

# Mechanistische Analysen immuntoxischer Substanzeffekte auf die humorale Reaktion in Mishell-Dutton-Kulturen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Lydia Mareen Köper

aus Vechta

Berlin, Juli 2011

aus dem Institut für Toxikologie der Bayer HealthCare AG in Wuppertal

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. H.-W. Vohr Koreferent: Prof. Dr. R. Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 14. November 2011

## Erklärung

Die vorgelegte Dissertation mit dem Thema "Mechanistische Analysen immuntoxischer Substanzeffekte auf die humorale Reaktion in Mishell-Dutton-Kulturen" habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Berlin, Juli 2011

Lydia Mareen Köper

TRENNE DICH NICHT VON DEINEN ILLUSIONEN. WENN SIE VERSCHWUNDEN SIND, WIRST DU WEITER EXISTIEREN, ABER AUFGEHÖRT HABEN ZU LEBEN.

Mark Twain

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung			1		
1.1 Das Immunsystem			nmunsystem	1		
		1.1.1	Überblick über die angeborene und erworbene Immunität $\ldots \ldots \ldots$	1		
1.1.2 Die humorale Immunreaktion		Die humorale Immunreaktion	4			
		1.1.3	Polyklonale Aktivierung von Lymphozyten	6		
	1.2	Immuntoxizität				
		1.2.1	Immun suppressive Substanzen und ihre Mechanismen $\ \ldots\ \ldots\ \ldots\ \ldots$	7		
			1.2.1.1 Glukokortikoide	7		
			1.2.1.2 Zytostatika	8		
			1.2.1.3 Immunophilin-bindende Substanzen	8		
			1.2.1.4 Biologicals	9		
			$1.2.1.5 \qquad {\rm Medikamente\ mit\ sekund\"ar\ immunsuppressiver\ Wirkung\ und\ Che-}$			
			mikalien	10		
		1.2.2	Toxikologische Evaluierung immunsuppressiver Substanzeffekte $\ .\ .\ .$ .	11		
			1.2.2.1 Standardtoxizitäts studien	11		
			1.2.2.2 Funktionstests	12		
	1.3	In vitro Tests zur humantoxikologischen Risikobewertung von Substanzen $\ldots$				
		1.3.1 Die EU-Richtlinie für Kosmetika und die REACH-Verordnung				
		1.3.2	Validierung und behördliche Anerkennung von <i>in vitro</i> Tests	16		
		1.3.3	Alternative Methoden zur Evaluierung immunsuppressiver Substanzeffekte	17		
			1.3.3.1 Stimulationstests zur Identifikation imnunsuppressiver Substan-			
			zen <i>in vitro</i>	17		
			1.3.3.2 In vitro Funktionstests - der Mishell-Dutton-Test	18		
	1.4	Frages	tellung dieser Arbeit	19		
<b>2</b>	Mat	terial ı	ınd Methoden	<b>21</b>		
	2.1	Material und Versuchstiere				
		2.1.1	Versuchstiere	21		
		2.1.2	Labormaterial	21		
		2.1.3	Laborgeräte	22		
		2.1.4	Verbrauchschemikalien, Puffer und Lösungen	23		
		2.1.5	Kulturmedien und Zusätze	25		
		2.1.6	Vehikel- und Applikationssubstanzen	26		
		2.1.7	Immunstimulanzien	28		
		2.1.8	Antikörper für ELISA	28		

	2.1.9	Antikörper für Analysen mittels Durchflußzytometrie (FACS)		29
	2.1.10	Kits		29
	2.1.11	Software	)	29
2.2	Metho	den und	Versuchsprotokolle	30
	2.2.1	Herstellu	ng von Zellsuspensionen für <i>in vitro</i> und <i>ex vivo</i> Versuche $\ldots$	30
		2.2.1.1	Herstellen von Milzzellsuspensionen	30
		2.2.1.2	Herstellen von Suspensionen peripherer mononukleärer Blutzel-	
			len (PBMC)	30
	2.2.2	Bestimm	ung der Zellzahl	31
		2.2.2.1	Automatisierte Zellzahlbestimmung am Partikelzählgerät	31
		2.2.2.2	Mikroskopische Zellzahlbestimmung mit der Neubauerzählkammer	31
	2.2.3	Der Plac	que Forming Cell Assay (PFCA)	32
		2.2.3.1	Intraperitoneale Applikation von Substanzen	32
		2.2.3.2	Die Immunisierung	33
		2.2.3.3	Der <i>ex vivo</i> Plaque Assay	33
		2.2.3.4	Auswertung	34
		2.2.3.5	Histopathologische Untersuchungen	34
	2.2.4	Mitogen	-induzierte Stimulation von Milzzellen	34
		2.2.4.1	Ansetzen von Kulturen für Mitogenstimulationen	34
		2.2.4.2	Zellproliferations analyse (BrdU-ELISA)	35
		2.2.4.3	Zytokinanalyse (ELISA)	36
		2.2.4.4	Auswertung	36
	2.2.5	Viabilitä	itsassays	36
		2.2.5.1	Laktat Dehydrogenase Assay (LDH-Assay)	37
		2.2.5.2	Resazurin Assay	38
		2.2.5.3	Auswertung	39
	2.2.6	Mishell-	Dutton-Kultur	39
		2.2.6.1	Ansatz der Mishell-Dutton-Kultur mit murinen Milzzellen	39
		2.2.6.2	Ansatz der Mishell-Dutton-Kultur mit Milzzellen der Ratte	
			$(Waschprotokoll) \dots $	40
		2.2.6.3	Ansatz der Mishell-Dutton-Kultur mit peripheren mononukle-	
			ären Zellen	40
		2.2.6.4	Induktion der Substanzmetabolisierung durch S9-Mix (Cytochrom	
			P450)	41
		2.2.6.5	Inhibierung der Cytochrome CYP2E1 und CYP2B6 durch Die-	
			thyldithiocarbamat (DDC)	41
		2.2.6.6	Neuraminidase-Verdau von Zellen	42
		2.2.6.7	Zelluläre und humorale Kulturzusätze	42
		2.2.6.8	Depletion der Makrophagen	44
		2.2.6.9	SRBC-ELISA und IgM-ELISA	44
		2.2.6.10	Der Plaque Assay	45
		2.2.6.11	Auswertung	45

		2.2.7	RNA-Anal	yse mit Mishell-Dutton-Kulturen	46		
			2.2.7.1 Is	solation der RNA	46		
			2.2.7.2 G	Qualitätskontrolle der RNA am Bioanalyzer	47		
			2.2.7.3 G	Quantifizierung der RNA	47		
			2.2.7.4 R	Leverse Transkription	47		
			2.2.7.5 G	Quantitative Real-time PCR	47		
			2.2.7.6 A	uswertung	49		
		2.2.8	FACS-Ana	lyse mit Mishell-Dutton-Kulturen	49		
			2.2.8.1 A	ufarbeitung der Milzzellen für die FACS-Analyse	49		
			2.2.8.2 F	ärbung muriner Milzzellen	50		
			2.2.8.3 F	ärbung von Milzzellen der Ratte	50		
			2.2.8.4 P	Probenanalyse am FACS und Auswertung der Daten	51		
3	$\mathbf{Erg}$	ebniss	e		53		
	3.1	Mitogenstimulationsversuche zur Detektion immunsuppressiver Substanzeffekte					
		in vitr	<i>o</i>		53		
		3.1.1	Mitogensti	mulationsversuche an Milzzellen der Maus	53		
		3.1.2	Mitogensti	mulationsversuche an Milzzellen der Ratte	59		
	3.2	Aufba	u und Etabl	ierung von Mishell-Dutton-Kulturen	64		
		3.2.1	Mishell-Du	tton-Kulturen mit murinen Milzzellen	64		
		3.2.2	Mishell-Du	tton-Kulturen mit Milzzellen der Ratte	66		
		3.2.3	FACS-Ana	lyse CD4-positiver T-Zellfraktionen von Milzzellen in Mishell-			
			Dutton-Ku	lturen	70		
		3.2.4	Mishell-Du	tton-Kulturen mit peripheren mononukleären Zellen (PBMC) .	75		
			3.2.4.1 N	Iurines Blut	75		
			3.2.4.2 B	Blut der Ratte	76		
			3.2.4.3 H	lumanes Blut	77		
	3.3	Mishe	l-Dutton-K	ulturen zur Detektion immunsuppressiver Substanzen $in\ vitro\$ .	78		
		3.3.1	Screening i	immunsuppressiver und nicht-immunsuppressiver Substanzen $% \mathcal{S}_{\mathrm{s}}$ .	78		
		3.3.2	Reproduzie	erbarkeit und Klassifizierung	83		
		3.3.3	Vergleich o	der Detektion immunsuppressiver Substanzen durch Mishell-			
			Dutton-Te	sts und Mitogenstimulationen	85		
		3.3.4	Metabolisr	nus-abhängige Substanzeffekte	86		
	3.4	Analy	se der Immu	ınsuppressivität der Substanz Urethan	89		
		3.4.1	Die immur	suppressive Wirkung des Urethans in vivo und in vitro	89		
		3.4.2	Immunsup	pressive Wirkung von Urethanmetaboliten	92		
		3.4.3	PCR-Array	y	94		
		3.4.4	Metabolisi	erung von Urethan in Mishell-Dutton-Kulturen	96		
4	$\mathbf{Disl}$	kussio	1		101		
	4.1	${\it Mitogenstimulations versuche\ zur\ Detektion\ immunsuppressiver\ Substanzeffekte}$					
		in vitr	ю		101		
	4.2	2 Aufbau und Etablierung von Mishell-Dutton-Kulturen					

		4.2.1	Mishell-Dutton-Kulturen mit murinen Milzzellen	. 106
		4.2.2	Mishell-Dutton-Kulturen mit Milzzellen der Ratte	. 108
		4.2.3	FACS-Analyse der CD4-positiven T-Zellfraktion von Milzzellen $\ .\ .\ .$	. 112
		4.2.4	Mishell-Dutton-Kulturen mit peripheren mononukle ären Zellen $\ .\ .\ .$	. 114
	4.3	Mishe	ll-Dutton-Kulturen zur Detektion immunsuppressiver Substanzen <i>in vitro</i>	. 116
		4.3.1	Der Mishell-Dutton-Test	. 116
		4.3.2	Der Mishell-Dutton-Test mit metabolischem System (S9-Mix)	. 118
	4.4	Analy	se der Immunsuppressivität der Substanz Urethan	. 119
		4.4.1	Die immunsuppressive Wirkung des Urethans und seiner Metaboliten $in$	
			vivo und in vitro	. 119
		4.4.2	Die Metabolisierung von Urethan <i>in vitro</i>	. 121
5	Aus	sblick		125
6	Zus	amme	nfassung	127
7	Sun	nmary		129
Literaturverzeichnis 13				
Abbildungsverzeichnis 14				149
Tabellenverzeichnis 15				
Abkürzungsverzeichnis 15				153
Danksagung 15				157

# Kapitel 1

# Einleitung

### 1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein komplexes System zum Schutz eines Organismus vor exogenen Noxen wie Pathogenen und Toxinen. Zudem verhindert es endogene Schädigungen, wie die Entartung und Ausbreitung von Zellen (Tumorwachstum). Es besteht aus einer Vielzahl zellulärer und humoraler Komponenten, wobei sämtliche Zellen des Immunsystems im Knochenmark von hämatopoetischen Stammzellen gebildet werden. Generell unterscheidet man zwei Möglichkeiten des Immunsystems, auf bestimmte Pathogene zu reagieren: die angeborene und die erworbene Immunität. Die daran beteiligten Zelltypen lassen sich ebenfalls in zwei Kategorien unterteilen, in myeloide und lymphoide Zellen.

#### 1.1.1 Überblick über die angeborene und erworbene Immunität

Die angeborene Immunität ist die erste Verteidigung des Organismus gegen eindringende Pathogene und wird von myeloiden Zellen sowie Komplement übernommen. Einzige Ausnahme bilden Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), die zwar der angeborenen Immunität zuzuordnen sind, aber der lymphoiden Linie entstammen. Ihre Aufgabe liegt in der Elimination virusinfizierter oder tumorös veränderter Zellen aus dem Organismus.

Myeloide Zellen lassen sich unterteilen in Granulozyten, Monozyten bzw. Makrophagen, Mastzellen und dendritische Zellen. Zu den Granulozyten zählen neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten. Sie befinden sich im Blut, werden aber zur Bekämpfung von Pathogenen an Infektionsorte rekrutiert. Dies geschieht durch eine Ausschüttung von Chemokinen im Rahmen einer lokalen Entzündungsreaktion, die durch die Infektion ausgelöst wird. Granulozyten besitzen Rezeptoren für Chemokine und gelangen chemotaktisch durch Wanderung entlang der Chemokingradienten zum Infektionsort. Dort können sie, durch die lokale Ausbildung verschiedener Adhäsionsmoleküle der Blutgefäßwände, in die peripheren Gewebe übertreten. Neutrophile Granulozyten sind primär phagozytische Zellen, die Pathogene internalisieren und abtöten. Bei eosinophilen und basophilen Granulozyten handelt es sich um primär sekretorische Zellen, die durch Freisetzung ihrer Granula Effektorfunktionen ausüben. Während eosinophile Granulozyten antikörperbehaftete, also opsonisierte, Pathogene abtöten, hat die Freisetzung der Granula basophiler Granulozyten eine Verstärkung der lokalen Entzündungsreaktion zur Folge, durch die unter anderem weitere phagozytisch aktive Zellen angelockt werden. Die Ausschüttung der Granula basophiler Granulozyten wird zumeist durch Antigenbindung der an oberflächliche IgE-Rezeptoren gebundenen IgE-Antikörper ausgelöst. Die Funktion basophiler Granulozyten im Blut scheint äquivalent zu der im Gewebe residenter Mastzellen zu sein. Beide Zelltypen lösen Entzündungsreaktionen aus, vorwiegend durch Aktivierung der IgE-Rezeptoren mit anschließender Freisetzung der Granula.

Monozyten sind unreife Makrophagen, die im Blut zirkulieren. Zu reifen Makrophagen differenzieren sie, nachdem sie in die peripheren Gewebe eingedrungen sind. Dort nehmen sie ihre Funktion als residente Phagozyten auf und können, insbesondere durch Ausschüttung des Zytokins  $\text{TNF}\alpha$ , lokale Entzündungsreaktionen nach Pathogenerkennung auslösen. Dendritische Zellen hingegen sind im unreifen Stadium in den peripheren Geweben phagozytisch aktiv. Wird ein Antigen als potenziell gefährlich erkannt und von dendritischen Zellen internalisiert, wandern diese aus der Peripherie zu den sekundären lymphatischen Organen. Dort können sie das Antigen T-Lymphozyten präsentieren und so eine erworbene (adaptive) Immunreaktion initiieren. Die Funktion der Antigenpräsentation kann neben dendritischen Zellen auch von Makrophagen ausgeübt werden.

Lymphozyten entstammen der lymphoiden Zelllinie und werden der erworbenen Immunität zugeordnet. Während die angeborene Immunität die erste Verteidigungslinie des Organismus gegen Pathogene darstellt und diese sofort bekämpft, wird die erworbene Immunität erst wenige Tage nach Eindringen eines Pathogens aktiv. Grund dafür sind die erforderlichen Aktivierungsund Proliferationsschritte der Lymphozyten.

Bei den Lymphozyten unterscheidet man B- und T-Zellen, wobei letztere wiederum in CD4positive T-Helferzellen und CD8-positive zytotoxische T-Zellen unterteilt werden. B-Zellen sind durch B-Zell-Rezeptoren bzw. membrangebundene Antikörper auf ihrer Oberfläche gekennzeichnet, während T-Zellen T-Zellrezeptoren (TCR) assoziiert mit einem CD3-Molekül aufweisen. Jeder Lymphozyt weist mit seinem Rezeptor eine eigene, einmalige Antigenspezifität auf, wie sie bei Zellen der angeborenen Immunität nicht vorkommt. Diese Vielfalt wird durch variable Gensegmente erreicht, die in der Entwicklung der Lymphozyten zufällig zusammengelagert werden. Dieser Prozess findet in den primären lymphatischen Geweben statt, bei T-Zellen im Thymus und bei B-Zellen im Knochenmark. Deutlich autoreaktive Lymphozyten, die zu Autoimmunerkrankungen führen können, werden dort im Regelfall während ihrer Entwicklung eliminiert. Fertig entwickelte naive Lymphozyten verlassen das Knochenmark bzw. den Thymus und zirkulieren fortwährend zwischen Blut und Lymphe. Dabei passieren sie die sekundären lymphatischen Organe, in denen sie Kontakt mit antigenpräsentierenden Zellen (APC) aufnehmen und aktiviert werden können.

Zu den sekundären lymphatischen Organen zählen u.a. Milz, Lymphknoten und darmassoziierte lymphatische Gewebe (GALT). Strukturell sind sich diese Organe sehr ähnlich. Sie alle weisen B- und T-Zellregionen auf, zwischen denen sich Keimzentren befinden, in denen B-Zellen nach ihrer Aktivierung proliferieren. Unterschiede zu anderen sekundären lymphatischen Organen weist insbesondere die Milz auf, da sie neben der lymphatischen Funktion, die in der weißen Pulpa ausgeführt wird (*Abbildung* 1.1), eine weitere Funktion einnimmt. In der roten Pulpa werden gealterte Erythrozyten gesammelt und abgebaut. In die Milz gelangen Antigene über die Blutbahn, während diese in die Lymphknoten über die Lymphe eintreten. In darmassoziierten lymphatischen Geweben wie den Peyerschen Plaques werden Antigene von speziellen Epithelzellen, den M-Zellen, gesammelt.



Abbildung 1.1 – Querschnitt durch die weiße Pulpa der Milz. Gekennzeichnet sind die B-Zell-Corona, in der sich B-Zellen befinden, sowie das Keimzentrum, in dem aktivierte B-Zellen proliferieren. Die PALS-Region (periateriolar lymphoid sheath) ist der Bereich, in dem sich vorwiegend T-Zellen befinden und dort Antigene von Makrophagen und dendritischen Zellen präsentiert bekommen. Die antigenpräsentierenden Zellen gelangen über die Arteriole in die PALS-Region.

In den sekundären lymphatischen Organen wird Lymphozyten das von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommene Antigen über Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) I (für die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen, Erkennung des Komplexes über den CD8-Rezeptor) oder MHC II (zur Aktivierung von T-Helferzellen, Erkennung des Komplexes über den CD4-Rezeptor) präsentiert. Erkennt eine T-Zelle das Antigen über ihren spezifischen T-Zellrezeptorkomplex, wird sie im sekundären lymphatischen Organ festgehalten. Erhält die T-Zelle von der antigenpräsentierenden Zelle zusätzlich ein kostimulatorisches Signal durch die Bindung von CD80 oder CD86 an das Oberflächenmolekül CD28, so wird sie aktiviert und beginnt zu proliferieren. Man spricht bei diesem Vorgang von einer klonalen Expansion, da alle Tochterzellen den gleichen T-Zellrezeptor wie die ursprünglich aktivierte T-Zelle tragen. Die klonale Expansion ist stark von der Transkription und Sezernierung von IL-2 abhängig, einem Zytokin, das autokrin auf T-Zellen wirkt. Der Prozess der Proliferation geht mit einer Differenzierung der T-Zellen einher, die sich zu so genannten reifen Zellen entwickeln. Reife CD8-positive zytotoxische T-Zellen können direkt Effektorfunktionen im Organismus ausüben, indem sie infizierte Zellen abtöten, als Untereinheit regulatorischer T-Zellen die Immunreaktion kontrollieren oder Makrophagen, insbesondere durch die Sezernierung des Zytokins IFN $\gamma$ , aktivieren. Abhängig von den Zytokinen, die von den antigenpräsentierenden Zellen ausgeschüttet werden, differenzieren CD4-positive T-Helferzellen weiter in T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17 oder regulatorische T-Zellen (T<sub>reg</sub>). Letztere bewirken eine Limitierung der Immunreaktion gegenüber Fremdantigenen und eine Erhaltung der Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen, während T<sub>H</sub>17-Zellen, T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen den Effektor-T-Zellen zuzuordnen sind. Sie bewirken durch eine Ausschüttung bestimmter Zytokine, die über spezifische Rezeptoren Wirkungen auf die Zielzellen ausüben, eine Aktivierung unterschiedlicher Zelltypen. T<sub>H</sub>17-Zellen fördern unter anderem die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und verstärken die Barrierefunktion von Epithelzellen durch die Sekretion von IL-17, TNF $\alpha$  und GM-CSF. Während T<sub>H</sub>1-Zellen durch die Ausschüttung von IL-2, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  vorwiegend Makrophagen, NK-Zellen und zytotoxische T-Zellen aktivieren, wirken die Zytokine der T<sub>H</sub>2-Zellen, IL-4, IL-5 und IL-13, vorwiegend auf B-Zellen. B-Zellen sezernieren nach ihrer Differenzierung zu reifen Plasmazellen, welche zu den Infektionsorten wandern, Antikörper, die Teil der humoralen Immunität sind. Des Weiteren entwickeln sich einige B- und T-Zellen zu Gedächtniszellen, wodurch bei einem erneuten Antigenkontakt eine schnellere und effizientere Immunreaktion ausgelöst werden kann. Der Ablauf humoraler Immunreaktionen und der dafür notwendigen Aktivierung von B-Zellen soll im Folgenden genauer erläutert werden, ebenso die mitogen-induzierte polyklonale Aktivierung von Lymphozyten.

#### 1.1.2 Die humorale Immunreaktion

Die humorale Immunreaktion vermittelt Schutz gegen Pathogene in den Extrazellulärräumen des Körpers. Viele Erreger vermehren sich dort, und auch die meisten intrazellulären Erreger durchwandern die Extrazellulärräume bei ihrer Verbreitung von Zelle zu Zelle. Somit können verschiedenste Erreger humoral bekämpft werden.

Für die Entwicklung einer humoralen Immunreaktion sind zunächst auf zellulärer Ebene verschiedene Interaktionen erforderlich, die zum Teil in Kapitel 1.1.1 beschrieben wurden und alle in den sekundären lymphatischen Organen stattfinden. Antigen-spezifische CD4-positive T-Helferzellen werden dort von antigenpräsentierenden Zellen aktiviert, wenn sie neben der Bindung des T-Zellrezeptorkomplexes an das Antigen ein zusätzliches kostimulatorisches Signal erhalten. Für die Entstehung einer humoralen Immunreaktion ist die Aktivierung von B-Zellen entscheidend. Diese Aufgabe wird von zu  $T_H$ 2-Zellen differenzierten T-Helferzellen ausgeführt. Wenn B-Zellen über ihr Oberflächenimmunglobulin (B-Zell-Rezeptor) ein Antigen binden, internalisieren sie dieses und präsentieren es über MHC II auf ihrer Oberfläche. Die Aktivierung der B-Zelle geschieht, mit Ausnahme einiger weniger mikrobieller Antigene, die eine direkte Aktivierung bewirken können, nur dann, wenn die B-Zelle von einer  $T_H$ 2-Zelle ein kostimulatorisches Signal erhält. Dieses Signal entsteht durch eine so genannte gekoppelte Erkennung. Das von der B-Zelle erkannte und folglich auf MHC II präsentierte Antigen muss von einer zuvor aktivierten  $T_{H}$ 2-Zelle ebenfalls erkannt werden. Dies bewirkt eine Synthese und Freisetzung von Effektormolekülen der T<sub>H</sub>2-Zelle, die zu einer Aktivierung der B-Zelle führen. Dabei handelt es sich unter anderem um die Expression von CD40-Ligand (CD40L) und IL-4, die in Kombination eine Proliferation der B-Zelle bewirken. Die B-Zellen differenzieren dann zu antikörpersezernierenden Plasmazellen oder zu B-Gedächtniszellen.

Die Differenzierung der B-Zellen geht mit Veränderungen der antigenbindenden Eigenschaften der Antikörper durch somatische Hypermutation und Isotypenwechsel einher. Nach Aktivierung der B-Zelle wird zunächst IgM sezerniert, bevor, aufgrund der Sekretion spezifischer T-Zell-Zytokine, der Klassenwechsel zu einem anderen Isotypen stattfindet. Ein solcher Isotypenwechsel ist notwendig, damit die Antikörper im gesamten Organismus an die Infektionsorte gelangen und dort ihre optimale Wirkung entfalten können. Die Wirkung der humoralen antikörpervermittelten Immunreaktion umfasst drei Komponenten, die Neutralisierung von Pathogenen, deren Opsonisierung zur Förderung der Phagozytose und die Aktivierung der Komplementkaskade.

IgM findet man vorwiegend im Blut. Da diese primär gebildeten Antikörper noch keine somatische Hypermutation durchgeführt haben, ist ihre Affinität vergleichsweise gering. Durch die fünf Bindungsstellen des IgM-Pentamers ist die Avidität jedoch hoch, und es wird eine starke Aktivierung der Komplementkaskade bewirkt. Der Isotyp IgG kommt am häufigsten in den extrazellulären Flüssigkeiten und im Blut vor und kann leicht ins Gewebe diffundieren. Er weist sowohl komplementaktivierende als auch neutralisierende Eigenschaften auf und ist zudem ein gutes Opsonin. Antikörper des Isotyps IgA befinden sich zumeist in Sekreten an der Körperoberfläche und wirken vorwiegend neutralisierend. IgE-Antikörper liegen zum Großteil gebunden an der Oberfläche von Mastzellen vor. Diese Zellen werden bei einer Antigenbindung an den Antikörper aktiviert und befinden sich hauptsächlich direkt unterhalb epithelialer Oberflächen.



Abbildung 1.2 – Der klassische Weg der Aktivierung der Komplementkaskade. Zusammenfassend sind die wichtigsten Plasmaproteine und ihre Funktionen in der klassischen Komplementkaskade dargestellt. Der klassische Weg wird durch Antigen-Antikörper-Komplexe auf Pathogenoberflächen ausgelöst und endet in der Bildung eines membrangreifenden Komplexes, der das Pathogen lysiert. Beim Ablauf der Komplementkaskade entstehen verschiedene Spaltprodukte. die unterschiedliche Funktionen ausüben. Es entstehen Peptidmediatoren, die Phaqozyten an den Infektionsort rekrutieren, Opsonine, die Pathogene neutralisieren und deren Aufnahme durch Phagozytose fördern, sowie Komplementproteine, die den Fortlauf der Komplementkaskade bewirken. Dies sind beispielsweise Komplexbildner, die die Bindung weiterer Komplementproteine aus dem Plasma ermöglichen.

Neben der direkten Neutralisierung oder einer Förderung der Phagozytose von Pathogenen durch Opsonisierung können an Antigen gebundene Antikörper, wie bereits erwähnt, die Komplementkaskade als Teil der humoralen Immunität aktivieren. Die Komplementkaskade besteht aus vielen verschiedenen Plasmaproteinen und hat drei Wirkungen, die der Beseitigung von Pathogenen dienen: Das Anlocken inflammatorischer Zellen, die Opsonisierung von Pathogenen sowie deren Zerstörung. Zur Aktivierung der Komplementkaskade gibt es drei Möglichkeiten, die des klassischen, die des MB-Lektin- und die des alternativen Weges. Beim klassischen Weg erfolgt die Aktivierung durch die Bindung des Komplementfaktors C1q an Antigen-Antikörper-Komplexe, er ist also von antikörper-sezernierenden Plasmazellen abhängig (Abbildung 1.2). Beim MB-Lektin-Weg bindet mannan-bindendes Lektin (MB-Lektin) an die Oberfläche eines Pathogens, während beim alternativen Weg die Komplementkaskade durch ein spontan aktiviertes Komplementprotein direkt auf der Pathogenoberfläche gestartet wird. Allen drei Wegen ist gemeinsam, dass nach der Initiierung Spaltungsreaktionen stattfinden, die zur Bildung der C3-Konvertase führen. Diese spaltet die Komplementkomponente C3 zu C3a und C3b, wobei C3b als Opsonin an Bakterienoberflächen bindet. C3a ist ein Peptidmediator, der Phagozyten an den Infektionsort lockt. Durch Bindung von C3b an die C3-Konvertase entsteht die C5-Konvertase, die C5 in C5a und C5b spaltet. Wie C3a hat auch C5a eine Funktion in der Rekrutierung von Phagozyten. Die Freisetzung von C5b führt zu dessen Bindung an ein C6-Molekül. An diesen Komplex lagert sich dann ein C7-Molekül an, wodurch eine Bindung an Pathogenmembranen ermöglicht wird. Anschließend bindet C8, welches die Lipiddoppelschicht des Pathogens durchdringt. Die Assoziierung von C8 mit dem Komplex wiederum induziert die Polymerisierung von C9-Molekülen, wodurch eine porenbildende Struktur, die auch als membrangreifender Komplex bezeichnet wird, entsteht. Ein solches Aufbrechen der Lipiddoppelschicht des Pathogens führt zur Lyse und damit zu seiner Zerstörung.

#### 1.1.3 Polyklonale Aktivierung von Lymphozyten

Die Aktivierung einer B- oder T-Zelle geschieht, mit Ausnahme einiger weniger mikrobieller Antigene, die eine direkte Aktivierung bewirken können, nur dann, wenn die Zelle neben der Antigenbindung ein zusätzliches kostimulatorisches Signal erhält. Solche mikrobiellen Antigene, die direkt Lymphozyten ohne kostimulatorisches Signal aktivieren können, werden Mitogene genannt. Der Name entstammt dem Wort Mitose, da bei Bindung des Mitogens an B- oder T-Zellen deren Proliferation angeregt wird, die Zellen also anfangen, die Mitose zu durchlaufen. Weil die Zellen in diesem Fall nicht über spezifisch bindende Rezeptoren wie den B- oder T-Zell-Rezeptor aktiviert werden, spricht man von einer unspezifischen Immunreaktion bzw. einer polyklonalen Aktivierung.

Eine wichtige Mitogengruppe bilden die Lektine (zucker-bindende Proteine), die spezifisch an Membran-Glykoproteine verschiedener Zellen binden. Lektine führen oft zu Agglutinationen, was eine Zellaktivierung und Proliferation zur Folge hat. Während einige Lektine speziell B-Zellen aktivieren, induzieren andere ausschließlich eine Proliferation von T-Zellen oder können beide Lymphozytentypen aktivieren. Phytohaemagglutinin (PHA; T-Zell-Aktivator), Pokeweed Mitogen (PWM; B- und T-Zell-Aktivator) und Concanavalin A (ConA; T-Zellaktivator) gehören zu dieser Mitogengruppe. ConA, ein Metalloprotein aus der Jackbohne (*Canavalia ensiformis*), ist ein häufig verwendeter Vertreter zur Induktion einer T-Zellaktivierung bei der Durchführung immunologischer Versuche.

Ein ebenfalls vielfach eingesetztes Mitogen, welches nicht zur Gruppe der Lektine gehört, ist Lipopolysaccharid (LPS). Lipopolysaccharide aus den Zellwänden gramnegativer Bakterien wirken mitogen, indem sie an das lipopolysaccharid bindende Protein und CD14 auf Zelloberflächen binden, die dann mit dem Toll-like Rezeptor 4 assoziieren. Da diese Oberflächenmoleküle auf dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen, aber nicht auf T-Zellen vorhanden sind, führt LPS zu einer Aktivierung der drei erstgenannten Zelltypen und zur Proliferation von B-Zellen.

#### 1.2 Immuntoxizität

Unter dem Begriff Immuntoxizität versteht man einen unerwünschten immunmodulatorischen Effekt auf das Immunsystem, der durch Umweltgifte, Chemikalien, Medikamente und auch psychologische Einflüsse wie Stress (Ziemssen und Kern 2007) ausgelöst werden kann. Solche Wirkungen auf das Immunsystem können in einer gesteigerten Aktivität resultieren, wie dies beispielsweise bei Allergien der Fall ist, oder aber das Immunsystem beeinträchtigen. Im letzten Fall spricht man von einer Immunsuppression. Dabei muss z.B. zwischen einer gewünschten Immunsuppression, die medikamentös zur Symptombehandlung bei Autoimmunerkrankungen oder zur Prävention einer Abstoßungsreaktion nach Transplantationen hervorgerufen wird, und einer unerwünschten Immunsuppression durch Nebenwirkungen von Medikamenten oder durch immuntoxische Wirkungen von Chemikalien, unterschieden werden.

#### 1.2.1 Immunsuppressive Substanzen und ihre Mechanismen

Medikamente mit primär immunsuppressiver Wirkung lassen sich prinzipiell in vier Gruppen einteilen. Dies sind Glukokortikoide, Zytostatika, Biologicals und auf Immunophilin wirkende Substanzen. Die Mechanismen, über die Vertreter dieser Substanzgruppen ihre immunsuppressiven Wirkungen ausüben, sind im Folgenden näher beschrieben. Des Weiteren sind Chemikalien und Medikamente charakterisiert, deren Immunsuppressivität als unerwünschte Wirkung bzw. Nebenwirkung anzusehen ist.

#### 1.2.1.1 Glukokortikoide

Der wohl bekannteste Vertreter der Glukokortikoide ist das natürlich im Organismus vorkommende Cortisol, welches ein von der Nebenniere gebildetes Steroid ist. Zu den Glukokortikoiden gehören zudem rein synthetische Substanzen, wie z.B. Dexamethason. Gemeinsam ist allen eine antiinflammatorische und immunsuppressive Wirkung, die zu einer Anwendung bei einer Vielzahl verschiedener Indikationen führt. So ist die Gabe von Glukokortikoiden beispielsweise sowohl ein Standard zur Prävention von Transplantatsabstoßungen (McDonald 2007, Valantine und Zuckermann 2005, Encke et al. 2004) als auch bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie Morbus Crohn (Michetti et al. 2007, Büning und Lochs 2006) und rheumatoider Arthritis (Boyer et al. 2008, Di Munno und Delle Sedie 2008, Lee und Kavanaugh 2003). Zudem werden Kortikosteroide aufgrund ihrer antiinflammatorischen Wirkung bei der Behandlung allergischen Asthmas zur Reduktion der Entzündungssymptome eingesetzt (Sobande und Kercsmar 2008, Gibson und Powell 2006).

Glukokortikoide üben transkriptionelle Effekte aus. Aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften können sie durch Plasmamembranen hindurch diffundieren und im Zytoplasma an Glukokortikoidrezeptoren binden, was zu einer nukleären Translokation der Rezeptoren führt (Karin 1998). Die Rezeptoren wiederum binden im Nukleus an bestimmte Promotorregionen der DNA und können so die Transkription der Zielgene regulieren. Durch Bindung aktivierter Glukokortikoidrezeptoren an so genannte glukokortikoidrezeptorbindende Elemente (GRE) wird die Transkription der Zielgene heraufreguliert, während an Bindungsstellen des Aktivierenden Proteins 1 (AP-1) in der DNA eine Herunterregulierung der Gentranskription durch Antagonisierung von AP-1 bewirkt wird (Bamberger und Schulte 1997). Die Targetgene von Glukokortikoiden wurden von Hayashi et al. (2004) zusammengefasst. Als Ziel für eine herunterregulierte Transkription sind mit IL-8, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, MCP-3, MCP-4 und Eotaxin verschiedene Chemokine sowie mit IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-16, IL-17, IL-18,  $\text{TNF}\alpha$ , GM-CSF und SCF verschiedene Zytokine bekannt. Auch die Expression von induzierbaren Enzymen, Endothelin-Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle kann von Glukokortikoiden inhibiert werden. Zu den Zielgenen für eine verstärkte Transkription zählen verschiedene inhibitorische Proteine wie IL-1 Rezeptor Antagonisten, Phospholipase A2 Inhibitoren oder Inhibitoren bestimmter Signaltransduktionswege wie I $\kappa$ B $\alpha$  und MAP Kinase Phosphatase 1. Insbesondere für T-Zellen wurde zudem eine nicht-genomische glukokortikoid-induzierte Immunsuppression durch eine veränderte Signaltransduktion des T-Zell-Rezeptorkomplexes beschrieben (Löwenberg et al. 2007).

#### 1.2.1.2 Zytostatika

Unter dem Begriff Zytostatika werden natürliche oder synthetische Substanzen geführt, die die Zellteilung hemmen. Dies geschieht beispielsweise durch Bindung von interkalierend wirkenden Zytostatika an die DNA, durch chemische Reaktion alkylierender Agenzien mit Basen der DNA, durch sogenannte Antimetabolite, die an Stelle von Basen in die DNA eingebaut werden oder an DNA-Aufbau und -Reparatur beteiligte Enzyme hemmen, oder aber durch eine Bindung von Vinca-Alkaloiden an Tubulin. Zytostatika werden als Immunsuppressiva, aber auch als Chemotherapeutika zur Behandlung verschiedener Krebserkrankungen eingesetzt, da sie durch ihre Wirkung auf proliferierende Zellen hauptsächlich mit tumorösen Zellen und Zellen des Immunsystems interagieren. Im Folgenden sind alkylierende Agenzien und Antimetabolite näher beschrieben.

Bei alkylierenden Agenzien handelt es sich um organische Verbindungen, die Alkylgruppen auf Basen der DNA übertragen. Dies führt zu einer Hemmung der DNA-Synthese und kann Strangbrüche bewirken (Colvin 1999). Ein Vertreter dieser Gruppe ist Cyclophosphamid, das an sich keine immunsuppressive oder antitumoröse Wirkung hat, jedoch durch das P450 Cytochrom CYP2B6 zum aktiven 4-Hydroxycyclophosphamid metabolisiert wird (Coecke et al. 2006, Takamizawa et al. 1975). Cyclophosphamid wird verbreitet als Chemotherapeutikum zur Behandlung solider und haematologischer Tumore eingesetzt (Kim 2007), kann jedoch auch bei Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose (Perini et al. 2008) oder Lupus erythematosus (Gupta et al. 2009, Sanna et al. 2008) sowie bei Graft-versus-host Reaktionen (Mayer et al. 2005) eingesetzt werden.

Als Beispiel für die Gruppe der Antimetabolite sei an dieser Stelle Methotrexat genannt. Methotrexat ist ein Folsäureantagonist, der das Enzym Dihydrofolatreduktase kompetitiv hemmt (Bertino 1963). Dies hat eine verringerte Synthese der Base Thymidin zur Folge und resultiert generell in einer verminderten DNA-Synthese (Friedkin 1963). Methotrexat wird seit geraumer Zeit als Chemotherapeutikum eingesetzt (Sullivan et al. 1959, Holland 1958, Hertz et al. 1956) und ist ebenfalls für die Symptombehandlung bei einer Vielzahl verschiedener Automimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis (Boyer et al. 2008, Sizova 2008), Psoriasis (Thaci 2008, Berger und Gottlieb 2007) und Colitis Ulcerosa (Kozuch und Hanauer 2008, Panaccione et al. 2008) verbreitet.

#### 1.2.1.3 Immunophilin-bindende Substanzen

Immunophilin-bindende Substanzen lassen sich in zwei Unterkategorien einteilen, in Calcineurin-Inhibitoren und mTOR-Inhibitoren. Zur Klasse der Calcineurin-Inhibitoren gehört Cyclosporin A, ein zyklisches Undecapeptid des Pilzes *Tolypocladium inflatum*. Es wird zur Prävention von Transplantatsabstoßungen (Miners et al. 2007, Snell und Westall 2007) und zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie Psoriasis verwendet (Menter et al. 2008, Warren und Griffiths 2008). Cyclosporin A bindet an das Immunophilin Cyclophilin und bildet anschließend einen Komplex mit Calcineurin (Ryffel et al. 1993), welches somit inaktiviert wird. Dadurch kommt es zu einer Dephosphorylierung der zytoplasmatischen Untereinheit des Nukleären Faktors Aktivierter T-Zellen (NFAT), welche die nukleäre Translokation dieses Transkriptionsfaktors hemmt. Somit können bestimmte NFAT-regulierte Gene wie IL-2 nicht mehr transkribiert werden (Cai et al. 1996, Ho et al. 1996).

Zu den mTOR-Inhibitoren zählt Rapamycin, ein Makrolid des Actinomyceten Streptomyces hygroscopicus, welches auch unter dem Namen Sirolimus bekannt ist. Es findet klinischen Einsatz bei der Verhinderung von Transplantatsabstoßungen (Flechner et al. 2008, Zuckermann et al. 2008). Rapamycin blockiert im Gegensatz zu den Calineurin-Inhibitoren nicht die IL-2-Gentranskription, da es die Aktivität von Calcineurin nicht beinflusst (Dumont et al. 1990). Es bindet hingegen an das Immunophilin FK-bindendes Protein-12 (FKBP-12) (Van Duyne et al. 1991). Der Rapamycin/FKBP-12-Komplex inhibiert durch Bindung die Aktivierung des mamalian Target of Rapamycin (mTOR) (Wiederrecht et al. 1995), dessen Funktion unter anderem in der Phosphorylierung der p70 S6 Proteinkinase liegt. Über den mTOR und p70 S6 Proteinkinase vermittelten Signalweg wird insbesondere bei T-Zellen durch Stimuli wie IL-2 der Übertritt der Zellen von der G1- in die S-Phase und somit eine Zellproliferation ausgelöst, was durch Bindung des Rapamycin/FKBP-12-Komplexes inhibiert wird (Abraham und Wiederrecht 1996). Somit blockt Rapamycin die zellulären Antworten, die durch IL-2 ausgelöst werden.

#### 1.2.1.4 Biologicals

Biologicals sind biologische Moleküle wie Antikörper und rekombinante Proteine, die eine neuartige Therapieform darstellen. Mit Biologicals konnten bisher bestehende Behandlungsmöglichkeiten in den Bereichen Lymphome, Immunsuppression und Blutgerinnung erweitert werden (Schulze-Koops und Skapenko 2002). Als Beispiel für die Behandlung einer Störung der Blutgerinnung, genauer der Hämophilie A, sei hier Kogenate<sup>®</sup>genannt. Der Hämophilie A liegt ein angeborener Mangel an Faktor VIII zugrunde, der fehlende Faktor wird dem Patienten durch das Medikament als rekombinantes Protein verabreicht (Pipe 2008).

Insbesondere bei der Behandlung verschiedener Autoimmunerkrankungen haben Biologicals Einzug als Therapeutika genommen. So stehen beispielsweise für Psoriasis-Patienten mit Adalimunab (Humira<sup>®</sup>) ein monoklonaler anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, mit Etanercept (Enbrel<sup>®</sup>) ein rekombinanter humaner TNF $\alpha$ -Rezeptor und mit Infliximab (Remicade<sup>®</sup>) ein aus variablen murinen Sequenzen und einer humanen konstanten IgG-Region konstruierter anti-TNF $\alpha$ -Antikörper zur Verfügung (Menter et al. 2008). Auch der therapeutische Erfolg eines IL-12/23 monoklonalen Antikörpers wurde in einer klinischen Studie erwiesen (Menter et al. 2008). Verbreitet sind Biologicals ebenfalls bei der Behandlung Multipler Sklerose, da hier mit Betaferon<sup>®</sup> (Interferon-beta-1b), Avonex<sup>®</sup> (Interferon-beta-1a) und Rebif<sup>®</sup> (Interferon-beta-1a) von verschiedenen Herstellern Interferone angeboten werden (Katsara et al. 2008). Die Verabreichung von Interferon-beta ist für diese Krankheit die am häufigsten eingesetzte Behandlungsform (Kivisäkk et al. 2000). Mit Natalizumab (Tysabri<sup>®</sup>) steht zudem ein humanisierter, gegen das zelluläre Adhäsionsmolekül a4-Integrin gerichteter monoklonaler Antikörper sowie mit Copaxone<sup>®</sup>, einem Glatiramer Acetat, ein Peptid-Vakzin zur Verfügung (Katsara et al. 2008). Antikörper werden zudem auch zur Verhinderung von Abstoßungsreaktion nach Transplantationen eingesetzt. So ist beispielsweise mit Muromonab CD3 (Orthoclone OKT3<sup>®</sup>) ein anti-CD3-Antikörper von klinischer Bedeutung, der den mit CD3 assoziierten T-Zell-Rezeptorkomplex bindet und somit eine Aktivierung von T-Zellen inhibiert (Martin-Mateos 2007). Dieser Antikörper war der erste Antikörper weltweit, der zur Humantherapie im Jahre 1986 zugelassen wurde (Todd und Brogden 1989). Es ist zu erwarten, dass aufgrund des stets zunehmenden Wissens um molekulare Mechanismen, insbesondere von Autoimmunerkrankungen, ständig weitere Biologicals entwickelt werden.

#### 1.2.1.5 Medikamente mit sekundär immunsuppressiver Wirkung und Chemikalien

Eine Kategorie immunsuppressiv wirkender Chemikalien bildet die Gruppe der polyzyklischen aromatischen Hydrocarbone (PAH). Sie umfasst Umweltschadstoffe, denen Menschen unter anderem durch die Verbrennung von Diesel, Benzin und Kohle ausgesetzt sind. Benzo(a)pyren ist ein Vertreter dieser Gruppe, der sowohl hinsichtlich seiner Kanzerogenität (Badawi et al. 1996, White 1986) als auch seiner immunsuppressiven Eigenschaften (Lee und Urso 2007, Ginsberg et al. 1989, White 1986) intensiv erforscht wurde. Benzo(a)pyren muss, ähnlich wie Cyclophosphamid, zu reaktiven Formen metabolisiert werden (Ginsberg et al. 1989, Kawabata und White 1987). Dies geschieht durch das P450 Cytochrom CYP1A1 (Goeptar et al. 1995). Dabei entsteht unter anderem der Metabolit Benzo(a)pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE), der kovalent an die DNA bindet und dadurch sowohl karzinogene als auch immunsuppressive Effekte ausübt (Lee und Urso 2007, Moolenaar et al. 1996). Zudem konnten Veränderungen in der zellulären Produktion von IL-2 (Lyte et al. 1987) sowie der Reaktivität gegenüber IL-2 (Myers et al. 1988) nach einer *in vivo* Exposition mit Benzo(a)pyren festgestellt werden.

Urethan, auch geführt unter dem Namen Ethyl Carbamat, wird in der Tiermedizin als Narkotikum eingesetzt (Hara und Harris 2002). Es wird heute nur unter bestimmten Voraussetzungen verwendet und ist für humane Anwendungen nicht zugelassen, begründet durch seine Nebenwirkungen, die karzinogen (Stathopoulos et al. 2007, Haran und Berenblum 1956, Guyer und Claus 1947) und immunsuppressiv (Luebke et al. 1987, Luster et al. 1982, Parmiani 1970) sind. Früher wurde Urethan als humanes Krebstherapeutikum eingesetzt (Loge und Rundles 1949, Wilson et al. 1948), da es die Mitose von Tumorzellen inhibiert (Haddow und Sexton 1946). Expositionen des Menschen mit Urethan als Umweltschadstoff treten jedoch auch heute in geringen Konzentrationen fortwährend auf, da Urethan durch Fermentationsprozesse entsteht und somit Bestandteil fermentierter Nahrungsmittel und alkoholischer Getränke ist (Miller und Miller 1983). Es wurden Auswirkungen einer Urethan-Exposition in vivo auf die Aktivität von Makrophagen sowie B- und T-Zellen nachgewiesen, die durch die zytostatische Wirkung des Urethans begründet wurden (Luster et al. 1982). Urethan wird von P450 Cytochromen wie CYP2E1 metabolisiert, und zwar unter anderem zu den Metaboliten Vinyl Carbamat und N-Hydroxyurethan (Hoffler et al. 2003, Guengerich und Kim 1991). Beiden Metaboliten wurden immunsuppressive Wirkungen auf murine Milzzellkulturen nachgewiesen (Jeong et al. 1996). Inwieweit Urethan selbst oder aber die genannten Metaboliten für die auftretende Immunsuppression verantwortlich sind, ist jedoch unklar und erfordert weitere Analysen. Während für Vinyl Carbamat als Mechanismus die Bildung von DNA-Addukten nach weiterer Metabolisierung durch CYP2E1

zu einem Epoxid beschrieben ist (Guengerich und Kim 1991), ist für N-Hydroxyurethan der Mechanismus, der zu einer Immunsuppression führt, ungeklärt (Cha et al. 2000).

Ein weiteres Medikament mit sekundär immunsuppressiver Wirkung ist Verapamil. Primär handelt es sich um ein Herz-Kreislauf-Medikament, welches Anwendung bei Herzrhythmusstörungen, Bluthochdruck und Koronarerkrankungen findet (Aronow 2008, Rosendorff 2007). Verapamil gehört zur Gruppe der Calcium-Antagonisten und blockiert Calcium-Kanäle der Zellmembranen. Immunsuppressive Wirkungen wurden insbesondere auf T-Zellen nachgewiesen, die sich ebenfalls durch das Blockieren von Calcium-Kanälen und den dadurch fehlenden Calcium-Einstrom in die Zellen erklären (Blaheta et al. 2000, Zanker et al. 1994, Birx et al. 1984). Verapamil inhibiert, wenn auch aufgrund eines anderen Mechanismus und früher im Signaltransduktionsweg, ähnlich wie die Calcineurin-Inhibitoren die NFAT-abhängige Transkription des Gens für IL-2 (Zanker et al. 1994). Zudem konnten Wirkungen von Verapamil auf die NK-Zell-vermittelte Lyse nachgewiesen werden (Markham et al. 1996).

#### 1.2.2 Toxikologische Evaluierung immunsuppressiver Substanzeffekte

Immuntoxikologische Analysen sind ein wichtiger Bestandteil der Risikobewertung von Substanzen. Allen Richtlinien zur toxikologischen Evaluierung von Medikamenten (EMEA 2008, ICH 2006, FDA 2002), Chemikalien (OECD 1995) sowie Pestiziden und Fungiziden (EPA 1996a) ist gemeinsam, dass so genannte Standardtoxizitätsstudien, bestehend aus Haematologie, klinischer Biochemie, grober Pathologie, Histologie und der Bestimmung von Organgewichten, die im Rahmen von Studien mit mehrfacher Substanzverabreichung (28-Tage subakute oder 90-Tage subchronische Toxizitätsstudien) durchzuführen sind, verlangt werden. Ein Teil der dabei durchgeführten Analysen ist immunologisch relevant. Im Bereich Kosmetik besteht zwar für fertige Produkte keine Zulassungspflicht, neue Inhaltstoffe müssen aber ebenfalls entsprechend toxikologisch getestet werden (Kosmetikverordnung). Dies erfolgt gemäß der Testrichtlinien für Chemikalien der OECD (1995).

Für Medikamente (EMEA 2008, ICH 2006, FDA 2002), Pestizide und Fungizide (EPA 1996a;b) werden zudem speziell immuntoxikologische Analysen verlangt. Für die Evaluierung immunsuppressiver Effekte gibt es dabei, je nach Richtlinie, Variationen der geforderten Tests. So können immunologische Funktionstests entweder kategorisch (EPA 1996a;b) oder bei Verdacht auf Immunsuppressivität der Substanz (EMEA 2008, ICH 2006, FDA 2002) verlangt werden. Des Weiteren können Stimulationstests zur Überprüfung der Funktionalität spezifischer Zelltypen gefordert werden, wenn diese zuvor als Target einer Substanz bestimmt wurden oder aber in den Funktionstests nicht inbegriffen sind (z.B. NK-Zell-Test, Test auf Funktionalität zytotoxischer T-Zellen, Makrophagentest). Außerdem kann eine durchflusszytometrische Populationsund Subpopulationsanalyse der Zellen des Blutes oder der lymphatischen Organe Aufschluss über immunmodulatorische Substanzeffekte geben.

#### 1.2.2.1 Standardtoxizitätsstudien

Wie bereits erwähnt bestehen Standardtoxizitätsstudien, durchgeführt im Rahmen von Studien mit wiederholter Substanzverabreichung, aus Haematologie, klinischer Biochemie, Pathologie und Histologie sowie der Bestimmung von Organgewichten. Die in diesem Rahmen durchzuführenden Analysen, die immunologische Relevanz haben, gleichen sich dabei in allen Richtlinien (EMEA 2008, ICH 2006, FDA 2002, EPA 1996a, OECD 1995). Dies sind zunächst die haematolgischen Untersuchungen, die beispielsweise Veränderungen in der Anzahl von Granulozyten oder Lymphozyten detektieren. Zudem können am Serum Immunglobulinkonzentrationen bestimmt werden, die ebenfalls bei Veränderungen Hinweise auf eine Immunsuppression geben können. Die Analysen der klinischen Biochemie stehen im Allgemeinen nicht im Zusammenhang mit immunologischen Parametern. Im pathologischen und histologischen Teil hingegen werden Untersuchungen immunologisch relevanter Organe und Gewebe gefordert. Dies sind Analysen von Milz, Thymus, Knochenmark und Lymphknoten, wobei ein Schwerpunkt auf die lymphatischen Gewebe und Organe entlang der gewählten Expositionsroute gelegt wird. Veränderungen in den Geweben dieser Organe sowie den Organgewichten können eine Immunsuppression oder -stimulation anzeigen. Hinweis auf ein supprimiertes Immunsystem in solchen Studien kann zudem z.B. eine erhöhte Inzidenz für Infektionen sowie eine gesteigerte Tumorbildung geben.

#### 1.2.2.2 Funktionstests

Unter dem Begriff Funktionstest in der Immuntoxikologie versteht man Analysen, die die Kooperation verschiedener immunkompetenter Zellen beinhalten. Mit solchen Funktionstests wird im Allgemeinen die humorale Immunreaktion bestimmt, auch bezeichnet als die T-Zell-vermittelte Antikörperreaktion (TDAR). Der älteste Test für TDAR-Analysen in behördlichen Richtlinien ist der Plaque Forming Cell Assay (PFCA) (EMEA 2008, ICH 2006, FDA 2002, EPA 1996a), der erstmals von Jerne und Nordin (1963) beschrieben wurde. Er beruht auf der Auslösung einer humoralen Immunreaktion *in vivo* durch eine Immunisierung mit Schafserythrozyten (SRBC).

Die Immunisierung beim PFCA läuft folgendermaßen ab (*Abbildung* 1.3): Die SRBC werden von Makrophagen aufgenommen, prozessiert und als Antigen präsentiert. Eine Erkennung des Antigens durch CD4-positive T-Helferzellen unter Kostimulation der Makrophagen führt zu einer Zellaktivierung, so dass zu  $T_{\rm H}$ 2-Zellen differenzierte CD4-positive T-Helferzellen wiederum B-Zellen aktivieren. Aktivierte B-Zellen beginnen zu proliferieren und Antikörper gegen Antigene der SRBC zu produzieren. Zunächst sind dies Antikörper des Isotyps IgM, der Isotypenwechsel erfolgt jedoch vorwiegend zu IgG.

Werden Immunzellen, wie die beim PFCA verwendeten Milzzellen, *ex vivo* erneut mit dem Antigen in Kontakt gebracht, so binden die von den Plasmazellen sezernierten spezifischen Antikörper an das Antigen. Beim PFCA werden daher die Milzzellen zusammen mit den SRBC in Agarose auf Objektträgern ausplattiert. Aufgrund der Agaroseschicht können die Bereiche, an denen sich antikörper-sezernierende Plasmazellen befinden, durch eine komplement-vermittelte Lyse sichtbar gemacht werden (*Abbildung* 1.4).

Die Bindung des Komplementproteins C1q an die IgM-Antikörper führt zu einer Lyse der daran gebundenen Erythrozyten, so dass für jede Plasmazelle ein haemolytischer Plaque in der Agaroseschicht zu erkennen ist. Um IgG-Antikörper sichtbar zu machen, ist ein weiterer Schritt erforderlich, bei dem zur Verbesserung der Komplementaktivierung zunächst ein Anti-Immunglobulin-Antikörper an die von B-Zellen sezernierten Antikörper bindet. Wird beim PF-CA den Tieren vor der Immunisierung eine Substanz verabreicht, so kann im Vergleich zu den



Abbildung 1.3 – Die Enstehung einer humoralen Immunreaktion im Plaque Forming Cell Assay (PFCA).Dargestellt sind die erforderlichen zellulären Interaktionen, die zur Ausbildung einer humoralen Immunreaktion gegen Schafserythrozyten (SRBC) führen. Zunächst werden Proteine der SRBC von Makrophagen als Antigen präsentiert. Wird das Antigen von einer T-Zellen über ihren T-Zell-Rezeptor erkannt, so wird die T-Zellen durch Kostimulation des Makrophagen aktiviert. Erkennen B-Zellen über den B-Zellrezeptor Antigene, internalisieren sie diese und präsentieren sie. Bindet eine aktivierte T-Zelle dasselbe Antigen, kommt es zu einer gekoppelten Erkennung, die zu einer Aktivierung der B-Zelle führt. Diese proliferiert und differenziert zur Plasmazelle, welche Antikörper gegen das Antigen sezerniert.

vehikelbehandelten Kontrolltieren ermittelt werden, ob die verabreichte Substanz Auswirkungen auf die Entwicklung der humoralen Immunreaktion gegen SRBC hat.

Alternativ kann ein sogenannter KLH-Assay durchgeführt werden, bei dem für die Immunisierung statt der SRBC Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) als Antigen verwendet wird. KLH ist ein hochmolekulares Protein, das aus der Hämolymphe der Meeresschnecke *Megathura crenulata* gewonnen wird. Bei diesem Assay wird im Gegensatz zum Plaque Assay die Antikörperreaktion durch die ELISA-Technik bestimmt. Dazu wird den Tieren terminal Blut entnommen,



Abbildung 1.4 – Lichtmikroskopische Aufnahme eines Plaque Forming Cell Assays. Alle drei Bilder sind Aufnahmen der selben Stelle eines Objektträgers, unterscheiden sich aber in der Vergrößerung. Das linke Bild wurde mit einer 2-fachen Vergrößerung und einer Exposition von 1/800 s aufgenommen, das Mittlere mit einer 4-fachen Vergrößerung und 1/200 s Exposition und das rechte Bild mit 8-facher Vergrößerung und einer Exposition von 1/50 s. Die Aufnahmen wurden nach Bindung eines Anti-Immunglobulin-Antikörpers angefertigt und zeigen somit IgM- und IgG-Plaques.

daraus Serum gewonnen und mittels ELISA die Konzentration von Anti-KLH-Antikörpern des Isotyps IgM und IgG bestimmt (Gore et al. 2004).

Ähnlich dem Prinzip des KLH-Assays wurde auch für eine Immunisierung mit SRBC anstelle eines Plaque Asasys ein ELISA zur Bestimmung der IgM- und IgG-Serumkonzentrationen entwickelt (Johnson et al. 2000). Sowohl der KLH-Assay als auch der SRBC-ELISA können anstelle des PFCA durchgeführt werden (EMEA 2008, ICH 2006, FDA 2002, EPA 1996a).

## 1.3 In vitro Tests zur humantoxikologischen Risikobewertung von Substanzen

Ein Problem bei der toxikologischen Risikobewertung von Substanzen stellt der starke Einsatz von Tierversuchen dar, der ethisch bedenklich ist. Deshalb sollten die Zahlen benötigter Versuchstiere so weit wie möglich reduziert werden, die Versuche verbessert werden (um die Unannehmlichkeiten für die Tiere so gering wie möglich zu halten) oder aber im besten Falle neue Methoden entwickelt werden, die ohne den Einsatz lebender Tiere durchgeführt werden können. Dieses Konzept, bekannt unter dem Namen 3R (Reducement, Refinement and Replacement), wurde von Russell und Burch (1956) entwickelt. In der Bundesrepublik Deutschland wird die Umsetzung des 3R-Konzeptes von der Regierung gefördert, unter anderem seit 1984 durch das Programm "Ersatzmethoden zum Tierversuch" des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF), seit 1990 durch die "Vergabe von Forschungsmitteln zur wissenschaftlichen Erarbeitung von Tierversuchsersatzmethoden" der Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET) und des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR), durch die Vergabe des jährlichen Tierschutz-Forschungspreises seit 1982 und die Gründung der "Stiftung zur Förderung der Erforschung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zur Einschränkung von Tierversuchen (SET)" im Jahre 1986.

Diese Bemühungen, die Versuchstierzahlen insbesondere in der toxikologischen Risikobewertung von Substanzen zu verringern, zeigen sich in den Zahlen der Tierschutzberichte der Bundesregierung (Tierschutzbericht 2007; 2005; 2003) (*Tabelle* 1.1). Während ein konstanter Anstieg der zu wissenschaftlichen Zwecken verwendeten Versuchstiere von 975.885 im Jahre 2000 auf 1.432.492 im Jahre 2005 zu verzeichnen war, zeigt sich die Zahl der für toxikologische Untersuchungen und andere Sicherheitsprüfungen verwendeten Tiere zunehmend rückläufig. Wurden 2000 noch 219.390 Tiere eingesetzt, so waren es 2005 nur noch 159.412 Tiere. Keine Tendenz in Richtung eines Rückganges von Tierversuchen hingegen zeigen die Zahlen der davon aufgrund von EG-Rechtsvorschriften einschließlich der Anforderungen des Europäischen Arzneibuches durchgeführten Tierstudien. Zwar war im Jahr 2000 die Anzahl der eingesetzten Tiere mit 115.095 im Vergleich zu den nachfolgenden Jahren höher, von 2001 bis 2005 jedoch schwankt die Zahl ohne erkennbare Tendenz zwischen 70.000 und 90.000 Tieren. Grund dafür ist das Fehlen behördlich anerkannter Alternativmethoden in vielen Bereichen toxikologischer Risikoanalysen.

Jahr	Gesamtzahl der zu wissenschaftlichen Zwecken in der BRD verwendeten Tiere	davon für toxikologi- sche Untersuchungen und andere Sicherheits- prüfungen verwendete Tiere	wegen EG-Rechtsvor- schriften einschl. An- forderungen des Euro- päischen Arzneibuches eingesetzte Tiere
2000	975.885	219.390	115.095
2001	1.024.413	189.996	77.437
2002	1.151.053	207.511	89.486
2003	1.180.355	178.221	70.533
2004	1.316.628	160.974	75.838
2005	1.432.492	159.412	89.580

Tabelle 1.1 – Versuchstierzahlen der Bundesrepublik Deutschland aus den Tierschutzberichten der Bundesregierung von 2003, 2005 und 2007. In der Tabelle dargestellt sind die Gesamtzahlen der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere sowie die Anzahl der davon für toxikologische Untersuchungen und andere Sicherheitsprüfungen verwendeten Tiere. Es ist zudem aufgeführt, wieviele Tiere der für toxikologische Untersuchungen und andere Sicherheitsprüfungen verwendeten Tiere aufgrund von EG-Rechtsvorschriften oder Anforderungen des Europäischen Arzneibuches eingesetzt wurden.

#### 1.3.1 Die EU-Richtlinie für Kosmetika und die REACH-Verordnung

Neben dem 3R-Konzept und der Problematik fehlender behördlich anerkannter Alternativmethoden führen derzeit konkrete Richtlinien und Verordnungen der Europäischen Union zu einer Situation, in der eine Entwicklung von in vitro Tests zur toxikologischen Risikobewertung von Substanzen als Ersatz von Tierversuchen von dringender Notwendigkeit ist. In der Kosmetikindustrie werden, entsprechend der EU-Richtlinie 76/768/EWG bzw. der siebten Änderung 2003/15/EG dieser Richtlinie, Tierversuche zur toxikologischen Risikobewertung von Produkten und ihren Inhaltsstoffe eingestellt. Fertige Produkte dürfen seit dem 11. September 2004 nicht mehr an Tieren getestet werden. Die toxikologische Risikobewertung von Inhaltsstoffen oder Kombinationen von Inhaltsstoffen darf seit dem 11. März 2009 nicht mehr tierexperimentell durchgeführt werden, obwohl bis heute nicht für alle vorgeschriebenen Tests alternative Methoden zur Verfügung stehen. Am 11. März 2009 trat zudem ein teilweises Verbot der Vermarktung von an Tieren getesteten Produkten ein. Unter diese Regelung fallen Studien zur akuten Toxizität, zur Hautirritation und -korrosion, zur Augenirritation, zur Genotoxizität und Mutagenität, zur akuten Phototoxizität, zur Hautabsorption und -penetration sowie zur Toxikokinetik und zum Metabolismus, die alternativ durchgeführt werden müssen. Ausgenommen sind Studien zur subakuten (28-Tage-Test) und subchronischen Toxizität (90-Tage-Test), zur

(Photo-)Sensibilisierung, zur Reproduktions- und Entwicklungstoxikologie sowie zur Karzinogenität. Produkte, deren Inhaltsstoffe in diesen Studien tierexperimentell getestet wurden, dürfen noch bis zum 11. März 2013 in der EU vermarktet werden (SEK/2004/1210).

Ein weiterer gewichtiger Grund für eine Entwicklung von in vitro Methoden ist die neue Europäische Chemikalienverordnung 1907/2006, die am 01. Juni 2007 in Kraft getreten ist. Sie ist auch bekannt unter dem Namen REACH-Verordnung, wobei REACH als Abkürzung für Registrierung, Evaluierung und Autorisierung von Chemikalien steht. Innerhalb des Geltungsbereiches der Verordnung dürfen ab dem 01. Dezember 2008 nur noch Chemikalien vermarktet werden, die zuvor registriert wurden. Dies betrifft Substanzen, die pro Jahr mit einem Volumen größer 1 t in der EU hergestellt oder in die EU importiert werden. Die Registrierung erfordert neben physikalisch-chemischen Daten eine erneute humantoxikologische und ökotoxikologische Risikobewertung der Chemikalien, die vor 1981 erstmals vermarktet wurden, und muss somit für ca. 30.000 Substanzen vorgenommen werden. Auch wenn dafür bereits existierende Daten eingesetzt werden, so müssen dennoch Lücken durch erneute Analysen geschlossen werden. Die durchzuführenden toxikologischen Analysen bezüglich humaner Gesundheitseffekte sind nach Produktionsmengen gegliedert - je mehr von der Chemikalie hergestellt wird, desto mehr Toxizitätsstudien sind für die Registrierung erforderlich. Für Stoffe mit Produktionsmengen  $\leq 10$  t sind dies Tests zur Hautirritation und Hautkorrosion, zur Augenirritation, zur Sensibilisierung, ein oraler akuter Toxizitätstest sowie ein Mutagenitätstest. Für höhere Produktionsmengen werden zudem Studien zur subakuten und subchronischen Toxizität sowie reproduktionstoxikologische Analysen und Angaben zur Toxikokinetik gefordert. Ohne alternative Testmethoden fordert dieses Verfahren eine hohe Zahl an Versuchstieren, die sich möglicherweise in einer Steigerung der in der EU für toxikologische Untersuchungen und andere Sicherheitsprüfungen verwendeten Tierzahl zeigen wird.

#### 1.3.2 Validierung und behördliche Anerkennung von in vitro Tests

Um Validierungen alternativer Testmethoden durchführen zu können und deren behördliche Anerkennungen zu erwirken, wurde im Oktober 1991 das Europäische Zentrum für die Validierung alternativer Methoden (ECVAM) durch eine Kommunikation der Europäischen Komission an den Rat und das Parlament (SEK/91/1794) gegründet. Grundlegend dafür war die Richtlinie 86/609/EWG zum Schutz von Tieren, die das 3R-Konzept beinhaltet. Die Aufgaben der ECVAM sind die Koordinierung von Validierungen alternativer Testmethoden in der EU, die Entwicklung, Erhaltung und das Management einer Datenbank solcher Methoden sowie die Förderung des Dialogs zwischen Gesetzgebern, Wissenschaftlern, Verbraucherorganisationen und Tierschutzorganisationen. Zudem soll ECVAM einen zentralen Punkt im Informationsaustausch über die Entwicklung alternativer Methoden darstellen.

Von ECVAM organisierte und unabhängig ausgewertete Validierungstudien alternativer Methoden, die im Allgemeinen in mehreren teilnehmenden Laboren und verblindet durchgeführt werden, sollen bei entsprechend erwiesener Relevanz und Zuverlässigkeit von Aufsichtsbehörden anerkannt werden. Die Validität einer entwickelten Methode wird vom ECVAM Scientific Advisory Comitee (ESAC) beurteilt und eine entsprechende Empfehlung herausgegeben. Wird die entwickelte Methode als geeignet angesehen, Tierversuche zu reduzieren, zu verfeinern oder zu ersetzen, ist es Aufgabe der ESAC, die behördliche Anerkennung des Tests zu erwirken. Wird der Test von Behörden wie der Organisation für wirtschaftliche Kooperation und Entwicklung (OECD) ebenfalls als geeignet eingestuft, wird eine entsprechende Richtlinie ausgearbeitet.

Bisher konnte von ECVAM die behördliche Anerkennung von vier *in vitro* Testverfahren durch die OECD erwirkt werden. Mit der Richtlinie OECD TG 428 (OECD 2004a) wurde ein Test zur Hautabsorption von Substanzen, mit den Richtlinien OECD TG 430 (OECD 2004b) und OECD TG 431 (OECD 2004c) Hautkorrosionstests sowie mit der Richtlinie OECD TG 432 (OECD 2004d) ein Test zur Phototoxizität übernommen.

### 1.3.3 Alternative Methoden zur Evaluierung immunsuppressiver Substanzeffekte

An alternativen Methoden für humantoxikologische Risikoanalysen wird in verschiedenen Bereichen geforscht. Ein Bereich, in dem starke Aktivitäten zur Entwicklung von *in vitro* Tests zu verzeichnen sind, ist die Evaluierung potenziell immunsuppressiver Substanzeffekte. Bisher durchgeführte Arbeiten auf diesem Gebiet können in zwei Kategorien unterteilt werden. Zum einen in Stimulationstests, die die Antwort eines Zelltyps auf einen Stimulus unter Einfluss immunsuppressiver Substanzen analysiert, und zum anderen in *in vitro* Funktionstests, bei denen die Interaktion mehrerer Zelltypen unter Exposition gegenüber immunsuppressiven Substanzen untersucht wird. Einzige Ausnahme dieser Kategorien bildet der Einsatz von Microarrays, der von Baken et al. (2007) diskutiert wurde. Von der Arbeitsgruppe wurde das Fazit gezogen, dass durch eine Analyse von Microarrays bekannte und neue Effekte eines breiten Spektrums immunmodulierender Substanzen detektiert werden können, aber die Standardisierung und die Handhabung der generierten Daten zwischen verschiedenen Laboren variiert. Dadurch sind bestehende Daten in Datenbanken nur schwer zu nutzen.

# 1.3.3.1 Stimulation<br/>stests zur Identifikation imnunsuppressiver Substanzen in vi-<br/>tro

Die Analyse immunsuppressiver Substanzeffekte anhand von Stimulationen bestimmter immunkompetenter Zelltypen wurde bisher von zahlreichen Arbeitsgruppen in verschiedenen Modifikationen durchgeführt und ist somit die am stärksten erforschte Methode. Lebrec et al. (1995) analysierten immunsuppressive Effekte pharmazeutischer Medikamente an Milzzellkulturen der Ratte und der Maus sowie an humanen peripheren mononukleären Blutzellen (hPBMC). Die Gruppe untersuchte die proliferative Antwort von Lymphozyten auf ConA, PHA und gemischte Leukozyten (MLR) sowie die von cytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen vermittelte Zytolyse. In einer Studie mit fünf Substanzen (zwei negative und drei positive Substanzen) wurden Rattenmilzzellen als das sensitivste Modell zur Differenzierung zwischen immunsuppressiven und nichtimmunsuppressiven Substanzeffekten bestimmt. Langezaal et al. (2001) setzten humane und murine Vollblutkulturen für ein Modell zur Detektion immunsuppressiver Substanzen *in vitro* ein. Als Endpunkte wurden die Freisetzung der Zytokine IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  nach LPS-Stimulation bestimmt. Die Zytokinausschüttung wurde durch die drei eingesetzen immunsuppressiven Substanzen bei niedrigeren Substanzkonzentrationen reduziert als bei drei negativen Kontrollsubstanzen. Die weitere Analyse dieser Methode führte zu einer ECVAM Prä-Validierungsstudie

(Langezaal et al. 2002). Ringerike et al. (2005) entwickelten den so genannten T-Zell-basierten "Cell-Chip", um an Zellen der murinen T-Zell-Linie EL4 Immuntoxizität zu detektieren. Endpunkt war auch hier die Zytokinfreisetzung, und zwar die von IL-2, IL-4, IL-10 und IFN $\gamma$ , mit oder ohne Stimulation der Zellen durch PMA. Die Ergebnisse zeigten, dass eine Reihe von Zytokinen analysiert werden muss, um immunsuppressive Substanzen zu identifizieren, da einige Substanzen sehr eingeschränkt nur auf bestimmte Effektormechanismen wirken. Hymery et al. (2006) setzten humane dendritische Zellen (aus CD34-positiven Zellen oder Monozyten generiert) für ihre in vitro Studien zur Immunsuppression ein. Es wurden adverse Effekte von Xenobiotika auf die Reifung dendritischer Zellen nach LPS- oder TNF $\alpha$ -Stimulation durch Messung der Expression von Oberflächenmarkern wie CD86, CD83 and HLA-DR, der Freisetzung der Zytokine IL-10 and IL-12 und der Proliferation autologer Lymphozyten analysiert. Zwei getestete immunsuppressive Substanzen regulierten die Expression von Oberflächenmarkern und die T-Zell-Proliferation im Vergleich zu einer negativen Kontrollsubstanz herunter. Im Jahre 2007 wurde eine weitere ECVAM Prä-Validierungsstudie zur Detektion immunsuppressiver Substanzen in vitro durchgeführt (Carfi' et al. 2007). An murinen, humanen und Rattenzellen wurden verschiedene Endpunkte wie Zytotoxizität, Zytokinfreisetzung (IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$ ), Myelotoxizität und Stimulierbarkeit mit Mitogenen (LPS, ConA and PHA) untersucht. Sechs Substanzen wurden fast korrekt klassifiziert, wenn das Testsystem die Ergebnisse mehrerer Endpunkte beinhaltete.

#### 1.3.3.2 In vitro Funktionstests - der Mishell-Dutton-Test

Eine weitere Methode zur Detektion immunsuppressiver Eigenschaften von Substanzen ist der Mishell-Dutton-Test. 1966 erstmalig beschrieben (Mishell und Dutton 1966), wurde der Test seitdem in verschiedenen Modifikationen zu unterschiedlichen Analysen eingesetzt. Anhand von Mishell-Dutton-Kulturen wurden allgemeine Mechanismen der Immunreaktion studiert (Eardley et al. 1976, Eardley und Gershon 1976, Marbrook und Haskill 1974, Haskill und Marbrook 1972, Cosenza et al. 1971, Haskill et al. 1970, Mishell et al. 1970, Hartmann et al. 1970, Hirst und Dutton 1970, Dutton et al. 1970, Dutton und Mishell 1967), immunsuppressive Effekte verschiedener Substanzklassen untersucht (Ban et al. 1995, Pruett et al. 1992a, Pazdernik und Corbett 1980) und immunsuppression-induzierende Mechanismen analysiert (Han und Pruett 1995, Pruett et al. 1992b, Kawabata und White 1987). Betrachtet man all die unterschiedlichen Ansätze, die bisher entwickelt wurden, um immunsuppressive Substanzen in vitro detektieren zu können (siehe Kapitel 1.3.3.1), scheint der Mishell-Dutton-Test in Vergessenheit geraten zu sein. Bisher wurde diese Methode weder als in vitro Alternative zu bestehenden Tierexperimenten in Erwägung gezogen, noch wurde ihr Potential, verschiedene Substanzen in Bezug auf ihre immunsuppressiven Eigenschaften korrekt vorherzusagen, durch eine Studie analysiert. Dies erstaunt besonders in dem Zusammenhang, dass für in vivo Methoden klar gezeigt werden konnte, dass Funktionstests die sensitivsten Indikatoren für primäre immunotoxische Substanzeffekte sind (Germolec 2004, Vohr und Ruehl-Fehlert 2001, Vohr 1995, Luster et al. 1993b; 1992; 1993a; 1988). Der Mishell-Dutton-Test gehört der Klasse der Funktionstests an, da er das in vitro Äquivalent zum ex vivo PFCA darstellt.



Abbildung 1.5 – Lichtmikroskopische Aufnahme eineshaemolytischen DiePlaques. Aufnahme entstammtderstimulierten Kontrolle MishelleinesDutton-Tests. Mikroskopiert wurde eine 94 mm Petrischale, auf der Zellen, SRBC und Komplement in Bakto-Agar zur Auswertung des Versuches im Plaque Assay aufgebracht wurden. Der Plaque wude Vergrößerung bei 8-facher und einer Expositionszeit von 1/300 s aufgenommen.

Wie beim PFCA wird auch bei der Mishell-Dutton-Kultur eine Immunisierung gegen SRBC durchgeführt. Diese erfolgt allerdings *in vitro* durch die Zugabe der SRBC zu immunkompetenten Zellen hergestellter Milz- oder peripherer Blutzellkulturen. Das Versuchsprinzip und die ablaufenden Immunreaktionen sind die Gleichen wie beim PFCA und wurden daher bereits im *Kapitel* 1.2.2.2 näher beschrieben. Als Endpunkt sind beim Mishell-Dutton-Test ebenfalls Bereiche antiköper-sezernierender Plasmazellen als haemolytische Plaques zu erkennen (*Abbildung* 1.5). Eine Immunsuppression verschiedener Substanzen kann erfasst werden, da sie durch komplette oder teilweise Inhibierung des Funktionstests in einer verringerten Plaquezahl resultiert.

## 1.4 Fragestellung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, eine *in vitro* Methode zu etablieren und zu optimieren, die zur Detektion immunsuppressiver Substanzeffekte als Alternative zum Tierversuch eingesetzt werden kann. Entsprechend muss eine solche Methode eine hohe Spezifität und Sensitivität aufweisen, indem sie deutlich zwischen zytotoxischen und immunsuppressiven Effekten diskriminiert und zudem die Möglichkeit der Metabolisierung von Substanzen beinhaltet, wie dies in der *in vivo* Situation gegeben ist.

Für den ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde eine Studie zur Detektion potenziell immunsuppressiver Substanzeffekte *in vitro* durch die Methodik der Mitogenstimulationen durchgeführt, die Teil des ECVAM-Projektes CCR.IHCP.C432293.X0 "Optimisation of *in vitro* immunotoxicity" war. Die korrekte Detektion sieben gut erforschter immunsuppressiver Modellsubstanzen und einer Kontrollsubstanz wurde anhand der Endpunkte Proliferation und Zytokinfreisetzung von TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  analysiert.

Aufgrund der Experimente von Luster et al. (1993b; 1992; 1993a; 1988), die eine hohe korrekte Vorhersagerate von Funktionstests im Vergleich zu Stimulationsversuchen zeigten, wurde im zweiten Abschnitt mit Mishell-Dutton-Kulturen ein solcher *in vitro* Funktionstest etabliert und optimiert. Da Mishell-Dutton-Kulturen an murinen Milzzellen entwickelt wurden ((Mishell und Dutton 1966), wurde der Versuch auch mit diesen Zellen aufgebaut. Anschließend wurde die Übertragbarkeit auf Milzzellen der Ratte sowie periphere mononukleäre Zellen (PBMCs) verschiedener Spezies überprüft. Der Einsatz von PBMC-Kulturen würde zum einen eine studienbegleitende Durchführung der Detektion immunsuppressiver Substanzeffekte ermöglichen, zum anderen würde die Verwendung humaner PBMCs die Problematik spezies-spezifischer Differenzen umgehen.

Im dritten Abschnitt erfolgte eine Analyse der korrekten Vorhersagewahrscheinlichkeit der immunsuppressiven Eigenschaften von Substanzen mit Mishell-Dutton-Kulturen muriner Milzzellen unter dem Einsatz acht immunsuppressiver Modellsubstanzen und vier negativer Kontrollsubstanzen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Methode der Mishell-Dutton-Kulturen für mechanistische Analysen der immunsuppressiven Wirkung von Substanzen einzusetzen. Dazu wurden im vierten Abschnitt verschiedene Studien mit der Substanz Urethan durchgeführt, um den immunsuppressions-induzierenden Mechanismus dieser Substanz weiter zu erforschen und die Methode der Mishell-Dutton-Kultur weiter in ihrer Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die *in vivo* Situation zu überprüfen.

# Kapitel 2

# Material und Methoden

## 2.1 Material und Versuchstiere

#### 2.1.1 Versuchstiere

Die *ex vivo* Experimente des Plaque Forming Cell Assays (PFCA) werden an 8 - 12 Wochen alten Weibchen des Auszuchtstammes NMRI durchgeführt, ebenso die Entnahme von Milzen und Blut zur Herstellung muriner Mishell-Dutton-Kulturen. Für die *in vitro* Mitogenstimulationen werden 6 - 8 Wochen alte Weibchen des murinen Inzuchtstammes C3H oder 6 - 8 Wochen alte männliche Ratten des Auszuchtstammes Wistar eingesetzt. Alle Tiere werden von Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen. Für die Herstellung von Mishell-Dutton-Kulturen der Ratte wird weiblichen, 8 - 12 Wochen alten Tieren des Stammes Lewis (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) oder Wistar (Harlan-Winkelmann) Blut oder Milz entnommen.

Die Haltung der Versuchstiere erfolgt gruppenweise in Käfigen des Typs III (Makrolon) unter Gabe von Haltungsalleinfutter (Provimi KLIBA SA, Kaiseraugst, Schweiz) und Wasser *ad libitum*. Die Versuche werden aufgrund der erforderlichen Akklimatisierung der Tiere frühestens fünf Tage nach Lieferung durchgeführt und erfolgen nach den allgemeinen Bestimmungen des Europäischen Tierschutzgesetzes.

#### 2.1.2 Labormaterial

Accuvetten; Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Bechergläser 25 ml, 50 ml, 600 ml; Schott, Mainz, Deutschland
Combitips steril, 1,0 ml, 2,5 ml, 5 ml, 10 ml; Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Combitips unsteril, 1,0 ml, 2,5 ml, 5 ml, 10 ml; Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Deckgläser, für Haemozytometer; Menzel, Braunschweig, Deutschland
Durchflußzytometrie-Röhrchen 5 ml; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Erlenmeyerkolben, 200 ml; Schott, Mainz, Deutschland
FACS Röhrchen 5 ml; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Falconröhrchen 15 ml, 50 ml; BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
Filtereinheit, 200 µM Cup Filcon; BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Gewebekulturflaschen 250 ml steril mit Standardverschluß; Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

Glaskolben, 1 l, 2 l, 100 ml; Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland

Kanülen, Neolus, steril, 20 G und 26 G; Terumo Europe N.V., Leuven, Belgien Kanülen für Monovetten, 20 G; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland Kunststoffkisten mit Objektträgerauflage; eigene Herstellung Monovette, mit Natriumcitrat; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland Multipette<sup>®</sup>; Eppendorf, Hamburg, Deutschland Neubauerzählkammer; Brand, Wertheim, Deutschland Nivelliertisch; neoLab Migge, Heidelberg, Deutschland Objektträger; Menzel, Braunschweig, Deutschland Parafilm; Pechiney Plastic Packaging, Neenah, USA Petrischalen, 60 mm und 94 mm; Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland Pipetten; Eppendorf, Hamburg, Deutschland Pipettenspitzen; Eppendorf, Hamburg, Deutschland Präparierbesteck; Aesculap, Tuttlingen, Deutschland Probenröhrchen, 5 ml und 10 ml, steril; Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml; Eppendorf, Hamburg, Deutschland Spritze, 1 ml, steril; Codan Medical ApS, Rødby, Dänemark Spritze, 5 ml, steril; B. Braun, Melsungen, Deutschland Stahlsiebe, grobmaschig; eigene Herstellung Stripetten<sup>®</sup> steril 5 ml, 10 ml, 25 ml; Corning B.V., Schiphol-Rijk, Niederlande Transfer-Pipetten, steril und unsteril; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland Vacutainer<sup>™</sup> Blutentnahmesystem; BD Diagnostics, Heidelberg, Deutschland Vakuum Sterilfilter, 200 µm; Corning B.V., Schiphol-Rijk, Niederlande Weisskappengefäße; Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland 24-Well-Platten, steril; BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland 96-Well-Platten, steril; Corning B.V., Schiphol-Rijk, Niederlande 96-Well-Platten (flat-bottom, flexible); BD Falcon, Heidelberg, Deutschland 96-Well-Platten (Maxi-Sorp); Nunc, Langenselbold, Deutschland

### 2.1.3 Laborgeräte

Autoklav; Getinge, Getinge, Schweden Bioanalyzer 2100; Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland FACSCanto II; BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland Fluorometer CytoFlour<sup>TM</sup> II, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland Fluorometer SPECTRAFluor Plus; Tecan, Crailsheim, Deutschland Kamera-Modul XC-003P; Sony Germany, Köln, Deutschland Inkubator BBD 6220; Kendro, Langenselbold, Deutschland Luftentkeimungsmodul PCR-Chamber; Bäro, Leichlingen, Deutschland Magnetrührer IKA Combimag Ret, IKA<sup>®</sup>-Labortechnik, Staufen, Deutschland Mikroskop Axioskop; Zeiss, Göttingen, Deutschland Mikroskop BZ-8000; Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland Mikroskop DMIRB; Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikrowelle; Brother, Bad Vilbel, Deutschland Partikelzählgerät Coulter Counter ZM; Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland pH-Meter; Knick, Berlin, Deutschland Pipetus<sup>®</sup>; Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland Realtime-PCR-Gerät ABI Prism<sup>®</sup> 7900HT Sequence Detection System; Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland Sterilbank; Clean Air, Woerden, Niederlande Spektralphotometer EL808; BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland Thermocycler PTC-200; MJ Research, Biozym Scientific, Hess. Oldendorf, Deutschland Ultraschallbad Transsonic TP 690; Elma, Singen, Deutschland Vacuboy mit Waschflasche; Inotech, Doltikon, Schweiz Vertikalschüttler MTS 4; IKA<sup>®</sup>-Labortechnik, Staufen, Deutschland Vertikalschüttler für Agilent Lab Chips, IKA Vortex; Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland Vortex REAX 200; Heidolph, Schwabach, Deutschland Waage AE 2000 (Analysenwaage); Mettler, Giessen, Deutschland Waage PM 200 (Oberschalenwaage); Mettler, Giessen, Deutschland Waage (Universalwaage); Sartorius, Göttingen, Deutschland Wärmebad; Köttermann Labortechnik, Uetze, Deutschland Wärmeschrank T6060 (Sterilisator); Heraeus, Hanau, Deutschland Wärmeschrank Hereaus Kelvitron<sup>®</sup>; Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland Zentrifuge 4K15C, Sigma Laborzentrifugen, Osterode, Deutschland Zentrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg, Deutschland Zentrifuge Megafuge 1.0R, Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland Zentrifuge Multifuge 4KR; Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland

## 2.1.4 Verbrauchschemikalien, Puffer und Lösungen

Bacto<sup>™</sup> Agar; BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland Blocking-Puffer (Tris buffered saline with Tween<sup>®</sup> 20, pH 8); Sigma, Deisenhofen, Deutschland Calciumchlorid-dihydrat; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Citronensäure; AppliChem, Darmstadt, Deutschland Coating-Puffer (Carbonate-Bicarbonate buffer); Sigma, Deisenhofen, Deutschland DEAE Dextran hydrochlorid; Sigma, Deisenhofen, Deutschland Dimethylsulfoxid (DMSO); Sigma, Deisenhofen, Deutschland Diantriumhydrogenphosphat; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland D(+)-Glukose; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland FACS Cleaning Solution; BD Biosciences, Heidleberg, Deutschland FACS Shutdown Solution; BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland Ficoll-Plaque<sup>™</sup> PLUS; GE Healthcare Biosciences AB, Upsala, Schweden IgM und IgG Standard; eigene Herstellung DL-Isocitratsäure Trinatriumsalz; Sigma, Deisenhofen, Deutschland Isoton II; Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland Kaliumchlorid; Sigma, Deisenhofen, Deutschland Kaliumdihydrogenphosphat; KMF Laborchemie, Lohmar, Deutschland Kochsalzlösung, isoton; Baxter, Unterschleißheim, Deutschland Komplement vom Meerschweinchen; Cedarlane Laboratories, Burlington, Canada Magermilchpulver; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Magnesiumchlorid-hexahydrat; Sigma, Deisenhofen, Deutschland Magnesiumsulfat-heptahydrat; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Natriumazid; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Natriumcarbonat; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Natriumchlorid; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Natrium Diethyldithiocarbamat Trihydrat; Sigma, Deisenhofen, Deutschland Natriumhydrogenphosphat-dihydrat; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Natronlauge 1 N; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Neuraminidase aus Vibrio cholerae > 1.5 U/ml; Sigma, Deisenhofen, Deutschland  $\beta$ -Nicotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat Hydrat (NADP); Sigma, Deisenhofen, Deutschland OPD-Tabletten; Dako, Hamburg, Deutschland Phenolrot; Sigma, Deisenhofen, Deutschland Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS); Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland Plaque Agarose; Biozym Scientific, Hess. Oldendorf, Deutschland Proben-Konjugat-Puffer (Tris buffered saline + BSA + 0.05 % Tween<sup>®</sup> 20, pH 8); Sigma, Deisenhofen, Deutschland S9 Mix von Mausweibchen (CD-1), BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland Salzsäure, 1 N; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Schwefelsäure, 25 %; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland SRBC-Hüllen; eigene Herstellung Tetramethylbenzidine (TMB) / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, USA Trypanblau; Sigma, Deisenhofen, Deutschland Tween<sup>®</sup> 20; Sigma, Deisenhofen, Deutschland Waschpuffer (Tris buffered saline with Tween<sup>®</sup> 20, pH 8); Sigma, Deisenhofen, Deutschland Zap-O-Globin; Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland

#### Ansatz Hank's Balanced Salt Solution (BSS)

Stammlösung A (in A. bidest.)	(g/l)	Stammlösung B (in A. bidest.)	(g/l)
D(+)-Glukose	10,00	Natriumchlorid	80,00
Natriumhydrogenphosphat-dihydrat	2,38	Kaliumchlorid	4,00
${ m Kalium dihydrogen phosphat}$	$0,\!60$	Magnesiumsulfat-heptahydrat	2,00
Phenolrot	0,10	Magnesiumchlorid-hexahydrat	2,00
		Calciumchlorid-dihydrat	1,86

#### Tabelle 2.1 – Ansatzschema der Stammlösungen A und B zur Herstellung von BSS.

Aus beiden Stammlösungen (*Tabelle* 2.1) wird gebrauchsfertiges BSS hergestellt, indem gleiche Teile der Stammlösung A und B miteinander vermischt werden. Die Lösung wird dann

1:5 mit A. bidest. verdünnt. Anschließend wird das BSS mit einem 200  $\mu m$ Vakuumfilter steril filtriert.

2-ME-Puffer ohne SRBC	(µl)	2-ME-Puffer mit SRBC	(µl)
Kulturmedium 50 μM 2-Mercaptoethanol in PBS	4600 400	Kulturmedium 50 μM 2-Mercaptoethanol in PBS 2,5 % SRBC in Kulturmedium	$4200 \\ 400 \\ 400$

## Ansatz der 2-Mercaptoethanolpuffer (2-ME) für Mishell-Dutton-Kulturen

#### Tabelle 2.2 – Ansatzschema der 2-ME-Puffer für Mishell-Dutton-Kulturen.

Um bei den Mishell-Dutton-Kulturen sowohl stimulierte als auch unstimulierte Kontrollen mitführen zu können, erfolgt jeweils parallel ein Ansatz von zwei verschiedenen 2-Mercaptoethanol-Puffern (2-ME-Puffern), einmal mit und einmal ohne Zusatz von Schafserythrozyten (SRBC) (*Tabelle* 2.2).

## Ansatz von Baktoagar für den Plaque Assay von Mishell-Dutton-Kulturen

0.5 % Baktoagar (in BSS) wird aufgekocht, bis eine klare Lösung entsteht. Anschließend werden 450 µg/ml DEAE Dextran Hydrochlorid zugegeben. Dazu wird eine Stammlösung mit 30 mg/ml des DEAE Dextran Hydrochlorids verwendet, deren pH-Wert mit Natronlauge auf 7,2 eingestellt wird.

## Ansatz des Färbepuffers für FACS-Analysen

PBS wird mit 0,09 % Natriumazid und 1 % FCS versetzt und der pH-Wert auf 7,4 - 7,6 eingestellt. Anschließend wird die Lösung sterilfiltriert (200  $\mu$ m Vakuumfilter).

## 2.1.5 Kulturmedien und Zusätze

Advanced D-MEM; Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland Bovines Serumalbumin; Sigma, Deisenhofen, Deutschland DMEM/F-12; Biochrom AG, Berlin, Deutschland Fötales Kälberserum; BiochromAG, Berlin und Sigma, Deisenhofen, Deutschland L-Glutamin 200 mM; Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland Humanes A/B-Serum; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland IMDM + L-Glutamin und 25 mM Hepes; Sigma, Deisenhofen, Deutschland McCoy's + L-Glutamin; Sigma, Deisenhofen, Deutschland 2-Mercaptoethanol; Sigma, Deisenhofen, Deutschland Natriumpyruvat 100 mM; Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland Non-Essential Amino Acids (NEAA) 100 x; Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland OpTmizer<sup>TM</sup> T-Cell Expansion SFM; Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland Penicillin-Streptomycin (5000 U/ml / 5000 µg/ml); Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland Primocin<sup>™</sup> 50 mg/ml; InVivoGen, San Diego, USA RPMI + L-Glutamin; Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland RPMI ohne Phenolrot; Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland Recombinant Rat IL-2; R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland

Recombinant Rat IL-4; R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland Recombinant Rat IL-6; R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland Recombinant Rat IL-10; R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland TB-1 Clonal Express Lymphocyte Medium; BioConcept, Allschwil, Schweiz

## RPMI I (supplementiert, für Resazurin-Assays und Mitogenstimulationen)

RPMI ohne Phenolrot oder RPMI + L-Glutamin
1 × Non-Essential Amino Acids
1 mM Natriumpyruvat
2 mM L-Glutamin
10 U/ml Penicillin, 10 µg/ml Streptomycin
10 % FCS
0,02 µM 2-Mercaptoethanol

## RPMI II (supplementiert, für Mishell-Dutton-Kulturen)

RPMI + L-Glutamin  $1 \times \text{Non-Essential Amino Acids}$  1 mM Natriumpyruvat 2 mM L-Glutamin  $0,1 \text{ µg/ml Primocin}^{\text{TM}}$ 5 % FCS

## Advanced D-MEM (supplementiert, für Mishell-Dutton-Kulturen)

Advanced D-MEM 1 × Non-Essential Amino Acids 1 mM Natriumpyruvat 2 mM L-Glutamin 0,1 μg/ml Primocin<sup>TM</sup> 5 % FCS

## Futtermedium für Mishell-Dutton-Kulturen

FCS im entsprechenden nicht supplementierten Medium 1:3 verdünnt

## 2.1.6 Vehikel- und Applikationssubstanzen

Als Vehikel wird Medium der entsprechenden Kultur eingesetzt. Bei hydrophoben Substanzen wird DMSO als organisches Lösungsmitel verwendet, dessen Endkonzentration für Mishell-Dutton-Kulturen bei 0,1 % liegt. Für Mitogenstimulationen wird Rapamycin mit einer Endkonzentration von 0,1 % DMSO und Benzo(a)pyren mit einer Endkonzentration von 0,5 % DMSO eingesetzt.

## Immunsuppressive Substanzen

Benzo(a)pyren; Sigma, Deisenhofen, Deutschland Cyclophosphamid; Sigma, Deisenhofen, Deutschland Cyclosporin A; Novartis, Nürnberg, Deutschland Dexamethason; Sigma, Deisenhofen, Deutschland Methotrexat Hydrat; Sigma, Deisenhofen, Deutschland N-Hydroxyurethan; Sigma, Deisenhofen, Deutschland Rapamycin; Sigma, Deisenhofen, Deutschland und LC Laboratories, Woburn, USA Urethan; Sigma, Deisenhofen, Deutschland Verapamil Hydrochlorid; Sigma, Deisenhofen, Deutschland Vinyl Carbamat; Toronto Research Chemicals, North York, Canada



Abbildung 2.1 – Strukturformeln der immunsuppressiven Substanzen.

#### Nicht-immunsuppressive Substanzen

 $1\hbox{-}Bromo-4\hbox{-}chlorobutan; Sigma, Deisenhofen, Deutschland$ 

D-Mannitol; Sigma, Deisenhofen, Deutschland

Heptanal; ABCR GmbH & CoKG, Karlsruhe, Deutschland Natriumdodecylsulfat (SDS); Sigma, Deisenhofen, Deutschland



Abbildung 2.2 - Strukturformeln der nicht-immunsuppressiven Substanzen.

## 2.1.7 Immunstimulanzien

Concanavalin A; MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich

Lipopolysaccharid; Sigma, Deisenhofen, Deutschland

Pokeweed Mitogen; Sigma, Deisenhofen, Deutschland

Schafserythrozyten, 50 %-Vollblut-Suspension in Alsever-Puffer; Labor Dr. Merk & Kollegen,

Ochsenhausen, Deutschland



(a) Concanavalin A (ConA)

(b) Lipopolysaccharid (LPS)

Abbildung 2.3 – Struktur der Mitogene Concanavalin A (ConA) und Lipopolysaccharid (LPS). Die Abbildung des ConA-Moleküls wurde der Webseite "www.wikipedia.org" nach Stichwortsuche "Concanavalin A" entnommen. Die Abbildung des LPS-Moleküls entstammt der Dissertation "Die Regulation des humanen Lipopolysaccharid Bindenden Proteins (hLBP)" von Werner Hallatschek an der Humboldt-Universität zu Berlin.

## 2.1.8 Antikörper für ELISA

Ziege Anti-Ratte IgG-POD; Dianova, Hamburg, Deutschland Ziege Anti-Ratte IgM-POD; Dianova, Hamburg, Deutschland

## 2.1.9 Antikörper für Analysen mittels Durchflußzytometrie (FACS)

Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Ratte Anti-Maus Foxp3 Klon MF23; BD Biosciences, Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Ratte Anti-Maus IL-17A Klon TC11-18H10; BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

- APC Maus Anti-Ratte CD4 Klon OX-35; BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- APC Ratte Anti-Maus CD25 Klon PC61; BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- FITC Ratte Anti-Maus/Ratte Foxp3 Klon FJK-16s; eBioscience, Frankfurt am Main, Deutschland

PE Ratte Anti-Maus CD4 Klon RM4-5; BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland PE Maus Anti-Ratte CD25 Klon OX-39; BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland Ratte Anti-Maus CD16/CD32 Fc-Block, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

## 2.1.10 Kits

Agilent RNA 6000 Nano Kit; Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland Cell Proliferation ELISA Kit; Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland Comp Beads Anti Maus Ig; BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland Comp Beads Anti Ratte Ig; BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland Cytofix/Cytoperm<sup>™</sup> Plus Kit; BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland Foxp3 Staining Buffer Set; eBioscience, Frankfurt am Main, Deutschland In Vitro Toxicology Assay Kit, Resazurin based; Sigma, Deisenhofen, Deutschland In Vitro Toxicology Assay Kit, Lactic Dehydrogenase based; Sigma, Deisenhofen, Deutschland Mouse IFN $\gamma$  Quantikine<sup>®</sup> ELISA Kit; R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland Mouse  $\text{TNF}\alpha$  Quantikine<sup>®</sup> ELISA Kit; R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland Rat IgM ELISA Quantitation Set; Bethyl Laboratories; Montgomery, USA Rat TNF $\alpha$  Quantikine<sup>®</sup> ELISA Kit; R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland Rat IFN $\gamma$  Quantikine<sup>®</sup> ELISA Kit; R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland RediPlate<sup>™</sup> 96 RiboGreen<sup>®</sup> RNA Quantitation Kit; Molecular Probes, Leiden, Niederlande RNeasy<sup>®</sup> Protect Cell Mini Kit; Qiagen, Hilden, Deutschland RT<sup>2</sup> First Strand Kit; SA Biosciences, Frederick, USA RT<sup>2</sup> qPCR Master Mix, SA Biosciences, Frederick, USA RT<sup>2</sup> Profiler<sup>™</sup> PCR Array System (Mouse Drug Metabolism); SA Biosciences, Frederick, USA RT<sup>2</sup> RNA QC PCR Array; SA Biosciences, Frederick, USA

### 2.1.11 Software

Agilent 2100 Bioanalyzer Software; Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland CytoCalc<sup>™</sup>; Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland CytoFluor<sup>™</sup>; Apllied Biosystems, Darmstadt, Deutschland FACSDiva<sup>™</sup> Software, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland KC4 Software; BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland Keyence Software für Mikroskopie; Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland Leica Q500MC Software Q-Win; Leica, Wetzlar, Deutschland Magellan v2.2x; TECAN Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland Multisizer<sup>TM</sup> 3 Software, Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland SDS 2.1; Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

## 2.2 Methoden und Versuchsprotokolle

#### 2.2.1 Herstellung von Zellsuspensionen für in vitro und ex vivo Versuche

Sämtliche für diese Arbeit durchgeführten Versuche erfordern das Herstellen von Zellsuspensionen, entweder für *ex vivo* Analysen wie den Plaque Forming Cell Assay (PFCA), oder aber reine *in vitro* Versuche wie die Mitogenstimulationen oder Mishell-Dutton-Kulturen. Die *ex vivo* Versuche werden mit Milzzellen durchgeführt, ebenso die Mitogenstimulationen. Für die Mishell-Dutton-Kulturen werden sowohl Milzzellen als auch periphere mononukleäre Zellen des Blutes (PBMC) eingesetzt.

#### 2.2.1.1 Herstellen von Milzzellsuspensionen

Die Ratte oder Maus wird durch  $CO_2$ -Inhalation getötet. Zur Milzentahme wird nach Desinfektion mit 70 % Ethanol im Bereich des unteren, linken Rippenbogens die Haut durch einen ca. 1 cm langen Schnitt durchtrennt. Nach Öffnung des Peritoneums wird die Milz mit einer Pinzette angehoben, von Fett- und Bindegewebe befreit und in kaltes BSS (Hank's Balanced Salt Solution) überführt. Bis zur weiteren Verarbeitung verbleibt die Milz auf Eis.

Durch mechanische Disaggregation wird aus der Milz eine Zellsuspension hergestellt. Dazu wird die Milz in einer 60 mm Kulturschale mit dem Stempel einer 5 ml Spritze durch ein grobes Stahlsieb gedrückt. Die Zellsuspension wird mit einer Transfer-Pipette über eine sterile Filtereinheit in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Es wird mit BSS auf 15 ml aufgefüllt.

Die Zellsuspension wird 10 min bei  $300 \times g$  zentrifugiert und der Überstand anschließend dekantiert. Die Zellen werden aufgewirbelt und in einem adäquaten Volumen des für den jeweiligen Versuch zu verwendenden Mediums aufgenommen.

#### 2.2.1.2 Herstellen von Suspensionen peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC)

#### Maus/Ratte

Für die Gewinnung peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC) wird die Ratte oder Maus durch  $CO_2$ -Inhalation getötet. Das Tier wird mit der dorsalen Seite nach unten fixiert und mit 70 % Ethanol desinfiziert. Das Fell am Brustkorb wird entfernt und direkt kaudal des Sternums die Bauchhöhle durch einen Schnitt geöffnet. Von dort ausgehend werden zur Öffnung des Brustkorbes zwei Schnitte links und rechts des Sternums in Höhe der vorderen Axillarlinie nach kranial unter Durchtrennung der Rippen gesetzt. Das Sternum kann nun mit einer Pinzette hochgeklappt werden, so dass das Herz frei zugänglich ist. Die rechte Herzkammer wird mit einer 20 G Kanüle punktiert und das Blut in Natriumcitrat-haltigen Monovetten aufgefangen. Anschließend wird das Blut in 15 ml Falcons überführt, in die zuvor jeweils 5 ml Ficoll vorgelegt wurden, indem es vorsichtig überschichtet wird. Es wird für 20 min bei 1000 × g und 20 °C zentrifugiert. Der Zellring an der Phasengrenze, welcher die PBMCs enthält, wird mit einer

Transfer-Pipette abgezogen und in ein neues 15 ml Falconröhrchen überführt. Es wird mit BSS auf 15 ml aufgefüllt und 10 min bei 4 °C und  $300 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Die Zellen werden in einer adäquaten Menge des für den jeweiligen Versuch einzusetzenden Mediums aufgenommen und an der Neubauerzählkammer ausgezählt.

## Human

Die Blutentnahme für Versuche an PBMCs humanen Ursprungs (hPBMCs) erfolgt durch Punktion der Armvene. Das verwendete Blutentnahmesystem des Vacutainers<sup>TM</sup> enthält Heparin als Antikoagulanz und Ficoll für die Auftrennung der Zellpopulationen. Direkt nach der Blutentnahme werden die Vacutainer<sup>TM</sup> waagerecht geschwenkt und anschließend für ca. 15 min stehengelassen. Nach erneutem Schwenken erfolgt die Zentrifugation bei RT für 20 min bei  $1600 \times g$ . Der Überstand wird in ein 15 ml Falconröhrchen überführt, dieses mit BSS aufgefüllt und 10 min bei 4 °C und  $300 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Die Zellen werden in einer adäquaten Menge des für den jeweiligen Versuch einzusetzenden Mediums aufgenommen und an der Neubauerzählkammer ausgezählt.

## 2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung der Zellzahl werden zwei verschiedene Verfahren eingesetzt, abhängig vom durchzuführenden Versuch. Die Mitogenstimulationen werden im Rahmen des ECVAM-Projektes CCR.IHCP.C432293.X0 "Optimisation of *in vitro* immunotoxicity" durchgeführt. Für dieses Projekt ist eine automatisierte Zellzahlbestimmung zur Minimierung des Zählfehlers erwünscht, so dass diese für sämtliche Mitogenstimulationen sowie für die zugehörigen Viabilitätsassays am Partikelzählgerät durchgeführt wird. Für die Mishell-Dutton-Kulturen und den Plaque Forming Cell Assay werden die Zellzahlen mikroskopisch mit der Neubauerzählkammer ermittelt, da mit diesem Verfahren tote Zellen zuverlässig von der Zählung ausgeschlossen werden können und sie bei geringen Probenmengen weniger Zeitaufwand benötigt.

## 2.2.2.1 Automatisierte Zellzahlbestimmung am Partikelzählgerät

 $2 \times 40$  µl der jeweiligen Zellsuspension werden abgenommen und jeweils in eine Accuvette mit 20 ml Isoton II gegeben. Pro Accuvette werden 3 Tropfen Zap-O-Globin zur Erythrozyten-Lyse hinzugefügt. Innerhalb eines Zeitraumes von 3 bis 15 min können die Zellzahlen am Partikelzählgerät ermittelt werden. Aus den Doppelbestimmungen der jeweiligen Zellsuspension werden von der Software Multisizer<sup>TM</sup> 3 die Mittelwerte im Größenbereich von 3,29 µM bis 20 µM Durchmesser gezählter Partikel berechnet. Diese Mittelwerte entsprechen den angegeben Zellzahlen  $\times 10^6$  Zellen/ml. Anhand der ermittelten Konzentrationen der Zellsuspensionen werden die Verdünnungen berechnet und angesetzt, die für den jeweils durchzuführenden Versuch benötigt werden.

## 2.2.2.2 Mikroskopische Zellzahlbestimmung mit der Neubauerzählkammer

20 µl der jeweiligen Zellsuspension werden abgenommen, mit 180 µl Trypanblau vermischt und auf eine Neubauerzählkammer aufgetragen. Das Trypanblau kann nur bei Verlust der Membranintegrität in Zellen eindringen und färbt somit nur tote Zellen blau, die entsprechend bei der Auszählung nicht berücksichtigt werden. Es wird ein Großquadrat bestehend aus 16 Kleinquadraten bei einer Zellzahl größer 100 lebender Zellen ausgezählt. Liegt die ermittelte Zellzahl darunter, werden zwei oder mehrere Großquadrate ausgezählt und anschließend der Mittelwert gebildet, um den Zählfehler zu reduzieren. Die Zellkonzentration der Ausgangssuspension entspricht der für ein Großquadrat ermittelten Zellzahl  $\times 10^4$  Zellen/ml, bei einer 1:10 Verdünnung mit Trypanblau entsprechend der Zellzahl  $\times 10^5$  Zellen/ml. Anhand der bestimmten Konzentration der Zellsuspension wird die Verdünnung berechnet und angesetzt, die der für den jeweiligen Versuch benötigten Konzentration entspricht.

#### 2.2.3 Der Plaque Forming Cell Assay (PFCA)

Beim Plaque Forming Cell Assay (PFCA) handelt es sich um einen so genannten *ex vivo* Versuch zur Analyse immuntoxischer, insbesondere immunsuppressiver, Substanzeigenschaften. Bei einem solchen Versuch erfolgt die Verabreichung der zu analysierenden Substanz *in vivo*, ebenso die für den Versuch unerlässliche Immunisierung. Die Erhebung definierter Parameter zur Bestimmung von Substanzeffekten wird jedoch *ex vivo* an den Milzzellen der Tiere durchgeführt.

#### 2.2.3.1 Intraperitoneale Applikation von Substanzen

Die intraperitoneale Applikation von Substanzen erfolgt an weibliche NMRI-Mäuse in Gruppen von jeweils acht Tieren pro Dosis. Die Substanzen werden im entsprechenden Lösungsmittel so angesetzt, dass für die entsprechende Dosis jeder Maus pro Gramm Körpergewicht 10 µl verabreicht werden. Die durchgeführten Versuche sind in *Tabelle 2.3* aufgeführt.

Substanz	${f Dosis}\ ({ m mg/kg/d})$	$\frac{{\bf Konzentration}}{{\rm (mg/ml)}}$	Lösungsmittel
Urethan (Langzeitprotokoll)	0 100 300	$0,0 \\ 10,0 \\ 30,0$	physiol. Kochsalzlösung
Urethan (Kurzzeitprotokoll)	0 500	$0,0 \\ 50,0$	physiol. Kochsalzlösung
N-Hydroxyurethan (Kurzzeitprotokoll)	$\begin{array}{c} 0 \\ 50 \\ 150 \\ 400 \end{array}$	0,0 5,0 15,0 40,0	physiol. Kochsalzlösung
Vinyl Carbamat (Kurzzeitprotokoll)	0 5 20 60	0,0 0,5 2,0 6,0	physiol. Kochsalzlösung

**Tabelle 2.3** – Übersicht der durchgeführten PFCAs. Dargestellt sind die Dosen pro Behandlungstag sowie die eingesetzten Substanzkonzentrationen und Lösungsmittel im PFCA nach Langzeitoder Kurzzeitprotokoll.

#### Langzeitprotokoll

Den Tieren wird über einen Zeitraum von 14 Tagen täglich die Substanz verabreicht. Die Sektion der Tiere erfolgt am Tag nach der letzten Behandlung (Tag 15).

#### Kurzzeitprotokoll

Den Tieren wird an insgesamt zwei Tagen mit einem behandlungsfreien Tag dazwischen die zu analysierende Substanz verabreicht. Die Sektion der Tiere erfolgt, abhängig von der Fragestellung des Versuches, vier oder sechs Tage nach der letzten Behandlung (entsprechend an Tag 7 oder Tag 9).

#### 2.2.3.2 Die Immunisierung

Eine Immunisierung mit Schafserythrozyten (SRBC) wird, abhängig von der Fragestellung des Versuches, drei, vier oder fünf Tage vor der Sektion durchgeführt. Die Immunisierung der NMRI-Mäuse erfolgt intraperitoneal. Dazu wird eine SRBC-Suspension der Konzentration  $1 \times 10^{10}$  SRBC/ml in sterilem BSS durch mikroskopische Zellzahlbestimmung mit der Neubauerzählkammer (siehe *Kapitel* 2.2.2.2) hergestellt. Jedem Tier werden gewichtsunabhängig 100 µl dieser Suspension verabreicht.

#### 2.2.3.3 Der ex vivo Plaque Assay

Wie im Kapitel 2.2.1 beschrieben, wird aus der Milz eines jeden Versuchstieres eine Zellsuspension hergestellt. Einzige Abweichung zu diesem Protokoll ist das zusätzliche Wiegen der frisch entnommenen Milzen, bevor diese dann jeweils zu einer Einzelzellsuspension weiterverarbeitet werden. Die Bestimmung der Zellzahl (Zahl der Lymphozyten) jeder Milz erfolgt mikroskopisch mit der Neubauerzählkammer (siehe Kapitel 2.2.2.2). Anschließend wird die Zellzahl in BSS auf  $1 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt. Zu 500 µl auf 42 °C vorgewärmter Plaque Agarose (0,5 % in BSS) werden 10 bzw. 100 µl der Zellsuspension und 50 µl einer SRBC-Suspension (10 % in BSS) zugegeben. Diese Suspension wird auf mit 0,1 % Plaque Agarose vorbeschichteten Objektträgern in Doppelbestimmungen ausplattiert.

Die Objektträger werden in Kunststoffkisten mit Objektträgerauflagen gelagert, mit BSS überschichtet und 60 min bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. In dieser Zeit diffundieren von B-Zellen sezernierte SRBC-spezifische Antikörper in die Agarose. Anschließend wird das BSS abgesaugt und die Objektträger mit 10 % Komplement in BSS überschichtet, um die Bereiche, in denen spezifische Antikörper von B-Zellen sezerniert wurden, zu lysieren. Dazu wird 60 min bei 37 °C inkubiert und anschließend das Komplement abgesaugt.

Für die Auswertung wird zunächst begutachtet, ob die mit 10 µl oder 100 µl Zellsuspension plattierten Objektträger ausgezählt werden. Dabei gilt, dass die 100 µl Objektträger nur dann nicht verwendet werden, wenn die Plaquedichte für eine Auszählung zu groß ist. Die IgM-vermittelten Plaques der Doppelbestimmungen, also die vom Komplement lysierten, kreisrunden Bereiche auf den Objektträgern, werden ausgezählt und Mittelwerte bezogen auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen gebildet.

Um auch alle durch IgG-vermittelten Plaques zu erfassen, werden die Objektträger anschließend mit einem polyklonalen Kaninchen anti-Maus anti-Immunglobulin-Antikörper (50 µg/ml in BSS/10 % Komplement) beschichtet und für 45 min inkubiert. Durch die Bindung des zugegebenen Antikörpers an von murinen B-Zellen sezernierte IgG-Antikörper wird, unter Zusatz von Komplement, eine indirekte SRBC-Lyse erzielt. Dadurch können nun auch die zuvor nicht sichtbaren Bereiche IgG-sezernierender B-Zellen als Plaques sichtbar gemacht werden. Dies war für die Analyse der IgM-sezernierenden B-Zellen zuvor nicht notwendig, da im Gegensatz zu IgG das IgM-Pentamer das Komplement deutlich stärker zur Lyse aktivieren kann. Nach Absaugen der Antikörperlösung können nun die IgG-Plaques bestimmt werden, indem die zuvor ermittelte IgM-Plaquezahl von der hier gezählten Gesamtplaquezahl subtrahiert wird. Auch aus den Doppelbestimmungen der IgG-Plaquezahlen werden Mittelwerte für eine Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen gebildet.

#### 2.2.3.4 Auswertung

Aus den Werten für das Milzgewicht, die Milzzellzahl und die IgM- und IgG-Plaques der jeweils acht Tiere pro Gruppe werden Mittelwerte gebildet sowie die Standardabweichungen absolut und prozentual berechnet. Abweichende Ergebnisse zwischen der Kontrollgruppe und der behandelten Gruppe, die auf einen spezifischen Substanzeffekt hindeuten, werden mittels des Studentschen t-Tests auf Signifikanz überprüft. Der Test wird dazu zweiseitig, ungepaart und heteroskedastisch durchgeführt. Ein signifikantes Ergebnis ist gekennzeichnet durch einen Wert p < 0,05, ein Wert p < 0,01 zeigt ein hochsignifikantes Ergebnis an.

#### 2.2.3.5 Histopathologische Untersuchungen

Die histopathologischen Analysen wurden von Dr. Christine Ruehl-Fehlert, Dr. Elke Hartmann und Mitabeitern in der Abteilung für Pathologie und Klinische Pathologie der Bayer HealthCare AG durchgeführt.

Für die Untersuchungen werden weiblichen NMRI-Mäusen, die für einen PFCA nach Langzeitprotokoll wie beschrieben 14 Tage i.p. mit Urethan behandelt und 5 Tage vor der Sektion mit SRBC immunisiert werden, neben der Milz für den Plaque Assay zusätzlich Lunge, Leber, Thymus, Femur, Sternum, Nieren, Nebennieren, Ovarien und mesenteriale Lymphknoten entnommen. Die Organe werden in 10 % Formalin fixiert und dehydriert. Anschließend werden sie in Paraplast eingebettet und in ca. 4 µm dicke Schnitte geteilt. Diese werden auf Objektträger aufgebracht, mit Hematoxylin und Eosin gefärbt und am Mikroskop bewertet.

#### 2.2.4 Mitogen-induzierte Stimulation von Milzzellen

Die Mitogenstimulationen werden im Rahmen des ECVAM-Projektes CCR.IHCP.C432293.X0 "Optimisation of *in vitro* immunotoxicity" durchgeführt. Zur Bestimmung eines Effektes immunsuppressiver Substanzen werden die Proliferation der Zellen sowie die Freisetzung der Zytokine TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  in den Kulturüberstand als Endpunkte gewählt.

#### 2.2.4.1 Ansetzen von Kulturen für Mitogenstimulationen

Das einzusetzende Medium ist RPMI I mit Phenolrot. Für jede Mitogenstimulation mit ConA oder LPS werden jeweils eine unstimulierte und eine stimulierte Kontrolle mitgeführt, der statt einer zu testenden Substanz die entsprechende Menge des Vehikels zugesetzt wird. Pro Well einer 96-Well-Platte werden 50 µl Milzzellsuspension entsprechend  $4 \times 10^5$  Zellen pro Well, 50 µl Mitogen (oder Medium für die unstimulierte Kontrolle) und 50 µl der zu testenden Substanzkon-

zentration bzw. Vehikel pipettiert. Die Mitogene werden in den folgenden Endkonzentrationen eingesetzt:

LPS: 30 μg/ml ConA: 2 μg/ml

Die Mitogene inkubieren mit den Zellen und der zu testenden Substanz für 48 h bei 37 °C, 5 %  $CO_2$  und 95 % Luftfeuchtigkeit. Die Auswertung erfolgt entweder als Zellproliferationsanalyse durch den BrdU-ELISA oder als Zytokinanalyse durch einen TNF $\alpha$ - und IFN $\gamma$ -ELISA. Für einen BrdU-ELISA wird jede Substanzkonzentration bzw. Kontrolle dreifach bestimmt, für die Zytokinanalyse werden Vierfachbestimmungen angesetzt.

#### 2.2.4.2 Zellproliferationsanalyse (BrdU-ELISA)

Mit dem Cell Proliferation ELISA kann die Proliferation von Zellen quantitativ bestimmt werden. Dazu wird der Einbau von BrdU (*Abbildung* 2.4) während der DNA-Synthese gemessen. Die Detektion des BrdU erfolgt durch Inkubation mit einem peroxidase-gekoppelten Antikörper, der unter Umsatz von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) einen Farbumschlag von Tetramethylbenzidin (TMB) von farblos nach blau bewirkt. Durch ein Abstoppen der Reaktion mit Schwefelsäure erfolgt ein weiterer Farbumschlag nach gelb, so dass die Absorption bei 450 nm mit der Referenzwellenlänge von 630 nm photometrisch bestimmt werden kann. Die OD<sub>450-630</sub> ist proportional zur Menge eingebauten BrdUs.

Nach Ablauf der 48-stündigen Inkubationszeit der Zellen auf 96-Well-Platten mit Mitogenen und/oder Substanz werden pro Well 15 µl (10 % des Gesamtkulturvolumens) BrdU Labeling Reagent hinzupipettiert. Nach 22- bis 24-stündiger Inkubation bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit werden die Platten 10 min bei 4 °C und 300 × g zentrifugiert. Der Überstand wird abgekippt und die Zellen für 75 min bei 60 °C im Wärmeschrank getrocknet. Anschließend werden pro Well 200 µl FixDenat auf die Zellen pipettiert und es wird 30 min bei RT inkubiert. Nach Abkippen der FixDenat-Lösung werden pro Well 100 µl Anti-BrdU-POD Working Solution zugegeben. Die Inkubation erfolgt bei RT für 90 min. Anschließend werden die Wells dreimal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Der Waschpuffer wird abgekippt und die Platten trocken geklopft. Pro Well werden 100 µl Substrat-Lösung zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei RT im Dunkeln wird die Farbreaktion durch Zugabe von 25 µl/Well 1 M Schwefelsäure abgestoppt. Innerhalb von 5 min wird bei 450 nm die Absorption unter der Referenzwellenlänge von 630 nm am Photometer gemessen.



Abbildung 2.4 – Strukturformel der Base Thymidin und des Analogons 5-Bromo-2desoxyuridin (BrdU).

#### 2.2.4.3 Zytokinanalyse (ELISA)

Mit einem Zytokin-ELISA kann die von Zellen sezernierte Menge von Zytokinen quantitativ bestimmt werden. Dazu wird zunächst das zu bestimmende Zytokin durch auf die Platte beschichtete Antikörper festgehalten und durch anschließende Waschschritte aus dem Zellkulturüberstand isoliert. Die Detektion und Quantifizierung des Zytokins erfolgt durch Inkubation mit einem zweiten, peroxidase-gekoppelten Antikörper, der unter Umsatz von  $H_2O_2$  einen Farbumschlag von Tetramethylbenzidin (TMB) von farblos nach blau bewirkt. Durch ein Abstoppen der Reaktion mit Schwefelsäure erfolgt ein weiterer Farbumschlag nach gelb, so dass die Absorption bei 450 nm mit der Referenzwellenlänge von 570 nm photometrisch bestimmt werden kann. Die  $OD_{450-570}$  ist proportional zur Menge des auf der Platte gebundenen Zytokins und somit zur Menge, die von den Zellen sezerniert wurde. Eine genaue Quantifizierung erfolgt über die Erstellung von Standardkurven, indem die  $OD_{450-570}$  für Proben definierter Zytokinkonzentrationen bestimmt werden.

Nach Ablauf der 48-stündigen Inkubationszeit werden die Zellen auf den 96-Well-Platten bei  $300 \times g$  und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Anschließend werden die Überstände jeder Vierfachbestimmung in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß zusammengeführt und gemischt. Die Proben werden in 100 µl Aliquots in 0,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen aufgeteilt und anschließend bei -80 °C aufbewahrt. Zur Analyse werden die Proben aufgetaut und gegebenenfalls mit A. bidest. verdünnt. Folgende Verdünnungen können zumeist eingesetzt werden:

Maus TNF $\alpha$ :	unverdünnt für alle durchgeführten Stimulationen
Maus IFN $\gamma$ :	LPS-Stimulationen unverdünnt, ConA-Stimulationen 1:2
Ratte TNF $\alpha$ :	unverdünnt für alle durchgeführten Stimulationen
Ratte IFN $\gamma$ :	LPS-Stimulationen 1:2, ConA-Stimulationen 1:4

Die Durchführung der Zytokinanalyse erfolgt entsprechend der Angaben des Herstellers der ELISA-Kits (R&D Systems).

#### 2.2.4.4 Auswertung

Für die weitere Auswertung werden der Mittelwert der vehikelbehandelten und nicht mit Mitogenen stimulierten Negativkontrolle gleich einer Proliferation bzw. Zytokinfreisetzung von 0 % und der der stimulierten Positivkontrolle gleich einer Proliferation bzw. Zytokinfreisetzung von 100 % gesetzt. Die Proliferation bzw. Zytokinfreisetzung der stimulierten und chemikalienbehandelten Zellen lässt sich dann folgendermaßen berechnen:

 $Proliferation/Zytokinfreisetzung(\%) = \frac{MW\ Probe - MW\ Negativkontrolle}{(MW\ Positivkontrolle - MW\ Negativkontrolle) \times 100}$ 

#### 2.2.5 Viabilitätsassays

Für sämtliche Versuche zur Identifikation immuntoxischer Substanzen *in vitro* ist die Durchführung von Viabilitätsassays unerlässlich. Nur durch die Bestimmung unspezifischer zytotoxischer Effekte können diese klar von spezifischen immuntoxischen Substanzwirkungen abgegrenzt werden. Ein Teil der Viabilitätsassays wurde im Rahmen des ECVAM-Projektes CCR.IHCP. C432293.X0 "Optimisation of *in vitro* immunotoxicity" durchgeführt. Dazu wurden mit dem LDH-Assay und dem Resazurin-Assay zwei verschiedene Methoden ausgewählt, um sie unter den Kulturbedingungen der Mitogenstimulationsexperimente einzusetzen und die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können.

Für die Viabilitätsanalyse unter den Kulturbedingungen der Mitogenstimulationsexperimente werden Kulturen wie in *Kapitel* 2.2.4.1 beschrieben angesetzt, wobei kein Mitogen, sondern stattdessen die entsprechende Menge Medium zugegeben wird. Verwendet wird RPMI I, wobei für den Resazurin-Assay RPMI ohne Phenolrot zur Hintergrundreduktion eingesetzt wird. Die Auswertungen in Dreifachbestimmungen erfolgen nach 24 h, 48 h und 72 h.

Für die Mishell-Dutton-Kulturen wird nur der zellbasierte Resazurin-Assay für eine Bestimmung der Viabilität eingesetzt. Hier erfolgt die Analyse in Doppelbestimmungen direkt am durchgeführten Versuch durch Abnahme eines entsprechenden Volumens der Zellsuspension jeder Probe nach Ablauf der Inkubationszeit (siehe *Kapitel* 2.2.6). Je ein Well pro Doppelbestimmung der antigen-stimulierten und unstimulierten Kontrollen wird als Positivkontrolle des Resazurin-Assays verwendet (siehe *Kapitel* 2.2.5.2).

#### 2.2.5.1 Laktat Dehydrogenase Assay (LDH-Assay)



Abbildung 2.5 – Prinzip des Laktat-Dehydrogenase (LDH) Assays. Abbildung modifiziert nach der Abbildung "Principle of measurement" des LDH Cytotoxicity Detection Kits aus dem Produktkatalog der Firma Takara Bio Inc.

Der LDH-Assay basiert auf der Reduktion von NAD durch LDH. LDH befindet sich im Zytoplasma von Zellen und wird bei Verlust der Membranintegrität in den Überstand freigesetzt. Wird das im Assay zugegebene Laktat von LDH unter Reduktion von NAD zu NADH umgesetzt, steht das entstandene NADH entsprechend als Kofaktor der Konvertierung von Tetrazolium zu Formazan durch das Enzym Diaphorase zur Verfügung (*Abbildung* 2.5). Nur das rote Formazan absorbiert Licht der Wellenlänge 490 nm, so dass die bei dieser Wellenlänge gemessene Absorption proportional zur freigesetzten LDH-Menge ist.

45 min vor Ablauf der gewünschten Inkubationszeit mit verschiedenen Substanzen und Substanzkonzentrationen werden auf die Zellen der Positivkontrolle je 15 µl LDH Assay Lysis Solution gegeben. Anschließend werden die Zellen auf den 96-Well-Platten 5 min bei 4 °C und  $300 \times g$  zentrifugiert, um Suspensionszellen aus dem Kulturüberstand zu entfernen. Aus jedem Well (Proben, Negativkontrollen und Positivkontrollen) werden 50 µl des Überstandes auf neue 96-Well-Platte übertragen. Dann werden 100 µl frisch angesetzten LDH Assay Mixes (Verhältnis LDH Substrat, Kofaktor und Färbelösung 1+1+1) pro Well hinzu pipettiert. Die Inkubation erfolgt für 30 min im Dunkeln bei RT. Anschließend wird durch Zugabe von 15 µl 1 N Salzsäure (HCl) pro Well die Reaktion abgestoppt und die Absorption bei 490 nm abzüglich der Hintergrundabsorption bei 630 nm photometrisch bestimmt.

#### 2.2.5.2 Resazurin Assay

Mit der Durchführung des Resazurin-Assays wird die metabolische Aktivität von Zellen bestimmt. Dabei wird blaues Resazurin von metabolisch aktiven Zellen durch Dehydrogenasen zu seiner fluoreszenten roten Form Resorufin umgewandelt (*Abbildung* 2.6). Die Menge an fluoreszierendem Resorufin (gemessen bei 590 nm bei einer Anregungswellenlänge von 540 nm) ist proportional zur Viabilität der Zellen, da nur lebende Zellen metabolische Aktivität aufweisen.



Abbildung 2.6 – Konvertierung von Resazurin zu fluoreszentem Resorufin. Abbildung modifiziert nach der Abbildung des Eintrages "Resazurin" auf www.wikipedia.de.

Die zu analysierenden Zellen aus Mishell-Dutton-Kulturen werden unmittelbar nach ihrer Überführung auf Platten im 96-Well-Format 2 min bei 4 °C und  $300 \times g$  zentrifugiert. Die Überstände werden verworfen und durch 100 µl RPMI I ohne Phenolrot ersetzt. Wurden Kulturen bereits in RPMI I ohne Phenolrot angesetzt (Zytotoxizitätsbestimmung unter den Bedingungen der Mitogenstimualtionskulturen), entfällt der Mediumwechsel. Auf die Zellen der Positivkontrolle (stimulierte und unstimulierte Kontrolle) werden pro Well 10 µl LDH Assay Lysis Solution gegeben. Es wird 45 min bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit werden pro Well 10 µl Resazurin hinzu pipettiert. Nach 2- bis 3-stündiger Inkubation (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchtigkeit) wird am Fluorometer die Fluoreszenz bei 590 nm unter Anregung bei 540 nm bestimmt.

#### 2.2.5.3 Auswertung

Für die weitere Auswertung wird der Mittelwert der vehikelbehandelten bzw. unbehandelten Negativkontrolle gleich einer Zytotoxizität von 0 % und der der lysierten Positivkontrolle gleich einer Zytotoxizität von 100 % gesetzt. Die Zytotoxizität der eingesetzten Substanzkonzentrationen auf die Zellen lässt sich dann folgendermaßen berechnen:

 $Zytotoxizität(\%) = \frac{MW \ Probe - MW \ Negativkontrolle}{(MW \ Positivkontrolle - MW \ Negativkontrolle) \times 100}$ Viabilität(%) = 100% - Zytotoxizität(%)

Für jede Dreifachbestimmung der jeweiligen Substanzkonzentration bzw. des Vehikels werden absolute und prozentuale Standardabweichungen berechnet. Bei den Mishell-Dutton-Kulturen werden als Grundlage für die Positiv- und Negativkontrolle die Zellen der stimulierten Kontrolle verwendet.

#### 2.2.6 Mishell-Dutton-Kultur

Der Mishell-Dutton-Test ist das *in vitro* Äquivalent zum *ex vivo* durchgeführten PFCA und gliedert sich somit ebenfalls in die drei Komponenten Substanzapplikation, Immunisierung und Plaque Assay, wenn auch *in vitro* teilweise die Substanzapplikation und die Immunisierung parallel durchgeführt werden. Mishell-Dutton-Kulturen werden mit Milz- und Blutzellen der Maus (Weibchen des Stammes NMRI) und der Ratte (Weibchen des Stammes Wistar und Lewis) durchgeführt. Zudem werden humane periphere mononukleäre Zellen eingesetzt.

#### 2.2.6.1 Ansatz der Mishell-Dutton-Kultur mit murinen Milzzellen

Der Mishell-Dutton-Test auf der Basis einer Mishell-Dutton-Kultur wird in Dreifachbestimmungen durchgeführt. Es werden demnach pro Test drei Wells unstimulierte Kontrolle (mit 2-ME-Puffer ohne SRBC), drei Wells stimulierte Kontrolle (mit 2-ME Puffer mit SRBC) und drei Wells je Substanzkonzentration (mit 2-ME Puffer mit SRBC) angesetzt. Für murine Milzzellen wird supplementiertes Advanced D-MEM mit 5 % FCS verwendet.

Die Milzzellsuspension wird auf  $2 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt. Pro Well werden 500 µl Zellsuspension ( $1 \times 10^7$  Zellen), 250 µl des jeweilig zu verwendenden 2-ME-Puffers und 250 µl Substanzverdünnung bzw. Medium (für die Kontrollen) pipettiert. Es wird für 5 Tage bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Jeweils einmal täglich werden die Zellen mit Futtermedium gefüttert, indem pro Well mit einer sterilen Pasteurpipette 2 Tropfen Futtermedium pipettiert und die Zellen anschließend durch Auf- und Abpipettieren aufgewirbelt werden. Am Tag 5 erfolgt die Aufarbeitung, wofür die Zellen der Kulturen zunächst unsteril mit Pasteurpipetten aufgewirbelt werden. Pro Well werden  $2 \times 50$  µl für den Resazurin-Assay entnommen und auf eine 96-Well-Platte überführt. Die verbliebenen Zellen werden in FACS-Röhrchen überführt und jedes Well mit BSS gespült. Die Zellen werden zweimal mit BSS gewaschen (Zentrifugation bei 300 × g und 4 °C für 10 min). Der Überstand wird anschließend dekantiert, das Zellpellet in 900 µl BSS aufgenommen und die Röhrchen für den Plaque Assay (siehe *Kapitel* 2.2.6.10) auf Eis gelagert.

# 2.2.6.2 Ansatz der Mishell-Dutton-Kultur mit Milzzellen der Ratte (Waschprotokoll)

Aufgrund der hohen benötigten Zellzahl wird der Versuch zunächst in Einfachbestimmungen angesetzt. Als Medium wird RPMI II verwendet.

Der Ansatz der Mishell-Dutton-Kulturen erfolgt in 250 ml Gewebekulturflaschen. Pro Flasche werden 6 ml Medium, 6 ml 2-ME Puffer (mit oder ohne SRBC) sowie  $24 \times 10^7$  Zellen in 12 ml Medium gegeben. Je nach eingesetztem Rattenstamm und Fragestellung des Versuches wird 6 h (Stamm Wistar) oder 24 h (Stamm Lewis) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen aufgewirbelt, in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und mit BSS gewaschen (Zentrifugation bei  $300 \times q$  und 4 °C für 10 min). Anschließend wird das Zellpellet in 10 ml BSS resuspendiert und die Zellsuspension vorsichtig auf 5 ml Ficoll in einem 15 ml Falconröhrchen überschichtet. Es wird für 20 min bei  $1000 \times q$  und 20 °C zentrifugiert. Die an der Phasengrenze zwischen flüssiger Phase und dem Ficoll befindlichen Lymphozyten werden abgenommen, in ein neues 15 ml Falconröhrchen überführt und mit BSS gewaschen  $(300 \times g, 4 \text{ °C}, 10 \text{ min})$ . Das Zellpellet wird in 2 ml RPMI II resuspendiert und die Zellzahl an der Neubauerzählkammer bestimmt. Die Zellzahl wird auf  $2 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt. In Dreifachbestimmungen werden anschließend auf 24-Well-Platten  $1 \times 10^7$  Zellen/Well auplattiert und entsprechend mit 250 µl 2-ME-Puffer mit oder ohne SRBC versetzt. Das Volumen pro Well wird mit RPMI II auf 1 ml gebracht. Es wird bei 37 °C, 5 %  $\rm CO_2$  und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Ca. 24 h nach dem Ausplattieren der Zellen auf 24-Well-Platten wird ein Mediumwechsel durchgführt. Dazu werden die Zellen auf den Platten für 5 min bei  $300 \times q$ und 4 °C zentrifugiert und die Überstände anschließend abgesaugt. Die Zellen werden in 1 ml RPMI II mit 1 µM 2-Mercaptoethanol resuspendiert. Eine erneute SRBC-Stimulation erfolgt nicht.

An Tag 4 werden die Kulturen unsteril mit Pasteurpipetten aufgewirbelt. Pro Well werden  $2 \times 50$  µl für den Resazurin-Assay entnommen und in die Wells einer 96-Well-Platte pipettiert. Die verbliebenen Zellen werden in FACS-Röhrchen überführt und jedes Well mit BSS gespült. Die Zellen werden zweimal mit BSS gewaschen (Zentrifugation bei  $300 \times g$  und 4 °C für 10 min). Der Überstand wird anschließend dekantiert, das Zellpellet in 500 µl BSS aufgenommen und die Röhrchen für den Plaque Assay (siehe *Kapitel* 2.2.6.10) auf Eis gelagert.

#### 2.2.6.3 Ansatz der Mishell-Dutton-Kultur mit peripheren mononukleären Zellen

Die Mishell-Dutton-Kulturen werden aufgrund des niedrigen Lymphozytengehaltes des Blutes vorwiegend in Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Gewinnung der peripheren mononukleären Zellen (PBMC) erfolgt nach dem in *Kapitel* 2.2.1.2 beschriebenen Protokoll. Als Standardmedium wird RPMI II eingesetzt. Das Ausplattieren, Füttern und Aufarbeiten der Zellen erfolgt wie im *Kapitel* 2.2.6.1 für murine Milzzellen beschrieben. Für den Plaque Assay (siehe *Kapitel* 2.2.6.10) werden die Zellen jedoch statt in 900 µl in 500 µl BSS aufgenommen.

#### 2.2.6.4 Induktion der Substanzmetabolisierung durch S9-Mix (Cytochrom P450)

Einige Substanzen sind selbst nicht oder nur schwach immuntoxisch und entfalten ihre Wirkung *in vivo* erst durch eine Metabolisierung durch Cytochrom P450 Enzyme der Leber. Für einen *in vitro* Test ist es daher unerlässlich, ebenfalls eine solche Metabolisierung zu ermöglichen. Dazu kann S9-Mix verwendet werden.

Beim S9-Mix handelt es sich um den Überstand der Zentrifugation von Leberzellhomogenat für 20 min bei 9000  $\times g$ . Er wird auch als postmitochondrialer Überstand bezeichnet, da durch die Zentrifugation Mitochondrien, Zellkerne und intakte Zellen sedimentiert werden. Es wird zumeist das Leberzellhomogenat mit Aroclor 1254, Phenobarbital oder 3-Methylcholanthren behandelter Tiere verwendet, deren Leberenzyme stark induziert sind. Der hier verwendete S9-Mix (BD Gentest) stammt jedoch von unbehandelten Tieren, genauer von Mausweibchen des Stammes CD-1.

Um S9-Mix in der Mishell-Dutton-Kultur anwenden zu können, ist es notwendig, die Substanzexposition und die Immunisierung voneinander zu trennen. Eine Immunisierung ist nicht möglich, wenn der S9-Mix zum selben Zeitpunkt wie das Antigen zugegeben wird und für die gesamte Inkubationsdauer in der Kultur verbleibt (Tucker und Munson 1981).

Die hier durchgeführte Methode ist eine Modifikation des von Tucker et al. (1982) beschriebenen Verfahrens und wird bisher nur für Kulturen mit murinen Milzzellen eingesetzt. Als Medium wird supplementiertes Advanced D-MEM, zunächst ohne FCS, verwendet. Pro Well einer 24-Well-Platte werden 250 µl Medium,  $1 \times 10^7$  Zellen in 500 µl Medium und 250 µl der entsprechenden Substanzverdünnung bzw. Medium für die Kontrollen pipettiert. Der murine S9-Mix mit einer Konzentration von 20 mg/ml Gesamtprotein wird in Medium mit 35 mM Isocitrat und 2mM NADP auf eine Konzentration von 5 mg/ml verdünnt. Von diesem Ansatz werden pro Well 100 µl direkt in die Kultur pipettiert. Es wird 1 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Unmittelbar nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen für 10 min bei  $300 \times g$  und 4 °C pelletiert und der Zellkulturüberstand vorsichtig abgezogen. Jedes Zellpellet wird in 750 µl Medium (supplementiertes Advanced D-MEM mit 5 % FCS) resuspendiert. Anschließend werden den Zellen der unstimulierten Kontrolle 250 µl 2-ME-Puffer ohne SRBC zugesetzt, während denen der stimulierten Kontrolle sowie den substanzbehandelten Zellen 250 µl 2-ME-Puffer mit SRBC zugegeben werden. Nun wird wie mit jeder Mishell-Dutton-Kultur des entsprechenden Zelltyps weiter verfahren und 5 Tage unter täglicher Fütterung mit 2 Tropfen Futtermedium pro Well im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Aufarbeitung der Zellen nach Ablauf der Inkubationszeit wird wie im *Kapitel* 2.2.6.1 bzw. *Kapitel* 2.2.6.10 beschrieben durchgeführt.

## 2.2.6.5 Inhibierung der Cytochrome CYP2E1 und CYP2B6 durch Diethyldithiocarbamat (DDC)

Für Versuche zur Metabolisierung bestimmter Substanzen kann es wichtig sein, bestimmte Enzyme zu inhibieren. Das Cytochrom CYP2E1 kann durch Natrium Diethyldithiocarbamat (DDC) (*Abbildung* 2.7) mechanismus-basiert gehemmt werden, wobei der Inhibitor nicht selektiv ist und auch andere Enzyme wie CYP3A4 und CYP2B6 hemmt (Eagling et al. 1998).



Natrium Diethyldithiocarbamat

Abbildung 2.7 – Strukturformel von Natrium Diethyldithiocarbamat (DDC).

Aufgrund der starken Zytotoxizität des DDC kann dieses nicht über die gesamte Kulturzeit von 5 Tagen auf den Zellen verbleiben. Daher werden bei diesem Versuch die Substanzexposition und die Immunisierung nacheinander durchgeführt. Als Medium wird supplementiertes Advanced D-MEM, zunächst ohne FCS, eingesetzt. Pro Well einer 24-Well-Platte werden 250 µl einer 40 µM oder 8 µM DDC-Lösung (abhängig von der Fragestellung des Versuches) und  $1 \times 10^7$  Zellen in 500 µl Medium pipettiert. Es wird 7 min bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert, damit das DDC vor der Substanzexposition auf die Zellen wirken kann. Es folgt die Zugabe von 100 µl Medium mit 35 mM Isocitrat und 2mM NADP. Anschließend werden pro Well 250 µl der jeweils einzusetzenden Substanzkonzentration bzw. Medium für die Kontrollen hinzugegeben. Es wird 53 min bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Unmittelbar nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen 5 min bei 4 °C und 300 × g pelletiert und der Zellkulturüberstand vorsichtig abgezogen. Jedes Zellpellet wird in 750 µl Medium (supplementiertes Advanced D-MEM mit 5 % FCS) resuspendiert. Anschließend werden den Zellen der unstimulierten Kontrolle 250 µl 2-ME-Puffer ohne SRBC zugesetzt, während denen der stimulierten Kontrolle sowie den substanzbehandelten Zellen 250 µl 2-ME-Puffer mit SRBC zugegeben werden. Es wird 5 Tage unter täglicher Fütterung mit 2 Tropfen Futtermedium pro Well im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Aufarbeitung der Zellen nach Ablauf der Inkubationszeit wird wie im *Kapitel* 2.2.6.1 bzw. *Kapitel* 2.2.6.10 beschrieben durchgeführt.

#### 2.2.6.6 Neuraminidase-Verdau von Zellen

Für einen Vorverdau von Zellen mit Neuraminidase werden  $1 \times 10^7$  Zellen pro Well einer 24-Well-Platte ausgesät. Es erfolgt eine Zentrifugation bei  $300 \times g$  und 4 °C für 5 min. Die Überstände werden abgezogen und die Zellpellets vorsichtig in jeweils 500 µl Neuraminidase ( $\geq 1,5$  U/ml; 1:50 verdünnnt in PBS + 0,2 % BSA) suspendiert. Es wird 1 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wird erneut bei  $300 \times g$  und 4 °C für 5 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgezogen. Die Zellpellets werden in Medium und 2-ME-Puffer mit oder ohne SRBC entsprechend des Standardprotokolls für den Ansatz von Mishell-Dutton-Kulturen (siehe *Kapitel* 2.2.6.1) resuspendiert.

## 2.2.6.7 Zelluläre und humorale Kulturzusätze

Zur Optimierung der Mishell-Dutton-Kulturen mit unterschiedlichen Zelltypen verschiedener Spezies können den Kulturen optional verschiedene zelluläre und humorale Komponenten zugesetzt werden.

#### Zusatz peritonealer Makrophagen

Es werden einer zuvor durch  $CO_2$ -Inhalation getöteten Wistarratte 10 ml eiskaltes BSS in die Bauchhöhle injiziert. Nach einer ca. 2-minütigen Massage des Bauches wird das BSS mit den darin enthaltenen peritonealen Makrophagen mit einer 10-ml-Spritze möglichst vollständig zurückgewonnen. Die Zellzahl wird an der Neubauerzählkammer bestimmt und die Zellen nach Zentrifugation für 10 min bei  $300 \times g$  und 4 °C im für den jeweiligen Mishell-Dutton-Test verwendeten Medium aufgenommen. Bis zu ihrer Zugabe zur Kultur werden die Makrophagen auf Eis gelagert. Eingesetzt werden folgende Endkonzentrationen:  $3 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  und  $3 \times 10^4$ Zellen/ml.

#### Zugabe von ConA und PWM zur Mishell-Dutton-Kultur

ConA wird mit einer Endkonzentration von 2  $\mu$ g/ml eingesetzt. Beim Pokeweed Mitogen (PWM) liegen die Endkonzentrationen bei 10  $\mu$ g/ml, 30  $\mu$ g/ml und 100  $\mu$ g/ml für Rattenmilzzellen sowie 10  $\mu$ g/ml und 100  $\mu$ g/ml für humane PBMCs.

#### Zusatz von Zytokinen

Die Zytokine IL-2 und IL-4 werden entsprechend der folgenden Endkonzentrationen zugegeben:

IL-2: 0,3 ng/ml und 1 ng/ml IL-4: 1 ng/ml und 3 ng/ml

Die Zytokine werden dabei jeweils einzeln in der niedrigen und der hohen Konzentration eingesetzt, oder aber in der Kombination beider niedriger oder beider hoher Konzentrationen. Für die Zytokine IL-2, IL-6 und IL- 10 werden die folgenden Kombinationen (Endkonzentrationen) eingesetzt:

IL-2 1 ng/ml, IL-6 0,3 ng/ml, IL-10 25 ng/ml IL-2 1 ng/ml, IL-6 0,3 ng/ml, IL-10 75 ng/ml IL-2 0,3 ng/ml, IL-6 0,3 ng/ml, IL-10 25 ng/ml

#### Gewinnung von ConA-Überständen

Für eine Gewinnung von ConA-Überständen werden pro Well einer 24-Well-Platte  $1 \times 10^7$ Zellen (gleicher Spezies, gleichen Tierstammes und gleichen Zelltyps wie für die spätere Mishell-Dutton-Kultur) in 1 ml Volumen mit 2 µg/ml ConA stimuliert. Nach 24 h und 48 h werden die Platten 5 min bei 300 × g und 4 °C zentrifugiert und die Überstände abgezogen, gepoolt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

#### Gewinnung von Mishell-Dutton-Überständen

Für die Gewinnung der Überstände von Tag 1 und Tag 5 werden Mishell-Dutton-Kulturen mit murinen Milzzellen angesetzt. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit werden die Zellen 5 min bei  $300 \times g$  und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände werden vorsichtig abgezogen, gepoolt und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

#### 2.2.6.8 Depletion der Makrophagen

Um eine Depletion der Makrophagen aus den Kulturen muriner PBMCs und Milzzellen der Ratte zu erzielen, werden die Kulturen zunächst nicht stimuliert, sondern lediglich in 1 ml Medium pro Well einer 24-Well-Platte angesetzt. Die Zellen werden 2 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert, damit die Makrophagen an das Plastik der Näpfe adhärieren. Nach Ablauf der Inkuabtionszeit werden die nicht-adhärenten Zellen vorsichtig mit einer Transfer-Pipette aufgewirbelt und auf eine neue 24-Well-Platte überführt. Es erfolgt eine Zentrifugation bei 300 × g und 4 °C für 5 min. Die Überstände werden abgezogen und durch Medium und 2-ME-Puffer zum Ansatz einer regulären Mishell-Dutton-Kultur ersetzt.

#### 2.2.6.9 SRBC-ELISA und IgM-ELISA

#### SRBC-ELISA

Für die Durchführung eines SRBC-ELISA werden 96-Well-Platten (BD Falcon) am Vortag des Versuches mit SRBC-Hüllen (1:400 in PBS verdünnt) gecoatet. Die Wells der Platte werden anschließend  $4 \times \text{mit Tween}^{\textcircled{m}}$  20-Puffer (0,01 % Tween<sup>m</sup> 20 in PBS) gewaschen, um überschüssige SRBC-Hüllen zu entfernen. Unspezifische Bindungsstellen werden anschließend durch eine Inkubation für 1 h bei RT mit 125 µl/Well Blocking-Puffer (3 % Magermilch in A. bidest.) gesättigt. Die Platte wird 2 × mit Tween<sup>m</sup> 20-Puffer gewaschen. IgM- und IgG-Standards werden in einer Verdünnungsreihe mit Blocking-Puffer verdünnt. Die Überstände der Mishell-Dutton-Kulturen werden sowohl unverdünnt als auch 1:2 in Blockingpuffer verdünnt eingesetzt. Von Standards und Überständen werden in Doppelbestimmungen 50 µl pro Well pipettiert. Es wird 1 h bei RT inkubiert und anschließend 2 × mit Tween<sup>m</sup> 20-Puffer gewaschen. In Blocking-Puffer werden folgende Antiköper-Verdünnungen angesetzt:

Ziege Anti-Ratte IgG-POD: 1:2000 Ziege Anti-Ratte IgM-POD: 1:2000

Von den jeweiligen Antikörper-Verdünnungen werden 50 µl pro Well pipettiert. Es wird bei RT 1 h inkubiert. Anschließend wird 1 × mit Tween<sup>®</sup> 20-Puffer und 2 × mit Citratpuffer (Citronensäure und Dinatriumhydrogenphosphat in A. bidest) gewaschen. Es werden 100 µl Substratlösung pro Well pipettiert (48 ml Citratpuffer, 16 OPD-Tabletten, 20 µl  $H_2O_2$ ). Nach ca. 15 min wird die Umsetzung des Substrates durch die Antikörper-gekoppelte Peroxidase (POD) durch die Zugabe von 10 µl Schwefelsäure (25 %) abgestoppt. Die Absorption wird anschließend bei 450 nm mit einer Referenz von 630 nm am Photometer bestimmt.

#### IgM-ELISA

Für den IgM-ELISA werden 96-Well-Platten (Nunc) mit dem 1:100 in Coating-Puffer verdünnten anti-Ratte anti-IgM-Antikörper des Rat IgM ELISA Quantitation Sets für 1 h bei RT gecoatet. Die Platten werden  $4 \times$  mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend werden unspezifische Bindungsstellen durch eine Inkubation mit 200 µl Blocking-Puffer pro Well für 30 min bei RT abgesättigt. Die Standards werden in einer Reihe von 1:2-Verdünnungen von 200 ng/ml bis 31,25 ng/ml in Proben-Konjugat-Puffer angesetzt. Die Überstände wurden im selben Puffer 1:2 verdünnt. Es werden 100 µl Standard bzw. Probe pro Well in Doppelbestimmungen pipettiert und anschließend 1 h bei RT inkubiert. Die Platten werden  $4 \times$  mit Waschpuffer gewaschen. Es folgt die Zugabe des Zweitantikörper-Konjugates Ziege anti-Ratte IgM-HRP, der 1:12500 in Proben-Konjugat-Puffer verdünnt wird. Es werden 100 µl pro Well pipettiert und 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem  $4 \times$  Waschen der Platte mit Waschpuffer wird das Substrat zugegeben. Dazu werden TMB und Peroxidase zu gleichen Teilen vermischt und 100 µl/Well pipettiert. Es wird 10 min bei RT inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 100 µl Schwefelsäure (25 %) abgestoppt. Die Absorption wird bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenz von 630 nm am Photometer bestimmt.

#### 2.2.6.10 Der Plaque Assay

Im Wasserbad (45 °C) werden in FACS-Röhrchen je 600 µl Bacto-Agar vorgelegt. Das Meerschweinchenkomplement wird in 5 ml kaltem A. bidest. rekonstituiert und zusammen mit einer 15 % SRBC-Lösung (in BSS) auf Eis gelagert.

Zum Agar in den im Wasserbad befindlichen Röhrchen werden je 50 µl SRBC-Lösung und 50 µl Komplement pipettiert. Bei murinen Milzzellen erfolgt zudem eine Zugabe von 50 µl Zellsuspension und 50 µl BSS, während bei Milzzellen der Ratte und PBMCs 100 µl Zellsuspension pipettiert werden. Die Suspension wird gevortext und zügig auf 94 mm Petrischalen mit einer gebogenen Glas-Pasteurpipette ausplattiert. Von jeder Probe werden Doppelbestimmungen angefertigt.Die Petrischalen werden nach ein paar Minuten Trockenzeit zusammengesetzt und in einer Kunststoffkiste mit etwas Wasser bei 37 °C für 5 h im Wärmeschrank inkubiert. Anschließend werden die Plaques pro Schale ausgezählt.

#### 2.2.6.11 Auswertung

Da für jede Substanzkonzentration und Kontrolle Triplikate angesetzt werden und der Plaque Assay in Duplikaten durchgeführt wird, ergeben sich bei der Auszählung der Plaques insgesamt 6 Einzelwerte für gleichbehandelte Zellen. Aus diesen wird jeweils der Mittelwert gebildet sowie die absolute und prozentuale Standardabweichung berechnet.

Für jede zu analysierende Substanz wird anhand der ermittelten Werte die Plaque IC90 berechnet. IC steht für inhibitorische Konzentration. Die IC90 beschreibt somit die Substanzkonzentration, die 90 % der Plaques inhibiert. Dazu wird zunächst die prozentuale Inhibition der Plaques jeder Substanzkonzentration nach folgender Formel berechnet:

Inhibition (%) =  $\frac{MW \ Probe - MW \ stimulierte \ Kontrolle}{(MW \ unstimulierte \ Kontrolle - MW \ stimulierte \ Kontrolle) \times 100}$ 

Wenn die ermittelte Inhibition  $\geq$  100 % ist gilt Inhibition = 100 %

Anhand eines Wertes  $y_1$ , der eine größere Inhibition und eines Wertes  $y_2$ , der eine geringere Inhibition als die der zu berechnende IC beschreibt, wird mit den jeweils zugehörigen Substanzkonzentrationen  $x_1$  bzw.  $x_2$  die Geradengleichung der Plaqueinhibition berechnet. Die Geradengleichung lautet:

y = mx + s

Die Variable m beschreibt dabei die Steigung der Geraden und wird folgendermaßen berechnet:

$$m = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}$$

Die Variable s beschreibt den Schnittpunkt der Geraden mit der y-Achse und berechnet sich entsprechend der Formel:

$$s = y_1 - mx_1$$

Anhand der ermittelten Geradengleichung kann im nächsten Schritt dann die jeweilige IC berechnet werden:

$$IC90 = \frac{10-s}{m}$$

Für den berechneten Wert wird mit Hilfe der zu den jeweiligen Versuchen gehörigen Viabilitätsdaten des Resazurin Assays die Viabilität bestimmt, dass heißt die Viabilität bei der Substanzkonzentration der Plaque IC90. Dazu wird zunächst die Geradengleichung der Viabilitätskurve entsprechend der oben beschriebenen Formel berechnet. Anschließend wird mit der Geradengleichung für die Konzentration der Plaque IC90 die Viabilität an diesen Fixpunkten berechnet.

#### 2.2.7 RNA-Analyse mit Mishell-Dutton-Kulturen

Für die RNA-Gewinnung werden Mishell-Dutton-Kulturen, wie unter Kapitel 2.2.6.1 beschrieben, angesetzt und mit der Substanz Urethan in verschiedenen Konzentrationen (12,5 mM, 25 mM und 50 mM) in Triplikaten behandelt. Auf den Ansatz einer unstimulierten Kontrolle wird verzichtet, so dass als Kontrolle substanzunbehandelte, aber SRBC-stimulierte Zellen dienen. Nach Ablauf der gewählten Inkubationszeiten von 30 min, 1 h, 4 h, 8 h, 24 h und 48 h werden die jeweils  $1 \times 10^7$  ausgesäten Zellen pro Well einer 24-Well-Platte für 10 min bei  $200 \times g$  zentrifugiert, das Kulturmedium abgezogen und die Zellen anschließend in sterilem PBS gewaschen. Die Zellpellets werden zur Stabilisierung der RNA in jeweils 600 µl RNAprotect Cell Reagent aufgenommen und bei 4 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Die Zellen werden nicht länger als über Nacht aufbewahrt.

#### 2.2.7.1 Isolation der RNA

Die Isolation der RNA erfolgt entsprechend der Herstellerangaben des RNeasy<sup>®</sup> Protect Cell Mini Kits. Die Zellen der Triplikate im RNAprotect Cell Reagent werden zunächst gepoolt und aufgrund der hohen Zellzahl zur weiteren Verarbeitung auf zwei Probengefäße aufgeteilt. Zur Homogenisierung werden die Zelllysate 2 min durch Qiashredder-Säulen zentrifugiert. Je Säule wird mit 2  $\times$  30 µl RNase-freiem Wasser eluiert und die gewonnene RNA der jeweils identischen Proben gepoolt. Die RNA wird bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

## 2.2.7.2 Qualitätskontrolle der RNA am Bioanalyzer

Eine Qualitätskontrolle der isolierten RNA wird am Bioanalyzer 2100 durchgeführt. Dazu wird das Agilent RNA 6000 Nano Kit nach Herstellerangaben eingesetzt. Mithilfe des Kits und der entsprechenden Software wird eine Gelelektrophorese im Nanomaßstab durchgeführt und das Verhältnis der 28S zur 18S rRNA bestimmt sowie die RNA Integrity Number (RIN) berechnet. RNA, die nicht degradiert ist und qualitativ für den Einsatz in Realtime-PCRs geeignet ist, wird durch ein 28S zu 18S rRNA-Verhältnis größer 1,8 und eine RIN größer 7 gekennzeichnet.

## 2.2.7.3 Quantifizierung der RNA

Die Quantifizierung der RNA mit dem RediPlate<sup>TM</sup> 96 RiboGreen<sup>®</sup> RNA Quantitation Kit erfolgt nach Herstellerangaben. Die Methode basiert auf der Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffes RiboGreen<sup>®</sup> in RNA oder DNA, die bei einer Extinktion von 500 nm und einer Emission von 525 nm fluorometrisch am CytoFluor<sup>TM</sup> II bestimmt wird. Die RNA wird mit einer Verdünnung von 1:1000 in TE-Puffer eingesetzt. Als Standard dient eine rRNA-Verdünnungsreihe bekannter Konzentrationen.

## 2.2.7.4 Reverse Transkription

Bevor eine quantitative Analyse der RNA durch Realtime-PCR durchgeführt werden kann, muss die RNA zunächst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dieser Schritt erfolgt durch das Enzym Reverse Transkriptase. Die reverse Transkription wird mit dem RT<sup>2</sup> First Strand Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Kit beinhaltet eine Eliminierung möglicherweise in den RNA-Proben verbliebener genomischer DNA. Von der gewonnenen cDNA jeder Probe wird für die Durchführung eines QC PCR Arrays zur Qualitätskontrolle ein 6 µl Aliquot abgenommen. Die cDNA und die Aliquots für den QC PCR Array werden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

## 2.2.7.5 Quantitative Real-time PCR

Die Quantifizierung der RNA bzw. cDNA erfolgt durch Real-time PCR. Die quantitative Real-time PCR beruht auf dem Prinzip der Polymerase Kettenreaktion (PCR), bei der durch das Enzym Polymerase gezielt bestimmte DNA-Fragmente, abhängig von der Auswahl der Primer, vervielfältigt werden. Die Quantifizierung der Real-time PCR wird über den DNA-interkalierenden Farbstoff SYBR<sup>®</sup> Green durchgeführt. Durch Messung der Fluoreszenz des SYBR<sup>®</sup> Greens, die sich proportional zur Menge des PCR-Produktes verhält, kann auf die mRNA-Menge der Ausgangsprobe rückgeschlossen werden. Dazu wird für die Messung eine Detektionsgrenze festgelegt, die, abhängig von der Menge der entsprechenden mRNA bzw. cDNA in der Probe, zu einer bestimmten Zyklenzahl des Real-time PCR-Laufes überschritten wird. Diese Zyklenzahl wird als C<sub>T</sub>-Wert bezeichnet und ist die Grundlage für die spätere Analyse.

#### Qualitätskontrolle der RNA und cDNA durch QC PCR Array

Zur Überprüfung der Qualität der cDNA nach der reversen Transkription und der RNA der Ausgangsproben wird vor der Messung des eigentlichen PCR Arrays eine Qualitätskontrolle sämtlicher Proben durchgeführt. Dazu wird der RT<sup>2</sup> QC PCR Array der Firma SABiosciences nach Herstellerangaben eingesetzt. Bestimmt wird ein niedrig und ein stark exprimiertes Haushaltsgen der cDNA-Proben, um deren Integrität zu überprüfen. Zudem wird eine reverse Transkriptionskontrolle über die externe RNA-Kontrolle des RT<sup>2</sup> First Strand Kits, eine positive PCR Kontrolle über eine artifizielle DNA-Sequenz zur Detektion potentieller PCR-Inhibitoren, sowie eine Kontrolle auf Kontamination mit genomischer DNA durchgeführt. Die RNA wird ebenfalls auf Kontamination mit genomischer DNA getestet. Zudem wird mit einer Wasserkontrolle die bleibende Reinheit der Proben während des Pipettiervorgangs überprüft. Auf den RT<sup>2</sup> QC PCR Arrays befinden sich die Primer für die zu messenden Gene bereits in den entsprechenden Wells der 96-Well-Platte. Zu den 6 µl Aliquots der cDNA-Proben wird hinzupipettiert:

- 75 µl  $2 \times$  SABiosciences PCR Master Mix
- 69 µl RNase- und DNase-freies Wasser

Für die Wasserkontrolle wird 2 × SABiosciences PCR Master Mix mit RNase- und DNasefreiem Wasser auf 1 × verdünnt. Für die RNA-Proben wird 1 µl RNA auf den auf 1 × verdünnten 2 × SABiosciences PCR Master Mix gegeben. Pro Well der 96-Well-Platte werden 25 µl des entsprechenden Ansatzes hinzugegeben und die fertig pipettierten Platten für 2 min bei  $150 \times g$ zentrifugiert und anschließend im ABI Prism<sup>®</sup> 7900HT Sequence Detection System gemessen. Dazu werden zunächst ein Zyklus mit 95 °C für 1 min und anschließend 40 Zyklen mit 95 °C für 15 s und 60 °C für 1 min durchgeführt.

#### PCR Array zur RNA-Analyse

Zur Überprüfung des Metabolismus der Substanz Urethan wird der Mouse Drug Metabolism RT<sup>2</sup> Profiler<sup>TM</sup> PCR Array ausgewählt und nach Herstellerangaben durchgeführt. Auf den PCR-Platten befinden sich Primer für 84 metabolismus-relevante Gene sowie für 5 Haushaltsgene zur Normalisierung der Ergebnisse. Zudem beinhaltet jede Platte eine Kontrolle auf Kontamination mit genomischer DNA, eine reverse Transkriptionskontrolle und eine positive PCR-Kontrolle. Pro Platte/cDNA-Probe wird der folgende experimentelle Cocktail angesetzt:

1275 µl 2 × SABiosciences PCR Master Mix
1173 µl RNase- und DNase-freies Wasser
102 µl cDNA

25 µl des Cocktails werden pro Well der 96-Well-Platte pipettiert, die Platte für 2 min bei  $150 \times g$  zentrifugiert und anschließend im ABI Prism<sup>®</sup> 7900HT Sequence Detection System gemessen.

#### 2.2.7.6 Auswertung

Für die Auswertung der PCR Arrays wird mit dem Programm SDS 2.1 der Firma Applied Biosystems der  $C_T$ -Wert jeder Probe/Primer-Kombination berechnet. Die weitere Auswertung erfolgt basierend auf diesen  $C_T$ -Werten über die Webseite der Firma SABiosciences unter http://www.SABiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php.

#### Qualitätskontrolle der RNA und cDNA durch QC PCR Aray

Zur Auswertung des QC PCR Arrays wird das Excel-basierte " $RT^2$  RNA QC PCR Array Data Analysis Template" der SABiosciences Webseite unter der oben angegebenen Adresse verwendet. Aus den eingegebenen C<sub>T</sub>-Werten werden automatisch verschiedene Parameter berechnet, die Aufschluss über die Qualität der Proben, mögliche Inhibitoren der reversen Transkription und Kontaminationen der Proben mit genomischer DNA geben. Eine vollständige Analyse erfolgt über die Software, die jede Probe bezüglich der genannten Parameter bewertet.

## PCR Array zur RNA-Anaylse

Die Auswertung der PCR Arrays erfolgt ebenfalls web-basiert auf der SABiosciences Internetseite. Jede Probe wird durch den Array erneut auf Kontamination mit genomischer DNA und Inhibitoren der reversen Kontamination getestet. Zudem ist eine positive PCR-Kontrolle enthalten. Es werden Excel-Templates erstellt, in die die entsprechenden C<sub>T</sub>-Werte der Proben eingefügt werden. Diese Daten werden hochgeladen und von der Software bearbeitet. Es erfolgt eine Normalisierung auf den Durchschnittswert fünf verschiedener Haushaltsgene (Gusb, Hrpt1, Hsp90ab1, Gapdh und Actb). Die Daten werden ausgegeben als normalisierte Werte in einer Tabelle, als Scatterplot, als Clustergramm und als Multigroupplot.

## 2.2.8 FACS-Analyse mit Mishell-Dutton-Kulturen

Sämtliche FACS-Analysen werden am FACSCanto II der Firma Becton Dickinson durchgeführt. Eingesetzt werden Milzzellen der Maus und der Ratte, die, wie unter *Kapitel* 2.2.6.1 bzw. *Kapitel* 2.2.6.2 beschrieben, kultiviert werden. An murinen Milzzellen werden Färbungen von regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ) (CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup>) und  $T_{H}17$ -Zellen (CD4<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup>) durchgeführt, an Milzzellen der Ratte werden nur die  $T_{reg}s$  (CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup>) gefärbt.

## 2.2.8.1 Aufarbeitung der Milzzellen für die FACS-Analyse

Für die Aufarbeitung wird ein Teil der Milzzellen unmittelbar vor dem Ausplattieren an Tag 0 abgenommen, sowie entsprechend Zellen der fertigen Mishell-Dutton-Kulturen an Tag 1, 2 und 3 zur Analyse entnommen. Dazu werden die Zellen aufgewirbelt, in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und in BSS gewaschen (Zentrifugation für 10 min bei  $300 \times g$  und 4 °C). Nach Resupension des jeweiligen Zellpellets in BSS wird die Zellsuspension vorsichtig auf 5 ml Ficoll in einem 15 ml Falconröhrchen überschichtet. Es wird 20 min bei 20 °C und  $1000 \times g$  zentrifugiert. Die an der Phasengrenze befindlichen Lymphozyten werden abgenommen und erneut in BSS gewaschen. Anschließend werden die Zellzahlen an der Neubauerzählkammer bestimmt (siehe Kapitel 2.2.2.2) und jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen in ein 5 ml FACS-Röhrchen überführt.

#### 2.2.8.2 Färbung muriner Milzzellen

Die Färbung der  $T_{reg}s$  und der  $T_H17$ -Zellen erfolgt parallel. Da sich sowohl die Proteine IL-17A als auch Foxp3 im Inneren der Zelle befinden, erfolgte die Färbung nach Protokollen für intrazelluläre Färbungen. Für den Nachweis von  $T_H17$ -Zellen wird nach der Anweisung des Cytoperm BD Cytofix/Cytoperm<sup>TM</sup> Plus Kits verfahren, die Färbung der Tregs erfolgt entsprechend des Protokolls für intrazelluläre Färbungen des Anti-Maus/Anti-Ratte Foxp3 Antikörpers Klon FJK-16s der Firma eBioscience (siehe *Kapitel* 2.2.8.3). Um IL-17A vor der Färbung in den Zellen akkumulieren zu lassen, werden 3 h vor der Aufarbeitung der Zellen der Mishell-Dutton-Kulturen pro Well 0,67 µl BD Golgi-Stop<sup>TM</sup> (Teil des BD Cytofix/Cytoperm<sup>TM</sup> Plus Kits) zugegeben.

Antikörper	Verdünnugsfaktor
Ratte Anti-Maus CD16/CD32 Fc-Block	1:50
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 Ratte Anti-Maus IL-17A Klon TC11-18H10	1:100
FITC Ratte Anti-Maus/Anti-Ratte Foxp3 Klon FJK-16s	1:100
APC Ratte Anti-Maus CD25 Klon PC61	1:100
PE Ratte Anti-Maus CD4 Klon RM4-5	1:400

Tabelle 2.4 - Verdünnungsfaktoren der Antikörper zur Färbung muriner Milzzellen.

Die Zellen werden in 2 ml Färbepuffer gewaschen (Zentrifugation für 10 min bei 300  $\times g$ und 4 °C). Anschließend wird ein Fc-Block durchgeführt, indem die Zellen für 15 min bei 4 °C mit 100 µl einer entsprechenden Verdünnung des purifizierten Ratte Anti-Maus CD16/CD32-Antikörpers inkubiert werden. Die Zellen werden dann erneut in 2 ml Färbepuffer gewaschen. Es folgt die Färbung der Oberflächenmarker, indem 30 min bei 4 °C mit 100 µl einer Verdünnung des entsprechenden Antikörpers (*Tabelle* 2.4) in Färbepuffer inkubiert wird. Im Anschluss werden die Zellen 2 × in Färbepuffer gewaschen. Sie werden durch 20 min Inkubation bei 4 °C in 250 µl Fixierungs- und Permeabilisierungslösung für die intrazelluläre Färbung vorbereitet. Nach 2 × Waschen mit BD Perm/Wash<sup>TM</sup> Puffer werden die Zellen mit dem entsprechenden Antikörper (50 µl der einzusetzenden Verdünnung in BD Perm/Wash<sup>TM</sup> Puffer) durch Inkubation bei 4 °C für 30 min intrazellulär gefärbt. Es wird erneut 2 × mit BD Perm/Wash<sup>TM</sup> Puffer gewaschen und das Zellpellet anschließend für die Analyse am FACS in 500 µl Färbepuffer aufgenommen.

#### 2.2.8.3 Färbung von Milzzellen der Ratte

Die Färbung erfolgt nach dem Protokoll für intrazelluläre Färbungen des Anti-Maus/Anti-Ratte Foxp3 Antikörpers Klon FJK-16s der Firma eBioscience. Die Zellen werden zunächst in 2 ml Färbepuffer gewaschen (Zentrifugation für 10 min bei 300  $\times g$  und 4 °C). Es folgt die Färbung der Oberflächenmarker, indem 30 min bei 4 °C mit 100 µl einer Verdünnung des entsprechenden Antikörpers (*Tabelle* 2.5) in Färbepuffer inkubiert wird. Im Anschluss werden die Zellen 2  $\times$  in Färbepuffer gewaschen. Die Zellen werden durch 30 min Inkubation bei 4 °C in 1 ml Fixierungsund Permeabilisierungslösung für die intrazelluläre Färbung vorbereitet. Nach 2  $\times$  Waschen mit Permeabilisierungspuffer werden die Zellen mit dem entsprechenden Antikörper (100 µl der einzusetzenden Verdünnung in Permeabilisierungspuffer) durch Inkubation bei 4 °C für 30 min intrazellulär gefärbt. Es wird erneut 2  $\times$  mit Permeabilisierungspuffer gewaschen und das Zellpellet anschließend für die Analyse am FACS in 500 µl Färbepuffer aufgenommen.

Antikörper	Verdünnugsfaktor
Ratte Anti-Maus CD16/CD32 Fc-Block	1:50
APC Maus Anti-Ratte CD4 Klon OX-35	1:100
FITC Ratte Anti-Maus/Anti-Ratte Foxp3 Klon FJK-16s	1:100
PE Maus Anti-Ratte CD25 Klon OX-39	1:200
PE Ratte Anti-Maus CD4 Klon RM4-5	1:400

Tabelle 2.5 - Verdünnungsfaktoren der Antikörper zur Färbung von Milzzellen der Ratte.

## 2.2.8.4 Probenanalyse am FACS und Auswertung der Daten

Die Proben werden am FACSCanto II gemessen. Im Dotplot des Forward-Scatters gegen den Side-Scatter wird zunächst ein Gate auf die Lymphozytenpopulation gelegt. Aus dieser Population werden in einem weiteren Dotplot die CD4-positiven Zellen über die entsprechende Fluoreszenzmarkierung gegen den Forward-Scatter dargestellt. Auf die CD4-positive Population wird ein Gate gelegt und 10.000 Events darin aufgenommen. Die Auswertung der Daten erfolgt entsprechend der im jeweiligen Versuch zu analysierenden Zellpopulation mit der Software FACSDiva<sup>TM</sup>.

## Kapitel 3

## Ergebnisse

Der Ergebnisteil gliedert sich in vier Abschnitte. Im ersten Abschnitt wurde im Rahmen des ECVAM-Projektes CCR.IHCP.C432293.X0 "Optimisation of *in vitro* immunotoxicity" mit Mitogenstimulationstests an den Spezies Maus und Ratte ein *in vitro* Testsystem auf seine korrekte Vorhersage immunsuppressiver Substanzeffekte analysiert. Der zweite Teil beschreibt die Etablierung und Optimierung muriner Mishell-Dutton-Kulturen sowie deren Übertragbarkeit auf Milzzellen anderer Spezies und auf periphere mononukleäre Zellen (PBMC). Im dritten Abschnitt wurden die Mishell-Dutton-Kulturen mit murinen Milzzellen dann mit verschiedenen immunsuppressiven und nicht-immunsuppressiven Substanzen auf eine korrekte Vorhersage immunsuppressiver Substanzeigenschaften getestet. Der vierte Abschnitt befasst sich mit der Substanz Urethan, deren Immunsuppressions-Mechanismus näher analysiert wurde. Dazu wurden Plaque Forming Cell Assays (PFCAs) und Mishell-Dutton-Kulturen eingesetzt.

## 3.1 Mitogenstimulationsversuche zur Detektion immunsuppressiver Substanzeffekte *in vitro*

Im folgenden Abschnitt wurde die Methode der Mitogenstimulation von Milzzellen auf ihre korrekte Identifizierung immunsuppressiver Substanzeffekte *in vitro* analysiert. Als Stimulanzien wurden mit LPS ein B-Zell- und Makrophagen-stimulierendes Mitogen und mit ConA ein T-Zell-Aktivator eingesetzt. Endpunkte der Analysen waren die Zellproliferation, gemessen im BrdU-ELISA, sowie die Freisetzung der Zytokine TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$ , ebenfalls bestimmt mit der Methode des ELISA. Um Effekte auf diese Endpunkte in eine unspezifische Zytotoxizität und eine spezifische Immunsuppression differenzieren zu können und so überhaupt eine Klassifizierung der getesteten Substanzen zu ermöglichen, wurden zusätzlich Daten zur Zellviabilität erhoben. Hierfür wurden mit dem Resazurin-Assay und dem Laktat-Dehydrogenase-Assay (LDH-Assay) zwei verschiedene Methoden eingesetzt. Die Versuche wurden zum Vergleich zweier Spezies mit Milzzellen von Ratten und Mäusen durchgeführt und waren Teil des ECVAM-Projektes CCR.IHCP.C432293.X0 "Optimisation of *in vitro* immunotoxicity".

#### 3.1.1 Mitogenstimulationsversuche an Milzzellen der Maus

Als Negativkontrolle der Mitogenstimulationsversuche an murinen Milzellen wurde die Substanz Mannitol verwendet. Da die Mitogenstimulationen über einen Zeitraum von 48 h durchgeführt werden sollten, wurde zunächst nach dieser Inkubationszeit ohne Zusatz eines Mitogens die Viabilität der Zellen im Resazurin- und im LDH-Asssay bestimmt. Mannitol hatte im Konzentrationsbereich von 3  $\mu$ M bis 1000  $\mu$ M keinen reduzierenden Effekt auf die Viabilität der Zellen (*Abbildung* 3.1). Im LDH-Assay betrug sie bei allen Substanzkonzentrationen zwischen 120 % und 130 % der Kontrolle. Im Resazurin-Assay ergaben sich mit Ausnahme der Mannitol-Konzentrationen von 10  $\mu$ M und 1000  $\mu$ M mit 102 % und 101 % Viabilität ebenfalls Werte in diesem Bereich. Ob hier tatsächlich ein viabilitätssteigernder Effekt der Substanz Mannitol vorlag, ist fraglich, es handelte sich möglicherweise nur um eine natürlich vorkommende Schwankung der substanzbehandelten Zellen gegenüber denen der vehikelbehandelten Kontrolle.

Abbildung 3.1 – Viabilität, Proliferation und Zytokinausschüttung Mannitol-behandeltermuriner Milzzellen. Die Milzzellen wurden mit ConA oder LPS und der Substanz Mannitol 48 h inkubiert. Anschließend wurde in Triplikaten die Proliferation mittels BrdU-ELISA und in gepoolten Quadruplikaten die Ausschüttung von  $TNF\alpha$  und  $IFN\gamma$  mittels ELISA gemessen. Es wurde ein prozentualer Index berechnet, indem die Mittelwerte der Proliferationsbestimmung bzw. Werte der gepoolten Zytokinbestimmung in Bezug zur unstimulierten (0 %) und zur stimulierten Kontrolle (100 %) gesetzt wurden. Für den LDH- und den Resazurin-Viabilitätsassay wurden unstimulierte Zellen in Triplikaten unter gleichen Bedingungen wie für die Stimulationen eingesetzt. Zur Berechnung des Index wurden die Mittelwerte zu denen lysierter (0 % Viabilität) und unbehandelter Zellen (100 % Viabilität) in Bezug gesetzt.



Auch in den Stimulationsversuchen mit den Mitogenen ConA und LPS konnte kein durch die Substanz Mannitol induzierter Effekt gemessen werden (*Abbildung* 3.1). Die Proliferation nach ConA Stimulation wies ebenso wie die Ausschüttung der Zytokine TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  Schwankungen um den Idealwert von 100 % auf. Ein konzentrationsabhängiger Effekt der Substanz war jedoch nicht zu erkennen. Ähnlich verhielt es sich mit den LPS-stimulierten Milzzellen, auch hier wurde kein inhibierender Effekt der Substanz Mannitol im Proliferationsassay oder in den Zytokin-ELISAs angezeigt. Die negative Kontrollsubstanz wurde somit entsprechend aller Endpunkte korrekterweise als nicht-immunsuppressiv eingestuft.

Im Folgenden wurde die Sensitivität der Mitogenstimulationen durch den Einsatz verschiedener immunsuppressiver Substanzen überprüft. Urethan hatte im eingesetzten Konzentrationsbereich von 3  $\mu$ M bis 1000  $\mu$ M keine zytotoxischen Effekte auf die Milzzellen (*Tabelle* 3.1). Die Substanz führte lediglich in der LPS-Stimulation beim Endpunkt der Proliferation zu einer Reduzierung der Werte im Vergleich zur vehikelbehandelten Kontrolle, da bei den Substanzkonzentrationen von 10  $\mu$ M bzw. 100  $\mu$ M nur 57 % bzw. 75 % der maximalen Proliferation gemessen wurden. Die Werte für die niedrigste und die höchste eingesetzte Substanzkonzentration (3  $\mu$ M

Urethan Viabilität (%)		ConA Stimulation (%)			LPS	LPS Stimulation (%)		
(µM)	LDH	Resazurin	Proliferati	ion TNF $\alpha$ -	$IFN\gamma$ -	Proliferati	on TNF $\alpha$ -	$IFN\gamma$ -
				Ausschüt-	Ausschüt-		Ausschüt-	Ausschüt-
				tung	$\operatorname{tung}$		tung	$\operatorname{tung}$
3	122,84	124,77	88,85	100,00	110,62	96,86	101,40	102,08
10	125, 91	105, 18	$96,\!57$	96,21	106,57	57,04	93,01	$104,\!87$
30	127,58	130,51	92,71	113,32	$114,\!66$	86,88	$95,\!80$	99,31
100	121,59	$135,\!86$	106,86	$101,\!90$	103,75	$75,\!15$	86,04	92,25
300	128, 13	$114,\!97$	101,97	113,32	$133,\!85$	85,59	$91,\!61$	90,92
1000	128, 13	$134,\!93$	$102,\!53$	$113,\!32$	$107,\!50$	94,27	$101,\!40$	$107,\!55$

Tabelle 3.1 – Viabilität, Proliferation und Zytokinausschüttung Urethan-behandelter muriner Milzzellen. Die Milzzellen wurden 48 h mit ConA oder LPS und der Substanz Urethan inkubiert. Anschließend wurde in Triplikaten die Proliferation mittels BrdU-ELISA und in gepoolten Quadruplikaten die Ausschüttung von TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  mittels ELISA gemessen. Es wurde ein prozentualer Index berechnet, indem die Mittelwerte der Proliferationsbestimmung bzw. Werte der gepoolten Zytokinbestimmung in Bezug zur unstimulierten (0 %) und stimulierten Kontrolle (100 %) gesetzt wurden. Für den LDH- und den Resazurin-Viabilitätsassay wurden unstimulierte Zellen in Triplikaten unter gleichen Bedingungen wie für die Stimulationen eingesetzt. Zur Berechnung des Index wurden die Mittelwerte mit denen lysierter (0 % Viabilität) und unbehandelter Zellen (100 % Viabilität) in Bezug gesetzt. Rote Markierung: unspezifischer inhibitorischer Effekt auf den jeweiligen Endpunkt (durch versuchsspezifische Schwankungen)

bzw. 1000 μM) zeigten mit 97 % bzw. 94 % Proliferation jedoch keine Unterschiede zur Kontrolle. Somit handelte es sich nur um versuchsspezifische Schwankungen, die für diesen Versuch ungewöhnlich hoch waren. Hätte eine konzentrationsabhängige Suppression vorgelegen, so hätten steigende Substanzkonzentrationen zu einer stärkeren Inhibierung der Proliferation führen müssen. Würde die Substanz unabhängig der eingesetzten Konzentration einen suppressiven Effekt auf den jeweils bestimmten Endpunkt haben, so hätten alle Werte dies anzeigen müssen. Die Substanz Urethan konnte folglich mit der eingesetzten Methode nicht als Immunsuppressivum identifiziert werden.

Cyclosporin A zeigte im Resazurin-Assay einen zytotoxischen Effekt auf die murinen Milzzellen. Bei der höchsten eingesetzten Substanzkonzentration von 3  $\mu$ M betrug die Viabilität nur noch 87 % der vehikelbehandelten Kontrolle (*Abbildung* 3.2). Eine beginnende Zytotoxizität war bereits bei 1  $\mu$ M Cyclosporin A erkennbar, da bei dieser Konzentration mit 107 % Viabilität zwar keine absolute Reduktion, aber im Vergleich zu den 124 % Viabilität bei 0,3  $\mu$ M Cyclosporin A doch eine bereits einsetzende Verringerung der Resazurin-Metabolisierung gemessen wurde. Im LDH-Assay zeigte sich kein zytotoxischer Effekt, dort lagen die ermittelten Viabilitäten durch versuchspezifische Schwankungen mit Werten zwischen 90 % und 99 % leicht unter den im Idealfall zu erwartenden 100 %.

Eine Stimulation der Zellen mit ConA unter Zusatz von Cyclosporin A zeigte einen deutlich umgekehrt proportionalen Effekt der Proliferation und der Ausschüttung der Zytokine TNF $\alpha$ und IFN $\gamma$  zur eingesetzten Substanzkonzentration. Wurden bei einer Konzentration von 0,01 µM Cyclosporin A noch 87 % Proliferation, 95 % TNF $\alpha$ - und 88 % IFN $\gamma$ -Ausschüttung gemessen, so waren es bei 3 µM Cyclosporin A nur noch 53 % Proliferation und jeweils 4 % Ausschüttung der beiden Zytokine. Deutlich erkennbare Effekte traten mit 70 % Proliferation, 46 % TNF $\alpha$ - und 72 % IFN $\gamma$ -Ausschüttung ab einer Konzentration von 0,3 µM Cyclosporin A auf. Die bei dieser Abbildung 3.2 - Viabilität, Proliferation und Zytokinausschüttung Cyclosporin A-behandelter muriner Milzzellen. Die Milzzellen wurden 48 h mit ConA oder LPS sowie der Substanz Cyclosporin A inkubiert. Anschließend wurde in Triplikaten die Proliferation mittels BrdU-ELISA und in gepoolten Quadruplikaten die Ausschüttung von  $TNF\alpha$  und  $IFN\gamma$  mittels ELI-SA gemessen. Es wurde ein prozentualer Index berechnet, indem die Mittelwerte der Proliferationsbestimmung bzw. Werte der gepoolten Zytokinbestimmung in Bezug zur unstimulierten bzw. stimulierten Kontrolle (0 % bzw. 100 %) gesetzt wurden. Für den LDH- und Resazurin-Viabilitätassay wurden unstimulierte Zellen in Triplikaten unter gleichen Bedingungen wie für die Stimulationen eingesetzt. Zur Berechnung des Index wurden die Mittelwerte mit denen lysierter (0 % Viabilität) und unbehandelter Zellen (100 % Viabilität) in Bezug gesetzt.



Konzentration gemessen Effekte waren unabhängig von einer Reduktion der Zellviabilität, die bei 99 % im LDH-Assay bzw. 124 % im Resazurin-Assay lag.

In der LPS-Stimulation zeigte Cyclosporin A in den eingesetzten Substanzkonzentrationen keine Inhibierung der Zytokinausschüttung, die Proliferation war jedoch deutlich auch bei niedrigen Substanzkonzentrationen herabgesetzt (51 % Proliferation bei 0,01 µM Cyclosporin A). Die Substanz Cyclosporin A wurde somit sowohl durch die ConA- als auch die LPS-Stimulation korrekt als Immunsuppressivum identifiziert.

Als nächstes wurden die Substanzen Cyclophosphamid, Dexamethason, Methotrexat und Rapamycin getestet (*Tabelle* 3.2). Cyclophoshamid zeigte keine Zytotoxizität in den eingesetzten Substanzkonzentrationen von 3  $\mu$ M bis 1000  $\mu$ M. Sowohl bei einer Stimulation der Milzzellen mit ConA als auch mit LPS konnte kein Effekt von Cyclophosphamid auf die Proliferation gemessen werden, die Ausschüttung der Zytokine TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  hingegen war bei allen eingesetzten Substanzkonzentrationen deutlich inhibiert.

Dexamethason war in den Konzentrationsbereichen von 0,1  $\mu$ M bis 30  $\mu$ M nicht zytotoxisch. In beiden Stimulationsversuchen hatte Dexamethason starke Auswirkungen auf die Proliferation der Zellen und die Ausschüttung der Zytokine TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$ . Insbesondere die Freisetzung von IFN $\gamma$  wurde vollständig gehemmt und war sowohl bei ConA- als auch LPS-stimulierten murinen Milzzellen schon bei einer Konzentration von 0,1  $\mu$ M Dexamethason nicht mehr messbar.

Methotrexat wurde in Konzentrationsbereichen von 3  $\mu$ M bis 1000  $\mu$ M eingesetzt. Ab einer Konzentration von 300  $\mu$ M wurde im LDH-Assay ein zytotoxischer Effekt gemessen, bei einer Konzentration von 1000  $\mu$ M zeigte auch der Resazurin-Assay eine Zytotoxizität an. Für alle gemessenen Endpunkte der ConA-Stimulation wurde eine Reduktion bei 1000  $\mu$ M Methotrexat gegenüber der Kontrolle bestimmt, also in Folge der starken Zytotoxizität der Substanz bei

	ConA Stimulation			LPS Stimulation		
Immunsuppressiva	Proliferation	Zytokinausschüttung		Proliferation	Zytokinausschüttung	
	$\operatorname{BrdU}$	$TNF\alpha$ IFN $\gamma$		$\operatorname{BrdU}$	$\text{TNF}\alpha$	$\mathrm{IFN}\gamma$
	Einbau			Einbau		
Cyclophosphamid	-	+	+	-	+	+
Dexamethason	+	+	+	+	+	+
Methotrexat	-	-	-	-	-	+
Rapamycin	-	+	+	+	+	+

**Tabelle 3.2** – **Proliferation und Zytokinausschüttung muriner Milzzellen.** Eingesetzt wurden die Substanzen Cyclophosphamid, Dexamethason, Methotrexat und Rapamycin. Die Milzzellen wurden 48 h mit ConA oder LPS und der jeweils angegebenen Substanz inkubiert. Anschließend wurde in Triplikaten die Proliferation mittels BrdU-ELISA und in gepoolten Quadruplikaten die Ausschüttung von TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  mittels ELISA gemessen. Die Ergebnisse wurden mit einem "+" bewertet, wenn eine Inhibierung des jeweils bestimmten Parameters im Vergleich zur stimulierten Kontrolle gemessen wurde und diese nicht mit der zuvor bestimmten Zellviabilität (Resazurin- und LDH-Assay) korrelierte. Wurde der entsprechende Parameter nicht supprimiert oder korrelierte die Suppression mit einem Viabilitätsverlust, so wurden die Ergebnisse mit einem "-" bewertet.

dieser Konzentration. Lediglich in der LPS-Stimulation konnte anhand der IFN $\gamma$ -Ausschüttung ein für die Immunsuppression spezifischer und damit von der Zytotoxizität unabhängiger Effekt gemessen werden.

Die Substanz Rapamycin zeigte nur bei der höchsten eingesetzten Substanzkonzentration von 30 µM eine Reduktion der Zellviabilität. Die Zellproliferation nach Stimulation mit ConA korrelierte damit, die Zytokinausschüttung hingegen war unabhängig von einer Zytotoxizität der Substanz eingeschränkt. In der LPS-Stimulation zeigten alle drei Endpunkte eine Immunsuppressivität des Rapamycins an.

Die Substanzen Cyclophosphamid, Dexamethason und Rapamycin wurden somit sowohl in der Stimulation mit ConA als auch in der Stimulation mit LPS korrekt als immunsuppressiv indentifiziert. Methotrexat hingegen wurde in der ConA-Stimulation nicht korrekt als immunsuppressiv eingestuft, in der LPS-Stimulation konnte bei einem Endpunkt und einer Substanzkonzentration auf eine Immunsuppressivität der Substanz geschlossen werden.

Die Substanz Benzo(a)pyren wurde im Konzentrationsbereich von 3 µM bis 1000 µM appliziert (*Abbildung* 3.3). Je nach eingesetztem Viabilitätsassay wurden stark abweichende Ergebnisse für die Zytotoxiziztät der Substanz bestimmt. Während im LDH-Assay nur bei der höchsten Konzentration von 1000 µM eine Reduktion der Viabilität auf 37 % im Vergleich zur vehikelbehandelten Kontrolle gemessen wurde, so zeigte sich im Resazurin-Assay bereits bei der niedrigsten Substanzkonzentration von 3 µM eine Zytotoxizität mit 72 % Viabilität. Mit steigender Konzentration nahm diese weiter zu, bei 1000 µM Benzo(a)pyren betrug die Viabilität nur noch 24 %. Bei einer Stimulation der Milzzellen mit ConA blieb die TNF $\alpha$ -Ausschüttung der Zellen unbeeinflusst von einer Zugabe des Benzo(a)pyrens. Die Proliferation war nur bei einer Konzentration von 1000 µM Benzo(a)pyren deutlich auf 52 % im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Da diese Substanzkonzentration in beiden Viabilitätsassays eine Reduktion der Zellviabilität bewirkte, ließ dies auf einen durch Zytotoxizität bedingten Effekt schließen. Die IFN $\gamma$ -Ausschüttung hingegen zeigte sich bereits bei 100 µM Benzo(a)pyren eingeschränkt mit 57 % im Vergleich zur Kontrolle. Hier ist die Interpretation des Ergebnisses in einen unspezifischen zytotoxischen oder spezifischen immunsuppressiven Effekt abhängig vom betrachteten



Abbildung 3.3 – Viabilität, Proliferation und Zytokinausschüttung Benzo(a)pyrenbehandelter muriner Milzzellen nach ConA-Stimulation. Die Viabilität wurde in einem Parallelansatz durch Konvertierung von Resazurin zu Resorufin und Freisetzung von LDH an unstimulierten Zellen bestimmt. Prozentuale Viabilitäten wurden in Bezug zur lysierten (0 % Viabilität) und unbehandelten Kontrolle (100 % Viabilität) berechnet. Die Proliferation der Benzo(a)pyren-behandelten Zellen unter ConA-Stimulation wurde durch BrdU-ELISA in Triplikaten bestimmt, sowie die Ausschüttung von TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  mittels ELISA an gepoolten Quadruplikaten gemessen. Es wurde ein prozentualer Index berechnet, indem die Mittelwerte der Proliferationsbestimmung bzw. Werte der gepoolten Zytokinbestimmung in Bezug zur unstimulierten (0 %) und zur stimulierten Kontrolle (100 %) gesetzt wurden.

Viabilitätsassay. Wurde der LDH-Assay zur Analyse verwendet, konnte auf einen immunsuppressiven Effekt der Substanz geschlossen werden, da die Viabilität bei 100 µM Benzo(a)pyren mit 114 % im Vergleich zur IFN $\gamma$ -Ausschüttung nicht reduziert war. Betrachtete man hingegen den Resazurin-Viabilitätsassay, so handelte es sich um einen unspezifischen Effekt, da Viabilität (44 %) und IFN $\gamma$ -Ausschüttung (57 %) korrelierten.

	LPS Stimulation					
Immunsuppressiva	Proliferation	Zytokinausschüttung				
	BrdU	$\text{TNF}\alpha$	$\mathrm{IFN}\gamma$			
	Einbau					
Benzo(a)pyren	-	-	-			

Tabelle 3.3 – Proliferation und Zytokinausschüttung Benzo(a)pyren-behandelter muriner Milzzellen nach LPS-Stimulation. Die Milzzellen wurden 48 h mit LPS und Benzo(a)pyren inkubiert. Anschließend wurde in Triplikaten die Proliferation mittels BrdU-ELISA und in gepoolten Quadruplikaten die Ausschüttung von TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  mittels ELISA gemessen. Die Ergebnisse wurden mit einem "+" bewertet, wenn eine Inhibierung des jeweils bestimmten Parameters im Vergleich zur stimulierten Kontrolle gemessen wurde und diese nicht mit der zuvor bestimmten Zellviabilität (Resazurinkonversion) korrelierte. Wurde der entprechende Parameter nicht supprimiert oder korrelierte die Suppression mit einem Viabilitätsverlust, so wurden die Ergebnisse mit einem "-" bewertet.

Bei der Stimulation mit LPS hingegen (*Tabelle* 3.3) wurde nur bei 1000  $\mu$ M Benzo(a)pyren eine Reduktion der IFN $\gamma$ -Ausschüttung gemessen. Da mit beiden Viabilitätsassays bei dieser Konzentration ein zytotoxischer Effekt bestimmt wurde, war diese Suppression als unspezifisch einzustufen.

Wurden die Ergebnisse der Mitogenstimulationsversuche auf der Grundlage der Viabilitätsdaten des Resazurin-Assays interpretiert, so konnte die Substanz Benzo(a)pyren anhand der gemessenen Endpunkte nicht korrekt als immunsuppressiv identifiziert werden.
Die Reproduktion der Versuchsergebnisse aus den Mitogenstimulationen erwies sich als generell schwierig, da von Versuch zu Versuch starke Variabilitäten auftraten. Zudem wurden häufig, insbesondere bei den LPS-Stimulationen, keine ausreichenden Stimulationsindices von mindestens 2 erreicht. Somit konnten einige Versuche nicht ausgewertet werden.

## 3.1.2 Mitogenstimulationsversuche an Milzzellen der Ratte

Für die Mitogenstimulationen an Milzzellen der Ratte wurden dieselben Substanzen verwendet wie für die Versuche mit murinen Milzzellen. Als Negativkontrolle diente somit wiederum Mannitol.

Mannitol	Viabi	lität (%)	ConA	Stimulat	ion (%)	$\mathbf{LPS}$	Stimulatio	on (%)
(µM)	LDH	Resazurin	Proliferati	ion TNF $\alpha$ -	$\mathrm{IFN}\gamma$ -	Proliferati	ion TNF $\alpha$ -	$\mathrm{IFN}\gamma$ -
				Ausschüt-	Ausschüt-		Ausschüt-	Ausschüt-
				$\operatorname{tung}$	$\operatorname{tung}$		$\operatorname{tung}$	$\operatorname{tung}$
3	116, 19	$96,\!42$	108,74	102,35	92,34	$95,\!44$	117,89	$139,\!49$
10	$116,\!87$	109,10	106, 47	90,19	95,59	103, 31	$93,\!29$	185,09
30	124,97	103,75	110,39	100, 17	99,44	104,78	100,00	$67,\!96$
100	117,95	105,77	111,29	$100,\!67$	92,71	111,29	102,24	$102,\!65$
300	128,07	87,76	114,75	$91,\!68$	$90,\!68$	103, 31	105,59	63,92
1000	131,85	102,21	$122,\!61$	91,84	106, 47	$98,\!48$	$124,\!60$	100,00

Urethan	Viabi	lität (%)	ConA	Stimulat	ion (%)	LPS	Stimulatio	on (%)
(µM)	LDH	Resazurin	Proliferati	ion TNFα- Ausschüt- tung	$\begin{array}{c} \text{IFN}\gamma\text{-}\\ \text{Ausschüt-}\\ \text{tung} \end{array}$	Proliferati	on TNFα- Ausschüt- tung	$\begin{array}{c} \text{IFN}\gamma\text{-}\\ \text{Ausschüt-}\\ \text{tung} \end{array}$
3	110,39	98,63	102,39	102,35	94,73	97,99	96,52	$195,\!47$
10	114, 31	$102,\!66$	$103,\!62$	95,16	83,90	101,36	94, 19	$114,\!54$
30	116,06	111,10	107,27	105,71	93,37	113,25	101, 16	169,49
100	110,26	113,72	100,89	89,36	95,12	93,21	101, 16	143,41
300	115,79	117, 19	99,21	$95,\!66$	66,78	114,88	94, 19	94,70
1000	$122,\!40$	107,53	$104,\!74$	96,66	$94,\!54$	82,14	119,76	$93,\!37$

Tabelle 3.4 – Viabilität, Proliferation und Zytokinausschüttung Mannitol- und Urethanbehandelter Rattenmilzzellen. Die Milzzellen wurden 48 h mit ConA oder LPS sowie der jeweils angegebenen Substanz inkubiert. Anschließend wurde in Triplikaten die Proliferation mittels BrdU-ELISA und in gepoolten Quadruplikaten die Ausschüttung von TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  mittels ELISA gemessen. Es wurde ein prozentualer Index berechnet, indem die Mittelwerte der Proliferationsbestimmung bzw. Werte der gepoolten Zytokinbestimmung in Bezug zur unstimulierten (0 %) und zur stimulierten Kontrolle (100 %) gesetzt wurden. Für den LDH- und den Resazurin-Viabilitätsassay wurden unstimulierte Zellen in Triplikaten unter gleichen Bedingungen wie für die Stimulationen eingesetzt. Zur Berechnung des Index wurden die Mittelwerte mit denen lysierter (0 % Viabilität) und unbehandelter Zellen (100 % Viabilität) in Bezug gesetzt.

Die Substanz zeigte auch an Rattenmilzzellen weder eine Zytotoxizität noch einen Effekt auf die Proliferation und die Zytokinausschüttung von TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  nach Stimulation mit ConA oder LPS (*Tabelle 3.4*). Sie wurde somit korrekt als nicht-immunsuppressiv eingestuft.

Die immunsuppressive Substanz Urethan (*Tabelle* 3.4) hatte im Konzentrationsbereich von 3  $\mu$ M bis 1000  $\mu$ M keinen Einfluss auf die Zellviabilität. Die Messungen der Proliferation und der Zytokinausschüttung von TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  nach einer 48-stündigen Stimulation der Milzzellen mit ConA oder LPS zeigte keine Inhibierung durch die eingesetzten Urethankonzentrationen

an. Urethan wurde somit nicht als immunsuppressive Substanz erkannt und entsprechend nicht korrekt klassifiziert.

Abbildung 3.4 - Viabilität, Proliferation und Zytokinausschüttung Benzo(a) pyren-behandelterRattenmilzzellen. Die Milzzellen wurden 48 h mit ConA oder LPS sowie der Substanz Benzo(a)pyreninkubiert. Anschließend wurde in Triplikaten die Proliferation mittels BrdU-ELISA und in gepoolten Quadruplikaten die Ausschüttung von  $TNF\alpha$  und  $IFN\gamma$ mittels ELISA gemessen. Es wurde ein prozentualer Index berechnet, indem die Mittelwerte der Proliferationsbestimmung bzw. Werte der gepoolten Zytokinbestimmung in Bezug zur unstimulierten (0 %) und zur stimulierten Kontrolle (100 %) gesetzt wurden. Für den LDH- und den Resazurin-Viabilitätsassay wurden unstimulierte Zellen in Triplikaten unter gleichen Bedingungen wie für die Stimulationen eingesetzt. Zur Berechnung des Index wurden die Mittelwerte mit denen lysierter (0 % Viabilität) und unbehandelter Zellen (100 % Viabilität) in Bezug gesetzt.



Mit Benzo(a)pyren wurde eine weitere immunsuppressive Substanz getestet (Abbildung 3.4), und zwar im Konzentrationsbereich von 3 µM bis 1000 µM. Mit beiden Viabilitätsassays wurde eine Reduktion der Viabilität ab einer Substanzkonzentration von 300 µM gemessen. Bei einer Stimulation der Milzzellen mit ConA zeigte Benzo(a)pyren keine Inhibierung der Proliferation, die TNF $\alpha$ -Ausschüttung der Zellen war jedoch bei einer Konzentration von 1000  $\mu$ M Benzo(a)pyren auf 85 % der vehikelbehandelten Kontrolle supprimiert. Die IFN $\gamma$ -Ausschüttung betrug bei einer Konzentration von 300  $\mu$ M Benzo(a)pyren 89 % und bei 1000  $\mu$ M 56 % der vehikelbehandelten Kontrolle. In der graphischen Darstellung (Abbildung 3.4) zeigt sich deutlich die Korrelation der Zytokin-Ausschüttung mit der Viabilität. Ein spezifischer, immunsuppressiver Effekt konnte somit nicht nachgewiesen werden. In der LPS-Stimulation wurde kein Effekt der Substanz Benzo(a)pyren auf die Proliferation oder die TNF $\alpha$ -Ausschüttung bestimmt, die IFN $\gamma$ -Ausschüttung war jedoch insbesondere bei hohen Benzo(a)pyren-Konzentrationen im Vergleich zur vehikelbehandelten Kontrolle stark inhibiert (19 % bei 300  $\mu$ M und 27 % 1000  $\mu$ M Benzo(a)pyren). Im Resazurin-Assay lag bei diesen Konzentrationen die Viabilität bei 88 % bzw. 68 %, sodass die gemessene starke Suppression der IFN $\gamma$ -Ausschüttung nicht allein durch Zytotoxizität begründet werden konnte. In der LPS-Stimulation konnte die Substanz Benzo(a)pyren somit anhand eines Endpunktes korrekt als immunsuppressiv eingestuft werden.

Die Substanz Cyclophosphamid konnte mit der Methode der Mitogenstimulationsversuche korrekt als immunsuppressiv vorhergesagt werden. Bei einer Stimulation der Rattenmilzzellen mit ConA oder LPS zeigte Cyclophosphamid zwar keinen Einfluss auf die Zellproliferation, die



Abbildung 3.5 - Viabilität, Proliferation und Zytokinausschüttung Cyclophosphamid-behandelter Rattenmilzzellen. Die Milzellen wurden 48 h mit ConA oder LPS sowie Cyclophosphamid inkubiert. Anschließend wurde in Triplikaten die Proliferation mittels BrdU-ELISA und in gepoolten Quadruplikaten die Ausschüttung von  $TNF\alpha$  und  $IFN\gamma$  mittels ELISA gemessen. Es wurde ein prozentualer Index berechnet, indem die Mittelwerte der Proliferationsbestimmung bzw. Werte der gepoolten Zytokinbestimmung in Bezug zur unstimulierten (0 %) und zur stimulierten Kontrolle (100 %) gesetzt wurden. Für den LDH- und den Resazurin-Viabilitätsassay wurden unstimulierte Zellen in Triplikaten eingesetzt. Zur Berechnung des Index wurden die Mittelwerte mit denen lysierter und unbehandelter Zellen (entsprechend 0 % und 100 % Viabilität) in Bezug gesetzt.

Ausschüttung der Zytokine TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  war jedoch stark supprimiert (*Abbildung* 3.5). In der ConA-Stimulation wurde ein konzentrationsunabhängiger Effekt des Cyclophosphamids gemessen. Die TNF $\alpha$ -Ausschüttung lag bei allen eingesetzten Konzentrationen zwischen 66 % und 81 % der vehikelbehandelten Kontrolle, die IFN $\gamma$ -Freisetzung zwischen 43 % und 56 %. In der LPS-Stimulation wurde eine Inhibierung der Zytokinausschüttung umgekehrt proportional zur Substanzkonzentration gemessen, denn höhere Cyclophosphamid-Konzentrationen bewirkten eine weniger starke Supprimierung. Konnte bei einer Konzentration von 3 µM Cyclophosphamid keine TNF $\alpha$ - und auch keine IFN $\gamma$ -Ausschüttung gemessen werden, so betrug diese bei 1000 µM Cyclophosphamid 74 % (TNF $\alpha$ ) bzw. 101 % (IFN $\gamma$ ) der vehikelbehandelten Kontrolle. Da die Zellen im LDH-Assay keine Reduktion der Viabilität durch Cyclophosphamid und im Resazurin-Assay nur einen leichten Viabilitätsverlust auf 77 % bei 1000 µM Cyclophosphamid aufwiesen, handelte es sich bei der inhibierten Zytokinausschüttung beider Mitogenstimulationen definitionsgemäß um spezifische immunsuppressive Effekte.

Für die Substanz Cyclosporin A wurden differierende Viabilitäten je nach eingesetztem Viabilitätsassay gemessen. In der ConA-Stimulation zeigten sowohl die Zellproliferation als auch die Ausschüttung der Zytokine TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  eine zunehmende Suppression bei steigender Cyclosporin A-Konzentration, die bereits bei nicht-zytotoxischen Konzentrationen einsetzten und somit als spezifisch immunsuppressiv eingestuft wurden (*Tabelle* 3.5). Bei einer Stimulation der Zellen mit LPS war die Ausschüttung von TNF $\alpha$  unbeeinflusst von der jeweils eingesetzten Cyclosporin A-Konzentration, die Endpunkte Proliferation bzw. IFN $\gamma$ -Ausschüttung waren jedoch viabilitätsunabhängig reduziert.

Die Substanz Methotrexat zeigte sich sowohl im LDH- als auch im Resazurin-Assay als zytotoxisch bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 1000  $\mu$ M. In den Mitogenstimulationen

	Con	A Stimulat	tion	LPS	5 Stimulati	ion
Immunsuppressiva	Proliferation	Zytokinau	sschüttung	Proliferation	Zytokinau	sschüttung
	$\operatorname{BrdU}$	$\text{TNF}\alpha$	$\mathrm{IFN}\gamma$	$\operatorname{BrdU}$	$\text{TNF}\alpha$	$\mathrm{IFN}\gamma$
	Einbau			Einbau		
Cyclosporin A	+	+	+	+	-	+
Dexamethason	?	?	?	?	?	?
Methotrexat	+	-	-	-	-	-

**Tabelle 3.5** – **Proliferation und Zytokinausschüttung von Milzzellen der Ratte.** Die Milzzellen wurden 48 h mit ConA oder LPS sowie der jeweils angegebenen Substanz inkubiert. Anschließend wurde in Triplikaten die Proliferation mittels BrdU-ELISA und in gepoolten Quadruplikaten die Ausschüttung von TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  mittels ELISA gemessen. Die Ergebnisse wurden mit einem "+" bewertet, wenn eine Inhibierung des jeweils bestimmten Parameters im Vergleich zur stimulierten Kontrolle gemessen wurde und diese nicht mit der zuvor bestimmten Zellviabilität (Resazurinund LDH-Assay) korrelierte. Wurde der entprechende Parameter nicht supprimiert oder korrelierte die Suppression mit einem Viabilitätsverlust, so wurden die Ergebnisse mit einem "-" bewertet. Bei mit einem "?" markierten Daten konnte aufgrund differierender Ergebnisse der beiden durchgeführten Viabilitätsassays (Resazurin- und LDH-Assay) keine Bewertung vorgenommen werden.

mit ConA und LPS spiegelte sich dieser Effekt in allen gemessenen Endpunkten wieder, da sämtliche Werte bei 1000  $\mu$ M Methotrexat im Vergleich zur vehikelbehandelten Kontrolle deutlich reduziert waren. Spezifische immunsuppressive Effekte konnten in der ConA-Stimulation der Milzzellen über die Messung der Proliferation detektiert werden (*Tabelle* 3.5).



Abbildung 3.6 – Viabilität, Proliferation und Zytokinausschüttung Rapamycinbehandelter Rattenmilzzellen nach ConA-Stimulation. Die Viabilität wurde in einem Parallelansatz durch Konvertierung von Resazurin zu Resorufin und Freisetzung von LDH an unstimulierten Zellen bestimmt. Prozentuale Viabilitäten wurden in Bezug zur lysierten bzw. unbehandelten Kontrolle (0 % bzw. 100 % Viabilität) berechnet. Die Proliferation der Rapamycin-behandelten Zellen unter ConA-Stimulation wurde durch BrdU-ELISA in Triplikaten bestimmt, sowie die Ausschüttung von TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  mittels ELISA an gepoolten Quadruplikaten gemessen. Es wurde ein prozentualer Index berechnet, indem die Mittelwerte der Proliferationsbestimmung bzw. Werte der gepoolten Zytokinbestimmung in Bezug zur unstimulierten (0 %) und zur stimulierten Kontrolle (100 %) gesetzt wurden.

Auch mit der Substanz Dexamethason (*Tabelle* 3.5) wurden, wie bereits für Cyclopsorin A erwähnt, konträre Ergebnisse mit den beiden Viabilitätsassays erzielt. Je nachdem, welcher Assay zur Bewertung der Spezifität der Ergebnisse herangezogen wurde, wurden entweder alle Effekte als immunsuppressiv (LDH-Assay) oder als durch Zytotoxizität induziert (Resazurin-Assay) eingestuft. Diese Problematik ist im Folgenden anhand der Ergebnisse der ConA-Stimulation mit der Substanz Rapamycin dargestellt (*Abbildung* 3.6).

Während im LDH-Assay keine der eingesetzten Substanzkonzentrationen von 0,1 µM bis 30 µM Rapamycin die Viabilität der Zellen reduzierte, waren laut Resazurin-Assay alle Konzentrationen zytotoxisch. Es wurden keine konzentrationsabhängigen Effekte gemessen, sondern eine generelle Reduktion der Viabilität durch das Rapamycin auf 61 % bis 69 % in Relation zur vehikelbehandelten Kontrolle bestimmt. In der ConA-Stimulation zeigte sich die Proliferation unbeeinflusst von einer Zugabe steigender Rapamycin-Konzentrationen zur Zellkultur, während die Ausschüttung des Zytokins TNF $\alpha$  der Rattenmilzzellen auf 67 % bis 80 % und die von IFN $\gamma$  auf 58 % bis 74 % der vehikelbehandelten Kontrolle reduziert wurde. Die Zellproliferation zeigte eine Korrelation mit der Viabilitätskurve des LDH-Assays, während die Zytokinausschüttung mit den im Resazurin-Assay bestimmten Viabilitäten korrelierte. Betrachtete man die Suppression der Zytokinausschüttung im Zusammenhang mit den im LDH-Assay bestimmten Viabilitäten, so bestand kein Zusammenhang und der Effekt wurde als spezifischer, immunsuppressiver Effekt interpretiert. Wurden die Viabilitätsdaten des Resazurin-Assays zur Bewertung hinzugezogen, so korrelierten diese mit der Inhibierung der Ausschüttung von TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$ . Somit handelte es sich dann um einen unspezifischen, durch Zytotoxizität induzierten Effekt.

Rapamycin	Viabi	lität (%)	LPS	LPS Stimulation (%)			
(µM)	LDH	Resazurin	Proliferati	Proliferation $\text{TNF}\alpha$ -			
				Ausschüt-	Ausschüt-		
				$\operatorname{tung}$	$\operatorname{tung}$		
0,1	$105,\!67$	62,18	124,49	102,80	$57,\!56$		
0,3	$121,\!90$	67,84	99,72	96,28	$67,\!30$		
1,0	$118,\!60$	66,21	66,70	89,76	44,50		
$^{3,0}$	$116,\!62$	63,55	64,66	85,10	$45,\!32$		
10,0	$113,\!06$	60,76	75,05	$91,\!62$	$85,\!89$		
$_{30,0}$	$97,\!10$	68,63	$65,\!12$	$129,\!82$	$62,\!43$		

Tabelle 3.6 – Viabilität, Proliferation und Zytokinausschüttung Rapamycin-behandelter Rattenmilzzellen nach LPS-Stimulation. Die Viabilität wurde in einem Parallelansatz durch Konvertierung von Resazurin zu Resorufin und Freisetzung von LDH an unstimulierten Zellen bestimmt. Prozentuale Viabilitäten wurden in Bezug zur lysierten (0 % Viabilität) und unbehandelten Kontrolle (100 % Viabilität) berechnet. Die Proliferation der Rapamycin-behandelten Zellen unter LPS-Stimulation wurde durch BrdU-ELISA in Triplikaten bestimmt, sowie die Ausschüttung von TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  mittels ELISA an gepoolten Quadruplikaten gemessen. Es wurde ein prozentualer Index berechnet, indem die Mittelwerte der Proliferationsbestimmung bzw. Werte der gepoolten Zytokinbestimmung in Bezug zur unstimulierten (0 %) und zur stimulierten Kontrolle (100 %) gesetzt wurden. Rote Markierung: Korrelation zwischen den Viabilitätsdaten aus dem Resazurin-Assay und den Effekten auf die Proliferation sowie die IFN $\gamma$ -Ausschüttung (Kriterium für eine unspezifische Zytotoxizität)

In der LPS-Stimulation der Rattenmilzzellen zeigten sich ähnliche Ergebnisse (*Tabelle* 3.6). Hier war die TNF $\alpha$ -Ausschüttung unbeeinflusst von der jeweils eingesetzten Rapamycin-Konzentration, aber die Zellproliferation ab einer Substanzkonzentration von 1 µM auf 65 % bis 75 % der vehikelbehandelten Kontrolle reduziert. Die Freisetzung von IFN $\gamma$  wurde ebenfalls inhibiert. Unter Betrachtung der Viabilitätsdaten des LDH-Assays waren diese Suppressionen spezifisch, unter Betrachtung der Daten des Resazurin-Assays hingegen unspezifisch und durch Zytotoxizität induziert. Ähnlich wie bei den Versuchen an murinen Milzzellen erwies sich auch für die Spezies Ratte die Reproduzierbarkeit der Versuche aufgrund starker Variabilitäten als problematisch. Ein ausreichend hoher Stimulationsindex mit einem Wert von mindestens 2 konnte insbesondere bei den LPS-Stimulationen nicht immer erzielt werden.

# 3.2 Aufbau und Etablierung von Mishell-Dutton-Kulturen

Der folgende Abschnitt beschreibt die Etablierung und Optimierung von Mishell-Dutton-Kulturen. Der Aufbau dieser Art von Zellkultur wurde, unabhängig von den Ergebnissen der Mitogenstimulationsversuche, für die Entwicklung eines rein *in vitro* durchgeführten Immuntoxizitätstests als extrem wichtig angesehen. Die Mishell-Dutton-Kultur würde im Gegensatz zur Mitogenstimulation die komplexe Analyse der Interaktion verschiedener Zelltypen *in vitro* ermöglichen. Zudem könnte mit der Mishell-Dutton-Kultur als *in vitro* Äquivalent zum Plaque Forming Cell Assay (PCA), dem ersten behördlich anerkannten immunologischen Funktionstest, ein direkter Vergleich *in vitro* und *ex vivo* erhobener Daten durchgeführt werden.

Für den Aufbau des Versuches wurden zunächst murine Milzzellen eingesetzt, weil damit die Mishell-Dutton-Kultur ursprünglich etabliert wurde (Mishell und Dutton 1966). Im weiteren Verlauf wurde dann die Übertragbarkeit auf Milzzellen der Ratte sowie auf periphere mononukleäre Zellen (PBMC) der Maus, der Ratte und des Menschen geprüft.

### 3.2.1 Mishell-Dutton-Kulturen mit murinen Milzzellen

Obwohl die Methode der Mishell-Dutton-Kulturen mit murinen Milzzellen seit 1966 bekannt ist (Mishell und Dutton 1966), war für diese Arbeit ein grundlegend neuer Aufbau des Versuches mit verschiedenen Optimierungen notwendig. Als primärer Endpunkt der Versuchsetablierung und -optimierung wurden die Plaquezahlen betrachtet, die am Ende des Versuches ausgezählt wurden. Es wurde angestrebt, eine hohe Plaquezahl von mindestens 500 Plaques pro Petrischale zu erzielen, um ein ausreichend großes Spektrum für eine Differenzierung supprimierender und zytotoxischer Substanzeffekte zur Verfügung zu stellen, da nur so einer Fehlinterpretation versuchsspezifischer Schwankungen bei einer späteren Analyse von Substanzen vorgebeugt werden kann. Nach dem von Mishell und Dutton (1966) beschriebenen Protokoll konnte dies in unserem Labor nicht erreicht werden.

Faktor	Option
Medium	RPMI I / advanced D-MEM
FCS	Chargentest (4 verschiedene FCS-Chargen)
SRBC	Titration der SRBC $(2 \times 10^6, 5 \times 10^6, 1 \times 10^7 \text{ SRBC/Well})$
Antibiotikum	Penicillin und Streptomycin / Primocin <sup>TM</sup>
Kulturbehältnis	Zellkulturflasche $(10 \text{ ml}) / 24$ -Well-Platte $(1 \text{ ml})$
Kulturbedingungen	auf dem Schüttler / stationär im Brutschrank

**Tabelle 3.7 – Faktoren und Optionen zur Optimierung muriner Mishell-Dutton-Kulturen.** Die aufgelisteten Faktoren wurden wie in der Spalte Option beschrieben variiert, um die optimalen Bedingungen für Mishell-Dutton-Kulturen mit murinen Milzzellen herauszufinden. Als Endpunkt diente die jeweils ermittelte Plaquezahl. Standard war, wenn nicht gerade dieser Faktoren variiert wurde, der Einsatz von  $1 \times 10^7$  Zellen pro Well einer 24-Well-Platte.

Um optimale Bedingungen für die Mishell-Dutton-Kulturen zu finden, wurden verschiedene Faktoren der Kultur variiert und ausgetestet (Tabelle 3.7). Mit RPMI I und advanced D-MEM wurden zwei verschiedene Medien eingesetzt, wobei das Letztere entsprechend seiner Verwendung als serumreduzierendes Medium mit nur 5 % FCS im Vergleich zu 10 % FCS im RPMI-Medium verwendet wurde. Des Weiteren wurden vier verschiedene FCS-Chargen getestet und die Konzentration der einzusetzenden Schafserythrozyten (SRBC) neu titriert. Es wurde analysiert, ob höhere Plaquezahlen durch das Ansetzen der Kultur in 10 ml Volumen in Zellkulturflaschen im Vergleich zu Kulturen in 1 ml Volumen in den Näpfen von 24-Well-Platten erzielt werden konnten. Zudem wurde ermittelt, ob entsprechend einiger Veröffentlichungen (Cosenza et al. 1971, Mishell und Dutton 1966) ein leichtes Bewegen der Kultur auf dem Schüttler zu einer stärkeren Induktion der humoralen Immunreaktion gegenüber stationärer Kulturen führt. Als optimal erwies sich eine Kultur in 1 ml Volumen auf 24-Well-Platten mit  $5 \times 10^6$  SRBC/Well, die nicht bewegt wurde. Im Chargentest der fötalen Kälberseren zeigte sich, dass besonderer Wert auf die Auswahl einer für den Versuch geeigneten FCS-Charge gelegt werden musste. Die getesteten Seren variierten stark, sowohl im Hintergrund (nicht-SRBC-stimulierte Zellen), als auch in den höchsten erzielten Plaquezahlen (SRBC-stimulierte Zellen). Es konnte eine Charge ermittelt werden, mit der hohe Plaquezahlen in der Stimulation und ein niedriger Hintergrund unstimulierter Zellen erreicht wurden. Zudem wurde während der Austestung verschiedener FCS-Chargen das zuvor eingesetzte Antibiotikum (Penicillin/Streptomycin) durch Primocin<sup>™</sup> (InVivoGen), einem Antibiotikum speziell für Primärzellkulturen, ersetzt.



Abbildung 3.7 – Plaquezahlen nach verschiedenen Inkubationszeiten.Es wurden Parallelansätze von Mishell-Dutton-Kulturen murinerMilzzellen angefertigt (Tag 0). Nach der jeweils  ${\it Inkubations zeit}$ angegebenen wurden die Zellen aufgearbeitet und ausplattiert. Jede Kultur bestand aus einer Dreifachbestimmung unstimulierter und SRBC-stimulierter Zellen, die jeweils inDoppelbestimmungen ausplattiert wurden. Es wurden die Mittelwerte der Plaquezahlen und die Standardabweichungen berechnet.

Nach der Optimierung der Kulturbedingungen wurden die Plaquezahlen über einen zeitlichen Verlauf bestimmt, um die optimale Inkubationszeit der Mishell-Dutton-Kultur mit murinen Milzzellen zu ermitteln (*Abbildung* 3.7). An Tag 3 der Kultur führte eine Stimulation der Zellen mit SRBC zur Ausbildung von durchschnittlich 74 Plaques pro Platte, an Tag 4 stieg die Zahl auf 759. An Tag 5 wurden durchschnittlich 1182 Plaques gezählt, an Tag 6 war die Zahl mit 40 Plaques bereits stark rückläufig. Der Anteil unspezifischer Plaques, der anhand der jeweiligen unstimulierten Kontrollen bestimmt wurde, betrug an Tag 4 6,9 % und an Tag 5 6,7 % der stimulierten Kontrolle. Damit wurden 5 Tage als die optimale Inkubationszeit von Mishell-Dutton-Kulturen mit murinen Milzzellen festgelegt.

### 3.2.2 Mishell-Dutton-Kulturen mit Milzzellen der Ratte

Nach der erfolgreichen Etablierung und Optimierung von Mishell-Dutton-Kulturen mit murinen Milzzellen wurde versucht, diese Art der Zellkultur auf Milzzellen der Ratte zu übertragen. Die Ratte ist die Standardspezies in der Toxikologie, an der im Regelfall der Plaque Forming Cell Assay (PFCA) *ex vivo* durchgeführt wird.

Wurde die Mishell-Dutton-Kultur mit Rattenmilzzellen des Stammes Wistar nach dem gleichen Protokoll angesetzt, wie die mit murinen Milzzellen, so konnten nur sehr wenige Plaques pro Platte gezählt werden, die zudem nicht für eine Stimulation mit SRBC spezifisch waren. Aus diesem Grund wurden zunächst verschiedene Faktoren der Kultur variiert, um eine Steigerung der Plaquezahl zu erzielen (*Tabelle 3.8*).

Faktor	Option
Medium	RPMI II (5 % FCS) / advanced D-MEM (5 % FCS) /
	McCoy's (2,5 % FCS) / IMDM (ohne FCS)
Zellzahl/SRBC	$2,5 \times 10^6$ - $2 \times 10^7$ Zellen gegen $1 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$ SRBC
zugesetzte Zellen	Peritoneale Makrophagen
Kulturzusätze	PWM (SRBC-ELISA/IgM-ELISA) / ConA / IL-2 und IL-4
	(allein/in Kombination) / IL-2, IL-6, IL-10 in Kombination /
	24 h- und 48 h-Con A-Überstände (1 % - 20 %)
Vorbehandlung	Neuraminidase-Verdau / Makrophagendepletion
in vivo Immunisierung	Immunisierung 10 Tage vor Milzentnahme, Zweitstimulation
	mit SRBC in vitro

Tabelle 3.8 – Faktoren und Optionen zur Optimierung von Mishell-Dutton-Kulturen an Milzzellen des Rattenstammes Wistar. Die aufgelisteten Faktoren wurden, wie in der Spalte Option beschrieben, variiert, um die optimalen Bedingungen für Mishell-Dutton-Kulturen mit Milzzellen von Wistarratten herauszufinden. Als Endpunkt diente jeweils die ermittelte Plaquezahl. Standard war, wenn nicht gerade einer dieser Faktoren variiert wurde, der Einsatz von  $1 \times 10^7$  Zellen pro Well einer 24-Well-Platte mit  $5 \times 10^6$  SRBC.

So wurden mit RPMI II (5 % FCS), advanced D-MEM (5 % FCS), McCoy's (2,5 % FCS) und IMDM (ohne FCS) verschiedene Medien ausgetestet, die zudem unterschiedliche FCS-Konzentrationen beinhalteten. Keines der Medien zeigte gegenüber einem anderen verbesserte Bedingungen für die Ausbildung einer humoralen Immunreaktion gegen SRBC, sodass im nächsten Schritt die Zellzahlen und die Zahl der SRBC variiert wurden. Da auch dies nicht zur erwünschten Bildung von Plaques führte, wurden den Kulturen verschiedene Faktoren zugesetzt. Auf zellulärer Ebene beinhaltete dies eine Zugabe peritonealer Makrophagen, um zu garantieren, dass genügend Makrophagen für die Initiierung einer Immunreaktion in der Kultur vorhanden waren. Um sicherzustellen, dass die humorale Immunreaktion nicht aufgrund des Fehlens bestimmter Zytokine und Chemokine nicht ausgelöst wurde, wurden mit Pokeweed Mitogen (PWM) und ConA unspezifische Immunstimulanzien zugesetzt. Bei den PWM-Versuchen wurde parallel zum Ausplattieren der Zellen ein SRBC-ELISA und ein IgM-ELISA mit den Zellkulturüberständen durchgeführt, da so die Methode des Ausplattierens auf eine ausreichende Sensitivität hin überprüft werden konnte. In weiteren Versuchen wurden mit IL-2 und IL-4 (allein und in Kombination) und mit IL-2, IL-6 und IL-10 in Kombination den Kulturen für die Ausbildung einer humoralen Immunreaktion essenzielle Zytokine zugegeben. Andere Versuche beinhalteten den Zusatz von Kulturüberständen 24 h oder 48 h ConA-stimulierter Milzzellen des

Stammes Wistar, die in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt wurden. Durch keinen dieser Zusätze konnte jedoch die Plaquezahl gesteigert werden.

Es erfolgte eine Vorbehandlung der Zellen. Ein Neuraminidase-Verdau vor Ansatz der Mishell-Dutton-Kultur sollte gewährleisten, dass durch die Entfernung bestimmter Oberflächenmoleküle die verschiedenen Zelltypen auch tatsächlich miteinander in den Kontakt treten konnten, was für die Ausbildung einer humoralen Immunreaktion essenziell ist. Eine Depletion der in der Kultur befindlichen Makrophagen wurde durchgeführt, da in Veröffentlichungen eine Inhibierung der Plaquebildung durch adhärente Zellen in der Kultur beschrieben wurde (Corvalan und Howard 1978, Weiss und Fitch 1978). Beides konnte die Plaquezahl jedoch nicht steigern.

Eine weitere Option war die Durchführung der ersten Immunisierung *in vivo*, der nach 10 Tagen die Splenektomie des Tieres und eine zweite Immunisierung *in vitro* folgte. Die Kultur wurde nach dem Protokoll der murinen Mishell-Dutton-Kultur angesetzt (siehe *Kapitel* 2.2.6.1). Ziel war es festzustellen, ob möglicherweise in den vorangegangenen Versuchen die erste Immunisierung *in vitro* nicht stark genug war, um eine humorale Immunantwort gegen die SRBC zu initiieren. Dies war jedoch nicht das Problem, da auch die Zweitantwort *in vitro* nicht ausgelöst werden konnte.

Da in einer Veröffentlichung zum Thema Mishell-Dutton-Kultur an Ratten Milzzellen des Inzuchtstammes Lewis eingesetzt wurden (Weiss und Fitch 1978) und mit Zellen vom Auszuchtstamm Wistar die Kultur bis zu diesem Zeitpunkt nicht etabliert weden konnte, wurden verschiedene Versuche auch mit diesem Stamm durchgeführt (*Tabelle* 3.9).

Faktor	Option
Medium	advanced D-MEM (5 % FCS) / RPMI II (5% FCS)
Makrophagen	Depletion durch Adhäsion
Kulturzusätze	in Verbindung mit Makrophagendepletion: ConA-Überstände
in vivo Immunisierung	(24 n, 1 %, 2 %, 3 %, 5 %) Milzentnahme an Tag 3, anschließend boost <i>in vitro</i>

Tabelle 3.9 – Faktoren und Optionen zur Optimierung von Mishell-Dutton-Kulturen an Milzzellen des Rattenstammes Lewis. Die aufgelisteten Faktoren wurden wie in der Spalte Option beschrieben variiert, um die optimalen Bedingungen für Mishell-Dutton-Kulturen mit Milzzellen von Lewisratten herauszufinden. Als Endpunkt diente jeweils die ermittelte Plaquezahl. Standard war der Einsatz von  $1 \times 10^7$  Zellen pro Well einer 24-Well-Platte mit  $5 \times 10^6$  SRBC.

Dies beinhaltete zunächst den Test der Kulturmedien advanced D-MEM und RPMI II sowie eine Depletion der Makrophagen. Da eine alleinige Depletion der Makrophagen nicht zu einer vermehrten B-Zell-Aktivierung führte, wurden den Kulturen anschließend in unterschiedlichen Konzentrationen Überstände von 24 h ConA-stimulierten Rattenmilzzellen zugesetzt. Aber weder durch den Einsatz eines bestimmten Kulturmediums noch durch den Zusatz der Kulturüberstände konnte die Plaquezahl gesteigert werden.

Da sich aufgrund der vorliegenden Ergebnisse die Frage stellte, ob möglicherweise die Kulturbedingungen für die Zellen generell zu schlecht waren oder nur die Stimulation der Zellen mit SRBC *in vitro* nicht funktionierte, wurde eine *in vivo* Immunisierung mit anschließendem *in vitro* SRBC-boost (an Tag 3) durchgeführt. Auch nach dieser Methode konnten keine Plaques erzielt werden, was für einen generell schlechten Zustand der Zellen in der Kultur sprach. Eine weitere Optimierung wurde daher anhand des Endpunktes der Zellviabilität und nicht der Plaquezahl durchgeführt (*Tabelle* 3.10). Da sich kein Rattenstamm gegenüber dem anderen als besser geeignet darstellte, wurden die folgenden Versuche als Parallelansätze mit Milzzellen beider Tierstämme durchgeführt.

Faktor	Option
Tierstamm Medium	Lewis/Wistar advanced D-MEM (5 % FCS) / RPMI II (5 % FCS) / TB-1 (ohne FCS) / OpTmizer (ohne oder mit 2,5 % FCS), D-MEM/F12 (5 % FCS)
FCS Waschen Inkubation	Chargentest (7 verschiedene FCS) Waschen nach 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h Auswertung an Tag $4/5/6/7$ (Lewis)

Tabelle 3.10 – Faktoren und Optionen zur Optimierung von Mishell-Dutton-Kulturen an Milzzellen der Rattenstämme Lewis und Wistar. Die aufgelisteten Faktoren wurden wie in der Spalte Option beschrieben variiert, um die optimalen Bedingungen für Mishell-Dutton-Kulturen mit Milzzellen von Lewis- und Wistarratten herauszufinden. Als Endpunkt dienten für die Optimierung der Medien und der FCS-Chargen die Zellviabilität (gemessen im Resazurin-Assay), für die verschiedenen Waschzeitpunkte und Inkubationszeiten wurde die Plaquezahl ermittelt. Standardbedingung bei einer reinen Viabilitätsbestimmung war der Einsatz von  $1 \times 10^7$  Zellen pro Well einer 24-Well-Platte mit  $5 \times 10^6$  SRBC. Für die nach dem Waschprotokoll durchgeführten Kulturen wurden 2,  $4 \times 10^8$  Zellen und  $1, 2 \times 10^8$  SRBC in 250 ml Gewebekulturflaschen angesetzt.

In einem Vergleich verschiedener Medien mit 7 verschiedenen FCS-Chargen wurde ein für die Kultur von Rattenmilzzellen besser geeignetes FCS bestimmt und RPMI II als das Medium für zukünftige Versuche festgesetzt. Da die Viabilitätsergebnisse generell zeigten, dass viele Zellen in der Kultur nach kurzer Zeit entweder apoptotisch wurden oder in einen Zustand der Anergie verfielen, wurde ein zusätzliches Waschprotokoll entwickelt. So konnten tote Zellen entfernt und damit sichergestellt werden, dass eine Zytokinausschüttung dieser Zellen nicht die Entwicklung der humoralen Immunreaktion in der Zellkultur blockieren würde.

Die Mishell-Dutton-Kultur wurde mit dem Endpunkt der Plaquezahl unter diesen neuen Bedingungen optimiert. Es wurden mit 6 h, 12 h, 24 h, 48 h und 72 h unterschiedliche Zeitpunkte zum Waschen der Milzzellen ausgetestet. Dabei ergaben sich für die Zellen der Rattenstämme Wistar und Lewis sehr unterschiedliche Ergebnisse. Während für Zellen von Lewisratten ein Waschen und anschließendes Ausplattieren auf 24-Well-Platten nach 24 h optimal war, lag der am besten geeignete Zeitpunkt bei Zellen von Wistarratten bei 6 h. Zudem wurde an Milzzellen von Lewisratten bestimmt, nach wie vielen Tagen Inkubation die Kulturen aufgearbeitet und die Plaques ausgezählt werden sollten. Als optimal erwies sich eine Aufarbeitung der Kulturen an Tag 4.

Die Milzzellen von Lewisratten erwiesen sich für die Mishell-Dutton-Kultur als generell besser geeignet, da Werte von durchschnittlich etwa 150 Plaques pro Platte erzielt wurden. Für die SRBC-stimulierten Zellen von Wistarratten lag der Wert mit durchschnittlich ca. 60 Plaques pro Platte deutlich niedriger.

Da durch die Optimierung der Mishell-Dutton-Kultur an Rattenmilzzellen nun eine humorale Immunreaktion *in vitro* ausgelöst werden konnte, sollte mit Cyclosporin A eine erste Substanz getestet werden. Cyclosporin A ist eine Standardsubstanz für Immuntoxizitätsanalysen, die unter anderem im *in vivo* Äquivalent zur Mishell-Dutton-Kultur, dem PFCA, Anwendung findet. Um eine Vergleichbarkeit beider Methoden herzustellen, wurde die Substanz sowohl im PFCA als auch in der Mishell-Dutton-Kultur analysiert.



Abbildung 3.8 – Ergebnisse eines Plaque Forming Cell Assay (PFCA) mit der Substanz Cyclosporin A. Es handelte sich bei dem Versuch um eine 28 Tage subakute Toxizitätsstudie. Es wurden Ratten des Stammes Thomae Wistar-like mit jeweils 5 Tieren pro Gruppe eingesetz, denen Cyclosporin A bzw. Olivenöl als Vehikel über 28 Tage täglich mit einem Volumen von 5 ml/kg oral verabreicht wurde. 5 Tage vor Aufarbeitung wurden die Tiere i.v. mit  $5 \times 10^7$  SRBC in BSS (Gesamtvolumen 100 µl) immunisiert.

Abbildung 3.8 zeigt die Ergebnisse eines PFCA, durchgeführt im Rahmen einer 28 Tage subakuten Toxizitätsstudie mit Cyclosporin A. Die Standardsubstanz wurde eindeutig als immunsuppressiv klassifiziert. Bei einer Verabreichung von 1 mg/kg Cyclosporin A oral pro Tag war die Zahl der Lymphozyten der Milz von  $3,96 \times 10^8$  auf  $2,81 \times 10^8$  reduziert, bei einer Verabreichung von 25 mg/kg wurden nur noch  $2,28 \times 10^8$  Zellen pro Milz gezählt. Die Zahl der IgMbzw. IgG-Plaques pro  $1 \times 10^6$  Milzzellen nahm von 1348 bzw. 134 auf 1169 bzw. 76 bei einer Dosis von 1 mg/kg und auf 9 bzw. 5 Plaques bei einer Dosis von 25 mg/kg ab.



Abbildung 3.9 – Ergebnisse einer Mishell-Dutton-Kultur mit Rattenmilzzellen und der Substanz Cyclosporin A. Eingesetzt wurden Milzzellen des Stammes Lewis. Die Zellen wurden 24 h in Zellkulturflaschen mit SRBC und der jeweiligen Cyclosporin A-Konzentration bzw. dem Vehikel vorinkubiert, dann an Tag 1 gewaschen und auf 24-Well-Platten ausplattiert. Eine erneute Inkubation mit Cyclosporin A oder eine SRBC-Stimulation erfolgte nicht. Die Auswertung erfolgte an Tag 4.

In Abbildung 3.9 sind die Ergebnisse eines Mishell-Dutton-Tests an Rattenmilzzellen (Stamm Lewis) mit Cyclosporin A dargestellt. Eine Stimulation der Zellen mit SRBC führte zur Induktion einer humoralen Immunreaktion und somit zu einem Anstieg von durchschnittlich 2 auf 158 Plaques pro Platte. Eine Zugabe von Cyclosporin A reduzierte die Plaquezahl konzentrationsabhängig. Bei einer Konzentration von 0,01  $\mu$ M Cyclosporin A wurden durchschnittlich 83 Plaques gezählt, bei 0,03  $\mu$ M Cyclosporin A 62 Plaques und bei einer Konzentration von 0,1  $\mu$ M nur noch 9 Plaques pro Platte. Die Viabilitäten, gemessen im Resazurin-Assay, waren bei den Substanzkonzentrationen von 0,01  $\mu$ M und 0,03  $\mu$ M mit jeweils 121 % in Bezug zur stimulierten Kontrolle nicht herabgesetzt. Bei einer Konzentration von 0,1  $\mu$ M Cyclosporin A hingegen wurde mit einer durchschnittlichen Viabilität von nur noch 15 % eine Zytotoxizität der Substanz gemessen. Dennoch zeigte die Inhibierung der Plaquezahlen bei den Konzentrationen von 0,01  $\mu$ M und 0,03  $\mu$ M cyclosporin A ohne Reduzierung der Viabilität deutlich eine spezifische Immunsuppression an. Die Ergebnisse der Mishell-Dutton-Kultur waren somit äquivalent zu denen des PFCA.

# 3.2.3 FACS-Analyse CD4-positiver T-Zellfraktionen von Milzzellen in Mishell-Dutton-Kulturen

Eine FACS-Analyse verschiedener Subpopulationen der CD4-positiven Fraktion von T-Zellen sollte Aufschluss darüber geben, warum sich die Milzzellen der Rattenstämme Lewis und Wistar in der Mishell-Dutton-Kultur unterschiedlich verhalten. Zudem sollte analysiert werden, weshalb die Stimulation von Milzzellen der Ratte im Vergleich zu murinen Milzzellen nur zur Ausbildung einer schwachen humoralen Immunantwort führte. Mit der Etablierung des Waschprotokolls und dem Einsatz von Lewisratten konnten zwar Werte von etwa 150 Plaques pro Platte erzielt werden, was jedoch bei Werten von ca. 1000 Plaques pro Platte mit murinen Milzzellen immer noch wenig war.

Die Ursache wurde in einer Supprimierung der T-Zellaktivität durch regulatorische T-Zellen  $(T_{reg})$  und/oder  $T_H 17$ -Zellen vermutet. Aus diesem Grund wurden an den nach Standardprotokoll durchgeführten murinen Mishell-Dutton-Kulturen diese beiden Subpopulationen analysiert. Für die Spezies Ratte konnte nur die Fraktion der  $T_{reg}$ s analysiert werden, da es derzeit keinen kommerziell erhältlichen anti-IL-17A-Antikörper gab. Die Zellen der Rattenstämme Wistar und Lewis wurden entsprechend des zuvor entwickelten Waschprotokolls eingesetzt, wobei für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse jeweils nach 24 h gewaschen wurde.

Abbildung 3.10 zeigt die Subpopulationsanalyse CD4-positiver T-Zellen der Milz unmittelbar nach Organentnahme (Tag 0) von Ratten des Stammes Lewis. Zu diesem Zeitpunkt betrug der Anteil CD4/CD25<sup>hoch</sup>-exprimierender Zellen 2,0 % der Gesamtpopulation der CD4-positiven T-Zellen. Von diesen 2,0 % wiederum exprimierten 74,2 % intrazelluläres Foxp3 und waren damit als T<sub>reg</sub>s zu klassifizieren. Der Anteil der T<sub>reg</sub>s an den CD4<sup>+</sup>-Zellen lag bei 1,5 %.

Im weiteren Verlauf des Versuches bis Tag 3 (*Abbildung* 3.11) zeigte sich für die Subpopulation der CD4/CD25<sup>hoch</sup>-exprimierenden Zellen eine Zunahme auf 4,6 % an Tag 1 und 12,2 % an Tag 2. An Tag 3 war diese mit 6,4 % wieder rückläufig. Der Anteil der T<sub>reg</sub>s an der Subpopulation lag an Tag 1 mit 89,9 % über dem Wert von Tag 0, nahm im Verlauf dann aber ab auf 70,9 % an Tag 2 und 74,4 % an Tag 3 (bzw. 73,0 % an Tag 3 in der unstimulierten Probe). Für den Anteil

der T<sub>reg</sub>s an der Gesamtpopulation der CD4-positiven Zellen bedeutete dies eine Zunahme auf 4,1 % an Tag 1 und 8,7 % an Tag 2. Die Werte an Tag 3 entsprachen mit 4,7 % bzw. 4,8 % ungefähr denen von Tag 1. Die am Beispiel von Tag 3 aufgeführten Werte einer unstimulierten und einer stimulierten Kontrolle belegen, dass es zu keinem der gemessenen Zeitpunkte eine durch die Stimulation mit SRBC hervorgerufene Veränderung in einer Subpopulation gab.



Abbildung 3.10 FACS-Milzzellen Analyse vondes Rattenstammes Lewis auf regulatorische T-Zellen unmittelbar nach Entnahme des Organs (Kontrolle, Tag 0). Es wurden zunächst die Lymphozyten im Forwardgegen Sidescatter (FCS gegen SSC) lokalisiert (Gate P1). Aus diesem Gate wurden über die Messung von APC gegen den Forwardscatter die CD4positiven Zellen identifiziert (Gate P2). Nach Aufnahme 10.000 CD4-positiven vonZellen in P2 wurde in der Darstellung APC (CD4) gegen PE (CD25) ein Gate auf die Population der CD4/CD25<sup>hoch</sup>exprimierenden Zellen gelegt (P3). Anhand dieser Population wurden dann in der Darstellung PE gegen FITC CD25<sup>hoch</sup>/Foxp3-(Foxp3)exprimierende Zellen analysiert (Qaudrant 2-1). Die Expression von CD4/CD25<sup>hoch</sup>/Foxp3 ist für  $T_{reg}s$  kennzeichnend.

Ein parallel angesetzter Versuch mit Milzzellen des Stammes Wistar (*Abbildung* 3.12) zeigte deutliche Unterschiede in der Verteilung der CD4-Subpopulationen. Während unmittelbar nach Organentnahme die Werte mit 2,0 % CD4/CD25<sup>hoch</sup>-exprimierender T-Zellen und einem Anteil von 78,2 % zusätzlich Foxp3-exprimierender Zellen (entsprechend einem Anteil von 1,5 % an der Gesamtpopulation der CD4-positiven Zellen) in etwa denen des Stammes Lewis entsprachen, traten während der Mishell-Dutton-Kultur Differenzen auf. Der Anteil der CD4/CD25<sup>hoch</sup>-exprimierenden T-Zellen stieg an Tag 1 auf 10,6 % und an Tag 2 weiter auf 16,9 % an. Erst an Tag 3 war der Anteil mit 14,6 % wieder leicht rückläufig. Der Anteil der Foxp3-exprimierenden Zellen an der Subopulation der CD4/CD25<sup>hoch</sup>-exprimierenden Zellen zeigte an Tag 1 eine leichte Zunahme auf 81,6 % und nahm dann ab auf 69,1 % an Tag 2 und 67,5 % an Tag 3. Betrachtete man den Anteil dieser Fraktion an der gesamten Population CD4-positiver Zellen, so lag dieser an Tag 1 mit 2,0 % unter dem von Lewisratten, für die zu diesem Zeitpunkt ein Wert von 4,1 % bestimmt wurde. An Tag 2 und Tag 3 war der Anteil der T<sub>reg</sub>s des Versuches am Stamm Wistar mit 11,7 % und 9,9 % jedoch im Vergleich zu 8,7 % und 4,8 % der Lewisratten deut-

Abbildung 3.11 FACS-Analyse vonMilzzellen des RattenstammesLewis inMishell-Duttonauf regu-Kulturen latorische T-Zellen. Die Abbildungen zeigen dieContourplots der Analyse unstimulierterSRBC-stimulierter undAufgenommen Zellen. wurden 10.000 CD4positive Zellen. Die Analysen wurdenanTag 1, Tag 2 und Tag 3 nachAnsatzderMishell-Dutton-Kulturen durchgeführt. Verfahren wurde dabei nach dem für Lewisratten optimierten Protokoll miteinemWaschen der Zellen nach 24 h. Angegeben sind die Anteile der darge $stellten CD4/CD25^{hoch}$ exprimierendenZellenan der Population der CD<sub>4</sub>-positiven Zellen(entspricht Gate P6 aus Abbildung 3.10). Für die CD4/CD25<sup>hoch</sup>/Foxp3exprimierenden Zellensind sowohl die Anteile an der Population CD4/CD25<sup>hoch</sup>derexprimierenden Zellenals auch an der derCD<sub>4</sub>-positiven Zellenangegeben.

















Tag 3 - stimuliert





 $\label{eq:CD4+/CD25hoch/Foxp3+ = 89,9 %} CD4+/CD25^{hoch}/Foxp3+ = 89,9 \%$  Anteil an CD4+ = 4,1 %



 $\label{eq:CD4+/CD25hoch/Foxp3+} \begin{array}{l} {\rm CD4^+/CD25^{hoch}/Foxp3^+} = 70.9 \ \% \\ {\rm Anteil \ an \ CD4^+} = 8.7 \ \% \end{array}$ 



 $CD4^+/CD25^{hoch}/Foxp3^+ = 73,0 \%$ Anteil an  $CD4^+ = 4,7 \%$ 



$$\label{eq:CD4+/CD25hoch/Foxp3+} \begin{split} \mathrm{CD4^+/CD25^{hoch}/Foxp3^+} &= 74.4~\%\\ \mathrm{Anteil~an~CD4^+} &= 4.8~\% \end{split}$$



 $CD4^{+}/CD25^{hoch} = 2.0 \%$ 





 $\mathrm{CD4^{+}/CD25^{hoch}=10,6~\%}$ 





 $CD4^+/CD25^{hoch} = 16,9 \%$ 





 $\label{eq:CD4+/CD25hoch/Foxp3+ = 78,2 \%} \begin{array}{l} \mbox{CD4+/CD25hoch/Foxp3+ = 78,2 \%} \\ \mbox{Anteil an CD4^+ = 1,5 \%} \end{array}$ 



$$\label{eq:CD4+/CD25hoch/Foxp3+} \begin{split} & \text{CD4+/CD25^{hoch}/Foxp3+} = 81.6~\%\\ & \text{Anteil an CD4+} = 2.0~\% \end{split}$$



 $CD4^+/CD25^{hoch}/Foxp3^+ = 69,1 \%$ Anteil an  $CD4^+ = 11,7 \%$ 



 $CD4^+/CD25^{hoch}/Foxp3^+ = 67,5 \%$ Anteil an  $CD4^+ = 9,9 \%$ 

Abbildung 3.12 FACS-Analyse vonMilzzellen des Rattenstammes Wistar inMishell-Dutton-Kulturen auf regulatorische T-Zellen. Die Messungen wurden an Tag 0, Tag 1, Tag 2 und Tag 3 nach Ansatz der Mishell-Dutton-Kulturen durchgeführt. Verfahren wurde dabei nach dem für Lewisratten optimierten Protokoll mit einem Waschen der Zellen nach 24 h. Die Abbildungen zeigen Contour plotsdiederAnalyse unstimulierter undSRBC-stimulierter Zellen. Lediglich dieProben an Tag 0 waren generell unstimuliert, da sie unmittelbar nach derOrganentnahme wurden. angefertigt Aufgenommen wurden jeweils 10.000 CD4-positive Zellen. Angegeben sind die Anteile der darge-CD4/CD25<sup>hoch</sup> stellten- exprimierenden Zellen an der Population der CD4-positiven Zellen (entspricht Gate P3 aus Abbildung 3.10). Für die CD4/CD25<sup>hoch</sup>/Foxp3exprimierendenZellensind sowohl die Anteile $an \quad der$ Population derCD4/CD25<sup>hoch</sup>exprimierenden Zellenals auch an der der CD4-positiven Zellen angegeben.

lich erhöht. Mit Zellen des Stammes Wistar konnte, wie zuvor mit denen des Stammes Lewis, zu keinem der gemessenen Zeitpunkte ein Unterschied zwischen unstimulierter und stimulierter Probe bestimmt werden.



Abbildung 3.13 – FACS-Analyse von murinen Milzzellen in Mishell-Dutton-Kulturen auf  $T_H$ 17-Zellen. Die Messungen wurden an Tag 0 sowie an Tag 1, Tag 2 und Tag 3 nach Ansatz der Mishell-Dutton-Kulturen durchgeführt (angefertigt nach dem Standardprotokoll für murine Milzzellen). Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte der Analyse einer Dreifachbestimmung unstimulierter und SRBC-stimulierter Zellen. Lediglich die Proben an Tag 0 waren generell unstimuliert und nicht dreifachbestimmt, da sie unmittelbar nach der Organentnahme angefertigt wurden. Aufgenommen wurden jeweils 10.000 CD4-positive Zellen. Angegeben sind die Anteile der CD4/IL-17A-exprimierenden Zellen an der Population der CD4-positiven Zellen. Eine Expression von CD4 und IL-17A ist kennzeichnend für T<sub>H</sub>17-Zellen.

Die murinen Mishell-Dutton-Kulturen wurden zunächst auf die Subpopulation der CD4- und IL-17A-exprimierenden T<sub>H</sub>17-Zellen analysiert (*Abbildung* 3.13). Es zeigte sich in der Mishell-Dutton-Kultur an Tag 1 im Vergleich zu den frisch isolierten Milzzellen an Tag 0 ein deutlicher Rückgang der IL-17A-Expression von 2,15 % der CD4-positiven Zellen auf durchschnittlich 0,30 % in den unstimulierten und 0,43 % in den stimulierten Proben. Der Anteil der T<sub>H</sub>17-Zellen an der CD4<sup>+</sup>-Gesamtpopulation nahm ab Tag 2 wieder zu auf 0,77 % (unstimuliert) bzw. 0,67 % (stimuliert) und betrug an Tag 3 1,17 % bzw. 1,77 %.

Die Analyse der CD4/CD25<sup>hoch</sup>-exprimierenden Subpopulation der CD4-positiven Zellen ergab an Tag 3 der Mishell-Dutton-Kultur deutliche Unterschiede zwischen Proben von unstimulierten und stimulierten Zellen (*Abbildung* 3.14). Während 6,6 % der CD4-positiven Zellen in der unstimulierten Probe auch CD25 als Oberflächenmarker exprimierten, so waren es in der stimulierten Probe 12,1 %. Der Anteil Foxp3-exprimierender Zellen an der CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>hoch-</sup>Population war mit 66,5 % im Vergleich zu 59,4 % in der stimulierten Probe ebenfalls leicht erhöht. Für den Anteil der T<sub>reg</sub>s an der CD4<sup>+</sup>-Gesamtpopulation ergab sich jedoch mit 3,9 % der unstimulierten und 3,8 % der stimulierten Zellen keine Unterschiede. Auffallend sind diese beiden Werte muriner Mishell-Dutton-Kulturen insbesondere im Vergleich mit denen der beiden Rattenstämme Wistar und Lewis. Während an Tag 3 in einem für Milzzellen des Stammes Lewis optimierten Protokoll der Anteil der T<sub>reg</sub>s mit 4,8 % bzw. 4,7 % leicht über dem der murinen Kultur lag, war er in der Kultur mit Zellen des Stammes Wistar mit 9,9 % deutlich erhöht.



Abbildung 3.14 – FACS-Analyse von murinen Milzzellen in Mishell-Dutton-Kulturen auf regulatorische T-Zellen. Die Abbildungen zeigen die Contourplots der Analyse einer repräsentativen Probe aus einer insgesamt durchgeführten Dreifachbestimmung unstimulierter und SRBC-stimulierter Zellen. Aufgenommen wurden 10.000 CD4-positive Zellen an Tag 3 nach Ansatz der Mishell-Dutton-Kultur (angefertigt nach dem Standardprotokoll für murine Milzzellen). Angegeben sind die Anteile der dargestellten CD4/CD25<sup>hoch</sup>-exprimierenden Zellen an der Population der CD4-positiven Zellen (entspricht Gate P3 aus Abbildung 3.10, 3.11 und 3.12). Für die CD4/CD25<sup>hoch</sup>/Foxp3-exprimierenden Zellen sind sowohl die Anteile an der Population der CD4/CD25<sup>hoch</sup>-exprimierenden Zellen als auch an der der CD4-positiven Population angegeben.

### 3.2.4 Mishell-Dutton-Kulturen mit peripheren mononukleären Zellen (PBMC)

Die Verwendung peripherer mononukleärer Zellen (PBMC) in Mishell-Dutton-Tests würde die Möglichkeit eröffnen, Immuntoxizitätstests auch studienbegleitend durchzuführen. Aus diesem Grund wurde versucht, die Mishell-Dutton-Kultur mit PBMCs der Maus und der Ratte zu etablieren und zu optimieren. Um die Möglichkeit einer direkten Übertragbarkeit gewonnener Studienergebnisse auf den Menschen zu gewährleisten, wurden zudem Zellen humanen Ursprungs eingesetzt.

### 3.2.4.1 Murines Blut

Die aus murinem Blut isolierten PBMCs wurden zunächst in RPMI II ohne FCS oder Advanced D-MEM mit 5 % FCS angesetzt. Da mit beiden Medien keine signifikanten Plaquezahlen nach Stimulation der Zellen mit SRBCs erzielt werden konnten, wurden weitere Kulturbedingungen variiert (*Tabelle* 3.11). Sowohl die Zellzahl als auch die Zahl der zuzugebenen SRBCs wurde neu austitriert. Eingesetzt wurden  $2, 5 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen und  $1 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  SRBC, eine Erhöhung der Plaquezahl konnte jedoch mit keiner der möglichen Kombinationen erreicht werden. Auch ein wahlweises Ansetzen der Kultur auf 24-Well-Platten oder in Zellkulturröhrchen brachte keine Verbesserung. Da es, ähnlich wie für Rattenmilzzellen, auch für PBMCs humanen Ursprungs Veröffentlichungen gibt, die eine Inhibierung der Plaquebildung durch adhärente Zellen in der Kultur beschreiben (Villa et al. 1985, Luzzati et al. 1976), wurden diese depletiert, bevor eine Stimulation mit SRBC erfolgte. Durch diese Variante konnte allerdings keine Optimierung der Mishell-Dutton-Kultur erzielt werden. Ebenso verhielt es sich, wenn der Kultur

Überstände muriner Mishell-Dutton-Kulturen mit Milzzellen zugesetzt wurden. Diese Variante wurde aufgrund der Annahme angewendet, dass den PBMCs ein Faktor fehlen könnte, der bei einer Kultur mit Milzzellen hingegen in ausreichendem Maße sezerniert wurde. Die Überstände wurden Mishell-Dutton-Kulturen mit Milzzellen an Tag 1 und Tag 5 entnommen und in Konzentrationen von 5 % und 20 % eingesetzt.

Faktor	Option
Medium	RPMI II ohne FCS / Advanced D-MEM mit 5% FCS
Zellzahl/SRBC	Titration 2, 5 $\times$ 10 $^{6}$ - 1 $\times$ 10 $^{7}$ Zellen/Well gegen 1 $\times$ 10 $^{6}$ -
	$1 \times 10^7 \text{ SRBC}$
Kulturbehältnis	mit $2 \times 10^6$ bzw. $2, 5 \times 10^6$ Zellen in Kulturröhrchen / mit
	$5 \times 10^6$ Zellen/Well auf 24-Well-Platten
Vorbehandlung	Verbleib der Makrophagen in Kultur / Depletion der
	Makrophagen
Medienzusätze	5 % und 20 % Überstände von Mishell-Dutton-Kulturen
	muriner Milzzellen, ent nommen nach 5 Tagen / 5 $\%$
	Uberstand entnommen an Tag 1

Tabelle 3.11 – Faktoren und Optionen zur Optimierung muriner Mishell-Dutton-Kulturenmit PBMCs. Die aufgelisteten Faktoren wurden wie in der Spalte Option beschrieben variiert, umdie optimalen Bedingungen für Mishell-Dutton-Kulturen mit murinen PBMCs herauszufinden. AlsEndpunkt diente die jeweils ermittelte Plaquezahl. Soweit nicht anders vermerkt wurden die Kulturenauf 24-Well-Platten angesetzt mit  $5 \times 10^6$  Zellen/Well und  $5 \times 10^6$  SRBC. Die Überstände von Mishell-Dutton-Kulturen mit murinen Milzzellen wurden zum angegebenen Zeitpunkt entnommen und bis zurVerwendung bei -80 °C aufbewahrt.

#### 3.2.4.2 Blut der Ratte

Aus dem Blut der Ratte isolierte PBMCs zeigten ebenfalls extrem niedrige Plaquezahlen, die sich kaum vom Hintergrund der nicht-SRBC-stimulierten Kontrollen abhoben. Zur Optimierung (*Tabelle* 3.12) wurden zunächst verschiedene Medien ausgetestet. Eingesetzt wurden RPMI II mit 5 % FCS oder ohne FCS, IMDM ohne FCS, McCoy's mit 2,5 % FCS und Advanced D-MEM mit 2,5 % FCS. Mit  $1 \times 10^7$  Zellen/Well wurde auf 24-Well-Platten eine Titration gegen  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$  und  $5 \times 10^6$  SRBC durchgeführt. In einem weiteren Versuch wurden in einem Parallelansatz verschiedene Kulturbehältnisse getestet, es wurden  $2 \times 10^6$  Zellen in Kulturröhrchen oder  $5 \times 10^6$  Zellen in den Näpfen einer 24-Well-Platte ausgesät. Zudem wurde überprüft, ob möglicherweise eine Kulturzeit von 5 Tagen für den Ablauf der Immunreaktion zu kurz war und daher die Inkubation auf 6 Tage verlängert. Egal welcher Faktor in dem jeweilig durchgeführten Versuch variiert wurde, eine Erhöhung der Plaquezahl konnte mit keiner der Optionen erzielt werden.

Um sicherzustellen, dass die verschiedenen Zelltypen untereinander in den benötigten Kontakt treten können, wurde ein Vorverdau der Zellen mit Neuraminidase durchgeführt. Zu einer vermehrten Bildung von Plasmazellen, die Antikörper gegen SRBC sezernieren, führte dies jedoch nicht. Aufgrund der Annahme, dass möglicherweise zur Aktivierung der Lymphozyten benötigte Zytokine wie IL-2, IL-6 und IL-10 unter Zellkulturbedingungen nicht ausreichend produziert werden, wurden diese einzeln und in Kombination den Kulturen in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Ein positiver Effekt auf die Plaquebildung konnte jedoch erneut nicht festgestellt werden.

Faktor	Option
Medium	RPMI II (5 % FCS/ohne FCS) / IMDM (ohne FCS) /
	McCoy's (2,5 % FCS)/ Advanced D-MEM (2,5 % FCS)
SRBC	$1 \times 10^6$ , $2 \times 10^6$ und $5 \times 10^6$ SRBC/Well
Inkubationszeit	5 Tage / 6 Tage
Kulturbehältnis	$2\times 10^6$ Zellen in Kulturröhrchen / $5\times 10^6$ Zellen auf
	24-Well-Platten
Vorbehandlung der	Neuraminidase-Verdau
Zellen	
Zusätze	IL-2, IL-6, IL-10 einzeln und in Kombination

Tabelle 3.12 – Faktoren und Optionen zur Optimierung von Mishell-Dutton-Kulturen mit PBMCs der Ratte. Die aufgelisteten Faktoren wurden wie in der Spalte Option beschrieben variiert, um die optimalen Bedingungen für Mishell-Dutton-Kulturen mit PBMCs der Ratte herauszufinden. Als Endpunkt diente die jeweils ermittelte Plaquezahl. Soweit nicht anders vermerkt wurden die Kulturen auf 24-Well-Platten angesetzt mit  $1 \times 10^7$  Zellen/Well und  $5 \times 10^6$  SRBC.

#### 3.2.4.3 Humanes Blut

Für die Etablierung von Mishell-Dutton-Kulturen mit humanen PBMCs (*Tabelle* 3.13) wurden mit RPMI II und Advanced D-MEM (beide mit 5 % FCS) zunächst zwei verschiedene Medien getestet. Die SRBC wurden mit einer generellen Konzentration von  $5 \times 10^6$ /well eingesetzt. Als Kulturbehältnis wurden Kulturröhrchen mit einer Zellzahl von  $2 \times 10^6$  Zellen oder 24-Well-Platten mit 1 - 2,  $5 \times 10^6$  Zellen, abhängig von der aus der Blutprobe gewonnenen Zellzahl, verwendet. Neben 5-tägigen Inkubationen wurden auch 7-tägige Kulturen angesetzt, um einen ausreichend langen Zeitraum für den Ablauf der Immunreaktion zu gewähren. Spezifische Plaques für eine Stimulation mit SRBC konnten dennoch nicht erzielt werden, keine der durchgeführten Varianten zeigte eine Verbesserung. In einem weiteren Versuch wurde das FCS gegen humanes AB-Serum ersetzt, welches mit einer Konzentration von 5 % und 10 % eingesetzt wurde. Die Verwendung von humanem AB-Serum gestaltete sich jedoch sehr problematisch, da ein Zusatz zur Kultur eine Lyse der SRBC zur Folge hatte. Somit konnte keine Stimulierung der Zellen hatte keine verstärkte spezifische Reaktion gegen SRBC zur Folge.

Faktor	Option
Medium	RPMI II (5 % FCS) / Advanced D-MEM (5 % FCS)
Kulturbehältnis	$2\times 10^6$ Zellen in Kulturröhrchen / 1 - 2,5 $\times 10^6$ Zellen auf
	24-Well-Platten
mit humanem Serum	RPMI II (5 $\%$ der 10 $\%$ humanes AB-Serum statt FCS)
Kulturzusätze	Pokeweed Mitogen
Zeit	5 Tage / 7 Tage

Tabelle 3.13 – Faktoren und Optionen zur Optimierung humaner Mishell-Dutton-Kulturen mit PBMCs. Die aufgelisteten Faktoren wurden wie in der Spalte Option beschrieben variiert, um die optimalen Bedingungen für Mishell-Dutton-Kulturen mit humanen PBMCs auszutesten. Alle Kulturen wurden mit  $5 \times 10^6$  SRBC angesetzt.

# 3.3 Mishell-Dutton-Kulturen zur Detektion immunsuppressiver Substanzen *in vitro*

Nach der erfolgreichen Etablierung und Optimierung von Mishell-Dutton-Kulturen mit murinen Milzzellen wurde dieser Versuch in Form des Mishell-Dutton-Tests auf eine korrekte Detektion immunsuppressiver Substanzeffekte überprüft. Dazu wurde zunächst ein Viabilitätstest integriert, um unspezifische zytotoxische Substanzeffekte von spezifischen immunsuppressiven Substanzeffekten trennen zu können. Da sich in den Mitogenstimulationsversuchen an Milzzellen der Ratte und der Maus der Resazurin-Assay als deutlich sensitiver im Vergleich zum LDH-Assay zeigte, wurde dieser für die Mishell-Dutton-Tests ausgewählt und parallel zur Plaquezahlbestimmung durchgeführt. Nur wenn eine Plaquezahlreduktion nicht durch eine Zytotoxizität bedingt war und entsprechend eine substanz-induzierte Suppression der humoralen Immunantwort nicht mit einem Viabilitätsverlust korrelierte, konnte von einer spezifischen Immunsuppression ausgegangen werden.

# 3.3.1 Screening immunsuppressiver und nicht-immunsuppressiver Substanzen

Für das Screening immunsuppressiver und nicht-immunsuppressiver Substanzen mit dem Mishell-Dutton-Test an murinen Milzzellen wurden zunächst die gleichen immunsuppressiven Substanzen wie für die in *Kapitel* 3.1.1 und *Kapitel* 3.1.2 beschriebenen Mitogenstimulationsversuche verwendet. Die Substanz Verapamil wurde zusätzlich eingesetzt. Neben der Negativkontrolle Mannitol wurde die Gruppe der nicht-immunsuppressiven Substanzen mit Heptanal, SDS und 1-Bromo-4-chlorobutan um drei weitere Substanzen ergänzt. Für jede Substanz wurde zunächst der Konzentrationsbereich austitriert, in dem die Plaquezahl auch tatsächlich reduziert wurde. *Abbildung* 3.15 zeigt die Ergebnisse von Mishell-Dutton-Tests mit den drei immunsuppressiven Substanzen Dexamethason, Urethan und Benzo(a)pyren.

Während Dexamethason bei einer Konzentration von 0,01  $\mu$ M noch keinen Effekt auf die mittlere Plaquezahl pro Platte hatte (1924 Plaques im Vergleich zu 1836 Plaques der stimulierten Kontrolle), reduzierte eine Konzentration von 0,02  $\mu$ M bzw. 0,03  $\mu$ M diese auf 974 bzw. 27 Plaques. Bei der Konzentration von 0,02  $\mu$ M konnte die spezifisch immunsupressive Wirkung der Substanz Dexamethason eindeutig nachgewiesen werden, da die Viabilität mit 107 % in Bezug zur stimulierten Kontrolle nicht reduziert war.

Benzo(a)pyren wurde in den Konzentrationen 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M und 10  $\mu$ M eingesetzt. Bei allen Konzentrationen war die Plaquezahl stark supprimiert, da im Vergleich zur stimulierten Kontrolle im Mittel jeweils weniger als 13 % Plaques gezählt wurden. Die Viabilität war mit Werten von 90 % bis 96 % der vehikelbehandelten Kontrolle bei den verschiedenen Konzentrationen nahezu unbeinflusst, sodass ein eindeutig immunsuppressiver Effekt des Benzo(a)pyrens gemessen wurde.

Für die schwach immunsuppressive Substanz Urethan lag der einzusetzende Konzentrationsbereich mit 12,5 bis 50 mM vergleichsweise hoch. Bei 12,5 mM Urethan zeigte sich eine Reduktion der Plaquezahl von 1275 der Kontrolle auf 987 Plaques pro Platte, bei 25 mM konnten im Mittel nur noch 304 Plaques gezählt werden. 50 mM Urethan unterdrückten die Ausbildung einer



Abbildung 3.15 – Ergebnisse unabhängig voneinander durchgeführter Mishell-Dutton-Tests mit den immunsuppressiven Substanzen Dexamethason, Benzo(a)pyren und Urethan. Murine Milzzellen wurden für 5 Tage in Triplikaten mit SRBC und den angegebenen Substanzkonzentrationen inkubiert. Die Viabilitätsbestimmung erfolgte mittels Resazurin-Assay. Die Mittelwerte der Viabilitäten in Prozent wurden im Verhältnis zur lysierten (0 % Viabilität) und nichtlysierten Probe (100 % Viabilität) der stimulierten Kontrolle berechnet. Die Plaquezahlen wurden nach 5-stündiger Inkubation mit SRBC und Meerschweinchen-Komplement bestimmt. Dabei erfolgte für jede Probe der Triplikate eine Doppelbestimmung, sodass pro Substanzkonzentration bzw. Kontrolle 6 Platten ausgezählt wurden.

humoralen Immunreaktion vollständig, diese Substanzkonzentration reduzierte jedoch auch die Viabilität auf 20 %. Da bei den Konzentrationen von 12,5 mM und 25 mM Urethan die Inhibierung der Plaquebildung unabhängig von einer Zytotoxizität auftrat, wurde auch Urethan korrekt als immunsuppressive Substanz identifiziert.

Cyclosporin A	Kontrolle		Probe		
	unstimuliert	stimuliert	$0{,}01~\mu\mathrm{M}$	$0,03~\mu M$	$0,1~\mu M$
Viabilität (%)	-	$100,00 \pm 1,01$	$100,\!18 \pm 7,\!02$	$99,63 \pm 2,73$	$76,\!64 \pm 5,\!14$
Plaques (%)	$0,\!00~\pm~88,\!81$	$100{,}00~\pm~10{,}53$	$76,\!26~\pm~24,\!05$	$2,38 \pm 43,95$	$0,00~\pm~20,41$
Rapamycin	Kont	trolle		Probe	
	unstimuliert	stimuliert	$0,001 \ \mu M$	$0,003 \ \mu M$	$0,01~\mu M$
Viabilität (%)	-	$100,00 \pm 10,96$	$82,10 \pm 10,21$	$56,\!80~\pm~~6,\!59$	$34,51 \pm 11,24$
Plaques (%)	$0,00~\pm~31,37$	$100{,}00~\pm~13{,}12$	$19,79 \pm 21,70$	$0{,}00~\pm~64{,}52$	$0,00 \pm 0,00$
-					
Methotrexat	Kont	trolle		Probe	
Methotrexat	<b>Kont</b> unstimuliert	t <b>rolle</b> stimuliert	0,003 µM	<b>Probe</b> 0,03 μM	0,3 µM
Methotrexat           Viabilität (%)	Kont unstimuliert -	trolle stimuliert $100,00 \pm 6,08$	$0,003 \ \mu M$ 97,44 ± 1,68	<b>Probe</b> 0,03 μM 86,18 ± 4,04	$0,3 \ \mu M$ 73,76 ± 7,52
Methotrexat Viabilität (%) Plaques (%)	Kont unstimuliert $0,00 \pm 24,48$	trolle stimuliert $100,00 \pm 6,08$ $100,00 \pm 12,04$	$\begin{array}{r} 0,003 \ \mu \mathrm{M} \\ 97,44 \ \pm \ 1,68 \\ 103,32 \ \pm \ 7,35 \end{array}$	Probe $0,03 \mu M$ $86,18 \pm 4,04$ $34,94 \pm 14,82$	$\begin{array}{rrr} 0,3 \ \mu M \\ \hline 73,76 \ \pm \ \ 7,52 \\ 7,38 \ \pm \ \ 36,42 \end{array}$
Methotrexat Viabilität (%) Plaques (%)	Kont unstimuliert $0,00 \pm 24,48$	trolle stimuliert $100,00 \pm 6,08$ $100,00 \pm 12,04$	$\begin{array}{rrrr} 0,003 \ \mu \mathrm{M} \\ 97,44 \ \pm & 1,68 \\ 103,32 \ \pm & 7,35 \end{array}$	Probe $0,03 \mu M$ $86,18 \pm 4,04$ $34,94 \pm 14,82$	$\begin{array}{r} 0,3 \ \mu M \\ \hline 73,76 \ \pm \ 7,52 \\ 7,38 \ \pm \ 36,42 \end{array}$
Methotrexat Viabilität (%) Plaques (%) Verapamil	Kont unstimuliert $0,00 \pm 24,48$ Kont	trolle stimuliert $100,00 \pm 6,08$ $100,00 \pm 12,04$ trolle	$\begin{array}{rrrr} 0,003 \ \mu \mathrm{M} \\ 97,44 \ \pm \ 1,68 \\ 103,32 \ \pm \ 7,35 \end{array}$	Probe           0,03 μM           86,18 ± 4,04           34,94 ± 14,82           Probe	$\begin{array}{r} 0.3 \ \mu M \\ 73.76 \ \pm \ \ 7.52 \\ 7.38 \ \pm \ \ 36.42 \end{array}$
Methotrexat Viabilität (%) Plaques (%) Verapamil	Kont unstimuliert $0,00 \pm 24,48$ Kont unstimuliert	trolle stimuliert $100,00 \pm 6,08$ $100,00 \pm 12,04$ trolle stimuliert	$\begin{array}{c} 0,003 \ \mu M \\ 97,44 \ \pm \ 1,68 \\ 103,32 \ \pm \ 7,35 \end{array}$	Probe           0,03 μM           86,18 ± 4,04           34,94 ± 14,82           Probe           20 μM	$\begin{array}{c} 0,3 \ \mu M \\ \hline 73,76 \ \pm \ 7,52 \\ 7,38 \ \pm \ 36,42 \\ \hline 30 \ \mu M \end{array}$
Methotrexat         Viabilität (%)         Plaques (%)         Verapamil         Viabilität (%)	Kont unstimuliert $0,00 \pm 24,48$ Kont unstimuliert	trolle stimuliert $100,00 \pm 6,08$ $100,00 \pm 12,04$ trolle stimuliert $100,00 \pm 7,10$	$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$	Probe $0,03 \mu M$ $86,18 \pm 4,04$ $34,94 \pm 14,82$ Probe $20 \mu M$ $117,03 \pm 19,27$	$\begin{array}{r} 0,3 \ \mu M \\ 73,76 \ \pm \ 7,52 \\ 7,38 \ \pm \ 36,42 \\ \end{array}$ $\begin{array}{r} 30 \ \mu M \\ 85,31 \ \pm \ 15,25 \end{array}$
Methotrexat         Viabilität (%)         Plaques (%)         Verapamil         Viabilität (%)         Plaques (%)	Kont unstimuliert $0,00 \pm 24,48$ Kont unstimuliert $0,00 \pm 20,88$	trolle stimuliert $100,00 \pm 6,08$ $100,00 \pm 12,04$ trolle stimuliert $100,00 \pm 7,10$ $100,00 \pm 6,21$	$\begin{array}{c} 0,003 \ \mu \mathrm{M} \\\\ 97,44 \ \pm \ 1,68 \\\\ 103,32 \ \pm \ 7,35 \end{array}$ $\begin{array}{c} 10 \ \mu \mathrm{M} \\\\ 105,77 \ \pm \ 4,94 \\\\ 84,58 \ \pm \ 12,13 \end{array}$	$\begin{array}{c} {\bf Probe} \\ 0,03 \ \mu M \\ \\ 86,18 \ \pm \ 4,04 \\ 34,94 \ \pm \ 14,82 \\ \\ \hline {\bf Probe} \\ 20 \ \mu M \\ \\ 117,03 \ \pm \ 19,27 \\ 84,27 \ \pm \ 8,65 \end{array}$	$\begin{array}{c} 0,3 \ \mu M \\ \hline 73,76 \pm & 7,52 \\ 7,38 \pm & 36,42 \\ \hline 30 \ \mu M \\ \hline 85,31 \pm & 15,25 \\ 0,00 \ \pm & 16,88 \end{array}$

Tabelle 3.14 – Ergebnisse unabhängig voneinander durchgeführter Mishell-Dutton-Testsmit den immunsuppressiven Substanzen Cyclosporin A, Rapamycin, Methotrexat undVerapamil. Murine Milzzellen wurden für 5 Tage in Triplikaten mit SRBC und den angegebenenSubstanzkonzentrationen inkubiert. Die Viabilitätsbestimmung erfolgte mittels Resazurin-Assay. DieMittelwerte der Viabilitäten in Prozent wurden im Verhältnis zur lysierten (0 % Viabilität) und nicht-lysierten Probe (100 % Viabilität) der stimulierten Kontrolle berechnet. Die Plaquezahlen wurden nach5-stündiger Inkubation mit SRBC und Meerschweinchen-Komplement bestimmt. Dabei erfolgte für jedeProbe der Triplikate eine Doppelbestimmung, sodass pro Substanzkonzentration bzw. Kontrolle 6 Plat-ten ausgezählt wurden. Die mittleren Plaquezahlen in Prozent wurden in Relation zur unstimuliertenKontrolle (0 % Plaques) und zur stimulierten Kontrolle (100 % Plaques) bestimmt. Grüne Markierung:spezifisch immunsuppressiver Effekt (Plaquezahlreduktion korreliert nicht mit einem Viabilitätsverlust)

In *Tabelle* 3.14 sind die Ergebnisse der weiteren Versuche mit immunsuppressiven Standardsubstanzen dargestellt. Eingesetzt wurden Cyclosporin A, Rapamycin, Methotrexat und Verapamil.

Cyclosprin A wurde als immunsuppressiv gekennzeichnet, da es bei einer Substanzkonzentration von 0,03  $\mu$ M eine Reduzierung der Plaquezahl auf 2 % der stimulierten Kontrolle bei einer Viabilität von 100 % bewirkte. Bei der Substanz Rapamycin gingen die gemessenen Plaquezahlreduktionen jeweils mit einem leichten Viabilitätsverlust der Zellen einher. Bei einer Konzentration von 0,001  $\mu$ M wurden jedoch lediglich 20 % Plaques in Relation zur stimulierten Kontrolle bei einer Viabilität von 82 % gezählt, sodass die Plaquezahlreduktion deutlich den Viabilitätsverlust überwog. Damit war der Effekt als spezifisch immunsuppressiv einzustufen. Mit der Substanz Methotrexat wurde bei einer Konzentration von 0,3  $\mu$ M eine leichte Reduktion der Viabilität auf 74 % gemessen, während die Plaquezahl nur noch 7 % der stimulierten Kontrolle betrug und somit deutlich eingeschränkt war. Es lag somit trotz des Viabilitätsverlusts der Zellen keine Korrelation zur Plaquezahl vor und die Substanz wurde als immunsuppressiv eingestuft. Verapamil reduzierte die Plaquezahl pro Platte ebenfalls nur bei Konzentrationen, die leicht zytotoxisch waren. Bei 0,3 µM Verapamil konnten bei einer Viabilität von 85 % keine Plaques mehr nachgewiesen werden. Somit wurde auch diese Substanz korrekt identifiziert.

Das einzige Standardimmunsuppressivum, das im Mishell-Dutton-Test nicht korrekt klassifiziert werden konnte, war die Substanz Cyclophosphamid (*Abbildung* 3.16). Es zeigte sich eine deutliche Korrelation zwischen Viabilität und Plaquezahl, die den gemessenen Effekt als unspezifisch und durch die Zytotoxizität der Substanz hervorgerufen klassifizierte. Bei der höchsten eingesetzten Substanzkonzentration von 25 mM wurde beispielsweise eine Reduktion der mittleren Plaquezahl auf 51 % gemessen, die aber mit einem Viabilitätsverlust auf 60 % einherging.



Abbildung 3.16 – Ergebnis einesMishell-Dutton-Tests mit der immunsuppressiven Standardsubstanz Cyclophosphamid. Murine Milzzellen wurden für 5 Tage in Triplikaten mit SRBC und den angegebenen Substanzkonzentrationen inkubiert. Die Mittelwerte der Viabilitäten in Prozent wurden im Verhältnis zur lysierten (0 % Viabilität) und nicht-lysierten Probe (100 % Viabilität) der stimulierten Kontrolle berechnet. Die Plaquezahlen wurden pro Platte in Duplikaten nach 5-stündiger Inkubation mit SRBC und Meerschweinchen-Komplement bestimmt und prozentual im Verhältnis zur stimulierten Kontrolle berechnet.

Als erste negative Kontrollsubstanz wurde Mannitol verwendet. Diese bekannterweise nichtzytotoxische Substanz wurde in den gleichen hohen Konzentrationen wie zuvor die Substanz Urethan der Mishell-Dutton-Kultur zugesetzt. So konnte nachgewiesen werden, ob der mit Urethan gemessene Effekt nicht möglicherweise aufgrund von osmotischem Druck entstand. Mit Mannitol konnte bis zu einer Konzentration von 50 mM kein Effekt auf die Viabilität oder die Plaquezahl pro Platte erzielt werden (*Abbildung* 3.17). Die Substanz wurde also korrekt als nicht-immunsuppressiv gekennzeichnet und das zuvor erzielte Ergebnis einer spezifischen Immunsuppression durch die Substanz Urethan bestätigt.

Da Mannitol im Gegensatz zu den eingesetzten immunsuppressiven Substanzen keine zytotoxischen Effekte auf die murinen Milzzellkulturen hatte, wurden im nächsten Schritt Irritantien der Gruppe der Negativkontrollen hinzugefügt. Die erste getestete Substanz war der Standard-Irritant SDS (Natrium Dodecylsulfat). SDS zeigte bei einer Konzentration von 260  $\mu$ M eine starke Zytotoxizität, es konnten keine lebenden Zellen mehr nachgewiesen werden. Dies korrelierte mit der Plaquebildung, welche bei dieser Konzentration ebenfalls vollständig unterdrückt war (*Abbildung* 3.17). Bei einer niedrigeren Konzentration von 87  $\mu$ M hingegen wurden keine Effekte auf die Zellviabilität und die Ausbildung einer humoralen Immunreaktion bestimmt. Eine solche Korrelation der Viabilität und der Plaquezahl war kennzeichnend für nicht-immunsuppressive Substanzen. Ähnliche Ergebnisse wurden mit Heptanal und 1-Bromo-4-chlorobutan erzielt (*Tabelle* 3.15).

#### Ergebnisse



Abbildung 3.17 – Ergebnisse unabhängig voneinander durchgeführter Mishell-Dutton-Tests mit den nicht-immunsuppressiven Substanzen Mannitol und SDS. Murine Milzzellen wurden für 5 Tage in Triplikaten mit SRBC und den angegebenen Substanzkonzenrationen inkubiert. Die Viabilitätsbestimmung erfolgte mittels Resazurin-Assay. Die Mittelwerte der Viabilitäten in Prozent wurden im Verhältnis zur lysierten (0 % Viabilität) und nicht-lysierten Probe (100 % Viabilität) der stimulierten Kontrolle berechnet. Die Plaquezahlen wurden nach 5-stündiger Inkubation mit SRBC und Meerschweinchen-Komplement bestimmt. Dabei erfolgte für jede Probe der Triplikate eine Doppelbestimmung, sodass pro Substanzkonzentration bzw. Kontrolle 6 Platten ausgezählt wurden.

Mit dem stark irritierenden Heptanal konnte, ähnlich wie beim SDS, keine Konzentration ermittelt werden, die nur eine leichte Reduktion der Viabilität zur Folge hatte. Waren bei einer Konzentration von 2,6 mM die Viabilität mit 115 % und die Plaquezahl mit 120 % im Vergleich zur stimulierten Kontrolle unbeeinflusst, so konnten bei einer Konzentration von 6 mM weder antikörper-sezernierende noch lebende Zellen nachgewiesen werden.

Um schließlich feststellen zu können, ob auch eine leichte Viabilitätsreduktion wie angenommen mit der Plaquezahl korrelieren würde, wurde mit der Substanz 1-Bromo-4-chlorobutan ein vergleichsweise schwacher Irritant ausgewählt. Bei einer Konzentration von 1,75 mM wurde mit einem Wert von 90 % in Relation zur stimulierten Kontrolle ein leichter Viabilitätsverlust induziert, der mit dem ermittelten Anteil an Plaques von 91 % der stimulierten Kontrolle nahezu identisch war. 5,83 mM 1-Bromo-4-chlorobutan reduzierten die Viabilität auf 75 %, während der Effekt auf die Plaquezahl mit verbliebenen 32 % der Plaques etwas stärker war. Bei einer Konzentration von 17,5 mM wurde eine Viabilität von 10 % bei einer vollständig unterdrückten humoralen Immunreaktion gemessen. Trotz leichter Abweichungen zeigte sich mit der Substanz 1-Bromo-4-chlorobutan die erwartete Korrelation von Viabilität und Plaquezahl.

Heptanal	Kon	trolle		Probe	
	unstimuliert	stimuliert	$0,9 \mathrm{mM}$	$2,6 \mathrm{~mM}$	$6 \mathrm{mM}$
Viabilität (%)	-	$100,00 \pm 8,88$	$105,93 \pm 6,93$	$114,52 \pm 10,06$	$0,00 \pm 3,64$
Plaques $(\%)$	$0{,}00~\pm~68{,}83$	$100{,}00~\pm~20{,}92$	$124{,}24~\pm~20{,}08$	$119{,}71~\pm~25{,}69$	$0,00 \pm 51,16$
1-Bromo-4-	Kon	trolle		Probe	
1-Bromo-4- chlorobutan	Kon unstimuliert	trolle stimuliert	$1,75~\mathrm{mM}$	<b>Probe</b> 5,83 mM	$17,5 \mathrm{~mM}$
1-Bromo-4- chlorobutan Viabilität (%)	Kon unstimuliert -	trolle stimuliert $100,00 \pm 2,87$	1,75  mM $89,71 \pm 3,74$	<b>Probe</b> 5,83 mM 74,64 ± 34,38	17,5  mM $10,47 \pm 31,98$
1-Bromo-4- chlorobutanViabilität (%) Plaques (%)	Kontunstimuliert - $0,00 \pm 28,15$	trolle stimuliert $100,00 \pm 2,87$ $100,00 \pm 17,41$	1,75  mM $89,71 \pm 3,74$ $90,68 \pm 10,27$	Probe $5,83 \text{ mM}$ $74,64 \pm 34,38$ $32,13 \pm 77,53$	$17,5 \text{ mM}$ $10,47 \pm 31,98$ $0,00 \pm 142,00$

Tabelle 3.15 – Ergebnisse unabhängig voneinander durchgeführter Mishell-Dutton-Testsmit den nicht-immunsuppressiven Substanzen Heptanal und 1-Bromo-4-chlorobutan. Mu-rine Milzzellen wurden für 5 Tage in Triplikaten mit SRBC und den angegebenen Substanzkonzen-trationen inkubiert. Die Viabilitätsbestimmung erfolgte mittels Resazurin-Assay. Die Mittelwerte derViabilitäten in Prozent wurden im Verhältnis zur lysierten (0 % Viabilität) und nicht-lysierten Probe(100 % Viabilität) der stimulierten Kontrolle berechnet. Die Plaquezahlen wurden nach 5-stündigerInkubation mit SRBC und Meerschweinchen-Komplement bestimmt. Dabei erfolgte für jede Probe derTriplikate eine Doppelbestimmung, sodass pro Substanzkonzentration bzw. Kontrolle 6 Platten ausgezählt wurden. Die mittleren Plaquezahlen in Prozent wurden in Relation zur unstimulierten Kontrolle(0 % Plaques) und zur stimulierten Kontrolle (100 % Plaques) bestimmt. Rote Markierung: unspezi-fischer zytotoxischer Effekt (Plaquezahl korreliert mit dem Viabilitätsverlust)

#### 3.3.2 Reproduzierbarkeit und Klassifizierung

Um die Reproduzierbarkeit der Mishell-Dutton-Tests an murinen Milzzellen zu überprüfen (*Tabelle* 3.16), wurde für jede eingesetzte Substanz für jeweils zwei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche die Plaque IC90 (siehe *Kapitel* 2.2.6.11) berechnet. Die Plaque IC90 beschreibt die Substanzkonzentration, bei der die Plaquebildung zu 90 % inhibiert wurde.

Ein Vergleich der Plaque IC90 der immunsuppressiven Substanzen zeigte durchweg eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der zwei unabhängig voneinander durchgeführten Mishell-Dutton-Tests. Die IC90 der Standardsubstanz Cyclopsorin A beispielsweise wurde mit Konzentrationen von 0,093  $\mu$ M und 0,096  $\mu$ M nahezu identisch bestimmt. Lediglich für die Substanz Rapamycin zeigten sich leichte Differenzen mit 0,0009  $\mu$ M und 0,0020  $\mu$ M, die jedoch aufgrund des sehr niedrigen eingesetzten Konzentrationsbereiches allein durch den Pipettierfehler begründet werden konnten. Für die Substanz Cyclophosphamid konnte keine Plaque IC90 berechnet werden, da in allen durchgeführten Experimenten im eingesetzten Konzentrationsbereich von bis zu 25 mM keine Suppression der Plaquezahlen auf weniger als 10 % im Vergleich zur stimulierten Kontrolle erzielt wurde.

Betrachtet man die Gruppe der Negativkontrollen, so konnte für Mannitol keine Plaque IC90 berechnet werden, da bis zur höchsten einsetzbaren Konzentration von 50 mM die Substanz keinen Effekt auf die Plaquezahlen hatte. Für Heptanal konnte nur anhand eines Versuchs die IC90 bestimmt werden. Im zweiten durchgeführten Experiment wurden niedrigere Konzentrationen eingesetzt, um so möglicherweise eine Konzentration finden zu können, die eine leichte Plaquezahlreduktion bedingen würde. Folge war jedoch, dass die in diesem Versuch verwendete

Immunsuppressiva		Plaq	ue IC90	
	Assay	Ι	Assay	II
Benzo(a)pyren	2,00	$\mu M$	2,76	$\mu M$
Cyclophosphamid	> 25,00	$\mathrm{mM}^*$	> 25,00	$\mathrm{mM}^*$
Cyclosporin A	0,093	$\mu M$	0,096	$\mu M$
Dexamethason	0,028	$\mu M$	0,029	$\mu M$
Methotrexat	0,27	$\mu M$	0,30	$\mu M$
Rapamycin	0,0009	$\mu M$	0,0020	$\mu M$
Urethan	38,38	mM	$42,\!67$	$\mathrm{mM}$
Verapamil	23,82	$\mu M$	28,81	$\mu M$
Negativkontrollen		Plaq	ue IC90	
	Assay	Ι	Assay	II
1 Bromo 4 chlorobutan	13.88	mМ	12 10	mM
Hoptonal	5.87	mM	12,15 > 5.95	$mM^*$
	5,67		> 5,25	
Mannitol	> 50,00	mM	> 50,00	mM
202	173,38	μМ	242,74	μM

Tabelle 3.16 – Analyse der Reproduzierbarkeit muriner Mishell-Dutton-Tests anhand der Berechnung der Plaque IC90. Die Plaque IC90 wurde für jede eingesetzte Substanz für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche berechnet. \*: Es konnte im getesteten Konzentrationsbereich keine Reduzierung der Plaques auf weniger als 10 % erzielt werden, die höchste getestete Konzentration ist jeweils angegeben.

höchste Konzentration von 5,25 mM die Plaquezahl nicht beeinflusste. Somit konnte nur festgehalten werden, dass die Plaque IC90 bei einer höheren Konzentration als den eingesetzten 5,25 mM lag. Für die anderen verwendeten Substanzen SDS und 1-Bromo-4-chlorobutan zeigte sich eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Um im nächsten Schritt eine genauere Definition für die Immunsuppressivität einer Substanz zu bekommen, als nur die Beschreibung einer fehlenden Korrelation der Viabilitätskurve einer Substanz mit ihrer Plaquezahl, wurde die Viabilität der Zellen anhand der Messwerte aus dem Resazurin-Assay wie in *Kapitel* 2.2.6.11 beschrieben für die Konzentration der Plaque IC90 berechnet. Eine Substanz wurde dann als immunsuppressiv klassifiziert, wenn die Viabilität bei dieser Konzentration mehr als 50 % betrug. Nach dieser Berechnung wurden, mit Ausnahme des Cyclophosphamids, alle immunsuppressiven Substanzen korrekt identifiziert (*Tabelle* 3.17).

Für nicht-immunsuppressive Substanzen war entsprechend eine Viabilität von weniger oder gleich 50 % für die Plaque IC90 zu erwarten. In der Gruppe der Negativkontrollen zeigte sich diese auch entsprechend bei den Substanzen SDS, Heptanal und 1-Bromo-4-chlorobutan. Für Mannitol konnte die Viabilität nicht berechnet werden, da die Substanz weder die Plaquezahl reduzierte noch zytotoxische Effekte zeigte. Deshalb war sie ohnehin klar als negativ zu klassifizieren.

Immunsuppressiva	Viabilität bei der	Plaque IC90 (%)	Viabilität bei der
	Assay I	Assay II	Konzentration der
			Plaque IC90 $> 50\%$
Benzo(a)pyren	90,84	$125,\!25$	Ja
Cyclophosphamid	n.b.	n.b.	Nein
Cyclosporin A	$99,\!63$	100,50	Ja
Dexamethason	$75,\!43$	$83,\!43$	Ja
Methotrexat	$75,\!14$	79,94	Ja
Rapamycin	$73,\!69$	69,45	Ja
Urethan	$53,\!68$	54,57	Ja
Verapamil	56,26	89,08	Ja
Negativkontrollen	Viabilität bei der Assav I	Plaque IC90 (%) Assay II	Viabilität bei der Konzentration der
	risbay i	1105009 11	Plaque IC90 $> 50\%$
1-Bromo-4-chlorobutan	$30,\!36$	28,86	Nein
Heptanal	$8,\!59$	n.b.	Nein
Mannitol	n.b.	n.b.	Kein Effekt
SDS	2,08	10,08	Nein

**Tabelle 3.17 – Zellviabilitäten in Mishell-Dutton-Tests bei der Konzentration der Plaque IC90.** Anhand der für jeden Versuch gemessenen Viabilitätsdaten aus dem Resazurin-Assay wurden für die zuvor berechnete Plaque IC90 die Viabilitäten berechnet. Es wurde für die Einstufung einer Immunsuppressivität der jeweilig zu analysierenden Substanz bestimmt, ob die Viabilität bei der Plaque IC90 mehr als 50 % betrug. War dies der Fall, wurde die Substanz als immunsuppressiv klassifiziert. Betrug die Viabilität 50 % oder weniger, so wurde die Substanz als nicht-immunsuppressiv klassifiziert. n.b.: nicht berechnet, da die Konzentration der Plaque IC90 nicht bestimmt werden konnte.

# 3.3.3 Vergleich der Detektion immunsuppressiver Substanzen durch Mishell-Dutton-Tests und Mitogenstimulationen

Um einen direkten Vergleich der korrekten Vorhersagen immunsuppressiver Substanzeffekte durch Mitogenstimulationen und Mishell-Dutton-Tests durchzuführen, wurden die jeweiligen Ergebnisse der Versuche an murinen Milzzellen gegenübergestellt (*Tabelle* 3.18). Dies gewährleistete zum einen die größtmögliche Vergleichbarkeit durch den Einsatz der Daten derselben Spezies, und zum anderen zeigten sich in der Mitogenstimulation die Versuche an murinen Zellen gegenüber denen an Rattenzellen als überlegen.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine schwach immunsuppressive Substanz wie Urethan in den Mitogenstimulationsversuchen nicht detektiert werden konnte. Je nach betrachtetem Viabilitätsassay wurde auch Benzo(a)pyren nicht korrekt klassifiziert. Methotrexat konnte nur anhand eines einzigen Endpunktes, nämlich der IFN $\gamma$ -Freisetzung nach LPS-Stimulation, als immunsuppressiv eingestuft werden.

Im Mishell-Dutton-Test hingegen konnte das schwach immunsuppressiv wirkende Urethan korrekt klassifiziert werden. Auch die Immuntoxizität der Substanzen Benzo(a)pyren und Methotrexat wurde eindeutig nachgewiesen. Eine Erweiterung der Gruppe der Negativkontrollen um drei Irritanzien belegte zudem, dass der Mishell-Dutton-Test eine klare Unterscheidung zwischen unspezifisch zytotoxischen und spezifisch immunsuppressiven Effekten ermöglichte. In einem Punkt zeigte sich die Detektion immunsuppressiver Substanzeffekte mit Mishell-Dutton-

Immunsuppressiva	korrekte Kla	ssifizierung de	r Substanz durch
	ConA-	LPS-	Mishell-Dutton-Test
	Stimulation	Stimulation	
Benzo(a)pyren	?	-	+
Cyclophosphamid	+	+	-
Cyclosporin A	+	+	+
Dexamethason	+	+	+
Methotrexat	-	+	+
Rapamycin	+	+	+
Urethan	-	-	+
Verapamil	n.d.	n.d.	+
Negativkontrollen	korrekte Kla	ssifizierung de	r Substanz durch
	ConA-	LPS-	Mishell-Dutton-Test
	Stimulation	Stimulation	
1-Bromo-4-chlorobutan	n.d.	n.d.	+
Heptanal	n.d.	n.d.	+
Mannitol	+	+	+
SDS	n.d.	n.d.	+

Tabelle 3.18 – Vergleich der korrekten Vorhersage immunsuppressiver Substanzeffektedurch Mitogenstimulationen und Mishell-Dutton-Tests. Gegenübergestellt wurden die Ergeb-nisse aus den jeweiligen Versuchen mit murinen Milzzellen. +: die Substanz wurde korrekt klassifiziert;-: die Substanz wurde nicht korrekt klassifiziert; ?: die Substanz konnte aufgrund kontroverser Ergeb-nisse der zwei bei Mitogenstimulationsversuchen durchgeführten Viabilitätsassays nicht klassifiziertwerden; n.d.: Versuch wurde mit der angegebenen Substanz nicht durchgeführt.

Tests jedoch kritisch: Eine Substanz wie Cyclophosphamid, deren immunsuppressiver Effekt metabolismus-abhängig ist, konnte nicht korrekt klassifiziert werden.

#### 3.3.4 Metabolismus-abhängige Substanzeffekte

Einige immunsuppressiv wirkende Substanzen beeinflussen selbst nicht das Immunsystem, werden jedoch im Organismus von Leberenzymen metabolisiert. Diese Metaboliten sind es dann, die die immunsuppressive Wirkung ausüben. Ein Zytostatikum mit einer solchen Wirkungsweise ist Cyclophosphamid. In dem Standardversuch zur funktionellen Überprüfung des Immunsystems, dem PFCA, wird Cyclophosphamid als Positivkontrolle zur regelmäßigen Validierung des Versuches *in vivo* eingesetzt. Eine solche Substanz muss entsprechend von einer adäquaten Tierversuchsersatzmethode korrekt klassifiziert werden.

Abbildung 3.18 zeigt die Ergebnisse eines PFCA mit Cyclophosphamid. In dem ex vivo Versuch wurde die Substanz eindeutig als immunsuppressiv gekennzeichnet, da sie im kompletten Organismus von den Leberenzymen entsprechend metabolisiert wurde. Bei den männlichen Mäusen wurden die Parameter Milzgewicht, Milzzellzahl (Lymphozyten) sowie IgG- und IgM-Plaques pro  $1 \times 10^6$  Zellen bei einer einmaligen Verabreichung von 40 mg Cyclophosphamid pro kg Körpergewicht deutlich reduziert, bei den etwas weniger suszeptiblen Weibchen konnten ähnliche Effekte bei 80 mg Cyclophosphamid pro kg Körpergewicht gemessen werden.

Im Mishell-Dutton-Test erfolgte die Metabolisierung des Cyclophosphamids nicht. Erst bei einer Substanzkonzentration von 1 mM konnte eine leichte Reduzierung der Plaquezahl pro Platte von 1088 auf 896 gemessen werden, die jedoch mit einer starken Streuung der Einzel-



Abbildung 3.18 – Ergebnisse eines Plaque Forming Cell Assasy (PFCA) mit der Substanz Cyclophosphamid. Es wurden Mäuse des Stammes NMRI mit jeweils 8 Tieren pro Gruppe eingesetz, denen Cyclophosphamid bzw. BSS als Vehikel einmalig i.p. verabreicht wurde. 2 h später erfolgte die Immunisierung der Tiere i.p. mit  $1 \times 10^9$  SRBC in BSS (Gesamtvolumen 100 µl). Die Splenektomie und anschließende Aufarbeitung der Milzzellen erfolgte 5 Tage nach der Immunisierung.

werte einherging und zudem mit einer leichten Verringerung der Viabilität auf 95 % korrelierte (*Abbildung* 3.19).

Dieses Problem konnte durch eine Modifikation des von Tucker et al. (1982) beschriebenen Protokolls zur Induktion einer Substanzmetabolisierung *in vitro* gelöst werden. Wurden die im Gesamtorganismus vorhandenen Leberenzyme in Form von S9-Mix in den Mishell-Dutton-Test eingebracht, so erfolgte eine Metabolisierung des Cyclophosphamids, deutlich angezeigt durch die daraufhin vorhandene Immunsuppressivität. Bereits bei 0,1 mM Cyclophosphamid verringerte sich die Plaquezahl pro Platte von 893 der stimulierten Kontrolle auf 583 und nahm konzentrationsabhängig weiter ab auf 302 Plaques bei 0,3 mM und 37 Plaques bei 1 mM Cyclophosphamid. Die Viabilität wurde nicht beeinflusst bzw. nur bei der höchsten eingesetzten Substanzkonzentration leicht auf 96 % reduziert.

Benzo(a)pyren ist eine weitere Substanz, deren immunsuppressive Wirkung einer Metabolisierung unterliegt. Im Mishell-Dutton-Test konnte die Immunsuppressivität dieser Substanz bereits ohne den Zusatz von S9-Mix nachgewiesen werden, da Benzo(a)pyren konzentrations-



Abbildung 3.19 – Parallelansatz eines Mishell-Dutton-Tests mit Cyclophosphamid mit und ohne Zusatz von S9-Mix. Es wurden jeweils zwei Mishell-Dutton-Tests mit Cyclophosphamid parallel angesetzt, dem einen wurde S9-Mix hinzugefügt, dem anderen als Kontrolle entsprechend nicht. Die Endkonzentration des S9-Mixes betrug 5 mg/ml. Die Inkubationszeit mit der Substanz und dem S9-Mix betrug 1 h, dann wurde der Überstand nach Zentrifugation der Zellen verworfen und durch frisches Medium ersetzt. Erst dann erfolgte eine Stimulation der Zellen mit SRBC. Die Aufarbeitung und Auswertung wurde an Tag 5 durchgeführt.

abhängig im Bereich von 0,3  $\mu$ M bis 3  $\mu$ M die Plaquezahl reduzierte, ohne die Zellviabilität zu verringern (*Tabelle* 3.19). Wurde den Kulturen S9-Mix zugesetzt, so führte dies zu einer entsprechend stärkeren Reduzierung der Plaquezahl. Konnten in dem Mishell- Dutton-Test ohne S9-Mix bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M Benzo(a)pyren noch 75 % der Plaques im Verhältnis zur stimulierten Kontrolle gezählt werden, so waren es mit S9-Mix nur noch 53 %.

Die Ergebnisse der Versuche mit S9-Mix waren sowohl mit der Substanz Cyclophosphamid als auch mit Benzo(a)pyren sehr gut reproduzierbar. Generell zeigte sich der Zusatz eines metabolischen Systems in Form von S9-Mix als eine zuverlässige Ergänzung des regulären Mishell-Dutton-Tests.

Benzo(a)pyren	Kon	trolle		Probe	
	unstimuliert	stimuliert	$0,3~\mu M$	$1 \ \mu M$	$3 \ \mu M$
Viabilität (%)	-	$100,00 \pm 6,74$	$113,\!61 \pm 4,\!52$	$109,\!48 \pm 7,\!84$	$92,\!49 \pm 5,\!94$
Plaques $(\%)$	$0,00~\pm~64,\!64$	$100,00 \pm 5,68$	$88{,}02~\pm~13{,}04$	$75,\!48 \pm 18,\!46$	$31,\!39 \pm 13,\!35$
Benzo(a)pyren	Kon	trolle		Probe	
Benzo(a)pyren + S9 Mix	Kontunstimuliert	t <b>rolle</b> stimuliert	0,3 µM	<b>Probe</b> 1 μM	3 µM
Benzo(a)pyren + S9 Mix Viabilität (%)	Kon unstimuliert -	trolle stimuliert $100,00 \pm 4,68$	$0.3 \ \mu M$ 113.52 ± 4.62	<b>Probe</b> 1 μM 113,05 ± 6,42	$3 \ \mu M$ 102,66 ± 5,84
Benzo(a)pyren + S9 Mix Viabilität (%) Plaques (%)	Kontunstimuliert - $0,00 \pm 45,67$	trolle stimuliert $100,00 \pm 4,68$ $100,00 \pm 13,31$	$\begin{array}{r} 0.3 \ \mu \mathrm{M} \\ 113.52 \ \pm \ \ 4.62 \\ 87.93 \ \pm \ \ 5.27 \end{array}$	Probe           1 $\mu$ M           113,05 ± 6,42           53,15 ± 10,54	$\begin{array}{r} 3 \ \mu M \\ 102,66 \ \pm \ 5,84 \\ 25,51 \ \pm \ 14,37 \end{array}$

Tabelle 3.19 – Parallelansatz eines Mishell-Dutton-Tests mit Benzo(a)pyren mit und ohne Zusatz von S9-Mix. Es wurden jeweils zwei Mishell-Dutton-Tests mit Benzo(a)pyren parallel angesetzt, dem einen wurde S9-Mix hinzugefügt, dem anderen als Kontrolle entsprechend nicht. Die Endkonzentration des S9-Mixes betrug 5 mg/ml. Die Inkubationszeit mit der Substanz und dem S9-Mix betrug 1 h, dann wurde der Überstand nach Zentrifugation der Zellen verworfen und durch frisches Medium ersetzt. Erst dann erfolgte eine Stimulation der Zellen mit SRBC. Die Aufarbeitung und Auswertung wurde an Tag 5 durchgeführt. Grüne Markierung: Ein Vergleich der Werte beider Ansätze zeigt deutlich die Verstärkung des spezifisch immunsuppressiven Effektes durch die Zugabe von S9-Mix.

# 3.4 Analyse der Immunsuppressivität der Substanz Urethan

Der vierte Abschnitt des Ergebnisteils galt der Substanz Urethan. Der Immunsuppressions-Mechanismus der Substanz wurde anhand von PFCAs und Mishell-Dutton-Kulturen näher analysiert, da bisher nicht erwiesen wurde, ob Urethan selbst eine immunsuppressive Wirkung ausübt oder nur seine Metaboliten. Insbesondere für *in vitro* Versuche mit Milzzellen war nicht bekannt, ob sie entsprechende Enzyme für eine Metabolisierung des Urethans exprimieren und die Substanz, ähnlich wie Benzo(a)pyren, auch *in vitro* umsetzen würden. Entsprechend sollten in diesem Abschnitt neue Erkenntnisse bezüglich einer möglichen Metabolisierung des Urethans *in vitro* gewonnen werden. Dabei konnte der Mishell-Dutton-Test weiter auf eine direkte Vergleichbarkeit mit dem PFCA überprüft sowie auf eine Anwendbarkeit verschiedener Methoden wie einer RNA-Analyse analysiert werden.

# 3.4.1 Die immunsuppressive Wirkung des Urethans in vivo und in vitro

Zunächst wurden mit der Substanz Urethan Plaque Forming Cell Assays (PFCA) durchgeführt. In einer NTP-Studie (NTP 1982) konnte im PFCA mit B6C3F1 Mäusen nach 14-tägiger subkutaner Injektion der Testsubstanz Urethan ein immunsuppressiver Effekt an Tag 4 nach SRBC-Stimulation nachgewiesen werden, der am Tag 5 bereits deutlich abgeschwächt wurde und an Tag 6 in einen immunstimulierenden Effekt umschlug. Es wurde zunächst überprüft, ob diese Ergebnisse unter Anpassung an das derzeitige Standardprotokoll reproduzierbar waren. Dies beinhaltete die Verwendung von Mäusen des Auszuchtstammes NMRI sowie eine intraperitoneale Applikation der Testsubstanz.

Wie in *Abbildung* 3.20 dargestellt, konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Bereits an Tag 3 nach der intraperitonealen Applikation von SRBC konnte eine deutliche Suppression der Ausbildung antikörpersezernierender Zellen durch Urethan im PFCA detektiert werden. Die Zahl der IgM Plaques pro  $1 \times 10^6$  Zellen wurde von 132 der vehikelbehandelten Gruppe auf 60 bei 100 mg/kg Urethan und 19 bei 300 mg/kg Urethan reduziert. Damit einher ging eine



Abbildung 3.20 – Plaque Forming Cell Assay mit der Substanz Urethan nach Langzeitprotokoll. Weibliche NMRI-Mäuse wurden über 14 Tage täglich i.p. mit der im Diagramm angegebenen Dosis behandelt. Der obere Graph zeigt die IgM-Plaquezahlen pro  $1 \times 10^6$  eingesetzte Milzzellen, die Milzgewichte und die Milzzellzahlen an Tag 3 nach der Immunisierung mit SRBC, der mittlere Graph an Tag 4 und der untere Graph an Tag 5 nach der Immunisierung.

konzentrationsabhängige Reduktion des Milzgewichts von 197 mg auf 147 bzw. 108 mg und der Lymphozytenzahl von 2,  $27 \times 10^8$  auf 1,  $70 \times 10^8$  bzw. 1,  $08 \times 10^8$ . 4 Tage nach der Immunisierung zeigte sich ebenfalls eine deutliche Reduktion der IgM-Plaques, die wie an Tag 3 zusammen mit einer Verringerung des Milzgewichts und der Milzzellzahl erfolgte. An Tag 5 hingegen wurde eine gesteigerte mittlere Anzahl der IgM-Plaques pro  $1 \times 10^6$  Milzzellen von 369 auf 873 bei 100 mg/kg bzw. 991 bei 300 mg/kg Urethan gezählt, während das Milzgewicht konzentrationsabhängig von 186 mg auf 163 mg bzw. 128 mg reduziert wurde. Die Zahl der Milzzellen hingegen blieb nahezu unverändert. Den an Tag 5 nach Immunisierung getöteten Tieren wurden neben der Milz zusätzliche Organe für eine histopathologische Untersuchung entnommen. Beurteilt wurden Milz, Lunge, Leber, Thymus, Femur, Sternum, Nieren, Nebennieren, Ovarien und mesenteriale Lymphknoten. Alle Organe waren ohne histopatholgischen Befund, eine generelle Toxizität der Substanz Urethan lag in den eingesetzten Konzentrationsbereichen somit nicht vor.

Urethan	Plaques IgM	Plaques IgG	Zellzahl Milz	Gewicht Milz
Tag 3 Tag 5	$\stackrel{\downarrow}{\leftrightarrow}(\uparrow)$	$\stackrel{\downarrow}{\leftrightarrow}(\uparrow)$	$\underset{\leftrightarrow}{\leftrightarrow}$	$\overset{\leftrightarrow}{\leftrightarrow}$

Tabelle 3.20 – Plaque Forming Cell Assay mit der Substanz Urethan nach Kurzzeitprotokoll. Weibliche NMRI-Mäuse wurden zweimal mit 500 mg/kg Urethan oder dem Vehikel behandelt, drei Tage und einen Tag vor der Immunisierung. An Tag 3 und Tag 5 nach der Immunisierung wurde der Plaque Assay durchgeführt und zusätzlich die Parameter Milzgewicht und Milzzellzahl bestimmt.  $\downarrow$ : statistisch signifikant (t-Test; p < 0,05) niedrigere Werte der Urethan-behandelten Gruppe im Vergleich zur vehikelbehandelten Kontrollgruppe;  $\leftrightarrow$ : keine statistisch signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe; ( $\uparrow$ ): Tendenz der Steigerung im Vergleich zur vehikelbehandelten Kontrolle, jedoch nicht statistisch signifikant

Als nächstes wurde überprüft, ob mit der Substanz Urethan eine Supprimierung der Immunreaktion auch nach einer Kurzzeitbehandlung (zweimalige Substanzapplikation) erzielt werden konnte. Wie *Tabelle* 3.20 zeigt, wurden im Vergleich zur Langzeitbehandlung nahezu identische Ergebnisse erzielt. An Tag 3 nach der Immunisierung wurde die Ausbildung von IgM- und IgG-Plaques deutlich durch das Urethan supprimiert, während Parameter wie Milzzellzahl und Milzgewicht unverändert blieben. An Tag 5 hingegen wurde keine statistisch signifikante Veränderung der Plaquezahl gemessen, die Werte zeigten jedoch eine Tendenz zu einer verstärkten Plaquebildung durch die Urethanbehandlung. Die Zellzahl und das Gewicht der Milzen waren unbeeinflusst.

Die Substanz Urethan wurde im nächsten Schritt *in vitro* anhand eines Mishell-Dutton-Tests analysiert (*Abbildung* 3.21). Die Mikroskopiebilder weisen eine deutliche konzentrationsabhängige Reduktion der Plaques auf den Platten nach, die sich mit 81 % Plaques bei 12,5 mM Urethan, 55 % Plaques bei 25 mM Urethan und nur unspezifischen Hintergrund-Plaques bei 50 mM Urethan in Relation zur stimulierten und unstimulierten Kontrolle auch in den Mittelwerten der jeweils doppelt ausgewerteten Dreifachbestimmungen widerspiegelte. Die Viabilität war dabei mit 95 %, 87 % und 74 % nur geringfügig reduziert. Der gemessene Effekt wurde entsprechend als spezifisch immunsuppressiv eingestuft. Die Ergebnisse des Mishell-Dutton-Tests an Tag 5 entsprachen denen des PFCAs an Tag 3 nach Immunisierung.



Abbildung 3.21 – Mishell-Dutton-Test mit Urethan. Die Mishell-Dutton-Kultur wurde mit unstimulierter und stimulierter Kontrolle sowie den drei Urethan-Konzentrationen 12,5 mM, 25 mM und 50 mM in Dreifachbestimmungen angesetzt. An Tag 5 wurden die mittleren Viabilitäten im Resazurin-Assay und die mittleren prozentualen Plaquezahlen in Relation zu den Kontrollen bestimmt. Jeweils eine Platte pro Gruppe der in Doppelbestimmungen ausplattierten Proben wurde am Mikroskop analysiert. Dazu wurden mit einer 4-fachen Vergrößerung und einer Belichtungszeit von 1/1000s jeweils 25 Bilder pro Platte einer definierten Fläche erstellt und mit Hilfe der Keyence Software für Mikroskopie aneinander gefügt. Plaques wurden mit einem Pfeil markiert.

# 3.4.2 Immunsuppressive Wirkung von Urethanmetaboliten

Es wurde überprüft, ob mit dem PFCA eine immunsuppressive Wirkung der beiden Urethanmetaboliten N-Hydroxyurethan und Vinyl Carbamat *in vivo* nachgewiesen werden konnte. Eine Immunsuppressivität wurde für beide Substanzen in der Literatur beschrieben, die Daten wurden allerdings *in vitro* erhoben (Jeong et al. 1996).

Vinyl Carbamat wurde im PFCA an Tag 3 nach der Immunisierung positiv getestet (*Abbil*dung 3.22). Ab einer Substanzkonzentration von 20 mg/kg wurde eine Reduktion der Parameter Milzzellzahl und Milzgewicht sowie der IgM- und IgG-Plaques gemessen, die bei einer Konzentration von 60 mg/kg statistisch hoch signifikant war (p < 0, 01).

Für die Substanz N-Hydroxyurethan hingegen konnte am Tag 3 nach der Immunisierung mit SRBC keine immunsuppressive Eigenschaft detektiert werden. Es zeigte sich jedoch eine Immuntoxizität anhand eines immunstimulierenden Effekts, der bei allen drei eingesetzten Substanzkonzentration von 50 mg/kg, 150 mg/kg und 400 mg/kg für die Milzzellzahl sowie die IgM- und IgG-Plaques statistisch signifikant war (p < 0,05). Das Milzgewicht hingegen blieb unbeeinflusst.

Substanz	Viabilität beim	Immunsuppressive	
	Assay I	Assay II	Eigenschaften
N-Hydroxyurethan	$69,\!15$	67,99	Ja
Vinyl Carbamat	$88,\!13$	79,01	Ja

**Tabelle 3.21 – Zellviabilitäten der Substanzen Vinyl Carbamat und N-Hydroxyurethan im Mishell-Dutton-Test bei der Plaque IC90.** Anhand der für jeden Versuch erstellten Zytotoxizitätskurve wurde für die zuvor bestimmte Plaque IC90 die Viabilität berechnet. War diese größer 50 %, so wies die getestete Substanz immunsuppressive Eigenschaften auf.

Im Anschluss an die nachgewiesene Immuntoxizität beider Urethan-Metaboliten *in vivo* wurden N-Hydroxyurethan und Vinyl Carbamat dann entsprechend *in vitro* im Mishell-Dutton-Test auf ihre immunsuppressiven Substanzeigenschaften überprüft (*Tabelle* 3.21). Die Kulturen wurden dem Standardprotokoll entsprechend an Tag 5 nach Ansatz aufgearbeitet und ausgewertet.



Abbildung 3.22 – Plaque Forming Cell Assays mit den Urethan-Metaboliten N-Hydroxyurethan und Vinyl Carbamat nach Kurzzeitprotokoll. Weibliche NMRI-Mäuse wurden zweimal mit der im Diagramm angegebenen Dosis i.p. behandelt, drei Tage und einen Tag vor der Immunisierung. Die Graphen zeigen IgM- und IgG-Plaquezahlen pro  $1 \times 10^6$  eingesetzte Milzzellen sowie die Milzgewichte und Milzzellzahlen an Tag 3 nach der Immunisierung mit SRBC.

Beide Urethanmetaboliten wurden *in vitro* im Mishell-Dutton-Test als immunsuppressiv eingestuft. Für die Substanz Vinyl Carbamat wurden für die Plaque IC90 (2,90 mM bzw. 1,72 mM) mit 88 % und 79 % nur geringfügig reduzierte Viabilitäten der Milzzellen bestimmt. Die Plaque IC90 wurde für N-Hydroxyurethan auf die Konzentration von 0,18 mM bzw. 0,29 mM berechnet. N-Hydroxyurethan war bei dieser Konzentration stärker zytotoxisch mit 69 % und 68 % Viabilität als Vinyl Carbamat, dennoch lagen die Werte deutlich über 50 %, was für die Detektion eines spezifisch immunsuppressiven Substanzeffektes gefordert war.

# 3.4.3 PCR-Array

Um an der Mishell-Dutton-Kultur eine mögliche Metabolisierung der Substanz Urethan *in vitro* nachweisen zu können, wurde ein PCR-Array durchgeführt. Eingesetzt wurde der Mouse Drug Metabolism RT<sup>2</sup> Profiler<sup>™</sup> PCR Array, der eine zeitgleiche quantitative RNA-Analyse von 84 metabolismus-relevanten Genen ermöglichte. Zu den analysierten Genexpressionsmustern gehörten unter anderem die verschiedener P450 Cytochrome. Zu dieser Gruppe zählt auch CYP2E1, welches möglicherweise die Metabolisierung des Urethans katalysiert.




Tabelle 3.22 – Ergebnisse des an Mishell-Dutton-Kulturen durchgeführten Mouse Drug Metabolism  $\mathbb{RT}^2$  Profiler<sup>TM</sup> PCR Arrays. Angesetzt wurden Mishell-Dutton-Kulturen nach Standardprotokoll in Dreifachbestimmungen für die Zeitpunkte 0,5 h, 1 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h mit den Konzentrationen 12,5, 25 und 50 mM Urethan. Als Kontrolle dienten zu jedem der gemessenen Zeitpunkte vehikelbehandelte Zellen in Dreifachbestimmungen. Für die RNA-Isolierung wurden die Proben gepoolt, die weiteren Messungen erfolgten in Einfachbestimmungen. Basis der Auswertung war der für jede Probe auf den Mittelwert von 5 Haushaltsgenen normalisierte  $C_T$ -Wert eines jeden Genes. Eine Herauf- oder Herunterregulation der Genexpression wurde ermittelt, in dem der  $C_T$ -Wert der jeweiligen Probe ins Verhältnis zum Wert der zugehörigen vehikelbehandelten Kontrolle gesetzt wurde. War die Genexpression der Probe mehr als 4-fach erniedrigt, so wurde eine signifikante Hinunterregulation des Gens angenommen (grün markiert), war sie mehr als 4-fach erhöht, so wurde eine signifikant Hinaufregulation des Gens angenommen (rot markiert).

Die Expressionsanalyse verschiedener für den Arzneimittelmetabolismus relevanter Gene (*Tabelle 3.22*) zeigte keinen spezifischen, durch die Substanz Urethan induzierten Effekt auf

einen bestimmten Abbauweg. Vielmehr wurden unspezifisch nahezu alle Gene für Transporter, Phase I Enzyme, Phase II Enzyme und andere in einem ähnlichen Muster verstärkt exprimiert. Während die niedrigste Urethankonzentration von 12,5 mM bei kurzen Inkubationszeiten von bis zu 8 h eine generelle Herunterregulation der meisten Gene zur Folge hatte (die Ergebnisse nach 4 h Inkubation wurden aufgrund der starken Abweichung vom 1- und 8-h-Wert als Artefakt betrachtet), bewirkten längere Inkubationszeiten und steigende Substanzkonzentrationen eine generelle Heraufregulation der Genexpression.

Es waren starke Schwankungen zwischen den Proben der verschiedenen Substanzkonzentrationen zu verzeichnen, da z.B. die Proben der mit 25 mM Urethan behandelten Milzzellen im Vergleich zu den anderen Proben weniger stark reagierten. Dennoch zeigte sich bei einer Inkubationszeit von 48 h unabhängig von der eingesetzten Urethankonzentration eine Heraufregulation der Genexpression Arzneimittelmetabolismus-relevanter Gene. Für die Gruppe der P450 Cytochrome, insbesondere CYP2E1, konnte damit keine für einen Abbauweg des Urethans spezifische Genexpressionsregulierung festgestellt werden. Lange Inkubationszeiten von 48 h führten auch für dieses Gen zu einer generellen Heraufregulation der Expression. Auch wenn kein spezifischer Effekt durch das Urethan induziert wurde, so belegen die Daten dennoch, dass CYP2E1 von den Milzzellen exprimiert wurde.

#### 3.4.4 Metabolisierung von Urethan in Mishell-Dutton-Kulturen

Aus den durchgeführten Mishell-Dutton-Tests mit den Substanzen N-Hydroxyurethan und Vinyl Carbamat wurde die jeweils höchste Substanzkonzentration bestimmt, die weder einen immunsuppressiven noch einen zytotoxischen Effekt hatten. Diese Konzentration lagen für Vinyl Carbamat bei 0,3 mM und bei 0,01 mM für N-Hydroxyurethan. Mishell-Dutton-Tests mit der Substanz Urethan wurden in den folgenden Versuchen diese Konzentrationen hinzugefügt. Es wurde analysiert, wie sich das immunsuppressive Verhalten des Urethans dadurch verändert. Grundlegend für den Versuch war die Annahme, dass die Metaboliten N-Hydroxyurethan und Vinyl Carbamat in einem bestimmten Gleichgewicht gebildet werden. Liegt nun ein Metabolit bereits vor, verschiebt sich dieses Gleichgewicht zugunsten einer verstärkten Bildung des anderen.

Eine Zugabe von 0,01 mM N-Hydroxyurethan zum Mishell-Dutton-Test mit verschiedenen Konzentrationen Urethan hatte keinen nachweisbaren Effekt (*Abbildung* 3.23). Während die Viabilitätskurven der Kultur mit und ohne Urethan nahezu identisch verliefen, zeigten sich auch zwischen den Plaquezahlen keine signifikanten Unterschiede. Bei einer Urethankonzentration von 12,5 mM wurden beispielsweise Werte von 425 (Urethan) und 437 Plaques pro Platte (Urethan + N-Hydroxyurethan) gezählt.

Wurde der Kultur hingegen Vinyl Carbamat in einer Konzentration von 0,3 mM zugesetzt, so zeigte sich insbesondere bei einer Urethankonzentration von 25 mM ein hoch signifikanter Unterschied (t-Test; p < 0,01) in der mittleren Plaquezahl pro Platte. Während eine Zugabe von Vinyl Carbamat in einer Plaquezahl von 230 und entprechend 26 % der stimulierten Kontrolle resultierte, wurden bei der reinen Urethan-Kultur bei einer Konzentration von 25 mM 444 Plaques bzw. 50 % der Plaques der stimulierten Kontrolle gezählt. Dieses Ergebnis war reproduzierbar und sprach für die Induktion einer verstärkten Metabolisierung des Urethans zu



Abbildung 3.23 – Mishell-Dutton-Tests mit der Substanz Urethan unter Zusatz nicht-zytotoxischer und nicht-immunsuppressiver Substanzkonzentrationen von N-Hydroxyurethan und Vinyl Carbamat. Es wurden jeweils Parallelansätze einer reinen Urethankultur und einer mit dem jeweils hinzugefügten Metaboliten durchgeführt. Die einzusetzenden Konzentrationen der Metaboliten wurden austitriert und für N-Hydroxyurethan auf 0,01 mM und Vinyl Carbamat auf 0,3 mM bestimmt.

N-Hydroxyurethan, welches dann die erhöhte Immunsuppressivität bewirkte. Es konnte jedoch mit diesem Versuch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei der verstärkten Immunsuppressivität nicht um einen metabolischen, sondern einen rein additiven Effekt der beiden Substanzen handelte.

Um nachzuweisen, ob murine Milzzellen das Urethan überhaupt metabolisieren können, wurden Mishell-Dutton-Tests unter Zusatz von S9-Mix angesetzt. In Parallelansätzen mit und ohne S9-Mix konnte so gemessen werden, ob eine durch den S9-Mix sichergestellte Metabolisierung des Urethans abweichende Ergebnisse zur reinen Mishell-Dutton-Kultur mit Urethan hervorbringt. *Tabelle* 3.23 zeigt die Ergebnisse eines solchen Versuches, der eine hohe Reproduzierbarkeit aufwies. Während für die Kultur ohne S9-Mix bei Konzentrationen von 50 mM, 100 mM und 200

Urethan	Kontrolle		<b>Probe</b> 50 mM 100 mM 200 mM		
	unstimunert	stimuliert	50 mm	100 11111	200 11111
Viabilität (%) Plaques (%)	- 0,00 ± 31,35	$\begin{array}{rrrr} 100,00 \ \pm \ \ 7,03 \\ 100,00 \ \pm \ \ 12,86 \end{array}$	$\begin{array}{rrrr} 101,\!99 \ \pm \ \ 4,\!37 \\ 79,\!94 \ \pm \ \ 15,\!95 \end{array}$	$\begin{array}{rrrr} 108,\!17 \pm & \!$	$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$
Urethan + S9 Mix	Kontrolle unstimuliert stimuliert		50 mM	Probe 100 mM	200 mM
Viabilität (%) Plaques (%)	$0,00 \pm 65,06$	$\begin{array}{rrrr} 100,00 \ \pm \ 10,03 \\ 100,00 \ \pm \ 13,66 \end{array}$	$\begin{array}{rrrr} 102,\!02 \ \pm & 7,\!91 \\ 98,\!32 \ \pm & 16,\!01 \end{array}$	$\begin{array}{rrrr} 96,74 \ \pm \ \ 3,62 \\ 81,87 \ \pm \ \ 14,08 \end{array}$	$\begin{array}{rrrr} 98,63 \pm & 6,63 \\ 46,24 \ \pm \ 10,89 \end{array}$

**Tabelle 3.23 – Parallelansatz eines Mishell-Dutton-Tests mit Urethan mit und ohne Zusatz von S9-Mix.** Es wurden jeweils zwei Mishell-Dutton-Tests mit Urethan parallel angesetzt, dem einen wurde S9-Mix hinzugefügt, dem anderen als Kontrolle entsprechend nicht. Die Endkonzentration des S9-Mixes betrug 5 mg/ml. Die Inkubationszeit mit der Substanz und dem S9-Mix betrug 1 h, dann wurde der Überstand nach Zentrifugation der Zellen verworfen und durch frisches Medium ersetzt. Erst dann erfolgte eine Stimulation der Zellen mit SRBC. Grüne Markierung: Ein Vergleich der Werte der zwei Parallelansätze zeigt deutlich die immunsuppressions-vermindernde Wirkung, die durch den S9-Mix induziert wurde.

mM Urethan Plaquezahlen von 80 %, 70 % und 27 % der stimulierten Kontrolle gezählt wurden, lagen diese im Parallelansatz mit S9-Mix mit 98 %, 82 % und 46 % deutlich darüber. Die Zugabe von S9-Mix hatte somit eine Reduzierung der immunsuppressiven Wirkung des Urethans zur Folge. Es konnte anhand des durchgeführten Versuches allerdings nicht bestimmt werden, ob diese aufgrund einer durch den S9-Mix induzierten Metabolisierung des Urethans auftrat oder aber aufgrund einer Verstärkung einer bereits bestehenden Metabolisierung durch die murinen Milzzellen.



Abbildung 3.24 – Etablierung des Diethyldithiocarbamat(DDC)-Zusatzes im Mishell-Dutton-Test. Es wurden jeweils zwei Parallelansätze einer Mishell-Dutton-Kultur vorbereitet. Der einen wurde DDC hinzugefügt, der anderen als Kontrolle entsprechend nicht. Nach 7 min Vorinkubation mit 10  $\mu$ M DDC wurden der S9-Mix und das Cyclophosphamid in entsprechender Konzentration bzw. der Vehikel hinzugefügt. Nach 1 h Gesamtinkubation der Zellen mit DDC wurden die Überstände verworfen und eine Stimulation mit SRBC durchgeführt. Die Aufarbeitung und Auswertung der Kultur erfolgte an Tag 5.

Zum Nachweis einer möglichen Metabolisierung des Urethans durch murine Milzzellen wurde mit Diethyldithiocarbamat (DDC) ein nicht-selektiver CYP2E1-Inhibitor eingesetzt. Da dieser ebenfalls die Wirkung des P450 Cytochroms CYP2B6 hemmt, wurde seine Verwendung zunächst an einem Mishell-Dutton-Testt mit Cyclophosphamid und S9-Mix etabliert.

DDC hatte eine stark zytotoxische Wirkung auf murine Milzzellen und war zudem stark flüchtig. Bei allen Experimenten wurde daher die generelle Ausbildung der humoralen Immunreaktion der Kulturen auf 300 bis 400 Plaques pro Platte reduziert. Dies betraf somit auch die Kontrollen, denen kein DDC direkt zugesetzt wurde, da sich der unter gleichen Bedingungen durchgeführte Parallelansatz mit DDC im selben Brutschrank befand. Eine separate Inkubation der Kontrollen in einem anderen Brutschrank wurde nicht in Betracht gezogen, weil dann eine Gleichheit der Bedingungen nicht mehr gegeben gewesen wäre. Dennoch konnte durch das DDC ein reproduzierbarer inhibitorischer Effekt auf die Kulturen mit S9-Mix erzielt werden, der sich in einer weniger starken spezifischen Suppression der IgM-Plaques durch das Cyclophosphamid zeigte.



Abbildung 3.25 – Mishell-Dutton-Test mit Urethan unter Zugabe von DDC. Es wurden jeweils zwei Parallelansätze der Mishell-Dutton-Kultur vorbereitet. Der einen Kultur wurde DDC hinzugefügt, der anderen als Kontrolle entsprechend nicht. Nach 7 min Vorinkubation mit 2  $\mu$ M DDC wurde das Urethan in entsprechender Konzentration bzw. der Vehikel hinzugefügt. Nach 1 h Gesamtinkubation der Zellen mit DDC wurden die Überstände verworfen und eine Stimulation mit SRBC durchgeführt. Die Aufarbeitung und Auswertung der Kultur erfolgte an Tag 5.

Abbildung 3.24 zeigt die Ergebnisse eines solchen Experimentes. Während die Plaquezahlen der stimulierten Kontrollen nahezu identisch waren (ein Mittelwert von 383 Plaques der nicht

DDC-behandelten Kontrolle im Vergleich zu 356 Plaques der DDC-behandelten Kontrolle), zeigte sich ab einer Konzentration von 0,3 mM Cyclophosphamid eine durch DDC supprimierte Metabolisierung. Während in den nicht DDC-behandelten Proben mit 0,3 mM Cyclophosphamid durchschnittlich nur 204 Plaques pro Plattte gezählt wurden, waren es unter DDC-Zugabe 281. Bei einer Konzentration von 1 mM Cyclophosphamid wurden nach DDC-Behandlung 62 Plaques gezählt, ohne den Inhibitor waren es mit 32 Plaques nur die Hälfte. Der Unterschied war statistisch signifikant (t-Test; p < 0, 05).

Aufgrund eines additiven zytotoxischen Effektes der beiden Carbamate DDC und Urethan wurde die DDC-Konzentration von 10  $\mu$ M auf 2  $\mu$ M abgesenkt. Dies resultierte im Vergleich zu den vorangegangenen Versuchen mit Cyclophosphamid in einer Erhöhung der generellen Plaquezahl auf ca. 800 Plaques pro Platte. Wurde das DDC nun Mishell-Dutton-Kulturen mit Urethan als Testsubstanz zugesetzt, konnte auch dort eine teilweise Inhibierung des immunsuppressiven Substanzeffektes erzielt werden (*Abbildung* 3.25). Wurden bei der höchsten eingesetzten Substanzkonzentration von 200 mM Urethan nur 652 Plaques entsprechend 71 % der stimulierten Kontrolle gemessen, so reduzierte eine Zugabe von 2  $\mu$ M DDC diese Suppression statistisch signifikant (t-Test; p < 0,05) auf 743 Plaques entsprechend 92 % der stimulierten Kontrolle. Die Inhibierung von P450 Cytochromen in der Mishell-Dutton-Kultur verringerte somit die immunsuppressiven Effekte des Urethans.

# Kapitel 4

## Diskussion

Die Diskussion gliedert sich wie der Ergebnisteil in vier Abschnitte. Zunächst werden die Ergebnisse der Mitogenstimulationsversuche diskutiert und anschließend die Etablierung und Optimierung von Mishell-Dutton-Kulturen mit murinen Milzzellen sowie deren Übertragbarkeit auf Zellen anderen Ursprungs besprochen. Im Dritten Abschnitt erfolgt die Diskussion des Einsatzes von Mishell-Dutton-Tests an murinen Milzzellen zur Detektion immunsuppressiver Substanzeffekte *in vitro*. Der vierte Abschnitt befasst sich mit der Substanz Urethan und deren Mechansimus der Induktion einer Immunsuppression *in vivo* und *in vitro*.

### 4.1 Mitogenstimulationsversuche zur Detektion immunsuppressiver Substanzeffekte *in vitro*

Mitogenstimulationsversuche, durchgeführt an Milzzellen, peripheren mononukleären Zellen (PB-MC), T-Zelllinien und dendritischen Zellen unterschiedlicher Spezies, wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen auf eine korrekte Detektion immuntoxischer Substanzeffekte in vitro analysiert (Hymery et al. 2006, Ringerike et al. 2005, Langezaal et al. 2002; 2001, Lebrec et al. 1995). Dabei wurden mit Proliferationsanalysen, den Bestimmungen von auf der Zelloberfläche befindlichen Aktivierungsmarkern sowie Quantifizierungen der Ausschüttungen verschiedener Zytokine und deren Genexpression verschiedenste Endpunkte gewählt. Dennoch konnte bisher aus keinem dieser Ansätze eine Methode entwickelt werden, die eine ausreichend hohe Sensitivität und Spezifität aufweist, um als Tierversuchsersatzmethode Eingang in die behördlichen Richtlinien zu finden. 2007 wurde in einer ECVAM-Studie ein Vergleich verschiedener Methoden und Endpunkte der Mitogenstimulation durch den Einsatz von Zellen der Ratte, der Maus und des Menschen in Analysen zur Zytotoxizität, Myelotoxizität, Zytokinausschüttung und Zellproliferation durchgeführt (Carfi' et al. 2007). Anhand der dort gewonnenen Ergebnisse wurde eine Optimierungsstudie zur Evaluierung immuntoxischer Substanzeffekte in vitro unter dem Projektnamen CCR.IHCP.C432293.X0 "Optimisation of in vitro immunotoxicity" mit Beteiligung verschiedener Labore in Europa initiiert, um erneut die korrekte Vorhersage immunsuppressiver Substanzeffekte mit der Methode der Mitogenstimulation zu überprüfen. Die für diese Arbeit durchgeführten Versuche waren Teil dieses Projekts.

Eingesetzt wurden sieben immunsuppressive Standardsubstanzen und eine Negativkontrolle. Die Versuche wurden zum Vergleich zweier Spezies mit Milzzellen der Ratte (Männchen des Stammes Wistar) und der Maus (Weibchen des Stammes C3H) durchgeführt. Bestimmt wurden für jede Substanz und Spezies die Viabilitäten im LDH- und im Resazurin-Assay, sowie in den Mitogenstimulationen mit ConA und LPS dann die Proliferation (BrdU-ELISA) und die Ausschüttung der Zytokine TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  (ELISA). Der LDH- und der Resazurin-Assay wurden dabei bewusst an unstimulierten Zellen durchgeführt, da bestimmte immunsuppressive Substanzen wie Methotrexat *in vitro* eine spezifische stimulations-abhängige Apoptose induzieren (Paillot et al. 1998). Nur so konnte eine klare Trennung eines solchen spezifischen immunsuppressiven Effekts gegenüber einer unspezifischen Zytotoxizität sichergestellt werden.

Die Ergebnisse der beiden verschiedenen Viabilitätsassays, des überstand-basierten LDH-Assavs und des zell-basierten Resazurin-Assavs, zeigten sowohl für die murinen Milzzellen als auch die der Ratte, wie wichtig die Auswahl des Viabilitätstests für eine spätere Interpretation der Ergebnisse ist. Werden die gemessenen Endpunkte immunkompetenter Zellen von einer Substanz beeinflusst und supprimiert, so heißt dies noch lange nicht, dass es sich dabei auch um einen spezifischen immunsuppressiven Effekt handelt. Eine unspezifische Zvtotoxizität kann ebenfalls zu diesem Resultat führen, wie beispielsweise von Ringerike et al. (2005) anhand einer Herunterregulation der IL-2 Expression einer T-Zelllinie nach Exposition gegenüber dem Irritanten SDS beschrieben wurde. Um eine Unterscheidung zwischen unspezifischem, zytotoxischem Effekt und spezifischem, immunsuppressivem Effekt durchführen zu können, ist der Bezug der Messwerte zu entsprechenden Viabilitätsdaten unerlässlich. Nun stellt sich allerdings die Frage, welcher Viabilitätstest eingesetzt werden sollte. Die auf sehr unterschiedlichen Methoden basierenden Resazurin- und LDH-Assays zeigten für bestimmte Substanzen an Zellen derselben Spezies stark abweichende Ergebnisse. Mit murinen Milzzellen trat dies beim Einsatz der Substanz Benzo(a)pyren auf, bei Rattenmilzzellen hingegen mit Cyclosporin A, Dexamethason und Rapamycin sogar bei drei verschiedenen Substanzen. Die Art der Abweichung war jeweils identisch, da der Resazurin-Assay bereits zytotoxische Effekte anzeigte, bei denen mittels LDH-Assay noch keine Reduktion der Zellviabilität gemessen werden konnte.

In der Literatur finden sich wenig vergleichende Studien verschiedener Viabilitätsassays. In einer Studie mit der Danio rerio Leberzellinie ZFL wurden vier Viabilitätsassays getestet, wobei der LDH-Assay die höchste Variabilität und das niedrigste Verhältnis zwischen Signal und Hintergrund zeigte, sowie häufig die höchsten oder niedrigsten EC-Werte produzierte (Bopp und Lettieri 2008). Die Autoren empfahlen eine Verwendung des Resazurin-Assays. Für die vom Schwein stammende Nierenzelllinie LLC-PK1 konnte gezeigt werden, dass bestimmte Substanzen im Resazurin-Assay deutlich zytotoxisch waren, ohne dass eine vermehrte Freisetzung von LDH ins Kulturmedium gemessen werden konnte (Kendig und Tarloff 2007). Die Autoren vermuteten eine Degradierung des LDHs durch die Substanzen. Für Leberzellen des Rattenstammes Wistar in einer Sandwichkultur unter Exposition gegen Xenobiotika hingegen zeigte sich der LDH-Assay deutlich sensitiver als der Resazurin-Assay (Kemp und Brouwer 2004). Diese Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen verdeutlichen, wie wichtig es ist, für den Zelltyp und die Spezies, die für den eigentlichen Versuch eingesetzt werden sollen, den optimalen Viabilitätstest zu finden und vorher auszutesten. Für die Mitogenstimulationsversuche an Milzzellen der Ratte und der Maus lässt sich eine direkte Degradierung von LDH durch die eingesetzten Substanzen ausschließen, da für beide Spezies unterschiedliche Substanzen die konträren Ergebnisse der beiden Viabilitätsassays bewirkten. Problematisch scheint auf jeden Fall der Einsatz des LDH-Assays in Kombination mit Immunophilin-bindenden Substanzen und Milzzellen des Rattenstammes Wistar zu sein, da hier für die beiden eingesetzten Substanzen Rapamycin und Cyclosporin A keine Zytotoxizität bestimmt werden konnte, während im Resazurin-Assay bereits eine deutliche Reduzierung der Zellviabilität gemessen wurde. Der einzige Fall, bei dem der LDH-Assay eine Zytotoxizität anzeigte, die im Resazurin-Assay nicht detektiert wurde, war bei einer Exposition muriner Milzzellen mit 300 µM Methotrexat. Dennoch war für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche mit Milzzellkulturen der Resazurin-Assay dem LDH-Assay überlegen, weil sich die Methode als insgesamt sensitiver darstellte und keinerlei Probleme beim Nachweis der Zytotoxizität einer bestimmten Gruppe immunsuppressiver Substanzen wie beim LDH-Assay auftraten.

Die Ergebnisse der Proliferationsanalyse und der Messung der freigesetzten Zytokine TNF $\alpha$ und IFN $\gamma$  wurden entsprechend auf die Viabilitätsdaten bezogen, um suppressive Effekte als spezifisch oder unspezifisch kennzeichnen zu können. Die eingesetzte Negativkontrolle D-Mannitol beeinflusste keinen der gemessenen Endpunkte und wurde somit sowohl beim Einsatz von murinen als auch von Rattenmilzzellen korrekt als nicht-immunsuppressiv klassifiziert. Die Substanz verursachte im eingesetzten Konzentrationsbereich allerdings auch keine Reduktion der Zellviabilität. Es verbleibt somit unklar, welche Auswirkungen rein zytotoxische Substanzen auf die Parameter Zellproliferation und die Ausschüttung der Zytokine TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  hätten, und ob gemessene Suppressionen dann auch wie angenommen tatsächlich mit einer Zytotoxizität korrelieren würden. Sollten weitere Analysen zur korrekten Detektion immuntoxischer Substanzeffekte mit Mitogenstimulationen durchgeführt werden, wäre eine entsprechende Erweiterung der Gruppe nicht-immunsuppressiver Substanzen unerlässlich.

Korrekt detektiert wurden mit Zellen beider Spezies die immunsuppressiven Substanzen Cyclophosphamid, Cyclosporin A, Methotrexat und Rapamycin. Im murinen Versuch konnte zudem die Immuntoxizität von Dexamethason nachgewiesen werden, an Rattenzellen die von Benzo(a)pyren. Der Einsatz von Rattenmilzzellen zeigte sich dennoch als weniger sensitiv, da bei separater Betrachtung beider Stimulationsarten in den Versuchen mit murinen Milzzellen insgesamt mehr immunsuppressive Effekte detektiert wurden. Spezies-spezifische Differenzen zwischen Lymphozyten der Ratte und der Maus sind für proliferative Antworten nach Exposition gegen immuntoxische Substanzen seit längerem bekannt. Lang et al. (1993) konnten zeigen, dass die Proliferation von Milzzellen des Rattenstammes Fischer344 nach PHA-, anti-CD3-Antikörperund *Salmonella-typhimurium*-Mitogen-Stimulation deutlich stärker durch Cyclosporin A supprimiert wird als die durch PHA, anti-CD3-Antikörper und LPS ausgelöste Stimulation von Milzzellen des Mausstammes B6C3F1. Diese Ergebnisse korrelieren mit denen der hier durchgeführten Versuche mit Milzzellen von Wistarratten und C3H-Mäusen, in denen sich die Rattenzellen ebenfalls als suszeptibler erwiesen. Hintergrund war allerdings eine im Resazurin-Assay gemessene Zytotoxizität, die bei den murinen Zellen nicht auftrat.

Auffallend ist, dass in den Mitogenstimulationsversuchen die Substanz Urethan generell nicht korrekt klassifiziert werden konnte. Die Substanz ist eindeutig als immunsuppressiv einzustufen, gehörte sie doch unter anderem zu den positiven Standardsubstanzen der Studie zur Bestimmung der Sensitivität und Vorhersagbarkeit verschiedener Immuntests zur Risikobewertung von Substanzen in der Immuntoxikologie (Luster et al. 1992). Nach einer Applikation *in vivo* konnten Luebke et al. (1987) und Luster et al. (1982) eine dosisabhängige Reduktion der Proliferation muriner Milzzellen nach Stimulation mit ConA, PHA und LPS messen. Grund für das hier vorliegende falsch-negative Ergebnis ist möglicherweise eine mangelnde Sensitivität des Assays, oder aber der Einsatz zu niedriger Substanzkonzentrationen. Da im gemessen Konzentrationsbereich bis 1 mM kein zytotoxischer Effekt detektiert wurde, wäre eine Erhöhung der Urethankonzentration möglich, um zu testen, ob sich dann spezifische immunsupressive Effekte induzieren lassen. Für das gesamte Projekt wurde jedoch eine generelle Maximalkonzentration von 1 mM festgelegt, die in den Experimenten nicht überschritten werden sollte, so dass diese Maßnahme nicht ergriffen wurde.

Betrachtet man die Ergebnisse der Mitogenstimulationen von murinen Milzzellen, so konnte unter Verwendung der Viabilitätsdaten des Resazurin-Assays mit Benzo(a)pyren eine weitere von Luster et al. (1992) als Standardimmunsuppressivum verwendete Substanz nicht korrekt klassifiziert werden. Dieses zweite falsch-negative Resultat könnte eine mangelnde Sensitivität des Versuches belegen, oder aber aufgrund einer fehlenden Metabolisierung von Substanzen durch murine Milzzellen aufgetreten sein- Es ist bekannt, dass erst ein Metabolit des Benzo(a)pyrens die immunsuppressive Wirkung ausübt (Goeptar et al. 1995), Ähnliches gilt möglicherweise auch für die Substanz Urethan (Hoffler et al. 2003, Guengerich und Kim 1991).

Mit den Mitogenstimulationsversuchen an Rattenmilzzellen konnte neben der immunsuppressiven Wirkung des Urethans bei einer Bewertung der Messwerte anhand der Viabilitätsdaten des Resazurin-Assays auch die der Substanz Dexamethason nicht detektiert werden. Da Dexamethason keiner weiteren Aktivierung bedarf, kann in diesem Fall die mangelnde Sensitivität des Versuches nicht auf eine fehlende oder unzureichende Substanzmetabolisierung durch die eingesetzten Zellen zurückgeführt werden.

Betrachtet man die Versuchsergebnisse einiger vermeintlich korrekt klassifizierter Substanzen genauer, so erscheinen auch diese zum Teil zweifelhaft. Cyclosporin A wurde zwar nach den festgelegten Kriterien, nämlich der zytotoxizitäts-unabhängigen Suppression mindestens eines Endpunktes in einer der zwei Mitogenstimulationen, als immunsuppressiv detektiert, bemerkenswert ist dabei allerdings, dass die Proliferation der B-Zellen deutlich stärker eingeschränkt war als die der T-Zellen. Eine vermehrte Suppression der T-Zellaktivität nach *in vivo* oder *in vitro* Applikation wäre bei dieser Substanz allerdings zu erwarten gewesen (Vandebriel et al. 1999, Lang et al. 1993, Alberti et al. 1981), die Ergebnisse sind daher fragwürdig. Zwar wird angenommen, dass Cyclosporin A neben den bekannten Effekten auf T-Zellen, die in einer Inhibierung der IL-2-Sekretion resultieren, auch andere Zelltypen, wie mononukleäre Phagozyten, inhibiert (Sovcikova et al. 2002), ein direkter Einfluss auf B-Zellen besteht jedoch nicht (Heidt et al. 2010, Salinas-Carmona et al. 2009).

Eine weitere Substanz, die bei der Verwendung von Milzzellen beider Spezies unerwartete Ergebnisse produzierte, war Cyclophosphamid. Die Substanz ist ein Zytostatikum, welches die Zellteilung hemmt. Dieses Phänomen sollte in Mitogenstimulationsversuchen deutlich in der Proliferationsmessung sichtbar sein. In einer *ex vivo* Studie an Mäusen (Stockman et al. 1973) konnte ein suppressiver Effekt des Cyclophosphamids auf die PHA- und PWM-vermittelte Proliferation von T- und B-Zellen der Milz, gemessen am Einbau radioaktiv markierten Thymidins, nachgewiesen werden, wobei B-Zellen stärker und für einen längeren Zeitraum inhibiert wurden als T-Zellen. In den hier präsentierten Versuchen zeigte sich weder für die Ratten- noch für die murinen Milzellen nach Stimulation mit ConA oder LPS eine Suppression der Proliferation durch Cyclophosphamid. Inhibiert wurde hingegen in allen Versuchen die Ausschüttung der Zytokine TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$ , wobei diese verstärkt bei niedrigen Substanzkonzentrationen auftrat. Cyclophosphamid muss bekannterweise erst zu 4-Hydroxycyclophosphamid metabolisiert werden, um als Zytostatikum und damit auch Immunsuppressivum zu wirken. Die Ergebnisse lassen bezweifeln, dass die Substanz Cyclophosphamid *in vitro* von den Milzzellen metabolisiert wurde, denn dann wäre eine deutliche Suppression der Proliferation zu erwarten gewesen. Da Cyclophosphamid an sich keine immunsuppressive Wirkung hat, ist fraglich, ob es sich bei der gemessenen Reduktion bzw. Inhibierung der Zytokinausschüttung tatsächlich um einen spezifischen Effekt handelt oder ob das Cyclophosphamid im niedrigen Konzentrationsbereich den Nachweis der Zytokine oder deren Ausschüttung in einer anderen Art und Weise beeinflusst.

Auch mit der zweiten Substanz aus der Gruppe der Zytostatika, dem Methotrexat, konnten zum Teil nicht die erwarteten Ergebnisse erzielt werden. Wurden Kulturen muriner Milzzellen eingesetzt, so konnte lediglich für die IFN $\gamma$ -Ausschüttung nach LPS-Stimulation ein spezifischer immunsuppressiver Effekt gemessen werden. Bei Rattenzellen hingegen inhibierte Methotrexat die Zellproliferation nach ConA-Stimulation. Dieser Effekt wäre auch für die murinen Milzzellen zu erwarten gewesen, da für das Zytostatikum in *ex vivo* Versuchen an murinen Milzzellen die Induktion einer aktivierungsspezifischen Apoptose von T-Zellen nach ConA-Stimulation beschrieben wurde (Paillot et al. 1998).

Neben diesen substanzspezifischen Problemen können für die Mitogenstimulationsversuche weitere generelle Schwierigkeiten der Detektion immunsuppressiver Substanzeffekte aufgezeigt werden. Ein generelles Problem ist die Beschränkung des Versuches auf bestimmte Zelltypen. LPS aktiviert B-Zellen und Makrophagen, ConA hingegen wirkt nur auf T-Zellen stimulierend. Da auch die meisten immuntoxischen Substanzen ebenfalls beschränkt nur auf bestimmte Zelltypen wirken, war es für die Planung der Versuche unerlässlich, zumindest zwei Mitogene einzusetzen, um die durch verschiedenste Mechanismen hervorgerufenen immunsuppressiven Wirkungen der einzelnen Substanzen auch *in vitro* nachweisen zu können. Dennoch bleibt fraglich, ob eine Stimulation mit zwei verschiedenen Mitogenen ausreicht. Für Cyclosporin A beispielsweise konnte nach einer Applikation *in vivo* eine selektive Suppression T-Zell-vermittelter Funktionen muriner Milzzellen anhand einer deutlich supprimierten proliferativen Antwort auf eine PHA-Stimulation nachgewiesen werden, während die auf ConA nur minimal und die auf LPS gar nicht eingeschränkt war (Alberti et al. 1981). Es wurden somit selbst mit zwei verschiedenen T-Zell-Aktivatoren, wie PHA und ConA, abweichende Ergebnisse erzielt.

Es stellt sich zudem die Frage, ob für die Analyse der Mitogenstimulationen die Endpunkte Proliferation und Ausschüttung der Zytokine  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IFN}\gamma$  genügen. Es war unumgänglich, die Analyse auf einige ausgewählte Endpunkte zu beschränken, um die Zahl der durchzuführenden Versuche nicht zu groß werden zu lassen. Dennoch bleibt unklar, ob sich so auch alle Auswirkungen immunsuppressiver Substanzen detektieren lassen. Einige Substanzen wirken nicht nur beschränkt auf einen speziellen Zelltyp, sondern möglicherweise auch auf bestimmte Endpunkte. Eine Restriktion auf einen bestimmten Endpunkt zeigte sich in unseren Versuchen beispielsweise deutlich mit der Substanz Methotrexat sowohl beim Einsatz von murinen als auch von Rattenmilzzellen.

Abschließend lässt sich festhalten, dass der Einsatz von Mitogenstimulationen zur Detektion immunsuppressiver Substanzeffekte generell fragwürdig ist. Selbst beim Einsatz gut erforschter Standardsubstanzen traten mit dieser Methode viele Probleme auf, die eine sichere Einstufung der gemessenen Substanzeffekte in die Kategorien immunsuppressiv und nichtimmunsuppressiv zum Teil verhinderten. Es konnten mit den Versuchen der gesamten Optimierungsstudie CCR.IHCP.C432293.X0 "Optimisation of *in vitro* immunotoxicity" keine einheitlichen und reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden, weder innerhalb eines Labores noch beim Vergleich der fünf teilnehmenden Labore untereinander. Es ist daher durch Mitogenstimulationen, zumindest in der jetzigen Form der Versuche, nicht möglich, bisher unerforschte Substanzen korrekt zu klassifizieren.

#### 4.2 Aufbau und Etablierung von Mishell-Dutton-Kulturen

Als eine weitere potenzielle Tierversuchsersatzmethode zur Analyse immuntoxischer Substanzeffekte wurde die Mishell-Dutton-Kultur etabliert. Sie basiert auf der Entwicklung einer spezifischen humoralen Immunreaktion gegen SRBC und ist damit das in vitro Äquivalent zum Plaque Forming Cell Assay (PFCA). Im Gegensatz zu den Mitogenstimulationen werden dabei nicht nur anhand willkürlich festgelegter Endpunkte bestimmte immunsuppressive Mechanismen von Substanzen detektiert, sondern multiple immunologische Prozesse in ihrem komplexen Zusammenspiel analysiert. Man spricht daher auch von einem immunologischen Funktionstest. Mit dem PFCA konnten zum einen hohe korrekte Vorhersageraten für die Immuntoxizität von Substanzen erzielt werden, und zum anderen wurden durch seine Kombination mit anderen Methoden. wie der Bestimmung der Zahl peripherer Leukozyten oder der MLR, auch deren Prädiktivität weiter verbessert (Luster et al. 1993b; 1992; 1993a; 1988). Eine Mishell-Dutton-Kultur erfordert, genau wie der PFCA, eine Interaktion von antigen-präsentierenden Zellen (Makrophagen), T-Zellen und B-Zellen. In der Mishell-Dutton-Kultur sollte daher ebenfalls, wie von Luster et al. (1992) für den PFCA beschrieben, jede Substanz-induzierte Veränderung der Prozessierung von Antigenen und ihrer Präsentation, der Synthese und Ausschüttung von Zytokinen sowie der Zellproliferation, -differenzierung und -sekretion die Immunreaktion gegen die SRBC modifizieren. Eine erfolgreiche Etablierung und Optimierung der Mishell-Dutton-Kultur würde also die Durchführung eines immunologischen Funktionstests auch in vitro ermöglichen. Es war entsprechend davon auszugehen, dass eine solche Methode auch in vitro die höchste Prädiktivität für immuntoxische Substanzeffekte aufweist.

#### 4.2.1 Mishell-Dutton-Kulturen mit murinen Milzzellen

Der Aufbau und die Etablierung von Mishell-Dutton-Kulturen erfolgten zunächst an murinen Milzzellen entsprechend der von Mishell und Dutton (1966) erstmals beschriebenen Methode. Eine Optimierung war notwendig, da nach bekannten Protokollen (Click et al. 1972a;b, Cosenza et al. 1971, Dutton und Mishell 1967, Mishell und Dutton 1966) keine für eine Substanzanalyse ausreichende humorale Immunreaktion *in vitro* ausgelöst werden konnte. Die ermittelten Plaquezahlen waren dafür zu gering.

Generell wurde in den älteren, bereits erwähnten Veröffentlichungen MEM als Kulturmedium eingesetzt, welches sich auch in den hier durchgeführten Versuchen in Form des neueren serumreduzierten advanced D-MEM gegenüber dem später für Mishell-Dutton-Kulturen verwendeten RPMI (Ban et al. 1995, Kawabata und White 1987, White und Holsapple 1984) überlegen zeigte. Als Behältnis für die Kulturen erwiesen sich 24-Well-Platten als optimal, die auch schon von Ban et al. (1995) eingesetzt wurden. In den frühen Protokollen wurden Petri-Schalen verwendet (Click et al. 1972a;b, Cosenza et al. 1971, Dutton und Mishell 1967, Mishell und Dutton 1966), wobei die Kulturvolumina mit 1 bis 2 ml pro Schale im Vergleich zu den hier eingesetzten 1 ml pro Well nicht wesentlich verändert wurden. Andere Kulturbehältnisse wurden lediglich von Marbrook (1968; 1967) in Form einer speziellen Kammer eingesetzt, die das Zellwachstum auf Dialysemembranen unter Versorgung mit Medium aus einem Reservoir ermöglichte.

In all den Veröffentlichungen zum Thema Mishell-Dutton-Kultur fanden sich immer wieder leichte Variationen bei der Zahl der eingesetzten Milzzellen und der Zahl der SRBC zur Immunisierung. Dabei handelt es sich um Parameter, die von Labor zu Labor variieren können und von daher, wie es auch für die hier vorliegende Arbeit getan wurde, individuell austitriert werden sollten. Bereits in den frühen Protokollen zur Mishell-Dutton-Kultur ergaben sich unterschiedliche Meinungen zu der Frage, ob die Kulturen stationär gehalten oder geschüttelt werden sollten. Während Mishell und Dutton (1966) und auch Cosenza et al. (1971) die Kulturen auf Rüttlern platzierten, bevorzugten Click et al. (1972a;b) und Marbrook (1968; 1967) stationäre Kulturen. Ein direkter Vergleich für die hier präsentierte Arbeit zeigte eindeutig höhere Plaquezahlen für stationäre Kulturen.

Die zwei entscheidenden Parameter, die letztendlich zu einer starken Steigerung der Plaquezahlen geführt haben, waren die Chargentests foetaler Kälbersera (FCS) und die Verwendung von Primocin<sup>TM</sup>. Nach älteren Protokollen wurde das Kulturmedium entweder mit Penicillin/Streptomycin supplementiert (Ban et al. 1995, Kawabata und White 1987, Click et al. 1972a;b) oder ohne Zusatz von Antibiotikia belassen (Cosenza et al. 1971, Marbrook 1968; 1967, Dutton und Mishell 1967, Mishell und Dutton 1966). Im Vergleich zum Penicillin/Streptomycin zeigte sich das hier eingesetzte Primocin<sup>™</sup> überlegen. Neben einer deutlichen Erhöhung der Plaquezahl war ein weiterer Vorteil, dass seit der Verwendung von Primocin<sup>TM</sup> keine Kontaminationen mehr auftraten. Grund dafür könnte sein, dass weniger Bakterienstämme gegen dieses Antibiotikum resistent sind als dies beim Penicillin/Streptomycin der Fall ist. Der Chargentest des FCS zeigte deutlich, dass große Varianzen zwischen einzelnen FCS-Chargen auftreten und es für eine Optimierung des Versuches unerlässlich ist, eine Charge zu finden, die für diese Art der Zellkultur optimale Bedingungen bietet. Eine Analyse des optimalen Zeitpunktes zur Aufarbeitung der Kulturen legte diesen auf Tag 5 fest. Diese Ergebnisse korrelieren mit einigen Protokollen (Ban et al. 1995, Kawabata und White 1987), andere hingegen bestimmen die Plaquezahl bereits an Tag 4 (Click et al. 1972a;b, Cosenza et al. 1971).

Durch die verschiedenen Optimierungsschritte konnten schließlich reproduzierbar etwa 1000 Plaques pro Platte erzielt werden, die die für eine erfolgreiche Etablierung und Optimierung der Mishell-Dutton-Kultur geforderte Zahl von mindestens 500 Plaques pro Platte deutlich überstiegen. Somit wurde ein ausreichend großes Spektrum für eine Differenzierung immunsuppressiver und zytotoxischer Substanzeffekte geschaffen.

#### 4.2.2 Mishell-Dutton-Kulturen mit Milzzellen der Ratte

Da die Ratte die Standardspezies in der Toxikologie ist (Gill et al. 1989), wurde nach dem erfolgreichen Aufbau der Mishell-Dutton-Kultur mit murinen Milzzellen versucht, das Verfahren auf Milzzellen der Ratte zu übertragen. Eingesetzt wurden zunächst Zellen des Rattenstammes Wistar, da an diesem Auszuchtstamm in der Regel der PFCA durchgeführt wird (Vohr und Ruehl-Fehlert 2001, Vohr 1995), und ein Auszuchtstamm den Vorteil einer natürlichen genetischen Varianz hat, wie sie auch beim Menschen vorkommt.

Es zeigte sich jedoch bereits in den ersten Versuchen, dass große Unterschiede zwischen Milzzellen der Ratte und der Maus bzw. ihrem Verhalten in Kultur bestehen (Haley 2003), da sich das an murinen Zellen optimierte Versuchsprotokoll nicht ohne Weiteres auf die Zellen der Ratte übertragen ließ. Auch nach verschiedenen Veränderungen, wie dem Einsatz anderer Medien und einer erneuten Titration der Milzzellzahl und der Zahl der eingesetzten SRBC, konnte keine humorale Immunantwort *in vitro* ausgelöst werden. Die Inhibierung der Immunreaktion lag offensichtlich nicht nur darin begründet, dass die für murine Zellen optimierten Parameter für die Rattenzellen suboptimal waren, sondern vielmehr grundlegende Differenzen zwischen den zwei Spezies bestehen. Ziel der weiteren Versuche war es, die Ursache der Inhibierung der humoralen Immunreaktion von Rattenmilzzellen *in vitro* ausfindig zu machen und entsprechend das Protokoll der Mishell-Dutton-Kultur anzupassen, um eine ausreichende Zahl von Plaques für eine spätere Substanzanalyse zu generieren.

Die Vermutung, dass die Zahl der antigenpräsentierenden Zellen (APC) in der Kultur zu gering war, um eine humorale Immunreaktion zu initiieren, bestätigte sich nicht. Auch nach Zusatz weiterer APCs in Form von peritonealen Makrophagen zeigten sich weiterhin keine Plaques in der Auswertung der Versuche. Für murine Milzzellen konnte hingegen gezeigt werden, dass ein solcher Zusatz die Zahl der Plaques erhöht (Hoffmann 1970).

Betrachtet man bestehende Protokolle verschiedener Arbeitsgruppen für den Einsatz humaner peripherer mononukleärer Zellen in Mishell-Dutton-Kulturen, sehen diese einen generellen Zusatz von Mitogenen bzw. polyklonalen B-Zell-Aktivatoren wie Pokeweed Mitogen (PWM) vor (Fauci 1979), oder es werden dadurch Steigerungen der Plaquezahlen erzielt (Dosch et al. 1977). Aus diesem Grund wurde versucht, durch die unspezifische zusätzliche Stimulation der B-Zellen durch PWM oder der T-Zellen durch ConA eine Bildung spezifischer Plaques gegen die SRBC zu induzieren. Die humorale *in vitro* Immunreaktion blieb jedoch weiterhin aus.

Durch eine unspezifische Stimulation mit Mitogenen wird eine Expression und Sezernierung von Interleukinen ausgelöst, die unter anderem essenziell ist für das Einsetzen der Zellproliferation. IL-2 wird für die Proliferation der T-Zellen und IL-4 für die der B-Zellen benötigt. Da in den Versuchen mit Zusatz von Mitogenen nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die unspezifische Stimulation möglicherweise die spezifische Stimulation mit SRBC überlagert oder diese möglicherweise sogar inhibiert, wurde den Kulturen in weiteren Experimenten statt Mitogenen direkt IL-2 und IL-4 zugesetzt. Für humane B-Zellen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass neben einer Stimulierung des CD40-Rezeptors die Verfügbarkeit der Interleukine 2, 6 und 10 für die Differenzierung zu IgM-sezernierenden Plasmazellen essenziell ist (Lu et al. 2009). Da möglicherweise auch diese Kombination an Interleukinen von Rattenmilzzellen nicht in ausreichendem Maße exprimiert bzw. sezerniert wird, wurden in weiteren Versuchen auch diese Interleukine in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Sowohl die Zugabe von IL-2 und IL-4 allein und in Kombination als auch die von IL-2, IL-6 und IL-10 in Kombination konnten jedoch die bestehende Inhibierung der humoralen Immunreaktion gegen SRBC nicht aufheben. Gleiches galt für den Zusatz von ConA-Überständen. Sie wurden verwendet, um den Mishell-Dutton-Kulturen unspezifisch Zytokine zuzusetzen, die von T-Zellen exprimiert und sezerniert werden. Zwar konnte in der Form der hier durchgeführten Versuche nicht jedes Zytokin isoliert analysiert werden, ein Fehlen oder eine zu niedrige Konzentration eines bestimmten Zytokins oder einer Zytokinkombination als Ursache für das Ausbleiben der Entwicklung einer humoralen *in vitro* Immunreaktion ist jedoch als unwahrscheinlich zu betrachten.

Eine weitere mögliche Ursache für die Inhibierung der humoralen in vitro Immunreaktion konnte ein nicht ausreichender Zell-Zell-Kontakt zwischen Makrophagen und T-Zellen bzw. T-Zellen und B-Zellen unter den verwendeten Kulturbedingungen sein. Diese Kontakte sind für die Aktivierung des jeweiligen Lymphozytentyps absolut notwendig. Aus diesem Grund wurde ein Neuraminidaseverdau der Milzzellen vor Ansatz der eigentlichen Mishell-Dutton-Kultur durchgeführt. Neuraminidase ist eine Exoglycosidase, die die terminale Neuraminsäure der Glykoproteine und -lipide auf der Zelloberfläche spaltet. Ansatzpunkt dieses Versuches war die Annahme, dass die negativ geladenen Neuraminsäuren auf der Oberfläche der Lymphozyten durch Abstoßung die benötigten Zell-Zell-Kontakte in vitro verhindern. Die Oberflächenladung der Zellen, die unter physiologischen Bedingungen, also in vivo, stabil ist, kann in vitro von verschiedenen Faktoren wie der Zusammensetzung des Mediums und des verwendeten FCS beeinflusst und verändert werden (Sawyer et al. 1978). Es wurde zudem nachgewiesen, dass ein Neuraminidaseverdau humaner (Semenzato et al. 1977) bzw. muriner Lymphozyten (Vohr und Hünig 1985a;b) zu einer Aktivierung mit Proliferation der Zellen führt. Nakamura et al. (1991) konnten an murinen Milzzellen zeigen, dass mit diesem Verfahren durch eine Reduzierung der Aktivität von suppressiven Thy-1<sup>+</sup>-Lymphozyten die humorale Immunreaktion verstärkt wird. Nach Auslösung der Erstantwort gegen SRBC in vivo wurde von der Gruppe eine Zweitantwort in vitro nach Neuraminidaseverdau der Lymphozyten induziert, die eine höhere Amplitude aufwies als die von unverdauten Zellen. Für die hier durchgeführten Versuche konnte mit einem Neuraminidaseverdau jedoch kein positiver Effekt erzielt werden. Die bestehende Inhibierung der humoralen Immunreaktion bei der Verwendung von Rattenmilzellen in der Mishell-Dutton-Kultur wurde dadurch nicht aufgehoben.

Die Notwendigkeit einer Depletion der Makrophagen, um auch mit Rattenmilzzellen in einer Mishell-Dutton-Kultur eine humorale Immunantwort induzieren zu können, wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben (Teodorczyk-Injeyan et al. 1982, Corvalan und Howard 1978, Weiss und Fitch 1978). Es konnte gezeigt werden, dass bei der murinen Mishell-Dutton-Kultur im Gegensatz zur Verwendung von Rattenmilzzellen ein Verbleib der Makrophagen in Kultur essenziell ist (Weiss und Fitch 1978). Während also Makrophagen im murinen Versuch die humorale Immunreaktion initiieren, supprimieren sie diese bei der Verwendung von Milzzellen der Ratte. Für die hier durchgeführten Versuche blieb eine Depletion der Makrophagen jedoch ebenfalls ohne Auswirkung. Es konnten weiterhin im Plaque-Assay keine spezifisch gegen SRBC gerichteten Antikörper-sezernierenden Plasmazellen detektiert werden.

Während sich eine Depletion der Makrophagen für die Auslösung einer Erstantwort gegen SRBC bei den von Corvalan und Howard (1978) durchgeführten Versuchen als notwendig erwies, hatte der Verbleib dieser Zellen in der Kultur keinen inhibitorischen Effekt auf die Intensität einer ex vivo ausgelösten Zweitantwort. Entsprechend wurden für diese Arbeit Versuche durchgeführt, bei denen zunächst eine Immunisierung von Wistarratten mit SRBC in vivo erfolgte und 10 Tage später die Milzzellen ex vivo erneut zur Auslösung einer Zweitantwort stimuliert wurden. Dennoch konnten erneut keine Plaques bei der Auswertung des Versuches detektiert werden. Somit war auszuschließen, dass die Depletion der Makrophagen in den zuvor durchgeführten Versuchen zur Erstantwort in vitro nur unzureichend erfolgte. Wäre dies der Fall, wäre eine in vitro ausgelöste Erstantwort durch die Makrophagen supprimiert, während in der ex vivo ausgelösten Zweitantwort eine deutliche humorale Immunreaktion auftreten würde. Die Inhibierung der humoralen Immunreaktion konnte also nicht mit der Präsenz supprimierender Makrophagen in der Kultur begründet werden. Eine denkbare Möglichkeit ist, dass die Immunisierung der Wistarratten mit SRBC in vivo nicht funktionierte. Dies ist jedoch auszuschließen, da die Zuverlässigkeit dieser Behandlung durch die Ergebnisse vieler im Labor durchgeführter PFCAs belegt ist. Da unter den eingesetzten Kulturbedingungen mit Rattenmilzzellen weder eine Erst- noch eine Zweitantwort in vitro bzw. ex vivo induziert werden konnte, lässt sich für den Mishell-Dutton-Test schlussfolgern, dass das Ausbleiben der humoralen Immunreaktion nicht durch Probleme im STadium der bei der Immunisierung begründet ist.

Auch nach einem Wechsel vom Auszuchtstamm Wistar auf den von Teodorczyk-Injeyan et al. (1982) und Weiss und Fitch (1978) verwendeten Inzuchtstamm Lewis konnte keine humorale Immunreaktion in der Mishell-Dutton-Kultur ausgelöst werden. In der Literatur finden sich wenig vergleichende Daten der beiden Stämme in Bezug auf das Immunsystem und die Wirkung immuntoxischer Substanzen. Eine Studie von Sovcikova et al. (2002) zeigte *in vivo* für die Substanz Cyclosporin A keine Unterschiede zwischen den beiden Stämmen und auch keine niedrigere Variabilität der an Lewisratten gewonnenen Daten, wie diese bei einem Inzuchtstamm im Vergleich zu einem Auszuchtstamm zu erwarten gewesen wäre. Auch in den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen konnte zunächst kein Unterschied zwischen den beiden Stämmen festgestellt werden, da weder mit einem Versuchsansatz nach Standardprotokoll mit verschiedenen Medien, noch durch eine Makrophagendepletion, den Zusatz von Überständen ConA-stimulierter Milzzellen oder eine Immunisierung *in vivo* mit anschließendem boost *in vitro* die Inhibierung der humoralen Immunreaktion aufgehoben werden konnte. Die Milzzellen beider Stämme zeigten in der Mishell-Dutton-Kultur eine geringe Viabilität, die jeweils durch einen Wechsel auf dieselbe FCS-Charge deutlich verbessert wurde.

Die geringe Viabilität der Milzzellen der Ratte in der Mishell-Dutton-Kultur im Vergleich zu murinen Zellen ist gleichbedeutend mit einem vermehrten Auftreten apoptotischer oder anergischer Zellen, welche möglicherweise die Entwicklung einer humoralen Immunreaktion gegen SRBC blockieren. Aufgrund dieser Annahme wurde ein Waschprotokoll eingeführt, um apoptotische und anergische Zellen aus der Kultur zu entfernen. Bei der Optimierung dieses Protokolls zeigten sich erstmals deutliche Unterschiede zwischen den Milzzellen des Stammes Wistar und denen des Stammes Lewis. Mit Zellen beider Stämme konnten erstmals Plaques generiert werden, wobei die Zahl mit Zellen des Stammes Lewis (ca. 150 Plaques pro Platte) generell höher war als mit Zellen des Stammes Wistar (ca. 60 Plaques pro Platte). Zudem wurde mit 6 h für die Lewiszellen ein deutlich früherer Zeitpunkt zum Waschen im Vergleich zu 24 h für Zellen von Wistarratten als optimal bestimmt.

Durch das Waschen werden adhärenten Zellen, also Makrophagen, entsprechend der Veröffentlichungen zum Thema Mishell-Dutton-Kultur mit Milzzellen der Ratte, aus der Kultur entfernt, wenn auch erst nach 6 h bzw. 24 h. Bei der Stimulation mit SRBC sind diese im Gegensatz zu den Veröffentlichungen noch in der Kultur präsent. Es ist unklar, wie genau die Rattenmilzzellen sich an die in vitro Situation anpassen und warum im Vergleich zu murinen Milzzellen die Zahl apoptotischer oder anergischer Lymphozyten so hoch ist. Es kann jedoch vermutet werden, dass durch diese Prozesse Zytokine ausgeschüttet werden, die eine veränderte Reaktion der Zellen zur Folge haben. Aufgrund des relativ kurzen Zeitraumes, nach dem das Waschen optimalerweise erfolgen sollte, scheint es die Stimulation der T-Zellen durch die antigenpräsentierenden Zellen, also die Makrophagen, zu sein, die inhibiert ist. Möglicherweise führt die Aufnahme apoptotischer Lymphozyten aus der Kultur durch die Makrophagen dazu, dass die Funktion der T-Zellstimulation nicht oder nur unzureichend wahrgenommen wird. So kann bei einem Verbleib der Makrophagen in der Kultur keine spezifische Immunreaktion gegen die SRBC initiiert werden. Ein möglicher Ansatzpunkt wäre in diesem Zusammenhang die Co-Stimulation über den CD28-Rezeptor, die von den Makrophagen nur unvollständig erfolgt. Müller et al. (1999) konnten an humanen T-Zellen zeigen, dass eine starke Stimulation des T-Zell-Rezeptors bei geringer CD28-Stimulation eine Apoptose bzw. Anergie der Zellen auslöst, während ein niedriger T-Zellrezeptor-Stimulus mit starker CD28-Stimulation eine "produktive" Proliferation und somit eine Immunreaktion auslöst. Sowohl an Mäusen (Wallace et al. 1995) als auch an Hunden (Graves et al. 2009) wurde nachgewiesen, dass eine Blockierung des CD28-Stimulus durch einen Antikörper (CTLA4-Ig) eine Immunreaktion gegen SRBC langfristig verhindert. Ob in der Mishell-Dutton-Kultur mit Rattenmilzzellen tatsächlich die Stimulation des CD28-Rezeptors zu gering ist, bliebe allerdings nachzuweisen und kann somit nur spekuliert werden.

Die Ergebnisse eines PFCA und eines Mishell-Dutton-Tests mit Milzzellen des Stammes Lewis mit der immunsuppressiven Substanz Cyclosporin A zeigten eine hohe Vergleichbarkeit. Eine Suppression der Plaquebildung im Mishell-Dutton-Test, die bereits bei nicht zytotoxischen Substanzkonzentrationen einsetzte, war deutlich zu erkennen. Es können somit spezifische immunsuppressive Substanzeffekte mit Mishell-Dutton-Kulturen aus Milzzellen der Ratte, insbesondere des Stammes Lewis, detektiert und von unspezifischen zytotoxischen Substanzeffekten unterschieden werden. Die Versuche mit Mishell-Dutton-Kulturen muriner Milzzellen haben jedoch gezeigt, dass eine Diskriminierung zwischen spezifischen immunsuppressiven und unspezifischen zytotoxischen Effekten nicht bei allen Substanzen so deutlich ist, wie für Cyclosporin A. Daher sind weitere Optimierungen der Kultur notwendig, um die Plaquezahlen weiter zu steigern. Bevor die Mishell-Dutton-Kultur an Rattenmilzzellen für ein Screening verschiedener immunsuppressiver und zytotoxischer Substanzen eingesetzt werden kann, ist es unabdingbar, eine Plaquezahl von mindestens 500 Plaques pro Platte zu erzielen, die die klare Abgrenzung versuchspezifischer Schwankungen von tatsächlichen Effekten erlaubt. Erst wenn dieses Ziel erreicht ist, kann die Methode auf ihre korrekte Vorhersage immunsuppressiver Substanzeffekte analysiert werden.

#### 4.2.3 FACS-Analyse der CD4-positiven T-Zellfraktion von Milzzellen

Nach der Durchführung von *ex vivo* Experimenten zur Immunsuppressivität der Substanzen 2-Methoxyethanol und 2-Methoxy-Essigsäure wurde bereits von Smialowicz et al. (1992) vermutet, dass es speziesspezifische Unterschiede im Immunsystem zwischen Mäusen und Ratten gibt. Um die in den hier präsentierten Versuchen festgestellten Unterschiede zwischen Milzzellen der Maus und der Ratte sowie den Zellen von Wistar- und Lewisratten in der Mishell-Dutton-Kultur näher zu untersuchen, wurden CD4-positive T-Zellfraktionen analysiert. Differenzen in ihrer Zusammensetzung wurden vermutet, da die ermittelten Zeiten des Waschprotokolls in dem Bereich liegen, in dem eine Aktivierung und Proliferation CD4-positiver T-Zellen stattfindet.

Der Anteil der CD4/CD25<sup>hoch</sup>-exprimierenden Zellen an der gesamten CD4-positiven Population verhielt sich zwischen den beiden Rattenstämmen unterschiedlich. Während mit Zellen des Stammes Lewis ein Anstieg von 2 % an Tag 0 auf 12,2 % an Tag 2 verzeichnet werden konnte, der an Tag 3 mit 6,4 % bereits deutlich rückläufig war, zeigten Zellen des Stammes Wistar einen stärkeren Anstieg der Population, der an Tag 2 16,9 % betrug und mit 14,6 % an Tag 3 nur leicht rückläufig war. Zudem zeigten sich Unterschiede im Anteil der CD4/CD25<sup>hoch</sup>/Foxp3exprimierenden Zellen an der Gesamtpopulation der CD4-positiven Zellen. Diese war bei Mishell-Dutton-Kulturen mit Zellen des Stammes Wistar im Vergleich zu denen des Stammes Lewis an Tag 1 um 2,0 % erniedrigt, an Tag 2 jedoch um 3,0 % und Tag 3 um 5,1 % erhöht.

Die Analyse der CD4/CD25<sup>hoch</sup>-exprimierenden Zellen beinhaltet zwei verschiedene Populationen. Zum einen ist bekannt, dass CD25 von aktivierten T-Helferzellen exprimiert wird (Willerford et al. 1995), zum anderen sind es regulatorische T-Zellen (T<sub>reg</sub>), die neben CD4 auch CD25 exprimieren. Die Bezeichnung "regulatorisch" entstammt der Tatsache, dass sowohl in Experimenten an Mäusen (Bacchetta et al. 2005, Bluestone und Tang 2005) als auch an Ratten (Lundsgaard et al. 2005) Autoimmunerkrankungen durch diese Zellen inhibiert werden konnten. Um eine Diskriminierung dieser beiden Zellpopulationen, also der aktivierten T-Helferzellen und der regulatorischen T-Zellen, durchführen zu können, wurden von verschiedenen Gruppen unterschiedliche Faktoren analysiert. Als geeignet erwies sich schließlich Foxp3 (Hori et al. 2003, Khattri et al. 2003, Fontenot et al. 2003), ein Transkriptionsfaktor, der nur von der Subpopulation der regulatorischen T-Zellen exprimiert wird. Für die für diese Arbeit durchgeführte Analyse von Mishell-Dutton-Kulturen zeigten beide Populationen Relevanz. Durch eine quantitative Messung aller drei Faktoren, also CD4, CD25 und Foxp3, konnte sowohl der Anteil der regulatorischen T-Zellen als auch der Anteil der durch die SRBC-Stimulation aktivierten T-Helferzellen über den zeitlichen Verlauf der Kultur analysiert werden.

Sowohl die Milzzellen des Stammes Wistar als auch die des Stammes Lewis zeigten nach Stimulation mit SRBC keine Zunahme der CD4/CD25<sup>hoch</sup>-exprimierenden T-Zell-Population *in vitro*. Eine aktivierungsspezifische Zunahme, welche für Lymphozyten der Ratte in anderen Versuchen eindeutig nachgewiesen werden konnte (Ericsson et al. 1991), wäre auch für die Mishell-Dutton-Kultur zu erwarten gewesen. Eine Analyse muriner Milzzellen in der Mishell-Dutton-Kultur zeigte die Aktivierung CD4-positiver T-Zellen sehr deutlich, da sich an Tag 3 der Anteil CD4/CD25<sup>hoch</sup>-exprimierender Zellen mit 12,1 % im Vergleich zu 6,6 % der unstimulierten Kontrolle fast verdoppelt hatte. Damit bestätigte sich das Ergebnis, welches der Endpunkt der Plaquezahlen bei den vorausgegangenen Optimierungen der Mishell-Dutton-Kultur mit Milzzellen der Ratte bereits angezeigt hatte. Eine deutliche spezifische Immunreaktion gegen die SRBC kann mit den Rattenmilzzellen nicht ausgelöst werden, sie fällt im Vergleich zu der Verwendung von murinen Milzzellen eher schwach aus.

Eine Ursache für dieses Phänomen wurde in einer verstärkten Präsenz regulatorischer T-Zellen (CD4/CD25<sup>hoch</sup>/Foxp3-exprimierende Zellen) vermutet. Somit war zum einen zu erwarten, dass Rattenmilzzellen generell einen höheren Anteil regulatorischer T-Zellen in der Mishell-Dutton-Kultur aufweisen als murine Milzzellen, und zum anderen, dass der Anteil regulatorischer T-Zellen der Lewismilzen unter dem des Stammes Wistar liegt. Die letztere Annahme ist darin begründet, dass mit Milzzellen des Stammes Lewis generell höhere Plaquezahlen pro Platte erzielt werden konnten und zudem das für die FACS-Analyse eingesetzte Protokoll für den Stamm Leiws optimiert war.

Regulatorische T-Zellen beeinflussen die Immunantwort durch anti-inflammatorische Faktoren. Sie verhindern so im Normalfall die Entstehung von Autoimmunerkrankungen und Allergien und sorgen für den kontrollierten Ablauf der Immunreaktion bei einer Infektion (Tesmer et al. 2008). Denn die perfekte Immunantwort ist dadurch gekennzeichnet, dass sie zum einen den Erreger möglichst schnell und effektiv unschädlich macht und aus dem Organismus entfernt, aber zum anderen auch nicht überschießt und so eine schädliche Auswirkung auf den Organismus selbst ausübt (Mills 2004). Ein erhöhter Anteil regulatorischer T-Zellen steht somit in Verbindung mit einer stärkeren (Runter-)Regulation der Immunantwort (Weaver et al. 2006). In der Kultur mit Wistarzellen zeigte sich genau dieser Effekt deutlich, da mit 9,9 % im Gegensatz zu den murinen Milzzellen mit 3,8 % der Anteil der CD4/CD25<sup>hoch</sup>/Foxp3-exprimierenden Zellen zunahm und an Tag 3 deutlich erhöht war. Lewiszellen zeigten an diesem Tag mit 4,8 % nur einen geringfügig höheren Anteil regulatorischer T-Zellen als die murinen Milzzellen.

Eine weitere Subpopulation CD4-positiver Zellen, die so genannten  $T_H 17$ -Zellen, die durch eine Expression von IL-17A gekennzeichnet sind, wurde innerhalb der murinen Mishell-Dutton-Kultur analysiert. An Rattenmilzzellen konnte ein entsprechender Versuch nicht durchgeführt werden, da für diese Spezies kein IL-17A-spezifischer Antikörper kommerziell bezogen werden konnte. Grund dafür ist, dass die immunologische Grundlagenforschung in erster Linie an Mäusen erfolgt, während Ratten eher selten in diesem Kontext eingesetzt werden (Popov et al. 2011).

Eine Betrachtung des Anteils der T<sub>H</sub>17-Zellen über den zeitlichen Verlauf der Mishell-Dutton-Kultur zeigte an Tag 1 einen Rückgang von 2,2 % der frisch isolierten murinen Milzzellen auf 0,3 % der unstimulierten bzw. 0,4 % der stimulierten Probe. Ab Tag 2 nahm der Anteil beider Proben wieder zu, wobei die stimulierten Zellen an Tag 3 mit 1,8 % eine stärkere Zunahme der T<sub>H</sub>17-Zellen verzeichneten als die unstimulierten mit 1,2 %.

Den  $T_H 17$ -Zellen werden verschiedene Funktionen zugeschrieben. Man geht davon aus, dass sie eine wichtige Rolle bei der Verteidigung des Immunsystems gegen extrazelluläre Pathogene spielen (Fedele et al. 2005, Infante-Duarte et al. 2000), welche von  $T_H 1$ - und  $T_H 2$ -Zellen nicht abgedeckt wird. Die  $T_H 17$ -Zellen richten sich daher in erster Linie gegen extrazelluläre Bakterien und bestimmte Parasiten (Weaver et al. 2006) und sind den Effektor-T-Zellen zuzuordnen. Durch das Ausschütten bestimmter Zytokine und die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten stellen sie eine Verbindung zwischen angeborener und erworbener Immunität dar (Tesmer et al. 2008). Nakae et al. (2002) konnten zeigen, dass eine Antigen-spezifische Aktivierung von T-Zellen in IL-17-defizienten Mäusen beeinträchtigt war und in einer supprimierten zellulären und humoralen Immunantwort resultierte. Im Gegensatz zu den regulatorischen T-Zellen sind  $T_H 17$ -Zellen also eher pro-inflammatorisch aktiv.

Betrachtet man auf diesem Hintergrund die gewonnenen Daten aus der FACS-Analyse der  $T_H 17$ -Population muriner Milzzellen in der Mishell-Dutton-Kultur, so zeigt sich eine Induktion der IL-17-Produktion durch die SRBC-Stimulation. Dies korreliert entsprechend mit dem von Nakae et al. (2002) beobachteten Zusammenhang des Vorhandenseins von IL-17 mit einer normalen Ausprägung der humoralen Immunreaktion, die in der Mishell-Dutton-Kultur induziert wird. Auch die Milzzellen der nicht-stimulierten Kontrolle zeigten jedoch geringe Veränderungen im Anteil IL-17 produzierender Zellen, der ab Tag 1 zunahm. Dies und die Abnahme der Population unmittelbar nach der Organentnahme können als allgemeine Anpassungsvorgänge der Zellen an die veränderten Bedingungen *in vitro* interpretiert werden. Für Primärkulturen mit Zellen anderer Organe, wie der Niere, konnten solche unspezifischen Anpassungsvorgänge an die *in vitro* Situation nachgewiesen werden (Weiland et al. 2007).

Abschließend lässt sich festhalten, dass ein erhöhter Anteil regulatorischer T-Zellen an der Population der CD4-positiven Zellen ein Grund für die supprimierte Immunreaktion der Rattenmilzzellen gegen die SRBC sein könnte. Im Verlauf der Mishell-Dutton-Kultur muriner Milzzellen zeigten  $T_H$ 17-Zellen eine Zunahme in ihrem Anteil an der CD4-positiven Population, die essenziell für die Ausbildung der humoralen Immunreaktion sein könnte. Es kann daher vermutet werden, dass eine Reduzierung des Anteils der  $T_H$ 17-Zellen an der CD4-positiven Population in der Mishell-Dutton-Kultur mit Rattenmilzzellen vorliegt, die die Ausbildung einer humoralen Immunreaktion verhindert. Dies ist jedoch Spekulation und bleibt in weiteren Experimenten mit einem spezifischen Antikörper gegen IL-17A der Ratte zu überprüfen. Für eine weitere Optimierung der Mishell-Dutton-Kultur mit Milzzellen der Ratte bleibt festzuhalten, dass eine durch Zytokine induzierte Suppression der regulatorischen T-Zellen möglicherweise helfen könnte, eine stärkere humorale Immunantwort zu induzieren. Sollte entsprechend der Vermutung ein erniedrigter Anteil von  $T_H$ 17-Zellen für die Milzzellen der Ratte nachgewiesen werden, wäre hier ebenfalls eine Beeinflussung des Gleichgewichts durch zugesetzte Zytokine denkbar.

#### 4.2.4 Mishell-Dutton-Kulturen mit peripheren mononukleären Zellen

Die Versuche zur Etablierung der Mishell-Dutton-Kultur mit peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) wurden mit Zellen dreier Spezies, nämlich der Maus, der Ratte und des Menschen, durchgeführt. Allerdings konnten trotz verschiedener Modifikationen im Versuchsprotokoll mit den PBMCs keiner der eingesetzten Spezies annehmbare Plaquezahlen erzielt werden. Aufgrund der ähnlichen Problematik wie bei den Mishell-Dutton-Kulturen mit Milzzellen der Ratte (siehe *Kapitel* 4.2.2) wurden zum großen Teil die gleichen Modifikationen der Kulturbedingungen ausgetestet. Ein Grund dafür war die Tatsache, dass die zur Verfügung stehende Literatur sich vorwiegend auf humane PBMCs bezog (Villa et al. 1985, van Tol et al. 1984, Villa und De Biasi 1983, Bialasiewicz et al. 1981, Cunningham et al. 1980, Fauci 1979, Herrod und Buckley 1979,

Dosch und Gelfand 1977, Dosch et al. 1977, Percy et al. 1977, Luzzati et al. 1976), während für Versuche an Ratten kaum Literatur zur Verfügung stand. Diese bezog sich zudem nur auf einen Ansatzpunkt, nämlich die Eliminierung der Makrophagen, welche bei einem Verbleib in Kultur die humorale Immunreaktion supprimieren würden (Corvalan und Howard 1978, Weiss und Fitch 1978).

Einziger Faktor, der in entsprechender Weise nicht für die Etablierung der Mishell-Dutton-Kultur mit Rattenmilzzellen variiert und daher nicht im *Kapitel* 4.2.2 bereits diskutiert wurde, war der Einsatz von humanem A/B-Serum in der Kultur humaner PBMCs. Einige Arbeitsgruppen verzichteten in der hPBMC-Kultur komplett auf den Zusatz von Serum (Villa et al. 1985, Villa und De Biasi 1983), andere verwendeten FCS (van Tol et al. 1984, Bialasiewicz et al. 1981, Luzzati et al. 1976) oder FCS in Kombination mit Pferdeserum (Cunningham et al. 1980), wieder andere humanes A/B-Serum (Fauci 1979, Dosch und Gelfand 1977, Dosch et al. 1977). In einem Versuch zur IgM-Produktion primärer humaner B-Zellen *in vitro* wurde FCS verwendet (Lu et al. 2009), dort wurde allerdings nicht mit SRBC stimuliert. Entsprechend wurde in den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen mit PBMCs der verschiedenen Spezies FCS eingesetzt oder auf den Zusatz von Serum verzichtet. Die Versuche an hPBMCs wurden zudem unter Supplementierung des RPMI-Mediums mit humanem A/B-Serum durchgeführt, da die Wahl eines geeigneten humanen A/B-Serums als einer der entscheidenden Faktoren zur Ausbildung einer humoralen Immunreaktion von hPBMCS *in vitro* postuliert wurde (Fauci 1979).

Die Supplementierung des Mediums mit humanem A/B-Serum führte zu einer Lyse der zur Stimulation zugegebenen SRBC. Humanes Serum kann natürliche Antikörper gegen SRBC enthalten (Strokan et al. 1998). Ist es nicht hitzeinaktiviert, kommt es jedoch weniger zu einer Aufnahme der SRBC durch Makrophagen aufgrund der Opsonisierung mit Antikörpern, als vielmehr zu einer Lyse der SRBC durch enthaltenes aktives Komplement, welches zudem auch opsonisiert (Chan et al. 2001). Obwohl hitzeinaktiviertes A/B-Serum für die für diese Arbeit durchgeführten Versuche bezogen wurde, ist es also möglich, dass das Serum nicht ausreichend inaktiviert wurde und Komplementkomponenten darin verblieben, welche die Lyse der SRBC bewirkten. Eine weitere denkbare Möglichkeit ist, dass die Lyse aufgrund einer Hypotonie des A/B-Serums entsteht. SRBC können bereits unter hypotonen Bedingungen lysiert werden, die für Leukozyten noch unschädlich sind (Chan et al. 2001, Pommier et al. 1983).

Unabhängig davon, ob der Versuch an hPBMCs nun mit A/B-Serum, FCS oder serumfrei durchgeführt wird, bleibt zu vermuten, dass bei den PBMCs aller drei Spezies dieselben Ursachen die Ausbildung einer humoralen Immunreaktion *in vitro* verhindern. Möglicherweise könnte auch hier die Etablierung eines Waschprotokolls ähnlich wie bei den Rattenmilzzellen deutliche Verbesserungen bringen. Auch wenn eine erfolgreiche Durchführung von Mishell-Dutton-Kulturen an PBMCs für die Bestimmung der Immunsuppressivität von Substanzen das breiteste Spektrum an Möglichkeiten eröffnen würde, da sie auch studienbegleitend vollzogen werden könnte, so ist ein großer Nachteil die im Vergleich zur Milz geringe Zellzahl des Blutes. Es werden zunächst sehr viele Tiere benötigt werden, um die Kultur überhaupt etablieren zu können. Sollte dies gelingen, wären weitere Optimierungen notwendig, um den Versuch auch mit einer deutlich niedrigeren Zellzahl als der für Milzzellen eingesetzten durchführen und auswerten zu können.

### 4.3 Mishell-Dutton-Kulturen zur Detektion immunsuppressiver Substanzen *in vitro*

Nach der erfolgreichen Etablierung der Mishell-Dutton-Kultur mit murinen Milzzellen wurde die Methode auf ihre korrekte Vorhersage immunsuppressiver Substanzeffekte überprüft. Es wurde mit dem Zusatz von S9-Mix ein metabolisches System in den Versuch eingefügt, um auch eine Detektion von Substanzen zu ermöglichen, die einer metabolischen Aktivierung bedürfen.

#### 4.3.1 Der Mishell-Dutton-Test

Im Mishell-Dutton-Test zeigten sieben von acht immunsuppressive Substanzen eine deutliche Reduktion der Plaquezahl, die unabhängig von unspezifischen, zytotoxischen Substanzeffekten auftrat. Eine solche Reduktion der Plaquezahl in der Mishell-Dutton-Kultur muriner Milzzellen durch immunsuppressive Substanzen wurde zuvor von verschiedenen anderen Gruppen beschrieben (Ban et al. 1995, Kawabata und White 1987, White und Holsapple 1984). Diese setzten allerdings im Gegensatz zu den hier präsentierten Versuchen nur nicht-zytotoxische Substanzen konzentrationen ein, um eine Analyse spezifisch immunsuppressiver Effekte zu gewährleisten. In einer Studie zur Immunsuppressivität von Chemikalien, bei der die eingesetzten Tiere *in vivo* mit SRBC immunisiert wurden und dann eine Zweitantwort *ex vivo* in der Mishell-Dutton-Kultur unter Substanzen klassifiziert, die eine Reduktion der Plaquezahl ohne messbare Zytotoxizität bewirkten (Kutz et al. 1980).

Die für diese Arbeit durchgeführten Versuche zeigen jedoch, dass nicht bei allen Substanzen zytotoxische und immunsuppressiv wirkende Konzentrationen so eindeutig voneinander zu trennen sind. Rapamycin beispielsweise inhibierte erst bei Konzentrationen die Ausbildung der humoralen Immunreaktion, die bereits eine leichte Reduktion der Zellviabilität zur Folge hatten. Daher war es unerlässlich, mit dem Resazurin-Assay einen Viabilitätstest in den eigentlichen Mishell-Dutton-Test zu integrieren. Nur so konnten Substanzeffekte, die eine Veränderung der Plaquezahlen gegenüber der jeweiligen vehikelbehandelten Kontrolle bewirkten, als spezifisch immunsuppressiv oder unspezifisch zytotoxisch bewertet werden.

Eine Substanz, die in Hinblick auf ihre immunsuppressive Wirkung *in vitro* sehr gut untersucht ist, ist Benzo(a)pyren. Obwohl davon ausgegangen wird, dass eine metabolische Aktivierung der Substanz zur Ausübung immunsuppressiver Effekte notwendig ist, konnte in Mishell-Dutton-Kulturen auch ohne die Einbindung eines metabolisch aktiven Systems eine deutliche Reduktion der Plaquebildung nachgewiesen werden (Kawabata und White 1987, White und Holsapple 1984). Diese Ergebnisse korrelierten mit denen der für diese Arbeit durchgeführten Versuche, die eine deutliche Reduktion der Plaquezahl bei nicht-zytotoxischen Substanzkonzentrationen zeigten. Neben Benzo(a)pyren wurden auch die Substanzen Cyclosporin A, Dexamethason, Methotrexat, Urethan und Verapamil korrekt als immunsuppressiv klassifiziert.

Ein falsch-negatives Ergebnis wurde lediglich mit der Substanz Cyclophosphamid erzielt. Dieses Resultat war jedoch keinesfalls überraschend, da Cyclophosphamid eine metabolische Aktivierung zur Ausübung immunsuppressiver Substanzeffekte benötigt (Connors et al. 1974). Es wurde zuvor von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt, dass murine Milzzellen in MishellDutton-Kulturen diese Metabolisierung nicht bewirken, und somit auch kein immunsuppressiver Effekt hervorgerufen werden kann (White und Holsapple 1984, Tucker und Munson 1981).

Die Substanz Mannitol hatte als negative Kontrollsubstanz ohne zytotoxische Eigenschaften erwartungsgemäß weder einen inhibierenden Effekt auf die Plaquebildung noch löste sie eine Reduktion der Zellviabilität aus. Um analysieren zu können, wie sich zytotoxische Effekte auf die Plaquebildung auswirken und ob diese tatsächlich mit der Zellviabilität korrelieren, wurde eine Erweiterung der Gruppe der negativen Substanzen vorgenommen. Hinzugefügt wurden SDS und Heptanal, die beide in *in vivo* und *in vitro* Studien als irritierend klassifiziert wurden (Cotovio et al. 2005), sowie 1-Bromo-4-Chlorobutan, welches *in vitro* irritierende Eigenschaften zeigte (Kandarova et al. 2005). Mit allen drei Substanzen konnte eine Korrelation der Viabilität mit der Plaquezahl verifiziert werden. Nahm die Plaquezahl konzentrationsabhängig ab, so ging dies mit einer entsprechenden Reduktion der Zellviabilität einher. Eine Inhibierung der Ausbildung einer humoralen Immunreaktion ohne den Einfluss ähnlich starker zytotoxischer Substanzeffekte war also spezifisch für die immunsuppressiven Substanzen - und konnte für die Detektion immunsuppressiver Substanzeffekte *in vitro* eingesetzt werden.

Für die komplette Gruppe der getesteten immunsuppressiven Substanzen lässt sich abschließend festhalten, dass sieben von acht Substanzen mit dem Mishell-Dutton-Test korrekt identifiziert wurden. Die Sensitivität des Mishell-Dutton-Tests war somit als hoch einzustufen. Die Erweiterung der Gruppe der nicht-immunsuppressiven Substanzen zeigte eine ebenfalls hohe Spezifität des Mishell-Dutton-Tests an, da sowohl Mannitol als auch die drei Irritanten korrekt klassifiziert wurden.

Die Reproduzierbarkeit der Mishell-Dutton-Tests mit verschiedenen Substanzen war generell sehr hoch. Als zuverlässiger Marker, mit dem eine Korrelation zwischen Plaquezahl und Viabilität bestimmt werden konnte, erwies sich die Berechnung der Viabilität bei der Substanzkonzentration des Plaque IC90. Unter der Annahme, dass diese bei immunsuppressiven Substanzen mehr als 50 % beträgt, konnten, mit Ausnahme des Cyclophosphamids aus den bereits erläuterten Gründen, alle Substanzen korrekt eingestuft werden.

Vergleicht man die Ergebnisse des Mishell-Dutton-Tests an murinen Milzzellen mit denen der Mitogenstimulationsversuche an murinen Milzzellen, so zeigt sich der Mishell-Dutton-Test als Methode zur Detektion immunsuppressiver Substanzeffekte *in vitro* deutlich überlegen. Während in der Mitogenstimulation mit Urethan und Benzo(a)pyren zwei Substanzen nicht korrekt klassifiziert wurden, war es im Mishell-Dutton-Test mit Cyclophosphamid nur eine. Da in keinem der durchgeführten Versuche ein metabolisches System zur Substanzaktivierung eingesetzt wurde und generell angenommen wird, dass murine Milzzellen Cyclophosphamid nicht metabolisieren können (White und Holsapple 1984, Tucker und Munson 1981), sind die Ergebnisse aus den Mitogenstimulationsversuchen, in denen Cyclophosphamid als immunsuppressiv detektiert wurde, eher fragwürdig. In *Kapitel* 4.1 wurde bereits diskutiert, dass bei einer Metabolisierung zu 4-Hydroxycyclophsophamid in erster Linie eine Inhibierung der Proliferation zu erwarten gewesen wäre und keine spezifische Suppression der Zytokinausschüttung von TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$ , wie sie bei den Mitogenstimulationsversuchen auftrat.

Bei den Ergebnissen der Mitogenstimulationen für die Substanz Benzo(a)pyren hingegen ist nach den Mishell-Dutton-Tests nicht mehr davon auszugehen, dass die Substanz aufgrund einer fehlenden Metabolisierung nicht detektiert wurde, da die murinen Milzzellen in der Mishell-Dutton-Kultur eine Aktivierung der Substanz ermöglichten. Ursache für das falsch-negative Ergebnis ist wahrscheinlich eine mangelnde Sensitivität der Methode der Mitogenstimulationen, die sich ebenfalls bei der Substanz Urethan zeigte. Ein solches im Vergleich zu den anderen Substanzen eher schwaches Immunsuppressivum konnte nur im Mishell-Dutton-Test korrekt klassifiziert werden.

Die für diese Arbeit erzielten Ergebnisse des Vergleichs der *in vitro* Methoden der Mitogenstimulation und der Mishell-Dutton-Kultur korrelieren mit denen einer *ex vivo* Studie von Luster et al. (1992), in der für den PFCA mit 78 % hohe korrekte Vorhersagewahrscheinlichkeiten für immunsuppressive Substanzeffekte nachgewiesen wurden, während sich Stimulationen mit T-Zell-Mitogenen und LPS mit 67 % und 50 % korrekter Vorhersage problematisch zeigten. Diese Überlegenheit eines Funktionstests im Vergleich zu Stimulationsversuchen ist also auch auf die *in vitro* Situation übertragbar.

Im Gegensatz zur Mitogenstimulation, bei der mit einer Reihe separat durchzuführender Versuche verschiedene willkürlich festgelegte Endpunkte bestimmter Zelltypen gemessen werden, wird beim Mishell-Dutton-Test anhand eines Versuches die Bestimmung der zwei Endpunkte der Plaquezahl und der Viabilität vorgenommen. Auf die Bestimmung verschiedener Endpunkte, über die jeweils bestimmte Zelltypen analysiert werden, kann in diesem Funktionstest verzichtet werden. Dort kooperieren verschiedene Zelltypen miteinander, was in der Auslösung der humoralen Immunreaktion resultiert, die schließlich anhand der Plaquezahl analysiert wird. Jeglicher Einfluss einer Substanz kann so über die Plaquezahl und die Viabilitäten als Endpunkte detektiert werden. Gegenüber der Mitogenstimulation hängt eine korrekte Bewertung einer Substanz in Bezug auf ihre Immunsuppressivität beim Mishell-Dutton-Test nicht von willkürlich gewählten Endpunkten ab, die möglicherweise den Wirkmechanismus der getesteten Substanz gar nicht erfassen. Ein weiterer Vorteil des Mishell-Dutton-Tests liegt darin, dass diese Methode deutlich weniger kosten- und laborintensiv als die der Mitogenstimulationsversuche ist.

#### 4.3.2 Der Mishell-Dutton-Test mit metabolischem System (S9-Mix)

Um auch die immunsuppressiven Eigenschaften von Substanzen korrekt vorhersagen zu können, die einer metabolischen Aktivierung bedürfen, war es unerlässlich, ein metabolisches System in den Mishell-Dutton-Test einzufügen. Nachdem bereits von Shand (1978) ein immunsuppressiver Effekt des Cyclophosphamids auch *in vitro* erzielt werden konnte, wurde von Tucker und Munson (1981) erstmals ein Protokoll zur Integration von S9-Mix in eine murine Mishell-Dutton-Kultur beschrieben.

Unter Zusatz von S9-Mix zur Mishell-Dutton-Kultur der hier durchgeführten Versuche wurde Cyclophosphamid nun korrekt als immunsuppressive Substanz klassifiziert. Benzo(a)pyren wurde bereits ohne den Zusatz eines metabolisch aktiven Systems korrekt als immunsuppressiv klassifiziert, eine Zugabe von S9-Mix verstärkte diesen Effekt jedoch. Dass eine Detektion immunsuppressiver Eigenschaften des Benzo(a)pyrens in Mishell-Dutton-Tests ohne metabolisches System möglich ist, wurde bereits von White und Holsapple (1984) beschrieben, die ebenfalls eine Verstärkung des immunsuppressiven Substanzeffektes durch S9-Mix erzielten. Es ist also davon auszugehen, dass murine Milzzellen selbst in der Lage sind, CYP1A1 zu exprimieren und so Benzo(a)pyren zu aktivieren (Hosoya et al. 2008). Auch für humane Milzzellen konnte eine Expression von CYP1A1-mRNA nachgewiesen werden (Bieche et al. 2007).

Zieht man die Versuche mit dem integrierten metabolischen System zur Klassifizierung der Immunsuppressivität der Testsubstanzen hinzu, wurden nun alle acht immunsuppressiven Substanzen und alle vier Kontrollsubstanzen im Mishell-Dutton-Test korrekt eingestuft. Die Versuche mit Cyclophosphamid belegen eindrucksvoll, wie wichtig es für eine Detektion immunsuppressiver Substanzeffekte *in vitro* ist, ein metabolisches System zu integrieren. Bei einer *in vivo* Applikation ist dies natürlicherweise vorhanden. Wird nicht zusätzlich auf eine Metabolisierung bei einem negativen Ergebnis einer Substanz getestet, führt dies unter Umständen zu einem falsch-negativen Resultat (Coecke et al. 2006, Zucco et al. 2004).

#### 4.4 Analyse der Immunsuppressivität der Substanz Urethan

Die Substanz Urethan ist eine weitere Substanz, die möglicherweise einer Metabolisierung zur Ausübung immunsuppressiver Substanzeffekte bedarf. Insbesondere für die *in vitro* Situation war unklar, ob die zuvor im Mishell-Dutton-Test bestimmte Immunsuppressivität der Substanz Resultat des Urethans an sich war, oder ob sie durch bestimmte Metaboliten ausgelöst wurde.

#### 4.4.1 Die immunsuppressive Wirkung des Urethans und seiner Metaboliten in vivo und in vitro

Im ex vivo durchgeführten PFCA mit Urethan erwies sich die Substanz entsprechend den Versuchen des NTP (1982) als immunsuppressiv. Eine Abweichung wurde lediglich für die Tage der gemessenen Suppression der Plaquereaktion gegen SRBC bestimmt. Während diese in den Versuchen des NTP an Tag 4 nach Immunisierung auftrat und an Tag 6 nach Immunisierung eine Stimulation der Plaquebildung verzeichnet wurde, so wurde für die für diese Arbeit durchgeführten Versuche an Tag 3 nach Immunisierung eine Suppression und an Tag 5 eine Stimulation der Plaquebildung gemessen. Ursache dafür kann die unterschiedliche Art der Applikation sein. Während in den Versuchen des NTP eine subkutane Injektion des Urethans durchgeführt wurde, präferierten wir für unsere Versuche eine intraperitoneale Applikation. Die Art der Verabreichung kann die Toxizität und Immunsuppressivität von Substanzen beeinflussen (Berenbaum 1971). Auch die eingesetzten Mausstämme könnten sich in ihrer Suszeptibilität unterscheiden. Für Cyclophosphamid (Pukhalsky et al. 1993) und 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (Vecchi et al. 1983) beispielsweise konnte eine unterschiedliche Suszeptibilität verschiedener Mausstämme im PFCA gezeigt werden, und auch die immunsuppressive Wirkung von UV-B-Strahlung auf eine induzierte Kontaktallergie war abhängig vom verwendeten Mausstamm (Noonan und Hoffman 1994). Für die Substanz Urethan konnten in Bezug auf die Karzinogenität Unterschiede bei der Verwendung verschiedener Mausstämme festgestellt werden, welche auf eine unterschiedliche CYP2E1-Kapazität der Stämme zurückgeführt wurden (Titis und Forkert 2001). Während für die NTP-Versuche der Stamm B6C3F1 verwendet wurde, waren es hier Mäuse des Auszuchtstammes NMRI, welche routinemäßig in der Toxikologie, beispielsweise beim LLNA/IMDS (Local Lymphnode Assay/Integrated Model for the Differentiation of Skin Reactions) (Ehling et al. 2005a;b) eingesetzt werden. Auch wenn PFCAs in der Toxikologie als Standard an Ratten des Stammes Wistar durchgeführt werden (Vohr und Ruehl-Fehlert 2001, Vohr 1995), so ist auch die Verwendung von Tieren des Stammes NMRI für murine PFCAs seit langem etabliert (Haukaas 1983, Buschmann et al. 1972, Emmerling 1972). Die Verwendung eines solchen Auszuchtstammes spiegelt besser die natürliche genetische Varianz wieder, wie sie auch beim Menschen auftritt (Joncourt et al. 1981), denn auf den Menschen sollen die Ergebnisse aus Toxizitätsstudien ja im Allgemeinen übertragen werden.

Der PFCA mit Urethan nach Langzeitprotokoll ließ sich problemlos auf ein Kurzzeitprotokoll übertragen, bei dem nur eine zweimalige Substanzapplikation anstelle der zuvor durchgeführten täglichen Behandlung über einen Zeitraum von zwei Wochen erfolgte. Die eingesetzte Dosis betrug dabei 500 mg/kg. Es konnte zuvor gezeigt werden, dass auch eine einmalige Behandlung von Mäusen mit 1 g/kg Urethan zu einer statistisch signifikanten Suppression der humoralen Immunreaktion führt, diese Dosis jedoch eine Narkose der Tiere zur Folge hat (Jeong et al. 1995).

Auch in den *in vitro* durchgeführten Mishell-Dutton-Tests zeigte sich ein immunsuppressiver Effekt des Urethans. In diesem Fall wurde an Tag 5 nach Stimulation mit SRBC die Auswertung im Plaque-Assay vorgenommen. Damit waren die Ergebnisse des PFCAs und des Mishell-Dutton-Tests aufeinander übertragbar, wenn auch nicht die genauen Zeitpunkte der Immunsuppression. Die Daten des Mishell-Dutton-Tests korrelierten zudem mit denen einer anderen Arbeitsgruppe, die eine Suppression der unspezifischen LPS-induzierten Antikörperbildung durch Urethan *in vitro* nachweisen konnte (Jeong et al. 1996). Eine Immuntoxizität von Urethan wurde in verschiedenen Veröffentlichungen beschrieben. So konnten immunsuppressive Wirkungen bei der Allotransplantation in Mäusen (Parmiani 1970) und Ratten (Di Marco et al. 1972), eine Verminderung der Aktivität natürlicher Killerzellen (Luster et al. 1982) und eine Suppression der Funktionalität peritonealer Makrophagen (Foris et al. 1983) nachgewiesen werden.

Verschiedene Veröffentlichungen zeigen, dass insbesondere für die genotoxischen und karzinogenen Substanzeffekte nicht Urethan selbst, sondern kleine Mengen bestimmter Metaboliten verantwortlich sind. Eins dieser Metaboliten ist N-Hydroxyurethan. Es konnte nachgewiesen werden, dass N-Hydroxyurethan deutlich aktiver als Urethan ist, was eine Induktion von Chromosomenaberrationen bei Pflanzen (Boyland et al. 1965) und Tieren (Borenfreund et al. 1964), einen antiviralen Effekt (de Sousa et al. 1965) und eine Inhibition der DNA-Synthese (Young und Hodas 1964) betrifft. Die Karzinogenität allerdings wurde von verschiedenen Gruppen auf nur 50 % im Vergleich zum Urethan selbst beziffert (Dahl et al. 1980, Miller et al. 1960, Berenblum et al. 1959). Weitere *in vivo* oder *ex vivo* Analysen zur Immuntoxizität der Substanz wurden nicht durchgeführt. Für die Substanz Vinyl Carbamat, einem weiteren Urethan-Metaboliten, wurden stärkere Effekte bezüglich der Karzinogenität gemessen, als Urethan selbst sie zu induzieren vermag (Dahl et al. 1978). Daten zur Immunsuppressivität *in vivo* standen nicht zur Verfügung. Aus diesem Grund wurden beide Metaboliten vergleichend *ex vivo* im PFCA und *in vitro* im Mishell-Dutton-Test auf ihre Immuntoxizität analysiert.

Da die immunsuppressive Wirkung des Urethans selbst im PFCA an Tag 3 gemessen wurde und dies zudem der früheste Zeitpunkt war, an dem eine ausreichende Induktion der humoralen Immunantwort erwartet werden konnte, wurden die PFCAs mit N-Hydroxyurethan und Vinyl Carbamat auf eine Analyse an Tag 3 beschränkt. Während für Vinyl Carbamat eine deutliche, konzentrationsabhängige Immunsuppressivität bestimmt wurde, zeigte sich für das N-Hydroxyurethan eine Immuntoxizität anhand eines immunstimulierenden Effektes. Eine Immunsuppression trat zum gemessenen Zeitpunkt nicht auf.

Es ist denkbar, dass der Zeitpunkt der Versuchsauswertung mit Tag 3 für die Detektion eines immunsuppressiven Effektes des N-Hydroxyurethans zu spät war. Urethan selbst zeigte an Tag 3 Effekte, die an Tag 4 nicht mehr vorhanden waren und an Tag 5 in eine Stimulation, wie sie nun auch für das N-Hydroxyurethan bestimmt wurde, umschlugen. Da der Metabolit hier direkt zugegeben wurde und dieser nicht erst gebildet werden musste, ist es möglich, dass eine immunsuppressive Wirkung bereits vor Tag 3 eintritt.

In der anschließenden Analyse *in vitro* an Tag 5 wurden sowohl Vinyl Carbamat als auch N-Hydroxyurethan als immunsuppressiv klassifiziert. Diese Ergebnisse korellierten zum Teil mit denen einer Studie zur Wirkung von Urethanmetaboliten auf die humorale Immunreaktion *in vitro* (Jeong et al. 1996). Die Gruppe bestimmte eine Reduktion der LPS-induzierten unspezifischen Antikörperbildung durch Vinyl Carbamat und N-Hydroxyurethan, die bei einigen Substanzkonzentrationen mit einer Abnahme der Zellzahl und damit einer Zytotoxizität einhergingen. Dennoch wurden für 0,05 mM N-Hydroxyurethan und 0,05 mM Vinyl Carbamat spezifische immunsuppressive Effekte gemessen.

Abschließend lässt sich festhalten, dass nicht nur in Bezug auf die Genotoxizität und zum Teil die Karzinogenität, sondern auch auf eine Immunsuppressivität die beiden Metaboliten Vinyl Carbamat und N-Hydroxyurethan stärkere Wirkungen ausüben als Urethan selbst. Während vom Urethan *in vivo* 500 mg/kg für die Induktion eines immunsuppressiven Effekts eingesetzt wurden, so wurde dieser bereits mit 20 mg/kg bzw. 60 mg/kg Vinyl Carbamat erzielt. Auch der stimulative Effekt des N-Hydroxyurethans zeigte sich bereits bei einer Konzentration von 50 mg/kg. Betrachtet man die Ergebnisse des Mishell-Dutton-Tests, so stehen einem Plaque IC90 von 38,38 mM bzw. 42,67 mM Urethan Werte von 2,90 mM bzw. 1,72 mM Vinyl Carbamat und 0,18 mM bzw. 0,29 mM N-Hydroxyurethan gegenüber. Vergleicht man nun die Daten der Mishell-Dutton-Tests mit denen der PFCAs, so fällt auf, dass N-Hydroxyurethan *in vitro* bei verhältnismäßig niedrigen Substanzkonzentrationen einen immunsuppressiven Effekt induzierte, der *ex vivo* nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte. Hier könnte es ein Vorteil der Zellkultur sein, dass durch das Fehlen der Leberenzyme, die möglicherweise einen schnellen Abbau des N-Hydroxyurethans bewirken, auch an Tag 5 nach Substanzzugabe noch ein immunsuppressiver Effekt messbar ist.

#### 4.4.2 Die Metabolisierung von Urethan in vitro

Durch weitere Versuche sollte nachgewiesen werden, ob Urethan *in vitro* tatsächlich zu relevanten Mengen N-Hydroxyurethan und Vinyl Carbamat metabolisiert wird. Zur Situation *in vivo* wurde eine Vielzahl verschiedener Analysen durchgeführt, die eine Metabolisierung durch P450 Cytochrome und insbesondere CYP2E1 belegen.

Eine Metabolisierung von Urethan zu Vinyl Carbamat, N-Hydroxyurethan und 2-Hydroxyethylcarbamat wurde erstmals an humanen Lebermikrosomen nachgewiesen (Guengerich und Kim 1991). Dabei wurde CYP2E1 als das humane P450 Cytochrom angesehen, das diese Reaktion katalysiert (Guengerich und Kim 1991). In vivo Versuche an Nagetieren zeigten, dass die Urethan-induzierte Suppression der humoralen Immunantwort im PFCA durch vorherige Behandlung der Tiere mit der Cytochrom P450-induzierenden Substanz Phenobarbital verstärkt und mit der inhibierenden Substanz Aminoacetonitril aufgehoben wird (Jeong et al. 1995). An Lungenmikrosomen von CD-1 Mäusen konnte eine Metabolisierung von Urethan durch CYP2E1 demonstriert werden (Forkert und Lee 1997). Bezüglich seiner immunsuppressiven Substanzeigenschaften wurde Urethan in BALB/c Mäusen durch P450 Cytochrome aktiviert und durch Esterase inaktiviert (Cha et al. 2000). In Studien an CYP2E1-Null-Mäusen konnte eine signifikante Inhibierung der Metabolisierung von Urethan zu  $CO_2$ , eine deutlich verlängerte Halbwertszeit des Urethans selbst und eine erhöhte Urethan-Konzentration im Blut und im Gewebe nachgewiesen werden (Hoffler et al. 2003). Zudem war die Urethan-induzierte Genotoxizität und Zellproliferation in CYP2E1-Mäusen aufgehoben (Hoffler et al. 2005). Eine mehrfache Substanzverabreichung führte zu einer gesteigerten Bioakkumulation der Substanz (Hoffler und Ghanayem 2005).

Für Nager wurde nachgewiesen, dass nur 5 % des verabreichten Urethans unverändert ausgeschieden werden, 90 % werden zu Esterol, Ammonium und  $CO_2$  hydrolysiert (Nomeir et al. 1989, Skipper et al. 1951). Ca. 0,1 % werden reversibel zu N-Hydroxyurethan konvertiert (Nery 1968, Boyland et al. 1965) und weniger als 0,5 % irreversibel zu Vinyl Carbamat (Cha et al. 2000). Vinyl Carbamat wiederum wird zu Vinyl Carbamat Epoxid konvertiert (Dahl et al. 1980; 1978), welches kovalent an DNA, RNA und Proteine bindet (Miller und Miller 1983).

Um die Situation *in vitro* zu analysieren, wurde ein PCR Array zur Expressions-Analyse 84 metabolismus-relevanter Gene durchgeführt. Dieser zeigte jedoch keine spezifische Induktion eines bestimmten Abbauweges durch das Urethan an, sondern vielmehr eine unspezifische Herunterregulation der Transkription vieler Gene bei einer Inkubationszeit von bis zu 8 h, während eine Inkubationszeit von 48 h eine Heraufregulation der meisten Gentranskripte zur Folge hatte. Es ist denkbar, dass die unspezifischen späten Induktionen der Gentranskripte Zeichen des Zeitraumes sind, in dem gerade noch keine Zytotoxizität auftritt. Diese Zeit- oder Konzentrationsbereiche haben häufig eine generelle Induktion der Zell- und Stoffwechselfunktionen zur Folge, die sich in Viabilitätstests in einem Anstieg der Viabilität auf über 100 % im Vergleich zur vehikelbehandelten Kontrolle darstellt (siehe *Abbildung* 3.4 und *Abbildung* 3.15). Dieses Phänomen zeigt sich nicht nur bei Primärzellkulturen, sondern ist auch für Zelllinien wie beispielsweise RAW 264.7 Makrophagen bekannt (Scheel et al. 2009).

Auch wenn keine Urethan-spezifische Induktion des P450 Cytochroms CYP2E1 detektiert werden konnte, so belegen die Daten doch, dass CYP2E1 von Milzzellen exprimiert wird und somit eine Metabolisierung des Urethans möglich ist. Für Lymphozyten aus Rattenblut konnte eine Funktionalität von CYP2E1 nachgewiesen werden (Dey et al. 2002). Auch für verschiedene humane Gewebe wie Plazenta, Haut und Lunge konnte eine Transkription von CYP2E1 bestimmt werden, wobei nur für die Plazenta und das Lungengewebe auch eine Enzymaktivität gemessen wurde (Botto et al. 1994). Für humanes Milzgewebe konnte eine CYP2E1-Expression durch RT-PCR nachgewiesen werden (Bieche et al. 2007).

Es ist fraglich, ob eine Induktion der Genexpression von CYP2E1 in der Mishell-Dutton-Kultur überhaupt zu erwarten gewesen wäre. Es ist nämlich auch für die *in vivo* Situation unklar, ob CYP2E1 durch eine Verabreichung von Urethan induziert wird. Für einige Substanzen wie Ethanol, Aceton, Pyrazol und Isoniazid konnte nachgewiesen werden, dass eine erhöhte Genexpression von CYP2E1 induziert werden kann (Danko und Chaschin 2005). Zudem ist unbekannt, wie Milzzellen auf die Bedingungen einer Zellkultur reagieren und wie sie sich daran anpassen. Für proximale tubuläre Zellen der Ratte konnte der generelle Prozess einer Dedifferenzierung durch das Anlegen einer Primärkultur in Genexpressionsanalysen belegt werden (Weiland et al. 2007). Dieser bezog sich unter anderem auf Gene der Biotransformation, die generell unter Zellkulturbedingungen herunterreguliert wurden. Dazu gehörten Phase I und Phase II Enzyme, und damit auch die P450 Cytochrome.

Wurde der Mishell-Dutton-Kultur mit Urethan in einem weiteren Versuch N-Hydroxyurethan in nicht-zytotoxischer und nicht-immunsuppressiver Konzentration zugesetzt, so blieb die Immunsuppressivität des Urethans unverändert. Wurde jedoch Vinyl Carbamat in entsprechender Konzentration zugesetzt, so verstärkte sich die immunsuppressive Wirkung auf die humorale Immunreaktion. Da beide Metaboliten, also sowohl Vinyl Carbamat als auch N-Hyroxyurethan, durch das Enzym CYP2E1 entstehen, kann angenommen werden, dass diese in einem bestimmten Gleichgewicht zueinander vorliegen. Das Vorhandensein eines Metaboliten würde die Bildung des anderen begünstigen. Es kann also entsprechend dieser Theorie für den durchgeführten Versuch davon ausgegangen werden, dass durch das Vorhandensein des Vinyl Carbamats mehr N-Hydroxyurethan gebildet wurde, welches die stärkere Immunsuppressivität hervorrief. Dies lässt vermuten, dass die Metabolisierung zu N-Hydroxyurethan vorwiegend für die Immunsuppressivität des Urethans verantwortlich ist. Dennoch kann anhand des Versuches nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um einen rein additiven Substanzeffekt handelt, der entweder durch eine verstärkte Anreicherung des Vinyl Carbamats bedingt sein könnte oder aber durch eine Kombination der immunsuppressiven Substanzeffekte von Urethan und Vinyl Carbamat entsteht.

Durch eine Zugabe von S9-Mix zur Mishell-Dutton-Kultur wurde eine Metabolisierung des Urethans sichergestellt. Dies führte zu einer verminderten Immunsuppressivität des Urethans im Vergleich zur Kontrolle ohne S9-Mix. Dieses Ergebnis war überraschend, da *in vivo* P450-Aktivatoren zu einer verstärkten Suppression der humoralen Immunreaktion führten (Jeong et al. 1995), und für die Substanzen Cyclophosphamid und Benzo(a)pyren eine ebensolche Wirkung des S9-Mixes auch für Mishell-Dutton-Kulturen nachgewiesen werden konnte (siehe *Kapitel* 3.3.4). Die Tatsache, dass kein stark abweichender Effekt zur Kontrolle durch die Zugabe von S9-Mix erzielt wurde, lässt vermuten, dass eine Metabolisierung der Substanz Urethan ohnehin, also auch ohne Zugabe von S9-Mix, stattfand. Diese Annahme korreliert zudem mit der nachgewiesenen Expression von CYP2E1 der Milzzellen in Kultur. Es ist denkbar, dass die Zugabe von S9-Mix entweder zu einem beschleunigten Abbau des Urethans und seiner Metaboliten führte oder aber das Gleichgewicht zugunsten der Bildung eines Metaboliten verschoben wurde, der weniger stark immunsuppressiv wirkt. Da N-Hydroxyurethan zuvor als möglicher Kandidat für die Ausübung immunsuppressiver Substanzeffekte erhoben wurde, ist in diesem Fall auch eine erhöhte Konversion zurück zum Urethan denkbar.

Da aufgrund der Versuchsergebnisse von einer generellen Metabolisierung des Urethans in der Mishell-Dutton-Kultur auszugehen war, wurde mit Diethylditihiocarbamat (DDC) ein unspezifischer CYP2E1-Inhibitor (Chang et al. 1994) eingesetzt. Die Einbringung der Substanz in das bestehende Versuchsprotokoll zeigte sich zunächst problematisch. Nachdem durch DDC erfolgreich eine durch S9-Mix induzierte Metabolisierung von Cyclophosphamid teilweise inhibiert werden konnte, musste für die Verwendung von Urethan die einzusetzende Konzentration erneut austitriert werden. Grund dafür war ein auftretender additiver Effekt des DDC und des Urethans, der eine verstärkte Zytotoxizität zur Folge hatte. An HL60 Zellen wurde nachgewiesen, dass DDC sowohl eine Apoptose als auch eine Nekrose induzieren kann (Kimoto-Kinoshita et al. 2004). Möglicherweise verschob das Vorhandensein von Urethan die Wirkung in eine der beiden Richtungen.

Die Zugabe einer nicht-zytotoxischen Konzentration des DDC zur Mishell-Dutton-Kultur bewirkte schließlich eine Reduzierung des immunsuppressiven Effekts des Urethans. Somit wurde eine Metabolisierung durch P450-Cytochrome in der Kontrolle nachgewiesen, die für eine verstärkt auftretende Immunsuppression verantwortlich war und durch DDC teilweise inhibiert wurde. Auch wenn aufgrund der unspezifischen Wirkung des DDC neben CYP2E1 weitere P450-Cytochrome wie CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP3A3 und CYP3A4 geblockt werden können (Chang et al. 1994), so sprechen die bereits beschriebenen Daten *in vivo* durchgeführter Versuche verschiedener Gruppen doch klar für eine Metabolisierung des Urethans durch dieses eine Enzym. In einem *in vivo* Experiment an Ratten konnte mit DDC eine Metabolisierung von Urethan nahezu vollständig inhibiert werden, während eine Induktion von CYP2B und CYP1A Isozymen keinen Effekt hatte (Carlson 1994).

Zusammenfassend belegen die Versuchsergebnisse zur Substanz Urethan eine Metabolisierung, die auch *in vitro* auftritt und nicht durch S9-Mix induziert werden muss, sondern durch zelleigene P450-Cytochrome katalysiert wird. Dabei ist es als sehr wahrscheinlich anzusehen, dass CYP2E1 diese Aufgabe übernimmt. Die entstehenden Metaboliten N-Hydroxyurethan und Vinyl Carbamat sind *in vivo* und *in vitro* stärker immuntoxisch als die Ausgangssubstanz Urethan. Anhand der aus den Mishell-Dutton-Kulturen gewonnenen Daten lässt sich vermuten, dass hauptsächlich N-Hydroxyurethan die immunsuppressive Wirkung ausübt. Um jedoch eindeutig nachzuweisen, ob in der Mishell-Dutton-Kultur mit Urethan relevante Mengen N-Hydroxyurethan und Vinyl Carbamat entstehen, die entsprechend immunsuppressive Effekte ausüben können, wäre die Durchführung einer HPLC unerlässlich.

Für die Mishell-Dutton-Kultur an sich lässt sich festhalten, dass die erzielten Ergebnisse mit denen der *ex vivo* durchgeführten PFCAs korrelierten. Zudem zeigte sich der Versuch verschiedener weiterer Methoden zugänglich, wie der Inhibierung bestimmter Enzyme oder einer Analyse der Genexpression. Die Mishell-Dutton-Kultur eignet sich daher nicht nur hervorragend zur Detektion immunsuppressiver Substanzeffekte, sondern auch zur *in vitro* Analyse immunsuppressionsinduzierender Mechanismen.

### Kapitel 5

### Ausblick

Die Methode der Mitogenstimulation ist wohl hinsichtlich ihrer Möglichkeiten zur Identifikation immunsuppressiver Substanzeffekte die am besten erforschte. Trotz der vielfältigen Arbeiten auf diesem Gebiet konnte bisher aus keinem der verschiedenen eingesetzten Protokolle eine Tierversuchsersatzmethode etabliert werden. Die für diese Arbeit im Rahmen des ECVAM-Projektes CCR.IHCP.C432293.X0 "Optimisation of *in vitro* immunotoxicity" durchgeführten Versuche zeigen deutlich die Schwächen der Methode, die sie für eine Validierungsstudie schon im Vorfeld ungeeignet erscheinen lassen. Die Mitogenstimulationen verfügen über eine unzureichende Spezifität und Sensitivität bei der Identifikation immunsuppressiver Substanzeffekte, so dass eine weitere Optimierung der Methode nicht sinnvoll ist.

Die Mishell-Dutton-Kultur hingegen zeigt sehr vielversprechende Ergebnisse bei der Identifikation immunsuppressiver Substanzeffekte. Die für diese Arbeit durchgeführten Versuche belegen eine Gleichwertigkeit zum ex vivo Äquivalent, dem Plaque Forming Cell Assay (PFCA). Dieser Test ist in verschiedenen Richtlinien zur Evaluierung immuntoxischer Substanzeffekte gefordert. Allerdings geben die hier eingesetzten acht immunsuppressiven und vier nichtimmunsuppressiven Substanzen lediglich einen Einblick. Inwieweit die Methode auch weniger gut erforschte Substanzen mit möglicherweise anderen Wirkmechanismen korrekt identifizieren kann, bliebe in einer Validierungsstudie mit einer Reihe weiterer Substanzen zu überprüfen. Ebenfalls steht es aus zu testen, wie verlässlich die Methode in anderen Laboren funktioniert und wie hoch die Vergleichbarkeit der dort erzielten Daten mit denen aus unserem Labor wäre. Nur wenn dabei eine hohe Vergleichbarkeit der Ergebnisse erzielt wird und die bisher angezeigte hohe Spezifität und Sensitivität bestehen bleibt, kann aus der Methode eine anerkannte Alternative zum Tierversuch bei der Identifikation immunsuppressiver Substanzeffekte entwickelt werden. Im Falle der Durchführung einer solchen Validierungsstudie bliebe zudem abzuwarten, ob die Berechnung der Viabilität bei der jeweiligen Substanzkonzentration des Plaque IC90 mit einem Grenzwert von 50 % Bestand hätte, oder ob die Berechnung weiter angepasst werden müsste.

Für eine erfolgreiche Etablierung und Optimierung des Mishell-Dutton-Tests mit Milzzellen der Ratte und PBMCs verschiedener Spezies ist wohl noch ein weiter Weg zu gehen. Es scheinen Differenzen zwischen den verschiedenen Zelltypen und Spezies zu bestehen, die bisher nicht bekannt waren und zum jetzigen Zeitpunkt nicht vollständig identifiziert sind. Erst wenn sie ausnahmslos bekannt sind, können die Kulturbedingungen entsprechend angepasst werden, um die zuverlässige Ausbildung einer ausreichend starken humoralen Immunreaktion zu gewährleisten. Eine solche Arbeit wäre von großem Wert, da mit einem Mishell-Dutton-Test an Rattenmilzzellen, vorzugsweise des Stammes Wistar, die höchste Vergleichbarkeit zu den verfügbaren Daten aus PFCAs gegeben ist. Der Einsatz von PBMCs würde mit einer versuchsbegleitenden Durchführung des Mishell-Dutton-Tests ein weites Feld potenzieller Einsatzmöglichkeiten eröffnen.

Um den Metabolismus der Substanz Urethan *in vitro* vollständig aufzuklären, sind weitere Versuche notwendig. Eine HPLC beispielsweise könnte endgültig den Nachweis über eine Metabolisierung durch eine Quantifizierung der Metaboliten N-Hydroxyurethan und Vinyl Carbamat geben. Generell wurde in den *in vitro* Versuchen mit der Substanz Urethan und ihren Metaboliten ein breites Feld der Kombination der Mishell-Dutton-Kultur mit verschiedenen Methoden wie PCR-Arrays und Enzyminhibierungen aufgezeigt. Diese Art der Zellkultur ist also durchaus kompatibel mit der Anwendung verschiedenster Methoden. Inwiefern weitere, bisher nicht durchgeführte Methoden zur Analyse immunsuppressionsinduzierender Mechanismen damit umzusetzen sind, muss in Zukunft weiter ausgetestet werden.

### Kapitel 6

## Zusammenfassung

Verschiedene Richtlinien zur toxikologischen Risikobewertung von Medikamenten, Pflanzenschutzmitteln und Chemikalien sehen die Durchführung eines immunologischen Funktionstests zur Erfassung immuntoxischer Substanzeffekte vor. Aufgrund aktueller ethischer und politischer Entwicklungen, die eine Einschränkung und möglichst einen vollständigen Ersatz des Einsatzes von Tieren zu Versuchszwecken fordern, wird verstärkt an der Entwicklung von Ersatzmethoden gearbeitet.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden zwei Methoden zur Detektion immunsuppressiver Substanzeffekte auf ihre korrekte Vorhersagewahrscheinlichkeit *in vitro* analysiert. Dabei handelte es sich zum einen um Mitogenstimulationsversuche und zum anderen um Mishell-Dutton-Kulturen. Die Ergebnisse der Mitogenstimulationsversuche zeigen, dass ein Einsatz dieser Methode zur Bestimmung immunsuppressiver Substanzeffekte *in vitro* generell fragwürdig ist. Selbst beim Einsatz gut erforschter Standardsubstanzen traten mit dieser Methode viele Probleme auf, die eine sichere Einstufung der gemessenen Substanzeffekte in die Kategorien immunsuppressiv und nicht-immunsuppressiv zum Teil verhinderten. Es wird daher mit dieser Methode in Zukunft nicht möglich sein, bisher unerforschte Substanzen korrekt zu klassifizieren und einen Tierversuch zu ersetzen.

Die Mishell-Dutton-Kultur wurde zunächst an murinen Milzzellen im Labor etabliert und optimiert. Anschließend wurde versucht, die Methode auf Milzzellen der Ratte und periphere mononukleäre Zellen (PBMC) der Maus, der Ratte und des Menschen zu übertragen. Es konnte allerdings mit diesen Zellen keine ausreichend starke humorale Immunreaktion ausgelöst werden, wie sie für eine Analyse immuntoxischer Substanzeffekte notwendig wäre. Die Ursachen dafür wurden an Rattenmilzzellen in Form von Analysen der CD4-positiven T-Zellfraktion näher untersucht. Der Anteil regulatorischer T-Zellen ( $T_{reg}$ ) war im zeitlichen Verlauf der Kultur im Vergleich zu murinen Milzzellen hochreguliert und supprimierte so möglicherweise die humorale Immunreaktion.

Die Mishell-Dutton-Kultur mit murinen Milzzellen wurde zur Analyse immunsuppressiver Substanzeffekte *in vitro* eingesetzt. Im Gegensatz zur Mitogenstimulation konnten mit dieser Methode, insbesondere nach dem Einfügen eines metabolisch aktiven Systems, acht immunsuppressive und vier nicht-immunsuppressive Substanzen korrekt und reproduzierbar klassifiziert werden. Wenn sich die hohe Spezifität und Sensitivität auch für weitere Substanzen bestätigt, wäre der Mishell-Dutton-Test bestens geeignet, einen *in vivo/ex vivo* durchgeführten immunologischen Funktionstest zu ersetzen. Des Weiteren wurde die Mishell-Dutton-Kultur mit murinen Milzzellen zur Analyse des Immunsuppressions-Mechanismus der Substanz Urethan *in vitro* eingesetzt, die vergleichend zur *in vivo* Situation erfolgte. Die Versuchsergebnisse belegen eine Metabolisierung des Urethans, die *in vitro* durch zelleigene P450-Cytochrome katalysiert wird. Dabei ist es als sehr wahrscheinlich anzusehen, dass CYP2E1 diese Aufgabe übernimmt. Anhand der aus der Mishell-Dutton-Kultur gewonnenen Daten lässt sich vermuten, dass hauptsächlich N-Hydroxyurethan die immunsuppressive Wirkung ausübt. Für einen eindeutigen Nachweis wären jedoch weitere Analysen notwendig.

### Kapitel 7

### Summary

Different guidelines for the toxicological risk assessment of drugs, pesticides and chemicals ask for functional immune assays for the detection of immuntoxic properties of compounds. For ethical and political reasons the use of animal testing should be reduced and whenever possible completely replaced. Because of this an increasing activity in the field of the development of alternatives to animal testing is observed.

For the work presented here two different methods were investigated for their correct prediction of immunotoxic properties of compounds *in vitro*. One was the use of mitogen stimulation assays and the other the use of Mishell-Dutton cultures. The results obtained with mitogen stimulations show that the variability was extreme and the use for this purpose therefore rather problematic. Even well established standard compounds could not always be categorized reliably and clearly. Due to this the method will not be suitable to correctly predict immuntoxic properties of unknown compounds and to replace animal testing.

The Mishell-Dutton culture was established and optimized using murine spleen cells. Next efforts were made to adapt the protocol to spleen cells from the rat and to peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from mice, rats and humans. It was not possible to induce a humoral immune response that would be strong enough for the analyses of immunotoxic properties of compounds. The reason for this was investigated by subpopulation analysis of CD4-positive T cells. The amount of regulatory T cells ( $T_{reg}$ ) was upregulated in rat spleen cells in comparison to murine spleen cells over the time course of the Mishell-Dutton culture. It can be assumed that these  $T_{reg}s$  suppressed the humoral immune response in rats.

The Mishell-Dutton culture with murine spleen cells was used for analyses of immunotoxic properties of compounds *in vitro*. In contrast to mitogen stimulation assays this method was suitable for a correct and reproducible categorization of eight immunsuppressants and four non-immunosuppressants, especially after integrating a metabolic system into the assay system. If the high sensitivity and specifity can be confirmed with additional compounds the method will be suitable for a replacement of an *in vivo/ex vivo* functional immune test.

Additionally, Mishell-Dutton cultures were used for the analysis of the mechanism of the compound Urethane to induce immunosuppression. The data obtained *in vitro* was compared to the *in vivo* situation. The results show a metabolization of urethane, which is catalyzed by P450 cytochromes of the splenic cells themselves. It is likely that CYP2E1 is the appropriate enzyme. According to the data obtained from different experiments it can be speculated that N-Hydroxyurethane is the metabolite generating immunotoxic effects. For verification further analyses are necessary.
### Literaturverzeichnis

- 1907/2006. Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH), zur Schaffung einer Europäischen Agentur für chemische Stoffe, zur Änderung der Richtlinie 1999/45/EG und zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 793/93 des Rates, der Verordnung (EG) Nr. 1488/94 der Kommission, der Richtlinie 76/769/EWG des Rates sowie der Richtlinien 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/EG und 2000/21/EG der Kommission, ABl. L 396 vom 30.12.2006, S. 1.
- 2003/15/EG. Richtlinie 2003/15/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 27. Februar 2003 zur Änderung der Richtlinie 76/768/EWG des Rates zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über kosmetische Mittel, ABl. L 66 vom 11.3.2003, S. 26.
- 76/768/EWG. Richtlinie des Rates 76/768/EWG vom 27. Juli 1976 zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über kosmetische Mittel, ABl. L 262 vom 27.9.1976, S. 169.
- 86/609/EWG. Richtlinie des Rates 86/609/EWG vom 24. November 1986 zur Annäherung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedstaaten zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere, ABl. L 358 vom 18.12.1986, S. 1.
- R. T. Abraham and G. J. Wiederrecht. Immunopharmacology of rapamycin. Annu. Rev. Immunol., 14:483–510, 1996.
- S. Alberti, D. Boraschi, W. Luini, and A. Tagliabue. Effects of in vivo treatments with cyclosporin-A on mouse cell-mediated immune responses. *Int. J. Immunopharmacol.*, 3:357– 364, 1981.
- W. S. Aronow. Etiology, pathophysiology, and treatment of atrial fibrillation: part 1. Cardiol. Rev., 16:181–188, 2008.
- R. Bacchetta, S. Gregori, and M. G. Roncarolo. CD4+ regulatory T cells: mechanisms of induction and effector function. *Autoimmun. Rev.*, 4:491–496, 2005.
- A. F. Badawi, S. J. Stern, N. P. Lang, and F. F. Kadlubar. Cytochrome P-450 and acetyltransferase expression as biomarkers of carcinogen-DNA adduct levels and human cancer susceptibility. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 395:109–140, 1996.
- K. A. Baken, R. J. Vandebriel, J. L. Pennings, J. C. Kleinjans, and H. van Loveren. Toxicogenomics in the assessment of immunotoxicity. *Methods*, 41:132–141, 2007.
- C. M. Bamberger and H. M. Schulte. Mechanisms of action of glucocorticoids. *Internist (Berl.)*, 38:366–370, 1997.

- M. Ban, D. Hettich, and C. Cavelier. Use of Mishell-Dutton culture for the detection of the immunosuppressive effect of iron-containing compounds. *Toxicol. Lett.*, 81:183–188, 1995.
- M. C. Berenbaum. Is azathioprine a better immunosuppressive than 6-mercaptopurine? *Clin. Exp. Immunol.*, 8:1–8, 1971.
- I. Berenblum, D. Ben-Ishai, N. Haran-Ghera, A. Lapidot, E. Simon, and N. Trainin. Skin initiating action and lung carcinogenesis byderivatives of urethane (ethyl carbamate) and related compounds. *Biochem. Pharmacol.*, 2:168–176, 1959.
- E. M. Berger and A. B. Gottlieb. Developments in systemic immunomodulatory therapy for psoriasis. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 7:434–444, 2007.
- J. R. Bertino. The mechanism of action of the folate antagonists in man. *Cancer Res.*, 23: 1286–1306, 1963.
- A. A. Bialasiewicz, D. Lubach, and S. Marghescu. Immunological features of psoriasis. Effects of Ro-109359, concanavalin A, pokeweed mitogen, and methotrexate on cultivated lymphocytes. *Arch. Dermatol. Res.*, 271:29–40, 1981.
- I. Bieche, C. Narjoz, T. Asselah, S. Vacher, P. Marcellin, R. Lidereau, P. Beaune, and I. de Waziers. Reverse transcriptase-PCR quantification of mRNA levels from cytochrome (CYP)1, CYP2 and CYP3 families in 22 different human tissues. *Pharmacogenet. Genomics*, 17:731– 742, 2007.
- D. L. Birx, M. Berger, and T. A. Fleisher. The interference of T cell activation by calcium channel blocking agents. *J. Immunol.*, 133:2904–2909, 1984.
- R. A. Blaheta, N. P. Hailer, N. Brude, B. Wittig, K. Leckel, E. Oppermann, M. Bachmann, S. Harder, J. Cinatl, M. Scholz, J. Bereiter-Hahn, S. Weber, A. Encke, and B. H. Markus. In vitro analysis of verapamil-induced immunosuppression: potent inhibition of T cell motility and lymphocytic transmigration through allogeneic endothelial cells. *Transplantation*, 69: 588–597, 2000.
- J. A. Bluestone and Q. Tang. How do CD4+CD25+ regulatory T cells control autoimmunity? *Curr. Opin. Immunol.*, 17:638–642, 2005.
- C. Büning and H. Lochs. Conventional therapy for Crohn's disease. World J. Gastroenterol., 12:4794–4806, 2006.
- S. K. Bopp and T. Lettieri. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. *BMC Pharmacol.*, 8:8, 2008.
- E. Borenfreund, M. Krim, and A. Bendich. Chromosomal aberrations induced by hyponitrite and hydroxylamine derivatives. J. Natl. Cancer Inst., 32:667–679, 1964.
- F. Botto, E. Seree, S. el Khyari, G. de Sousa, A. Massacrier, M. Placidi, P. Cau, W. Pellet, R. Rahmani, and Y. Barra. Tissue-specific expression and methylation of the human CYP2E1 gene. *Biochem. Pharmacol.*, 48:1095–1103, 1994.

- J. F. Boyer, A. Cantagrel, and A. Constantin. Impact of traditional therapies and biologics on cardiovascular diseases in rheumatoid arthritis. *Curr. Vasc. Pharmacol*, 6:218–227, 2008.
- E. Boyland, R. Nery, and K. S. Peggie. The induction of chromosome aberrations in Vicia faba root meristems by N-hydroxyurethane and related compounds. Br. J. Cancer, 19:878–882, 1965.
- H. Buschmann, H. Krausslich, J. Meyer, A. Radzikowski, and K. Osterkorn. Variation of the immune response to sheep erythrocytes in several strains of mice and their crosses. *Med. Microbiol. Immunol.*, 158:71–82, 1972.
- W. Cai, L. Hu, and J. G. Foulkes. Transcription-modulating drugs: mechanism and selectivity. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 7:608–615, 1996.
- M. Carfi', A. Gennari, I. Malerba, E. Corsini, M. Pallardy, R. Pieters, H. Van Loveren, H. W. Vohr, T. Hartung, and L. Gribaldo. In vitro tests to evaluate immunotoxicity: a preliminary study. *Toxicology*, 229:11–22, 2007.
- G. P. Carlson. The effect of inducers and inhibitors of urethane metabolism on its in vitro and in vivo metabolism in rats. *Cancer Lett.*, 87:145–150, 1994.
- S. W. Cha, H. K. Gu, K. P. Lee, M. H. Lee, S. S. Han, and T. C. Jeong. Immunotoxicity of ethyl carbamate in female BALB/c mice: role of esterase and cytochrome P450. *Toxicol. Lett.*, 115: 173–181, 2000.
- H. T. Chan, K. Kedzierska, J. O'Mullane, S. M. Crowe, and A. Jaworowski. Quantifying complement-mediated phagocytosis by human monocyte-derived macrophages. *Immunol. Cell Biol.*, 79:429–435, 2001.
- T. K. Chang, F. J. Gonzalez, and D. J. Waxman. Evaluation of triacetyloleandomycin, alphanaphthoflavone and diethyldithiocarbamate as selective chemical probes for inhibition of human cytochromes P450. Arch. Biochem. Biophys., 311:437–442, 1994.
- R. E. Click, L. Benck, and B. J. Alter. Enhancement of antibody synthesis in vitro by mercaptoethanol. *Cell. Immunol.*, 3:156–160, 1972a.
- R. E. Click, L. Benck, and B. J. Alter. Immune responses in vitro. I. Culture conditions for antibody synthesis. *Cell. Immunol.*, 3:264–276, 1972b.
- S. Coecke, H. Ahr, B. J. Blaauboer, S. Bremer, S. Casati, J. Castell, R. Combes, R. Corvi, C. L. Crespi, M. L. Cunningham, G. Elaut, B. Eletti, A. Freidig, A. Gennari, J. F. Ghersi-Egea, A. Guillouzo, T. Hartung, P. Hoet, M. Ingelman-Sundberg, S. Munn, W. Janssens, B. Ladstetter, D. Leahy, A. Long, A. Meneguz, M. Monshouwer, S. Morath, F. Nagelkerke, O. Pelkonen, J. Ponti, P. Prieto, L. Richert, E. Sabbioni, B. Schaack, W. Steiling, E. Testai, J. A. Vericat, and A. Worth. Metabolism: a bottleneck in in vitro toxicological test development. The report and recommendations of ECVAM workshop 54. *Altern. Lab. Anim.*, 34:49–84, 2006.
- O. M. Colvin. An overview of cyclophosphamide development and clinical applications. Curr. Pharm. Des., 5:555–560, 1999.

- T. A. Connors, P. J. Cox, P. B. Farmer, A. B. Foster, and M. Jarman. Some studies of the active intermediates formed in the microsomal metabolism of cyclophosphamide and isophosphamide. *Biochem. Pharmacol.*, 23:115–129, 1974.
- J. R. Corvalan and J. C. Howard. Primary in vitro antibody formation in the rat: partial characterization and properties of an inhibitor cell present in normal spleen. *Eur. J. Immunol.*, 8:331–335, 1978.
- H. Cosenza, L. D. Leserman, and D. A. Bowley. The third cell type required for the immune response of spleen cells in vitro. *J. Immunol.*, 107:414–421, 1971.
- J. Cotovio, M. H. Grandidier, P. Portes, R. Roguet, and G. Rubinstenn. The in vitro skin irritation of chemicals: optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process. *Altern. Lab. Anim.*, 33:329–349, 2005.
- D. S. Cunningham, M. Grogl, and R. E. Kuhn. Suppression of antibody responses in humans infected with Trypanosoma cruzi. *Infect. Immun.*, 30:496–499, 1980.
- G. A. Dahl, J. A. Miller, and E. C. Miller. Vinyl carbamate as a promutagen and a more carcinogenic analog of ethyl carbamate. *Cancer Res.*, 38:3793–3804, 1978.
- G. A. Dahl, E. C. Miller, and J. A. Miller. Comparative carcinogenicities and mutagenicities of vinyl carbamate, ethyl carbamate, and ethyl N-hydroxycarbamate. *Cancer Res.*, 40:1194– 1203, 1980.
- I. M. Danko and N. A. Chaschin. Association of CYP2E1 gene polymorphism with predisposition to cancer development. *Exp. Oncol.*, 27:248–256, 2005.
- C. P. de Sousa, E. Boyland, and R. Nery. Inhibition of Shope fibroma virus with Nhydroxyurethane and related compounds. *Nature*, 206:688–689, 1965.
- A. Dey, D. Parmar, A. Dhawan, D. Dash, and P. K. Seth. Cytochrome P450 2E1 dependent catalytic activity and lipid peroxidation in rat blood lymphocytes. *Life Sci.*, 71:2509–2519, 2002.
- A. T. Di Marco, C. Franceschi, and G. Prodi. Selective thymus-derived cell enrichment in the rat spleen as a result of immunodepression by urethan. *Cancer Res.*, 32:1569–1573, 1972.
- O. Di Munno and A. Delle Sedie. Effects of glucocorticoid treatment on focal and systemic bone loss in rheumatoid arthritis. J. Endocrinol. Invest., 31:43–47, 2008.
- H. M. Dosch and E. W. Gelfand. Generation of human plaque-forming cells in culture: tissue distribution, antigenic and cellular requirements. J. Immunol., 118:302–308, 1977.
- H. M. Dosch, M. E. Percy, and E. W. Gelfand. Functional differentiation of B lymphocytes in congenital agammaglobulinemia. I. Generation of hemolytic plaque-forming cells. J. Immunol., 119:1959–1964, 1977.

- F. J. Dumont, M. J. Staruch, S. L. Koprak, M. R. Melino, and N. H. Sigal. Distinct mechanisms of suppression of murine T cell activation by the related macrolides FK-506 and rapamycin. *J. Immunol.*, 144:251–258, 1990.
- R. W. Dutton and R. I. Mishell. Cell populations and cell proliferation in the in vitro response of normal mouse spleen to heterologous erythrocytes. Analysis by the hot pulse technique. J. Exp. Med., 126:443–454, 1967.
- R. W. Dutton, M. M. McCarthy, R. I. Mishell, and D. J. Raidt. Cell components in the immune response. IV. Relationships and possible interactions. *Cell. Immunol.*, 1:196–206, 1970.
- V. A. Eagling, J. F. Tjia, and D. J. Back. Differential selectivity of cytochrome P450 inhibitors against probe substrates in human and rat liver microsomes. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 45: 107–114, 1998.
- D. D. Eardley and R. K. Gershon. Induction of specific suppressor T cells in vitro. J. Immunol., 117:313–318, 1976.
- D. D. Eardley, M. O. Staskawicz, and R. K. Gershon. Suppressor cells: dependence on assay conditions for functional activity. J. Exp. Med., 143:1211–1219, 1976.
- G. Ehling, M. Hecht, A. Heusener, J. Huesler, A. O. Gamer, H. van Loveren, T. Maurer, K. Riecke, L. Ullmann, P. Ulrich, R. Vandebriel, and H. W. Vohr. An European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicology*, 212:60–68, 2005a.
- G. Ehling, M. Hecht, A. Heusener, J. Huesler, A. O. Gamer, H. van Loveren, T. Maurer, K. Riecke, L. Ullmann, P. Ulrich, R. Vandebriel, and H. W. Vohr. An European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: 2nd round. *Toxicology*, 212:69–79, 2005b.
- EMEA. Committee for medicinal products for human use (CHMP). Guideline on repeated dose toxicity. EMEA/CHMP/SWP/488313/2007, 2008.
- P. Emmerling. [Animal experiments on the development of primary and secondary antibody formation in early life. II. Formation of immunologic memory in young, as compared to, adult NMRI mice]. Arztl. Forsch., 26:178–187, 1972.
- J. Encke, W. Uhl, W. Stremmel, and P. Sauer. Immunosuppression and modulation in liver transplantation. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 19 Suppl 4:v22–25, 2004.
- EPA. Biochemicals Test Guidelines. OPPTS 880.3550 Immuntoxicity. EPA 712-C-96-280, 1996a.
- EPA. Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870.7800 Immunotoxicity. EPA 712-C-96-351, 1996b.
- P. O. Ericsson, O. Linden, M. Dohlsten, H. O. Sjogren, and G. Hedlund. Functions of rat CD4+ T cell subsets defined by CD45RB: CD45RB- cells have a much stronger response to recall antigens, whereas polyclonally activated cells of both subsets are equally efficient producers of IFN in the presence of exogenous IL-2. *Cell. Immunol.*, 132:391–399, 1991.

- A. S. Fauci. Human B cell function in a polyclonally induced plaque forming cell system. Cell triggering and immunoregulation. *Immunol. Rev.*, 45:93–116, 1979.
- FDA. Guidance for Industry. Immunotoxicology evaluation of investigational new drugs., 2002.
- G. Fedele, P. Stefanelli, F. Spensieri, C. Fazio, P. Mastrantonio, and C. M. Ausiello. Bordetella pertussis-infected human monocyte-derived dendritic cells undergo maturation and induce Th1 polarization and interleukin-23 expression. *Infect. Immun.*, 73:1590–1597, 2005.
- S. M. Flechner, J. Kobashigawa, and G. Klintmalm. Calcineurin inhibitor-sparing regimens in solid organ transplantation: focus on improving renal function and nephrotoxicity. *Clin Transplant*, 22:1–15, 2008.
- J. D. Fontenot, M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.*, 4:330–336, 2003.
- G. Foris, F. Bojan, G. A. Medgyesi, and T. Szilagyi. Effects of urethan on lymphokine-producing activity of lymphocytes and on some functions of peritoneal macrophages in rats. Agents Actions, 13:63–68, 1983.
- P. G. Forkert and R. P. Lee. Metabolism of ethyl carbamate by pulmonary cytochrome P450 and carboxylesterase isozymes: involvement of CYP2E1 and hydrolase A. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 146:245–254, 1997.
- M. Friedkin. Enzymatic aspects of folic acid. Annu. Rev. Biochem., 32:185-214, 1963.
- D. R. Germolec. Sensitivity and predictivity in immunotoxicity testing: immune endpoints and disease resistance. *Toxicol. Lett.*, 149:109–114, 2004.
- P. G. Gibson and H. Powell. Initial corticosteroid therapy for asthma. Curr. Opin. Pulm. Med., 12:48–53, 2006.
- T. J. Gill, G. J. Smith, R. W. Wissler, and H. W. Kunz. The rat as an experimental animal. Science, 245:269–276, 1989.
- G. L. Ginsberg, T. B. Atherholt, and G. H. Butler. Benzo[a]pyrene-induced immunotoxicity: comparison to DNA adduct formation in vivo, in cultured splenocytes, and in microsomal systems. J. Toxicol. Environ. Health, 28:205–220, 1989.
- A. R. Goeptar, H. Scheerens, and N. P. Vermeulen. Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Crit. Rev. Toxicol.*, 25:25–65, 1995.
- E. R. Gore, J. Gower, E. Kurali, J. L. Sui, J. Bynum, D. Ennulat, and D. J. Herzyk. Primary antibody response to keyhole limpet hemocyanin in rat as a model for immunotoxicity evaluation. *Toxicology*, 197:23–35, 2004.
- S. S. Graves, D. Stone, C. Loretz, L. Peterson, J. S. McCune, M. Mielcarek, and R. Storb. Establishment of long-term tolerance to SRBC in dogs by recombinant canine CTLA4-Ig. *Transplantation*, 88:317–322, 2009.

- F. P. Guengerich and D. H. Kim. Enzymatic oxidation of ethyl carbamate to vinyl carbamate and its role as an intermediate in the formation of 1,N6-ethenoadenosine. *Chem. Res. Toxicol.*, 4:413–421, 1991.
- R. Gupta, S. Gupta, and V. Khera. Dexamethasone cyclophosphamide pulse therapy in systemic lupus erythematosus: a case report. J. Dermatolog. Treat., 20:55–58, 2009.
- M. F. Guyer and P. E. Claus. Tumor of the lung in rats following injections of urethane (ethylcarbamate). *Cancer Res.*, 7:342–345, 1947.
- A. Haddow and W. A. Sexton. Influence of carbamic esters (urethanes) on experimental animal tumors. *Nature*, 157:500–503, 1946.
- P. J. Haley. Species differences in the structure and function of the immune system. *Toxicology*, 188:49–71, 2003.
- Y. C. Han and S. B. Pruett. Mechanisms of ethanol-induced suppression of a primary antibody response in a mouse model for binge drinking. J. Pharmacol. Exp. Ther., 275:950–957, 1995.
- K. Hara and R. A. Harris. The anesthetic mechanism of urethane: the effects on neurotransmitter-gated ion channels. *Anesth. Analg.*, 94:313–318, 2002.
- N. Haran and I. Berenblum. The induction of the initiating phase of skin carcinogenesis in the mouse by oral administration of urethane (ethyl carbamate). Br. J. Cancer, 10:57–60, 1956.
- K. Hartmann, R. W. Dutton, M. M. McCarthy, and R. I. Mishell. Cell components in the immune response. II. Cell attachment separation of immune cells. *Cell. Immunol.*, 1:182–189, 1970.
- J. S. Haskill and J. Marbrook. In vitro immunity to sheep erythrocytes by fractionated spleen cells: differentiation within the antibody-forming cell percursor population. *Cell. Immunol.*, 3:448–460, 1972.
- J. S. Haskill, P. Byrt, and J. Marbrook. In vitro and in vivo studies of the immune response to sheep erythrocytes using partially purified cell preparations. J. Exp. Med., 131:57–76, 1970.
- S. A. Haukaas. Suppression of antibody response of male mice exposed to diethylstilbestrol or estramustine phosphate (Estracyt). *Prostate*, 4:375–382, 1983.
- R. Hayashi, H. Wada, K. Ito, and I. M. Adcock. Effects of glucocorticoids on gene transcription. *Eur. J. Pharmacol.*, 500:51–62, 2004.
- S. Heidt, D. L. Roelen, C. Eijsink, M. Eikmans, C. van Kooten, F. H. Claas, and A. Mulder. Calcineurin inhibitors affect B cell antibody responses indirectly by interfering with T cell help. *Clin. Exp. Immunol.*, 159:199–207, 2010.
- H. G. Herrod and R. H. Buckley. Use of a human plaque-forming cell assay to study peripheral blood bursa-equivalent cell activation and excessive suppressor cell activity in humoral immunodeficiency. J. Clin. Invest., 63:868–876, 1979.

- R. Hertz, M. C. Li, and D. B. Spencer. Effect of methotrexate therapy upon choriocarcinoma and chorioadenoma. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 93:361–366, 1956.
- J. A. Hirst and R. W. Dutton. Cell components in the immune response. 3. Neonatal thymectomy: restoration in culture. *Cell. Immunol.*, 1:190–195, 1970.
- S. Ho, N. Clipstone, L. Timmermann, J. Northrop, I. Graef, D. Fiorentino, J. Nourse, and G. R. Crabtree. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 80:S40–45, 1996.
- U. Hoffler and B. I. Ghanayem. Increased bioaccumulation of urethane in CYP2E1-/- versus CYP2E1+/+ mice. *Drug Metab. Dispos.*, 33:1144–1150, 2005.
- U. Hoffler, H. A. El-Masri, and B. I. Ghanayem. Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) is the principal enzyme responsible for urethane metabolism: comparative studies using CYP2E1null and wild-type mice. J. Pharmacol. Exp. Ther., 305:557–564, 2003.
- U. Hoffler, D. Dixon, S. Peddada, and B. I. Ghanayem. Inhibition of urethane-induced genotoxicity and cell proliferation in CYP2E1-null mice. *Mutat. Res.*, 572:58–72, 2005.
- M. Hoffmann. Peritoneal macrophages in the immune response to SRBC in vitro. *Immunology*, 18:791–797, 1970.
- J. F. Holland. Methotrexate therapy of metastatic choriocarcinoma. Am. J. Obstet. Gynecol., 75:195–199, 1958.
- S. Hori, T. Nomura, and S. Sakaguchi. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science, 299:1057–1061, 2003.
- T. Hosoya, N. Harada, J. Mimura, H. Motohashi, S. Takahashi, O. Nakajima, M. Morita, S. Kawauchi, M. Yamamoto, and Y. Fujii-Kuriyama. Inducibility of cytochrome P450 1A1 and chemical carcinogenesis by benzo[a]pyrene in AhR repressor-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 365:562–567, 2008.
- N. Hymery, Y. Sibiril, and D. Parent-Massin. Improvement of human dendritic cell culture for immunotoxicological investigations. *Cell Biol. Toxicol.*, 22:243–255, 2006.
- ICH. Ich Topic S8. Immunotoxicity for human pharmaceuticals. Note for guidance on immunotoxicity studies for human pharmaceuticals. CHMP/167235/2004, 2006.
- C. Infante-Duarte, H. F. Horton, M. C. Byrne, and T. Kamradt. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J. Immunol.*, 165:6107–6115, 2000.
- T. C. Jeong, S. W. Cha, J. I. Park, C. S. Ha, S. S. Han, and J. K. Roh. Role of metabolism in ethyl carbamate-induced suppression of antibody response to sheep erythrocytes in female Balb/C mice. Int. J. Immunopharmacol., 17:1035–1044, 1995.
- T. C. Jeong, H. J. Kim, S. W. Cha, J. I. Park, H. C. Shin, D. H. Kim, S. S. Han, and J. K. Roh. Effects of ethyl carbamate and its metabolites on the antibody response in splenocyte cultures from female Balb/C mice. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 18:91–103, 1996.

- N. K. Jerne and A. A. Nordin. Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. Science, 140:405–406, 1963.
- C. W. Johnson, W. C. Williams, C. B. Copeland, M. J. DeVito, and R. J. Smialowicz. Sensitivity of the SRBC PFC assay versus ELISA for detection of immunosuppression by TCDD and TCDD-like congeners. *Toxicology*, 156:1–11, 2000.
- F. Joncourt, F. Kristensen, and A. L. De Weck. Ageing and immunity in outbred NMRI mice: lack of correlation between age-related decline of the response to T cell mitogens, the antibody response to a T-dependent antigen and lifespan in outbred NMRI mice. *Clin. Exp. Immunol.*, 44:270–277, 1981.
- H. Kandarova, M. Liebsch, I. Gerner, E. Schmidt, E. Genschow, D. Traue, and H. Spielmann. The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on in vitro skin irritation tests–an assessment of the performance of the optimised test. *Altern. Lab. Anim.*, 33:351–367, 2005.
- M. Karin. New twists in gene regulation by glucocorticoid receptor: is DNA binding dispensable? *Cell*, 93:487–490, 1998.
- M. Katsara, J. Matsoukas, G. Deraos, and V. Apostolopoulos. Towards immunotherapeutic drugs and vaccines against multiple sclerosis. Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai), 40: 636–642, 2008.
- T. T. Kawabata and K. L. White. Suppression of the vitro humoral immune response of mouse splenocytes by benzo(a)pyrene metabolites and inhibition of benzo(a)pyrene-induced immunosuppression by alpha-naphthoflavone. *Cancer Res.*, 47:2317–2322, 1987.
- D. C. Kemp and K. L. Brouwer. Viability assessment in sandwich-cultured rat hepatocytes after xenobiotic exposure. *Toxicol. In Vitro*, 18:869–877, 2004.
- D. M. Kendig and J. B. Tarloff. Inactivation of lactate dehydrogenase by several chemicals: implications for in vitro toxicology studies. *Toxicol. In Vitro*, 21:125–132, 2007.
- R. Khattri, T. Cox, S. A. Yasayko, and F. Ramsdell. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat. Immunol.*, 4:337–342, 2003.
- S. S. Kim. Treatment options in steroid-refractory acute graft-versus-host disease following hematopoietic stem cell transplantation. Ann. Pharmacother., 41:1436–1444, 2007.
- S. Kimoto-Kinoshita, S. Nishida, and T. T. Tomura. Diethyldithiocarbamate can induce two different type of death: apoptosis and necrosis mediating the differential MAP kinase activation and redox regulation in HL60 cells. *Mol. Cell. Biochem.*, 265:123–132, 2004.
- P. Kivisäkk, G. V. Alm, S. Fredrikson, and H. Link. Neutralizing and binding anti-interferonbeta (IFN-beta) antibodies. A comparison between IFN-beta-1a and IFN-beta-1b treatment in multiple sclerosis. *Eur. J. Neurol.*, 7:27–34, 2000.

- Kosmetikverordnung. Verordnung über kosmetische Mittel (Kosmetik-Verordnung), KosmetikV, angefertigt am 16.12.1977. Kosmetik-Verordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 7. Oktober 1997 (BGBl. i S. 2410), zuletzt geändert durch die Verordnung vom 18. September 2008 (BGBl. i S. 1840).
- P. L. Kozuch and S. B. Hanauer. Treatment of inflammatory bowel disease: a review of medical therapy. World J. Gastroenterol., 14:354–377, 2008.
- S. A. Kutz, R. D. Hinsdill, and D. J. Weltman. Evaluation of chemicals for immunomodulatory effects using an in vitro antibody-producing assay. *Environ. Res.*, 22:368–376, 1980.
- D. S. Lang, K. L. Meier, and M. I. Luster. Comparative effects of immunotoxic chemicals on in vitro proliferative responses of human and rodent lymphocytes. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 21: 535–545, 1993.
- I. Langezaal, S. Coecke, and T. Hartung. Whole blood cytokine response as a measure of immunotoxicity. *Toxicol. In Vitro*, 15:313–318, 2001.
- I. Langezaal, S. Hoffmann, T. Hartung, and S. Coecke. Evaluation and prevalidation of an immunotoxicity test based on human whole-blood cytokine release. *Altern. Lab. Anim.*, 30: 581–595, 2002.
- H. Lebrec, R. Roger, C. Blot, G. R. Burleson, C. Bohuon, and M. Pallardy. Immunotoxicological investigation using pharmaceutical drugs. In vitro evaluation of immune effects using rodent or human immune cells. *Toxicology*, 96:147–156, 1995.
- M. E. Lee and P. Urso. Suppression of T lymphocyte proliferation to antigenic and mitogenic stimuli by Benzo(alpha)pyrene and 2-aminofluorene metabolites. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 29:425–438, 2007.
- S. J. Lee and A. Kavanaugh. Pharmacological treatment of established rheumatoid arthritis. Best Pract. Res. Clin. Rheumatol., 17:811–829, 2003.
- J. P. Loge and R. W. Rundles. Urethane (ethyl carbamate) therapy in multiple myeloma. *Blood*, 4:201–216, 1949.
- H. Lu, R. B. Crawford, C. M. North, B. L. Kaplan, and N. E. Kaminski. Establishment of an immunoglobulin m antibody-forming cell response model for characterizing immunotoxicity in primary human B cells. *Toxicol. Sci.*, 112:363–373, 2009.
- R. W. Luebke, R. R. Rogers, M. M. Riddle, D. G. Rowe, and R. J. Smialowicz. Alteration of immune function in mice following carcinogen exposure. *Immunopharmacology*, 13:1–9, 1987.
- D. Lundsgaard, T. L. Holm, L. Hornum, and H. Markholst. In vivo control of diabetogenic T-cells by regulatory CD4+CD25+ T-cells expressing Foxp3. *Diabetes*, 54:1040–1047, 2005.
- M. I. Luster, J. H. Dean, G. A. Boorman, M. P. Dieter, and H. T. Hayes. Immune functions in methyl and ethyl carbamate treated mice. *Clin. Exp. Immunol.*, 50:223–230, 1982.

- M. I. Luster, A. E. Munson, P. T. Thomas, M. P. Holsapple, J. D. Fenters, K. L. White, L. D. Lauer, D. R. Germolec, G. J. Rosenthal, and J. H. Dean. Development of a testing battery to assess chemical-induced immunotoxicity: National Toxicology Program's guidelines for immunotoxicity evaluation in mice. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 10:2–19, 1988.
- M. I. Luster, C. Portier, D. G. Pait, K. L. White, C. Gennings, A. E. Munson, and G. J. Rosenthal. Risk assessment in immunotoxicology. I. Sensitivity and predictability of immune tests. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 18:200–210, 1992.
- M. I. Luster, C. Portier, D. G. Pait, G. J. Rosenthal, D. R. Germolec, E. Corsini, B. L. Blaylock, P. Pollock, Y. Kouchi, and W. Craig. Risk assessment in immunotoxicology. II. Relationships between immune and host resistance tests. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 21:71–82, 1993a.
- M. I. Luster, C. Portier, D. G. Pait, G. J. Rosenthal, D. R. Germolec, E. Corsini, B. L. Blaylock, P. Pollock, Y. Kouchi, and W. Craig. Risk assessment in immunotoxicology. II. Relationships between immune and host resistance tests. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 21:71–82, 1993b.
- A. L. Luzzati, M. J. Taussig, T. Meo, and B. Pernis. Induction of an antibody response in cultures of human peripheral blood lymphocytes. J. Exp. Med., 144:573–585, 1976.
- M. Löwenberg, A. P. Verhaar, G. R. van den Brink, and D. W. Hommes. Glucocorticoid signaling: a nongenomic mechanism for T-cell immunosuppression. *Trends Mol. Med.*, 13:158–163, 2007.
- M. Lyte, R. H. Blanton, M. J. Myers, and P. H. Bick. Effect of in vivo administration of the carcinogen benzo(a)pyrene on interleukin-2 and interleukin-3 production. *Int. J. Immuno*pharmacol., 9:307–312, 1987.
- J. Marbrook. Primary immune response in cultures of spleen cells. Lancet, 2:1279–1281, 1967.
- J. Marbrook. Foci of proliferating antibody-producing cells in a primary immune response in vitro. *Clin. Exp. Immunol.*, 3:367–372, 1968.
- J. Marbrook and J. S. Haskill. The in vitro response to sheep erythrocytes by mouse spleen cells: segregation of distinct events leading to antibody formation. *Cell. Immunol.*, 13:12–21, 1974.
- P. N. Markham, T. M. Ellis, A. R. Tambur, and H. M. Gebel. Differential sensitivity of resting and IL-2 activated NK cells to R-verapamil. *Transplantation*, 62:1883–1888, 1996.
- M. A. Martin-Mateos. Monoclonal antibodies in pediatrics: use in prevention and treatment. *Allergol. Immunopathol. (Madr.)*, 35:145–150, 2007.
- J. Mayer, M. Krejci, M. Doubek, Z. Pospisil, Y. Brychtova, M. Tomiska, and Z. Racil. Pulse cyclophosphamide for corticosteroid-refractory graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.*, 35:699–705, 2005.
- G. B. McDonald. Oral beclomethasone dipropionate: a topically active corticosteroid for the treatment of gastrointestinal graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 16:1709–1724, 2007.

- A. Menter, A. Gottlieb, S. R. Feldman, A. S. Van Voorhees, C. L. Leonardi, K. B. Gordon, M. Lebwohl, J. Y. Koo, C. A. Elmets, N. J. Korman, K. R. Beutner, and R. Bhushan. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: Section 1. Overview of psoriasis and guidelines of care for the treatment of psoriasis with biologics. J. Am. Acad. Dermatol., 58:826–850, 2008.
- P. Michetti, C. Mottet, P. Juillerat, V. Pittet, C. Felley, J. P. Vader, J. J. Gonvers, and F. Froehlich. Severe and steroid-resistant Crohn's disease. *Digestion*, 76:99–108, 2007.
- J. A. Miller and E. C. Miller. The metabolic activation and nucleic acid adducts of naturallyoccurring carcinogens: recent results with ethyl carbamate and the spice flavors safrole and estragole. Br. J. Cancer, 48:1–15, 1983.
- J. A. Miller, J. W. Cramer, and E. C. Miller. The N- and ringhydroxylation of 2acetylaminofluorene during carcinogenesis in the rat. *Cancer Res.*, 20:950–962, 1960.
- K. H. Mills. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat. Rev. Immunol.*, 4: 841–855, 2004.
- A. H. Miners, G. Yao, J. Raftery, and R. S. Taylor. Economic evaluations of calcineurin inhibitors in renal transplantation: a literature review. *Pharmacoeconomics*, 25:935–947, 2007.
- R. I. Mishell and R. W. Dutton. Immunization of normal mouse spleen cell suspensions in vitro. Science, 153:1004–1006, 1966.
- R. I. Mishell, R. W. Dutton, and D. J. Raidt. Cell components in the immune response. I. Gradient separation of immune cells. *Cell. Immunol.*, 1:175–181, 1970.
- Y. Müller, H. Wolf, E. Wierenga, and G. Jung. Induction of abortive and productive proliferation in resting human T lymphocytes via CD3 and CD28. *Immunology*, 97:280–286, 1999.
- P. Moolenaar, Y. Wirsiy, J. Rodriguez, W. Zhang, M. Lee, and P. Urso. Dysfunctional T cells induced by benzo(a)pyrene express BPDE-DNA adducts. *Proc. Am. Soc. Cancer Res.*, 37: 446, 1996.
- M. J. Myers, R. H. Blanton, and P. H. Bick. Inhibition of IL-2 responsiveness following exposure to benzo(a)pyrene is due to alterations in accessory cell function. *Int. J. Immunopharmacol.*, 10:177–186, 1988.
- S. Nakae, Y. Komiyama, A. Nambu, K. Sudo, M. Iwase, I. Homma, K. Sekikawa, M. Asano, and Y. Iwakura. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity*, 17:375–387, 2002.
- M. Nakamura, T. Yoshida, K. Isobe, T. Iwamoto, S. M. Jamshedur Rahman, Y. H. Zhang, T. Hasegawa, M. Ichihara, and I. Nakashima. Modulation of the secondary antibody response of murine lymphocytes to sheep red blood cells in vitro by neuraminidase and exoglycosidases. *Immunol. Lett.*, 29:235–240, 1991.

- R. Nery. Some aspects of the metabolism of urethane and N-hydroxyurethane in rodents. *Bio-chem. J.*, 106:1–13, 1968.
- A. A. Nomeir, Y. M. Ioannou, J. M. Sanders, and H. B. Matthews. Comparative metabolism and disposition of ethyl carbamate (urethane) in male Fischer 344 rats and male B6C3F1 mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 97:203–215, 1989.
- F. P. Noonan and H. A. Hoffman. Susceptibility to immunosuppression by ultraviolet B radiation in the mouse. *Immunogenetics*, 39:29–39, 1994.
- NTP. National Toxicology Program, Department of Health and Human Services. http://ntp-apps.niehs.nih.gov/ntp\_tox/index.cfm?fuseaction=immunology. datasearch&chemical\_name=Urethane&cas\_no=51-79-6&study\_no=IMM83002&study\_ length=14%20Days&protocol\_no=ECM-14-1-SC, 1982.
- OECD. TG 407: OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Repeated Dose 28-day oral Toxicity study in Rodents., 1995.
- OECD. TG 428: OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Skin Absorption: In vitro Method., 2004a.
- OECD. TG 430: OECD Guideline for the Testing of Chemicals, In vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test TER., 2004b.
- OECD. TG 431: OECD Guideline for the Testing of Chemicals, In vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test., 2004c.
- OECD. TG 432: OECD Guideline for the Testing of Chemicals, In vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test., 2004d.
- R. Paillot, L. Genestier, S. Fournel, C. Ferraro, P. Miossec, and J. P. Revillard. Activationdependent lymphocyte apoptosis induced by methotrexate. *Transplant. Proc.*, 30:2348–2350, 1998.
- R. Panaccione, P. Rutgeerts, W. J. Sandborn, B. Feagan, S. Schreiber, and S. Ghosh. Review article: treatment algorithms to maximize remission and minimize corticosteroid dependence in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 28:674–688, 2008.
- G. Parmiani. Immune-depressive effect of urethan on the homograft response in mice. Int. J. Cancer, 5:260–265, 1970.
- T. L. Pazdernik and M. D. Corbett. Role of chloramphenicol reduction products in aplastic anemia. *Pharmacology*, 20:87–94, 1980.
- M. E. Percy, H. M. Dosch, and E. W. Gelfand. Functional differentiation of B lymphocytes in congenital agammaglobulinemia. II. Immunochemical analysis of the in vitro primary immune response. J. Immunol., 119:1965–1972, 1977.
- P. Perini, M. Calabrese, L. Rinaldi, and P. Gallo. Cyclophosphamide-based combination therapies for autoimmunity. *Neurol. Sci.*, 29 Suppl 2:S233–234, 2008.

- S. W. Pipe. Recombinant clotting factors. Thromb. Haemost., 99:840-850, 2008.
- C. G. Pommier, S. Inada, L. F. Fries, T. Takahashi, M. M. Frank, and E. J. Brown. Plasma fibronectin enhances phagocytosis of opsonized particles by human peripheral blood monocytes. *J. Exp. Med.*, 157:1844–1854, 1983.
- A. Popov, I. Mirkov, D. Miljkovi?, S. Belij, L. Zolotarevski, D. Kataranovski, and M. Kataranovski. Contact allergic response to dinitrochlorobenzene (DNCB) in rats: Insight from sensitization phase. *Immunobiology*, 216:763–770, 2011.
- S. B. Pruett, Y. Han, A. E. Munson, and B. A. Fuchs. Assessment of cholinergic influences on a primary humoral immune response. *Immunology*, 77:428–435, 1992a.
- S. B. Pruett, Y. C. Han, and B. A. Fuchs. Morphine suppresses primary humoral immune responses by a predominantly indirect mechanism. J. Pharmacol. Exp. Ther., 262:923–928, 1992b.
- A. L. Pukhalsky, A. P. Toptygina, and V. V. Viktorov. Immunosuppressive action of cyclophosphamide in mice: contribution of some factors to determination of strain differences. *Int. J. Immunopharmacol.*, 15:509–514, 1993.
- T. Ringerike, E. Ulleras, R. Volker, B. Verlaan, A. Eikeset, D. Trzaska, V. Adamczewska, M. Olszewski, A. Walczak-Drzewiecka, J. Arkusz, H. van Loveren, G. Nilsson, M. Lovik, J. Dastych, and R. J. Vandebriel. Detection of immunotoxicity using T-cell based cytokine reporter cell lines ("Cell Chip"). *Toxicology*, 206:257–272, 2005.
- C. Rosendorff. Hypertension and coronary artery disease: a summary of the American Heart Association scientific statement. J. Clin. Hypertens. (Greenwich), 9:790–795, 2007.
- W.M.S. Russell and R.L. Burch. The Principles of Humane Experimental Technique. Methuen, London, 1956. Reprinted by UFAW, 1992: 8 Hamilton Close, South Mimms, Potters Bar, Herts EN6 3QD England.
- B. Ryffel, G. Woerly, M. Murray, H. P. Eugster, and B. Car. Binding of active cyclosporins to cyclophilin A and B, complex formation with calcineurin A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 194:1074–1083, 1993.
- M. C. Salinas-Carmona, L. I. Perez, K. Galan, and A. V. Vazquez. Immunosuppressive drugs have different effect on B lymphocyte subsets and IgM antibody production in immunized BALB/c mice. *Autoimmunity*, 42:537–544, 2009.
- G. Sanna, M. L. Bertolaccini, and M. A. Khamashta. Neuropsychiatric involvement in systemic lupus erythematosus: current therapeutic approach. *Curr. Pharm. Des.*, 14:1261–1269, 2008.
- P.N. Sawyer, W. Wrezlewicz, T. R. Lucas, G. P. Hoskin, and N. E. Kaminski. 208 lymphocytelymphocyte interaction: a function of a cell surface charge characteristic. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 5:168–176, 1978.

- J. Scheel, S. Weimans, A. Thiemann, E. Heisler, and M. Hermann. Exposure of the murine RAW 264.7 macrophage cell line to hydroxyapatite dispersions of various composition and morphology: assessment of cytotoxicity, activation and stress response. *Toxicol. In Vitro*, 23: 531–538, 2009.
- H. Schulze-Koops and A. Skapenko. Immunosuppression with biologicals: prospects for the treatment of autoimmune diseases. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2:687–691, 2002.
- SEK/2004/1210. Comission staff working document SEK (204) 1210 as of 01.10.2004. Timetables for the phasing-out of animal testing in the framework of the 7th Amendment to the Cosmetics Directive (Council Directive 76/768/EEC).
- SEK/91/1794. Mitteilung der Kommission SEK (91) 1794 vom 29.10.1991 an den Rat und das Europäische Parlament - Errichtung eines Europäischen Zentrums zur Validierung Alternativer Methoden (CEVMA).
- G. Semenzato, P. Sarasin, G. Amadori, and G. Gasparotto. Mitogenic action of neuraminidase. *Experientia*, 33:1520–1521, 1977.
- F. L. Shand. The capacity of microsomally-activated cyclophosphamide to induce immunosuppression in vitro. *Immunology*, 35:1017–1025, 1978.
- L. Sizova. Approaches to the treatment of early rheumatoid arthritis with disease-modifying antirheumatic drugs. Br. J. Clin. Pharmacol., 66:173–178, 2008.
- H. E. Skipper, L. L. Bennett, C. E. Bryan, L. White, M. A. Newton, and L. Simpson. Carbamates in the chemotherapy of leukemia. VIII. Overall tracer studies on carbonyl-labeled urethan, methylene-labeled urethan, and methylene-labeled ethyl alcohol. *Cancer Res.*, 11:46–51, 1951.
- R. J. Smialowicz, M. M. Riddle, W. C. Williams, C. B. Copeland, R. W. Luebke, and D. L. Andrews. Differences between rats and mice in the immunosuppressive activity of 2-methoxyethanol and 2-methoxyacetic acid. *Toxicology*, 74:57–67, 1992.
- G. I. Snell and G. P. Westall. Immunosuppression for lung transplantation: evidence to date. Drugs, 67:1531–1539, 2007.
- P. O. Sobande and C. M. Kercsmar. Inhaled corticosteroids in asthma management. *Respir. Care*, 53:625–633, 2008.
- A. Sovcikova, J. Tulinska, J. Kubova, A. Liskova, D. Syrova, and K. Horakova. Effect of cyclosporin A in Lewis rats in vivo and HeLa cells in vitro. J. Appl. Toxicol., 22:153–160, 2002.
- G. T. Stathopoulos, T. P. Sherrill, D. S. Cheng, R. M. Scoggins, W. Han, V. V. Polosukhin, L. Connelly, F. E. Yull, B. Fingleton, and T. S. Blackwell. Epithelial NF-kappaB activation promotes urethane-induced lung carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104:18514– 18519, 2007.

- G. D. Stockman, L. R. Heim, M. A. South, and J. J. Trentin. Differential effects of cyclophosphamide on the B and T cell compartments of adult mice. J. Immunol., 110:277–282, 1973.
- V. Strokan, L. Rydberg, E. C. Hallberg, J. Molne, and M. E. Breimer. Characterisation of human natural anti-sheep xenoantibodies. *Xenotransplantation*, 5:111–121, 1998.
- R. D. Sullivan, E. Miller, and M. P. Sikes. Antimetabolite-metabolite combination cancer chemotherapy. Effects of intraarterial methotrexate-intramuscular Citrovorum factor therapy in human cancer. *Cancer*, 12:1248–1262, 1959.
- A. Takamizawa, S. Matsumoto, T. Iwata, Y. Tochino, K. Katagiri, and K. Yamaguchi. Studies on cyclophosphamide metabolites and their related compounds. 2. Preparation of an active species of cyclophosphamide and related compounds. J. Med. Chem., 18:376–383, 1975.
- J. A. Teodorczyk-Injeyan, L. Makowka, R. E. Falk, and J. A. Falk. Mechanisms of altered in vitro antibody response in the rat by a small synthetic polymer. *Scand. J. Immunol.*, 15:9–16, 1982.
- L. A. Tesmer, S. K. Lundy, S. Sarkar, and D. A. Fox. Th17 cells in human disease. *Immunol. Rev.*, 223:87–113, 2008.
- D. Thaci. Long-term data in the treatment of psoriasis. Br. J. Dermatol., 159 Suppl 2:18–24, 2008.
- Tierschutzbericht. Unterrichtung durch die Bundesregierung. Deutscher Bundestag, 15. Wahlperiode, Drucksache 15/723., 2003.
- Tierschutzbericht. Unterrichtung durch die Bundesregierung. Deutscher Bundestag, 15. Wahlperiode, Drucksache 15/5405., 2005.
- Tierschutzbericht. Unterrichtung durch die Bundesregierung. Deutscher Bundestag, 16. Wahlperiode, Drucksache 16/5044., 2007.
- A. P. Titis and P. G. Forkert. Strain-related differences in bioactivation of vinyl carbamate and formation of DNA adducts in lungs of A/J, CD-1, and C57BL/6 mice. *Toxicol. Sci.*, 59:82–91, 2001.
- P. A. Todd and R. N. Brogden. Muromonab CD3. A review of its pharmacology and therapeutic potential. Drugs, 37:871–899, 1989.
- A. N. Tucker and A. E. Munson. In vitro inhibition of the primary antibody response to sheep erythrocytes by cyclophosphamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 59:617–619, 1981.
- A. N. Tucker, V. M. Sanders, P. Hallett, B. M. Kauffmann, and A. E. Munson. In vitro immunotoxicological assays for detection of compounds requiring metabolic activation. *Environ. Health Perspect.*, 43:123–127, 1982.
- H. Valantine and A. Zuckermann. From clinical trials to clinical practice: an overview of Certican (everolimus) in heart transplantation. J. Heart Lung Transplant., 24:S185–190, 2005.

- G. D. Van Duyne, R. F. Standaert, P. A. Karplus, S. L. Schreiber, and J. Clardy. Atomic structure of FKBP-FK506, an immunophilin-immunosuppressant complex. *Science*, 252:839– 842, 1991.
- M. J. van Tol, J. Zijlstra, B. J. Zegers, and R. E. Ballieux. Antigen-induced plaque-forming cell responses in cultures of peripheral blood mononuclear cells of human neonates and infants. J. Pediatr., 105:738–744, 1984.
- R. J. Vandebriel, S. W. Spiekstra, B. N. Hudspith, C. Meredith, and H. Van Loveren. In vitro exposure effects of cyclosporin A and bis(tri-n-butyltin)oxide on lymphocyte proliferation, cytokine (receptor) mRNA expression, and cell surface marker expression in rat thymocytes and splenocytes. *Toxicology*, 135:49–66, 1999.
- A. Vecchi, M. Sironi, M. A. Canegrati, M. Recchia, and S. Garattini. Immunosuppressive effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in strains of mice with different susceptibility to induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 68:434–441, 1983.
- M. L. Villa and S. De Biasi. Antigen-dependent colonies of human peripheral blood lymphocytes: an immunomorphologic study. *Cell. Immunol.*, 81:323–332, 1983.
- M. L. Villa, G. Rappocciolo, P. Piazza, and E. Clerici. Monocyte mediated modulation of the antibody response in vitro. *Immunol. Lett.*, 11:29–37, 1985.
- H. W. Vohr. Experiences with an advanced screening procedure for the identification of chemicals with an immunotoxic potential in routine toxicology. *Toxicology*, 104:149–158, 1995.
- H. W. Vohr and T. Hünig. Induction of proliferative and cytotoxic responses in resting Lyt-2+ T cells with lectin and recombinant interleukin 2. *Eur. J. Immunol.*, 15:332–337, 1985a.
- H. W. Vohr and T. Hünig. Polyclonal activation of cytotoxic T lymphocytes (CTL) from resting Lyt2+ percursor cells requires only IL-2 as an exogenous lymphokine. In: Cellular and Molecular Biology of Lymphokines, Academic Press, Orlando, Florida, 87, 1985b.
- H. W. Vohr and C. Ruehl-Fehlert. Industry experience in the identification of the immunotoxic potential of agrochemicals. *Sci. Total Environ.*, 270:123–133, 2001.
- P. M. Wallace, J. N. Rodgers, G. M. Leytze, J. S. Johnson, and P. S. Linsley. Induction and reversal of long-lived specific unresponsiveness to a T-dependent antigen following CTLA4Ig treatment. J. Immunol., 154:5885–5895, 1995.
- R. B. Warren and C. E. Griffiths. Systemic therapies for psoriasis: methotrexate, retinoids, and cyclosporine. *Clin. Dermatol.*, 26:438–447, 2008.
- C. T. Weaver, L. E. Harrington, P. R. Mangan, M. Gavrieli, and K. M. Murphy. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*, 24:677–688, 2006.
- C. Weiland, H. J. Ahr, H. W. Vohr, and H. Ellinger-Ziegelbauer. Characterization of primary rat proximal tubular cells by gene expression analysis. *Toxicol. In Vitro*, 21:466–491, 2007.

- A. Weiss and F. W. Fitch. Suppression of the plaque-forming cell response by macrophages present in the normal rat spleen. J. Immunol., 120:357–359, 1978.
- K. L. White. An overview of immunotoxicology and the carconogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Carcinogen. Rev.*, C4:136–202, 1986.
- K. L. White and M. P. Holsapple. Direct suppression of in vitro antibody production by mouse spleen cells by the carcinogen benzo(a)pyrene but not by the noncarcinogenic congener benzo(e)pyrene. *Cancer Res.*, 44:3388–3393, 1984.
- G. J. Wiederrecht, C. J. Sabers, G. J. Brunn, M. M. Martin, F. J. Dumont, and R. T. Abraham. Mechanism of action of rapamycin: new insights into the regulation of G1-phase progression in eukaryotic cells. *Prog. Cell Cycle Res.*, 1:53–71, 1995.
- D. M. Willerford, J. Chen, J. A. Ferry, L. Davidson, A. Ma, and F. W. Alt. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity*, 3:521–530, 1995.
- S. J. Wilson, G. W. Wise, and J. W. Campbell. The treatment of leukemia and allied disorders with urethane (ethyl carbamate). J. Kans. Med. Soc., 49:97–100, 1948.
- C. W. Young and S. Hodas. Hydroxyurea: Inhibitory effect on DNA metabolism. *Science*, 146: 1172–1174, 1964.
- B. Zanker, S. Marx, T. B. Strom, and H. Kohler. The immunosuppressive effects of verapamil upon mitogen activated and allo-antigen inducible human cytotoxic T-lymphocytes. *Int. J. Immunopharmacol.*, 16:507–517, 1994.
- T. Ziemssen and S. Kern. Psychoneuroimmunology–cross-talk between the immune and nervous systems. J. Neurol., 254 Suppl 2:8–11, 2007.
- F. Zucco, I. De Angelis, E. Testai, and A. Stammati. Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. *Toxicol. In Vitro*, 18:153–163, 2004.
- A. Zuckermann, N. Manito, E. Epailly, A. Fiane, C. Bara, J. F. Delgado, H. Lehmkuhl, H. Ross, H. Eisen, J. Chapman, and H. Valantine. Multidisciplinary insights on clinical guidance for the use of proliferation signal inhibitors in heart transplantation. J. Heart Lung Transplant., 27:141–149, 2008.

## Abbildungsverzeichnis

1.1	Querschnitt durch die weiße Pulpa der Milz	3
1.2	Der klassische Weg der Aktivierung der Komplementkaskade	5
1.3	Die Enstehung einer humoralen Immunreaktion im Plaque Forming Cell Assay	
	(PFCA)	13
1.4	Lichtmikroskopische Aufnahme eines Plaque Forming Cell Assays	14
1.5	Lichtmikroskopische Aufnahme eines haemolytischen Plaques $\ \ldots \ \ldots \ \ldots \ \ldots$	19
2.1	Strukturformeln der immunsuppressiven Substanzen	27
2.2	Strukturformeln der nicht-immunsuppressiven Substanzen	28
2.3	Struktur der Mitogene Concanavalin A $({\rm ConA})$ und Lipopolysaccharid $({\rm LPS})$	28
2.4	Strukturformel der Base Thymidin und des Analogons 5-Bromo-2-desoxyuridin	
	(BrdU)	35
2.5	Prinzip des Laktat-Dehydrogenase (LDH) Assays	37
2.6	Konvertierung von Resazurin zu fluoreszentem Resorufin	38
2.7	Strukturformel von Natrium Diethyldithiocarbamat	42
3.1	Viabilität, Proliferation und Zytokinausschüttung Mannitol-behandelter muriner	
	Milzzellen	54
3.2	Viabilität, Proliferation und Zytokinausschüttung Cyclosporin A-behandelter mu-	
	riner Milzzellen	56
3.3	$Viabilit \ddot{a}t, Proliferation \ und \ Zytokinaussch \ddot{u}ttung \ Benzo(a) pyren-behandelter \ munometabolitation \ Second and \ Second \ Second\ Second \ Second \ Second\ Sec$	
	riner Milzzellen nach ConA-Stimulation	58
3.4	$Viabilit \ddot{a}t, Proliferation \ und \ Zytokinaussch \ddot{u}ttung \ Benzo(a) pyren-behandelter \ Rat-$	
	tenmilzzellen	60
3.5	Viabilität, Proliferation und Zytokinausschüttung Cyclophosphamid-behandelter	
	Rattenmilzzellen	61
3.6	Viabilität, Proliferation und Zytokinausschüttung Rapamycin-behandelter Rat-	
	tenmilzzellen nach ConA-Stimulation	62
3.7	Plaquezahlen nach verschiedenen Inkubationszeiten	65
3.8	Ergebnisse eines Plaque Forming Cell Assay (PFCA) mit der Substanz Cyclospo-	
	rin A	69
3.9	Ergebnisse einer Mishell-Dutton-Kultur mit Rattenmilzzellen und der Substanz	
	Cyclosporin A	69
3.10	FACS-Analyse von Milzzellen des Rattenstammes Lewis auf regulatorische T-	
	Zellen unmittelbar nach Entnahme des Organs (Kontrolle, Tag 0)	71

3.11	${\it FACS-Analyse \ von \ Milzzellen \ des \ Rattenstammes \ Lewis \ in \ Mishell-Dutton-Kulturen}$	
	auf regulatorische T-Zellen	72
3.12	FACS-Analyse von Milzzellen des Rattenstammes Wistar in Mishell-Dutton-Kulturen	ı
	auf regulatorische T-Zellen	73
3.13	FACS-Analyse von murinen Milzzellen in Mishell-Dutton-Kulturen auf $\rm T_{\rm H}17\text{-}Zellen$	74
3.14	FACS-Analyse von murinen Milzzellen in Mishell-Dutton-Kulturen auf regulato-	
	rische T-Zellen	75
3.15	Ergebnisse unabhängig voneinander durchgeführter Mishell-Dutton-Tests mit den	
	immun suppressiven Substanzen Dexame thason, $\mbox{Benzo}(a)\mbox{pyren und Urethan}$	79
3.16	Ergebnis eines Mishell-Dutton-Tests mit der immunsuppressiven Standardsub-	
	stanz Cyclophosphamid	81
3.17	$\label{eq:expectation} Ergebnisse unabhängig voneinander durchgeführter Mishell-Dutton-Tests mit den$	
	nicht-immunsuppressiven Substanzen Mannitol und SDS	82
3.18	Ergebnisse eines Plaque Forming Cell Assasy (PFCA) mit der Substanz Cyclo-	
	phosphamid	87
3.19	Parallelansatz eines Mishell-Dutton-Tests mit Cyclophosphamid mit und ohne	
	Zusatz von S9-Mix	88
3.20	Plaque Forming Cell Assay mit der Substanz Urethan nach Langzeitprotokoll	90
3.21	Mishell-Dutton-Test mit Urethan	92
3.22	eq:Plaque Forming Cell Assays mit den Urethan-Metaboliten N-Hydroxyurethan und	
	Vinyl Carbamat nach Kurzzeitprotokoll	93
3.23	Mishell-Dutton-Tests mit der Substanz Urethan unter Zusatz nicht-zytotoxischer	
	und nicht-immunsuppressiver Substanzkonzentrationen von N-Hydroxyurethan	
	und Vinyl Carbamat	97
3.24	$\label{eq:constraint} Etablierung \ des \ Diethyldithiocarbamat(DDC)\mbox{-}Zusatzes \ im \ Mishell\mbox{-}Dutton\mbox{-}Test \ .$	98
3.25	Mishell-Dutton-Test mit Urethan unter Zugabe von DDC	99

## Tabellenverzeichnis

1.1	Versuchstierzahlen der Bundesrepublik Deutschland aus den Tierschutzberichten der Bundesregierung von 2003, 2005 und 2007	15
2.1	Ansatzschema der Stammlösungen A und B zur Herstellung von BSS	24
2.2	Ansatzschema der 2-ME-Puffer für Mishell-Dutton-Kulturen	25
2.3	Übersicht der durchgeführten PFCAs	32
3.1	Viabilität, Proliferation und Zytokinausschüttung Urethan-behandelter muriner	
	Milzzellen	55
3.2	Proliferation und Zytokinausschüttung muriner Milzzellen	57
3.3	Proliferation und Zytokinausschüttung Benzo(a)pyren-behandelter muriner Milz-	
	zellen nach LPS-Stimulation	58
3.4	Viabilität, Proliferation und Zytokinausschüttung Mannitol- und Urethan-behandelte	er
	Rattenmilzzellen	59
3.5	Proliferation und Zytokinausschüttung von Milzzellen der Ratte	62
3.6	Viabilität, Proliferation und Zytokinausschüttung Rapamycin-behandelter Rat-	
	tenmilzzellen nach LPS-Stimulation	63
3.7	Faktoren und Optionen zur Optimierung muriner Mishell-Dutton-Kulturen	64
3.8	Faktoren und Optionen zur Optimierung von Mishell-Dutton-Kulturen an Milz-	
	zellen des Rattenstammes Wistar	66
3.9	Faktoren und Optionen zur Optimierung von Mishell-Dutton-Kulturen an Milz-	
	zellen des Rattenstammes Lewis	67
3.10	Faktoren und Optionen zur Optimierung von Mishell-Dutton-Kulturen an Milz-	
	zellen der Rattenstämme Lewis und Wistar	68
3.11	Faktoren und Optionen zur Optimierung muriner Mishell-Dutton-Kulturen mit	
	PBMCs	76
3.12	Faktoren und Optionen zur Optimierung von Mishell-Dutton-Kulturen mit PBM-	
	Cs der Ratte	77
3.13	Faktoren und Optionen zur Optimierung humaner Mishell-Dutton-Kulturen mit	
	PBMCs	77
3.14	$\label{eq:constraint} Ergebnisse unabhängig voneinander durchgeführter Mishell-Dutton-Tests mit den$	
	immunsuppressiven Substanzen Cyclosporin A, Rapamycin, Methotrexat und Ve-	
	rapamil	80
3.15	$\label{eq:expectation} Ergebnisse unabhängig voneinander durchgeführter Mishell-Dutton-Tests mit den$	
	nicht-immunsuppressiven Substanzen Heptanal und 1-Bromo-4-chlorobutan $\ .\ .$	83

3.16	Analyse der Reproduzierbarkeit muriner Mishell-Dutton-Tests anhand der Be-	
	rechnung der Plaque IC90	84
3.17	Zellviabilitäten in Mishell-Dutton-Tests bei der Konzentration der Plaque IC90 $% \left( {{\left[ {{\left[ {\left[ {\left[ {\left[ {\left[ {\left[ {\left[ {\left[ {$	85
3.18	Vergleich der korrekten Vorhersage immunsuppressiver Substanzeffekte durch Mito-	
	genstimulationen und Mishell-Dutton-Tests	86
3.19	$Parallelansatz\ eines\ Mishell-Dutton-Tests\ mit\ Benzo(a) pyren\ mit\ und\ ohne\ Zusatz$	
	von S9-Mix	89
3.20	Plaque Forming Cell Assay mit der Substanz Urethan nach Kurzzeitprotokoll	91
3.21	Zellviabilitäten der Substanzen Vinyl Carbamat und N-Hydroxyurethan im Mishell-	
	Dutton-Test bei der Plaque IC90	92
3.22	Ergebnisse des an Mishell-Dutton-Kulturen durchgeführten Mouse Drug Metabo-	
	lism $\mathrm{RT}^2$ Profiler <sup>TM</sup> PCR Arrays	95
3.23	Parallelansatz eines Mishell-Dutton-Tests mit Urethan mit und ohne Zusatz von	
	S9-Mix	98

# Abkürzungsverzeichnis

A. bidest.	zweifach destilliertes Wasser, ( <i>lat.</i> Aqua bidestillata)
AP-1	Aktivierendes Protein 1
APC	Allophycocyanin
APC	antigen-präsentierende Zelle
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BPDE	Benzo(a)pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSS	engl. Hank's Balanced Salt Solution
bzw	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C <sub>T</sub> -Wert	${\it Detektions grenze, bestimmte Zyklenzahl des Real-time PCR-Laufes}$
CD	engl. Cluster of Differentiation
CD40L	CD40-Ligand
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
ConA	Concanavalin A
CTLA4	engl. Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4
CYP	Cytochrom P450
d	Tag(e)
D-MEM/DMEM	engl. Dulbecco's Minimal Essential Medium
DDC	Natrium Diethylditihiocarbamat
DEAE	Diethylaminoethyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. Deoxyribonucleic Acid)
DNase	Desoxyribonuklease
ECVAM	Europäische Komission zur Validierung Alternativer Methoden
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EG	Europäische Gemeinschaft
EL4	murine Lymphom-Zelllinie
ELISA	engl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMEA	engl. European Medicines Agency
EPA	engl. Environmental Protection Agency
ESAC	engl. ECVAM Scientific Advisory Comitee

EU	Europäische Union
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
FACS	engl. Fluorescence Associated Cell Sorting
FCS	fötales Kälberserum
FDA	engl. Food and Drug Administration
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKBP-12	FK-bindendes Protein 12
G	Gauge
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung $(9,81 \text{ m/s}^2)$
GALT	Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe (engl. Gut Associated
	Lymphatic Tissue)
GM-CSF	engl. Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GRE	glukokortikoidrezeptorbindendes Element
h	Stunde(n)
HCl	Wasserstoffchlorid, Salzsäure
HLA-DR	Humanes Leukozyten Antigen DR
hLBP	humanes Lipopolysaccharid-bindendes Protein
$H_2O_2$	Wasserstoffperoxid
hPBMC	humane periphere mononukleäre Blutzelle ( $\mathit{engl.}$ human Peripheral
	Blood Mononuclear Cell)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( $\mathit{engl.}$ High Performan-
	ce Liquid Chromatography)
HRP	Meerettich-Peroxidase $(engl.$ Horse Raddish Peroxidase)
$H_2SO_4$	Dihydrogensulfid, Schwefelsäure
Hz	Hertz
i.p	intraperitoneal
i.v	intravenös
IC/IC50/IC90	inhibitorische Konzentration (50 $\%$ bzw. 90 $\%$ Inhibition)
ICH	$\mathit{engl.}$ International Conference on Harmonisation of Technical Re-
	quirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
IFN $\gamma$	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IgA	Immunglobulin Typ A
IgE	Immunglobulin Typ E
IgG	Immunglobulin Typ G
IgM	Immunglobulin Typ M
ΙκΒ	Inhibitor des $NF\kappa B$
IL	Interloukin
	Interleukin
IMDM	engl. Iscove's Dulbecco's Modified Medium
IMDM     IMDS	engl. Iscove's Dulbecco's Modified Medium engl. Integrated Model for the Differentiation of Skin Reactions

1	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
LLNA	engl. Local Lymphnode Assay
LPS	Lipopolysaccharid
М	Molarität
MAP-Kinase	engl. Mitogen Activated Protein Kinase
MB-Lektin	mannanbindendes Lektin
MCP	engl. Monocyte Chemoattractant Protein
2-ME	2-Mercaptoethanolpuffer
MEM	engl. Minimal Essential Medium
mg, ml, mm, mM, mmol	Milligramm, Milliliter, Millimeter, millimolar, Millimol
μg, μl, μm, μM, μmol	Mikrogramm, Mikroliter, Mikrometer, mikromolar, Mikromol
МНС	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute(n)
MIP	engl. Macrophage Inflammatory Protein
MLR	engl. Mixed Lymphocyte Reaction
mTOR	engl. Mammalian Target of Rapamycin
MW	Mittelwert
N	Normalität
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NADH	reduzierte Form des NAD
NaOH	Natriumhydroxid, Natronlauge
$NF\kappa B$	engl. Nuclear Factor $\kappa B$
NFAT	engl. Nuclear Factor of Activated T-cells
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte, Extinktion
OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwick-
	lung ( $\mathit{engl.}$ Organisation for Economic Co-Operation and Deve-
	lopment)
OPD	O-Phenylendiamin
РАН	polyzyklische aromatische Hydrocarbone
PALS	engl. Periateriolar Lymphoid Sheath
PBMC	periphere mononukleäre Blutzelle ( $\mathit{engl.}$ Peripheral Blood Mono-
	nuclear Cell)
PBS	engl. Phosphate Buffered Saline
PCR	engl. Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PFCA	engl. Plaque Forming Cell Assay
рН	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
РНА	Phytohaemagglutinin
POD	Peroxidase

PWM	engl. Pokeweed Mitogen
QC PCR	Quantitative kompetitive PCR ( $engl.$ Quantitative Competitive
	PCR)
3R	engl. Reducement, Refinement, Replacement
RANTES	engl. Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and
	Secreted
REACH	Registrierung, Evaluierung und Autorisierung von Chemikalien
RIN	engl. RNA Integrity Number
RNA	Ribonukleinsäure (engl. Ribonucleic Acid)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. Rounds per Minute)
RPMI	Zellkulturmedium, am Roswell Park Memorial Institute entwickelt
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	engl. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
s	Sekunde(n)
SCF	engl. Stem Cell Factor
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. Sodium Dodecyl Sulfate)
SET	Stiftung zur Förderung der Erforschung von Ersatz- und Ergän-
	zungsmethoden zur Einschränkung von Tierversuchen
SRBC	Schafserythrozyt (engl. Sheep Red Blood Cell)
$t \hspace{0.1in} \ldots \\$	Tonne(n)
TCR	T-Zellrezeptor ( <i>engl.</i> T Cell Receptor)
TDAR	T-Zell-vermittelte Antikör perreaktion ( $\mathit{engl.}$ T Cell Dependent An-
	tibody Response)
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
$T_{\rm H} \ \ldots \ldots \ldots \ldots$	T-Helferzelle
TMB	Tetramethylbenzidine
$TNF\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
$T_{reg} \ \ldots \ldots \ldots \ldots$	regulatorische T-Zelle
U	Unit; Enzymmenge, die ein Mikromol Substrat pro Minute um-
	setzt
u.a	unter anderem
z.B	zum Beispiel
ZEBET	Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Er-
	gänzungsmethoden zum Tierversuch

#### Danksagung

Bedanken möchte ich mich an erster Stelle herzlichst bei Herrn Prof. Dr. Vohr, der diese Arbeit über die gesamte Zeit betreut hat und als Referent zur Verfügung stand. Ohne die vielen hilfreichen Gespräche, Diskussionen, Anmerkungen und Hinweise wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen. Bei Herrn Prof. Dr. Wagner möchte ich mich für die Übernahme des Koreferendariats bedanken. Herrn Dr. von Keutz und Herrn Dr. Dr. Ahr gebührt mein Dank für die Möglichkeit, den praktischen Teil der Arbeit in der Abteilung für Spezielle Toxikologie der Bayer HealthCare AG im Pharmaforschungszentrum Wuppertal durchführen zu können.

Ohne die große und ständige Hilfsbereitschaft im Labor der Immuntoxikologie der Abteilung für Spezielle Toxikologie wäre Vieles nicht machbar gewesen. Bedanken möchte ich mich an erster Stelle bei Simone Dörfling, die mich über den gesamten Zeitraum beim Thema Mishell-Dutton-Kultur nach Kräften unterstützt hat, und Holger Spiecker, der sich mit mir durch die FACS-Analysen gekämpft hat. Außerdem tausend Dank für die Hilfe beim ständig stattfindenden Plaquezählen! Besonderer Dank gebührt an dieser Stelle auch Martina Wingenroth, die immer zur Verfügung stand, wenn eine helfende Hand benötigt wurde. Für die Hilfe bei der Versorgung und Behandlung der Tiere möchte ich mich herzlichst bei Manuela Schmidt und Martina Arens bedanken. Bei den *In-vivo*-Studien standen mir zudem Annette Rauh und Petra Leidenfrost mit Rat und Tat zur Seite. Vielen Dank dafür! Auch für die Hilfe bei der Versorgung der Zellkulturen an den Wochenenden kann ich mich bei Martina Wingenroth, Petra Leidenfrost, Martina Arens und Manuela Schmidt nicht genug bedanken. Annette Rauh und Martina Wingenroth gebührt an dieser Stelle zusätzlicher Dank für die ständige Bemühung bei der Materialbeschaffung.

Auch Personen aus anderen Laboren haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Ellinger-Ziegelbauer dafür, dass ich viele Versuche in ihrem Labor durchführen durfte, die ansonsten nicht möglich gewesen wären. Vielen Dank an dieser Stelle an Wibke D'Acquisto, Nicole Hellwig, Anika Winter, Kerstin Albrecht und Sabine Michel-Kaulmann für die Einarbeitung und die Beantwortung der vielen und dauernden Fragen. Beim gesamten Team von Frau Dr. Ruehl-Fehlert und Frau Dr. Hartmann möchte ich mich herzlichst für die Möglichkeit bedanken, eine pathologische Analyse in einen PFCA zu integrieren. Ein besonderes Dankeschön gilt an dieser Stelle Birgit Lange, die mir bei der Sektion sehr geholfen hat. Weiterer Dank gebührt Herrn Dr. Freyberger, der mir für Fragen rund um die Metabolisierung von Substanzen zur Verfügung stand.

Bei Martina Weingarten möchte ich mich herzlich für die Organisation der Reisen zu verschiedenen Kongressen bedanken. Eckhard Heisler gebührt mein Dank für die wiederholte telefonische Unterstützung beim Thema Zellkultur und RNA-Analyse.

Besonderer Dank gilt natürlich meinen Mitdoktorandinnen und -diplomandinnnen, die mich über die Zeit begleitet haben und für viele Gespräche und Diskussionen zur Verfügung standen. Dies waren Dr. Christina Weiland, Dr. Lilli Podola und Daniela Brezeanu. Und für die Abwechslung des Tages danke ich natürlich Holger Spiecker, Jörg Oberbossel, Anika Winter, Michael Manthey und Martin Müller!

Tausend Dank gebührt natürlich allen Leuten aus meinem Umfeld, die mein Vorhaben immer wieder nach Kräften unterstützt haben. Ohne Euch wäre das hier nicht möglich gewesen! Hervorzuheben sind an dieser Stelle meine Eltern, die so manches ambitionierte Vorhaben erst umsetzbar gemacht haben, und das Team der Korrekturleser - Anna Fischer, Christoph Schneider und Theres Schröder.

Ein ganz besonderer Dank geht an Marko Harasic - für einfach alles. Dafür, dass Du in schwierigen Zeiten da warst, mich unterstützt hast wo Du konntest und mir in der Endphase so unermüdlich dabei geholfen hast, aus einer unansehnlichen Datei doch noch eine richtige Doktorarbeit zu machen.

DANKE!!!