

---

## **8. Anhang**

### **8.1. Abkürzungen**

ATP	Adenosintriphosphat
CCCP	Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon
CMT	Wirkungen hervorgerufen durch: Kanzerogenität, Mutagenität, Teratogenität
DMEM	Dulbecco`s Minimum Essential Medium

---

DMS	Dimethylsulfid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAD	Flavinadenindinukleotid
FCS	Fötale Kälberserum
GC/MS	Gaschromatografie/Massenspektrometrie
HaCaT	Humane Keratinozyten-Zelllinie
HEPES	biologischer Puffer: (N-(2-Hydroxy-ethyl)piperazin-N`-(4-butansulfonsäure)
IC <sub>50</sub>	Halbhemmungskonzentration
LFU	Labor für Umweltanalytik
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NNMO	N-Methylmorpholin-N-oxid
PBS	Phosphat puffer (phosphat buffered saline)
Proben: S01 - S40	Textilextrakte der Firma Steilmann
L01 - L17	Textilextrakte der Firma Lenzing
O01 - O11	Textilextrakte der Firma ONLINE
T01 - T14	Teppichextrakte

## 8.2. DIN-Vorschrift

### Keratinozytenatmungstest nach DIN

#### 1. Allgemeine Grundlagen

Der Keratinozytenatmungstest ist ein Kurzzeittest. Mit den vorhandenen Geräten und Chemikalien ist dieser Test leicht durchzuführen und vielseitig einsetzbar. Meßkriterium ist die Atmung der HaCaT-Zellen. Die Zellen der HaCaT-Zelllinie sind Keratinozyten, die den größten Anteil menschlicher Hautzellen darstellen. Der Keratinozytenatmungstest kann mit frisch gezüchteten oder konservierten HaCaT-Zellen durchgeführt werden. Die Konservierung erfolgt im flüssigen Stickstoff. Es ist jedoch ratsam frisch aufgetaute Zellen erst nach ein oder zwei Passagen zur Atmungsmessung zu verwenden. Die HaCaT-Zellen sind außerdem

---

nur verwendbar, wenn die im Abschnitt 12. genannten Gültigkeitskriterien erfüllt werden.

## 2. Anwendungsbereich

Der Keratinozytenatmungstest kann zur Prüfung von Textilextrakten (Schweißextrakt), von Textilinhalts- und Begleitstoffen verwendet werden. Ebenso können mit diesem Verfahren andere Substanzen, die mit der Haut in Berührung kommen, getestet werden (z.B. Kosmetika, Dermatika).

## 3. Begriffe

### 3.1. Textilschweißextrakt

Extrakt, aus der Textilprobe und der nach DIN 54020 hergestellten Lösung „Schweiß sauer“. Das Verhältnis Textilprobe zu eingesetztem Extraktionsmittel „Schweiß sauer“ beträgt 1:10. Nach der 24 Stunden bei 37°C dauernden Extraktion wird der gefilterte Extrakt aufgesalzen und der pH-Wert eingestellt.

### 3.2. Zellsuspension

Gemisch aus geernteten Zellen und Kulturmedium, das für die Messung bereitgestellt wird. Die Zelldichte beträgt etwa  $15 - 30 \cdot 10^6$  Zellen / ml.

### 3.3. Kulturmedium

Lösung, die für die Kultivierung der HaCaT-Zellen verwendet wird. Das Kulturmedium enthält alle wichtigen Substanzen, die für das ungestörte Wachstum und die Vermehrung der Zellen notwendig sind.

### 3.4. Meßmedium

Lösung, die für die Atmungsmessung der HaCaT-Zellen verwendet wird. Das Meßmedium enthält prinzipiell die gleichen Substanzen wie das Kulturmedium, jedoch ist der enthaltene Puffer kein Karbonatpuffer und damit nicht von der umgebenden Kohlendioxidkonzentration abhängig.

### 3.5. Kontrolle

Kontrollmessung, bei der das Atmungsprofil der HaCat-Zellen überprüft wird. Bei dieser Messung wird kein Extrakt oder andere Lösung zugegeben, sondern ausschließlich das Meßmedium, die Zellsuspension und die Wirkstoffe.

### 3.6. Atmungsprofil

---

Die Atmung der HaCat-Zellen ohne Zusatz von Substanzen, Extrakten oder Wirkstoffen ist die Basalatmung.

Bei Zugabe von Oligomycin wird die gemessene Atmung oligomycinresistente Atmung genannt (Endkonz.: 3µM). Bei Zugabe des Entkopplers CCCP (Endkonz.:7,7µM) wird die gemessene Atmung als entkoppelte Atmung bezeichnet. Die Antimycin A-resistente Atmung der HaCaT-Zellen ist die Atmung, die nach Antimycin A-Zugabe erfolgt (Endkonz.: 4µM).

Das Atmungsprofil ergibt sich aus dem Zusammenspiel dieser drei Wirkstoffe.

#### **4. Grundlagen**

Es wird die Hemmung der Atmung der Keratinozyten gemessen. Dabei wird der Textilschweißextrakt bzw. die zu untersuchende Lösung in verschiedener Konzentration in die Meßkammer zu den Zellen gegeben. Nach kurzer Zeit läßt sich ein veränderter Sauerstoffverbrauch/1Mio. Zellen \*min. messen. Daraus läßt sich dann die Hemmung der Atmung in Prozent angeben. Durch die unterschiedlichen Konzentrationen des zugegebenen Textilschweißextraktes bzw. der Substanzlösungen erhält man eine Dosis-Wirkungskurve. Aus dieser läßt sich dann der IC<sub>50</sub>-Wert ablesen.

#### **5. Störungen**

Nicht lösliche oder gelöste flüchtige Substanzen können in diesem Test nicht berücksichtigt werden. Ebenso beeinträchtigen Ausfällungen oder Substanzen, die mit dem Meßmedium ausfallen, den Keratinozytenatmungstest. In den Textilextrakten oder den zu testenden Lösungen dürfen keine sauerstoffzehrenden Substanzen enthalten sein. Die Zellen müssen ein intaktes Atmungsprofil aufweisen. Bei Spannungsschwankungen im Elektrizitätsnetz kann es zur Beeinflußung der Elektrode kommen.

Sind die Substanzen in einem Lösungsmittel gelöst, das durch seine Anwesenheit die Atmung der HaCaT-Zellen beeinflusst, kann man die Hemmwirkungen nicht eindeutig zuordnen.

#### **6. Bezeichnung**

Bezeichnung des Verfahrens zur Bestimmung der Hemmwirkung von Textilinhalts- und begleitstoffen, Kosmetika, usw. auf die Atmung der HaCaT-Zellen :

DIN .....

#### **7. HaCaT-Zellen**

Die Zelllinie der HaCaT-Zellen wurde in Heidelberg entwickelt und ist noch nicht überall käuflich zu erwerben. Bereits aus einer kleinen Menge dieser Zellen kann

---

ein Vielfaches gezüchtet werden. Durch Konservierung in flüssigem Stickstoff können die Zellen gelagert werden.

Um ein konstantes Atmungsprofil zu gewährleisten, müssen die Zellen ein Alter von mindestens 10 Tagen, höchstens jedoch von 14 Tagen erreicht haben. Die zur Atmungsmessung geeigneten Passagen liegen im Bereich von P15 bis P90.

## 8. Geräte

-Brutschrank, der eine gleichbleibende 5 %ige CO<sub>2</sub>-Konzentration und eine Temperatur von 37°C gewährleistet.

-Sterilbox, mit deren Hilfe Mediumwechsel, Zellvermehrung und Zellernte unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden.

-Zentrifuge, damit die Zellen vom Kulturmedium getrennt werden können.

-Mikroskop, zur Betrachtung der Zellkulturen, zur Erkennung von Infektionen und Zellwachstum.

-Neubauer-Zählkammer zur Auszählung der Zellen

-Behälter mit flüssigem Stickstoff, zur Konservierung der HaCaT-Zellen.

-Tiefkühlschrank ( -15 - -20°C ), zur Aufbewahrung von Textilextrakten, Wirkstoffen, FCS, Methylglycol, Meßmedium, usw.

-Kühlschrank ( 3 - 7°C ), zur Aufbewahrung von Kulturmedium, Trypsin/EDTA-Lösung, PBS/EDTA-Lösung, usw.

-Osmometer [Knauer] zur Osmolaritätseinstellung der Textilschweißextrakte nach der Extraktion und der pH-Einstellung

-Sauerstoffmessgerät Strathkelvin Instruments Oxygen Meter Model 781

-Sauerstoffelektrode und Meßkammer

-Aufzeichnungsgerät ( LKB-Schreiber oder Computer ) zur Erfassung des Sauerstoffverbrauchs

-Magnetrührwerk und passendes Magnetrührstück für die Meßkammer

-Thermostat mit Anschluß an die Glaswand der Meßkammer, um eine gleichbleibende Temperatur von 37°C während der Messung zu gewährleisten.

-Mikroliterspritzen und passende Teflonschläuche zum Einführen von Substanzen in die luftdicht verschlossene Meßkammer während der Messung

---

## 9. Chemikalien

- Ethanol zum Reinigen der Meßkammer
- Methylglykol
- Natriumchlorid
- Natriumdihydrogenphosphat-Hydrat
- L-Histidinmonohydrochlorid-Hydrat
- Natriumhydroxidlösung 0,1M; zur pH-Einstellung der Textilschweißextrakte
- Salzsäure 0,1M; zur pH-Einstellung der Textilschweißextrakte
- Oligomycin [Serva], verwendete Stammlösung: 1,8 mM
- CCCP (Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazin) [Sigma]; verwendete Stammlösung: 4,6 mM
- Antimycin A [Serva]; verwendete Stammlösung: 2,4mM
- Natriumdithionit
- DMEM mit HEPES-Puffer als Meßmedium
- DMEM mit 5% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin (10mg/l), 0,5% L-Glutamin (200nM)
- 0,05%ige EDTA-Lösung in PBS
- Trypsin/EDTA-Lösung
- Trypanblau-Lösung zum Auszählen der Zellen

## 10. Durchführung

### 10.1 Probenvorbereitung

Die Textilien werden mit saurem Schweiß nach DIN 54020 extrahiert (24 Stunden bei 37°C). Nach Beendigung der Extraktion wird der Überstand filtriert und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Anschließend wird durch Zugabe von Natriumdithionit die Osmolarität auf einen Wert von 300 Millosmol gebracht.

---

Soll eine Substanz untersucht werden, so muß diese in Lösung gebracht werden. Ist die Substanz nicht in Wasser löslich, so wird sie in Methylglykol gelöst. Beim Einsatz der Methylglykollösungen im Keratinozytenatmungstest ist jedoch darauf zu achten, daß die eingesetzte Menge 6 µl nicht überschreitet, da in größeren Mengen das Lösungsmittel Methylglycol selbst toxisch auf die Keratinozyten wirkt.

## 10.2 Zellgewinnung

Jedes Arbeiten mit den HaCaT-Zellen muß unter sterilen Bedingungen erfolgen.

### 10.2.1 Zellkultivierung und Vermehrung

Die HaCaT-Zellen werden in dafür vorgesehenen Kulturgefäßen in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Mediumwechsel erfolgt alle 2-4 Tage. Nach je 7 Tagen werden die Zellen passagiert. Das heißt, das Medium wird abgesaugt, ca. 2-4 ml EDTA/PBS-Lösung zugesetzt, 5 min. im Brutschrank inkubiert, Überstand abgesaugt, 2-4 ml Trypsin/EDTA zugegeben, 3-5 min. im Brutschrank inkubiert, die gelösten Zellen mit der zehnfachen Menge der Trypsin/EDTA-Lösung an DMEM versetzt und im Verhältnis 1:10 in neue Kulturgefäße überführt. Nach ca. 5-7 Tagen sind die Zellen so dicht gewachsen, daß ein lückenloser Zellrasen entsteht.

### 10.2.2 Zellernte

Die Ernte der HaCaT-Zellen erfolgt nach 10-14 Tagen nach dem Passagieren. Dazu werden die gleichen Arbeitsschritte wie beim Passagieren durchgeführt. Nach Aufnahme der abgelösten Zellen im Medium wird diese Lösung in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min. bei 1200 U/min zentrifugiert. Danach wird der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in sehr wenig Meßmedium aufgenommen und die Zelldichte mit einer Neubauer-Zählkammer und Trypanblau bestimmt. Die erhaltene Zellsuspension sollte eine Dichte von 20-50 \*10<sup>6</sup> Zellen/ml haben.

Die Zellsuspension wird in einem Eisbad aufbewahrt und ist für ungefähr 4-6 Stunden verwendbar.

## 10.3. Die Atmungsmessung

Vor jeder Meßserie wird die Elektrode geeicht. D.h. der Wert der Sauerstoffkonzentration vom Meßmedium nachdem Natriumdithionit zugegeben wurde, wird als Nullwert genommen. Zeigt das Elektrodenmeßgerät trotzdem eine Sauerstoffkonzentration in der luftdicht verschlossenen Meßkammer an, so muß dies nachgeregelt werden.

In die gereinigte Meßkammer werden 600 µl des vortemperierten (auf 37°C) Meßmediums gegeben. Die Elektrode wird so aufgesetzt, daß sich in der

Meßkammer keine Luft mehr befindet. Das Rührstück darf beim Rühren nicht an die Elektrodenmembran anstoßen, da diese sonst beschädigt werden könnte. Zeigt das Meßgerät eine konstante Sauerstoffkonzentration an, so ist das Meßmedium ausreichend vortemperiert. Jede weitere Zugabe von Zellen, Textilschweißextrakten, Substanzlösungen oder Wirkstoffen erfolgt mittels Mikroliterspritzen mit einem Teflonschlauch, der seitlich an der Elektrode eingeführt wird. Die Menge der nun zugeführten Zellsuspension richtet sich nach der Dichte der Zellen. Nach einer kurzen Anpassungsphase ist der Sauerstoffverbrauch/min. stabil.

Nach ca. 2-3 min. wird dann der Textilschweißextrakt bzw. die Substanzlösung zugeführt. Anschließend werden je 1µl der Wirkstoffe Oligomycin, CCCP und Antimycin A jeweils in die Meßkammer gespritzt und den lineare Sauerstoffverbrauch/min. erfaßt. Nach jeder Messung werden die Elektrode und die Meßkammer gründlich mit Alkohol und destilliertem Wasser gespült.

Die erste Messung ist immer eine Kontrollmessung. Dabei wird kein Textilschweißextrakt oder eine Substanzlösung zugegeben, sondern nach der Zellsuspension werden direkt die Wirkstoffe zugeführt. Kontrollmessungen müssen innerhalb einer Meßserie wiederholt und können auch mit dem Lösungsmittel der Substanzen durchgeführt werden. Anhand von Kontrollmessungen läßt sich das Atmungsprofil der HaCaT-Zellen ablesen.

## 11. Auswertung

Die Auswertung der Messungen erfolgt mit Hilfe eines Schreibers oder eines Computers. Wichtig ist, daß der Sauerstoffverbrauch pro Minute abgelesen werden kann. Er wird in nmol O<sub>2</sub> / min\*10<sup>6</sup> Zellen angegeben.

Die Bestimmung der Hemmung der Basalatmung wird wie folgt berechnet:

$$\frac{[\text{Hemmung der Basalatmung in \%}]}{100 \%} = \frac{[\text{Atmungswert nach Zugabe Textilschweißextraktes bzw. der Substanzlösung}] - [\text{Atmungswert nach Zugabe von Antimycin A}]}{[\text{Basalatmung}] - [\text{Atmungswert nach Zugabe von Antimycin A}]}$$

Die Hemmung der CCCP-entkoppelten Atmung durch ein Textilschweißextrakt oder eine Substanzlösung wird wie folgt berechnet:

$$\frac{[\text{Basalatmung der Messung}] - [\text{Atmungswert nach Zugabe von Antimycin A}]}{[\text{Atmungswert nach Zugabe von CCCP}] - [\text{Atmungswert nach Zugabe von Antimycin A}]} * F$$



---

100%

[Hemmung der CCCP-  
entkoppelten Atmung in %]

Wobei der Faktor F sich wie folgt berechnet:

$F = [\text{Atmungswert der CCCP-entkoppelten Atmung der Kontrolle}] - [\text{Atmungswert nach Zugabe von Antimycin A bei der Kontrolle}]$

$$F = \frac{[\text{Atmungswert der CCCP-entkoppelten Atmung der Kontrolle}] - [\text{Atmungswert nach Zugabe von Antimycin A bei der Kontrolle}]}{[\text{Atmungswert der Basal-Atmung der Kontrolle}] - [\text{Atmungswert nach Zugabe von Antimycin A bei der Kontrolle}]}$$

Aus den erhaltenen Werten für die Hemmwirkung der Basal-Atmung bzw. die der CCCP-entkoppelten Atmung lassen sich Dosis-Wirkungs-Kurven darstellen. Die Konzentration wird üblicherweise logarithmisch aufgetragen.

## 12. Gültigkeitskriterien

Die gewonnenen Ergebnisse können nur verwendet werden, wenn alle Gültigkeitskriterien erfüllt sind. Der Sauerstoffverbrauch des Meßmediums muß gleichbleibend einen konstanten Wert besitzen, bevor die Zellsuspension zugegeben wird. Der Faktor F sollte mindestens 1,3 betragen, sonst ist die Entkopplung der Atmung nicht mehr gewährleistet. Die Werte der Basal-Atmung der verschiedenen Messungen sollten ungefähr gleich sein innerhalb einer Meßserie.

## 13. Angabe der Ergebnisse

Aus den erhaltenen Werten für die Hemmwirkung der Basal-Atmung bzw. die der CCCP-entkoppelten Atmung lassen sich Dosis-Wirkungs-Kurven darstellen. Die Konzentration wird üblicherweise logarithmisch aufgetragen. Der  $IC_{50}$ -Wert läßt sich daraus ablesen.

## 14. Untersuchungsbericht

Der Bericht soll sich auf diese Verfahren beziehen und folgende Einzelheiten beinhalten:

-Angabe der zu untersuchenden Textilie bzw. Substanz

---

-Angaben in welchem Lösungsmittel die Substanz gelöst und mit welchen Konzentrationen gearbeitet wurde

-Alter der Zellen: Passage, Tag

-Besonderheiten, Abweichungen vom normalen Verfahren

## **Lebenslauf**

### **· Persönliche Angaben:**

Name: Karin Markgraf  
Anschrift: Fritz-Kirsch-Zeile 18 12459 Berlin  
Staatsangehörigkeit: Deutsch  
Geburtsdatum: 06.02.1972  
Geburtsort: Dresden  
Familienstand: ledig

### **· Schulbildung:**

09/78 – 10/80 Botschaftsschule Bagdad/ Irak  
11/80 – 08/81 2. Polytechnische Oberschule Dresden-Mitte  
09/81 – 08/82 10. Polytechnische Oberschule Berlin-Treptow  
09/82 – 08/86 31. Polytechnische Oberschule Berlin-Köpenick  
09/86 – 08/90 Spezialschule für Mathematik und Naturwissenschaften „Heinrich Hertz“ Berlin; (Abschluß: Abitur)

### **· Studium:**

09/90 – 09/95 Humboldt-Universität zu Berlin  
Fachbereich Chemie; Spezialisierung: Biochemie  
(Abschluß: Diplomchemiker)  
11/95 – 12/97 Experimenteller Teil der Dissertation am Institut für Biochemie der Charité, medizinische Fakultät der Humboldt-Universität

### **· Beschäftigung:**

01/98 – 08/98 Institut für Immunologie und Molekularbiologie der veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin; Thema: Gentransfer durch Virosomen

---

seit 09/98

BioS Biotechnologie Schönow in Zusammenarbeit mit AG Schmidt (IMB/Veterinärmedizin/FU) und AG Herrmann (Biophysik/HU);  
Thema: Erzeugung Transgener Rinderembryonen

## **Danksagung**

Meinen besonderen Dank möchte ich Prof. F. Hucho und Prof. M.F.G. Schmidt aussprechen, da sie sich bereit erklärt haben, die Gutachten für meine Arbeit zu übernehmen.

Mein herzlicher Dank gilt Dr. A. Hofmann am Paul-Ehrlich-Institut (Langen), für die fachliche Unterstützung und die vielfältigen Anregungen während der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

Besonders danke ich Prof. T. Schewe und Frau Dr. C. Schewe für die Überlassung des Themas, die großartige Unterstützung meiner Untersuchungen und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Ebenso möchte ich mich bei Prof. H. Kühn und seiner Arbeitsgruppe bedanken, die mir die Benutzung der Geräte im Institut ermöglichten.

Außerdem bedanke ich mich bei Dr. Beining und Dr. Polster am Labor für Umweltanalytik Berlin für die Möglichkeit der Nutzung der GC-MS-Anlage, bei Frau Dr. Knöpke am Labor für Umweltanalytik Schönwalde für die Durchführung der Leuchtbakterien- und Daphnientests.

Ferner möchte ich Dr. H.-G. Holzhütter für das Bereitstellen des Programmes SIMFIT und die Einarbeitung in die mathematische Auswertung danken, ebenso seiner Mitarbeiterin H. Pospisiel für ihre Unterstützung.

---

Ganz besonders danke ich Frau Kinder und Frau Martin für die kritische Durchsicht und das Korrekturlesen des Manuskriptes.