

BMBF Projekt NanoCare

In vitro Zellsysteme: Zentrale Ergebnisse

Jürgen Schnekenburger



Medizinische Klinik B
Westfälische Wilhelms-Universität
Münster

NanoCare Abschlussveranstaltung 16.06.-17.06.2009, Berlin

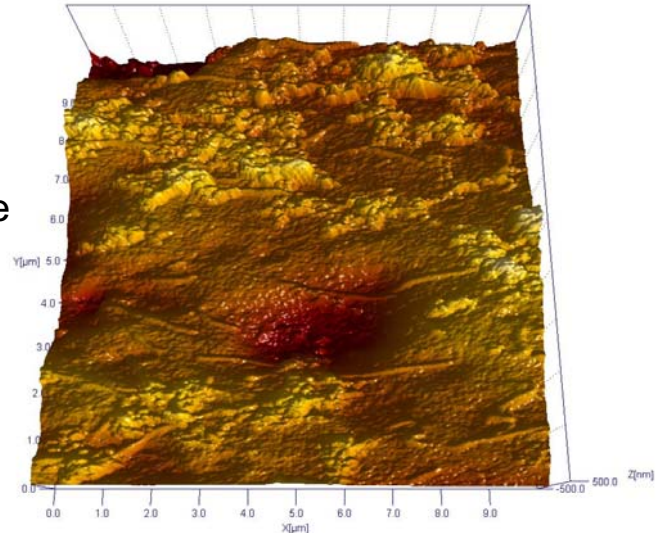
In vitro Zellsysteme: Übersicht

- Standardisierung der Zellkulturmodelle
- Adsorption von Proteinen an Nanopartikel
- Karlsruher Zell-Expositionssystem
- AFM-Analyse von Nanopartikel-Zell Interaktionen
- Transport von Partikeln durch epitheliale Zellmonolayer
- Vergleichende Analyse von Test und Zellkultursystemen zum in vitro Toxizitätstest
- IBE Vector Modell primärer Alveolarmakrophagen
- Zusammenfassung und Ausblick

In vitro Zellsysteme: Zielsetzung

Ziel: Beurteilung zellulärer Reaktionen in Gegenwart von Nanopartikeln abhängig von Partikelkonzentration, -größe, chemischer Zusammensetzung und Partikeloberfläche

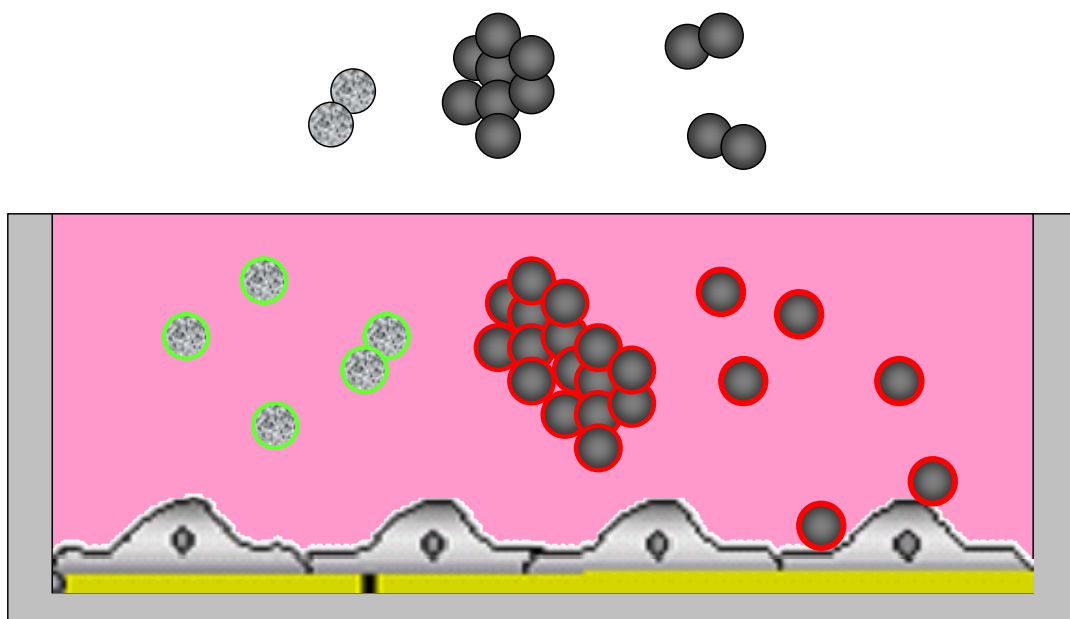
- Welche Zelltypen müssen untersucht werden, um Partikeleffekte zu charakterisieren?
- Welche Testsysteme werden für die Beurteilung der biologischen Auswirkungen benötigt?
- Welche Testsysteme sind für die Untersuchung von Nanopartikeln geeignet?



→ Entwicklung standardisierter Testsysteme (SOP) mit einer definierten Gruppe von Zelltypen und Assays

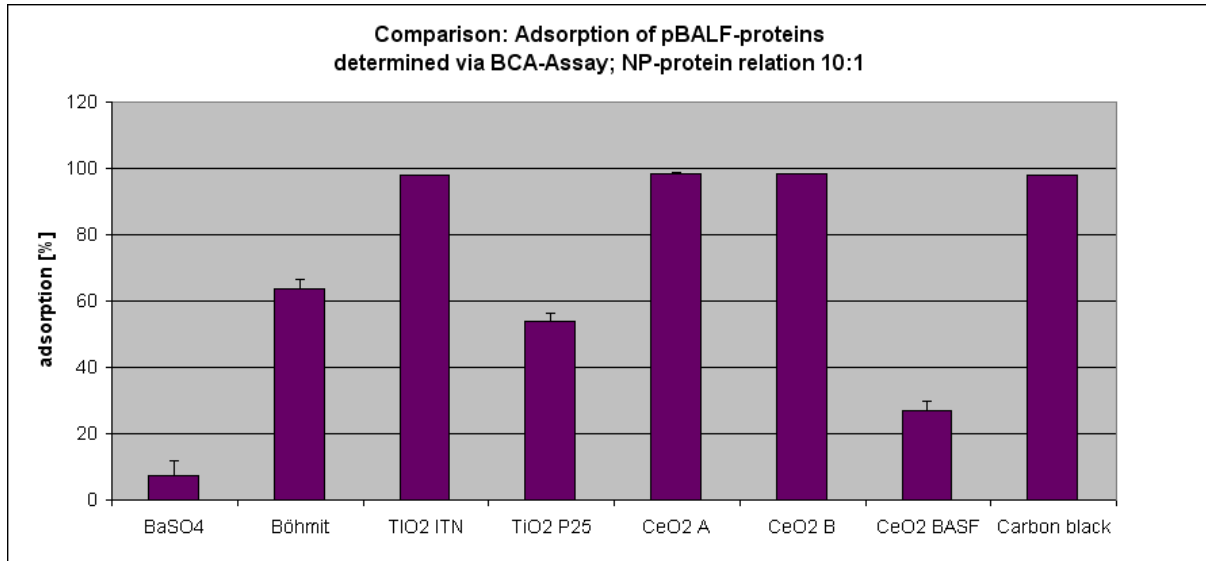
NanoCare Abschlussveranstaltung 16.06.-17.06.2009, Berlin

Nanopartikel werden durch Dispersion in biologischen Medien verändert



NanoCare Abschlussveranstaltung 16.06.-17.06.2009, Berlin

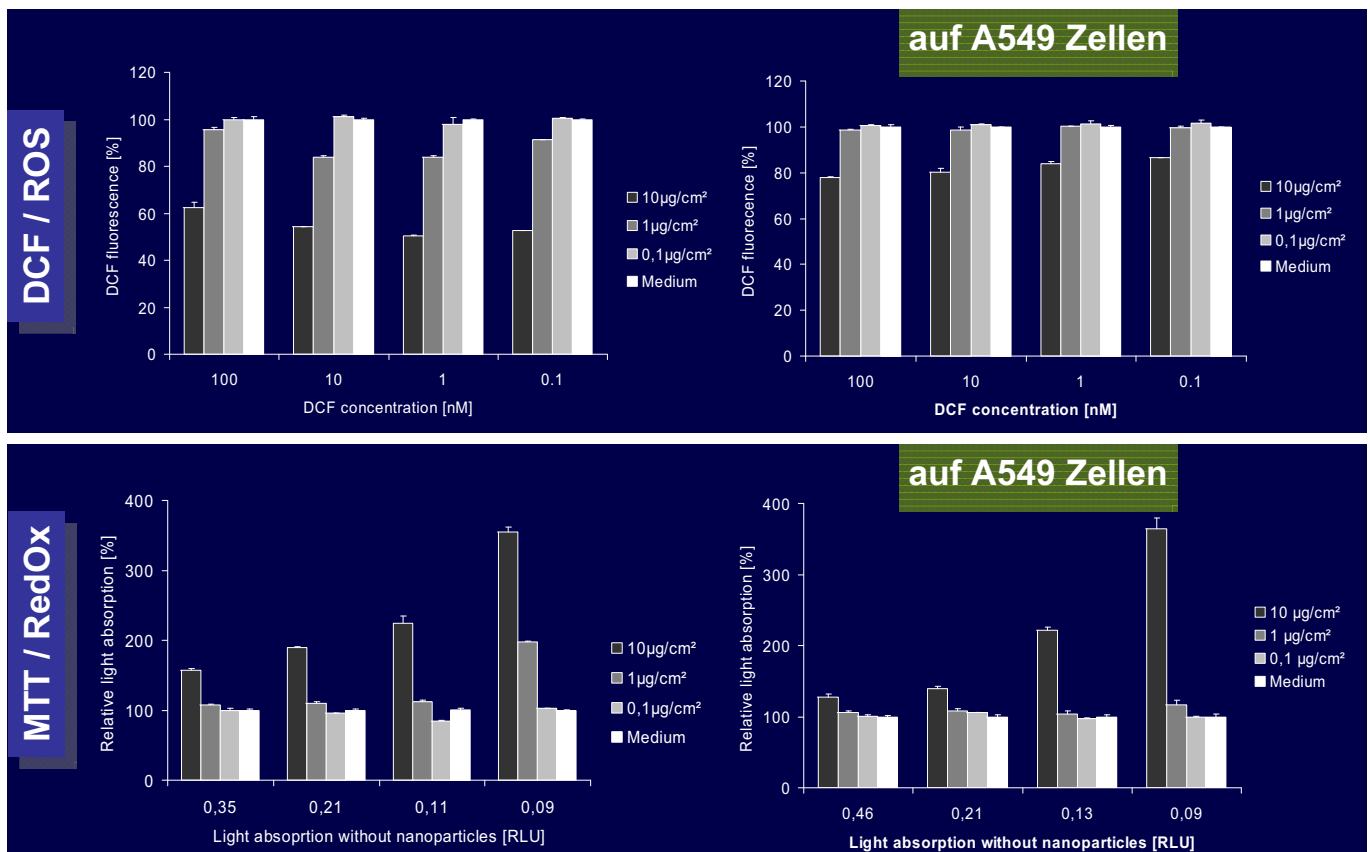
Nanopartikel Protein Adsorption



Adsorption von Proteinen aus broncheoalveolärer Lavage-Flüssigkeit an Nanopartikel: Partikel zeigen unterschiedliche Adsorptionsmuster.

NanoCare Abschlussveranstaltung 16.06.-17.06.2009, Berlin

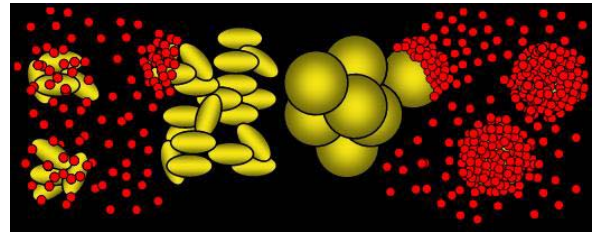
Nanopartikel Interferenz mit Testsystemen: Optische Interferenz (Carbon Black)



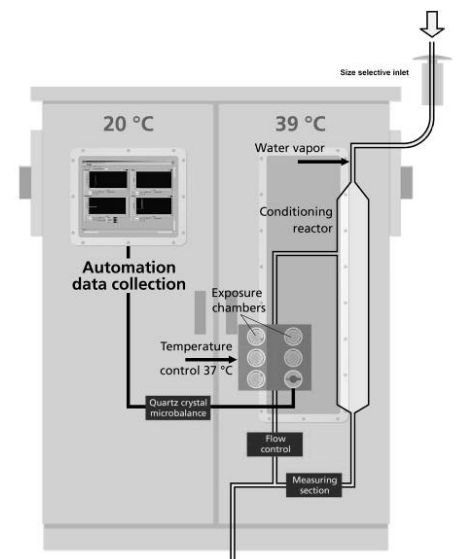
- **Dispersionen:**
 - Dispersions Protokoll
 - Agglomerat Größenverteilung und Agglomerationsstatus
 - Zetapotential
 - Benetzbarkeit und Agglomeration/Desagglomeration nach Adsorption von Lösungsbestandteilen
 - Adsorption von Lösungsbestandteilen, die Passivierung, Löslichkeit und Bindung beeinflussen können.

- **Mikrobiologische Eigenschaften**
 - Sterilität
 - Endotoxin Konzentration
 - Einfluß auf Endotoxin Tests

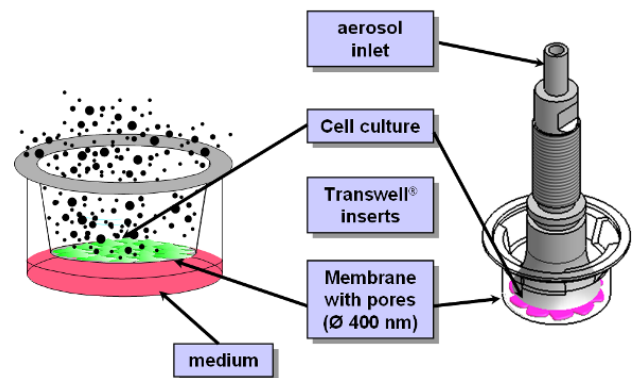
- **Interferenz mit Testsystemen**
 - Reaktion mit oder Adsorption von Testreagenzien
 - Absorbtion oder Streuung des emittierten Lichts
 - Quenchen der emittierten Fluoreszenz



Schulze et al., „Not ready to use – overcoming pitfalls when dispersing nanoparticles in physiological media“ *Nanotoxicology*, 2008



Left: scheme of the Karlsruhe Exposure System with the (1) size selective inlet, (2) the water vapour dosage for humidification (3), the conditioning reactor for a constant aerosol with 37°C and 85% r.h., (4) the VITROCELL® exposure chambers containing the Transwell® membrane inserts and the sensor of the (5) quartz crystal microbalance. Right: photograph of the fully automated and temperature controlled prototype during an outside measurement of environmental aerosols.



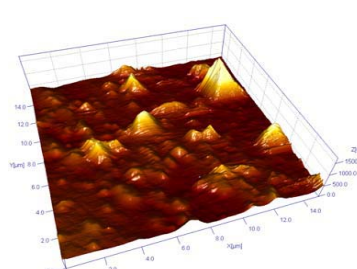
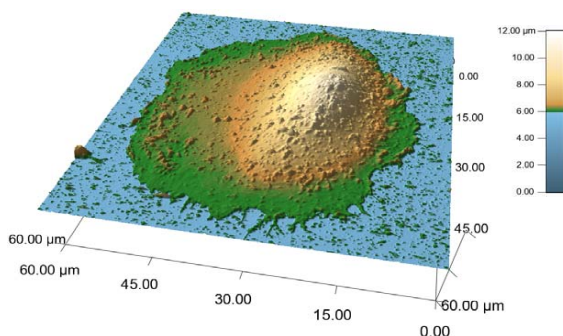
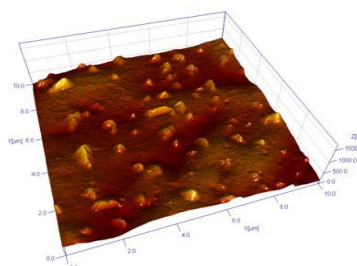
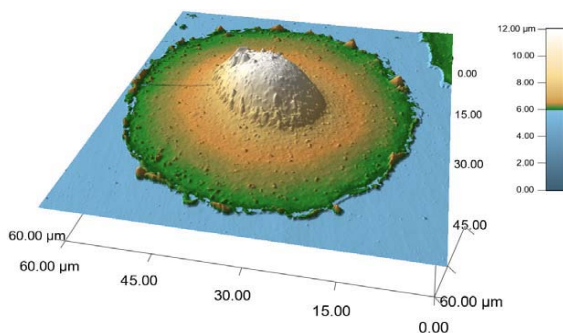
Opened and closed VITROCELL® exposure chambers with water temperature control and medium for supplying the cell cultures with nutrients.

Scheme of the exposure of a cell culture towards aerosol at the air liquid interface consisting of the aerosol inlet, the cell culture insert and the medium container.

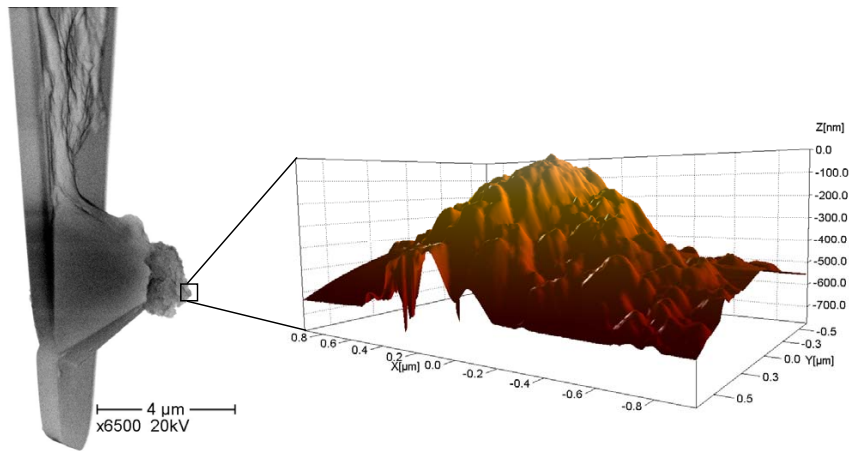
Expositions Experimente mit TiO₂ an humanen Lungenepithelzellen (A549) zeigten keine signifikante Veränderung der Zellviabilität nach 2 und 4 h Exposition.

Ergebnisse: FZK-ITG and ITC

NanoCare Abschlussveranstaltung 16.06.-17.06.2009, Berlin

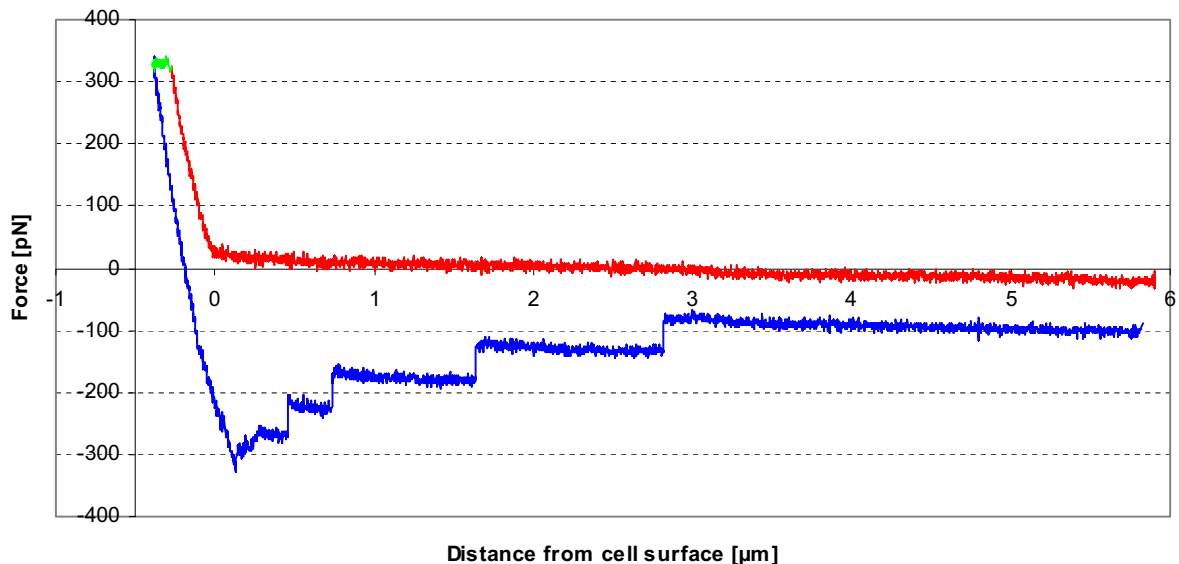


Topographic AFM-images of a whole RLE-6TN-cell (left) and magnified parts of the cell surface (right). Untreated cells (upper panel) and incubated with CeO₂-NP (lower panel). Cells are fixed and imaged in buffer solution.



Coated AFM tip mapped with an electron microscope (left) and an AFM image of the reconstructed apex (right).

NanoCare Abschlussveranstaltung 16.06.-17.06.2009, Berlin

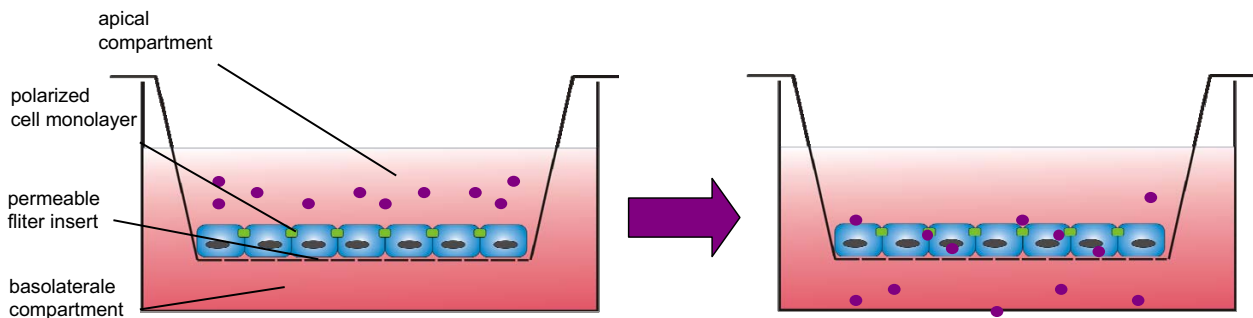


Typical force distance curve for a coated AFM-tip on a living cell with a dwell-time of 30 s. The red curve shows the approach, the green one the tips movement during the contact (dwell-time) and the blue one describes the retraction.

Rupture events can occur several microns away from the surface. This indicates the formation of membrane tethers (thin nano-tubes that consist of lipids) with rupture forces around 50 pN that appear for all analyzed particles.

NanoCare Abschlussveranstaltung 16.06.-17.06.2009, Berlin

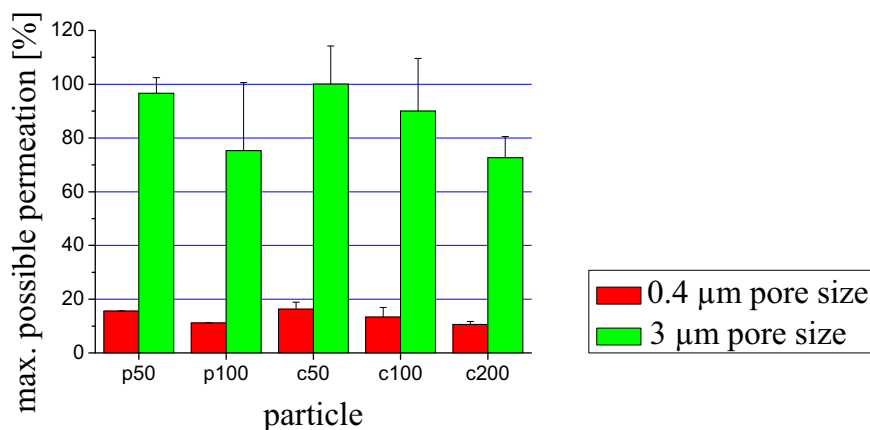
Transport von Metalloxid Nanopartikeln über Zellmonolayer



Das Transwell System: Epitheliale Zellen (blaue Quadrate) trennen den apikalen (Donor) vom basolateralen (Empfänger) Kompartiment. Sowohl interzellulärer und intrazellulärer Transport von Partikeln als auch Aufnahme und Adhäsion können untersucht werden.

NanoCare Abschlussveranstaltung 16.06.-17.06.2009, Berlin

Transport von Metalloxid Nanopartikeln über Zellmonolayer



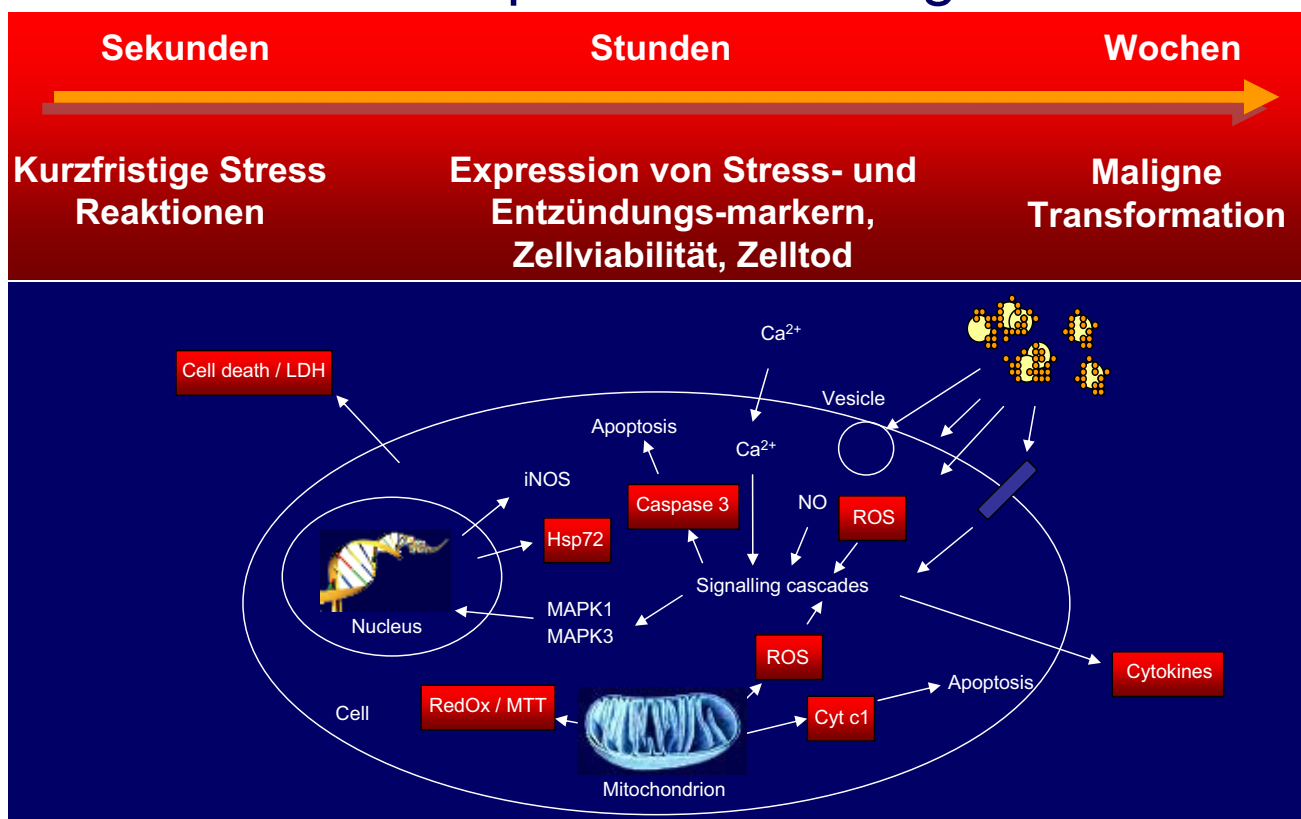
Permeation von Modellpartikeln durch Filter mit unterschiedlichen Porengrößen. Nach 5 Stunden Inkubation waren nahezu 100 % der Partikel durch Filter mit großen Poren diffundiert, wohingegen eine Porengröße von 0.4 µm eine signifikante Barriere darstellte (c=Carboxylated; p=Plain; die Zahl entspricht der Partikelgröße).

NanoCare Abschlussveranstaltung 16.06.-17.06.2009, Berlin

Nano-particle	Permeation through naked filter after 24 h [%]	Transport through cells [%]	Cellular uptake & filter washout [%]
ZrO ₂	35 ± 4.5	0	2.7 ± 2.6
TiO ₂ P25	34.8 ± 4.1	0	0
Böhmit I	46.7 ± 19.1	0	0

Zusammenfassung der Transport-Assays mit Metalloxid Nanopartikeln. Für keinen der getesteten Partikel konnte ein Transport durch die Zellbarriere nachgewiesen werden.

NanoCare Abschlussveranstaltung 16.06.-17.06.2009, Berlin



NanoCare Abschlussveranstaltung 16.06.-17.06.2009, Berlin

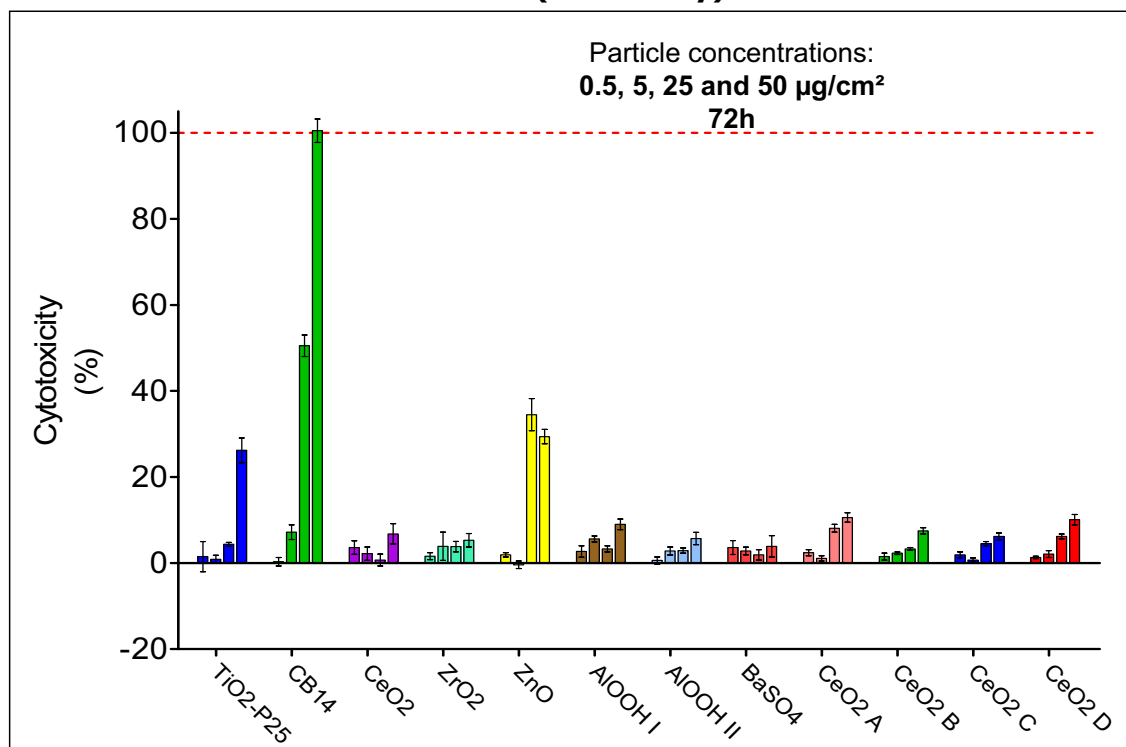
	Type	Origin	Species	Source
Mono-Mac-6	Connective tissue	Monocytes/Macrophages, leukemia	<i>Homo sapiens</i>	DSMZ
NIH-3T3	Connective tissue	Embryo fibroblasts	<i>Mus musculus</i>	DSMZ
RAW 264.7	Connective tissue	Macrophages	<i>Mus musculus</i>	ATCC
A-549	Epithelium	Lung epithelium, carcinoma	<i>Homo sapiens</i>	DMSZ
CACO-2	Epithelium	Colon epithelium, carcinoma	<i>Homo sapiens</i>	DSMZ
Calu-3	Epithelium	Lung epithelium	<i>Homo sapiens</i>	ATCC
HaCaT	Epithelium	Keratinocytes	<i>Homo sapiens</i>	CLS
MDCK (NBL-2)	Epithelium	Kidney epithelium-like	<i>Canis familiaris</i>	ATCC
MDCK2	Epithelium	Kidney epithelium-like	<i>Canis familiaris</i>	ECACC
NRK-52E	Epithelium	Kidney epithelium-like	<i>Rattus norvegicus</i>	ATCC
RLE-6TN	Epithelium	Lung epithelium	<i>Rattus norvegicus</i>	ATCC
T84	Epithelium	Colon epithelium	<i>Homo sapiens</i>	ATCC



Standard Zelllinie: A549 (humane Lungenepithelzellen)

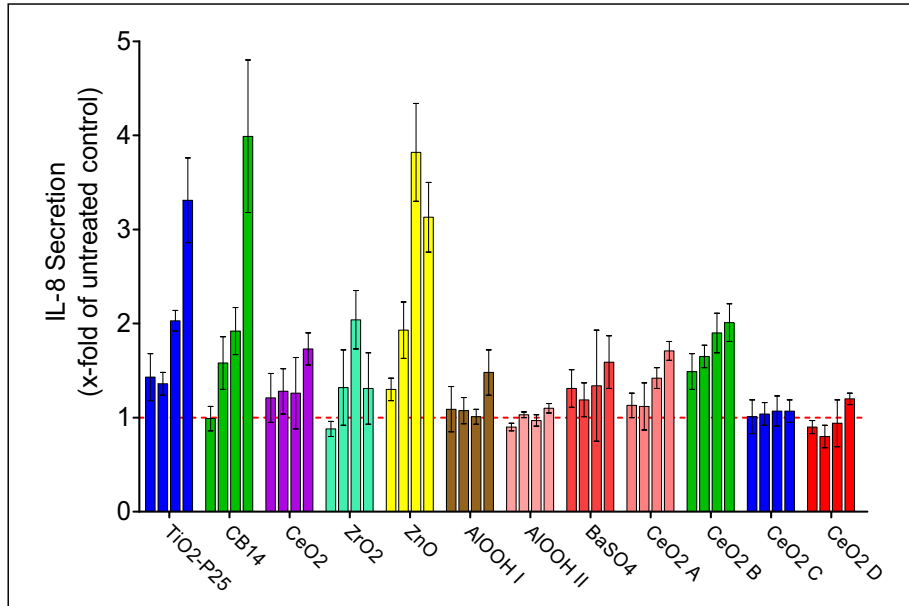
Results: FZK-ITG

Viabilität (LDH Assay)



Standard Zelllinie: A549 (humane Lungenepithelzellen)

Entzündung (IL-8 ELISA)



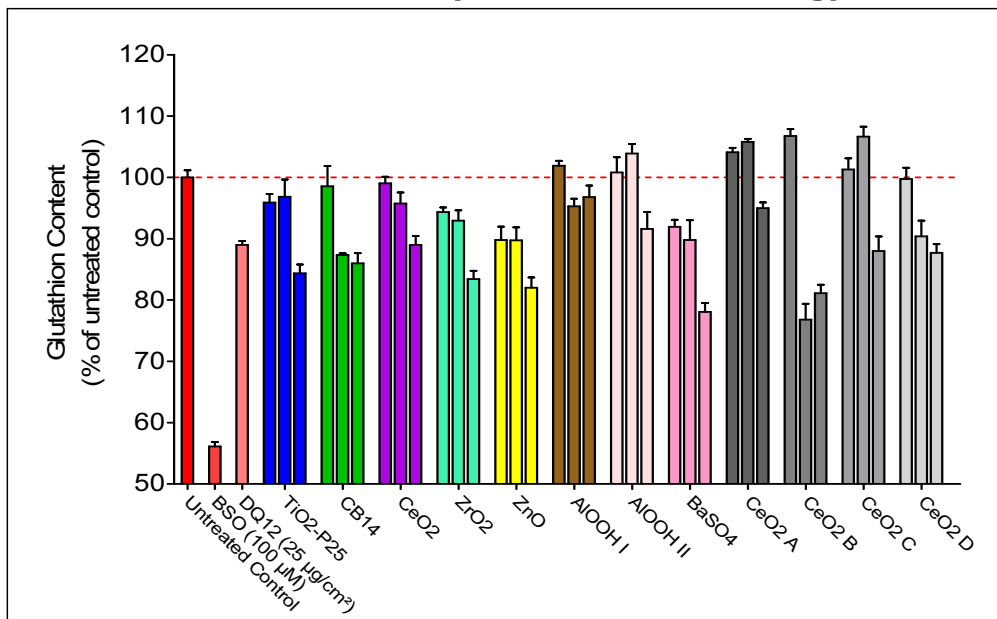
Results: FZK-ITG

Particle concentrations :
0.5, 5 and 50 µg/cm²
72h

NanoCare Abschlussveranstaltung 16.06.-17.06.2009, Berlin

Standard Zelllinie: A549 (humane Lungenepithelzellen)

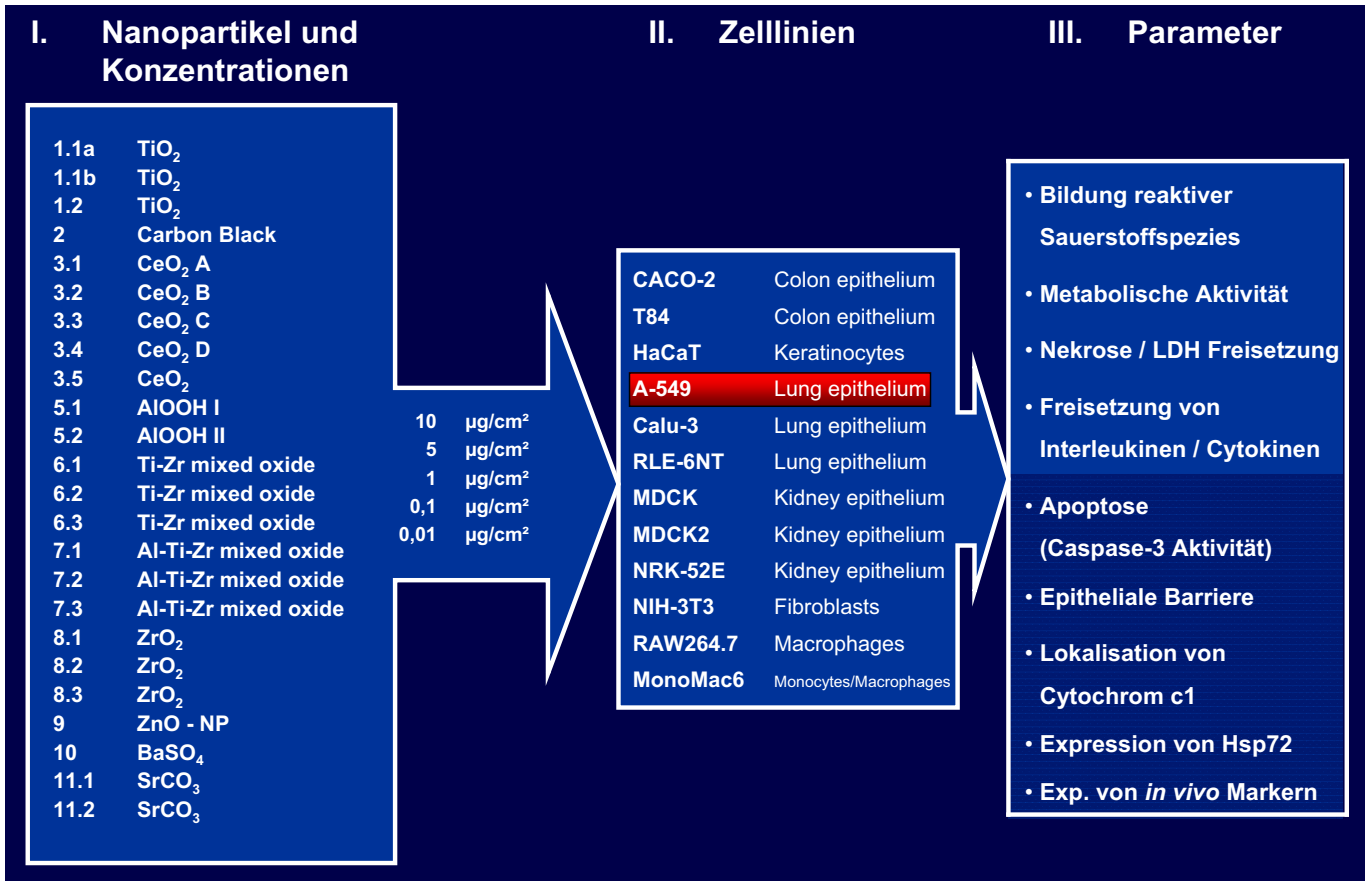
Oxidativer Stress (Glutathion Bestimmung)



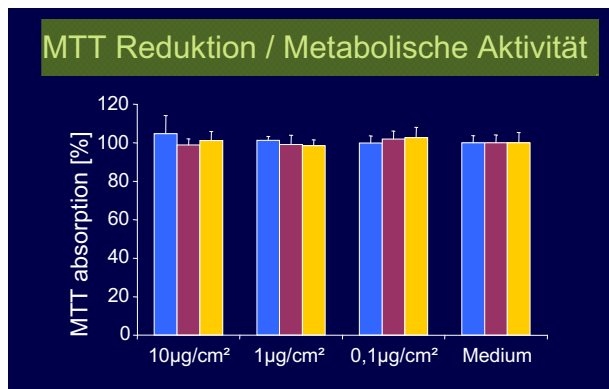
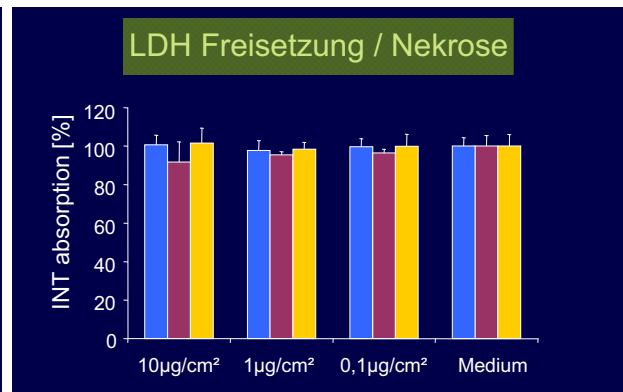
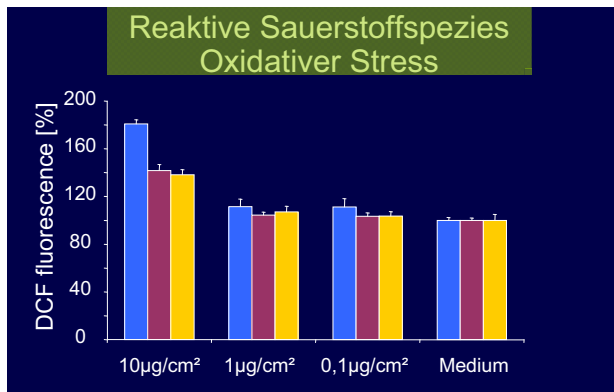
Results: FZK-ITG

Particle concentrations :
1, 5 and 25 µg/cm²
72h

NanoCare Abschlussveranstaltung 16.06.-17.06.2009, Berlin



Ergebnisse des *in vitro* Toxizitäts-Screenings: Ti-Zr Mixed Oxide 3



Ergebnisse: In vitro Screening

→ Insgesamt zeigte nur eine kleine Anzahl der getesteten Partikel signifikante Effekte in den elf untersuchten Zelllinien.

→ Die Ergebnisse lassen bedingt eine Korrelation von Partikeleigenschaften wie Kristallinität und Löslichkeit mit zellulären Effekten zu.

→ Die Daten werden mit den *in vitro* Ergebnissen der NanoCare Partner verglichen, um Dosis-Wirkungs-Beziehungen herzustellen.

	ROS	MTT	LDH	Cas3	TEER
TiO ₂ 1	-	-	-	nd	nd
TiO ₂ 2	-	-	-	nd	nd
TiO ₂ 3	+/-	-	-	-	-
Carbon Black	+	-	-	-	-
CeO ₂ A	+/-	-	-	nd	nd
CeO ₂ B	+/-	-	-	nd	nd
CeO ₂ C	+/-	-	-	nd	nd
CeO ₂ D	+/-	-	-	nd	nd
CeO ₂	-	-	-	nd	nd
Böhmit I	-	-	-	nd	nd
Böhmit II	-	-	-	nd	nd
Ti-Zr Mixed Oxide 1	-	-	-	nd	nd
Ti-Zr Mixed Oxide 2	-	-	-	nd	nd
Ti-Zr Mixed Oxide 3	+/-	-	-	-	nd
Al-Ti-Zr Mixed Oxide 1	-	-	-	nd	nd
Al-Ti-Zr Mixed Oxide 2	-	-	-	nd	nd
Al-Ti-Zr Mixed Oxide 3	-	-	-	nd	nd
ZrO ₂ 1	-	-	-	-	-
ZrO ₂ 2	-	-	-	nd	nd
ZrO ₂ 3	-	-	-	nd	nd
ZnO	-	+	+	-	+
BaSO ₄	-	+/-	+/-	nd	nd
SrCO ₃ I	-	-	-	nd	nd
SrCO ₃ II	-	-	-	nd	nd

Entzündungs- marker und Kokultursysteme

→ Insgesamt zeigte nur eine kleine Anzahl der getesteten Partikel signifikante Effekte in den elf untersuchten Zelllinien.

→ Die Ergebnisse lassen bedingt eine Korrelation von Partikeleigenschaften wie Kristallinität und Löslichkeit mit zellulären Effekten zu.

→ Die Daten werden mit den *in vitro* Ergebnissen der NanoCare Partner verglichen, um Dosis-Wirkungs-Beziehungen herzustellen.

Nano material	A549 Mono-culture	MM6 Mono-culture	MM6 (pre-stimulated) mono-culture	A549 with MM6 in coculture	A549 with MM6 (prestimulated) in coculture
BaSO ₄	?	-	-	?	?
nano-ZnO	+	+	+	+	+
CeO ₂ A	?	-	-	+	+
CeO ₂ B	-	-	-	-	?
CeO ₂ C	-	-	-	+	?
CeO ₂ D	-	-	-	-	-
CeO ₂	-	-	-	-	-
TiO ₂	-	↓	↓	↓	↓
TiO ₂	+	-	-	+	+
TiO ₂	-	-	-	-	-
Carbon Black CB14	+	↓	↓	+	+
Ti-Zr Mixed Oxide 1	-	-	-	-	-
Ti-Zr Mixed Oxide 2	-	-	-	-	-
Ti-Zr Mixed Oxide 3	-	-	-	-	-
Ti-Al-Zr Mixed Oxide 1	-	-	-	-	-
Ti-Al-Zr Mixed Oxide 2	-	-	-	-	-
Ti-Al-Zr Mixed Oxide 3	-	-	-	-	-

IBE

**Modell:
Primäre
Alveolar-
makrophagen**

Nekrose
(Glucuronidase, LDH)

Funktionelle
Zellschädigung
Fähigkeit zur Bildung
von ROS nach
16-stündiger
Partikelbelastung



Reaktive
Sauerstoff-
spezies
(ROS)

**Biologische
Komponenten
des
Vektormodells**

Produktion und
Freisetzung von
Mediatoren (TNFα)

IBE

**Positiv-
kontrolle**
Quarz DQ12
(60 pg/Zelle)

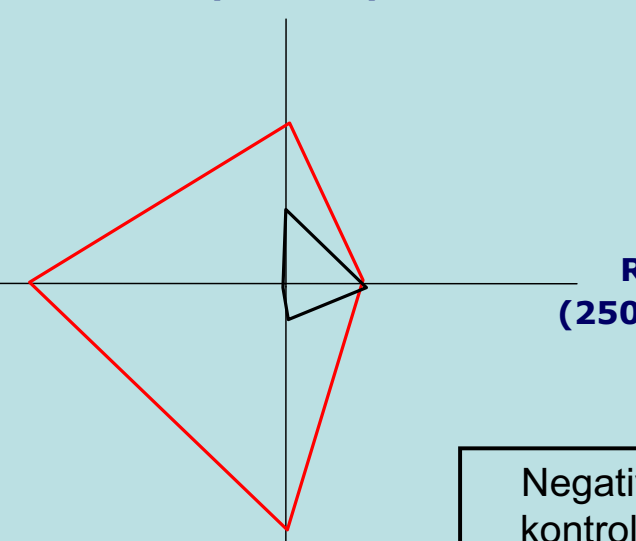
**Glucuronidase
(200 mol)**

**Funktionelle
Zellschädigung
(100%)**

**ROS
(250 nmol)**

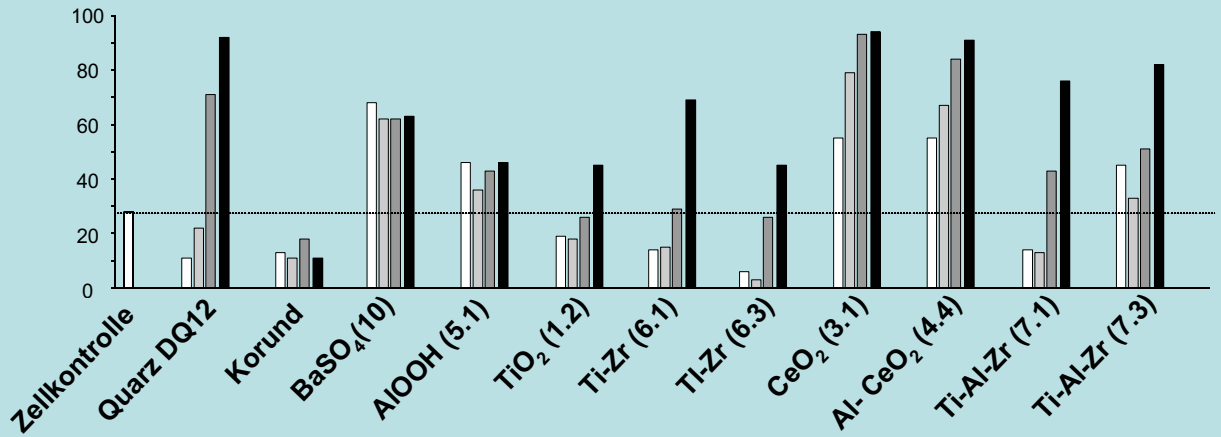
**TNFα
(30 units)**

**Negativ-
kontrolle**
Korund
(60 pg/cell)



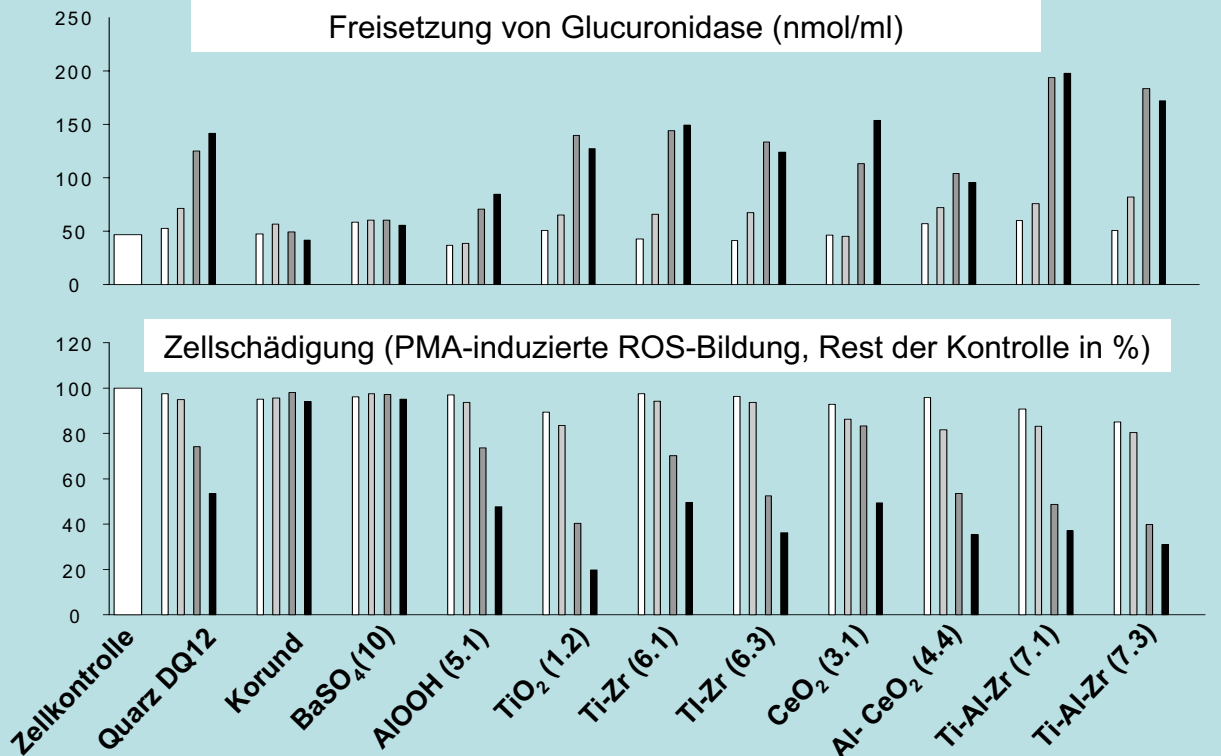


→ deutliche Differenzierung der biol. Aktivität



Dosierung: 15 - 30 - 60 - 120 pg pro Makrophage

Weitere Differenzierung: Enzymfreisetzung und funktionelle Zellschädigung



Dosierung: 15 - 30 - 60 - 120 pg pro Makrophage

Summenindex: S_{vivo} (→ Maximalwert: 400)

Parameter	Beitrag	Nachweismethode
Funktionelle Zellschädigung	→100	PMA-induzierte ROS-Freisetzung
Freisetzung von Glucuronidase	→100	Enzyme assay im Zellkulturüberstand
Lactatedehydrogenase (LDH)	→100	Enzyme assay im Zellkulturüberstand
Bioactives TNF	→100	Bioassay mit Zellkulturüberstand Lyse von Fibroblasten

$\text{BaSO}_4(10) < \text{AlOOH}(5.1) < \text{CeO}_2(3.1) \leq \text{Ti-Zr}(6.3) \leq \text{TiO}_2(1.2)$
 $\leq \text{CeO}_2(4.4) < \text{Al-Ti-Zr}(7.3)$

→ Korrelation mit *in vivo* Effekten

- Charakterisierung der verwendeten Nanopartikel
- Test-Eignung für jeden Nanopartikeltypen (Interferenz)
- Zellbiologische Tests unterscheiden sich in ihrer Sensitivität für spezifische Partikel
- Verwendung von ausgewählten Standardzelllinien, bevorzugt sensitive, diskriminante Zelllinien
- Verwendung von primären Zellen
- Test kurzfristiger (z.B. oxidativer Stress), mittelfristiger (z.B. Zelltod) und langfristiger (z.B. Mutationen, Transformation) Effekte

- Definition von in vitro NEL und LOEL für die verwendeten Nanopartikel
- Nur wenige der getesteten Partikel zeigten Effekte in in vitro Tests mit standardisierten Zelllinien
- Vergleichsdaten zur Evaluierung der in vitro Tests anhand der in vivo Daten

NanoCare Abschlussveranstaltung 16.06.-17.06.2009, Berlin

- Weiterentwicklung der Testsysteme
- Untersuchung und Identifizierung der für toxikologische Effekte relevanten Partikeleigenschaften (Struktur-Wirkungsbeziehung)
- Untersuchung der Partikeleffekte an und in Zellen (Partikelaufnahme, Kinetik, beteiligte Signalwege).

NanoCare Abschlussveranstaltung 16.06.-17.06.2009, Berlin

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!

S. Brill, J. Bruch, D. Hahn, A. Kroll, H.F. Krug, R. Landsiedel,
C.-M. Lehr, L. Ma-Hock, S. Mülhopt, K. Nau, H-R. Paur, M.H.
Pillukat, J. Pauluhn, J. Ragot, U.F. Schäfer, J. Schnekenburger,
C. Schulze, K. Tönsing, D. Wesner, M. Wiemann, K. Wiench,
W. Wohlleben, S. Zünkeler



Forschungszentrum Karlsruhe
In der Helmholtz-Gemeinschaft

ITC – TAB
ITG



UNIVERSITÄT
DES
SAARLANDES



Westfälische Wilhelms-Universität