good Laboratory Practice* zu entwickeln. Das im folgenden Kapitel erläuterte Chipsystem ist das Ergebnis vieler Optimierungsrunden, welches durch die interdisziplinäre Zusammenarbeit der Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Instrumentelle Analytik der Ernst-Abbe-Fachhochschule Jena und dem Arbeitskreis Bioanalytik und Biosensorik der Universität Regensburg entstand.

7.2.1 Design des Chipsystems

Statistisch nachgewiesene Ergebnisse von Lebendzellensensoren werden gewöhnlich durch die Untersuchung relativ hoher Zellzahlen und damit verhältnismäßig großen Zellkulturkammern erzielt. Im Gegensatz dazu ist allerdings ein minimaler Substanz- und Mediumsverbrauch zur Kosteneffektivität in Durchflusssystemen gefordert. Weiterhin müssen Einflüsse durch veränderte Dimensionen und Geometrien eines miniaturisierten Zellkultur-systems auf die Kultur- bzw. Testbedingungen und vor allem falschpositive Effekte durch Scherstress vermieden werden. Die verwendeten Flussraten sollten daher einerseits hinreichend gering gewählt werden, jedoch andererseits eine homogene und kontinuierliche Versorgung der Zellen mit Nährstoffen ermöglichen. Aus diesem Grund ist ferner eine außerordentlich günstige Mischerstrategie für unterschiedliche Flussraten notwendig. Zudem wurde die elektrochemische Detektionseinheit hinsichtlich Sensitivität und Stabilität optimiert und an die Notwendigkeiten der optischen Detektionseinheit angepasst. Dies schloss neben der Konzeption und Fertigung der Goldfilmelektroden auch die Auswahl des Trägermaterials ein.

Das in Abbildung 7.3 (A) illustrierte dreilagige Chipsystem besitzt neun Zellkulturkammern, sodass jeweils eine Dreifachbestimmung der Untersuchungssubstanz sowie eine entsprechende Positiv- und Negativkontrolle möglich ist. Die Versorgung der Zellen über eine Durchflusszelle und die Zumischung der Untersuchungssubstanzen werden mit Hilfe von Mikromischern und Schlauchrollenpumpen realisiert. Als Trägermaterial wurde Cyclo-Olefin-Copolymer (COC), aufgrund seiner sehr guten Transmissionseigenschaften im UV/Vis-Bereich, der außerordentlichen Biokompatibilität und seiner chemischen und thermischen Beständigkeit ($<150\text{ }^{\circ}\text{C}$), gewählt. Die einzelnen Lagen des Chipsystems wurden mittels Thermoplast-Spritzgießen durch die 3D-Schilling GmbH Sondershausen gefertigt.

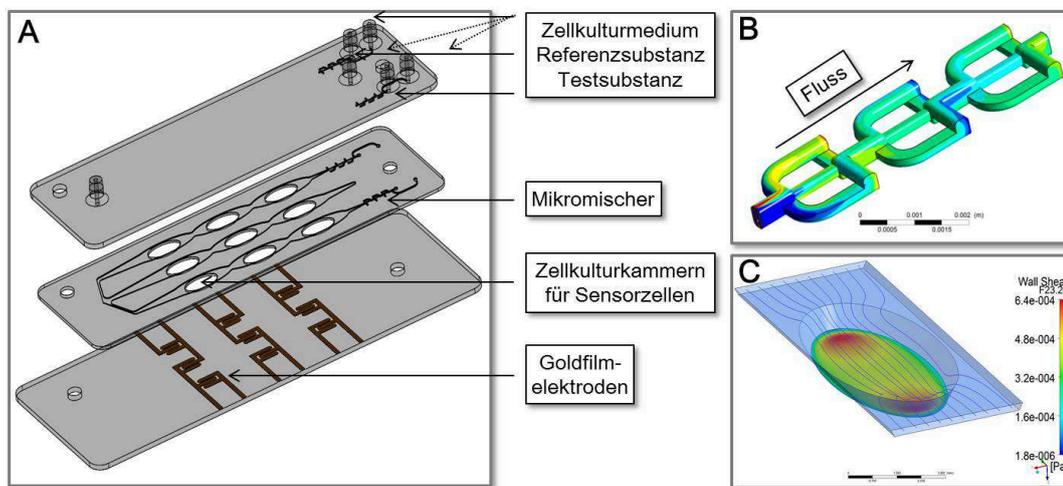


Abbildung 7.3: Design des integrierten Chipsystems (A) und Optimierung mikrostrukturierter Komponenten mittels numerischer Strömungssimulation (B und C). (A) Auf dem Chip sind neun Zellkulturkammern angeordnet, sodass jeweils eine Dreifachbestimmung der zu untersuchenden Substanz, einer Positiv- sowie einer Negativkontrolle möglich ist. Die Versorgung der Zellen über eine Durchflusszelle mit entsprechenden fluidischen Zugängen und die Zumischung der Untersuchungssubstanzen wird durch die Verwendung von Mikromischern und Schlauchrollenpumpen realisiert. Die Sensorzellen adhären auf den planaren Goldfilmelektroden am Boden einer jeden Zellkulturkammer. (B) Design des Tornado-Mischers, der durch Kombination von Teilungs-, Rotations- und Verdrillungselementen nur zwei mikrostrukturierte Lagen benötigt und bereits bei dreifach serieller Anordnung und einer Flussrate von $10\text{ }\mu\text{l}/\text{min}$ eine optimale Mischgüte (grüne Färbung) erreicht. Gezeigt ist das Flussprofil zweier unterschiedlich gefärbter Flüssigkeiten und deren Mischung. (C) Darstellung des Scherstress am Boden der Zellkulturkammern, der maßgeblich durch deren Tiefe bestimmt wird und bei einer Flussrate von $10\text{ }\mu\text{l}/\text{min}$ ca. $0,5\text{ mPa}$ beträgt.

Das Chipsystem besitzt fünf fluidische Zugänge, sodass über eine einfache Steckverbindung von Schläuchen der Anschluss an die mikrofluidische Peripherie erfolgt. Die Dichtwirkung basiert dabei auf der elastischen Rückstellkraft des Schlauchmaterials. Drei der Zugänge dienen zur Versorgung der Zellen mit Kulturmedium, während die restlichen zwei die Applikation der Test- als auch der Referenzsubstanz ermöglichen.

Um eine optimale Mischung der zu analysierenden Substanz mit dem Zellkulturmedium bei sehr geringen Flussraten zu gewährleisten wurde ein Tornado-Mischer entwickelt und charakterisiert [172]. Die fluidische Optimierung des Mischers basiert auf numerischer Strömungssimulation mittels ANSYS CFX. Durch Kombination von Teilungs-, Rotations- und Verdrillungselementen benötigt der Mischer nur zwei mikrostrukturierte Lagen und

erreicht bereits bei dreifach serieller Anordnung eine optimale Mischgüte (grüne Färbung in Abbildung 7.3 (B)).

Zum Ansammeln der in die Kanäle des Chipsystems eingespeisten Zellsuspension wurden die Zellkulturkammern als Versenkung und unter besonderer Berücksichtigung minimaler Scherstresseffekte konzipiert. Scherstress kann ebenfalls in Form eines exogenen Stimulus auf Zellen einwirken, stressaktivierte Signalkaskaden anregen und damit möglicherweise zu einer Expression des GFP durch das integrierte Stresspromotor-Reporter-Konstrukt führen [173]. Aus diesem Grund wurde die in Abbildung 7.3 (C) gezeigte Strömungssimulation durchgeführt [174, 175]. Die Scherstressrate am Boden der Zellkulturkammern ist hauptsächlich durch die Tiefe der Zellkulturreservoirs bestimmt. Die Zellen in Suspension überströmen mit geringsten Flussraten die Kavitäten und setzen sich auf den Goldfilmelektroden ab. Aus der Literatur ist bekannt, dass ein Scherstress von ca. 0,6 Pa auf die Zellen arterieller Blutgefäße wirkt [173], außerdem gelten Keratinozyten als besonders scherwiderstandsfähige Zellen [176]. Die numerische Strömungssimulation ergab, dass bei den angestrebten Flussraten (1-10 $\mu\text{l}/\text{min}$) der Scherstress im hier vorgestellten System nur 0,5 mPa beträgt und demzufolge etwa 3 Größenordnungen geringer ist.

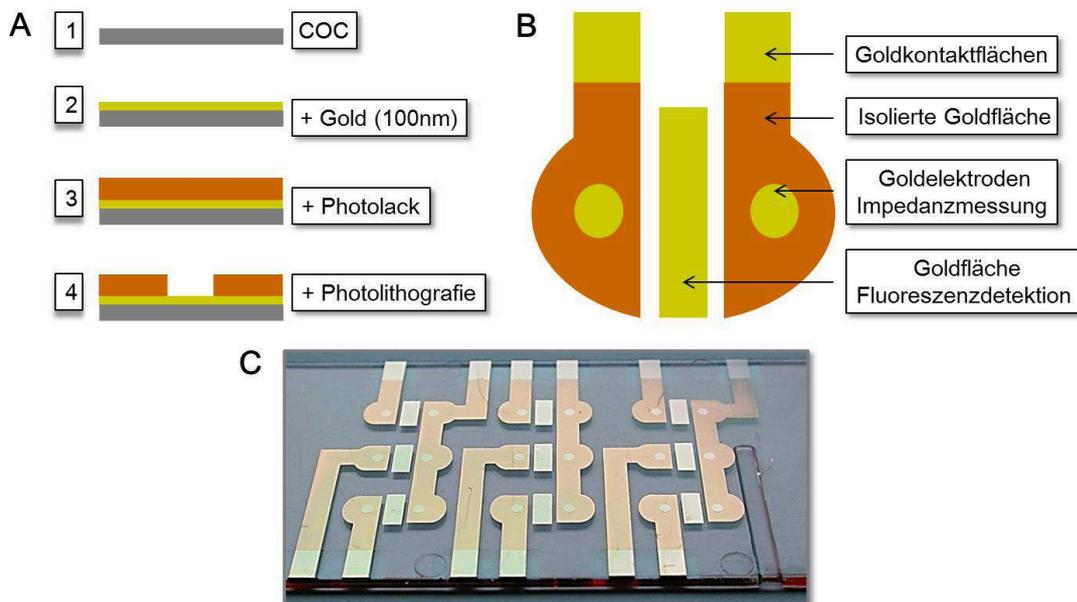


Abbildung 7.4: Elektrodenfertigung an der Universität Regensburg. Dargestellt ist das photolithografische Verfahren der Goldelektrodenfertigung (A), das Elektrodenlayout einer Zellkulturkammer im Chipsystem (B) und das vollständige Elektrodenlayout gefertigt auf der untersten Lage des Chipsystems (C). (A) Zunächst erfolgt die Metallierung des COC-Substrats (1) mit Gold durch *Sputter Coating* (2) und die anschließende Belackung der 100nm Goldschicht mittels *Spin Coating* (3). Der dadurch aufgebrachte positive Photolack ermöglicht nach Auflegen einer dem Elektrodenlayout entsprechenden Maske und Belichtung des COC-Substrats mit einem UV-Platinenbelichter das Entfernen der nicht benötigten Goldflächen durch einen Iod/Iodid-Ätzschritt (4). (B) In einem zweiten photolithographischen Schritt erfolgt erneut die Beschichtung mit Photolack. Aus dieser vollständig belackten Fläche werden nun die kreisförmigen Elektroden, die Goldkontaktflächen und eine mittige Goldfläche freigelegt. Erstere dient als aktive Elektrodenfläche, zweitere zur elektrischen Kontaktierung und letztere ist aufgrund der stark fluoreszierenden Eigenschaften des Photolacks für eine uneingeschränkte Fluoreszenzdetektion der Sensorzellen zwingend erforderlich.

Die Zellen adhäreren auf planaren Goldfilmelektroden, die auf dem Boden der dritten Chiplage mittels Photolithographie (siehe Abbildung 7.4 (A)) aufgebracht werden. Während des Prozesses der Elektrodenfertigung, der durch S. Michaelis an der Universität Regensburg durchgeführt wurde, erfolgt zunächst die Metallierung des COC-Substrats mit Gold durch *Sputter Coating* und die anschließende Belackung der 100 nm Goldschicht mittels *Spin Coating*. Der dadurch aufgebrachte positive Photolack ermöglicht nach Auflegen einer dem Elektrodenlayout entsprechenden Maske und Belichtung des COC-Substrats mit einem UV-Platinenbelichter das Entfernen der nicht benötigten Goldflächen durch einen Iod/Iodid-Ätzschritt [177].

Die mit Goldelektroden belegten Bodenplatten des Chipsystems werden nun in einem zweiten photolithographischen Schritt erneut mit Photolack beschichtet. Aus dieser vollständig belackten Fläche werden nun die kreisförmigen Elektroden, die Goldkontaktflächen und eine mittige Goldfläche freigelegt (siehe Abbildung 7.4 (B)). Erstere dient als aktive Elektrodenfläche und letztere ist aufgrund der stark fluoreszierenden Eigenschaften des Photolacks für eine uneingeschränkte Fluoreszenzdetektion der Sensorzellen zwingend erforderlich. Abbildung 7.4 (C) zeigt das Ergebnis des Elektrodenlayouts gefertigt auf der unteren Lage des Chipsystems.

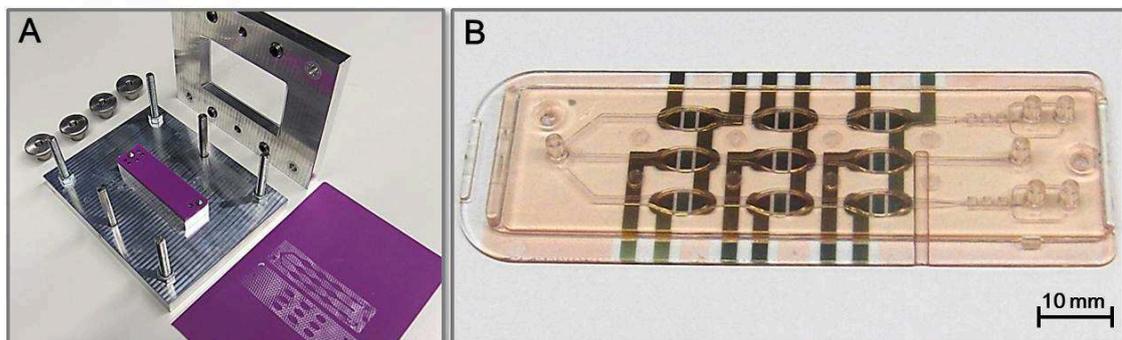


Abbildung 7.5: Vorrichtung zum Fügen der einzelnen Chiplagen mittels thermisch aktivierbarer, trägerloser Acrylatklebefolie (DigiMount, Biedermann GmbH) (A) und Ansicht des aus COC gefertigten Chipsystems (B). (A) Gezeigt ist die Fügevorrichtung zur genauen Positionierung der Chip- und Folienlagen auf Kegelstiften und Ausübung eines gleichmäßigen Anpressdrucks zur Haftverstärkung während des thermischen Aktivierungsschritts mittels integrierter Silikonmatten. (B) Ansicht des fluidisch dichten Chipsystems mit Goldfilmelektroden am Boden der Zellkulturkammern.

Das fluidisch dichte Fügen der einzelnen Chiplagen wurde mittels einer thermisch aktivierbaren, trägerlosen Niedrigtemperatur-Polyurethanklebefolie (DigiMount, Biedermann GmbH) realisiert. Die Folie ist pH-neutral, säurefrei und hat eine Dicke von ca. 50 μm . Sie wurde hinsichtlich ihrer Biokompatibilität in einem Vorversuch positiv getestet. Da die Folie bereits ab 70 °C schmilzt, ermöglicht sie bei gleichmäßigem Anpressdruck das blasenfreie Fügen mehrerer Lagen. Die exakte Chipgeometrie wurde entsprechend der technischen Zeichnungen mittels Laser aus der Folie ausgeschnitten. Außerdem wurde eine Fügevorrichtung erstellt, die die genaue Positionierung der Chip- und Folienlagen auf

Kegelstiften übereinander ermöglicht und mittels integrierten Silikonmatten einen gleichmäßigen Anpressdruck auf den Chip zur Haftungsverstärkung während des thermischen Aktivierungsschritts (30 min, 92 °C) ausübt (Abbildung 7.5 (A)) [178].

Das eigens in der Arbeitsgruppe Instrumentelle Analytik und in Kooperation mit der Universität Regensburg entwickelte Chipsystem (Abbildung 7.5 (B)) stand nun für die Integration in die inkubatorunabhängige Zellkulturplattform zur Verfügung.

7.2.2 Aspekte des integrierten Chipsystems (Aufbau 2)

Unter Berücksichtigung der in Kapitel 3.2.14 beschriebenen Sachverhalte bezüglich nachteiliger Eigenschaften von Aufbau 1 (Wärmeverteilung und Eigenfluoreszenz der transparenten Heizfolie) erfolgte die konzeptionelle Erarbeitung eines weiterentwickelten Laboraufbaus 2 zur Integration des designten Chipsystems unter Verwendung eines ITO-Slides zur Temperierung. Ziel ist dabei die inkubatorunabhängige Kultivierung der Sensorzellen und die Detektion der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit vom Grad der Zellstressbelastung. Dafür wurde ein an die Geometrien des Chips und des ITO-Slides angepasstes Positioniersystem zur Fixierung auf dem Mikroskopisch entworfen (Abbildung 7.6). Weitere wesentliche Veränderungen betreffen außerdem die fluidische Versorgung, welche aufgrund des 3-kanaligen Charakters des Chipsystems und der integrierten Mischerstrukturen zukünftig die Nutzung von Schlauchrollenpumpen ohne Recyclingkreislauf notwendig macht.

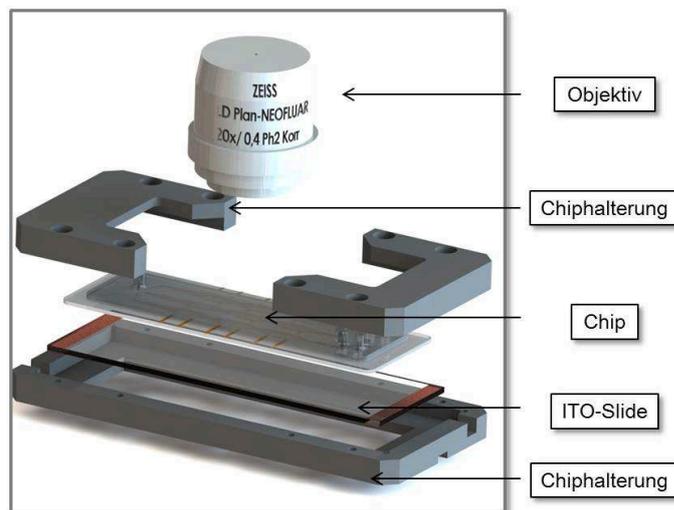


Abbildung 7.6: Einbindung des Chipsystems zur optischen Detektion mittels Chiphalterung und Einbindung des ITO-Slides zur Temperierung.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten Teilergebnisse zur Realisierung des Aufbaus 2 umgesetzt werden. Die Umstellung erfolgt dabei stufenweise, um den Ausschluss von Einflussfaktoren zu realisieren und mögliche Fehlerquellen betrachten zu können. Dies

betrifft zunächst die Leistungsfähigkeit des Chipsystems als Kultursubstrat. Daher wurde das Proliferationsverhalten im Chipsystem unter Flussbedingungen im CO₂-Inkubator untersucht. Die Zellen wurden dafür als Suspension mit einer Dichte von $3,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml eingesät. Nach erfolgter Zelladhäsion wurde das Chipsystem an die mikrofluidische Peripherie angeschlossen und das Zellwachstum in regelmäßigen Abständen dokumentiert. Das Ergebnis der erfolgreichen Zelladhäsion und Zellproliferation im etablierten Chipsystem als Kultursubstrat ist in Abbildung 7.7 zusammengefasst. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen den Ausschnitt einer Zellkulturkammer am Übergang von isolierter Goldfläche zu dem Bereich der freien Goldelektroden (Vergleich Abbildung 7.4 (B)) nach 24, 48, 72 und 120 h.

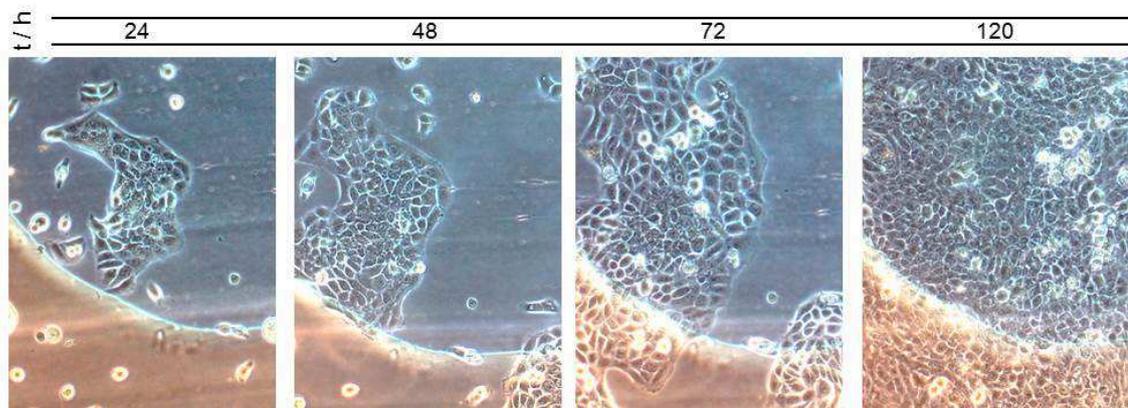


Abbildung 7.7: HaCaT-Zellen kultiviert in Zellkulturkammern des Chipsystems unter Flussbedingungen im CO₂-Inkubator nach 24, 48, 72 und 120 h.

Diese Ergebnisse bestätigten einerseits die Funktionalität des biokompatiblen Chipsystems als Kultursubstrat und verdeutlichten andererseits die ausreichende optische Transparenz des eingesetzten Fertigungsmaterials COC. Außerdem konnte die im ersten Aufbau genutzte transparente Heizfolie erfolgreich durch den ITO-Slide ersetzt werden. Messungen mit mehreren Pt-100-Elementen an unterschiedlichen Positionen des Chips bestätigten, dass das beschichtete Heizelement eine homogene Erwärmung des Chipsystems ermöglicht und diese kontinuierlich über mehrere Tage konstant gehalten werden kann.

Das konzipierte Chipsystem und die Teilergebnisse zur Integration in die mikrofluidische Zellkulturplattform bilden die Grundlage zur Weiterentwicklung, um eine inkubatorunabhängige Zellkultivierung und als Fernziel die zeitaufgelöste optische und impedimetrische Detektion der zellschädigenden Effekte simultan zu realisieren und so die Umsetzung einer innovativen *In-vitro*-Alternative zu Hautirritationstests bereitzustellen.

Zusammenfassung

Der mittels standardisierten Zellkulturbedingungen durchgeführte Vergleich des Reporterassays einerseits und des markerfreien, impedimetrischen Monitorings andererseits zeigte deren Assaycharakteristiken auf. Während der Stresspromotor-Reporter-Gen-Assay eine wesentlich sensitivere Detektion geringster CdCl_2 -Konzentrationen im Medium ermöglicht, ist eine Anwendung des Assays für Konzentrationen oberhalb der akuten Toxizitätsgrenze nicht zweckmäßig. Erst durch Kombination beider Assays erfolgt eine umfassende und ergänzende Beschreibung der zellulären Antwort über große Konzentrationsbereiche und ermöglicht so eine verlässlichere Analyse der untersuchten Substanz.

Darauf aufbauend wurde ein Chipsystem entworfen und getestet, welches eingebunden in die mikrofluidische Plattform (Aufbau 2) perspektivisch die Möglichkeit zur multiplen, zeitaufgelösten Detektion zellschädigender Effekte bietet. Verschiedene Faktoren wurden bei der Konzeption des Chipsystems berücksichtigt, die zur Entwicklung eines mittels numerischer Strömungssimulation optimierten, komplexen Systems führten. Dieses Kultursubstrat realisiert die Kultivierung eukaryotischer Zellen über längere Zeiträume, wobei falschpositive Effekte durch Scherstress ausgeschlossen werden konnten. Weiterhin ist die Zumischung der Untersuchungssubstanzen über eine integrierte Mischerstruktur und der Anschluss an die mikrofluidische Peripherie gegeben. Durch Auswahl des Fertigungsmaterials COC wurde die optische Detektion mit dem am Boden der Zellkulturkammern befindlichen Goldfilmelektroden zielführend kombiniert. Die Funktionalität des Systems als Basis für die miniaturisierte Kultivierung eukaryotischer Zellen wurde aufgezeigt und eine wesentliche Grundlage zur vollen Integration des Chipsystems in Form eines μTAS zur Kombination optischer und impedimetrischer Detektionsmethoden geleistet.

8 Diskussion

Das interdisziplinäre Gebiet der Biosensorentwicklung und deren Integration in miniaturisierte Umgebungen sind Bestandteil der vorliegenden Arbeit. Zur Entwicklung eines biosensorischen *In-vitro*-Detektionsverfahrens für toxikologische und dermatologische Anwendungen, im Wirkstoffscreening und in der Pharma- und Kosmetikindustrie wurden mehrere Beiträge geleistet, deren Verknüpfungen in Abbildung 8.1 dargestellt sind.

Um den Ansatz zur Entwicklung von alternativen *In-vitro*-Hautirritationstest zu verfolgen, wurden humane Keratinozyten als biologisches Erkennungselement eingesetzt und gentechnisch modifiziert, um die Messung der Fluoreszenzintensität eines Reporters in Abhängigkeit vom Grad der Zellstressbelastung zu erlauben. Basierend auf der Identifikation der leistungsfähigen Biomarker HSP72 und HSP70B' erfolgte die Etablierung zweier Sensorzelllinien in Kapitel 4. Neben der umfangreichen Charakterisierung des GFP-basierten Reporterassays erfolgte zudem der stetige Vergleich beider Sensorzelllinien und das Aufzeigen von Möglichkeiten zur Anwendung dieser in der Risikobewertung von Chemikalien sowie bei der Beurteilung von Pflanzenextrakten als Bestandteil kosmetischer Produkte (Kapitel 4 und 5).

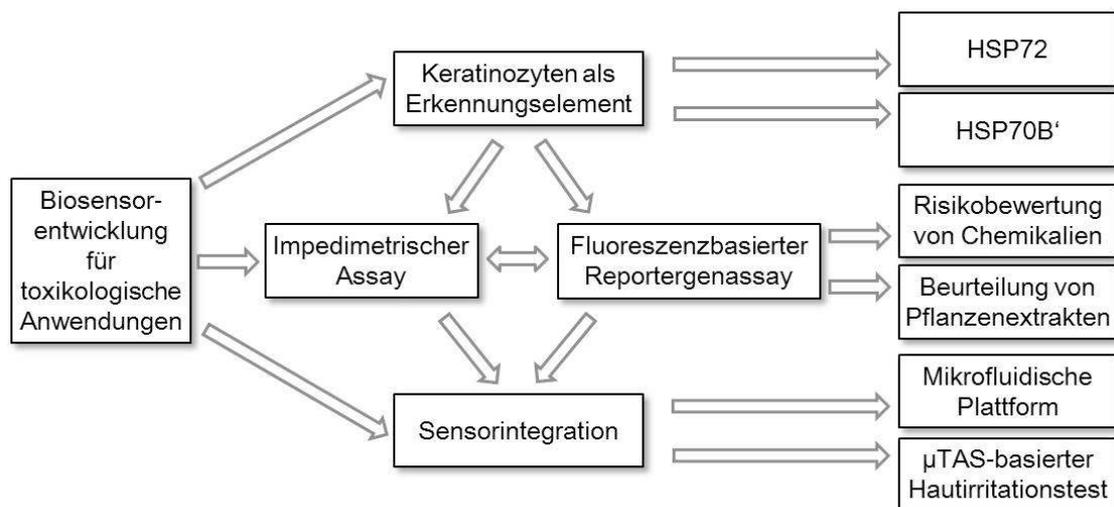


Abbildung 8.1: Überblick der in dieser Arbeit dargestellten Beiträge auf dem Gebiet der integrierten Biosensorentwicklung

Gleichzeitig konnten die etablierten Verfahren der Zytotoxizitätsanalyse mittels MTT und der qRT-PCR zur Genexpressionsanalyse genutzt werden, um einen Einblick in

molekulare Mechanismen der Keratinozytenaktivierung, insbesondere der Wirkung des Pflanzenextrakts *Arnica montana*, zu geben (Kapitel 5.2).

In einem nächsten Schritt wurden die für die mikroskopische, aber diskontinuierliche Beobachtung der Zellreaktion genutzten, Standardzellkulturbedingungen (Kapitel 4 und 5) adaptiert und eine mikrofluidische Zellkulturplattform geschaffen, die die Echtzeitanalyse sowohl im Phasenkontrast als auch in der Auflicht-Fluoreszenz ermöglicht. Kapitel 6 beschreibt außerdem die erfolgreiche Integration der etablierten Sensorzelllinie pHSP72_pAcGFP1-1 in diese inkubatorunabhängige Umgebung. Ausgehend von diesen Ergebnissen sowie dem geführten Vergleich von Reportergenassay und impedimetrischen Readout (ECIS), wurden Fortschritte der Entwicklung eines μ TAS-basierten Hautirritationstests zur komplexen Analyse zellschädigender Effekte über große Konzentrationsbereiche beschrieben (Kapitel 7).

8.1 Alternative Biomarker zur Anwendung in Hautirritationstest

Hitzeschockproteine

Zur Etablierung, Optimierung und Validierung eines alternativen *In-vitro*-Hautirritationstests wurde die humane Keratinozytenzelllinie und deren Antwort auf das Umwelttoxin CdCl₂ als Machbarkeitsnachweis genutzt. Bereits hier wurde eine starke Abhängigkeit der Toxizität von den Kulturbedingungen festgestellt, die sich mit den Beobachtungen von DelRaso *et al.* decken [179]. Es wurde an Hepatozyten beschrieben, dass die Interaktion von Cadmium mit dem im Serum befindlichen Albumin mit einer Reduktion der Zytotoxizität einhergeht.

Ausgehend von festgelegten Standardstressbedingungen wurden Genexpressionsanalysen der codierenden Gene für HSP72 und HSP27 durchgeführt, um deren Leistungsfähigkeit als Biomarker im HaCaT-Zellmodell zu überprüfen. In diesen Experimenten wurde eine signifikante Steigerung des mRNA-Expressionsspiegels von HSP72 nach Inkubation mit CdCl₂ bereits nach 6 h detektiert. Während das Gen ungefähr 20-fach erhöht exprimiert wurde, zeigte die relative Expressionsstärke des HSP27 eine wesentlich geringere, dennoch signifikante Änderung nach 8-stündiger Inkubation mit CdCl₂. Anhand dieser Ergebnisse wurde geschlussfolgert, dass eine 2-fache Induktion von HSP27 für eine ausreichende Sensitivität des angestrebten Reportergenassays nicht ausreicht, wohingegen die Induktion der Expression von HSP72 sensitiv genug erschien, um als Sensor für die Detektion von auf Keratinozyten applizierten xenobiotischen Stress zu dienen.

HSP72 und HSP27 sind die am besten in der Biologie der Haut untersuchten Stress-

proteine. Wie in allen anderen Zell- und Gewebetypen werden HSPs auch in Keratinozyten unter Stressbedingungen exprimiert. Es wurde weiterhin beschrieben, dass HSP72 unter normalen Bedingungen mit einem hohen basalen Level in der Haut exprimiert wird. Erst nach Stimulation durch äußere Umweltfaktoren, wird HSP72 superinduziert [101]. HSP27 hingegen wird eine besondere Rolle sowohl als Schlüsselprotein in apoptotischen Vorgängen und bei der Differenzierung, als auch bei der Vermittlung von Entzündungsreaktionen, zugeschrieben [104]. Obwohl HSP27 als sensitiver Marker der Hautreizung beschrieben wurde [140, 141], konnte dies in den hier verfolgten Ansätzen mittels HaCaT-Zellmodell nicht bestätigt werden. Dies ist vermutlich auf den Wirkungsmechanismus der eingesetzten Modellschubstanz zurückzuführen. In beiden zitierten Arbeiten wurde das anionische Tensid Natriumdodecylsulfat genutzt, wohingegen hier das Salz des Übergangsmetalls Cadmium zur Anwendung kam.

Da für die Verarbeitung einer zellulären Stresssituation bei gleichzeitiger Funktion als Sensorzelle mit intakter Proteinbiosynthese die Aufrechterhaltung der Zellphysiologie Grundvoraussetzung ist, liegt das Hauptaugenmerk bei der Wahl des Biomarkers auf zügigen und stark induzierten intrazellulären Reaktionen mit einer Dauer von wenigen Minuten bis Stunden. Diese konnte im direkten Vergleich beider Stressproteine nur bei HSP72 beobachtet werden und resultierte daher in der Etablierung der Sensorzelllinie pHSP72_pAcGFP1-1.

HSP70B' ist ein noch nicht ausführlich in der Literatur beschriebenes neuartiges Mitglied der HSP70-Familie, welches ebenfalls durch eine Reihe exogener Faktoren maßgeblich induziert wird. Die funktionelle Promotorregion des *HSPA6* wurde bereits erfolgreich in Leberkarzinomzellen und Fibroblasten als Reportergenassay genutzt [157, 143, 144]. Die Überprüfung der Übertragbarkeit des Ansatzes auf Keratinozyten wurde erstmalig innerhalb der vorliegenden Arbeit verfolgt. HMOX-1 ist ein weiteres stresssensitives Protein, welches enormen Einfluss auf die Zellvitalität nach Exposition mit exogenen zellschädigenden Faktoren hat [96]. Es wurde vergleichend zu HSP70B' untersucht.

Die Überprüfung der beiden genannten Gene im HaCaT-Zellmodell erfolgte mittels qRT-PCR-Studien ebenfalls nach Einwirkung von CdCl₂. Die Experimente zeigten einen signifikant erhöhten mRNA-Expressionsspiegel bereits nach 3-stündiger Inkubation mit dem Toxin. Unter diesen Bedingungen war sowohl die Expression von HSP70B' als auch HMOX-1 gleichermaßen bereits um das ca. 150-fache erhöht und damit eine Größenordnung stärker als bei HSP72 nach 6 h. Dies entspricht den aus der Literatur [111, 180, 181, 157] abgeleiteten Erwartungen, da Studien belegen, dass die stressinduzierte Antwort von HSP70B' durch eine sehr schnelle Induktion, ein niedriges Basallevel und kurze Halbwertszeiten charakterisiert wird. In diesem Zusammenhang könnte dies auf

die einzigartige proximale Region mit überlappenden HSEs des funktionellen Promotors des HSP70B' zurückgeführt werden, welche im HSP72-Promotor nicht vorzufinden ist [157, 153, 182, 111]. Die zytoprotektive Funktion und die stressensitive Antwort von HSP72 und HSP70B' werden miteinander in Beziehung gesetzt, wobei unter Einsatz von siRNA vorgeschlagen wurde [181], dass die Expression von HSP72 als Primärantwort reguliert wird und HSP70B' erst nachgeschaltet hohe Expressionsspiegel erlangt.

Die Genexpressionsanalysen am HaCaT-Zellmodell zeigten, dass HSP70B' auch in Keratinozyten entscheidend für das Zellüberleben während intensivster umweltbedingter Stresssituationen ist und resultierten in der Etablierung der Sensorzelllinie pHSP70B_pAcGFP1-1. Gleichmaßen demonstrierten die qRT-PCR-Studien, dass HMOX-1 als geeigneter Biomarker dienen könnte. Die Regulation der induzierten Expression von HMOX-1 erfolgt durch zwei *upstream* gelegene *Enhancer* und wird in Zusammenhang mit dem Nrf2-Keap1-Signalweg gebracht [96]. Um diesen komplexen *Enhancer*-basierten Regulationsmechanismus in einem Stresspromotor-Reporterassay zu nutzen, wären allerdings Plasmidkonstrukte von 10 kbp bzw. 20 kbp notwendig. Die Klonierung mehrerer stresssensitiver *Response elements* von HMOX-1, die in Zusammenhang mit dessen Induktion gebracht werden [156], wäre daher ein möglicher Alternativansatz.

Charakteristiken der Sensorzelllinien

Die an nativen HaCaT-Zellen bestimmte 20-fache Steigerung des Genexpressionslevels von HSP72 konnte in Studien zur Promotoraktivität am etablierten GFP-Konstrukt pHSP72_pAcGFP1-1 ebenfalls entsprechend nachgewiesen werden. Dies impliziert die Funktionalität des klonierten Konstrukts auf Transkriptionsebene unter Standardstressbedingungen einerseits und spiegelt die Übertragbarkeit der biosensorischen Antwort auf die nativen, tatsächlich ablaufenden intrazellulären Prozesse andererseits, wider. Ausgehend von diesem grundlegenden Machbarkeitsnachweis folgte die Erstellung eines inkubationszeit- und konzentrationsabhängigen Intensitätsprofils, einschließlich der Bestimmung der Nachweisgrenze zur Diskussion der Möglichkeiten und Grenzen des Assays.

Nach Inkubation der Sensorzellen mit Konzentrationen $<35 \mu\text{M CdCl}_2$ wurde ein inkubationszeitabhängiger Anstieg der relativen Fluoreszenzintensität, mit einem Maximum nach 6-stündiger Inkubation und $35 \mu\text{M CdCl}_2$, beobachtet. Wurde die Konzentration weiter erhöht, zeigte die Population nach 4- und 6-stündiger Inkubation bereits eine ungewöhnliche Morphologie und einige Zellen starben, was mit einem Abfall der Fluoreszenzintensität einherging. Unter diesen Bedingungen kommt es zu einer verstärkten Hemmung der Proteinbiosynthese und der verminderten Expression des Reportergens GFP. Nach Nzungue *et al.* [183] nimmt der oxidative Stress und das Maß an DNA-Schäden der HaCaT-Zellen bei Konzentrationen $>50 \mu\text{M CdCl}_2$ so stark zu, dass irreparable Schäden entstehen. Dies

deckt sich mit der experimentell ermittelten Fluoreszenzabnahme. Weiterhin wurde als Nachweisgrenze $7 \mu\text{M CdCl}_2$ bestimmt ($t=6 \text{ h}$). Die Nachweisgrenze ist aufgrund der starken Abhängigkeit von der Inkubationszeit nicht allgemeingültig, weshalb die zeitliche Dimension stets zur Einschätzung der Sensitivität des Assays berücksichtigt werden sollte. Unter gleichen Bedingungen konnte im MTT-Assay, sowohl nach 6-stündiger als auch nach 24-stündiger Inkubation mit $7 \mu\text{M CdCl}_2$ kein Einfluss auf die Zellvitalität detektiert werden. Diese Daten zeigen, dass die Sensorzelllinie eine wesentlich sensitivere Detektion des zytotoxischen Potenzials einer Substanz ermöglicht.

In Anlehnung an die von Migita *et al.* [144] an Fibroblasten erfolgreich durchgeführte Studie zur Verstärkung der biosensorischen Antwort mittels Zellhomogenisierung wurde der Zusammenhang zwischen Zellzyklussynchronisation und GFP-Expression am HaCaT-Zellmodell näher untersucht, da trotz stabiler Transfektion und Einzelklonselektion der Sensorzelllinie keine homogene biosensorische Antwort der Zellen beobachtet werden konnte. Ursache dafür ist, dass sich die vitalen sensorischen Zellen in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus befinden. Dies hat maßgeblichen Einfluss auf die Regulation bzw. Expression einer Reihe von spezifischen Genen [184] und ist bei der Abbildung von Genexpressionsmustern mithilfe von Sensorzelllinien zu berücksichtigen. Ziel der durchgeführten Experimente war die Steigerung der biosensorischen Antwort durch Anreicherung der Zellen in der G_0 -Phase erzielt mittels Serumentzug. Von DNA-Polymerasehemmern wie z.B. Aphidicolin oder den Mikrotubuliumaufbau hemmende Substanzen, wie z.B. Colchicin wurde abgesehen, da mögliche Einflüsse auf den zu detektierenden Stress etwa durch Hemmung der Proteinbiosynthese oder andere toxische Effekte die Ergebnisse an lebenden Sensorzellen verfälschen könnte [185]. Die durchflusszytometrischen Analysen zeigten, dass die Kultivierung in Mangelmedium eine Zunahme der in der Ruhephase befindlichen Zellen bewirkt und entsprechend der prozentualen Zunahme der in der G_0/G_1 -Phase befindlichen Zellen, der Anteil derer in der S- bzw. G_2/M -Phase abnimmt. Die Verteilung der Zellen in den einzelnen Phasen bei Kultivierung eines Monolayers entsprach in etwa der Verteilung nach 24-stündigem Serummangel. Bei der Bildung eines Monolayers kommt es zur Kontaktinhibition, wodurch die Zellen ebenfalls in den ruhenden Phasen des Zellzyklus verharren.

Nachdem ein positiver Einfluss des Serummangels zur Zellzyklussynchronisierung in HaCaT-Zellen gezeigt werden konnte, wurde nun der Einfluss der Synchronisierung auf die GFP-Expression in der Sensorzelllinie untersucht. Während Migita *et al.* [144] einen Zusammenhang zwischen der CdCl_2 -induzierten Zytotoxizität und dem Verharren der Fibroblastensensorzellen in der G_0/G_1 -Phase zeigte, konnte keine reproduzierbare und signifikante Steigerung der biosensorischen Antwort beobachtet und somit der Effekt der Zellzyklussynchronisation in HaCaT-Zellen nicht positiv genutzt werden. Dies ist mögli-

cherweise auf die mangelnde Übertragbarkeit zwischen den unterschiedlichen Zelltypen zurückzuführen. Da der Serumgehalt dennoch prinzipiell einen Einfluss auf die Zytotoxizität von CdCl₂ in unterschiedlichen Konzentrationsstufen hat [179], wurde die 24-stündige Kultivierung in Mangelmedium grundsätzlich durchgeführt, um die Vergleichbarkeit zu anderen Stressbedingungen zu gewährleisten.

Gleichzeitig wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht, ob der Serummangel und/oder die Standardstressbedingungen prinzipiell einen Effekt auf die Vitalität der Zellen haben, mit dem Ziel die Eignung der Sensorzelllinie als Biosensor für subletale Konzentrationen und kürzere Inkubationszeiten verglichen zu einer gewöhnlichen Endpunktmethode wie MTT zu überprüfen. Tatsächlich zeigte sich die Mehrheit der unterschiedlich exponierten Zellen in einem physiologisch akzeptablen Zustand. Sowohl der 48-stündige Serumentzug als auch die Stresssituationen wirkten sich nicht auf die Vitalität, Größe oder Form der Zellen aus. Der Anteil toter Zellen betrug bei allen Bedingungen ca. 5 % und ist auf Transportwege zwischen Kultivierung und Analyse zurückzuführen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die detektierten Änderungen der Fluoreszenzintensität des Reporters ein Maß für den Grad der Zellstressbelastung darstellen und die Sensorzelllinie damit die frühzeitige Detektion intrazellulärer Effekte ermöglicht, bevor eine sichtbare Zellschädigung etwa durch Permeabilisierung der Zellmembran, eintritt. Damit grenzen sich die etablierten Sensorzellen deutlich von den auf akuter Toxizität beruhenden Vitalitätsassays ab. Zudem zeigten die Untersuchungen zur Stabilität der Sensorzelllinie pHSP72_pAcGFP1-1, dass sich diese auch nach 50 Passagen noch im Rahmen der biologischen und technischen Variabilität zur Beschreibung der durch Wärmebehandlung und CdCl₂-induzierten Zytotoxizität eignet und ein robustes Testsystem für den Einsatz in der Dermatologie, Toxikologie oder dem Wirkstoffscreening darstellt.

Einen möglichen Biomarker, der sich durch eine höhere Promotoraktivität infolge der Einwirkung der Standardstressbedingungen auszeichnet und dadurch das Signal-Rausch-Verhältnis des Reporterassays maßgeblich verbessern könnte, zeigten Genexpressionsanalysen von HSP70B' auf. Der Expressionsspiegel von HSP70B' ist unter gleichen Stressbedingungen nochmals etwa 10-fach höher als HSP72. Die an nativen HaCaT-Zellen bestimmte 200-fache Steigerung des Genexpressionslevels von HSP70B' (t=6 h) konnte in Studien zur Promotoraktivität am etablierten GFP-Konstrukt nur bedingt nachgewiesen werden (ca. 50-fach). Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass komplexere regulatorische Einheiten zur Proteinexpression von HSP70B' notwendig sind, die außerhalb der hier klonierten Promotorregion liegen. Eine Alternative zur Vermeidung sehr großer, stabil zu transfizierender Konstrukte, stellt dabei die Einführung von *Tandem repeats* des spezifischen *Response elements* stromaufwärts eines Minimalpromotors dar, wie sie von Wieder *et al.* in seinen Arbeiten zur Optimierung von Reporterzelllinien für die

Expressionsprofilerstellung in mikrofluidischen Baugruppen vorgeschlagen wird [186].

Die Beobachtung der eingeschränkten Expressionsstärke bestätigte sich auch bei Betrachtung des Signal-Rausch-Verhältnisses der Sensorzelllinie pHSP70B_pAcGFP1-1 auf Translationsebene. Während erwartungsgemäß übereinstimmende Nachweisgrenzen für beide Sensorzelllinien ermittelt wurden, zeichnete sich die Sensorzelllinie pHSP70B_pAcGFP1-1 nur durch ein 1,5-fach verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis bei Konzentration von 20-40 μM CdCl₂ aus. Dieses Charakteristikum der höheren absoluten Fluoreszenzemission ist dennoch positiv zu bewerten, da es bezüglich auftretender Hintergrundproblematiken in Chipsystemen Vorteile verschafft.

Zur Optimierung der biosensorischen Antwort der HaCaT-Zellen bezüglich des Signal-Rausch-Verhältnisses könnte eine parallele Transfektion eines Reporterkonstrukts beider Promotoren zielführend sein, um so den komplexen kooperativen Wirkungsmechanismus von HSP70B' und HSP72 [181] für die Detektion zellschädigender Effekte zu nutzen. Eine Verschiebung der Nachweisgrenze ist dabei nicht zwangsläufig zu erwarten, da eine Grundkonzentration an Toxin notwendig ist, um überhaupt eine biosensorische Antwort zu initiieren.

Anwendungsspektrum der Sensorzelllinien

Die Identifikation neuartiger Biomarker erfordert die umfangreichere Untersuchung des experimentellen Protokolls, indem das *In-vitro*-Testmodell einer erweiterten Auswahl von risikobehafteten Testsubstanzen ausgesetzt wird. Auf diesem Wege kann untersucht werden, ob der gewählte Biomarker ein repräsentativer Biomarker der Hautirritation oder eines speziellen Typs dieser ist.

Die etablierten Sensorzelllinien wurden daher neben CdCl₂ sowohl mit einem erweiterten Substanzspektrum von Reinstchemikalien (DNCB und NiSO₄), als auch verschiedenen Pflanzenextrakten behandelt. Die detektierte Regulierung des mRNA-Expressionsspiegels der HSPs bzw. die beobachtete Induktion der Sensorzelllinien durch CdCl₂ und DNCB sowie die nicht detektierte Aktivierung durch NiSO₄ bei eingesetzten subletalen Konzentrationen erlauben, nach Abgleich mit in der Literatur beschriebenen Wirkungsmechanismen, Schlussfolgerungen zum Anwendungsspektrum der etablierten Sensorzelllinien.

Die zellschädigende Wirkungen von CdCl₂ [187, 188, 183] und DNCB [134] werden u.a. auf deren Befähigung zur ROS-Generierung zurückgeführt. Während toxikologische Signalwege von Cadmium sehr umfangreich in Keratinozyten beschrieben wurden, erfolgte die Einbeziehung der Effekte von Kontaktallergenen wie DNCB und Nickel auf nichtimmunologische Zellen erst in jüngster Zeit. Die Mechanismen der von Cadmium ausgehenden Zytotoxizität sind sehr vielfältig, vornehmlich indirekter Natur und stark abhängig vom

betrachteten Zelltyp [187]. Die nicht-spezifische Aufnahme von Cadmium erfolgt dabei u.a. über Ca^{2+} -Transporter und resultiert in der Hemmung antioxidativer enzymatischer und nicht-enzymatischer Schutzmechanismen, z.B. der Superoxid-Dismutase oder Glutathion [188]. Durch die Inaktivierung dieser antioxidativen Mechanismen über Interaktion von Cadmium mit den Thiol-Gruppen dieser Moleküle steigt sekundär der intrazelluläre ROS-Gehalt [189, 187]. Die übermäßige ROS-Anreicherung induziert stressaktivierte Signalkaskaden (MAPK und Nrf2-Keap1-ARE) und im Umkehrschluss die Transkription der HSPs [190]. Weiterhin wurde eine direkte Interaktion von Cadmium mit dem *Heat shock transcription factor* HSF1 beschrieben, der in eukaryotischen Zellen die stressinduzierte Änderung der Genexpression vermittelt [191]. Nach Stressexposition transloziert HSF1 in den Zellkern, bildet Trimere, bindet an die entsprechenden DNA-Regionen und aktiviert die Transkription der HSPs. Diese komplexen mehrstufigen Toxizitätsmechanismen des Cadmiums könnten die in qRT-PCR-Studien beobachtete Steigerung bzw. Sättigung des Expressionsspiegels der untersuchten HSP-Gene bei Verlängerung der Inkubationszeit erklären.

Hingegen war nach Behandlung der Zellen mit DNCB ein inkubationszeitabhängiger Abfall des Expressionsspiegels der HSPs zu beobachten. DNCB gehört zur Gruppe der Nitroaromaten und ist bekannt für dessen elektrophilen Charakter. Es ist möglich, dass diese Verbindung nach Aufnahme in die Zelle einer Ein-Elektronen-Übertragung und somit einem Redoxcyclus unterliegt. Es entstehen daher Nitroanionradikale, die mit Sauerstoff reagieren und unter Regeneration der Nitrogruppe das Superoxidradikalanion bilden [192]. Diese Hypothese unterstützt die von Kim *et al.* beschriebene ROS-Generierung in DNCB-behandelten Keratinozyten einerseits und erklärt andererseits den inkubationszeitabhängigen Abfall der HSP-Expression. Während der zunächst vorliegende oxidative Stress die Expression von HSPs induziert, ist aufgrund der Instabilität der Substanz sowie dem Abbau der ROS durch Antioxidantien möglicherweise der deregulierte Redoxstatus im Vergleich zur Applikation von Cadmium zügiger ausbalanciert, folglich wird die HSP-Expression herunterreguliert.

Obwohl die Nickel-induzierte ROS-Generierung in Darmkarzinomzellen ebenfalls beschrieben worden ist [193], konnte ein möglicher zellschädigender Effekt von NiSO_4 bei eingesetzten subletalen Konzentrationen mithilfe der etablierten Sensorzelllinien nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen von Kim *et al.* [134] im HaCaT-Zellmodell, wobei vorgeschlagen wurde, dass die Befähigung der ROS-Generierung nach Kontakt mit unterschiedlichen Chemikalien von der spezifischen Natur der Substanz selbst abhängt.

Weiterhin wurden Pflanzenextrakte der *A. montana*, *A. cotula*, *H. autumnale* und *S. officinalis* untersucht. *Arnica montana* wird bereits intensiv in Formulierungen zur äußeren

Anwendung bei Verletzungen und rheumatischen Muskel- und Gelenkbeschwerden eingesetzt. In diesem Zusammenhang diente es beispielhaft zur Anwendung der Sensorzellen bei der Beurteilung von Pflanzenextrakten als Bestandteil kosmetischer und pharmakologischer Produkte. Ausgehend von den Extrakt-Konzentrationen entsprechend der EC_{80} -Werte bestimmt mittels MTT, konnte ein besonders deutliches zellschädigendes Potenzial bei Applikation von *A. montana* auf die Sensorzelllinien nachgewiesen werden. Die zytotoxischen Eigenschaften des Arnika-Extraktes sind dabei auf das Sesquiterpenlacton Helenalin zurückzuführen [162], dessen in Nierenkarzinomzellen [168] bewiesene Befähigung zur ROS-Generierung beschrieben wurde. Möglicherweise ist dieser Ansatz auf Keratinozyten übertragbar und der Grund für die deutliche Reaktion der etablierten Sensorzelllinien. Einen eindeutigeren Aufschluss darüber würden qRT-PCR-Studien zur Regulation der HSPs nach Behandlung mit der Reinsubstanz Helenalin geben.

Die ebenfalls Sesquiterpenlactone enthaltenden Extrakte der Stammpflanzen *Anthemis cotula* und *Helenium autumnale* resultierten in einer geringfügigeren Induktion der Sensorzelllinien. Da Pflanzenextrakte sehr komplexe Stoffgemische sind, könnte diese Beobachtung auf einen geringeren Gehalt an Sesquiterpenlactonen [159] bzw. einem entsprechend größeren Anteil an Substanzen, die andere Wirkungsmechanismen in der Zelle hervorrufen, zurückgeführt werden. Eine vollständige Erklärung könnten hierzu quantitative vergleichende Bestimmungen der Inhaltsstoffe dieser Pflanzenextrakte leisten. Erwartungsgemäß erfolgte keine Induktion des Reporterkonstrukts durch das hauptsächlich zellmembranschädigende Extrakt der *Saponaria officinalis* [158, 166].

Während das bereits eingangs erwähnte etablierte und vielversprechende System KeratinoSens [194] auf die Unterscheidung von sensibilisierenden und nicht-sensibilisierenden Substanzen zur Beschreibung der hervorgerufenen toxisch-irritativen oder allergischen Kontaktdermatitis zielt, steht bei etabliertem Sensorsystem die Detektion der Generierung von oxidativem Stress als Folge der Einwirkung einer toxischen Substanz, unabhängig von deren sensibilisierenden Potenzial, im Vordergrund. Betrachtet man messspezifische Parameter beider Systeme, so ist im Vergleich zu KeratinoSens ein entscheidender Vorteil der hier etablierten Sensorzellen dessen Fähigkeit zum kontinuierlichen Monitoring der zellulären Antwort (siehe Kapitel 8.2).

Da die Regulation des Redoxstatus eine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung der intrazellulären Homöostase einnimmt, stellen die hier etablierten Sensorzelllinien einen innovativen Ansatz zur Durchführung von *In-vitro*-Hautirritationstests als Alternative zu etablierten und validierten Endpunktmessungen dar.

Weitere Reporterassays könnten unter Nutzung von Transkriptionsfaktoren, die während der Keratinozytenaktivierung infolge der Einwirkung exogener Stimuli einen Einfluss auf die Genexpression nehmen, etabliert werden, indem eine Bibliothek von

Sensorzelllinien, die ein fluoreszierendes Protein transkriptionell reguliert durch einen Transkriptionsfaktor in Verbindung mit einem Minimalpromotor kodieren, aufgebaut wird. Wann immer der entsprechende Transkriptionsfaktor aktiv ist erfolgt die Expression des Reportergens. Die *Response elements* der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und STAT3, sowie das *Glucocorticoid response element* (GRE) oder das *Activator Protein 1* (AP-1) *Binding element* wären dabei denkbar [195, 93, 186, 86].

Besonderheiten der *Arnica montana*

Bei der Analyse der Dosis-Wirkungs-Beziehung von *Arnica montana* auf das HaCaT-Zellmodell wurde in bestimmten Konzentrationsbereichen ein positiver Effekt auf die Zellvitalität detektiert. Diese Beobachtung veranlasste zur weiteren Analyse der molekularen Wirkungsmechanismen des Extraktes unter Ausnutzung der in dieser Arbeiten etablierten Methoden. Es wurde daher erstmalig untersucht, ob und inwieweit der beobachtete positive Einfluss des Extraktes auf die Zellvitalität in Zusammenhang mit dem dosisabhängigen Genexpressionsprofil der HSPs stehen könnte.

Während die 24-stündige Inkubation der HaCaT-Zellen mit 125 μ g/ml in 80 % der Zellvitalität resultierte, steigt diese bei einer Konzentration von 31,25 μ g/ml auf 140 % an. Bei noch geringeren Konzentrationen des Extraktes gleichen sich die Werte zu denen der unbehandelten Kontrolle an. Dieser biphasige glockenförmige Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurve wird allgemein als hormetischer Effekt bezeichnet und gilt als wesentlicher Grundsatz in der Toxikologie [196, 197]. Da die molekularen Mechanismen des beobachteten Arnika-induzierten Effekts nicht eindeutig beschrieben sind, wurde die dosisabhängige Wirkung des Extraktes auf die Genexpression von HSP72 und HSP70B' näher untersucht. Mit steigender Konzentration an Extrakt steigt auch der Expressionspiegel der untersuchten HSP-Proteine. Bei besonders geringen Konzentrationen bis ca. 4 μ g/ml ist kein Effekt auf die Zellen zu detektieren. Betrachtet man den Bereich zwischen ca. 15 und 60 μ g/ml ist die Hochregulierung der HSPs und der damit verbundene Effekt der molekularen Chaperonfunktion der HSPs, induziert durch spezielle Inhaltsstoffe des Extrakts der *Arnica montana*, möglicherweise in einem besonders günstigen Verhältnis, sodass nicht nur das Überleben der Zelle gefördert, sondern tatsächlich positiv beeinflusst wird. Überschreitet man jedoch diesen Konzentrationsbereich, resultiert die abermals gesteigerte Konzentration des Extraktes (125 μ g/ml) zwar in einer noch verstärkten HSP-Expression, gleichzeitig ist jedoch bereits ein Einfluss auf die Zellvitalität zu beobachten. Dieser mittels qRT-PCR detektierte Effekt der dosisabhängigen HSP-Expression in Keratinozyten nach Behandlung mit dem Extrakt der *Arnica montana* führte zu der Annahme, dass die sowohl vitalitätssteigernden also auch zytotoxischen Effekte des Extraktes mit einer Änderung des HSP-Expressionsspiegels einhergehen und die induzierte Überex-

pression der HSP70-Proteinfamilie zu einer Verschiebung von intrazellulären Überlebens- zu Zelltod-vermittelnden Signalen führt. Getragen wird diese Hypothese von Ran *et al.* [198] oder Arya *et al.* [199], die beschrieben, dass obwohl der HSP-Familie grundsätzlich eine inhibierende Rolle bei der Vermittlung apoptotischer Signale zugeschrieben wird, sie gleichzeitig bei gesteigerter Überexpression den Zelltod infolge der Einwirkung eines exogenen Stimuli potentieren können.

Die Betrachtungen schließen dabei unumgänglich die Rolle von NF- κ B ein. Werden Zellen mit exogenen Faktoren stimuliert, übt die Aktivierung des IKK/NF- κ B-Signalweges einerseits zytoprotektive Funktionen aus, unterstützt andererseits aber auch die Expression und die Abgabe von Zytokinen, die zur Aktivierung einer Entzündungsreaktion führen. Die Funktion des Signalwegs unterliegt dabei einer strengen Regulation [93]. In diesem Zusammenhang wird die antiphlogistische Wirkung des Extrakts auf die dosisabhängige Hemmung des Transkriptionsfaktor NF- κ B zurückgeführt [200]. Nichtsdestotrotz induzierte *Arnica montana* die Überexpression von Proteinen der HSP70-Familie und leitete unmittelbar den Zelltod ein. Diese Beobachtungen demonstrieren wie HSPs einen negativen Effekt auf die Zellphysiologie haben können und festigen die Beobachtungen von Ran *et al.* [198], der diese negative Wirkung auf Interaktionen mit dem NF- κ B- Signalweg zurückführte. Dieser Beitrag stellt die starke Konzentrationsabhängigkeit beim Einsatz pflanzlicher Wirkstoffe erneut in den Vordergrund.

Obwohl sowohl positive als auch zytotoxische Effekte der *Arnica montana* auf das Sesquiterpenlacton Helenalin zurückgeführt werden, konnten beim durchgeführten MTT-Test mit der Reinstsubstanz keine dem Pflanzenextrakt vergleichbaren vitalitätssteigernden Effekte beobachtet werden. Dies lässt vermuten, dass weitere Substanzen eine entscheidende Rolle bei der Wirkung des Extraktes *Arnica montana* spielen müssen. Als mögliche Substanzkandidaten werden z.B. in verschiedenen pflanzlichen Lebensmitteln vorkommende Flavonoide oder Polyphenole vorgeschlagen [201, 202, 203], wobei deren Übertragbarkeit auf die Inhaltsstoffe des gegebenen Pflanzenextrakts in Zusammenhang mit dem genutzten Hautzellmodell zu überprüfen wäre.

Die geführten Untersuchungen ordnen sich dennoch in das aufstrebende Gebiet der Altersforschung zur Nutzung von hormetischen Effekten in der Kosmetikindustrie ein. Die Grundlage dafür bildet die zunehmende Akzeptanz, dass die moderate stressinduzierte Regulation bestimmter Signalkaskaden und die damit verbundene Aktivierung von Reparaturmechanismen effektiv die Reduktion alterungsbedingter Akkumulationen molekularer Schäden unterstützt. Die nachgewiesene dosisabhängige HSP-Induktion und der gezeigte hormetische Effekt des Extraktes der *Arnica montana* erweitern in diesem Zusammenhang das von Rattan *et al.* [201] diskutierte Beispiel des Extrakts von Wurzeln der *Panax notoginseng*. Die Untersuchungen zur Wirkung beider Extrakte demonstrieren,

dass unter Berücksichtigung des Phänomens Hormesis die Induktion von HSPs nicht auf negative Stressmechanismen reduziert werden sollten, sondern vielmehr die nützlichen Effekte des Konzepts der *Moderaten Stressinduktion* zur Anwendung in entsprechenden Formulierungen in der Pharma- und Kosmetikindustrie kommen könnten.

Leistungsfähigkeit der Sensorzelllinien im Vergleich

Das Nachempfinden dermatologischer Effekte mittels *In-vitro*-Testsystemen stellt aufgrund der komplexen Struktur der Haut und den vielschichtigen zugrundeliegenden Penetrations- und Wirkungsmechanismen eine große Herausforderung dar. Die Ergebnisse bedürfen stets einer kritischen Betrachtung zur Abwägung der Relevanz generierter Datensätze und zur Einschätzung der Leistungsfähigkeit genutzter Modelle.

Daher wurde der Einfluss der in dieser Arbeit verwendeten Modellsubstanzen unter übertragbaren Bedingungen weiterhin an 3T3-Mausfibroblasten (Methode: WST-1) und dem 3D-Hautmodell SkinEthic (Methode: MTT) am SIT Hamburg durchgeführt. Tabelle 8.1 zeigt zunächst exemplarisch den Einfluss von CdCl₂ und DNCB auf das HaCaT-Zellmodell im Vergleich zu 3T3-Fibroblasten. Betrachtet man die EC₅₀-Werte nach 24-stündiger Inkubation der Hautmodelle mit den Substanzen wird deutlich, dass Fibroblasten ein wesentlich empfindlicheres 2D-Hautmodell, als die robusten und an der Hautoberfläche exponierten Keratinozyten, darstellen. Dabei bewirken nahezu übereinstimmende Dosen von CdCl₂ im HaCaT-Zellmodell nach 24 h, im 3T3-Modell bereits nach 6 h übereinstimmende Vitalitätseinschränkungen von 50 %.

Tabelle 8.1: Detektion von CdCl₂ und DNCB mittels 2D-Hautmodellen im Vergleich

Substanz (μM)	HaCaT	3T3 Fibroblasten	
	MTT (EC ₅₀) t= 24 h	WST-1 (EC ₅₀) t=6 h	WST-1 (EC ₅₀) t= 24 h
CdCl ₂	45 \pm 7	44 \pm 5	7 \pm 2
DNCB	11 \pm 0,3	6,5 \pm 0,2	6,7 \pm 0,2

Weiterhin wird anhand der EC₅₀-Werte nach 6- und 24-stündiger Inkubation mit DNCB deutlich, dass dessen Wirkungsmechanismus auch in Fibroblasten in erster Linie keinem inkubationszeitabhängigen Effekt unterliegt. Auch in den qRT-PCR-Studien zur Induktion von HSPs am HaCaT-Zellmodell wurde bei dieser Substanz die sofortige signifikante Reaktion intrazellulärer Mechanismen zur Erhaltung der Zellvitalität, verbunden mit einem Abfall des Expressionsspiegels nach 8 h, beobachtet.

Zur Etablierung und Validierung der Sensorzellen wurden grundsätzlich Substanzkonzentrationen benutzt, die den EC₈₀-Werten (t=24 h) im nativen HaCaT-Zellmodell entsprachen. In Tabelle 8.2 ist der Einfluss dieser Substanzkonzentrationen (25 μM CdCl₂,

10 μ M DNCB, 125 μ g/ml *A. montana*) auf die relative Fluoreszenzänderung der Sensorzellen vergleichend zu den extrahierten Datensätzen dargestellt als % Vitalität im HaCaT-, 3T3- und SkinEthic-Hautmodell zusammengefasst. Während alle Substanzen bereits nach 6-stündiger Inkubation aufgrund ihrer ROS-bildenden Eigenschaften ein deutliches biosensorisches Signal liefern, ist insbesondere am HaCaT-Zellmodell bei gleicher Inkubationszeit keine deutliche Einschränkung der Vitalität zu detektieren und unterstreicht die Sensitivität der Sensorzelllinie im Vergleich zur Endpunktmethode MTT an gleichen Zellmodell. Die gewählten Dosen führten bei 3T3-Fibroblasten zu dem annähernd vollständigen Absterben der Zellpopulation, wohingegen die Einwirkung der Substanzen CdCl₂, DNCB und *A. montana* am 3D-Hautmodell entsprechend in einer gemessenen Vitalität von 89, 84 bzw. 74 % nach 24 h resultierte. Diese Ergebnisse implizieren, dass das gewählte Modell der HaCaT-Zelllinie trotz Nichtvorhandensein eines *Stratum corneum*s verglichen zu Fibroblasten, eine verlässlichere Übertragbarkeit der Ergebnisse auf *in vivo*-nahe Bedingungen ermöglicht.

Tabelle 8.2: Vergleich der Reaktion von 2D- und 3D-Hautmodellen nach Standardstressbedingungen

Substanz	HaCaT		3T3 Fibroblasten		SkinEthic	
	pHSP70B _p AcGFP1-1	MTT		WST-1		MTT
	rel. Fl. t=6 h	% Vitalität				
		t=6 h	t=24 h	t= 6 h	t= 24 h	t= 24 h
25 μ M CdCl ₂	10,4	98	80	95	10	89
10 μ M DNCB	6,8	85	80	0	5	84
125 μ g/ml <i>A. montana</i>	8,0	95	80	48	11	74

Aus dem geführten Vergleich von Detektionsmethoden in verschiedenen Hautmodellen wird deutlich, dass 2D-Sensorzelllinien eine wesentlich sensitivere Bestimmung zellschädigender Effekte erlauben, diese aufgrund der Abwesenheit einer der natürlichen Barrierefunktion der Haut entsprechenden Struktur aber nur bedingte Rückschlüsse auf *in vivo*-nahe Effekte zulassen. Die Einführung von Reporterassays in 3D-Hautmodelle könnte eine zuverlässigere Alternative zu gewöhnlichen Endpunktmethoden darstellen. Da die Sensorzellen besonders frühzeitige Effekte abbilden und eine äußerliche Reaktion zunächst nicht sichtbar ist, wären diese Modelle besonders für die Vorhersage einer möglichen chronischen toxisch-irritativen Kontaktdermatitis (IKD) interessant. In diesem Zusammenhang wird die irritierende Wirkung auf die Haut ebenfalls zunächst nicht bemerkt. Erst durch wiederholte Applikation erfolgt das Überschreiten eines Schwellenwerts und die IKD wird sichtbar.

8.2 Integration von Biosensoren in mikrofluidische Plattformen

Es wurde die Schaffung einer mikrofluidischen Zellkulturplattform verfolgt, die die verlässliche und kontinuierliche Kultivierung und Analyse des HaCaT-Zellmodells in CO₂-unabhängiger Umgebung realisiert. Während auf dem Gebiet des *Live cell imaging* in den letzten Jahren enorme Fortschritte erzielt wurden, werden die meisten Experimente immer noch in statischen Zellkulturschalen durchgeführt. Kommerziell erhältliche Systeme sind trotz des aufstrebenden Gebiets der Biomikrosystemtechnik limitiert bzw. kostenintensiv oder unhandlich [72]. Verglichen zu anderen mikrofluidischen Plattformen [204, 71, 64] war es bei Etablierung des vorliegenden Systems unter Nutzung und Modifikation der vorhandenen Ausstattung eines Zellkulturlabors Ziel, einen einfach rekonstruier- und anpassbaren Aufbau zur kontinuierlichen Analyse zellbiologischer Experimente aufzuzeigen.

Durch Adaptation des Analysegerätes Axio Imager M.2 erfolgte die kontinuierliche Beobachtung der Zellproliferation über einen mehrtägigen Zeitraum. Grundlegende physiologische Bedingungen, die normalerweise durch die Funktion des CO₂-Inkubators realisiert werden, wurden durch Nutzung eines geschlossenen Durchflusskreislauf mit CO₂-unabhängigem Medium und einer Temperiereinheit in Form einer transparenten Heizfolie in Kombination mit einem Wärmediffuser realisiert. Damit grenzt sich das System durch einfache technische Umsetzung z.B. deutlich von dem *Ibidi Pump system* [205] ab, welches erst durch erweiterte Module und hohem apparativen Aufwand außerhalb des CO₂-Inkubators zum Einsatz kommen kann.

Der Durchflusskreislauf eliminiert nicht nur zu berücksichtigende Effekte der Verdunstung, sondern minimiert durch seine Geschlossenheit auch das Risiko von Kontaminationen. Außerdem garantiert er im Gegensatz zur Standardzellkultur eine kontinuierlich gleichbleibende Versorgung der Zellen und reduziert periodische Schwankungen der Nährstoffzufuhr bzw. des Stoffwechselprodukteabtransports durch den in der Standardzellkultur üblichen Mediumswechsel in Zellkulturflaschen. Das CO₂-unabhängige Medium erlaubt die Konstanzhaltung des pH-Wertes ungeachtet der atmosphärischen Bedingungen.

Alle an eine solche Plattform gestellten Anforderungen, wie Sterilität, Kontinuität, weitestgehende Automatisierung und die Schaffung optimaler Wachstumsbedingungen für eukaryotische Zelllinien konnten umgesetzt werden. Dies zeigte die mikroskopische Dokumentation des Zellverhaltens über 72 h. Außerdem wurde sowohl in einer Zellkulturflasche und gewöhnlichen Zellkulturbedingungen als auch mittels inkubatorunabhängiger Kultivierung in μ Slides^{0.4}Luer ein übereinstimmender Proliferationsfaktor von 1,9 innerhalb von 24 h ermittelt.

Weiterhin erfolgte die Integration der Sensorzelllinie in die mikrofluidische Platt-

form und die fluoreszenzoptische Detektion toxisch-irritativer Effekte. Es konnte gezeigt werden, dass die Sensorzelllinie mit gleicher Sensitivität und Effizienz in einer inkubatorunabhängigen Umgebung unter Flussbedingungen funktioniert. Dadurch gelang die Nutzung der zeitlichen Dimension zur umfangreicheren Beschreibung der Zellreaktion.

Die Ergebnisse bzw. der geführte Machbarkeitsnachweis zur inkubatorunabhängigen Kultivierung zeigen, dass unter Ausschöpfung des Potenzials mikrosystemtechnischer Methoden die Leistungsfähigkeit von Biosensoren durch Eröffnung kontinuierlicher Detektionsmethoden noch verstärkt werden kann. Aufgrund der Modularität des Systems ist der Messaufbau an unterschiedlichste miniaturisierte Zellkulturkammern adaptierbar und bildet die Grundlage zur Weiterentwicklung von Zellkulturplattformen, die eine Multiparameteranalyse ermöglichen.

8.3 Aspekte der Kombination biosensorischer Verfahren

Es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von Reporterzelllinien innerhalb eines biosensorischen Detektionsverfahrens die Beschreibung der physiologischen Wirkung von Chemikalien auf intrazelluläre Signalkaskaden bei Einwirkung subletaler Substanzkonzentration ermöglicht, grundsätzlich dessen Funktionalität jedoch stark vom Erhalt der Zellphysiologie abhängig ist. Ziel der Kombination der fluoreszenzoptischen Sensorzelllinie mit einem zweiten, von intrazellulären Prozessen unabhängigen Detektionsverfahren war die Grenzen des Reporterassays zu überschreiten und eine komplexere Beschreibung der infolge der Einwirkung einer zellschädigenden Substanz auftretenden Effekte über größere Konzentrationsbereiche zu realisieren.

Sowohl Forderungen der Anwender nach zuverlässigen, kostengünstigen und schnellen Analyseverfahren als auch gesetzliche Rahmenbedingungen motivieren zur Entwicklung von miniaturisierten Gesamtanalysesystemen, die die einfache Handhabung der Zellkultur, verbunden mit einer sensitiven und reproduzierbaren Echtzeit-Messung garantieren.

Die zytotoxische Antwort der Sensorzellen wurde unter Einsatz der ECIS-Methode verfolgt, um auftretende Änderungen der Zellmorphologie bzw. der Elektrodenbedeckung quantitativ zu beschreiben. Nach 6-stündiger Inkubation der Sensorzellen pHSP72_pAcGFP1-1 mit 5 und 15 μM CdCl₂ entsprach der zeitliche Verlauf der normalisierten Impedanz dem der unbehandelten Kontrolle. Dies deutet auf keinerlei Wirkung von CdCl₂ in diesem Konzentrationsbereich hin. Wurde hingegen eine Konzentration von 25 bzw. 35 μM CdCl₂ appliziert, konnte ein marginaler Anstieg der normalisierten Impedanz verzeichnet werden. Bei einer Konzentration von 45 und der Steigerung auf 60 bzw. schließlich 100 μM CdCl₂ reagierten die Zellen mit einer deutlichen und konzentra-

tionsabhängigen zellulären Antwort. Der zeitliche Verlauf der Impedanz erreichte dabei unmittelbar nach Toxinzugabe ein kurzzeitiges Maximum und fiel anschließend kontinuierlich in konzentrationsabhängiger Art und Weise. Nach Inkubation mit $45 \mu\text{M CdCl}_2$ näherte sich das zunächst detektierte Maximum wieder den normalisierten Impedanzwerten der unbehandelten Kontrolle an, ohne Rückschlüsse auf eine deutliche morphologische Schädigung in Form einer Zellkörperschrumpfung innerhalb der Beobachtungszeit zuzulassen. Dennoch impliziert dieser Impedanzverlauf bereits den zellschädigenden Einfluss auf die Zellen, deren morphologische Regeneration aufgrund der anschließenden Inkubation unter Cadmium-freien Bedingungen noch möglich ist. Die Permeabilisierung und das vollständige Abrunden der Zellen hingegen, wurden erst durch die Applikation der beiden höchsten Konzentrationen quantitativ detektiert und resultierte in Impedanzwerten zellfreier Elektroden, einhergehend mit dem vollständigen Verlust der Zellintegrität. Der Impedanzabfall nach Inkubation mit $60 \mu\text{M CdCl}_2$ erfolgte dabei verglichen mit der detektierten Wirkung von $100 \mu\text{M CdCl}_2$ etwas langsamer, wohingegen die höchste Konzentration die sofortige Schwächung der Zell-Substrat-Kontakte bewirkte.

Während der Reporterassay eine wesentlich sensitivere Detektion geringster CdCl_2 -Konzentrationen ($t=6 \text{ h}$: $7\text{-}35 \mu\text{M CdCl}_2$) im Medium ermöglicht, ist eine Anwendung des Assays für Konzentrationen oberhalb der akuten Toxizitätsgrenze nicht zweckmäßig. Unter diesen Bedingungen erfolgt eine maßgebliche Hemmung der Proteinbiosynthese, einhergehend mit einer verminderten Expression des Reportergens GFP ($45 \mu\text{M CdCl}_2$). Im Gegensatz dazu erfolgt die ECIS-Messung unabhängig von intrazellulären Prozessen, da ein passives Monitoring der Zellkörperkontraktionen oder der Membranpermeabilisierung bzw. -lyse zugrunde liegt. Daher ist es mittels impedimetrischem Readout möglich die zelluläre Antwort der Zellen quantitativ bis zur vollständigen Permeabilisierung der Zellmembran bzw. dem Abkugeln von der Elektrodenoberfläche zu verfolgen ($45\text{-}100 \mu\text{M CdCl}_2$).

Durch die Parallelisierung beider Verfahren erfolgt eine umfassende und ergänzende Beschreibung der zellulären Antwort über große Konzentrationsbereiche und ermöglicht eine verlässlichere Analyse der untersuchten Substanz. Ferner besteht durch die Kombination beider Verfahren die Möglichkeit zur Diskriminierung positiver von negativen Effekte bzw. die gegenseitige Kontrolle, charakterisiert durch ein kontinuierliches, sensibles und nicht-invasives Monitoring. Erfolgt beispielsweise die Applikation einer, eine unmittelbar akute Toxizität hervorrufende Substanz, wäre mittels alleiniger fluoreszenzoptischen Auswertung keine quantitative Beschreibung des Reaktionsszenarios möglich bzw. könnte dies sogar in falschnegativer Interpretation des Ergebnisses resultieren. Nur durch die gleichzeitige impedimetrische Charakterisierung der zellulären Antwort, kann unterschieden werden, ob bei unverändertem Fluoreszenzsignal die Untersuchungssubstanz

keine Reaktion auslöste oder die Zellphysiologie so stark beeinträchtigt wurde, dass es zur Hemmung der Proteinbiosynthese kam.

Miniaturisierte Gesamtanalysesysteme (μ TAS) ermöglichen die Kombination mehrerer Analyseverfahren zur komplexen Beschreibung toxikologischer Effekte. Die Entwicklung solcher Systeme für die Integration zellbasierter Biosensoren stellt dabei, aufgrund der anspruchsvollen Natur des biologischen Erkennungselements, eine Herausforderung dar und erfordert die Verschmelzung interdisziplinärer Fachgebiete. Das im Rahmen dieser Arbeit konzipierte Chipsystem bildet nicht nur ein ideales Zellkultursubstrat, sondern realisiert perspektivisch neben der automatisierten Zumischung der Testsubstanzen auch die kombinierte optische und impedimetrische Beobachtung zellschädigender Effekte.

Bereits bei der Wahl des Trägermaterials wurden im Zuge der Entwicklungen des Systems neue Wege beschritten. Innerhalb der letzten zwei Jahrzehnte setzte sich auf dem Gebiet der Mikrofluidik das Material Polydimethylsiloxan (PDMS), aufgrund seines einfachen Fertigungsprozesses für Kleinserien und seiner Materialeigenschaften, wie Gaspermeabilität, optischer Transparenz und Flexibilität besonders durch. Die kontinuierliche Verknüpfung von Mikrosystemtechnik und komplexen biologischen Fragestellungen hin zur Entwicklung von Zellkulturplattformen erforderte allerdings ein Umdenken innerhalb der wissenschaftlichen Gemeinschaft. Zunehmend wurden Limitationen des Materials beschrieben, die z.B. dessen Befähigung zur Absorption kleinster Moleküle und daraus resultierenden Konzentrationsveränderungen in biologischen Assays innerhalb pharmakologischer oder auch toxikologischer Studien betreffen [206]. Neben der Tatsache, dass der softlithographische Fertigungsprozess zu viele sequenzielle Schritte zur Massenproduktion und Automatisierung benötigt, ist ein erheblicher Nachteil die Verformbarkeit bzw. die Flexibilität des Materials für definierte, z.B. bei der Mikromischung notwendige Strukturen [207]. Eine Alternative zu PDMS bietet das thermoplastische COC, welches sich durch exzellente optische Transparenz, chemische und thermische Stabilität sowie der Massenproduktion mittels Spritzguss eignet [208]. Die problemlose Elektrodenfertigung auf COC sowie Lösungen zum Fügen dieses Materials wurden aufgezeigt und damit ein Beitrag zur Akzeptanz dieses Materials geleistet, indem ein funktionales, biokompatibles und zur Mikroskopie geeignetes COC-basiertes Chipsystem präsentiert wurde.

Die Goldfilmelektroden bieten nicht nur ein optimales Kultursubstrat, sondern ermöglichen die kontinuierliche impedimetrische Analyse der Zellmorphologie. Gold wird dabei aufgrund seiner inerten Eigenschaften bevorzugt als Elektrodenmaterial eingesetzt. Das Edelmetall zeichnet sich gegenüber anderen Vertretern seiner Gruppe durch eine sehr hohe Leitfähigkeit aus, ist besonders biokompatibel, leicht zu modifizieren und durch Sputtern in wohl definierten Schichten zu erzeugen, ohne den polymeren Träger zu großen Temperaturen auszusetzen. Goldfilme zeigen eine gute Haftung auf entsprechend vorbereiteten

Polymeroberflächen und sind mit etablierten Protokollen reproduzierbar lithographisch zu strukturieren [177, 209, 210]. Das Layout der Elektroden wurde dabei so erstellt, dass innerhalb eines definierten Bereiches gleichzeitig eine uneingeschränkte fluoreszenzoptische Auswertung möglich ist. Durch die Eigenschaften der gefertigten Goldfilmelektroden entfallen außerdem weitere Oberflächenmodifikationsverfahren, z.B. die Plasmabehandlung der Zellkulturkammern [211], die aufgrund des hydrophoben Charakters des Kunststoffmaterials andernfalls nötig wären. Die in Suspension in das Chipsystem eingesäten Zellen sammeln sich bevorzugt auf den hydrophilen Goldfilmelektroden an. Restliche, in den Kanälen bzw. in der Mikromischerstruktur befindlichen Zellen adhäreren unzureichend auf dem hydrophoben COC und werden bei Start der fluidischen Versorgung größtenteils aus dem System gespült.

Weiterhin wurden die Geometrien des Chipsystems so angepasst, dass die Positionierung auf dem motorisierten Mikroskopoptisch bei vollständiger fluidischer und elektrischer Kontaktierung in Einklang mit der Temperiereinheit erfolgen kann. Dafür wurde eine Chiphalterung entworfen und gefertigt, die das Gesamtsystem mechanisch und funktional kombiniert, sodass das automatisierte Auslesen jeder Zellkulturkammer realisiert wird. Zunächst wurde eine transparente Heizfolie genutzt, die in der Folge aufgrund der enormen Eigenfluoreszenz des Materials und ihrer mäanderförmigen Anlage des eigentlichen Heizdrahtes, durch ein ITO-basiertes Heizelement ersetzt wurde. Dadurch wurde die Hintergrundfluoreszenz des Gesamtsystems minimiert und eine noch gleichmäßigere Temperierung des Chips realisiert.

Das demonstrierte Chipsystem bildet die Grundlage für einen integrierten zellbasierten Biosensor, dessen Alleinstellungsmerkmal die zweischichtige Generierung von physiologisch relevanten Datensätzen ist. Die nicht überwindbare verhältnismäßig langsame Sensorantwort zellbasierter Erkennungselemente, begründet in stattfindenden Diffusionsprozessen und intrazellulär ablaufenden Reaktionsmechanismen, wurden durch die Anwendung biomikrosystemtechnischer hin zu automatisierten Lösungen auf sensitiver, nicht-invasiver und zeitaufgelöster Basis kompensiert. Eines der fundamentalen Ziele der Biomikrosystemtechnik, das Mikrosystem *lebende Zelle* in technische Mikrosysteme, die sowohl physiologische Umgebungsbedingungen schaffen als auch die Sensorik zur Verfügung stellen, die für eine empfindliche Detektion zellulärer Signale notwendig ist, konnte erreicht werden. Nach derzeitigem Kenntnisstand existiert kein vergleichbares System, welches sich durch die folgenden Eigenschaften und Funktionalitäten auszeichnet:

- Integrierte Mikromischung
- Minimaler Substanz- und Mediumsverbrauch
- Uneingeschränkte Langzeitkultivierung eukaryotischer Zellen

- Minimaler Scherstress im Kultursubstrat
- Inkubatorunabhängigkeit
- Kontinuierliche optische und impedimetrische Überwachung der Sensorzelllinie
- Weitestgehende Automatisierung

Gelingt die Weiterentwicklung bzw. die vollständige Integration dieses Chipsystems ist ein Gesamtanalysesystem geschaffen, welches nicht nur eine Alternative zu *In-vitro*-Hautirritationstest darstellt, sondern unter Einsatz anderer Zellmodelle, z.B. der Leber oder Niere, eine Plattform zur breitgefächerten Anwendung in der Toxikologie, Pharmakologie und im Wirkstoffscreening bildet.

9 Zusammenfassung

Zur Detektion auftretender molekularer Mechanismen, assoziiert mit einer toxisch-irritativen Kontaktdermatitis, wurden erstmalig auf Keratinozyten (HaCaT) basierende Sensorzelllinien als biologisches Erkennungselement etabliert. Die Optimierung und Validierung der Sensorzelllinien erfolgte dabei am Beispiel des Umwelttoxins CdCl₂. Insgesamt wurden vier stressensitive Biomarker (HSP27, HSP72, HSP70B' und HMOX-1) mittels qRT-PCR untersucht. Dabei wurde zunächst die Expression von HSP72 als empfindlich genug eingeschätzt, um als Sensor für die Detektion von xenobiotischen Stresssituationen in einem Reporterassay mit GFP zu dienen. Es zeigte sich, dass sich die etablierte Sensorzelllinie pHSP72_pAcGFP1-1 für die quantitative Detektion zytotoxischer Effekte unter subletalen Bedingungen und kürzeren Inkubationszeiten, verglichen zu gewöhnlichen Endpunktmessungen, eignet.

Einen möglichen Biomarker, der sich durch eine höhere Promotoraktivität infolge der Einwirkung der Standardstressbedingungen auszeichnet und dadurch das Signal-Rausch-Verhältnis des Reporterassays maßgeblich verbessern könnte, zeigten Genexpressionsanalysen von HSP70B' auf. Während übereinstimmende Nachweisgrenzen für beide Sensorzelllinien ermittelt wurden, zeichnete sich die Sensorzelllinie pHSP70B_pAcGFP1-1 durch ein 1,5-fach verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis bei Konzentration von 20-40 µM CdCl₂ aus.

Schließlich erfolgte eine umfangreichere Untersuchung des *In-vitro*-Testmodells mit einer erweiterten Auswahl von Testsubstanzen. Die hinsichtlich ihrer chemischen Struktur und bekannten Wirkungen sehr vielfältigen Substanzen zeigten nicht nur mögliche Anwendungen des etablierten Reporterassays auf, sondern ermöglichten gleichzeitig die umfangreichere Charakterisierung der Sensorzellen. Besonders durch die Erweiterung des Substanzspektrums um DNCB und NiSO₄ wurde deutlich, dass sich die etablierten Sensorzelllinien besonders als repräsentative Marker für die frühzeitige Erkennung der Stoffwechsellage des oxidativen Stresses eignen. Während sowohl CdCl₂ als auch DNCB schon bei geringen Konzentrationen die Produktion von ROS in Keratinozyten induzieren, geht von NiSO₄ keine derartige Wirkung aus. Dies ist unabhängig davon, ob die Substanzen prinzipiell eine toxisch-irritative (CdCl₂) oder allergische Kontaktdermatitis (DNCB) *in vivo* hervorrufen.

Weiterhin wurden Pflanzenextrakte der *A. montana*, *A. cotula*, *H. autumnale* und *S. officinalis* untersucht. Ausgehend von den Extrakt-Konzentrationen entsprechend der EC_{80} -Werte bestimmt mittels MTT, konnte ein besonders deutliches zellschädigendes Potenzial bei Einwirkung von *A. montana* nachgewiesen werden. Die zytotoxischen Eigenschaften des Arnika-Extraktes sind dabei auf das Sesquiterpenlacton Helenalin und dessen Befähigung zur ROS-Generierung zurückzuführen.

Unter Einsatz von μ Slides^{0,4}Luer wurde eine mikrofluidische Zellkulturplattform geschaffen, die die verlässliche und kontinuierliche Kultivierung des HaCaT-Zellmodells in CO_2 -unabhängiger Umgebung realisiert. Alle an eine solche Plattform gestellten Anforderungen, wie Sterilität, Kontinuität, weitestgehende Automatisierung und die Schaffung optimaler Wachstumsbedingungen für eukaryotische Zelllinien konnten umgesetzt werden. Dies spiegelt neben der mikroskopischen Dokumentation des Zellverhaltens über 72 h auch der in einer Zellkulturflasche ermittelte und mit der inkubatorunabhängigen Kultivierung in μ Slides^{0,4}Luer übereinstimmende Proliferationsfaktor von 1,9 ($t=24$ h) wider. Weiterhin erfolgte die Integration der Sensorzelllinie in die mikrofluidische Plattform und die zeitaufgelöste fluoreszenzoptische Detektion toxisch-irritativer Effekte.

Ferner wurde erstmalig die Kombination von optischen und impedimetrischen Detektionsverfahren angestrebt, um eine umfassende quantitative Charakterisierung von Veränderungen des Zellmetabolismus und der Zellmorphologie als Antwort auf eine schädigende Substanz zu ermöglichen. Die individuellen Stärken und Limitation des Reporterassays einerseits und des markerfreien, impedimetrischen Monitorings andererseits konnten dabei deutlich aufgezeigt werden. Während der Stresspromotor-Reporter-Assay eine wesentlich sensitivere Detektion geringster $CdCl_2$ -Konzentrationen im Medium ermöglicht, ist eine Anwendung des Assays für Konzentrationen oberhalb der akuten Toxizitätsgrenze nicht zweckmäßig.

Darauf aufbauend wurde ein Chipsystem entworfen, welches eingebunden in die mikrofluidische Plattform perspektivisch die Kombination beider Detektionsverfahren zur multiplen, zeitaufgelösten Detektion zellschädigender Effekte bietet. Vielschichtige Einflussfaktoren wurden bei der Konzeption des Chipsystems berücksichtigt, die zur Entwicklung eines optimierten, komplexen Systems führten. Es realisiert die Zumischung der Untersuchungssubstanzen, die Kultivierung eukaryotischer Zellen über längere Zeiträume bei minimalem Substanzverbrauch und kombiniert zielführend die optische Detektion mit den am Boden der Zellkulturkammern befindlichen Goldfilmelektroden zum impedimetrischen Monitoring. Die Funktionalität des Systems als Basis für die miniaturisierte Kultivierung eukaryotischer Zellen wurde aufgezeigt und damit eine wesentliche Grundlage zur vollen Integration des Chipsystems in Form eines μ TAS für die Anwendung in der Dermatologie, Toxikologie, Pharmakologie und im Wirkstoffscreening geleistet.

10 Summary

To detect occurring mechanisms associated with irritant contact dermatitis a sensor cell line based on keratinocytes (HaCaT) acting as biological element was established. The environmental toxin CdCl₂ was used for optimization and validation of the sensor cell line. Four stress-sensitive biomarkers (HSP27, HSP72, HSP70B' und HMOX-1) were investigated using qRT-PCR. Thereby the expression of HSP72 was assessed as sensitive enough to serve as a sensor for detection of xenobiotic stress in a reporter gene assay with GFP. It was demonstrated that the sensor cell line pHSP72_pAcGFP1-1 is suitable to quantitatively detect cytotoxicity under sublethal conditions and shorter incubation periods compared to endpoint measurements.

Another promising biomarker, characterized by a high promoter activity following exposure to standard stress conditions enabling a better signal-to-noise ratio of the reporter gene assay, was shown by gene expression analysis of HSP70B'. Whilst consisting limits of detection were determined for both sensor cell lines, pHSP70B_pAcGFP1-1 was characterized by a 1,5-fold better signal-to-noise ratio in the concentration range of 20-40 μM CdCl₂.

Finally the *in vitro* test system was exposed to an extended selection of test substances. All substances, chosen in respect to their diverse chemical structure and known effects, not only enabled to suggest possible applications of the established reporter gene assays, but also provided further insights to the characteristics of the sensor cells. Especially by addition of DNCB and NiSO₄ to the substrate spectra it was noticeable that the sensor cell line serves as a representative marker for the early detection of oxidative stress. While CdCl₂ and DNCB already induced the production of ROS in keratinocytes at low concentrations of the toxin, no comparable effect was observed for NiSO₄. This is independent no matter whether the substance is causing an irritant (CdCl₂) or allergic contact dermatitis (DNCB) *in vivo*.

Furthermore plant extracts of *A. montana*, *A. cotula*, *H. autumnale* and *S. officinalis* were investigated. Originating from the extract concentration according to the EC₈₀ values determined by MTT, a particular cell damaging potential of *A. montana* was proven. The cytotoxic properties of the extract are due to the sesquiterpenlacton Helenalin and its ability to produce ROS.

A microfluidic platform was established based on μ Slides^{0,4}Luer to allow for a convenient, sterile and incubator-independent time-lapse microscopic observation of the HaCaT cell line. All requirements for this platform, such as sterility, continuity, increased level of automation and establishment of optimal cell culture conditions were fulfilled. Cell growth was successfully achieved in this microfluidic setup, which was demonstrated by microscopic documentation of the cellular behavior over 72h. Furthermore a consistent increase in cell number by a factor of 1.9 within 24 h was observed for standard cell culture procedures as well as under incubator-independent conditions. By integration of the sensor cell line into the microfluidic platform the cellular response to a cytotoxic substance could be followed in a sensitive, real-time and non-invasive manner.

Moreover the combination of optical and impedimetric readouts was aspired, to allow for an overall quantitative characterization of changes in cell metabolism and morphology as a response to toxin exposure. Direct comparison of the reporter gene assay on the one hand, and label-free impedimetric monitoring on the other hand, revealed their individual strengths and limitations. Whereas the reporter gene more sensitively reported on small concentrations of cadmium in the extracellular buffer than ECIS recordings, it failed when cadmium concentrations were beyond the threshold concentration of acute cytotoxicity.

On this basis, a chip system as part of a modified microfluidic platform was designed, that combines the described readouts for conducting multiple real-time measurements. The design of the chip is characterized by a high complexity and technical cross talk, which needs to be considered and combined to meet all demands of a semi-automated *in vitro* test system in addition to common cell culture practice. The chip realizes the admixture of the test substances, the long term cultivation of eukaryotic cells with minimal media consumption and expediently combines the optical detection with the gold film electrodes at the bottom of the cell culture chamber for impedimetric monitoring. The functionality of the chip as culture substrate was demonstrated and thus an essential basis for the full integration of the chip system towards a μ TAS was achieved, suitable for application in dermatology, toxicology, pharmacology as well as drug screenings.

Literaturverzeichnis

- [1] CLARK, L. C.; LYONS, C.: Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. In: *Ann N Y Acad Sci* 102 (1962), Nr. 1, S. 29–45
- [2] RASOOLY, A.; HEROLD, K. E.: *Optical-based detectors*. Totowa, NJ: Humana Press, 2009
- [3] McNAUGHT, A. D.: *Compendium of chemical terminology. IUPAC recommendations*. 2. ed. Oxford [u.a.]: Blackwell Science, 1997
- [4] VO-DINH, T.; CULLUM, B.: Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. In: *Fresenius J Anal Chem* 366 (2000), Nr. 6-7, S. 540–51
- [5] SCHELLER, F.; SCHUBERT, F.; WOLLENBERGER, U.: *Biosensoren*. Basel [u.a.]: Birkhäuser, 1989
- [6] ROGERS, K. R.: Principles of affinity-based biosensors. In: *Mol Biotechnol* 14 (2000), Nr. 2, S. 109–29
- [7] SCHELLER, F. W.; WOLLENBERGER, U.; WARSINKE, A.; LISDAT, F.: Research and development in biosensors. In: *Curr Opin Biotechnol* 12 (2001), Nr. 1, S. 35–40
- [8] HOLFORD, T. R.; DAVIS, F.; HIGSON, S. P.: Recent trends in antibody based sensors. In: *Biosens Bioelectron* 34 (2012), Nr. 1, S. 12–24
- [9] RAUT, N.; O'CONNOR, G.; PASINI, P.; DAUNERT, S.: Engineered cells as biosensing systems in biomedical analysis. In: *Anal Bioanal Chem* 402 (2012), Nr. 10, S. 3147–59
- [10] BEN-YOAV, H.; MELAMED, S.; FREEMAN, A.; SHACHAM-DIAMAND, Y.; BELKIN, S.: Whole-cell biochips for bio-sensing: integration of live cells and inanimate surfaces. In: *Crit Rev Biotechnol* 31 (2011), Nr. 4, S. 337–53
- [11] PANG, W.; ZHAO, H.; KIM, E. S.; ZHANG, H.; YU, H.; HU, X.: Piezoelectric microelectromechanical resonant sensors for chemical and biological detection. In: *Lab Chip* 12 (2012), Nr. 1, S. 29–44

- [12] VOICULESCU, I.; NORDIN, A. N.: Acoustic wave based MEMS devices for biosensing applications. In: *Biosens Bioelectron* 33 (2012), Nr. 1, S. 1–9
- [13] GRIFFIN, G. D.; STRATIS-CULLUM, D. N.: Biosensors. In: *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*. Oxford: Academic Press, 2009
- [14] THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S.: Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. In: *Biosens Bioelectron* 16 (2001), Nr. 1-2, S. 121–31
- [15] RIEDEL, K.: *Biosensoren für die Umweltkontrolle*. München: Oldenbourg Industrie-verl., 2003
- [16] KONCKI, R.: Recent developments in potentiometric biosensors for biomedical analysis. In: *Anal Chim Acta* 599 (2007), Nr. 1, S. 7–15
- [17] DANIELS, J. S.; POURMAND, N.: Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges. In: *Electroanalysis* 19 (2007), Nr. 12, S. 1239–57
- [18] FAN, X.; WHITE, I. M.; SHOPOVA, S. I.; ZHU, H.; SUTER, J. D.; SUN, Y.: Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: a review. In: *Anal Chim Acta* 620 (2008), Nr. 1-2, S. 8–26
- [19] BRECHT, A.; GAUGLITZ, G.: Recent developments in optical transducers for chemical or biochemical applications. In: *Sensors and Actuators B: Chemical* 38 (1997), Nr. 1-3, S. 1–7
- [20] PILIARIK, M.; VAISOCHEROVÁ, H.; HOMOLA, J.: Surface plasmon resonance biosensing. In: *Methods Mol Biol* 503 (2009), S. 65–88
- [21] KARLSSON, R.: SPR for molecular interaction analysis: a review of emerging application areas. In: *J Mol Recognit* 17 (2004), Nr. 3, S. 151–61
- [22] QUINN, J. G.; O'NEILL, S.; DOYLE, A.; McATAMNEY, C.; DIAMOND, D.; MACCRAITH, B. D.; O'KENNEDY, R.: Development and application of surface plasmon resonance-based biosensors for the detection of cell-ligand interactions. In: *Anal Biochem* 281 (2000), Nr. 2, S. 135–43
- [23] PARK, J. S.; LEE, C. M.; LEE, K. Y.: A surface plasmon resonance biosensor for detecting *Pseudomonas aeruginosa* cells with self-assembled chitosan-alginate multilayers. In: *Talanta* 72 (2007), Nr. 2, S. 859–62

- [24] MIZUGUCHI, T.; UCHIMURA, H.; KATAOKA, H.; AKAJI, K.; KISO, Y.; SAITO, K.: Intact-cell-based surface plasmon resonance measurements for ligand affinity evaluation of a membrane receptor. In: *Anal Biochem* 420 (2012), Nr. 2, S. 185–7
- [25] HORII, M.; SHINOHARA, H.; IRIBE, Y.; SUZUKI, M.: Living cell-based allergen sensing using a high resolution two-dimensional surface plasmon resonance imager. In: *Analyst* 136 (2011), Nr. 13, S. 2706–11
- [26] GAUGLITZ, G.; PROLL, G.: Strategies for label-free optical detection. In: *Adv Biochem Eng Biotechnol* 109 (2008), S. 395–432
- [27] PROLL, G.; MARKOVIC, G.; STEINLE, L.; GAUGLITZ, G.: Reflectometric interference spectroscopy. In: *Methods Mol Biol* 503 (2009), S. 167–78
- [28] PROLL, G.; STEINLE, L.; PROLL, F.; KUMPF, M.; MOEHRLE, B.; MEHLMANN, M.; GAUGLITZ, G.: Potential of label-free detection in high-content-screening applications. In: *J Chromatogr A* 1161 (2007), Nr. 1-2, S. 2–8
- [29] FRITZSCHE, M.; MANDENIUS, C. F.: Fluorescent cell-based sensing approaches for toxicity testing. In: *Anal Bioanal Chem* 398 (2010), Nr. 1, S. 181–91
- [30] BANERJEE, P.; BHUNIA, A. K.: Mammalian cell-based biosensors for pathogens and toxins. In: *Trends Biotechnol* 27 (2009), Nr. 3, S. 179–88
- [31] STENGER, D. A.; GROSS, G. W.; KEEFER, E. W.; SHAFFER, K. M.; ANDREADIS, J. D.; MA, W.; PANCAZIO, J. J.: Detection of physiologically active compounds using cell-based biosensors. In: *Trends Biotechnol* 19 (2001), Nr. 8, S. 304–9
- [32] LI, N.; TOUROVSKAIA, A.; FOLCH, A.: Biology on a chip: microfabrication for studying the behavior of cultured cells. In: *Crit Rev Biomed Eng* 31 (2003), Nr. 5-6, S. 423–88
- [33] O'SHAUGHNESSY, J.; PANCAZIO, J. J.: Broadband Detection of Environmental Neurotoxicants. In: *Analytical Chemistry* 79 (2007), Nr. 23, S. 8838–45
- [34] PAMPALONI, F.; REYNAUD, E. G.; STELZER, E. H.: The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (2007), Nr. 10, S. 839–45
- [35] LAGARDE, F.; JAFFREZIC-RENAULT, N.: Cell-based electrochemical biosensors for water quality assessment. In: *Anal Bioanal Chem* 400 (2011), Nr. 4, S. 947–64
- [36] D'SOUZA, S. F.: Microbial biosensors. In: *Biosens Bioelectron* 16 (2001), Nr. 6, S. 337–53

- [37] SØRENSEN, S. J.; BURMØLLE, M.; HANSEN, L. H.: Making bio-sense of toxicity: new developments in whole-cell biosensors. In: *Curr Opin Biotechnol* 17 (2006), Nr. 1, S. 11–6
- [38] GIAEVER, I.; KEESE, C. R.: Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 81 (1984), Nr. 12, S. 3761–4
- [39] GHIM, C. M.; LEE, S. K.; TAKAYAMA, S.; MITCHELL, R. J.: The art of reporter proteins in science: past, present and future applications. In: *BMB Rep* 43 (2010), Nr. 7, S. 451–60
- [40] MULISCH, M.; WELSCH, U.; AESCHT, E.; ROMEIS, B.: *Romeis mikroskopische Technik*. 18. Aufl. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl., 2010
- [41] MEIGHEN, E. A.: Molecular biology of bacterial bioluminescence. In: *Microbiol Rev* 55 (1991), Nr. 1, S. 123–42
- [42] GUPTA, R. K.; PATTERSON, S. S.; RIPP, S.; SIMPSON, M. L.; SAYLER, G. S.: Expression of the *Photobacterium luminescens* lux genes (luxA, B, C, D, and E) in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *FEMS Yeast Res* 4 (2003), Nr. 3, S. 305–13
- [43] KAIN, S. R.: Green fluorescent protein (GFP): applications in cell-based assays for drug discovery. In: *Drug Discov Today* 4 (1999), Nr. 7, S. 304–12
- [44] YANG, F.; MOSS, L. G.; PHILLIPS, Jr. G. N. G. N.: The molecular structure of green fluorescent protein. In: *Nat Biotechnol* 14 (1996), Nr. 10, S. 1246–51
- [45] ORMÖ, M.; CUBITT, A. B.; KALLIO, K.; GROSS, L. A.; TSIEN, R. Y.; REMINGTON, S. J.: Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. In: *Science* 273 (1996), Nr. 5280, S. 1392–5
- [46] CHALFIE, M.: *Green fluorescent protein. Properties, applications, and protocols*. New York, NY [u.a.]: Wiley-Liss, 1998
- [47] PRASHER, D. C.; ECKENRODE, V. K.; WARD, W. W.; PRENDERGAST, F. G.; CORMIER, M. J.: Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. In: *Gene* 111 (1992), Nr. 2, S. 229–33
- [48] CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W. W.; PRASHER, D. C.: Green fluorescent protein as a marker for gene expression. In: *Science* 263 (1994), Nr. 5148, S. 802–5

- [49] GURSKAYA, N. G.; FRADKOV, A. F.; POUNKOVA, N. I.; STAROVEROV, D. B.; BULINA, M. E.; YANUSHEVICH, Y. G.; LABAS, Y. A.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K. A.: A colourless green fluorescent protein homologue from the non-fluorescent hydromedusa *Aequorea coerulescens* and its fluorescent mutants. In: *Biochem J* 373 (2003), Nr. Pt 2, S. 403–8
- [50] VEITH, D.; VEITH, M.: Biologie fluoreszierender Proteine: Ein Regenbogen aus dem Ozean. In: *Biol Unserer Zeit* 35 (2005), Nr. 6, S. 394–404
- [51] WEGENER, J.: ECIS: Ein variabel einsetzbares elektrochemisches Verfahren - Lebende Zellen als Sensoren. In: *Forschungsjournal der Universität Münster* (2003), S. 11–17
- [52] WEGENER, J.; KEESE, C. R.; GIAEVER, I.: Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) as a noninvasive means to monitor the kinetics of cell spreading to artificial surfaces. In: *Exp Cell Res* 259 (2000), Nr. 1, S. 158–66
- [53] WEGENER, J.; HAKVOORT, A.; GALLA, H. J.: Barrier function of porcine choroid plexus epithelial cells is modulated by cAMP-dependent pathways in vitro. In: *Brain Res* 853 (2000), Nr. 1, S. 115–24
- [54] XIAO, C.; LACHANCE, B.; SUNAHARA, G.; LUONG, J. H.: Assessment of cytotoxicity using electric cell-substrate impedance sensing: concentration and time response function approach. In: *Anal Chem* 74 (2002), Nr. 22, S. 5748–53
- [55] ARNDT, S.; SEEBACH, J.; PSATHAKI, K.; GALLA, H. J.; WEGENER, J.: Bioelectrical impedance assay to monitor changes in cell shape during apoptosis. In: *Biosens Bioelectron* 19 (2004), Nr. 6, S. 583–94
- [56] LAKOWICZ, J. R.: *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3. ed. New York, NY: Springer, 2006
- [57] OTTO, M.: *Analytische Chemie*. 4., überarb. und erg. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH-Verl., 2011
- [58] SCHWEDT, G.: *Analytische Chemie. Grundlagen, Methoden und Praxis*. Stuttgart: Thieme, 2001
- [59] SKOOG, D. A.; LEARY, J. J.: *Instrumentelle Analytik. Grundlagen - Geräte - Anwendungen*. Berlin [u.a.]: Springer, 1996

-
- [60] KASHA, M.: Collisional Perturbation of Spin-Orbital Coupling and the Mechanism of Fluorescence Quenching. A Visual Demonstration of the Perturbation. In: *J Chem Phys* 20 (1952), Nr. 1, S. 71–74
- [61] HUANG, M.; FAN, S.; XING, W.; LIU, C.: Microfluidic cell culture system studies and computational fluid dynamics. In: *Mat Comput Model* 52 (2010), Nr. 11-12, S. 2036–42
- [62] XU, Y.; JANG, K.; YAMASHITA, T.; TANAKA, Y.; MAWATARI, K.; KITAMORI, T.: Microchip-based cellular biochemical systems for practical applications and fundamental research: from microfluidics to nanofluidics. In: *Anal Bioanal Chem* 402 (2012), Nr. 1, S. 99–107
- [63] WU, M. H.; HUANG, S. B.; LEE, G. B.: Microfluidic cell culture systems for drug research. In: *Lab Chip* 10 (2010), Nr. 8, S. 939–56
- [64] YEO, L. Y.; CHANG, H. C.; CHAN, P. P.; FRIEND, J. R.: Microfluidic devices for bioapplications. In: *Small* 7 (2011), Nr. 1, S. 12–48
- [65] ZHANG, B.; KIM, M. C.; THORSEN, T.; WANG, Z.: A self-contained microfluidic cell culture system. In: *Biomed Microdevices* 11 (2009), Nr. 6, S. 1233–7
- [66] HUNG, P. J.; LEE, P. J.; SABOUNCHI, P.; AGHDAM, N.; LIN, R.; LEE, L. P.: A novel high aspect ratio microfluidic design to provide a stable and uniform microenvironment for cell growth in a high throughput mammalian cell culture array. In: *Lab Chip* 5 (2005), Nr. 1, S. 44–8
- [67] LINDER, V.; KOSTER, S.; FRANKS, W.; KRAUS, T.; VERPOORTE, E.; HEER, F.; HIERLEMANN, A.; ROOIJ, N. F.: Microfluidics/CMOS orthogonal capabilities for cell biology. In: *Biomed Microdevices* 8 (2006), Nr. 2, S. 159–66
- [68] WANG, Z.; KIM, M. C.; MARQUEZ, M.; THORSEN, T.: High-density microfluidic arrays for cell cytotoxicity analysis. In: *Lab Chip* 7 (2007), Nr. 6, S. 740–5
- [69] NEVILL, J. T.; COOPER, R.; DUECK, M.; BRESLAUER, D. N.; LEE, L. P.: Integrated microfluidic cell culture and lysis on a chip. In: *Lab Chip* 7 (2007), Nr. 12, S. 1689–95
- [70] PETRONIS, S.; STANGEGAARD, M.; CHRISTENSEN, C. B.; DUFVA, M.: Transparent polymeric cell culture chip with integrated temperature control and uniform media perfusion. In: *Biotechniques* 40 (2006), Nr. 3, S. 368–76

- [71] HUANG, C.-W.; LEE, G.-B.: A microfluidic system for automatic cell culture. In: *J Micromech Microeng* 17 (2007), Nr. 7, S. 1266
- [72] PAGUIRIGAN, A. L.; BEEBE, D. J.: Microfluidics meet cell biology: bridging the gap by validation and application of microscale techniques for cell biological assays. In: *Bioessays* 30 (2008), Nr. 9, S. 811–21
- [73] LIPPENS, S.; HOSTE, E.; VANDENABEELE, P.; AGOSTINIS, P.; DECLERCQ, W.: Cell death in the skin. In: *Apoptosis* 14 (2009), Nr. 4, S. 549–69
- [74] MUTSCHLER, E.: *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2008
- [75] PSCHYREMBEL, W.: *Klinisches Wörterbuch*. 258. Aufl. Berlin: de Gruyter, 1998
- [76] RIETSCHEL, R. L.: Occupational contact dermatitis. In: *The Lancet* 349 (1997), Nr. 9058, S. 1093–95
- [77] EBERHARD, Y.; ORTIZ, S.; RUIZ LASCANO, A.; KUZNITZKY, R.; SERRA, H. M.: Up-regulation of the chemokine CCL21 in the skin of subjects exposed to irritants. In: *BMC Immunol* 5 (2004), S. 7
- [78] LAMMINTAUSTA, K.; MAIBACH, H. I.; WILSON, D.: Mechanisms of subjective (sensory) irritation. Propensity to non-immunologic contact urticaria and objective irritation in stingers. In: *Derm Beruf Umwelt* 36 (1988), Nr. 2, S. 45–9
- [79] BÜCHNER, A.: Kontaktdermatitis. In: *Schweiz Med Forum* 18 (2001), S. 458–63
- [80] LÖFFLER, H.; EFFENDY, I.; HAPPLE, R.: Die irritative Kontaktdermatitis. In: *Der Hautarzt* 51 (2000), Nr. 3, S. 203–218
- [81] FLUHR, J. W.; DARLENSKI, R.; ANGELOVA-FISCHER, I.; TSANKOV, N.; BASKETTER, D.: Skin irritation and sensitization: mechanisms and new approaches for risk assessment. 1. Skin irritation. In: *Skin Pharmacol Physiol* 21 (2008), Nr. 3, S. 124–35
- [82] HANSEN, J. M.; GO, Y. M.; JONES, D. P.: Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. In: *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46 (2006), S. 215–34
- [83] JONES, D. P.: Radical-free biology of oxidative stress. In: *Am J Physiol Cell Physiol* 295 (2008), Nr. 4, S. C849–68

-
- [84] BARTOSZ, G.: Reactive oxygen species: destroyers or messengers? In: *Biochem Pharmacol* 77 (2009), Nr. 8, S. 1303–15
- [85] MAAS-SZABOWSKI, N.; STARKER, A.; FUSENIG, N. E.: Epidermal tissue regeneration and stromal interaction in HaCaT cells is initiated by TGF- α . In: *J Cell Sci* 116 (2003), Nr. Pt 14, S. 2937–48
- [86] TOMIC-CANIC, M.; KOMINE, M.; FREEDBERG, I. M.; BLUMENBERG, M.: Epidermal signal transduction and transcription factor activation in activated keratinocytes. In: *J Dermatol Sci* 17 (1998), Nr. 3, S. 167–81
- [87] BITO, T.; NISHIGORI, C.: Impact of reactive oxygen species on keratinocyte signaling pathways. In: *J Dermatol Sci* 68 (2012), Nr. 1, S. 3–8
- [88] WILKINSON, M. G.; MILLAR, J. B.: Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. In: *FASEB J* 14 (2000), Nr. 14, S. 2147–57
- [89] KRAUSS, G.: *Biochemistry of signal transduction and regulation*. 4. Weinheim: Wiley-VCH Verl., 2008
- [90] FRESHNEY, N. W.; RAWLINSON, L.; GUESDON, F.; JONES, E.; COWLEY, S.; HSUAN, J.; SAKLATVALA, J.: Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. In: *Cell* 78 (1994), Nr. 6, S. 1039–49
- [91] DIKER-COHEN, T.; KOREN, R.; RAVID, A.: Programmed cell death of stressed keratinocytes and its inhibition by vitamin D: the role of death and survival signaling pathways. In: *Apoptosis* 11 (2006), Nr. 4, S. 519–34
- [92] KARIN, M.; BEN-NERIAH, Y.: Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. In: *Annu Rev Immunol* 18 (2000), S. 621–63
- [93] PASPARAKIS, M.: Role of NF- κ B in epithelial biology. In: *Immunol Rev* 246 (2012), Nr. 1, S. 346–58
- [94] TKACHEV, V. O.; MENSCHIKOVA, E. B.; ZENKOV, N. K.: Mechanism of the Nrf2/Keap1/ARE signaling system. In: *Biochemistry (Mosc)* 76 (2011), Nr. 4, S. 407–22
- [95] VANDEBRIEL, R. J.; PENNING, J. L.; BAKEN, K. A.; PRONK, T. E.; BOORSMA, A.; GOTTSCHALK, R.; VAN LOVEREN, H.: Keratinocyte gene expression profiles discriminate sensitizing and irritating compounds. In: *Toxicol Sci* 117 (2010), Nr. 1, S. 81–9

- [96] SUN, J.; HOSHINO, H.; TAKAKU, K.; NAKAJIMA, O.; MUTO, A.; SUZUKI, H.; TASHIRO, S.; TAKAHASHI, S.; SHIBAHARA, S.; ALAM, J.; TAKETO, M. M.; YAMAMOTO, M.; IGARASHI, K.: Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. In: *EMBO J* 21 (2002), Nr. 19, S. 5216–24
- [97] RITOSSA, F.: A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. In: *Cell Mol Life Sci* 18 (1962), Nr. 12, S. 571–73
- [98] LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A.: The heat-shock proteins. In: *Annu Rev Genet* 22 (1988), S. 631–77
- [99] HARTL, F. U.; HLODAN, R.; LANGER, T.: Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations. In: *Trends Biochem Sci* 19 (1994), Nr. 1, S. 20–5
- [100] MORIMOTO, R. I.: Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. In: *Genes Dev* 12 (1998), Nr. 24, S. 3788–96
- [101] JONAK, C.; KLOSNER, G.; TRAUTINGER, F.: Heat shock proteins in the skin. In: *Int J Cosmet Sci* 28 (2006), Nr. 4, S. 233–41
- [102] DAI, R.; FREJTAG, W.; HE, B.; ZHANG, Y.; MIVECHI, N. F.: c-Jun NH₂-terminal kinase targeting and phosphorylation of heat shock factor-1 suppress its transcriptional activity. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Nr. 24, S. 18210–8
- [103] JONAK, C.; MILDNER, M.; KLOSNER, G.; PAULITSCHKE, V.; KUNSTFELD, R.; PEHAMBERGER, H.; TSCHACHLER, E.; TRAUTINGER, F.: The hsp27kD heat shock protein and p38-MAPK signaling are required for regular epidermal differentiation. In: *J Dermatol Sci* 61 (2011), Nr. 1, S. 32–7
- [104] SUR, R.; LYTE, P. A.; SOUTHALL, M. D.: Hsp27 regulates pro-inflammatory mediator release in keratinocytes by modulating NF-kappaB signaling. In: *J Invest Dermatol* 128 (2008), Nr. 5, S. 1116–22
- [105] WU, B.; HUNT, C.; MORIMOTO, R.: Structure and expression of the human gene encoding major heat shock protein HSP70. In: *Mol Cell Biol* 5 (1985), Nr. 2, S. 330–41
- [106] PARK, H. S.; CHO, S. G.; KIM, C. K.; HWANG, H. S.; NOH, K. T.; KIM, M. S.; HUH, S. H.; KIM, M. J.; RYOO, K.; KIM, E. K.; KANG, W. J.; LEE, J. S.; SEO, J. S.; KO, Y. G.; KIM, S.; CHOI, E. J.: Heat Shock Protein Hsp72 Is a Negative Regulator of Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1. In: *Mol Cell Bio* 22 (2002), Nr. 22, S. 7721–30

- [107] GABAI, V. L.; YAGLOM, J. A.; VOLLOCH, V.; MERIIN, A. B.; FORCE, T.; KOUTROUMANIS, M.; MASSIE, B.; MOSSER, D. D.; SHERMAN, M. Y.: Hsp72-mediated suppression of c-Jun N-terminal kinase is implicated in development of tolerance to caspase-independent cell death. In: *Mol Cell Biol* 20 (2000), Nr. 18, S. 6826–36
- [108] BEERE, H. M.; GREEN, D. R.: Stress management - heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. In: *Trends Cell Biol* 11 (2001), Nr. 1, S. 6–10
- [109] PARK, H. S.; LEE, J. S.; HUH, S. H.; SEO, J. S.; CHOI, E. J.: Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase. In: *EMBO J* 20 (2001), Nr. 3, S. 446–56
- [110] GONG, X.; LUO, T.; DENG, P.; LIU, Z.; XIU, J.; SHI, H.; JIANG, Y.: Stress-induced interaction between p38 MAPK and HSP70. In: *Biochem Biophys Res Commun* 425 (2012), Nr. 2, S. 357–62
- [111] NOONAN, E. J.; PLACE, R. F.; RASOULPOUR, R. J.; GIARDINA, C.; HIGHTOWER, L. E.: Cell number-dependent regulation of Hsp70B' expression: evidence of an extracellular regulator. In: *J Cell Physiol* 210 (2007), Nr. 1, S. 201–11
- [112] LEUNG, T. K.; RAJENDRAN, M. Y.; MONFRIES, C.; HALL, C.; LIM, L.: The human heat-shock protein family. Expression of a novel heat-inducible HSP70 (HSP70B') and isolation of its cDNA and genomic DNA. In: *Biochem J* 267 (1990), Nr. 1, S. 125–32
- [113] HATAYAMA, T.; ASAI, Y.; WAKATSUKI, T.; KITAMURA, T.; IMAHARA, H.: Regulation of hsp70 synthesis induced by cupric sulfate and zinc sulfate in thermotolerant HeLa cells. In: *J Biochem* 114 (1993), Nr. 4, S. 592–7
- [114] XU, Q.; SCHETT, G.; LI, C.; HU, Y.; WICK, G.: Mechanical stress-induced heat shock protein 70 expression in vascular smooth muscle cells is regulated by Rac and Ras small G proteins but not mitogen-activated protein kinases. In: *Circ Res* 86 (2000), Nr. 11, S. 1122–8
- [115] SCHMITZ, S.: *Der Experimentator: Zellkultur*. 2. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl., 2009
- [116] SCHÄFER-KORTING, M.; BOCK, U.; DIEMBECK, W.; DÜSING, H. J.; GAMER, A.; HALTNER-UKOMADU, E.; HOFFMANN, C.; KACA, M.; KAMP, H.; KERSEN, S.; KIETZMANN, M.; KORTING, H. C.; KRÄCHTER, H. U.; LEHR, C. M.; LIEBSCH, M.; MEHLING, A.; MÜLLER-GOYMAN, C.; NETZLAFF, F.; NIEDORF, F.; RÜBBELKE, M. K.; SCHÄFER, U.; SCHMIDT, E.; SCHREIBER, S.; SPIELMANN, H.; VUIA, A.; WEIMER, M.: The use of reconstructed

- human epidermis for skin absorption testing: Results of the validation study. In: *Altern Lab Anim* 36 (2008), Nr. 2, S. 161–87
- [117] SANCHEZ, L.; MITJANS, M.; INFANTE, M. R.; VINARDELL, M. P.: Assessment of the potential skin irritation of lysine-derivative anionic surfactants using mouse fibroblasts and human keratinocytes as an alternative to animal testing. In: *Pharm Res* 21 (2004), Nr. 9, S. 1637–41
- [118] BOUKAMP, P.; PETRUSSEVSKA, R. T.; BREITKREUTZ, D.; HORNUNG, J.; MARKHAM, A.; FUSENIG, N. E.: Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. In: *J Cell Biol* 106 (1988), Nr. 3, S. 761–71
- [119] BREITKREUTZ, D.; BOUKAMP, P.; RYLE, C. M.; STARK, H. J.; ROOP, D. R.; FUSENIG, N. E.: Epidermal morphogenesis and keratin expression in c-Ha-ras-transfected tumorigenic clones of the human HaCaT cell line. In: *Cancer Res* 51 (1991), Nr. 16, S. 4402–9
- [120] BREITKREUTZ, D.; SCHOOP, V. M.; MIRANCEA, N.; BAUR, M.; STARK, H. J.; FUSENIG, N. E.: Epidermal differentiation and basement membrane formation by HaCaT cells in surface transplants. In: *Eur J Cell Biol* 75 (1998), Nr. 3, S. 273–86
- [121] RYLE, C. M.; BREITKREUTZ, D.; STARK, H. J.; LEIGH, I. M.; STEINERT, P. M.; ROOP, D.; FUSENIG, N. E.: Density-dependent modulation of synthesis of keratins 1 and 10 in the human keratinocyte line HACAT and in ras-transfected tumorigenic clones. In: *Differentiation* 40 (1989), Nr. 1, S. 42–54
- [122] BREITKREUTZ, D.; STARK, H. J.; PLEIN, P.; BAUR, M.; FUSENIG, N. E.: Differential modulation of epidermal keratinization in immortalized (HaCaT) and tumorigenic human skin keratinocytes (HaCaT-ras) by retinoic acid and extracellular Ca²⁺. In: *Differentiation* 54 (1993), Nr. 3, S. 201–17
- [123] BOUKAMP, P.; POPP, S.; ALTMAYER, S.; HULSEN, A.; FASCHING, C.; CREMER, T.; FUSENIG, N. E.: Sustained nontumorigenic phenotype correlates with a largely stable chromosome content during long-term culture of the human keratinocyte line HaCaT. In: *Genes Chromosomes Cancer* 19 (1997), Nr. 4, S. 201–14
- [124] VINARDELL, M. P.; MITJANS, M.: Alternative methods for eye and skin irritation tests: an overview. In: *J Pharm Sci* 97 (2008), Nr. 1, S. 46–59
- [125] SPIELMANN, H.; HÖFFMANN, S.; LIEBSCH, M.; BOTHAM, P.; FENTEM, J. H.; ESKES, C.; ROGUET, R.; COTOVIO, J.; COLE, T.; WORTH, A.; HEYLINGS, J.; JONES, P.; ROBLES, C.; KANDÁROVÁ, H.; GAMER, A.; REMMELE, M.; CURREN, R.; RAABE, H.; COCKSHOT, A.

- GERNER, I.; ZUANG, V.: The ECVAM international validation study on in vitro tests for acute skin irritation: report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the Skin Integrity Function Test. In: *Altern Lab Anim* 35 (2007), Nr. 6, S. 559–601
- [126] GIBBS, S.: In vitro irritation models and immune reactions. In: *Skin Pharmacol Physiol* 22 (2009), Nr. 2, S. 103–13
- [127] MOSMANN, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. In: *J Immunol Methods* 65 (1983), Nr. 1-2, S. 55–63
- [128] ROEHM, N. W.; RODGERS, G. H.; HATFIELD, S. M.; GLASEBROOK, A. L.: An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. In: *J Immunol Methods* 142 (1991), Nr. 2, S. 257–65
- [129] NGAMWONGSATIT, P.; BANADA, P. P.; PANBANGRED, W.; BHUNIA, A. K.: WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic *Bacillus* species using CHO cell line. In: *J Microbiol Methods* 73 (2008), Nr. 3, S. 211–5
- [130] DECKER, T.; LOHMANN-MATTHES, M. L.: A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. In: *J Immunol Methods* 115 (1988), Nr. 1, S. 61–9
- [131] REPETTO, G.; PESO, A. del; ZURITA, J. L.: Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. In: *Nat Protoc* 3 (2008), Nr. 7, S. 1125–31
- [132] FALLER, C.; BRACHER, M.; DAMI, N.; ROGUET, R.: Predictive ability of reconstructed human epidermis equivalents for the assessment of skin irritation of cosmetics. In: *Toxicol In Vitro* 16 (2002), Nr. 5, S. 557–72
- [133] COQUETTE, A.; BERNA, N.; VANDENBOSCH, A.; ROSDY, M.; DE WEVER, B.; POUMAY, Y.: Analysis of interleukin-1alpha (IL-1alpha) and interleukin-8 (IL-8) expression and release in in vitro reconstructed human epidermis for the prediction of in vivo skin irritation and/or sensitization. In: *Toxicol In Vitro* 17 (2003), Nr. 3, S. 311–21
- [134] KIM, D. H.; BYAMBA, D.; WU, W. H.; KIM, T. G.; LEE, M. G.: Different characteristics of reactive oxygen species production by human keratinocyte cell line cells in response to allergens and irritants. In: *Exp Dermatol* 21 (2012), Nr. 2, S. 99–103

- [135] MAGCWEBEBA, T.; RIEDEL, S.; SWANEVELDER, S.; BOUIC, P.; SWART, P.; GELDERBLOM, W.: Interleukin-1alpha Induction in Human Keratinocytes (HaCaT): An In Vitro Model for Chemoprevention in Skin. In: *J Skin Cancer* 2012 (2012), S. 393681
- [136] BHOGAL, N.; GRINDON, C.; COMBES, R.; BALLS, M.: Toxicity testing: creating a revolution based on new technologies. In: *Trends Biotechnol* 23 (2005), Nr. 6, S. 299–307
- [137] NIWA, M.; NAGAI, K.; OIKE, H.; KOBORI, M.: Evaluation of the skin irritation using a DNA microarray on a reconstructed human epidermal model. In: *Biol Pharm Bull* 32 (2009), Nr. 2, S. 203–8
- [138] FLETCHER, S. T.; BAKER, V. A.; FENTEM, J. H.; BASKETTER, D. A.; KELSELL, D. P.: Gene expression analysis of EpiDerm following exposure to SLS using cDNA microarrays. In: *Toxicol In Vitro* 15 (2001), Nr. 4-5, S. 393–8
- [139] THANGJAM, G. S.; KONDAIAH, P.: Regulation of oxidative-stress responsive genes by arecoline in human keratinocytes. In: *J Periodontal Res* 44 (2009), Nr. 5, S. 673–82
- [140] BOXMAN, I. L.; HENSBERGEN, P. J.; VAN DER SCHORS, R. C.; BRUYNZEEL, D. P.; TENSEN, C. P.; PONEC, M.: Proteomic analysis of skin irritation reveals the induction of HSP27 by sodium lauryl sulphate in human skin. In: *Br J Dermatol* 146 (2002), Nr. 5, S. 777–85
- [141] ZHANG, Q.; DAI, T.; ZHANG, L.; ZHANG, M.; XIAO, X.; HU, H.; ZOU, P.; LIU, X.; XIANG, Q.; SU, Z.; HUANG, Y.; HE, Q. Y.: Identification of potential biomarkers for predicting acute dermal irritation by proteomic analysis. In: *J Appl Toxicol* 31 (2011), Nr. 8, S. 762–72
- [142] AÏT-AÏSSA, S.; PORCHER, J.; ARRIGO, A.; LAMBRÉ, C.: Activation of the hsp70 promoter by environmental inorganic and organic chemicals: relationships with cytotoxicity and lipophilicity. In: *Toxicology* 145 (2000), Nr. 2-3, S. 147–57
- [143] WADA, K.; TANIGUCHI, A.; OKANO, T.: Highly sensitive detection of cytotoxicity using a modified HSP70B' promoter. In: *Biotechnol Bioeng* 97 (2007), Nr. 4, S. 871–6
- [144] MIGITA, S.; WADA, K.; TANIGUCHI, A.: Reproducible fashion of the HSP70B' promoter-induced cytotoxic response on a live cell-based biosensor by cell cycle synchronization. In: *Biotechnol Bioeng* 107 (2010), Nr. 3, S. 561–5
- [145] EMTER, R.; ELLIS, G.; NATSCH, A.: Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. In: *Toxicol Appl Pharmacol* 245 (2010), Nr. 3, S. 281–90

- [146] PFAFFL, M. W.: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. In: *Nucleic Acids Res* 29 (2001), Nr. 9, S. e45
- [147] HELLEMANS, J.; MORTIER, G.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J.: qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. In: *Genome Biol* 8 (2007), Nr. 2, S. R19
- [148] INVITROGEN: *DAPI Nucleic Acid Stain*, 2006
- [149] STOLWIJK, J. A.; HARTMANN, C.; BALANI, P.; ALBERMANN, S.; KEESE, C. R.; GIAEVER, I.; WEGENER, J.: Impedance analysis of adherent cells after in situ electroporation: non-invasive monitoring during intracellular manipulations. In: *Biosens Bioelectron* 26 (2011), Nr. 12, S. 4720–7
- [150] SUN, H.; XIA, M.; AUSTIN, C. P.; HUANG, R.: Paradigm shift in toxicity testing and modeling. In: *AAPS J* 14 (2012), Nr. 3, S. 473–80
- [151] EL-ALI, J.; SORGER, P. K.; JENSEN, K. F.: Cells on chips. In: *Nature* 442 (2006), Nr. 7101, S. 403–11
- [152] PALMER, A. E.; QIN, Y.; PARK, J. G.; McCOMBS, J. E.: Design and application of genetically encoded biosensors. In: *Trends Biotechnol* 29 (2011), Nr. 3, S. 144–52
- [153] MORGAN, W. D.; WILLIAMS, G. T.; MORIMOTO, R. I.; GREENE, J.; KINGSTON, R. E.; TJIAN, R.: Two transcriptional activators, CCAAT-box-binding transcription factor and heat shock transcription factor, interact with a human hsp70 gene promoter. In: *Mol Cell Biol* 7 (1987), Nr. 3, S. 1129–38
- [154] JEYASEELAN, K.; MA, D.; ARMUGAM, A.: Real-time detection of gene promoter activity: quantitation of toxin gene transcription. In: *Nucleic Acids Res* 29 (2001), Nr. 12, S. E58–8
- [155] PARSIAN, A. J.; SHEREN, J. E.; TAO, T. Y.; GOSWAMI, P. C.; MALYAPA, R.; VAN RHEEDEN, R.; WATSON, M. S.; HUNT, C. R.: The human Hsp70B gene at the HSPA7 locus of chromosome 1 is transcribed but non-functional. In: *Biochim Biophys Acta* 1494 (2000), Nr. 1-2, S. 201–5
- [156] KOIZUMI, S.; GONG, P.; SUZUKI, K.; MURATA, M.: Cadmium-responsive element of the human heme oxygenase-1 gene mediates heat shock factor 1-dependent transcriptional activation. In: *J Biol Chem* 282 (2007), Nr. 12, S. 8715–23

- [157] WADA, K.; TANIGUCHI, A.; XU, L.; OKANO, T.: Rapid and highly sensitive detection of cadmium chloride induced cytotoxicity using the HSP70B' promoter in live cells. In: *Biotechnol Bioeng* 92 (2005), Nr. 4, S. 410–5
- [158] DINGERMAN, T.: *Arzneidrogen*. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl., 2011
- [159] TEUSCHER, E.; LINDEQUIST, U.: *Biogene Gifte. Biologie, Chemie, Pharmakologie, Toxikologie*. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges., 2010
- [160] WICHTL, M.; BAUER, R.; BARTHLEN, U.: *Teedrogen und Phytopharmaka*. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges., 2009
- [161] MERFORT, I.: [Arnica: new insights on the molecular mode of action of a traditional medicinal plant]. In: *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd* 10 Suppl 1 (2003), S. 45–8
- [162] WOERDENBAG, H. J.; MERFORT, I.; PASSREITER, C. M.; SCHMIDT, T. J.; WILLUHN, G.; UDEN, W. van; PRAS, N.; KAMPINGA, H. H.; KONINGS, A. W.: Cytotoxicity of flavonoids and sesquiterpene lactones from Arnica species against the GLC4 and the COLO 320 cell lines. In: *Planta Med* 60 (1994), Nr. 5, S. 434–7
- [163] LASS, C.; VOCANSON, M.; WAGNER, S.; SCHEMPP, C. M.; NICOLAS, J. F.; MERFORT, I.; MARTIN, S. F.: Anti-inflammatory and immune-regulatory mechanisms prevent contact hypersensitivity to Arnica montana L. In: *Exp Dermatol* 17 (2008), Nr. 10, S. 849–57
- [164] LASS, C.; MERFORT, I.; MARTIN, S. F.: In vitro and in vivo analysis of pro- and anti-inflammatory effects of weak and strong contact allergens. In: *Exp Dermatol* 19 (2010), Nr. 11, S. 1007–13
- [165] HITZIGER, T.; HÖLL, P.; RAMADAN, M.; DETTMERING, D.; IMMING, P.; HEMPEL, B.: Phytopharmazie. Die alte junge Kamille. In: *Pharmazeutische Zeitung* 148 (2003), Nr. 5, S. 22
- [166] WINK, M.; WYK, B.-E. van: *Mind-altering and poisonous plants of the world. An illustrated scientific guide*. Pretoria: Briza Publ., 2008
- [167] LEVEN, W.; WILLUHN, G.: Sesquiterpene lactones from Arnica chamissonis less. : VI. Identification and quantitative determination by high-performance liquid and gas chromatography. In: *J Chromatogr A* 410 (1987), Nr. 0, S. 329–342
- [168] JANG, J. H.; IQBAL, T.; MIN, K. J.; KIM, S.; PARK, J. W.; SON, E. I.; LEE, T. J.; KWON, T. K.: Helenalin-induced apoptosis is dependent on production of reactive oxygen

- species and independent of induction of endoplasmic reticulum stress in renal cell carcinoma. In: *Toxicol In Vitro* (2012)
- [169] BOXBERGER, H. J.: *Leitfaden für die Zell- und Gewebekultur: Einführung in Grundlagen und Techniken*. Weinheim: WILEY-VCH-Verl., 2007
- [170] GIBCO: *CO2 Independent Medium without L-glutamine*, 2001
- [171] GIAEVER, I.; KEESE, C. R.: A morphological biosensor for mammalian cells. In: *Nature* 366 (1993), Nr. 6455, S. 591–2
- [172] SCHIMMELPFENNIG, M.; HARZ, S.; BÜTTNER, B.; FELLER, K.-H.: Strömungssimulation als Methode zur Optimierung von mikrofluidischen Chipsystemen. In: *Proceedings: MikroSystemTechnik Kongress 2012*
- [173] WHITE, C. R.; FRANGOS, J. A.: The shear stress of it all: the cell membrane and mechanochemical transduction. In: *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 362 (2007), Nr. 1484, S. 1459–67
- [174] BÜTTNER, B.: *Konstruktion der mikrofluidischen Umgebung und deren Strömungssimulation für ein Cell-on-Chip-System*, Fachhochschule Jena, Fachbereich Medizintechnik und Biotechnologie, Bachelorarbeit, 2010
- [175] Schimmelpfenning, M.: Dissertation (in Vorbereitung), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- [176] RUSSELL, D.; ANDREWS, P. D.; JAMES, J.; LANE, E. B.: Mechanical stress induces profound remodelling of keratin filaments and cell junctions in epidermolysis bullosa simplex keratinocytes. In: *J Cell Sci* 117 (2004), Nr. Pt 22, S. 5233–43
- [177] MICHAELIS, S.: *Non-Invasive Biosensors to Characterize the Cell-Material Interface*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, Diss., 2010
- [178] Hoffmann, D.: Persönliche Mitteilung, Ernst-Abbe-Fachhochschule Jena (2012)
- [179] DELRASO, N. J.; FOY, B. D.; GEARHART, J. M.; FRAZIER, J. M.: Cadmium uptake kinetics in rat hepatocytes: correction for albumin binding. In: *Toxicol Sci* 72 (2003), Nr. 1, S. 19–30
- [180] NOONAN, E. J.; PLACE, R. F.; GIARDINA, C.; HIGHTOWER, L. E.: Hsp70B' regulation and function. In: *Cell Stress Chaperones* 12 (2007), Nr. 4, S. 393–402

- [181] NOONAN, E.; GIARDINA, C.; HIGHTOWER, L.: Hsp70B' and Hsp72 form a complex in stressed human colon cells and each contributes to cytoprotection. In: *Experimental Cell Research* 314 (2008), Nr. 13, S. 2468–76
- [182] HUNT, C.; MORIMOTO, R. I.: Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 (1985), Nr. 19, S. 6455–9
- [183] NZENGUE, Y.; STEIMAN, R.; RACHIDI, W.; FAVIER, A.; GUIRAUD, P.: Oxidative stress induced by cadmium in the C6 cell line: role of copper and zinc. In: *Biol Trace Elem Res* 146 (2012), Nr. 3, S. 410–9
- [184] COOPER, S.: Rethinking synchronization of mammalian cells for cell cycle analysis. In: *Cell Mol Life Sci* 60 (2003), Nr. 6, S. 1099–106
- [185] BANFALVI, G.: Overview of cell synchronization. In: *Methods Mol Biol* 761 (2011), S. 1–23
- [186] WIEDER, K. J.; KING, K. R.; THOMPSON, D. M.; ZIA, C.; YARMUSH, M. L.; JAYARAMAN, A.: Optimization of reporter cells for expression profiling in a microfluidic device. In: *Biomed Microdevices* 7 (2005), Nr. 3, S. 213–22
- [187] NZENGUE, Y.; STEIMAN, R.; GARREL, C.; LEFEBVRE, E.; GUIRAUD, P.: Oxidative stress and DNA damage induced by cadmium in the human keratinocyte HaCaT cell line: role of glutathione in the resistance to cadmium. In: *Toxicology* 243 (2008), Nr. 1-2, S. 193–206
- [188] NZENGUE, Y.; CANDEIAS, S. M.; SAUVAIGO, S.; DOUKI, T.; FAVIER, A.; RACHIDI, W.; GUIRAUD, P.: The toxicity redox mechanisms of cadmium alone or together with copper and zinc homeostasis alteration: its redox biomarkers. In: *J Trace Elem Med Biol* 25 (2011), Nr. 3, S. 171–80
- [189] FOTAKIS, G.; CEMELI, E.; ANDERSON, D.; TIMBRELL, J. A.: Cadmium chloride-induced DNA and lysosomal damage in a hepatoma cell line. In: *Toxicol In Vitro* 19 (2005), Nr. 4, S. 481–9
- [190] BEYERSMANN, D.; HECHTENBERG, S.: Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. In: *Toxicol Appl Pharmacol* 144 (1997), Nr. 2, S. 247–61
- [191] PIRKKALA, L.; NYKÄNEN, P.; SISTONEN, L.: Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. In: *FASEB J* 15 (2001), Nr. 7, S. 1118–31

- [192] MARQUARDT, H.; SCHÄFER, S.: *Lehrbuch der Toxikologie*. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges., 2004
- [193] KIM, H. L.; SEO, Y. R.: Molecular and genomic approach for understanding the gene-environment interaction between Nrf2 deficiency and carcinogenic nickel-induced DNA damage. In: *Oncol Rep* 28 (2012), Nr. 6, S. 1959–67
- [194] NATSCH, A.; EMTER, R.; ELLIS, G.: Filling the concept with data: integrating data from different in vitro and in silico assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. In: *Toxicol Sci* 107 (2009), Nr. 1, S. 106–21
- [195] KING, K. R.; WANG, S.; IRIMIA, D.; JAYARAMAN, A.; TONER, M.; YARMUSH, M. L.: A high-throughput microfluidic real-time gene expression living cell array. In: *Lab Chip* 7 (2007), Nr. 1, S. 77–85
- [196] CALABRESE, E. J.; BALDWIN, L. A.: Toxicology rethinks its central belief. In: *Nature* 421 (2003), Nr. 6924, S. 691–2
- [197] CALABRESE, E. J.: Hormesis: improving predictions in the low-dose zone. In: *EXS* 101 (2012), S. 551–64
- [198] RAN, R.; LU, A.; ZHANG, L.; TANG, Y.; ZHU, H.; XU, H.; FENG, Y.; HAN, C.; ZHOU, G.; RIGBY, A. C.; SHARP, F. R.: Hsp70 promotes TNF-mediated apoptosis by binding IKK gamma and impairing NF-kappa B survival signaling. In: *Genes Dev* 18 (2004), Nr. 12, S. 1466–81
- [199] ARYA, R.; MALLIK, M.; LAKHOTIA, S. C.: Heat shock genes - integrating cell survival and death. In: *J Biosci* 32 (2007), Nr. 3, S. 595–610
- [200] LYSS, G.; KNORRE, A.; SCHMIDT, T. J.; PAHL, H. L.; MERFORT, I.: The anti-inflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor NF-kappaB by directly targeting p65. In: *J Biol Chem* 273 (1998), Nr. 50, S. 33508–16
- [201] RATTAN, S. I.; KRYZCH, V.; SCHNEBERT, S.; PERRIER, E.; NIZARD, C.: Hormesis-based anti-aging products: a case study of a novel cosmetic. In: *Dose Response* 11 (2013), Nr. 1, S. 99–108
- [202] HAYES, D. P.: Nutritional hormesis. In: *Eur J Clin Nutr* 61 (2007), Nr. 2, S. 147–59
- [203] DEMIROVIC, D.; RATTAN, S. I.: Curcumin induces stress response and hormetically modulates wound healing ability of human skin fibroblasts undergoing ageing in vitro. In: *Biogerontology* 12 (2011), Nr. 5, S. 437–44

- [204] TOH, Y. C.; ZHANG, C.; ZHANG, J.; KHONG, Y. M.; CHANG, S.; SAMPER, V. D.; NOORT, D. van; HUTMACHER, D. W.; YU, H.: A novel 3D mammalian cell perfusion-culture system in microfluidic channels. In: *Lab Chip* 7 (2007), Nr. 3, S. 302–9
- [205] GMBH, Ibidi: *ibidi Pump System Instructions (Version 1.5.1)*, 2013
- [206] REGEHR, K. J.; DOMENECH, M.; KOEPEL, J. T.; CARVER, K. C.; ELLISON-ZELSKI, S. J.; MURPHY, W. L.; SCHULER, L. A.; ALARID, E. T.; BEEBE, D. J.: Biological implications of polydimethylsiloxane-based microfluidic cell culture. In: *Lab Chip* 9 (2009), Nr. 15, S. 2132–9
- [207] JEON, J. S.; CHUNG, S.; KAMM, R. D.; CHAREST, J. L.: Hot embossing for fabrication of a microfluidic 3D cell culture platform. In: *Biomed Microdevices* 13 (2011), Nr. 2, S. 325–33
- [208] MISERERE, S.; MOTTET, G.; TANIGA, V.; DESCROIX, S.; VIOVY, J. L.; MALAQUIN, L.: Fabrication of thermoplastics chips through lamination based techniques. In: *Lab Chip* 12 (2012), Nr. 10, S. 1849–56
- [209] MITRA, P.; KEESE, C. R.; GIAEVER, I.: Electric measurements can be used to monitor the attachment and spreading of cells in tissue culture. In: *Biotechniques* 11 (1991), Nr. 4, S. 504–10
- [210] Wegener, J.: Persönliche Mitteilung, Universität Regensburg (2013)
- [211] HEGEMANN, D.; BRUNNER, H.; OEHR, C.: Plasma treatment of polymers for surface and adhesion improvement. In: *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* (2003), Nr. 208, S. 281–6

A Anhang

Technische Details der optischen Transducerkomponenten

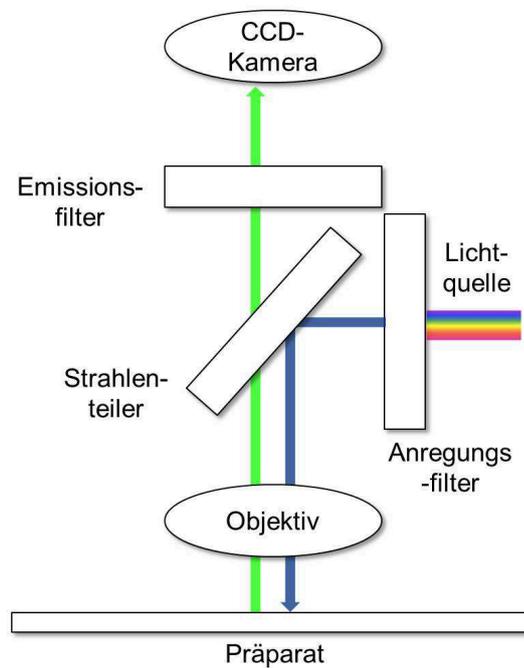


Abbildung A.1: Anordnung optischer Filter und Strahlengang der Aufsicht-Fluoreszenz in Mikroskopen (Epifluoreszenz)

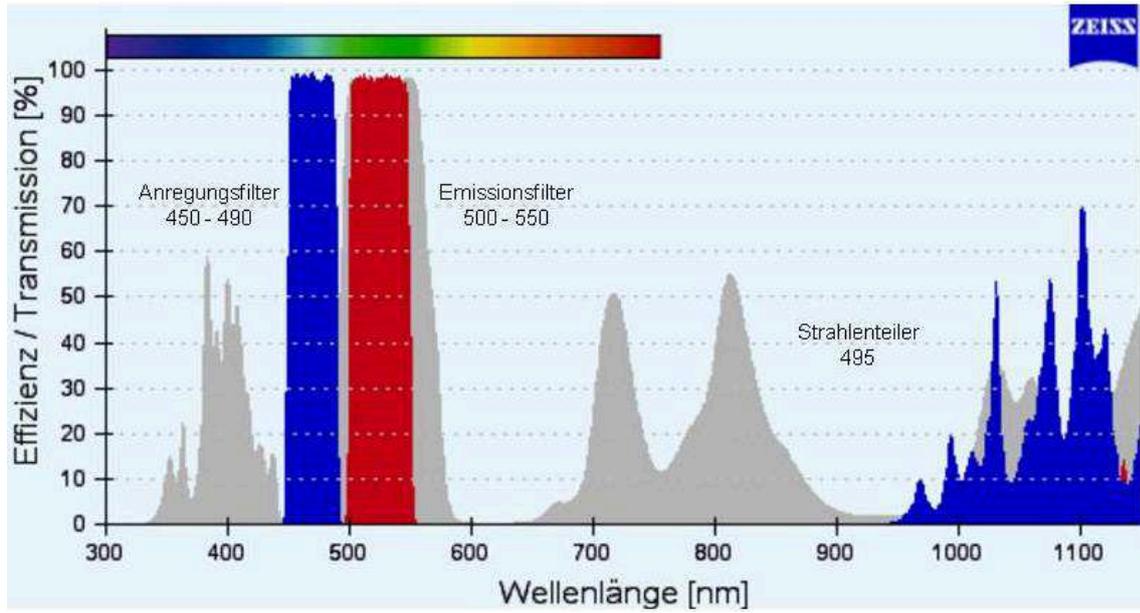


Abbildung A.2: Transmissionskurve zur Beschreibung der spektralen Charakteristika des Filtersatz 38 HE (Carl Zeiss)

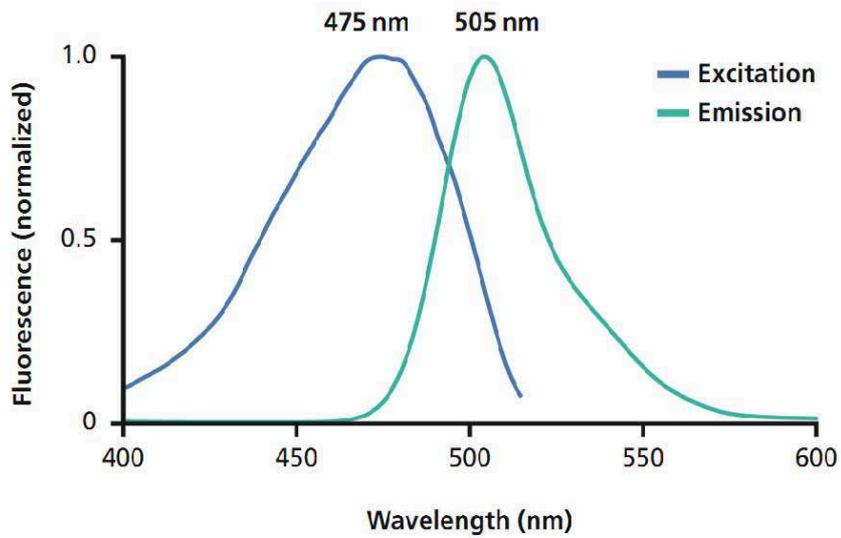


Abbildung A.3: Normalisiertes Anregungs- und Emissionsspektrum von AcGFP1 nach Herstellerangaben (Takara Clontech)

Wissenschaftlicher Werdegang

Persönliche Angaben

Geburstag: 13.05.1985

Geburtsort: Karl-Marx-Stadt

Familienstand: verheiratet, geb. Neubert

Ausbildung und berufliche Tätigkeit

1995-2003	Georgius-Agricola-Gymnasium Glauchau, Abitur
2003-2004	National Star College Cheltenham (UK), Volontariat
2004-2008	Fachhochschule Jena Studium Pharma-Biotechnologie Abschluss: Dipl.-Ing. (FH)
9/2007-1/2008	University Hospital Nottingham (UK) Forschungsstipendium
2008-2009	c-LEcta GmbH, Leipzig Wissenschaftliche Assistentin F&E
seit 9/2009	Friedrich-Schiller-Universität Jena/ Ernst-Abbe-Fachhochschule Jena Kooperatives Promotionsverfahren

Peer-reviewed Publikationen

HOFMANN, U.; MICHAELIS, S.; WINCKLER, T.; WEGENER, J.; FELLER, K.-H.: A whole-cell biosensor as in vitro alternative to skin irritation tests. In: *Biosens Bioelectron* 39 (2013), Nr.1, S. 156-62

Wissenschaftliche Vorträge

NEUBERT, U.; SCHIMMELPFENNIG, M.; BOGEN, A.; BÜTTNER, B.; PRIEM, M.; MICHAELIS, S.; WEGENER, J.; FELLER, K.-H.: Aspekte der Detektion toxikologischer Effekte in zellbasierten Lab-on-a-Chip-Systemen. 7. *Deutsches BioSensor Symposium*, 03.-06.04.2011, Heilbad Heiligenstadt

NEUBERT, U.; SCHIMMELPFENNIG, M.; BOGEN, A.; BÜTTNER, B.; PRIEM, M.; MICHAELIS, S.; WEGENER, J.; FELLER, K.-H.: Design of a cell-based Lab-on-a-Chip as an Alternative Method for Skin Irritation Tests. *10. Workshop on biosensors and bioanalytical microtechniques in environmental and clinical analysis*, 19.-22.06.2011, Weimar

HOFMANN, U.; SCHIMMELPFENNIG, M.; BÜTTNER, B.; EISENHUTH, S.; PRIEM, M.; MICHAELIS, S.; WEGENER, J.; FELLER, K.-H.: A cell-based Lab-on-a-Chip as an alternative method for skin irritation tests. *8. Jahrestagung Arbeitskreis BioMST und Life Sciences e.V.*, 19.-21.06.2012, Ilmenau

HOFMANN, U.; BÜTTNER, B.; MICHAELIS, S.; WEGENER, J.; FELLER, K.-H.: Zellbasierte Biosensoren als in vitro Alternative für Hautirritationstests. *8. Deutsches BioSensor Symposium*, 10.-13.03.2013, Wildau

Poster

NEUBERT, U.; SCHIMMELPFENNIG, M.; BÜTTNER, B.; PRIEM, M.; HARZ, S.; MUNDER, T.; MEYER, M.; FELLER, K.-H.: Detektion toxikologischer Effekte in zellbasierten Lab-on-a-Chip-Systemen. *15. Heiligenstädter Kolloquium*, 27.-29.09.2010, Heilbad Heiligenstadt

NEUBERT, U.; BOGEN, A.; SCHIMMELPFENNIG, M.; MICHAELIS, S.; WEGENER, J.; FELLER, K.-H.: A cell-based Lab-on-a-Chip as an alternative method for testing skin irritation. *The 15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, 02.-06.10.2011, Seattle (USA)

Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Prof. Dr. Karl-Heinz Feller für die Bereitstellung dieses facettenreichen Themas auf dem Gebiet der Biomikrosystemtechnik und die ausgezeichnete Betreuung in der Arbeitsgruppe Instrumentelle Analytik im Fachbereich Medizintechnik und Biotechnologie der Ernst-Abbe-Fachhochschule Jena. Das große Engagement, die fachlichen Anregungen, die vielen praktischen Hilfestellungen und vor allem seine Geduld haben im Wesentlichen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich danke ihm insbesondere auch dafür, dass er mir die Teilnahme an zahlreichen Tagungen und internationalen Veranstaltungen ermöglichte.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Thomas Munder und seiner Mitarbeiterin Dr. Jana Pieper sowie Prof. Dr. Michael Meyer für die Betreuung und freundliche Unterstützung in allen biologisch-relevanten Fragestellungen und die problemlose gemeinsame Nutzung der Labore bedanken.

Prof. Dr. Thomas Winckler vom Institut für Pharmazie der Friedrich-Schiller-Universität Jena danke ich für seine aufgeschlossene Haltung und alle wegweisenden Diskussionen innerhalb der Betreuung dieser Arbeit und für die Möglichkeit die Aufgabenstellung in dieser Form zu realisieren.

Des Weiteren möchte ich mich bei Melanie Priem und Susanne Eisenhuth für die Zusammenarbeit, die Gestaltung unseres Laboralltags, die experimentelle Unterstützung, sowie die unzähligen fachlichen und persönlichen Gespräche bedanken, ohne sie wäre das Gelingen dieser Arbeit unmöglich gewesen. Ein besonderer Dank gilt außerdem Bernd Büttner, Dirk Hoffmann und Michael Schimmelpfennig für die Konstruktion und gemeinsame technische Realisierung unseres Chipsystems. Vielen Dank für die Geduld und Ruhe in immer wiederkehrenden Diskussionen meinerseits zur Lösung vermeintlich unüberwindbarer technischer Problematiken. Darüber hinaus möchte ich Dr. Christine Bartzsch für ihr analytisches Geschick bei der quantitativen Bestimmung von Helenalin im Extrakt der *A. montana* danken. Ein Dankeschön verdienen auch alle anderen Kollegen für kleine und große Hilfestellungen sowie für die sehr gute Arbeitsatmosphäre in der Arbeitsgruppe, auch wenn ich des öfteren die Kaffeepause habe ausfallen lassen.

Dr. Stefanie Michaelis und Prof. Dr. Joachim Wegener vom Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik der Universität Regensburg möchte ich für die inspirie-

rende und fruchtbare Zusammenarbeit, die vielen Diskussionen und die Durchführung der ECIS-Messungen, die einen wesentlichen Beitrag zur Arbeit lieferten, herzlich danken.

Für die problemlose und unerlässliche Durchführung der FACS-Analysen zur Etablierung der Sensorzelllinien möchte ich mich bei Dr. Anne Gompf aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Falk Weih des Leibniz-Instituts für Altersforschung–Fritz Lipmann-Institut Jena bedanken.

Dr. Astrid von Seebach der Skin and Investigation Technology GmbH in Hamburg danke ich für die Zusammenarbeit innerhalb des Projekts FASTEST und denen von ihr durchgeführten Referenzmessungen an unterschiedlichen Hautmodellen, die die Grundlage zur Einordnung des hier etablierten Systems bildeten. Gleichmaßen danke ich Dr. Andreas Plescher von der Pharmaplant Arznei- und Gewürzpflanzen Forschungs- und Saatzucht GmbH in Artern für die Bereitstellung der Pflanzenextrakte, sowie Dr. Jörg Weber der Analytik Jena AG für die Realisierung der Temperiereinheiten.

Martin Wieczorek und seinen Kollegen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thorsten Heinzel der Friedrich-Schiller-Universität Jena danke ich für die großartige Unterstützung bei methodischen Fragestellungen sowie die Aufmunterung und die vielen Diskussionen rund um die Durchführung der qRT-PCR und den stabilen Transfektionen.

Weiterhin möchte ich mich bei all meinen Freunden, besonders Kathleen Rönsch, Theresa Kunz und Susann Meisel, bedanken. Ob das nahezu tägliche Telefonat, entspannte Mittagspausen oder eine interessante Freizeitgestaltung, vielen Dank für eine amüsante und wertvolle Zeit. Danken möchte ich auch meiner temporären Mitbewohnerin Regina Schreiner, die unermüdet und sehr gewissenhaft die orthographische Korrektur dieser Arbeit durchführte. Für den sportlichen Ausgleich gilt außerdem mein Dank meinen Handballkolleginnen und Laufpartnern.

Außerordentlich danke ich meinen Eltern, die mich auf ihre besondere Art und Weise während meines Biotechnologie-Studiums und der Zeit der Promotion immer moralisch unterstützt und hervorragend verwöhnt haben sowie Anne und Sabine, die es sowohl in der Nähe als auch in der Ferne verstanden ihre kleine Schwester positiv zu beeinflussen und zu formen.

Abschließend gilt mein herzlichster Dank meinem Ehemann Thomas Hofmann. Neben all den kleinen und großen Dingen, die uns zu einem besonders guten Team machen, danke ich dir für die zeitweise sehr ausgeprägten, nächtlichen Konversationen. Du hast es immer wieder geschafft, mich zu motivieren, zu trösten und Verständnis zu zeigen. Vielen Dank, ohne dich hätte ich diese Arbeit nicht fertig stellen können.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Bei der Generierung von Datensätzen und Lösungen beteiligte Personen wurden an den entsprechenden Stellen genannt. Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir keine geldwerten Leistungen für Arbeiten erhalten, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und ist auch noch nicht veröffentlicht worden. Die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutische Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena vom 22.08.2007 erkenne ich hiermit an.

Jena, den 25. April 2013

.....

Ute Hofmann