



**Mechanistische Analysen einer T-Zell-
abhängigen humoralen *in vitro* Immunreaktion**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Anna Fischer-Berenbein

aus Simferopol

Wuppertal, Juli 2013

aus dem Institut für Toxikologie
der Bayer Pharma AG in Wuppertal

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

Referent: Prof. Dr. Hans-Werner Vohr
Koreferent: Prof. Dr. Eckhard Lammert
Tag der mündlichen Prüfung: 13.01.2014

Für meine Familie

*Die Tatsachen an sich sind sinnlos,
wenn man sie nicht einem höheren Zusammenhang einfügt.*

Boris Pasternak
(1890-1960)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungen	V
1. Einleitung	1
1.1 Das adaptive Immunsystem.....	4
1.2 Oxidative Regulation der Immunreaktion.....	7
1.3 Immuntoxizität.....	9
1.3.1 Immuntoxische Substanzklassen.....	9
1.3.2 Immuntoxikologische Risikobewertung von Substanzen	11
1.3.3 Alternative Methoden zur Evaluierung immuntoxischer Substanz- effekte	13
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	15
2. Material und Methoden	16
2.1 Chemikalien.....	16
2.1.1 Reagenzien.....	16
2.1.2 Puffer und Lösungen.....	18
2.2 Antikörper	20
2.3 Kits und Microarrays	20
2.4 Verbrauchsmaterialien.....	21
2.4.1 Glasware.....	21
2.4.2 Kunststoffware	21
2.4.3 Sonstiges	22
2.5 Laborgeräte	22
2.6 Software	23
2.7 Methoden.....	24
2.7.1 <i>In vivo</i> Experimente	24
2.7.2 <i>Ex vivo</i> PFCA.....	25
2.7.3 <i>Ex vivo</i> Spotttest	25
2.7.4 MD Test mit Milzzellen.....	26
2.7.5 MD Test mit PBMC	28
2.7.6 Bestimmung der Zellzahl	29
2.7.7 Bestimmung der Viabilität	29
2.7.8 Durchflusszytometrische Analysen von Zellen.....	30
2.7.9 Magnetische Zellseparation	32

2.7.10 Genexpressionsanalysen.....	32
3. Ergebnisse.....	34
3.1 Etablierung der <i>in vitro</i> Immunreaktion gegen SRBC	34
3.1.1 Etablierung der Kulturbedingungen für Milzzellen von Ratten	35
3.1.2 Etablierung der Kulturbedingungen für Blutzellen aus Nagern	38
3.1.3 Etablierung der Kulturbedingungen für Blutzellen aus Primaten.....	40
3.2. MD Test als <i>in vitro</i> Test für immuntoxikologische Untersuchungen.....	43
3.2.1 Evaluierung von Testsubstanzen im MD Test <i>in vitro</i>	44
3.2.2 Anwendung des MD Tests zum Testen unbekannter Substanzen	50
3.2.3 Anwendung des MD Tests im <i>ex vivo</i> Modell	51
3.2.4 Modifizierte Anwendung des MD Tests zum Testen der Immuno- genität von Proteinen	56
3.3. MD Test als Modell zur Untersuchung humoraler Immunantworten	61
3.3.1 Charakterisierung der <i>in vitro</i> Immunreaktion gegen SRBC	61
3.3.2 MD Test als Modell für die Analyse der oxidativen Regulation während der Immunreaktion.....	72
4. Diskussion.....	85
4.1 Etablierung	86
4.2 MD Test als <i>in vitro</i> Immuntoxizitätsassay.....	89
4.3 Charakterisierung der humoralen <i>in vitro</i> Immunreaktion	98
4.3.1 Vergleich der <i>in vitro</i> Immunreaktion mit der <i>in vivo</i> Immunantwort...	98
4.3.2 Einfluss von 2-ME auf die <i>in vitro</i> Immunreaktion	103
4.4 Ausblick	113
5. Zusammenfassung	115
6. Summary.....	117
7. Literaturverzeichnis	119
Abbildungsverzeichnis.....	CXXXIV
Tabellenverzeichnis	CXXXVI
Anhang	CXXXVII
Danksagung	CXL
Eidesstattliche Erklärung	CXLII

Abkürzungen

μ	micro
O ₂	Sauerstoff
2-ME	β-Mercaptoethanol
Abb.	Abbildung
ANOVA	Varianzanalyse
APC	antigenpräsentierende Zelle
ARE	<i>antioxidative response elements</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Aza	Azathioprin
B(a)p	Benzo(a)pyren
BHQ	Benjamini-Hochberg Q-Wert
BSO	L-Butionin Sulfoximin
BSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ccl	CC-Chemokinligand
Ccr	CC-Chemokinrezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CMFDA	5-Chloromethylfluorescein Diacetat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
ConA	Concanavalin A
CrCl ₃	Chromiumchlorid
Cxcl	CXC-Chemokinligand
Cy	Cyanin
CYP	Cytochrome P450
DC	Dendritische Zelle
d.h.	das heißt
div.	diverse
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EMA	<i>U.S. European Medicine Agency</i>
EPA	<i>U.S. Environmental Protection Agency</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
FACS	Durchflußzytometer
FCS	fötales Kälberserum
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forwärtsstreulicht

G	Erdbeschleunigung
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
H2DCFDA	2,7-Dichlorodihydrofluorescein Diacetat
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HOCl	Hypochlorige Säure
i.p.	intra peritoneal
i.v.	intra venös
IC	inhibitorische Konzentration
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILC	lymphoide Zellen des angeborenen Immunsystems
IVT	<i>in vitro</i> Transkription
KLH	<i>keyhole limpet hemocyanin</i>
LLNA	lokaler Lymphknotentest
LPA	lysophosphatische Säure
LPS	Lipopolysaccharid
m	milli
M	Molar
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
MBL	mannanbindendes Lektin
MCP	Monocyten-Chemoattraktant-Protein
MD	Mishell-Dutton
MFI	mittlere Fluoreszenz Intensität
MFU	mittlere Fluoreszenz Units
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute(n)
mind.	mindestens
l	Liter
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NAC	N-Acetyl-L-Cystein
NADPH	β-Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, reduziert
NEAA	nichtessentielle Aminosäuren
n.d.	nicht ermittelt
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
o.g.	oben genannt
O ₂ ⁻	Hyperoxid-Anion
O ₃	Ozon
OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung
OH [•]	Hydroxyl-Radikal
OVA	Ovalbumin
PAK	polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoff
PAMPs	konservierte Pathogen-assoziierte Muster

PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PC	Phycoerythrin-Cyanin
PCA	Hauptkomponentenanalyse
PE	Phycoerythrin
PFCA	Plaque Assay
p	pico
PHA	Phytohämagglutinin
PRR	mustererkennender Rezeptor des angeborenen Immunsystems
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatasen
RNS	reaktive Stickstoffverbindungen
RO [•]	Alkoxy-Radikal
RO ₂ [•]	Peroxy- Radikal
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	am Roswell Park Memorial Institute entwickeltes Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur
S9 mix	Leberenzyme aus dem Überstand nach Zentrifugation bei 9.000 g
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNARF	Seminaphtharhodafluorescein
SRBC	Schaferythrozyten
SSC	Seitwärtsstreulicht
T	Tag
Tab.	Tabelle
TDAR	T-Zell-abhängige humorale Immunreaktion
Tfh	follikuläre T-Helferzellen
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
Th	T-Helferzellen
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Tpi	Triosephosphatisomerase
u.a.	unter anderem
üN	über Nacht
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
VDJ	<i>variable, diverse, joining</i>
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1. Einleitung

Das Immunsystem ist ein komplexes Zusammenspiel von zellulären und löslichen Bestandteilen, welches sich während der Evolution zum Schutz des Organismus vor Infektionen durch eingedrungene Pathogene sowie vor schädlichen Substanzen entwickelt hat. Durch Zellen des Immunsystems werden aber auch abgestorbene oder entartete körpereigene Zellen beseitigt. Alle zellulären Komponenten des Immunsystems haben ihren Ursprung in pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks, welche sich über myeloide Vorläuferzellen in Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen, sowie Erythrozyten, Thrombozyten, basophile, neutrophile und eosinophile Granulozyten differenzieren. Lymphoide Vorläuferzellen entwickeln sich zu Lymphozyten, also T- und B-Zellen, sowie zu lymphoiden Zellen des angeborenen Immunsystems (Huston, 1997; Spits und Cupedo, 2012).

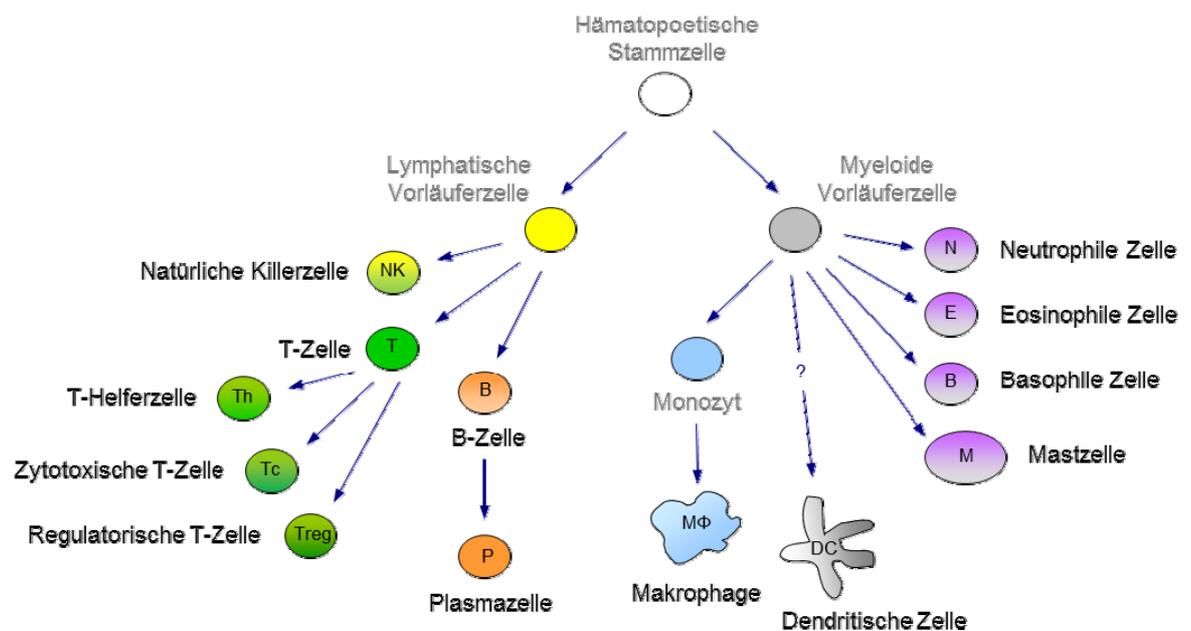


Abb. 1 Differenzierung der Immunzellen aus dem Knochenmark

Allgemein wird die Immunantwort von höheren Vertebraten in zwei grundsätzlich unterschiedliche Effektorsysteme unterteilt: die angeborene Immunität und die adaptive Immunität (Medzhitov und Janeway, 1997).

Die phylogenetisch ältere angeborene Immunität, welche schon in allen mehrzelligen Organismen und Pflanzen in unterschiedlicher Komplexität ausgeprägt ist (Hoffmann *et al.*, 1999), dient der initialen Immunabwehr, wobei allerdings kein immunologisches Gedächtnis aufgebaut wird (Janeway und Medzhitov, 2002). Die

angeborene Immunität funktioniert über die Erkennung von für den Organismus körperfremden, konservierten Pathogen-assoziierten Mustern (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), welche durch in der Keimbahn festgelegte, mustererkennende Rezeptoren des angeborenen Immunsystems (*pattern recognition receptor*, PRR) detektiert werden. PRRs haben die Funktion Phagozytose von erkannten Erregern zu initiieren, als Chemoattraktant zu fungieren oder die Bildung von Effektormolekülen zu induzieren. An PRRs sind an dieser Stelle vor allem die Toll-ähnlichen Rezeptoren (*Toll-like receptor*, TLR) sowie Komponenten des Komplements hervorzuheben. Bedeutende Bestandteile des angeborenen Immunsystems sind neben den natürlichen Barrieren des Körpers bestehend aus den inneren und äußeren Epithelien, die induzierbaren antimikrobiellen Peptide, wie Defensine oder Kolektine. Wichtige Zellen des angeborenen Immunsystems sind neben den Zellen mit myeloider Abstammung auch lymphoide Zellen (*innate lymphoid cells*, ILC), welche die Natürlichen Killerzellen, Rorγ+ ILC sowie Typ II ILC umfassen (Spits und Cupedo, 2012). Ebenso kommt proteolytischen Kaskaden, wie der Komplementkaskade, bei der Erkennung von Pathogenen eine große Bedeutung zu. Die Komplementkaskade besteht aus einer Reihe zellulärer und oberflächengebundener Proteine und führt nach Aktivierung entweder zur sofortigen Zerstörung des Erregers oder zu seiner Opsonisierung, infolge dessen inflammatorische Zellen mobilisiert werden (Markiewski und Lambris, 2007). Es werden drei Möglichkeiten der Aktivierung unterschieden: der klassische Weg, der MB-Lektin Weg und der alternative Weg. Der klassische Weg ist sowohl bei der angeborenen als auch bei der adaptiven Immunantwort von Bedeutung. Er beruht auf der Bindung vom Lektin C1q entweder direkt an Oberflächen von Pathogenen oder, und das ist der bedeutendere Weg, durch Bindung an Antigen-Antikörper-Komplexe und dadurch ausgelöst Initiierung der Komplementkaskade (Berger und Daha, 2007). Eine weitere Möglichkeit der Komplementaktivierung bietet das lösliche Akute-Phase-Protein mannanbindendes Lektin (MBL) durch Bindung an mannosehaltige Polysaccharide auf Pathogenoberflächen (Markiewski und Lambris, 2007). Der alternative Weg wird spontan durch Hydrolyse von C3 initiiert und durch direkte Bindung der Erreger aktiviert.

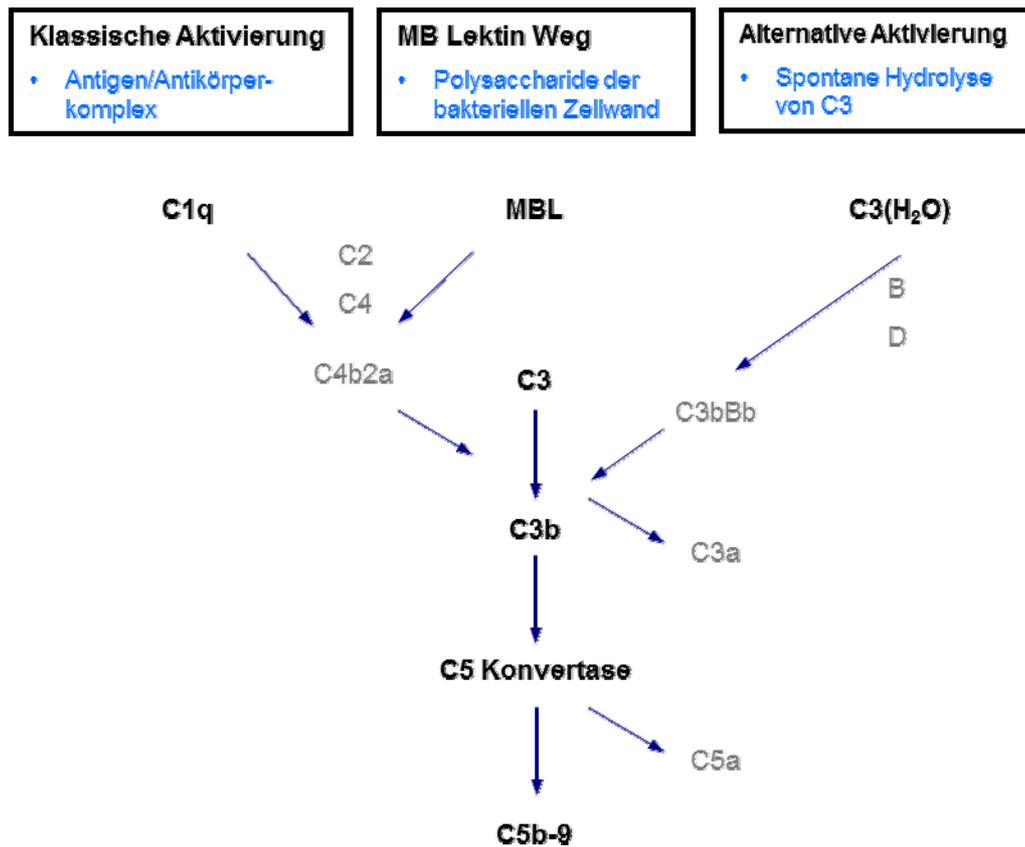


Abb. 2 Komplementkaskade

Die Signalübermittlung durch die Komplementkaskade kann durch drei Arten ausgelöst werden: über die klassische Aktivierung durch Antigen-Antikörperkomplexe, was über die Bindung von C1q zur Spaltung von C4 und C2 und damit zur Formation der C3 Konvertase führt.

Der zweite Aktivierungsweg erfolgt über die Assemblierung eines Komplexes von MB Lektin (MBL) mit den MB Lektin assoziierten Proteasen MASP 1 und MASP 2 an der bakteriellen Zellwand, infolge dessen MASP 2 durch Spaltung von C4 und C2 zur Bildung der C3 Konvertase führt.

Der alternative Aktivierungsweg wird durch die spontane Hydrolyse von C3 initiiert und führt zur Assoziation des Spaltungsprodukts C3b mit Faktor B. Faktor B wird daraufhin durch Faktor D gespalten und eine alternative C3 Konvertase entsteht.

Die entstandenen C3 Konvertasen spalten C3 zu C3a und C3b, woraufhin C3b zur Bildung der C5 Konvertase beiträgt, welche wiederum C5 in C5a und C5b spaltet. Dabei verursachen vor allem die Komponenten C3a und C5a inflammatorische Immunantworten. Der zum Schluss entstehende Komplex aus C5b bis C9 führt zur Lyse.

Abbildung modifiziert nach Berger und Daha, 2007.

Das adaptive Immunsystem, welches sich vor ca. 450 Millionen Jahren entwickelt hat, erlaubt die spezifische Eliminierung der Pathogene und führt zur Ausbildung von Gedächtniszellen, welche eine lang andauernde Immunität gegen diese vermitteln können (Hoffmann *et al.*, 1999). Diese spezifische Immunantwort umfasst zelluläre und humorale Effektormechanismen. Ihre Spezifität beruht auf der Antigenerkennung durch B- und T-Zellrezeptoren, welche durch festgelegte Genelemente in der Keimbahn kodiert sind, aber erst durch Rekombination und somatische Mutation ihre spezielle Form und Funktion erhalten (Litman, Rast und Fug-

man, 2010). Die zelluläre Immunantwort wird von T-Lymphozyten vermittelt, welche für ihre Aktivierung professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) des angeborenen Immunsystems erfordern. Die humorale Antwort wird überwiegend von den sezernierten Antikörpern der B-Zellen vermittelt.

1.1 Das adaptive Immunsystem

Für die Ausbildung einer adaptiven Immunantwort ist das Zusammenspiel von Zellen des angeborenen Immunsystems, welche sowohl bei der Auslösung als auch der Steuerung und Pathogenbeseitigung beteiligt sind, mit Lymphozyten des adaptiven Immunsystems entscheidend. So werden Antigene in der Peripherie vorwiegend von Makrophagen und Dendritischen Zellen (DC) erkannt. Diese gehören, wie auch die B-Lymphozyten, zu professionellen antigenpräsentierenden Zellen. Dendritische Zellen sind eine heterogene Population zirkulierender Zellen, denen die Rolle der wichtigsten APC zukommt. (Inaba und Steinman, 1985; Inaba *et al.*, 1990; Levin *et al.*, 1993). Internalisierte Antigene werden von unreifen DC prozessiert und auf Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen (MHC) präsentiert. Durch Mustererkennung erfolgt die Aktivierung und die anschließende Migration differenzierender Dendritischer Zellen in drainierende sekundäre lymphatische Organe, wo sie auf naive, antigenspezifische T-Zellen treffen und diese aktivieren (Cyster, 2005).

Grundsätzlich können aufgenommene Antigene auf zwei Klassen von MHC-Molekülen präsentiert werden. MHC-Moleküle sind eine Gruppe von polymorphen Genen kodierte Glykoproteine, die jedem Individuum ein bestimmtes Peptid-Bindungsspektrum ermöglichen. MHC-Klasse I Moleküle bestehen aus einer α -Kette und dem assoziierten β 2-Mikrogobulin und können auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden. Bedingt durch proteasomalen Abbau und der ER-abhängigen Beladung werden auf MHC I Molekülen hauptsächlich Fragmente intrazellulär synthetisierter und degradierter Proteine präsentiert (Neefjes *et al.*, 2011). MHC II Moleküle werden abgesehen von einigen Ausnahmen von professionellen APC exprimiert. Sie bestehen aus einer α - und einer β -Kette und präsentieren Peptide, die durch den endosomalen Abbau extrazellulärer Proteine gebildet wurden (Neefjes *et al.*, 2011).

Lymphozyten sind die Effektorzellen der adaptiven Immunreaktion. Aufgrund ihres Entwicklungsortes und der unterschiedlichen Funktion werden sie in zwei Haupt-

klassen, die B- und die T-Zellen, unterteilt. Beide Zelltypen wandern nach ihrer Entstehung, wobei T-Zellen im Thymus und B-Zellen im Knochenmark heranreifen, in periphere lymphatische Organe ein. Die Besonderheit der Lymphozyten liegt in ihrer einzigartigen Spezifität, welche durch die somatische Mutation und Reorganisation von separaten VDJ (*variable, diverse, joining*) Gensegmenten entstehen (Chaplin, 2010).

Der zentrale Grundsatz der adaptiven Immunantwort ist die klonale Selektion der Lymphozyten. Sowohl ineffiziente als auch potentiell autoreaktive Lymphozyten werden eliminiert. Zellen, die ein Antigen mit ihrem spezifischen Rezeptor erkennen können und Hilfe erhalten, vermehren sich dagegen klonal und differenzieren zu Effektorzellen (Danilova, 2012). Im weiteren Verlauf der Immunreaktion differenzieren sich einige B- und T-Zellen zu Gedächtniszellen, welche dann bei erneutem Antigenkontakt zu einer schnellen und spezifischen Immunreaktion führen.

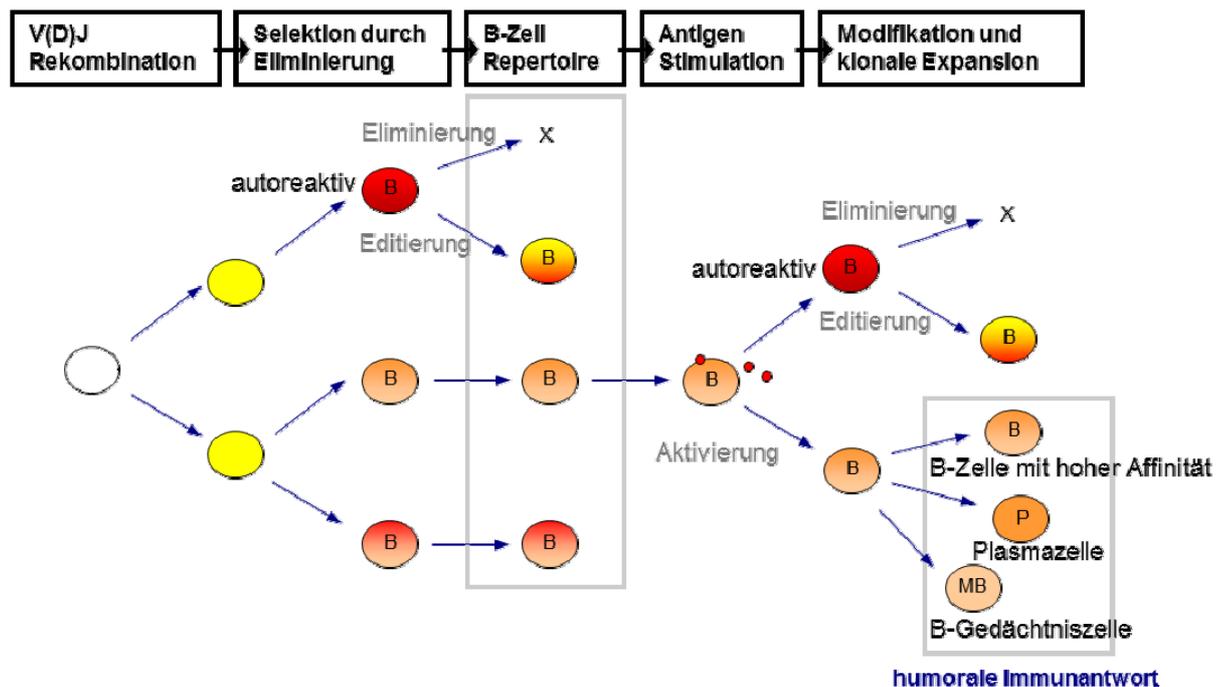


Abb. 3 Klonale Expansion und Selektion in der B-Zell Entwicklung

Abbildung in Anlehnung an Danilova, 2012.

T-Lymphozyten werden anhand ihrer Korezeptoren in CD4+ und CD8+ T-Zellen unterteilt. Dabei können CD8+ T-Zellen das spezifische Antigen ausschließlich auf MHC I Molekülen erkennen (Zinkernagel und Doherty, 1997) und durch Kostimulation in zytotoxische T-Zellen differenzieren. CD4+ T-Zellen können nur durch auf MHC II Molekülen präsentierte und zugleich spezifische Antigene und Kostimulation aktiviert werden. Aktivierte T-Helferzellen (CD4+) werden anhand ihres Zyto-

kinprofils in Th1, Th2 und Th17 Zellen unterschieden. Dabei sezernieren Th1 Zellen vor allem IL-2, TNF- β und IFN- γ und unterstützen damit zellvermittelte Antworten gegen Viren und einige intrazelluläre Bakterien (Chaplin, 2010). Th2 Zellen produzieren große Mengen von GM-CSF, IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13, was die Ausbildung von humoralen Antworten sowie antikörpervermittelten allergischen Reaktionen fördert. Th17 Zellen sind durch die Produktion von IL-6 und IL-17 gekennzeichnet und fördern die Mobilisierung von Neutrophilen zu Infektionsherden von extrazellulären Bakterien (Chaplin, 2010). Eine besondere Gruppe der Th2 Zellen bilden die regulatorischen T-Zellen, welche autoreaktive T-Zellen supprimieren und antigenspezifische Immunreaktionen kontrollieren.

B-Zellen sind für die humorale Immunreaktion verantwortlich, d.h. sie sezernieren Antikörper. Sie werden nach direkter Erkennung des Antigens über den B-Zellrezeptor aktiviert (T-Zell-unabhängige humorale Immunreaktion) oder erfordern die Hilfe von antigenspezifischen Th Zellen (T-Zell-abhängige humorale Immunreaktion) und differenzieren zur Plasmazelle. Polymere Antigene mit wiederkehrendem Muster, wie bakterielle Polysaccharide, vernetzen die B-Zellrezeptoren und können so eine humorale Immunreaktion ohne die Hilfe von T-Zellen auslösen (Chaplin, 2010). Diese T-Zell-unabhängige B-Zellantwort ist im Vergleich zur T-Zell-abhängigen Reaktion eingeschränkter und induziert meist keine ausreichende Gedächtnisausbildung (Chaplin, 2010). Die von der Plasmazelle sezernierten Antikörper haben die gleiche Spezifität wie ihr B-Zellrezeptor. Antikörper bestehen aus zwei leichten und zwei schweren Ketten mit je einem konstanten und einem variablen Bereich. Die variablen Bereiche bilden die Antigenbindungsstelle, wohingegen aufgrund der konstanten Regionen die Funktion festgelegt wird. Es werden fünf Immunglobulinklassen unterschieden: IgM, IgG, IgD, IgA, IgE, die durch ihre spezielle Form unterschiedlichen Funktionen zugeordnet werden können. Naive B-Zellen exprimieren IgM und IgD auf ihren Oberflächen, und können durch Aktivierung und T-Zellhilfe nach einem Isotypwechsel, welcher auf einer Umordnung von Genen basiert, auch Antikörper gleicher Spezifität aber unterschiedlicher Klasse produzieren. Von T-Zellen produzierte Zytokine haben Einfluss auf die sezernierte Immunglobulinklasse. So fördert IL-10 die Bildung von IgG1 und IgG3 (Chaplin, 2010). IgG2a wird durch IFN- γ induziert (Vinuesa *et al.*, 2005) und IL-4 und IL-13 begünstigen die Bildung von IgE, während die Produktion von IgA durch TGF- β unterstützt wird (Chaplin, 2010).

Für eine optimale adaptive Immunreaktion sind Zell-Zell-Interaktionen unerlässlich. Die Migration der beteiligten Zellen in die sekundären lymphatischen Organe, wie Lymphknoten oder Milz, gewährleistet diesen engen Zell-Zell-Kontakt. So sind B-Zellen in B-Zellfollikeln in Assoziation mit unterstützenden follikulären Dendritischen Zellen organisiert (Tew *et al.*, 1997), und angrenzende T-Zell-reiche Zonen zeichnen sich durch eine hohe Präsenz von antigenpräsentierenden Dendritischen Zellen aus (Chaplin, 2010). Laufender Austausch von Zellen mit peripheren Regionen wird durch die afferenten und efferenten lymphatischen Gefäße ermöglicht.

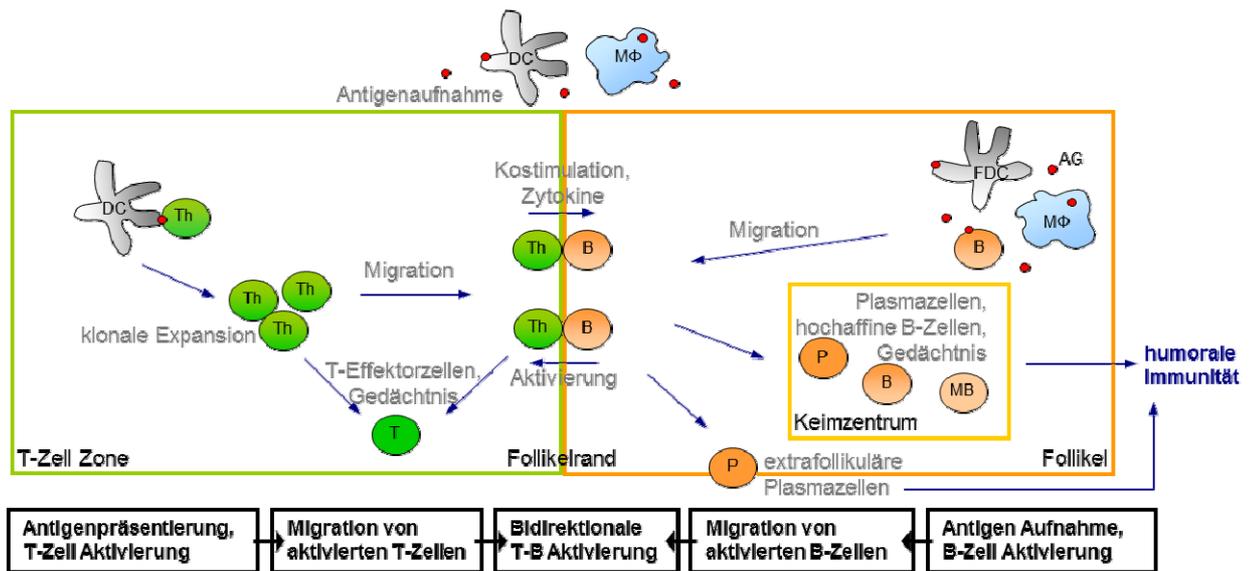


Abb. 4 Ausbildung einer adaptiven Immunreaktion in sekundären lymphatischen Organen

Nach der Antigenaufnahme in der Peripherie, wandern antigenpräsentierende Dendritische Zellen in T-Zell-reiche Regionen von sekundären lymphatischen Organen ein. Dort treffen sie auf CCR7-exprimierende T-Zellen und aktivieren diese. Nach der Aktivierung exprimieren T-Zellen vermehrt CXCR5, was ihnen die Migration zum Follikelrand ermöglicht. Dort treffen sie auf aktivierte und CCR7-hochregulierte B-Zellen, und es kommt zur gegenseitigen Stimulation, was eine klonale Expansion der B-Zellen zur Folge hat. Zum einen führt die Aktivierung zur Antikörperproduktion durch kurzlebige extrafollikuläre B-Zellen. Zum anderen kommt es mit Hilfe von follikulären T-Helferzellen zur Ausbildung von Keimzentren, wo hochaffine langlebige B-Zellen und Gedächtniszellen entstehen können.

Abbildung in Anlehnung an Patakas *et al.*, 2011; Cannons *et al.*, 2012; Okada und Cyster, 2006.

1.2 Oxidative Regulation der Immunreaktion

Ein wichtiges Signal während der Immunreaktion bildet die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Unter ROS werden kleine vom Sauerstoff abstammende Moleküle u.a. Radikale zusammengefasst. Zur Gruppe der Radikale gehören das Hydroxid-Anion (OH^{\cdot}) sowie das Hydroxyl- (OH^{\cdot}), Peroxyl- (RO_2^{\cdot}) und Alkoxy-Radikal (RO^{\cdot}). Nichtradikale, oxidierende Verbindungen oder leicht in Radikale umwandelbare Substanzen sind die Hypochlorige Säure (HOCl), Ozon (O_3) oder Wasserstoffperoxid (H_2O_2). ROS entstehen unspezifisch als Nebenprodukt

der Atmungskette und anderer biologischer Vorgänge in der Zelle, können aber auch spezifisch, z.B. durch NADPH-Oxidasen, produziert werden. In der Reaktion katalysieren NADPH-Oxidasen den Elektronentransfer von NADPH auf molekularen Sauerstoff, wobei Superoxidanionen gebildet werden (Crotzer *et al.*, 2012). Es sind eine Reihe von NADPH-Oxidasen in Säugetieren bekannt (Nox1 bis Nox5 sowie Duox1 und 2), wobei Nagern das *Nox5* Gen fehlt (zusammengefasst in Bedard und Krause, 2007). ROS reagieren sehr effektiv mit einer Reihe von Molekülen, wie Proteinen, Lipiden, Kohlenhydraten und Nukleinsäuren sowie anderen nichtorganischen Verbindungen. Durch diese Reaktivität können sie die Zielmoleküle irreversibel verändern und so zu einem biologischen Schaden führen. Neben ROS sind reaktive Stickstoffverbindungen (RNS), allen voran das durch Stickstoffmonoxid-Synthasen (Nos) produzierte flüchtige Stickstoffmonoxid (NO), hochreaktive Oxidantien mit Bedeutung für die antimikrobielle Abwehr sowie für die Signaltransduktion (MacMicking, 2012).

ROS, generiert durch die NADPH-Oxidase (Nox2), tragen entscheidend zur Pathogenabwehr in Phagozyten bei (Crotzer *et al.*, 2012). Neben der destruktiven Eigenschaft übernehmen ROS auch regulierende Funktionen in vielen biologischen Prozessen, indem sie z.B. redox-sensitive Transkriptionsfaktoren, wie NF κ B, NF-AT und AP-1 sowie sekundäre Regulationsmechanismen über MAP-Kinasen steuern (Bedard und Krause, 2007). Die Oxidierung von Thiolgruppen durch ROS ist bedeutend für zelluläre Signalprozesse. Hervorzuheben ist hier die Inaktivierung von katalytisch-relevantem Cystein in Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP), welche den Phosphorylierungsstatus vieler Signaltransduktionsproteine kontrollieren und in diverse zelluläre Vorgänge, wie Proliferation, Differenzierung, Überleben, Metabolismus und Motilität, involviert sind (Rhee, 2006). In Lymphozyten spielen ROS eine wichtige Rolle. So wurde für T-Zellen gezeigt, dass sowohl die Zugabe von Antioxidanzien als auch die Zufuhr von exogenen ROS zu mitogenstimulierten T-Zellen *in vitro* die Proliferation und IL-2 Produktion der Zellen inhibiert (zusammengefasst in Williams und Kwon, 2004).

NADPH-Oxidasen sind klinisch von Bedeutung, da Mutationen in Untereinheiten von NOX2 mit der Septischen Granulomatose assoziiert sind. Die chronische Erbkrankheit ist gekennzeichnet durch eine herabgesenkte Produktion von ROS, welche mit wiederkehrenden Infektionen, Entzündungen und Granulomen einhergeht (Crotzer *et al.*, 2012).

Einer der wichtigsten Defensivmechanismen der Zelle gegen oxidativen Stress stellt das intrazelluläre Thiol Glutathion (GSH) dar. Die reduzierte Form des Tripeptids GSH wird in der Zelle durch zwei aufeinanderfolgende Reaktionen aus Glutaminsäure, Glycin und der limitierenden Aminosäure Cystein synthetisiert (Bannai und Tateishi, 1986). ROS werden durch GSH detoxifiziert, indem die freie Thiolgruppe des monomeren GSH oxidiert wird und GSH gleichzeitig zu seiner dimeren Form übergeht. Die Expression einer Vielzahl antioxidativer und zellprotektiver Gene, unter anderem wichtiger Gene für die Biosynthese und Funktion von GSH (z.B. Glutathionperoxidase, Untereinheiten der Glutamatcysteinligase sowie der Glutathiontransferase), wird gesteuert durch bestimmte genregulatorische Promotorsequenzen (*antioxidative response elements*, ARE) (Kensler, Wakabayashi und Biswal, 2007). Ein zentraler Regulator der ARE-gesteuerten Genexpression ist der Transkriptionsfaktor Nrf2, welcher im inaktivierten Zustand gebunden an Keap1 im Cytoplasma der Zelle vorliegt und ausgelöst durch oxidativen Stress nach Phosphorylierung dissoziiert und in den Zellkern transloziert. Auch für GSH konnte eine immunmodulierende Wirkung, unter anderem in T-Zellaktivierung und -proliferation, gezeigt werden (Dröge *et al.*, 1991; Gmünder *et al.*, 1990).

1.3 Immuntoxizität

Induzierte, unerwünschte immunmodulierende Wirkungen auf das Immunsystem werden durch den Begriff Immuntoxizität beschrieben. Diese immuntoxischen Effekte können nach Exposition durch Chemikalien, Arzneimittel, Umweltgifte, aber auch durch Stress auftreten (Kovacic und Samanathan, 2008) und, abhängig vom Auslöser, sowohl immunaktivierend als auch immunsuppressiv wirken.

1.3.1 Immuntoxische Substanzklassen

Im Allgemeinen haben immuntoxische Substanzen eine immunmodulierende Wirkung. Diese kann nach Exposition mit immuntoxischen Stoffen als unerwünschte Auswirkung auf das Immunsystem auftreten, oder als Medikation zu Therapiezwecken eingesetzt werden. Die vorliegende Dissertation schließt Immunsuppressiva der folgenden Kategorien ein: Pharmaka mit „erwünschtem“ immunsuppressivem Effekt und „unerwünschter“ immunsuppressiver Nebenwirkung sowie Chemikalien mit immunsuppressiver Wirkung. Die Testsubstanzen werden im Folgenden näher beschrieben.

Eine wichtige Gruppe immunsuppressiver Substanzen sind Glucocorticoide. Diese natürlich vorkommenden Steroidhormone sind wie alle Hormone Abkömmlinge des Cholesterins und werden in der Nebennierenrinde synthetisiert (Payne und Hales, 2004). Das prominenteste natürliche Glucocorticoid ist das Cortisol. Ihre vielfältige physiologische Wirkung, u.a. die antiinflammatorische und immunsuppressive Eigenschaft, entfalten sie durch die Bindung an Glucocorticoidrezeptoren. In der Therapie werden synthetische Glucocorticoide, wie Prednisolon und Dexamethason, zur Behandlung von schweren allergischen Reaktionen, u.a. dem anaphylaktischen Schock, sowie bei diversen Autoimmunerkrankungen eingesetzt (Flammer und Rogatsky, 2011).

Eine weitere Medikamentengruppe sind die Zytostatika, welche, wie der Name schon sagt, durch verschiedene Mechanismen die Zellteilung inhibieren. Zytostatika werden sowohl als Krebstherapeutika als auch zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen eingesetzt. Ein verbreitetes Zytostatikum ist das Prodrug Cyclophosphamid, welches zur Klasse der Stickstoff-Senfgasverbindungen mit alkylirender Wirkung gehört. Dabei wird die Substanz durch das Cytochrom-P450 Enzym CYP2B6 zu 4-Hydroxycyclophosphamid umgesetzt und damit aktiviert (Roy *et al.*, 1999). 4-Hydroxycyclophosphamid kann Alkylgruppen auf Basen der DNA übertragen, was schließlich zur Hemmung der DNA-Synthese führt. Das Prodrug Azathioprin gehört zur Gruppe der purinanalogen Antimetaboliten und wirkt nach Metabolisierung durch das Enzym Glutathiontransferase A2-2 zu 6-Mercaptopurin hemmend auf die Nukleinsäure-Synthese, und somit zytostatisch (Zhang, Moden und Mannervik, 2010).

Andere Zytostatika üben ihre Funktion durch mitosehemmende Wirkweisen, durch DNA-interkalierende oder DNA-quervernetzende Reaktionen aus.

Cyclosporin A, ein Peptid gewonnen aus Schlauchpilzen, gehört zur Gruppe der Calcineurin-Inhibitoren und ist ein Vertreter der immunophilinbindenden Substanzen. Durch Komplexbildung mit Cyclophilin wird Calcineurin gebunden und dadurch inaktiviert (Ho *et al.*, 1996). In der Folge wird die Aktivierung von NFAT durch calcineurinvermittelte Dephosphorylierung sowie die nachgeschalteten Signalwege, u.a. die Produktion von einigen Zytokinen, unterbunden (Ho *et al.*, 1996). Cyclosporin A wird zur Behandlung von diversen Autoimmunerkrankungen sowie zur Prävention von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen eingesetzt.

Immunsuppressive Effekte können auch ungewollt nach Exposition mit Umweltgiften auftreten. In diesem Zusammenhang werden einige Verbindungen aus der Gruppe der polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK) genannt. So ist für die verbreitete Testsubstanz Benzo(a)pyren nach Metabolisierung durch P4501A/1B und Peroxidasen im Körper eine sowohl kanzerogene als auch immunsuppressive Wirkweise belegt (Burchiel und Luster, 2001). PAK-Verbindungen wie Benzo(a)pyren werden durch unvollständige Verbrennung von organischem Material, wie Kraftstoff und Kohle, in die Umwelt freigesetzt und sind ubiquitär nachweisbar (ATSDR, 1995).

Eine weitere Gruppe von Immunsuppressiva gehört zu den zunehmend bedeutenden Biopharmazeutika (Biologika). Medikamente auf Grundlage von rekombinanten Proteinen, u.a. Antikörper und Zytokine, werden verstärkt zur Behandlung von Krebs und Autoimmunerkrankungen eingesetzt. Diese Therapeutika werden so konstruiert, dass sie sehr spezifisch in relevante Vorgänge eingreifen und dadurch besonders wirksam sind. Zudem ist die Entwicklung von Biologika finanziell lukrativ, da allein in den USA die Einnahmen durch die Top zwölf Biologikaprojekte in 2010 etwa 30 Milliarden US Dollar betragen (Bourgoin, 2011). Sie sind für die Pharmafirmen von herausragendem Interesse, was sich an der Steigerung durchgeführter klinischer Studien für Biologika in den letzten Jahren zeigt. So wurden von 2000 bis 2005 in den USA ca. zweitausend Studien gemeldet. In den darauffolgenden fünf Jahren stieg deren Anzahl schon auf sechstausend und der Trend ist ungebrochen (Bourgoin, 2011). In den USA wurden 2011 von insgesamt 30 neuen Medikamenten sechs Biologika zugelassen (Mullard, 2012).

1.3.2 Immuntoxikologische Risikobewertung von Substanzen

Immuntoxikologische Risikobewertungen von Substanzen sind Bestandteil von behördlich vorgeschriebenen toxikologischen Untersuchungen. Für Chemikalien werden bei Standardtoxizitätsstudien u.a. auch immunsystemrelevante Parameter analysiert (OECD Richtlinie für das Testen von Chemikalien Nr. 407; 408). Solche Standardtoxizitätsuntersuchungen werden im Rahmen von *in vivo* Studien mit wiederholter Substanzgabe als subakute 28-Tage- oder subchronische 90-Tage-Tests durchgeführt. Die verlangten Analysen mit immunologischer Relevanz umfassen dabei die Zellzahlermittlung von peripheren Immunzellen in der Hämatologie sowie histopathologische Untersuchungen von primären und sekundären Or-

ganen des Immunsystems. Die Ermittlung von Gewichtsveränderungen von Tieren oder bestimmten Organen gibt einen Hinweis auf den Gesundheitsstatus. Zudem können gehäuft aufgetretene Infektionen, eventuell beobachtete Allergien, Autoimmunität oder gesteigerte Tumorbildung auf immuntoxische Substanzwirkungen hindeuten.

Für die Zulassung von neuen Medikamenten (FDA, 2002; EMA, 2006) sowie Pflanzenschutzmitteln (EPA, 1998) werden zudem mögliche immunmodulierende Substanzeffekte konkret untersucht. Dabei ist der Einsatz von immunologischen Funktionstests, meist in Form von einer T-Zell-abhängigen humoralen Immunreaktion (*T cell dependent antibody response*, TDAR), üblich. Dafür werden zusätzliche Tiere (die sogenannten Satellitengruppen) über die gesamte Studienzeit mit der Testsubstanz behandelt, kurz vor Studienende mit dem Antigen der Wahl (SRBC oder KLH) immunisiert und auf ihre Fähigkeit, spezifische Antikörper dagegen bilden zu können, durch einen Plaque Assay (*plaque forming cell assay*, PFCA) oder im ELISA untersucht. Üblicherweise werden auch durchflusszytometrische Untersuchungen von Zellen immunrelevanter Organe implementiert. Abhängig von der zu testenden Substanz und dem Ergebnis der durchgeführten Studien können zusätzliche Tests zur Überprüfung der Funktion von bestimmten Zelltypen, z.B. Makrophagen, NK-Zellen oder zytotoxischen Zellen, durchgeführt werden.

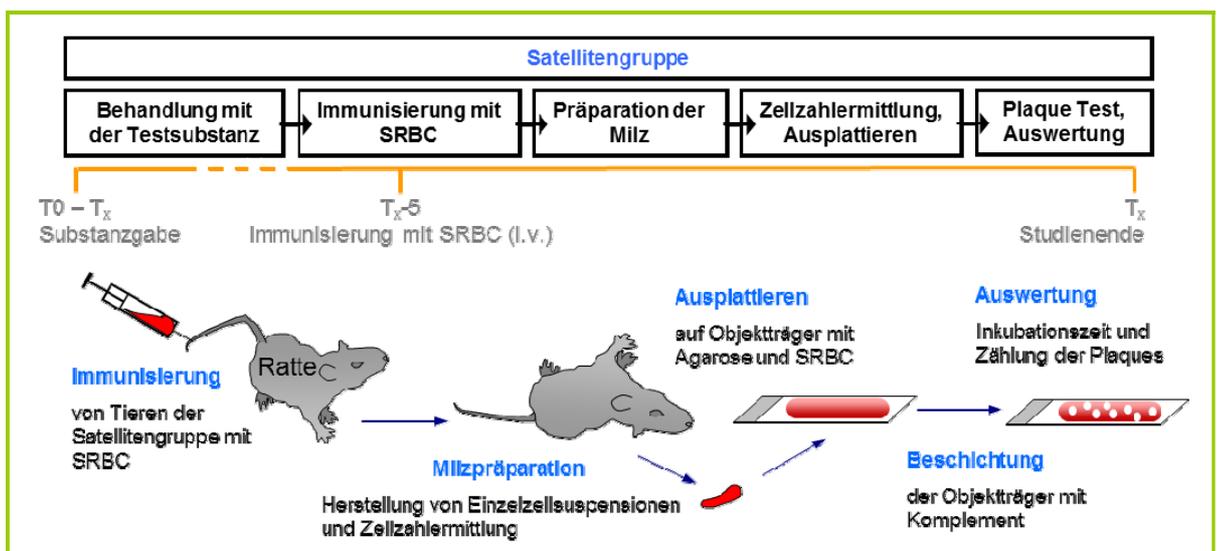


Abb. 5 Versuchsschema eines PFCA

Andere Nebenwirkungen auf das Immunsystem, wie Sensibilisierung, die Auslösung allergischer Reaktionen oder induzierte Autoimmunität, werden durch die o.g. Methoden nicht gezielt abgefragt. Kontaktsensibilisierende Effekte können z.B. mit dem lokalen Lymphknotentest (*local lymph node assay*, LLNA) ermittelt werden. Für Hautsensibilisierung, aber auch Phototoxizitätsuntersuchungen und Detektion korrosiver Substanzen können neben klassischer Exposition von Tieren alternative *in vitro* Hautmodelle herangezogen werden. Allerdings gibt es bisher keine prädiktiven Testsysteme für die Vorhersage von systemischer Hypersensibilität oder Autoimmunreaktionen (Galbiati *et al.*, 2010).

1.3.3 Alternative Methoden zur Evaluierung immuntoxischer Substanzeffekte

Klassische Testverfahren für humantoxikologische Untersuchungen sind nicht uneingeschränkt einsetzbar. Diese Toxizitätsprüfungen werden *in vivo* durchgeführt und sie sind meist mit einem ethisch bedenklichen hohen Tierbedarf und einem hohen Leidensdruck der Versuchstiere verbunden. Zudem werden überwiegend Studien an Nagern durchgeführt, was die Übertragung auf den Menschen zum einen erschwert und zum anderen in manchen Fällen sogar fraglich macht. Nicht immer können beobachtete Effekte im Tier ohne weiteres auf den Menschen extrapoliert werden, zusätzlich können Menschen nach Exposition unerwünschte Reaktionen zeigen, die im Tier nicht beobachtet werden können. Bedingt durch diese Einschränkungen ist es notwendig, neue Testverfahren zu entwickeln und damit die Toxizitätsprüfungen zu optimieren. Diese Bewegung wurde durch das „3R“ Konzept von Russel und Burch 1959 initiiert, welche die Reduzierung, Verbesserung und den Ersatz (*reducement, refinement and replacement*) von Tierversuchen für toxikologische Untersuchungen forderten (Russel und Burch, 1959). Dieses Ziel ist nach wie vor aktuell und wird durch diverse internationale Forschungs- und Finanzierungsprogramme unterstützt. So sind inzwischen eine Reihe von alternativen Testverfahren für die Endpunkte Hautkorrosion und -irritation (OECD Richtlinie für das Testen von Chemikalien Nr. 430; 431; 435; 439) sowie für die Feststellung von Genotoxizität und Mutagenität (OECD Richtlinie für das Testen von Chemikalien Nr. 471; 473; 476; 479; 480; 481; 482; 487) etabliert. Jedoch fehlen behördlich anerkannte Alternativen für die immuntoxikologische Risikobewertung von Substanzen. Neue Ansätze zur *in vitro* Detektion von Immuntoxizität wurden von Galbiati *et al.*, 2010 referiert und umfassen eine Empfehlung

zur gestaffelten Überprüfung auf Myelotoxizität und Lymphotoxizität. Dabei werden zum einen stimulationsbasierte Experimente von bestimmten Zelltypen, z.B. anti-CD3 und anti-CD28 Stimulation von T-Lymphozyten mit dem Endpunkt Proliferation und Zytokinbestimmung diskutiert oder die Messung der zytotoxischen NK-Zellaktivität. Zum anderen ist der Einsatz von kombinierten *in vitro* Funktionstests denkbar. So ist die T-Zell-abhängige humorale *in vitro* Immunreaktion eine gute Alternative, da sie das Zusammenwirken von unterschiedlichen Zelltypen, im Einzelnen antigenpräsentierende Zellen, T-Zellen und B-Zellen, erfordert. 2009 wurde ein solcher Test mit Milzzellen von Mäusen basierend auf der Methode von Mishell und Dutton (Mishell und Dutton, 1966) von Lydia Maren Köper und Hans-Werner Vohr für die *in vitro* durchgeführte immuntoxikologische Risikobewertung von Substanzen vorgeschlagen. Dabei konnte im Gegensatz zu Stimulationsexperimenten von Lymphozyten eine hohe Vorhersagekraft für immuntoxische Agenzien sowie die Abgrenzung zu nicht toxischen Substanzen und zytotoxischen Effekten detektiert werden (Köper und Vohr, 2009), sodass die Weiterentwicklung dieser Methode und die weitergehende Evaluierung von Testsubstanzen von großer Wichtigkeit ist.

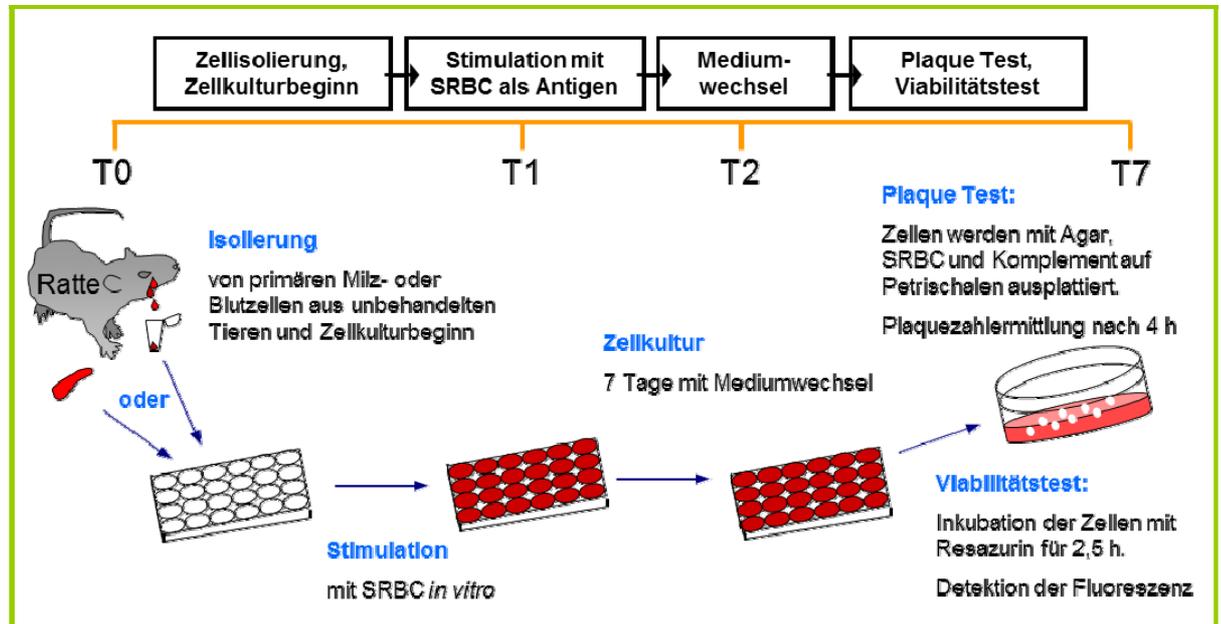


Abb. 6 Versuchsschema eines MD Tests

Dargestellt ist das in dieser Dissertation entwickelte Protokoll für primäre Rattenzellen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Dissertation ist primär die Optimierung von zellkulturbasierten Testverfahren für die Detektion immunsuppressiver Effekte in der toxikologischen Risikobewertung von Substanzen, um eine Alternative für Tierversuche in diesem Bereich zu etablieren. Dabei ist die Weiterentwicklung der T-Zell-abhängigen humoralen *in vitro* Immunreaktion, welche schon 2009 für den Einsatz als *in vitro* Immuntoxizitätstest vorgeschlagen wurde (Köper und Vohr, 2009), besonders erstrebenswert. Beruhend auf der Methode von Mishell und Dutton (1966), wurde der Test bisher mit Milzzellen aus Mäusen durchgeführt. Für einen breiteren Einsatz dieser Methode in der toxikologischen Praxis ist es notwendig, das System an Zellen aus anderen Spezies zu adaptieren. So sollen im ersten Schritt die Kulturbedingungen an die wichtigste Spezies für toxikologische Untersuchungen, die Ratte, angepasst werden. Um die Übertragbarkeit der Testergebnisse auf den Menschen möglichst verlässlich zu gewährleisten, sollen auch Zellen aus anderen Spezies für *in vitro* Untersuchungen herangezogen werden können. Dabei sind Zellen aus Hunden, Affen und vor allem aus Menschen von besonderem Interesse, wobei in diesen Fällen ein auf peripheren Blutzellen basierendes Testsystem notwendig wird. Somit ist der zweite Schritt die Etablierung der humoralen *in vitro* Immunreaktion an PBMC aus eben diesen Spezies. Anschließend sollen durch Einsatz von immuntoxischen Testsubstanzen die etablierten Testsysteme auf ihre Eignung für toxikologische Untersuchungen getestet werden. Zusätzlich sollen alternative Einsatzmöglichkeiten des neuen Verfahrens gefunden und geprüft werden. Außerdem soll die *in vitro* Immunreaktion näher charakterisiert und mit der *in vivo* Situation verglichen werden. In diesem Zusammenhang soll durch Einsatz von diversen Methoden, u.a. Genexpressionsanalysen, die Bedeutung von redoxrelevanten Vorgängen für das Immunsystem näher analysiert werden.

2. Material und Methoden

Alle experimentellen Arbeiten wurden unter Berücksichtigung der Richtlinien zur Arbeitssicherheit und Tierschutz in den Laboratorien der Toxikologie der Bayer Pharma AG durchgeführt. Für die tierexperimentellen Arbeiten wurden NMRI Mäuse (Harlan, Borchon, Deutschland), Wistar Ratten (Harlan, Borchon, Deutschland) und Lewis Ratten (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) nach mindestens einwöchiger Akklimatisierung eingesetzt. Die Pflege und Behandlung der Tiere entsprach dem Tierschutzgesetz und wurde von ausgebildetem Fachpersonal vorgenommen. Primatenblut wurde durch Punktion der Vene von Java-Affen (*Macaca cynomolgus*) gewonnen. Alternativ wurden humane PBMC aus *buffy coats* (Blutspendezentrale des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf) von gesunden Blutspendern isoliert. Die für die Versuche verwendeten Materialien sind im Folgenden aufgeführt.

2.1 Chemikalien

2.1.1 Reagenzien

Chemikalie	Bezugsquelle
2,7-Dichlorodihydrofluorescein Diacetat (H ₂ DCFDA)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
5, 6 Chloromethyl SNARF-1 Acetat	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
5' 5' Dithiobis (2-Nitrobenzoesäure)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Advanced DMEM	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
autoMACS Rinsing Solution	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
autoMACS Running Buffer	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
Azathioprin	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bacto™ Agar	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Benzo(a)pyren	Supelco, Bellefonte, USA
Calciumchlorid-dihydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Cell tracker green CMFDA	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
CrCl ₃	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Cyclophosphamid	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Cyclosporin A	Novartis, Nürnberg, Deutschland
D(+)-Glukose	Merck, Darmstadt, Deutschland
DEAE Dextran hydrochlorid	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Dexamethason	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
D-Mannitol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt, Deutschland
FACS Cleaning Solution	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS Shutdown Solution	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACSFlow	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Ficoll-Paque™ PLUS	GE Healthcare Biosciences, Upsala, Schweden
Fötales Kälberserum	BiochromAG, Berlin, Deutschland
Fötales Kälberserum	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Heptanal	ABCR GmbH & CoKG, Karlsruhe, Deutschland
humanes IFN- ω , rekombinant	PBL interferon source, Piscataway, USA
humanes Interleukin-29 (IFN- λ 1), rekombinant	PBL interferon source, Piscataway, USA
humanes Leukozyteninterferon (IFN I Gemisch)	PBL interferon source, Piscataway, USA
humanes universelles IFN- α , rekombinant	PBL interferon source, Piscataway, USA
IMDM + L-Glutamin und 25 mM Hepes	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Kaliumchlorid	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	KMF Laborchemie, Lohmar, Deutschland
Kochsalzlösung, isoton	Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
Komplement vom Meerschweinchen	Cedarlane Laboratories, Burlington, Canada
L-Butionin Sulfoximin (BSO)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Glutamin 200 mM	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
L-Gluthation, oxidiert	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Gluthation, reduziert	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Lysepuffer für FACS	Beckman Coulter, Immunotech, Marseille, Frankreich
VersaLyse	
Magnesiumchlorid-hexahydrat	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Magnesiumsulfat-heptahydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
N-Acetyl-L-Cystein (NAC)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumazid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat-dihydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumpyruvat 100 mM	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Nichtessentielle Aminosäuren (NEAA) 100x	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ovalbumin	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Phenolrot	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Phosphatgepufferte Salz-	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

lösung (PBS)	
Plaque Agarose	Biozym Scientific, Hess. Oldendorf, Deutschland
Primocin 50 mg/ml	InVivoGen, San Diego, USA
Propidiumiodid	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
RNA 6000 Ladder	Ambion, Austin, USA
RPML + L-Glutamin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
RPML ohne Phenolrot	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure, 1 N	Merck, Darmstadt, Deutschland
Schafserythrozyten, 50 %- Vollblut-Suspension in Alsever- Puffer	Labor Dr. Merk & Kollegen, Ochsenhausen, Deutschland
Triathanolamin	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Triton X-100	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
β -Nicotinamid-Adenin- Dinukleotid-Phosphat, reduziert (NADPH)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland

2.1.2 Puffer und Lösungen

Hank's Balanced Salt Solution (BSS)

Stammlösung A (in *Aqua bidest*)

D(+)-Glukose	10,00 g/l
Kaliumdihydrogenphosphat	0,60 g/l
Natriumhydrogenphosphat-dihydrat	2,38 g/l
Phenolrot	0,10 g/l

Stammlösung B (in *Aqua bidest*)

Calciumchlorid-dihydrat	1,86 g/l
Kaliumchlorid	4,00 g/l
Magnesiumchlorid-hexahydrat	2,00 g/l
Magnesiumsulfat-heptahydrat	2,00 g/l
Natriumchlorid	80,00 g/l

Aus beiden Stammlösungen wird konzentriertes BSS hergestellt, indem gleiche Teile der Stammlösung A und B miteinander vermischt werden. Die Lösung wird dann vor dem Gebrauch 1:5 mit *Aqua bidest* verdünnt und mit einem 0,2 μ m Vakuumfilter steril filtriert.

2-ME Stammlösung

50 mM Stammlösung wird in PBS angesetzt und verteilt auf 1 ml Cryoröhrchen bei -20 °C gelagert.

Baktoagar zum Ausplattieren von MD Kulturen

0,5 % Baktoagar wird in BSS aufgekocht, bis eine klare Lösung entsteht. Anschließend werden 450 µg/ml DEAE Dextran Hydrochlorid aus der Stammlösung zugegeben.

DEAE Dextran Stammlösung

Es wird eine 30 mg/ml Stammlösung verwendet. Für 25 ml DEAE Dextran Lösung werden 750 mg DEAE Dextran in 25 ml BSS gelöst und der pH Wert auf 7,2 eingestellt. Die Lösung wird im Kühlschrank gelagert.

Lysepuffer für Resazurintest

0,05 M KPO₄ Puffer mit 30 % Triton X-100.

Für den Ansatz werden je 1 M Lösungen von KH₂PO₄ und K₂HPO₄ hergestellt. Anschließend werden 802 µl von 1 M K₂HPO₄ mit 198 µl von 1 M KH₂PO₄ gemischt, auf 14 ml mit *Aqua bidest* aufgefüllt und mit 6 ml Triton X-100 versetzt. Der Lysepuffer wird im Kühlschrank gelagert.

Färbepuffer für FACS-Analysen

PBS versetzt mit 0,02 % Natriumazid.

Chromiumchlorid Stammlösung

Nach Gronowicz *et al.* (1976): 1,34 g CrCl₃ auf 100 ml Saline.

Vor dem Gebrauch wird die Stammlösung 1:200 mit Saline verdünnt.

Nach Goding (1976): 1 % CrCl₃ Lösung in Saline, pH 5.

Vor dem Gebrauch wird die Stammlösung 1:100 mit Saline verdünnt.

Beide Lösungen werden lichtgeschützt bei RT aufbewahrt und können nach einer Reifezeit von vier Wochen eingesetzt werden.

2.2 Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Biotin Maus Anti-Ratte CD25 Klon OX-39	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Biotin Maus Anti-Ratte RT1b (I-a) Klon OX-6	BioLegend, San Diego, USA
FITC Kaninchen Anti-Ovalbumin polyklonal	Abcam, Cambridge, UK
FITC Maus Anti-Ratte CD25 Klon OX-39	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FITC Maus Anti-Ratte CD45RC Klon OX-22	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FITC Maus Anti-Ratte RT1B (I-a) Klon OX-6	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
IO Test® Maus Anti-Ratte CD3-FITC/ CD4-PC7/ CD8-APC	Immunotech SAS, Beckman Coulter, Marseille, Frankreich
Kaninchen Anti-Ratte IgG polyklonal, AP164	Merck Millipore, Merck, Darmstadt, Deutschland
MicroBeads Maus Anti-Ratte CD4 Klon OX-38	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MicroBeads Maus Anti-Ratte CD45RA Klon OX-33	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MicroBeads Maus Anti-Ratte T Zell Klon OX-52	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
PE Maus Anti-Ratte CD4 Klon OX-35	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
PE Maus Anti-Ratte CD45RA Klon OX-33	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
PE-Cy™5 Maus Anti-Ratte CD4 Klon OX-35	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
PE-Cy™5 Maus Anti-Ratte CD45 RA Klon OX-33	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
PE-Cy™7 Streptavidin	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

2.3 Kits und Microarrays

Produkt	Herkunft
<i>In Vitro</i> Toxicology Assay Kit, Resazurin based	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
GeneChip® 3'IVT Express Kit	Affymetrix, Santa Clara, USA
GeneChip® 3'IVT Hybridisation Wash and Stain Kit	Affymetrix, Santa Clara, USA
GeneChip® 3'IVT Microarray Rat Expression, Array 230_2.0	Affymetrix, Santa Clara, USA
Human Cytokine 11plex Custom Kit (IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , TNF- α , TNF- β)	Flow Cytomix™, eBioscience, Bender MedSystems, Wien, Österreich
Human FlowCytomix™ Basic Kit	Flow Cytomix, eBioscience, Bender MedSystems, Wien,

QIAshredder	Österreich
Rat Cytokine 6plex Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
	FlowCytomix™, eBioscience, Bender MedSystems, Wien, Österreich
RNA 6000 Nano Chips	Stratagene, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
RNA 6000 Nano Reagents & Supplies	Stratagene, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
RNase free DNase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Universal Rat Reference RNA	Stratagene, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland

2.4 Verbrauchsmaterialien

2.4.1 Glasware

Objekt	Bezugsquelle
Bechergläser 25 ml, 50 ml, 600 ml	Schott, Mainz, Deutschland
Erlenmeyerkolben 200 ml	Schott, Mainz, Deutschland
Glaskolben 1 l, 2 l, 100 ml	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Pasteurpipetten mit Watte gestopft	Hilgenberg, Malsfeld, Deutschland
Objektträger	Menzel, Braunschweig, Deutschland

2.4.2 Kunststoffware

Objekt	Bezugsquelle
24-Well-Platten, steril	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
96-Well-Platten (flat-bottom, flexible)	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
Combitips steril und nicht steril 1 ml, 2,5 ml, 5 ml, 10 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Cryoröhrchen, 1 ml	Nunc, Roskilde, Dänemark
Durchflußzytometrie-Röhrchen 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Filtereinheit 0,2 µm Minisart	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Filtersystem 500 ml, 0,2 µm	Corning B.V., Schiphol-Rijk, Niederlande
Leucosep® Röhrchen 15 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Monovette® mit Li-Heparin	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Petrischalen, 94 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml Schraubkappengefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Schraubverschlußröhrchen 15 ml, 50 ml Spritze, 1 ml, steril Spritze, 5 ml, steril Stripetten® steril 5 ml, 10 ml, 25 ml	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland Codan Medical ApS, Rødby, Dänemark B. Braun, Melsungen, Deutschland Corning B.V., Schiphol-Rijk, Nieder- lande
Transfer-Pipetten, steril und unsteril	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.4.3 Sonstiges

Produkt	Bezugsquelle
Atemschutzmaske, FFP3	3M, Neuss, Deutschland
Einweghandschuhe, Aloe Vera Nitril	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Kanülen für Monovetten, 20G	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Kanülen, Neolus, steril, 20G und 26G	Terumo Europe N.V., Leuven, Belgien
Kunststoffkisten mit Objektträgerauflage und Deckel	interne Herstellung
Sterilcontainer für Autoklav, Steriset	Wagner, München, Deutschland
Neubauerzählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
Nivelliertisch	neoLab Migge, Heidelberg, Deutschland
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Neenah, USA
Präparierbesteck	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Stahlsiebe, grobmaschig	interne Herstellung

2.5 Laborgeräte

Gerät	Herkunft
Autoklav Automacs 275, Model 003	Getinge, Getinge, Schweden Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Brutschrank BBD 6220	Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Lan- genseibold, Deutschland
Eismaschine FACSCanto II	Ziegler, Isernhagen, Deutschland BD Biosciences, Heidelberg, Deutsch- land
Fluoreszenzmikroskop BZ-8000	Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland
Fluorometer SPECTRAFluor Plus	Tecan, Crailsheim, Deutschland
GeneChip® Scanner 3000	Affymetrix, Santa Clara, USA
Hybridisierungsofen, GeneChip® Hy- bridization oven 640	Affymetrix, Santa Clara, USA
Konzentrator 5301	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Leuchtplatte prolite basic 2	KFB, Buchen, Deutschland
Magnetrührer IKA Combimag Ret	IKA®-Labortechnik, Staufen, Deutsch- land

Magnetstand 96	Ambion, Austin, USA
Mikroskop Axioskop	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Mikroskop ID03	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Mikrowelle	Bosch, München, Deutschland
Multipette®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Nanodrop 1000	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
pH-Meter, 766 Calimatic	Knick, Berlin, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Plattenschüttler TPM-2	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reinstwassersystem MilliQ	Biocel, Merck Millipore, Merck, Darmstadt, Deutschland
Sterilbank, RF600GS	Beck+Thies, Langenfeld, Deutschland
Sterilbank	Clean Air, Woerden, Niederlande
Sterilisator T6060	Heraeus, Hanau, Deutschland
Thermocycler PTC-200	MJ Research, Biozym Scientific, Hess. Oldendorf, Deutschland
Thermomixer comfort (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultraschallbad Transsonic TP 690	Elma, Singen, Deutschland
Vacuboy mit Waschflasche	Inotech, Doltikon, Schweiz
Vortex REAX 2000	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Vortex REAX top	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Waage AE 200 (Analysenwaage)	Mettler, Giessen, Deutschland
Waage PM 200 (Oberschalenwaage)	Mettler, Giessen, Deutschland
Wärmebad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Wärmeschrank Hereaus Kelvitron®	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland
Waschstation, GeneChip® Fluidic Station 400	Affymetrix, Santa Clara, USA
Zentrifuge 4K15	Sigma Laborzentrifugen, Osterode, Deutschland
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland
Zentrifuge Multifuge 4KR	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland

2.6 Software

Software	Bezugsquelle
Agilent 2100 Bioanalyzer Software	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Analyst 2.2.9, Genedata solutions <i>in silico</i>	Genedata, Basel, Schweiz
Command Console® 3.0.1, AGCC Software	Affymetrix, Santa Clara, USA
Database 6.1	Genedata, Basel, Schweiz

FACSDiva™ Software	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FlowCytomix™ Pro 2.4	eBioscience, San Diego, USA
Keyence Software für Mikroskopie	Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland
Magellan v2.2x	TECAN Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
Microsoft Office Excel 2010	Microsoft Corporation, Redmont, USA
Microsoft Office PowerPoint 2010	Microsoft Corporation, Redmont, USA
Microsoft Office Word 2010	Microsoft Corporation, Redmont, USA
Prism 5, Version 5.04	GraphPad Software, La Jolla, USA
Refiner Array 6.1	Genedata, Basel, Schweiz

2.7 Methoden

2.7.1 *In vivo* Experimente

Männliche Wistarratten wurden im Rahmen von zwei vier Wochen Studien durch tägliche orale Gabe der Testsubstanzen Benzo(a)pyren oder Azathioprin *in vivo* behandelt. B(a)p wurde in Sesamöl gelöst und in Konzentrationen von 0, 37,5, 75 und 150 mg/kg Körpergewicht verabreicht. Aza wurde in 1 % Methylcellulose in Wasser in Konzentrationen von 0, 5, 10 und 20 mg/kg eingesetzt. Jede Dosisgruppe umfasste acht Versuchstiere. An jeweils drei Zeitpunkten wurde den Tieren retrobulbär je 1 ml Blut entnommen. Das Blut von je vier gleichbehandelten Ratten wurde gepoolt und isolierte PBMC wurden für den MD Test eingesetzt. Für den PFCA wurden die Tiere fünf Tage vor Versuchsende mit $1 \cdot 10^8$ SRBC in 100 μ l BSS i.v. immunisiert.

Im Kurzzeitprotokoll wurden weibliche Wistarratten in Gruppen von je vier Tieren durch einmalige i.p. Gabe von 0 oder 80 mg/kg Cyclophosphamid in BSS behandelt. Die Ratten wurden am folgenden Tag wie oben beschrieben mit SRBC immunisiert. Vier Tage später wurden aus den getöteten Tieren die Milz für den PFCA und MD Test sowie das Blut für den MD Test entnommen.

Für die Immunisierung von Wistarratten mit Ovalbumin, wurde je einem Weibchen 0, 10 oder 40 μ g OVA in 100 μ l PBS verabreicht. Dabei erfolgte die Applikation an Tag null intraperitoneal. An den Tagen drei und vier wurde die Lösung i.v. gespritzt. An Tag sieben wurde durch Anritzen der Schwanzvene Blut entnommen. Das daraus isolierte Serum wurde für den Spotttest eingesetzt.

2.7.2 *Ex vivo* PFCA

Die Durchführung eines PFCA erfordert die *in vivo* Immunisierung von Testsubstanz-behandelten Ratten fünf Tage vor der Sektion. Dazu werden die Tiere mit $1 \cdot 10^8$ SRBC in BSS durch intravenöse Injektion von 100 μ l Lösung in die Schwanzvene immunisiert. Am Tag der Sektion wird den durch CO₂-Begasung getöteten Tieren die Milz entnommen, gewogen und getrennt weiterbehandelt. Durch mechanische Disaggregation durch ein Stahlsieb wird aus dem Organ eine Einzellzellsuspension hergestellt und die Zellen werden in BSS gewaschen. Nach Bestimmung der Zellzahl wird diese auf $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml in BSS eingestellt und bis zum Ausplattieren auf Eis belassen. Für den Plaquetest werden zu 500 μ l auf 42 °C vorgewärmter Agarose (0,5 % in BSS) 10 bzw. 100 μ l der Zellsuspension und 50 μ l einer zehnpromzentigen SRBC-Suspension in BSS zugegeben und vermischt. Die Suspension wird auf mit 0,1 % Agarose vorbeschichteten Objektträgern in Doppelbestimmungen ausplattiert, mit BSS überschichtet und in geschlossenen Kunststoffkisten bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Nach einstündiger Inkubation werden die Objektträger mit 10 % Komplement in BSS benetzt und eine weitere Stunde inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit und Ausbildung der IgM-Plaques werden nach Möglichkeit die Objektträger mit 100 μ l Zellsuspension ausgezählt. Bei zu hoher Plaquedichte werden die Objektträger mit 10 μ l Zellsuspension herangezogen, wobei der größere Verdünnungsfaktor für die Auswertung berücksichtigt wird. Für die Auswertung werden die Plaquezahlen pro $1 \cdot 10^7$ Milzzellen oder pro Milz mit Standardabweichung für jede Dosisgruppe bestimmt.

2.7.3 *Ex vivo* Spotttest

Die Durchführung des Spotttests erfordert die *in vivo* Immunisierung von Ratten mit Ovalbumin (2.7.1). Das aus der Schwanzvene erhaltene Blut wird zur Serumgewinnung geronnen und 10 min bei 4.000 rpm zentrifugiert. Das Serum wird auf mit einem SRBC-Agarose-Gemisch beschichteten Objektträger aufgetragen. Dabei werden zum einen zu Kontrollzwecken unbehandelte SRBC eingesetzt, zum anderen werden für die spezifische Reaktion Ovalbumin-gekoppelte SRBC benötigt. Die Kopplung von Ovalbumin an SRBC kann angelehnt an das Protokoll von Gronowicz *et al.* (1976) erfolgen, indem zu 500 μ l SRBC (pelletiert) 500 μ l einer 2 mg/ml Ovalbuminlösung in Saline pipettiert werden und die Mischung mit 5 ml der 1:200 verdünnten CrCl₃ Lösung vermischt wird. Nach Goding (1976) werden

500 µl SRBC (pelettiert) mit 500 µl einer 4 mg/ml Ovalbuminlösung vereint und mit 2,5 ml der 1:100 verdünnten CrCl₃ Lösung (pH 5) gemischt. Beide Gemische werden 15 min bei RT inkubiert und vor der Verwendung zweimal in PBS gewaschen. Das Ergebnis kann im FACS mit einem FITC-gekoppelten Ovalbumin-spezifischen Antikörper überprüft werden. SRBC-OVA können mind. eine Woche gebrauchsfertig im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Für den Spotttest werden mit Agarose benetzte Objektträger mit einem Gemisch aus 500 µl auf 42 °C vorgewärmter Agarose in BSS (0,5 %) und 50 µl einer 15 %igen SRBC Lösung in BSS beschichtet. Nach dem Erkalten der Agarose-schicht werden je 5 µl Serum in verschiedenen Verdünnungen nebeneinander auf die Objektträger aufgebracht und für 1,5 h im Wärmeschrank bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Objektträger mit 1:10 verdünntem Komplement überzogen und eine weitere Stunde inkubiert. Um die Lyse durch IgG Antikörper zusätzlich zu dokumentieren, werden die Objektträger mit einem sekundären polyklonalen anti-IgG Antikörper (1:50 in BSS) und anschließend mit Komplement jeweils eine Stunde überzogen. Die Ausprägung der lysierten Areale (durch IgM oder IgM und IgG) wird protokolliert.

2.7.4 MD Test mit Milzzellen

Nach dem Töten der Wistar ratte durch CO₂-Begasung wird die Milz entnommen und in kaltes BSS überführt. Das Organ wird in BSS durch ein Stahlsieb gedrückt, sodass eine Einzellzellsuspension entsteht. Die Milzzellen werden über einen Filter gegeben, 10 min bei 250 g und 4 °C zentrifugiert und in 10 ml Medium aufgenommen. Die Zellzahl wird bestimmt, sodass $7 \cdot 10^6$ Zellen pro Vertiefung einer 24-Well-Platte in 1 ml Medium ausgesät und im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert werden. Als Medium wird RPMI mit 5 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 1 x NEAA, 10 µM 2-ME und 100 µg/ml Primocin verwendet. Nach 24 h Inkubation werden die Zellen nach einer zehnmütigen Zentrifugation bei 250 g und 4 °C durch einen Mediumwechsel mit 1 ml RPMI Medium supplementiert wie an Tag null jedoch mit 125 µM 2-ME und 0,6 % SRBC stimuliert. Als 100 % SRBC ist das Pelett nach einem Waschschrift mit BSS bei 10 min Zentrifugation mit 1.000 g definiert. Nach einer weiteren eintägigen Inkubation der Platten erfolgt ein Mediumwechsel durch 2 ml RPMI, welches wie an Tag null supplementiert ist. Die Zellen werden anschließend weiter kultiviert. Nach

Ablauf der Inkubationszeit an Tag sieben, werden die Zellen aus jedem Well in separate Röhrchen überführt. Verbleibende Zellen werden durch 1 ml BSS nachgespült und mit der Zellsuspension vereint. Aus jedem Röhrchen werden für den Viabilitätstest je 150 µl in zwei Vertiefungen einer 96-Well-Platte nebeneinander überführt und bis zur weiteren Behandlung am selben Tag im Brutschrank aufbewahrt. Die restlichen Zellen werden zweimal mit BSS gewaschen, wobei die Zentrifugationsschritte wie oben beschrieben ausgeführt werden, in 900 µl BSS resuspendiert und verbleiben anschließend bis zum Ausplattieren auf Eis. Für den Plaquetest werden zu 600 µl auf 42 °C vorgewärmten Bactoagar 100 µl der Zellsuspension, 50 µl einer fünfzehnprozentigen SRBC-Suspension in BSS und 50 µl Meerschweinchenkomplement (gefriergetrocknetes Komplement wird vorher mit 5 ml eiskaltem *Aqua bidest* resuspendiert) zugegeben. Die Suspension wird gevortext und auf 10 cm Petrischalen mit einer gebogenen Pasteurpipette in Doppelbestimmungen ausplattiert. Die Petrischalen werden in geschlossenen Kunststoffkisten mit etwas Wasser bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Nach dreistündiger Inkubation werden die Plaques ausgezählt. Für die Auswertung werden die Mittelwerte mit Standardabweichung von gleichbehandelten Proben der gezählten Plaques pro Petrischale herangezogen.

Milzzellen aus Lewisratten werden bei einer Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen pro ml Medium in 24-Well-Platten sieben Tage kultiviert. Das Protokoll entspricht im Wesentlichen dem MD Test mit Milzzellen von Wistarratten, mit dem Unterschied, dass die Stimulation der Zellen mit SRBC nach 21 h erfolgt, zwei zusätzliche Medienwechsel an Tag drei und Tag sechs durchgeführt, sowie die Zellen vor dem Ausplattieren in 700 µl BSS aufgenommen werden.

Für den Einsatz der MD Kultur als Immuntoxizitätstest, werden die zu testenden Substanzen über die gesamte Zellkulturdauer dem Medium beigemischt. Dabei werden hydrophobe Testkandidaten in DMSO gelöst und mit einer Endkonzentration von 0,1 % DMSO eingesetzt. Der Test wird üblicherweise in Triplikaten angesetzt und umfasst vehikelbehandelte Kontrollen sowie die Testsubstanz in gewählten Konzentrationen. Aus einer Rattenmilz können etwa 25 Wells angesetzt werden, sodass pro Tier acht Bedingungen getestet werden können.

2.7.5 MD Test mit PBMC

Für die Isolation von PBMC aus dem Blut von Nagern, wird das gewonnene und heparinisierte Blut mit gleichem Volumen BSS verdünnt, in 50 ml Leucosep-Röhrchen auf 15 ml Ficoll geschichtet und bei 800 g, 15 min ohne Bremse bei 19 °C zentrifugiert. Durch die Zentrifugation erfolgt die Zellauftrennung entlang des Zentrifugationsgradienten, sodass die milchige PBMC Schicht oberhalb des Filters isoliert werden kann. Die PBMC werden in BSS resuspendiert und dreimal gewaschen (je 10 min Zentrifugation bei 250 g, 4 °C). Nach dem letzten Waschschrift werden die Zellen in Medium resuspendiert und die Zellzahl wird bestimmt.

Die Kulturbedingungen für PBMC aus Wistarratten entsprechen denen der Milzzellen aus Wistarratten mit dem Unterschied, dass $5 \cdot 10^6$ Zellen pro Vertiefung einer 24-Well-Platte kultiviert werden. Zudem werden die Zellen an Tag sieben vor dem Ausplattieren in 400 µl BSS aufgenommen.

PBMC aus NMRI Mäusen werden in DMEM Medium mit 5 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 1 x NEAA, 250 µM 2-ME und 100 µg/ml Primocin verwendet. Die Zellen werden bereits nach 2 h mit DMEM mit 5 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 1 x NEAA, 100 µg/ml Primocin, 375 µM 2-ME und 0,6 % SRBC stimuliert. Ohne weitere Medienwechsel werden die Zellen im Brutschrank inkubiert. Die Auswertung erfolgt an Tag fünf unter gleichen Bedingungen wie für PBMC aus Wistarratten.

Humane PBMC werden aus *buffy coats* isoliert indem die Zellsuspension im gleichen Volumen BSS verdünnt und auf 50 ml Leucosep-Röhrchen mit 15 ml Ficoll verteilt wird. Die Zellseparation erfolgt bei 400 g, 20 °C in einem 40 min Zentrifugationsschritt ohne Bremse. Die PBMC Schicht wird abgenommen, im kalten RPMI Medium ohne Zusätze resuspendiert und zweimal gewaschen (200 g, 10 min, 4 °C). Zum Zählen werden die Zellen in RPMI mit 5 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 1 x NEAA, 100 µg/ml Primocin, 50 µM 2-ME und 50 ng/ml IFN- ω resuspendiert. Je $7 \cdot 10^6$ Zellen werden pro Vertiefung einer 24-Well-Platte ausgesät und im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Stimulation der Zellen erfolgt mit Medium gleicher Zusammensetzung mit 0,6 % SRBC nach 20 h. Ein Mediumwechsel zu je 2 ml Medium wird am darauffolgenden Tag durchgeführt, wobei die Zellkulturplatten immer bei 200 g, 10 min und 4 °C zentrifugiert werden. An Tag acht werden die Zellen wie

für Milzzellen beschrieben geerntet und vor dem Ausplattieren in 250 µl BSS resuspendiert.

PBMC aus Javaneraffen werden entsprechend dem Protokoll für Humanblut aus dem heparinisierten peripheren Blut gewonnen. Aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Zellmengen, werden die PBMC in 48-Well-Platten kultiviert, wobei $3,5 \cdot 10^6$ Zellen pro Vertiefung in 500 µl Medium inkubiert werden. Die Zellkultur erfolgt laut Protokoll für humane PBMC mit dem Unterschied, dass die Zellen an Tag neun geerntet werden.

2.7.6 Bestimmung der Zellzahl

Zur Ermittlung der Zellzahl wird ein Aliquot der resuspendierten Zellsuspension mit Trypanblau versetzt. Üblicherweise wird eine Verdünnung von 1:10 verwendet. Dadurch werden die toten Zellen angefärbt und die Zahl der lebenden Zellen kann in der Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung bestimmt werden. Es wird mindestens ein Großquadrat ausgewertet, wobei insgesamt mindestens 100 lebende Zellen gezählt werden. Die Zellkonzentration der Ausgangssuspension bei einer 1:10 Verdünnung mit Trypanblau entspricht der für ein Großquadrat ermittelten Zellzahl $\cdot 10^5$ Zellen pro ml.

2.7.7 Bestimmung der Viabilität

Die Viabilität der Zellen wird mit Hilfe von Resazurin, welches von metabolisch aktiven Zellen zu Resorufin umgesetzt wird, bestimmt. Für den Test werden aus allen Proben zwei Aliquots (z.B. zwei mal 100 µl aus 1 ml Zellsuspension) entnommen und auf eine 96-Well-Platte nebeneinander überführt. Es folgt eine kurze Zentrifugation von 2 min, wonach die Überstände verworfen und die Zellen in je 100 µl RPMI Medium ohne Phenolrot resuspendiert werden. Auf je ein Well von allen Proben werden 10 µl Lysepuffer pipettiert, und die Platte wird für 45 min in den Brutschrank gestellt. Danach werden auf alle lysierten und intakten Proben je 10 µl Resazurin pipettiert. Nach einer weiteren Inkubation von zwei bis drei Stunden, wird die Fluoreszenz bei 590 nm bei einer Anregungswellenlänge von 540 nm bestimmt. Die gemessene mittlere Fluoreszenz ist proportional zum umgesetzten Resazurin und damit zur Viabilität der Zellen. Für die Auswertung wird die Differenz von nicht lysierten zu lysierten Vertiefungen einer Probe bestimmt und als Mittelwert mit Standardabweichung für gleichbehandelte Proben angege-

ben. Häufig wird die Viabilität in Prozent angegeben. In diesem Fall werden die Kontrollproben, welche z.B. mit Vehikel behandelt wurden, als 100 % definiert, sodass die mit Testsubstanzen behandelten Proben darauf bezogen werden können.

2.7.8 Durchflusszytometrische Analysen von Zellen

Die durchflusszytometrische Analyse erfolgt nach vorhergehender Färbung der Zellen am FACSCanto II mit der Software FACS Diva. Dabei werden die Zellen im FSC/SSC hinsichtlich ihrer Lichtstreuungseigenschaften bezüglich Forwärtsstreuung (abhängig von der Zellgröße) und Seitwärtsstreuung (abhängig von der Granularität) aufgenommen. Im FSC/SSC erfolgt die Eingrenzung der je nach Fragestellung gewünschten Zellpopulation, z.B. Lymphozyten, Leukozyten oder Erythrozyten. Durch zusätzliche Einstellung eines Schwellenwertes werden unerwünschte Partikel, wie Zelltrümmer, Verunreinigungen oder Erythrozyten von der Aufnahme ausgeschlossen. Abhängig von verwendetem Fluoreszenzfarbstoff, werden die Zellen mit einem Argon-/Heliumlaser angeregt und die detektierten Signale in Zyto- oder Histogrammen ausgewertet. Für die Quantifizierung der Signale wird der prozentuale Anteil der jeweils, z.B. durch die Position in einem festgelegten Quadranten, fokussierten Zellen herangezogen. Alternativ kann die mittlere gemessene Fluoreszenzintensität dargestellt werden. Die Ergebnisse beruhen auf 10.000 aufgenommenen Zellen.

Zellpopulationsanalyse durch Oberflächenmarker

Die Phänotypisierung von Zellen erfolgt durch das direkte Markieren der Oberflächenmarker mit fluoreszenzfarbstoffgekoppelten zum überwiegenden Teil monoklonalen Antikörpern. Alternativ werden die Zellen indirekt mit einem biotinkoppelten monoklonalen Antikörper markiert und in einem zweiten Inkubationsschritt mit einem streptavidin gekoppelten Zweitantikörper gefärbt. Die verwendeten Antikörper sind im Abschnitt 2.2 zusammengefasst.

Vor der Färbung werden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt ($0,2-2 \cdot 10^6$ Zellen/Röhrchen) und mit 2 ml Färbepuffer gewaschen (10 min Zentrifugation bei 250 g, 4 °C). Nach Entfernen des Überstandes wird das Pellet in verdünnter und in Vorversuchen austitrierter Antikörperlösung (100 µl) resuspendiert und bei Direktfärbungen 15 min im Kühlschrank inkubiert. Die gebrauchsfertige Antikörperlösung

(IO Test) wird ohne Verdünnung (je 25 µl) direkt auf die Zellpellets gegeben. Bei indirekten Färbungen werden die Zellen 30 min bei RT mit dem Primärantikörper (500 µl) markiert, nach Ablauf der Inkubationszeit zweimal gewaschen und 15 min im Kühlschrank mit dem Sekundärantikörper (100 µl) gefärbt. Wenn Erythrozyten lysiert werden sollen, wird im Anschluss an die Färbung 1 ml VersaLyse Lysepuffer pro Röhrchen verteilt und für weitere 10 min abgedunkelt bei RT inkubiert. Vor der Aufnahme im FACS werden die Proben zweimal gewaschen und in 400-800 µl FACSflow aufgenommen.

Antikörper	Verdünnung in Färbepuffer
Biotin-CD25	1:500
Biotin-RT1b (I-a)	1:10.000
FITC-Ovalbumin	1:400
FITC-CD25	1:200
FITC-CD45RC	1:200
FITC-RT1B (I-a)	1:1.000
PE-CD4	1:200
PE-CD45RA	1:200
PE-Cy TM 5-CD4	1:200
PE-Cy TM 5-CD45 RA	1:1.500
PE-Cy TM 7 Streptavidin	1:1.500

Bestimmung von intrazellulären ROS und GSH

Die Quantifizierung von intrazellulären ROS wird durch Markierung mit 1 µM H₂DCFDA vorgenommen. GSH kann durch die Zugabe von 0,05 µM CMFDA bestimmt werden. Vor der Färbung werden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und zweimal mit PBS gewaschen (5 min Zentrifugation bei 250 g, 4 °C). Nach Entfernen des Überstandes wird das Pellet in 500 µl der Färbelösung resuspendiert und 30 min bei RT inkubiert. Der Färbeschritt kann parallel zum ersten Inkubationsschritt mit dem Primärantikörper zur Zellpopulationsanalyse durchgeführt werden. Die Aufnahme im FACS zur Detektion der mittleren Fluoreszenz erfolgt dann nach dem Färben mit dem Sekundärantikörper und dem anschließenden Waschen. Alternativ werden die Zellen zur GSH-Detektion mit 10 mM SNARF-1 inkubiert. SNARF-1 kann im Gegensatz zu den beiden anderen Agenzien nicht mit spezifischen Antikörpern kombiniert werden und die SNARF-1 behandelten Zellen müssen vor der FACS-Messung in FACSflow mit pH 6 aufgenommen werden.

Zytokinbestimmung

Sezernierte Zytokine werden mit dem Rat Cytokine 6plex Kit detektiert. Als Probenmaterial wird der bei -80 °C gelagerte Überstand von MD Kulturen mit Zellen von Wistarratten eingesetzt. Der Überstand wird im Kühlschrank aufgetaut und unverdünnt eingesetzt. Die Versuchsdurchführung, Aufnahme und Auswertung erfolgt ohne Änderungen gemäß dem Herstellerprotokoll.

2.7.9 Magnetische Zellseparation

Zellen werden nach dem Herstellerprotokoll mit den Oberflächenmarker-spezifischen MicroBeads markiert und im autoMACS separiert. Es werden je nach Anwendung die Programme „*deplete*“, „*possel*“ oder „*possel'd*“ ausgewählt. Der Separationserfolg wird durch das Anfärben eines Aliquots mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern durchflusszytometrisch überprüft.

2.7.10 Genexpressionsanalysen

Für Genexpressionsanalysen werden durch magnetische Separation aufgereinigte Zellpopulationen eingesetzt, deren Reinheit im FACS überprüft wird. Für die Isolation der CD4-positiven Fraktion wird das autoMACS Programm „*possel'd*“, und für CD45RA-positive Zellen das Programm „*possel*“ verwendet. Die Zellpopulationen werden bis zur Aufarbeitung bei -80 °C aufbewahrt. Für die RNA Isolation wird das *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) verwendet und das Herstellerprotokoll befolgt. Der Zellaufschluss erfolgt mit dem im Kit enthaltenem RLT Puffer mit 1 % 2-ME über einer *QIAshredder* Säule. Zusätzlich wird ein DNase-Verdau mit dem *RNase-Free DNase Set* (Qiagen) durchgeführt. Die isolierte Menge und Reinheit der RNA wird am *Nanodrop* quantifiziert. Anschließend wird die Qualität mit dem *RNA 6000 Nano Kit* am *Bioanalyzer* (Agilent) kontrolliert. Die weiteren Schritte erfolgen mit dem *GeneChip 3'IVT Express Labeling Assay* (Affymetrix) laut Protokoll. RNA (500 ng) von guter Qualität wird in cDNA umgeschrieben (2 h, 42 °C), durch *in vitro* Transkription in aRNA überführt, amplifiziert (1 h bei 16 °C; 10 min bei 65 °C) und mit Biotin markiert (4 h, 40 °C). Nach der Aufreinigung mit RNA-bindenden Beads über einem Magnet-Stand wird die aRNA fragmentiert (35 min, 94 °C), einer Qualitätsprüfung am *Bioanalyzer 2100* unterzogen und mit dem *Rat Genome 230 2.0 Array* (Affymetrix) hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgt mit 12,5 µg fragmentierter aRNA je Probe nach Herstellerprotokoll mit dem *GeneChip Hybridization, Wash and Stain Kit* (Affymetrix) im Hybridisierungs-ofen für 16 h bei 45 °C. Nach Hybridi-

sierung der Mikroarrays werden diese nach Protokoll gewaschen und mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin inkubiert (GeneChip Fluidics Station 450 nach dem Protokoll „Prime_450“). Die Fluoreszenzsignale, welche proportional zur Ausgangsmenge einer bestimmten mRNA in einer Probe sind, werden am *GeneChip Scanner 3000* mit dem Argonlaser detektiert. Die so erhaltenen Rohdaten werden mit der AGCC Software in CEL-Dateien überführt, welche nach einer Qualitätsprüfung statistisch ausgewertet werden. In einer Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*, PCA) werden die absoluten Daten der Expression in einer dreidimensionalen Matrix dargestellt. Die PCA verschafft einen Überblick über die erhaltenen Daten, da die räumliche Nähe der Datenpunkte zueinander eine Aussage über die Ähnlichkeit der Datensätze ermöglicht. Für die statistische Auswertung der Genexpressionsänderung in Abhängigkeit von der Zeit werden die absoluten Daten einer Bedingung mit dem Students t-Test für unpaarige Proben (Tag null vs. Tag drei; Tag null vs. Tag sechs; Tag drei vs. Tag sechs) analysiert und statistisch signifikant unterschiedliche Werte ($p < 5 \cdot 10^{-5}$) ermittelt. Anschließend werden die absoluten Daten einer Bedingung mit dem *N-Way ANOVA* analysiert um statistisch signifikant unterschiedliche Werte mit einem BHQ Wert $< 0,00125$ zu erhalten. Die mit dem t-Test und ANOVA ermittelten Gene werden in einer gemeinsamen Gengruppe zusammengefasst und die Gruppe auf Gene mit mindestens zweifach unterschiedlicher Expression reduziert, die dann funktionell analysiert werden. Für die graphische Darstellung der Expressionsdaten werden die absoluten Werte für Tag drei und Tag sechs auf Tag null normiert und nach einer Clusteranalyse (euklidische Entfernung mit kompletter Verknüpfung) in einer Heatmap verbildlicht. Für die statistische Auswertung der Genexpressionsänderung von CD4-positiven Zellen in Abhängigkeit von der Bedingung (+/- 2-ME) werden die signifikant unterschiedlichen Werte (*Students t-Test* für unpaarige Proben, $p < 0,0015$) der absoluten Daten an Tag sechs ermittelt. Mindestens zweifach deregulierte Gene werden funktionell charakterisiert.

3. Ergebnisse

Der Ergebnissteil gliedert sich in vier Abschnitte. Der erste Teil widmet sich der Etablierung des Testsystems, der humoralen *in vitro* Immunreaktion gegen Ham-melerythrozyten mit Primärzellen verschiedener Herkunft. Im zweiten Teil wird die Eignung dieses *in vitro* Testsystems für immuntoxikologische Risikobewertung von Substanzen untersucht. Dazu werden zuerst bekannte immunsuppressive Chemikalien und Kontrollsubstanzen im Test geprüft und die Vorhersagbarkeit des Systems ermittelt. Anschließend wird der Test für die Bewertung von Proteinen modifiziert und evaluiert. Im dritten Abschnitt wird das System als *in vitro* Modell für die humorale Immunreaktion betrachtet und charakterisiert. Schließlich wird es zur näheren Analyse der oxidativen Regulation während der humoralen Immunreaktion eingesetzt, wobei unter anderem der Einsatz von Genexpressionsanalysen erfolgt.

3.1 Etablierung der *in vitro* Immunreaktion gegen SRBC

Für die Ausbildung einer detektierbaren humoralen *in vitro* Immunreaktion ist es notwendig, die Versuchsbedingungen an das jeweilige System anzupassen. Die ursprünglich veröffentlichte Vorgehensweise für die Generierung einer humoralen *in vitro* Immunreaktion von Mishell und Dutton wurde für Milzzellen von diversen Mäusestämmen (BL6, DBA, BDF₁, CAF₁) beschrieben.

Tab. 1 Testbedingungen nach Mishell und Dutton, 1966

Spezies	diverse Mausstämme
Zellherkunft	Milzzellen
Zellzahl	2*10 ⁷
Medium	Eagle's Medium supplementiert mit 10 % FCS, Na-Pyruvat, NEAA
Stimulation	Sofort mit 1-2*10 ⁵ SRBC oder HRBC
Kulturbedingungen	in 35 mm Zellkulturschalen, auf einem Schüttler, tägliche Zugabe von FCS
Kulturdauer	4 Tage

Dieses Prinzip wurde in unserem Labor etabliert und an die vorhandenen Gegebenheiten, wie z.B. den bei uns verwendeten Mäusestamm NMRI, angepasst.

Tab. 2 Angepasste Testbedingungen an NMRI Mausmilzzellen nach Köper und Vohr, 2009

Spezies	NMRI Maus
Zellherkunft	Milzzellen

Zellzahl	1*10 ⁷
Medium	DMEM 5 % FCS mit NEAA, Na-Pyruvat, L-Glutamin, 1 µM 2-ME
Stimulation	Sofort mit 0,05 % SRBC
Kulturbedingungen	in 24-Well-Platten, 1 ml Medium, tägliche Zugabe von FCS
Kulturdauer	5 Tage

Wie Tab. 2 zeigt, wurden in unserem Labor einige Bedingungen im Vergleich zu dem ursprünglich publizierten Protokoll geändert. So wurden weniger Zellen in weniger Medium über einen längeren Zeitraum ohne Schüttler kultiviert. Es wurde ein anderes Medium verwendet und eine etwas andere SRBC Menge (umgerechnet ca. 1,5 Millionen SRBC pro Vertiefung) zur Stimulation eingesetzt.

Sowohl das angepasste Laborprotokoll als auch das ursprünglich veröffentlichte Protokoll ließen sich allerdings nicht für Experimente mit Milzzellen aus Ratten, dem wichtigsten Versuchstier für toxikologische Untersuchungen, übertragen. Somit wurde im ersten Schritt dieser Dissertation versucht, die Kulturbedingungen an diese Spezies anzupassen.

3.1.1 Etablierung der Kulturbedingungen für Milzzellen von Ratten

Um eine erfolgreiche *in vitro* Immunantwort gegen SRBC mit Milzzellen von Ratten zu erreichen, wurden die einzelnen Kulturparameter solange variiert, bis eine anti-SRBC Antikörperproduktion detektiert werden konnte. Diese initialen Bedingungen wurden schrittweise verändert und eine positive Tendenz soweit weiterverfolgt, bis die detektierte Antikörperproduktion zufriedenstellend und gut reproduzierbar war. Tab. 3 listet die Parameter auf, die im Laufe der Etablierung variiert wurden, um eine stabil detektierbare Immunantwort zu generieren.

Tab. 3 In dieser Dissertation ausgetestete Kulturbedingungen

Testkomponente	Parameter
Zellkulturgefäß	Flaschen, diverse Zellkulturplatten
Medium	DMEM, RPMI, IMDM
FCS	verschiedene Lieferanten und Chargen
2-ME Supplement	verschiedene Konzentrationen und Zugabezeitpunkte
Zytokin Supplement	verschiedene Konzentrationen div. Zytokine an div. Zugabezeitpunkten
Zellisolation	verschiedene Spezies, unterschiedliche Isolationsprotokolle
Zellen	verschiedene Zellkonzentrationen
SRBC	verschiedene Konzentrationen und Stimulationszeitpunkte
Mediumwechsel	ohne MW mit täglicher FCS Zugabe; div. Zeitpunkte und MW Häufigkeit
Zellkultur	unterschiedliche Kulturdauer

Die humorale *in vitro* Immunreaktion ist in hohem Grade von den Kulturbedingungen abhängig. Abb. 7 zeigt die Änderung der Antikörperproduktion von Milzzellen der Wistar Ratte in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellzahl pro Vertiefung einer 24-Well-Platte. Zum einen sieht man Unterschiede beruhend auf der ausführenden Person, zum anderen sieht man, dass für die optimale Zelldichte nur ein enger Bereich existiert, in dem Antikörper produziert werden. Zehn Millionen eingesetzte Zellen pro Vertiefung führen zu einer schwachen Antikörperproduktion von im Schnitt etwa 400 Plaques pro Platte, welche durch Reduktion der Zelldichte um 30 % auf sieben Millionen Zellen pro Well zu einem 4,5-fachen Anstieg der Plaquezahl auf etwa 1.800 Plaques pro Platte führt. Zu beachten ist, dass diese Zellzahl bei beiden Experimentatoren zu einer im Durchschnitt vergleichbaren Antikörperproduktion führt. Weitere Reduktion der eingesetzten Zellzahl auf fünf Millionen Zellen pro Vertiefung bewirkt eine weitere Steigerung der gebildeten Plaques, allerdings auch größere Unterschiede zwischen den Experimentatoren. Aus anderen Versuchen wurde deutlich, dass eine zunehmende Reduktion der eingesetzten Zellzahl wiederum zu einer Reduktion der Plaquezahl führt, sodass bei unter zwei Millionen Zellen pro Vertiefung keine Immunantwort detektiert werden kann (Versuch nicht gezeigt).

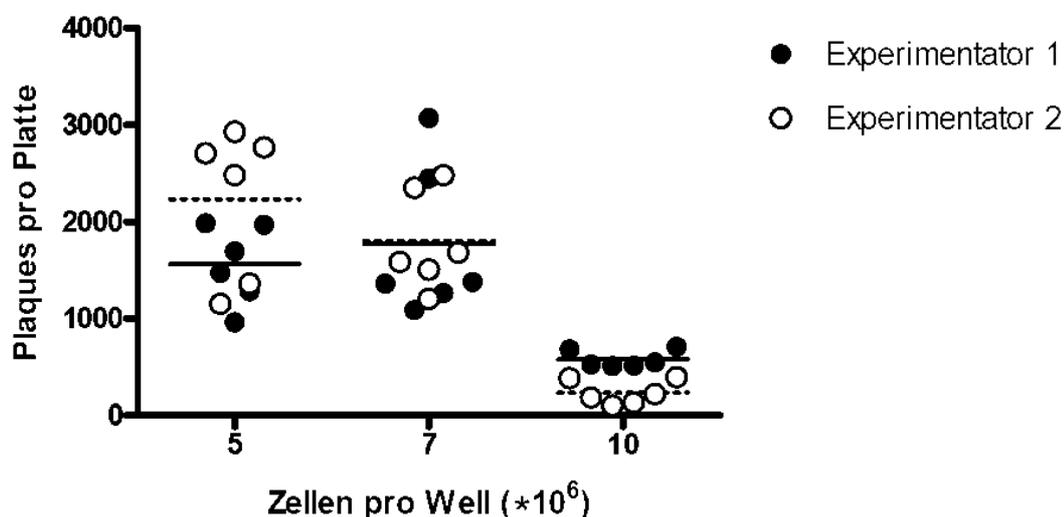


Abb. 7 Plaquezahlentwicklung in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellzahl

Milzzellen wurden aus einer weiblichen Wistar Ratte (9-10 Wochen alt) isoliert und in den angegebenen Zellkonzentrationen nach dem Standardprotokoll in Triplikaten inkubiert und mit SRBC stimuliert. Nach 7 Tagen erfolgte die Auswertung des Tests in Duplikaten durch Auszählung der Plaques pro Platte. Das Experiment wurde parallel von zwei Personen durchgeführt.

Weitere Faktoren, wie der Zeitpunkt des Mediumwechsels, sind entscheidend für die Antikörperproduktion *in vitro*. So führt eine Kultivierung der Rattenmilzzellen

Man sieht, dass die Antikörperproduktion von stimulierten Milzzellen aus Tier 1 zwischen Tag fünf (ca. 530 Plaques pro Platte) und Tag sieben (ca. 1.300 Plaques pro Platte) ansteigt. An Tag acht jedoch wieder auf 380 Plaques pro Platte absinkt. Zum Vergleich nimmt die Antikörperproduktion von stimulierten Milzzellen von Tier 2 innerhalb dieser Zeit stetig zu (Tag fünf: 450 gezählte Plaques, Tag acht: 2.500 Plaques pro Platte). Nichtstimulierte Zellen von beiden Tieren produzieren an allen Tagen unter 50 nachweisbare Plasmazellen pro Platte. Die Fähigkeit der Resazurinumwandlung der unstimulierten Zellen ist konstant höher, als die der stimulierten Zellen. Die Mittelwerte der gemessenen Fluoreszenz sind im Zeitraum zwischen Tag fünf und Tag sieben ähnlich. Dabei sind die Unterschiede zwischen den Milzen an Tag sechs sowohl bei stimulierten als auch den nicht stimulierten Zellen größer als an Tag sieben. An Tag acht ist eine Reduktion der Viabilität bei stimulierten Zellen zu messen.

Ausgehend von diesen und anderen durchgeführten Experimenten zur Ermittlung der optimalen Kulturbedingungen für die *in vitro* Immunreaktion von Rattenmilzzellen auf SRBC wurden die Parameter festgelegt. Tab. 4 fasst das etablierte Protokoll für Milzzellen aus Wistarratten sowie die besten Bedingungen für Kultur von Milzzellen aus Lewisratten zusammen.

Tab. 4 Optimale Kulturbedingungen für Milzzellen aus Lewis und Wistar Ratten

Spezies	Lewis Ratte	Wistar Ratte
Zellherkunft	Milzzellen	Milzzellen
Zellzahl	$1 \cdot 10^7$	$7 \cdot 10^6$
Medium	RPMI 5 % FCS mit NEAA, Na-Pyruvat, L-Glutamin, 10 μ M 2-ME, Primocin	RPMI 5 % FCS mit NEAA, Na-Pyruvat, L-Glutamin, 10 μ M 2-ME, Primocin
Stimulation	an T1 mit 0,6 % SRBC in Medium mit 135 μ M 2-ME	an T1 mit 0,6 % SRBC in Medium mit 135 μ M 2-ME
Bedingungen	1 ml Medium in 24-Well-Platten	1 ml Medium in 24-Well-Platten
Mediumwechsel	Je 1 ml an T2, T3, T6	2 ml an T2
Kulturdauer	7 Tage	7 Tage

Dargestellt sind die ermittelten optimalen Bedingungen für Milzzellen aus Ratten des Stammes Wistar und Lewis, die auch als Standardbedingungen bezeichnet werden. Für die Versuche wurden weibliche Tiere im Alter zwischen 9 und 12 Wochen eingesetzt. Verwendete Abkürzungen: FCS: fötales Kälberserum, NEAA: nichtessentielle Aminosäuren, 2-ME: β -Mercaptoethanol, Tx: Tag x, SRBC: Schafsferythrozyten.

3.1.2 Etablierung der Kulturbedingungen für Blutzellen aus Nagern

Die für Milzzellen von Mäusen und Ratten gefundenen Bedingungen ließen sich nicht ohne weiteres auf Blutzellen derselben Spezies übertragen, sodass die einzelnen Parameter für diese Zellquelle wiederum optimiert werden mussten.

Insgesamt sind die jeweiligen Bedingungen hochgradig an die eingesetzten Primärzellen angepasst. So ist z.B. die Integrierung von mindestens einem Mediumwechsel für Milzzellen aus Ratten notwendig, aber für PBMC aus NMRI Mäusen nachteilig. Auch zeigt sich, dass die Zugabe von bestimmten Zusätzen zur Steigerung der Plasmazellentwicklung beiträgt. So sorgen höhere 2-ME-Konzentrationen von 250 μM (bzw. 375 μM nach Stimulation) für eine höhere Viabilität im Vergleich zu niedrigeren 2-ME-Konzentrationen (10 μM , bzw. 135 μM nach Stimulation) und in Verbindung mit einer frühen Stimulation nach 2 h ohne zusätzlichen Mediumwechsel auch zu einer sehr guten Immunantwort.

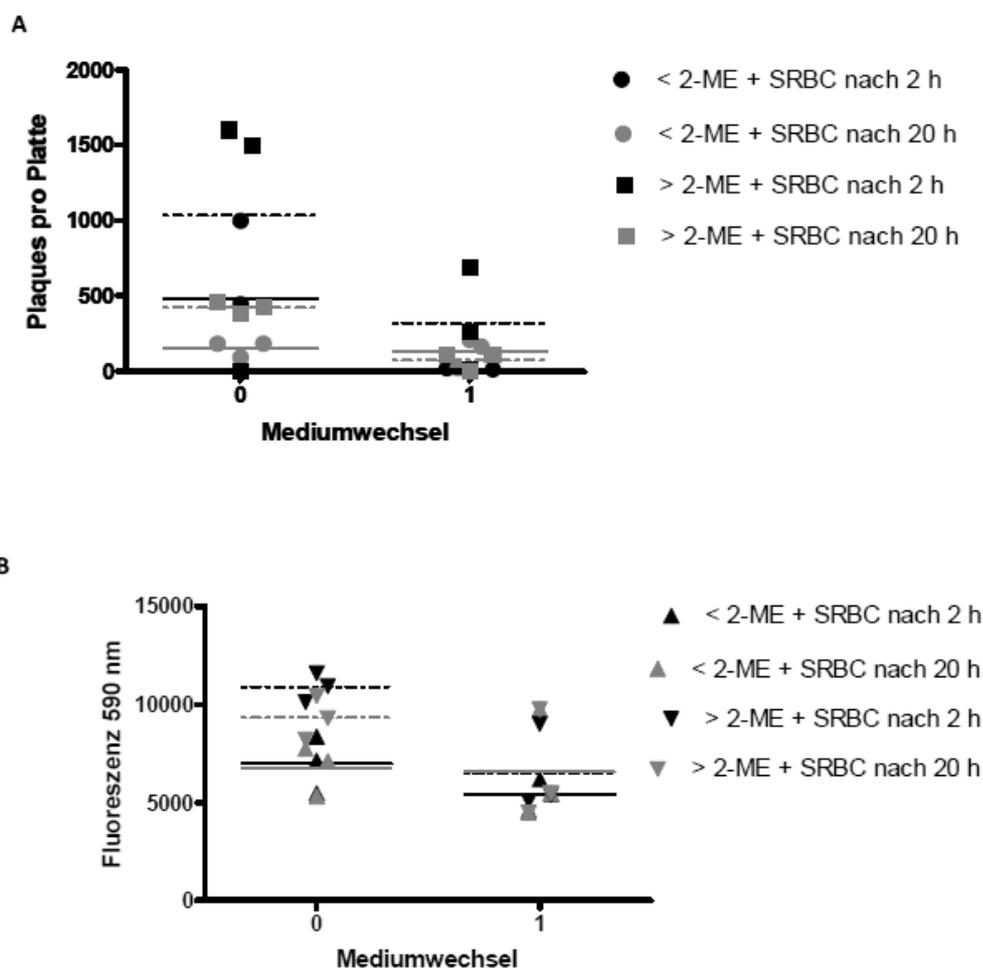


Abb. 10 Plaquezahlen und Viabilität in Abhängigkeit von Mediumwechsel, Stimulationszeitpunkt und 2-ME Konzentration

PBMC wurden aus dem Blut von 3 Monate alten männlichen NMRI Mäusen isoliert und nach 2 oder 20 Stunden in Kultur mit SRBC stimuliert. Gleichzeitig wurden zwei β -Mercaptoethanolkonzentrationen von 10 μM (< 2-ME) und 250 μM (> 2-ME) variiert. Nach 5 Tagen Inkubation in Duplikaten mit Mediumwechsel an Tag 1 oder ohne Mediumwechsel erfolgte die Auswertung des Tests in Duplikaten durch Auszählung der Plaques pro Platte (A) und durch Bestimmung der Viabilität mit dem Resazurintest (B).

Auch die Wahl des Mediums und das verwendete FCS sind entscheidend für eine detektierbare Immunreaktion (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund der hier dokumentierten und anderen Versuchen wurden die in dieser Arbeit verwendeten Protokolle aufgestellt, welche in Tab. 5 zusammengefasst werden.

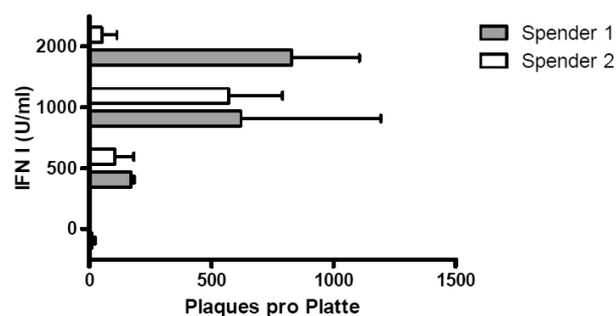
Tab. 5 Optimale Kulturbedingungen für PBMC aus Wistar Ratten und NMRI Mäusen

Spezies	Wistar Ratte	NMRI Maus
Zellherkunft	PBMC	PBMC
Zellzahl	$5 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6$
Medium	RPMI 5 % FCS mit NEAA, Na-Pyruvat, L-Glutamin, 10 μ M 2-ME, Primocin	DMEM 5 % FCS mit NEAA, Na-Pyruvat, L-Glutamin, 250 μ M 2-ME, Primocin
Stimulation	an T1 mit 0,6 % SRBC und Medium mit 135 μ M 2-ME	an T0 nach 2 h mit 0,6 % SRBC und Medium mit 375 μ M 2-ME
Bedingungen	in 24-Well-Platten, 1 ml Medium	in 24-Well-Platten, 1 ml Medium
Mediumwechsel	2 ml an T2	kein MW
Kulturdauer	7 Tage	5 Tage

Dargestellt sind die ermittelten optimalen Bedingungen für isolierte PBMC aus Ratten des Stammes Wistar und aus NMRI Mäusen, die auch als Standardbedingungen bezeichnet werden. Für die Versuche wurden weibliche Ratten sowie männliche Mäuse beide im Alter zwischen 2-3 Monaten eingesetzt. Verwendete Abkürzungen: FCS: fötales Kälberserum, NEAA: nichtessentielle Aminosäuren, 2-ME: β -Mercaptoethanol, Tx: Tag x, SRBC: Schafserythrozyten.

3.1.3 Etablierung der Kulturbedingungen für Blutzellen aus Primaten

PBMC isoliert aus peripherem Blut von höheren Lebewesen, also aus Affen und Menschen, konnten *in vitro* nicht ohne weiteres mit SRBC zur Plaqueproduktion stimuliert werden. Zwar konnte die Viabilität der Zellen mit zunehmender Konzentration von 2-ME gesteigert werden, jedoch wurden keine spezifischen Antikörper produziert (Daten nicht gezeigt). 2011 wurde von Gujer *et al.* die fördernde Wirkung von IFN- α auf T-Zell-vermittelte B-Zellreaktionen in einem humanen *in vitro* System beschrieben. Persönliche Kommunikation mit C. Gujer ergab, dass in dieser Publikation ein Typ I Interferongemisch eingesetzt wurde, welches in Folge auch in dieser Dissertation im humanen MD Versuch getestet wurde.



PBMC wurden aus buffy coats von 2 anonymen Spendern isoliert und nach dem Standardprotokoll mit SRBC stimuliert. IFN I wurde in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt und in Duplikaten inkubiert. Die Auswertung erfolgte in Duplikaten durch Auszählung der Plaques pro Platte.

Abb. 11 Plaquezahlen in Abhängigkeit von IFN I Konzentration

Wie Abb. 11 zeigt, gelang es durch Zusatz von IFN I eine deutliche SRBC-spezifische Antikörperantwort zu generieren. Dabei wurden nach Zugabe von 500 U/ml IFN I mit PBMC von beiden Spendern 120-210 Plaques pro Platte erreicht. Die doppelte Menge von IFN I brachte eine Steigerung auf im Durchschnitt etwa 600 Plaques pro Platte. Der Einsatz von 2.000 U/ml IFN I steigerte die Plasmazellzahl weiter auf über 800 Plaques pro Platte bei Spender 1, führte jedoch zu einer Reduktion der Plaquezahlen (auf etwa 50) mit Zellen des Spenders 2. Diese gebildeten Antikörper sind SRBC-spezifisch, da in Zellkulturen ohne Zugabe von SRBC keine Plaques gebildet werden (Daten nicht gezeigt). In weiteren Versuchen zeigte sich, dass die *in vitro* Antikörperproduktion durch den Einsatz von unterschiedlichen Chargen des IFN I stark variierte, sodass teilweise gar keine detektierbare Immunreaktion hervorgerufen werden konnte. Das zugesetzte IFN I ist eine Mischung von Zytokinen, die durch *in vitro* Infektion von humanen PBMC mit Sendaiviren produziert werden, wodurch große Unterschiede zwischen den Chargen bedingt sind. Laut Herstellerangaben sind in höheren Konzentrationen von jeweils etwa 500 ng/ml die Zytokine IFN- α , IFN- λ 1 und IFN- ω in diesem Gemisch nachweisbar. So wurden im Folgenden rekombinante Proteine dieser Interferone der humanen Zellkultur zugesetzt und verglichen.

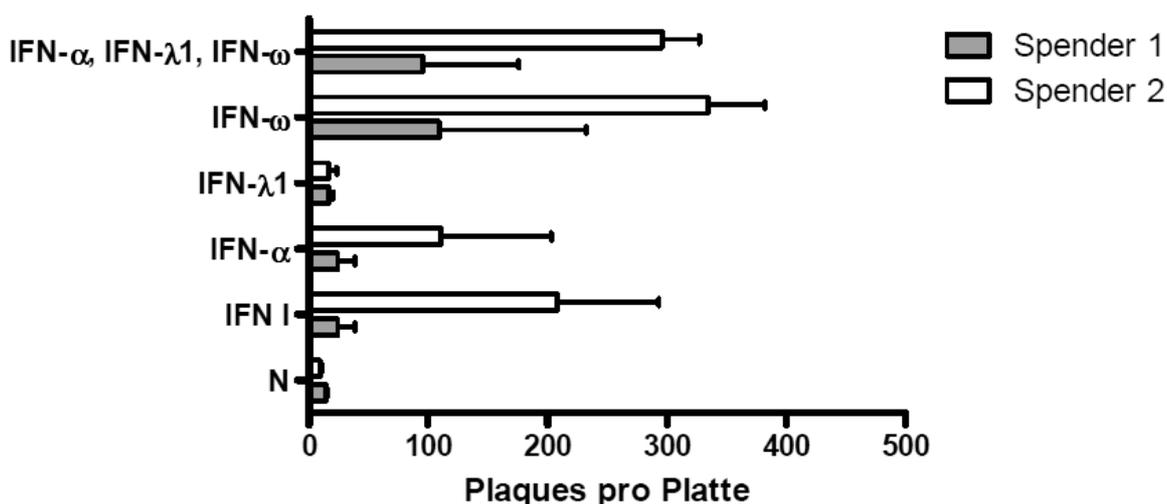


Abb. 12 Plaquezahlen in Abhängigkeit von zugesetztem IFN

PBMC wurden aus buffy coats von 2 anonymen Spendern isoliert und nach dem Standardprotokoll mit SRBC stimuliert. Die ausgewiesenen Interferone wurden in folgenden Konzentrationen zugesetzt (IFN I: 1000 U/ml, IFN- α : 1000 U/ml, IFN- λ 1: 500 ng/ml, IFN- ω : 500 ng/ml oder nicht zugesetzt (N) und die PBMC jeweils in Duplikaten inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch Ausplattieren in Duplikaten mit anschließender Auszählung der Plaques pro Platte.

Abb. 12 zeigt, dass die Zugabe von IFN I bei einem von zwei Spendern zur Ausbildung von etwa 200 Plaques pro Petrischale führt. Rekombinantes IFN- α allein

reduziert die Immunreaktion von Zellen aus diesem Spender fast um die Hälfte. Die Zugabe von IFN- λ 1 führt mit PBMC aus beiden Spendern zu keiner guten *in vitro* Immunreaktion gegen SRBC. Dagegen ist die Beimischung von 500 ng/ml IFN- ω für die Zellen aus beiden Spendern förderlich. So können bei Spender 2 nun über 300 Plaques pro Petrischale gezählt werden und Zellen aus Spender 1 produzieren über 100 SRBC-spezifische Plasmazellen. Dieser Plasmazellpegel wird durch die gleichzeitige Gabe der drei rekombinanten Zytokine nicht signifikant verändert (Abb. 12). Auch niedrigere Konzentrationen von IFN- ω bewirken eine detektierbare Plaqueproduktion, sodass in weiteren Experimenten standardmäßig 50 ng/ml IFN- ω zugesetzt wurde.

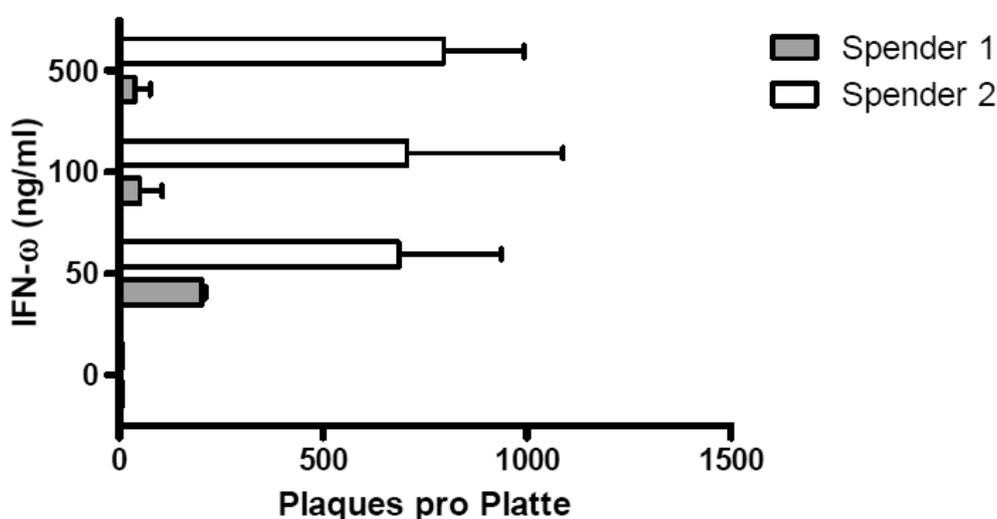


Abb. 13 Plaquezahlen in Abhängigkeit von IFN- ω Konzentration

PBMC wurden aus buffy coats von 2 anonymen Spendern isoliert und nach dem Standardprotokoll mit SRBC stimuliert. IFN- ω wurde in angegebenen Konzentrationen zugesetzt und in Duplikaten inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch Ausplattieren in Duplikaten mit anschließender Auszählung der Plaques pro Platte.

Die an humane PBMC angepassten Bedingungen können auch erfolgreich für PBMC aus Affen der Gattung *Macaca fascicularis* angewendet werden. Der Zusatz von Typ I IFN ist für die Ausbildung der *in vitro* Immunreaktion auch mit Zellen aus dieser Spezies notwendig. Dafür wurden die Parameter auf Anwendung in 48-Well-Platten runterskaliert, um den Test auch mit weniger PBMC, die problemlos aus peripherem Blut der Makaken gewonnen werden können, durchzuführen. Als optimale Zellkulturdauer erwies sich für die humorale *in vitro* Immunreaktion mit PBMC aus Affen eine Zellkulturdauer von neun Tagen (Abb. 14).

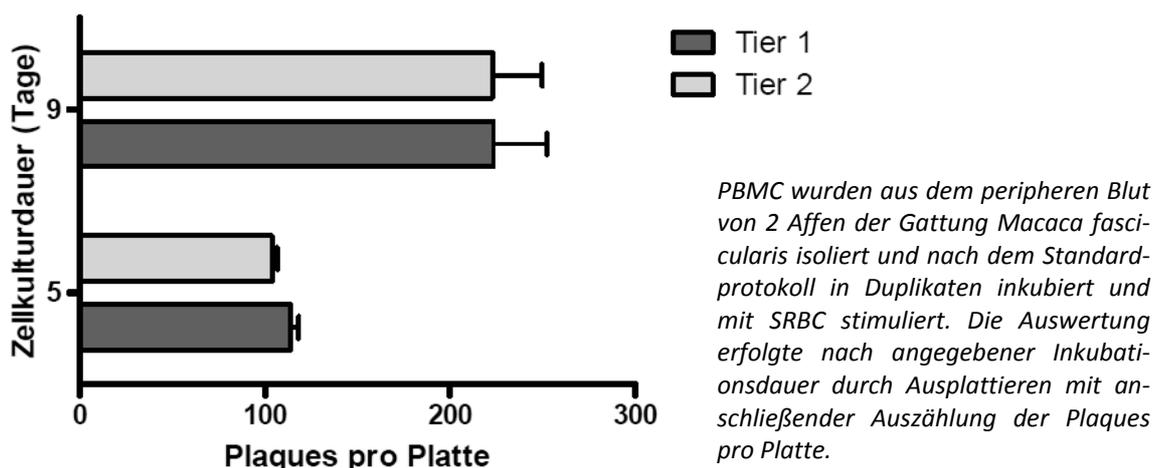


Abb. 14 Plaquezahlen in Abhängigkeit von Zellkulturdauer

Die in dieser Arbeit etablierten Zellkulturbedingungen für PBMC aus Primaten sind in Tab. 6 zusammengefasst. Dabei ist zu erwähnen, dass die Zugabe von nichtessentiellen Aminosäuren keinen signifikanten Vorteil für die humane Zellkultur erbringt (Daten nicht gezeigt). Jedoch werden NEAA in allen Versuchen zugesetzt, da sie andererseits nicht schädlich waren.

Tab. 6 Optimale Kulturbedingungen für PBMC aus Primaten

Spezies	<i>Homo sapiens</i>	<i>Macaca fascicularis</i>
Zellherkunft	PBMC	PBMC
Zellzahl	$7 \cdot 10^6$	$3,5 \cdot 10^6$
Medium	RPMI 5 % FCS mit NEAA, Pyruvate, L-Glutamin, 50 μ M 2-ME, Primocin	RPMI 5 % FCS mit NEAA, Pyruvate, L-Glutamin, 50 μ M 2-ME, Primocin
Zytokinzusatz	50 ng/ml IFN- ω	50 ng/ml IFN- ω
Stimulation	an T1 mit 0,625 % SRBC	an T1 mit 0,625 % SRBC
Kulturbedingungen	in 24-Well-Platten, 1 ml Mediumvolumen, MW 2 ml an T2	in 48-Well-Platten, 0,5 ml Mediumvolumen, MW 1 ml an T2
Kulturdauer	8 Tage	9 Tage

Dargestellt sind die ermittelten optimalen Bedingungen für isolierte PBMC aus humanen buffy coats von anonymen Spendern und aus dem peripheren Blut von Affen, die auch als Standardbedingungen bezeichnet werden. Verwendete Abkürzungen: FCS: fötales Kälberserum, NEAA: nichtessentielle Aminosäuren, 2-ME: β -Mercaptoethanol, Tx: Tag x, SRBC: Schafserythrozyten.

3.2. MD Test als *in vitro* Test für immuntoxikologische Untersuchungen

Der Einsatz der MD Kultur mit murinen Milzzellen als alternative Testmethode für die immuntoxikologische Risikobewertung von Chemikalien wurde initiiert und die Eignung mit Testsubstanzen evaluiert (Köper und Vohr, 2009). Die in dieser Arbeit

etablierten Testsysteme müssen ebenfalls auf ihre Fähigkeit, immunsuppressive von nicht immuntoxischen Chemikalien unterscheiden zu können, getestet werden, bevor sie als Test für neue Substanzen von Nutzen sein können.

Da viele Chemikalien nicht gut wasserlöslich sind, ist der Einsatz von einem Lösungsmittel in einem solchen Modell unerlässlich. Üblicherweise löst man die Testsubstanz in einem Lösungsmittel, bevor man sie in den entsprechenden Konzentrationen dem Zellkulturmedium zuführt. Daher wurde auch das Lösungsmittel DMSO in verschiedenen Konzentrationen getestet, um auszutitrieren, welche Konzentrationen vom System toleriert werden können. Abb. 15 zeigt, dass bis zu 0,4 % DMSO im Medium verwendet werden kann, ein höherer DMSO-Gehalt von 0,8 % sich aber nachteilig auf die Antikörperproduktion von Milzzellen der Lewisratte auswirkt. Somit wurde in weiteren Experimenten die Endkonzentration von 0,4 % DMSO nicht überschritten.

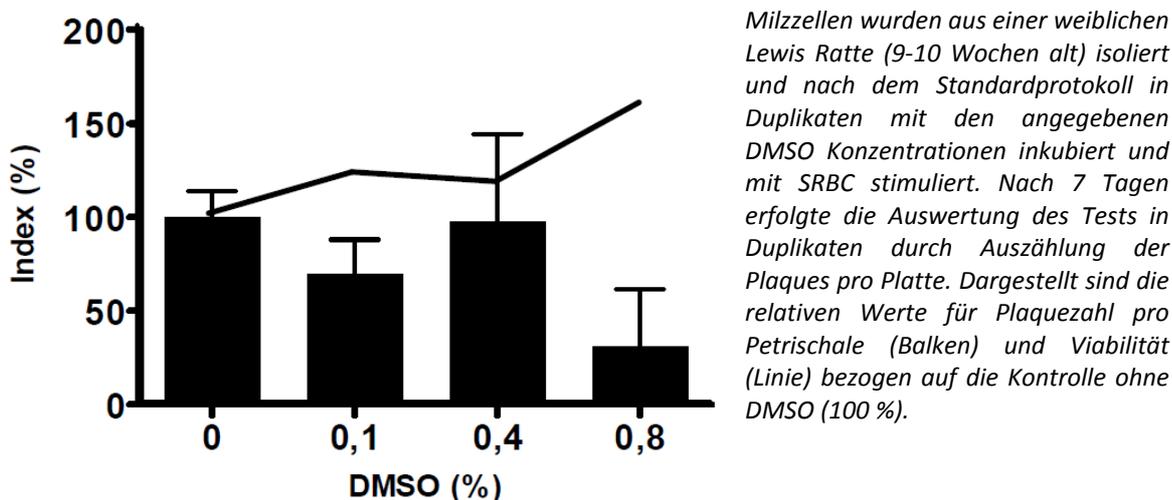


Abb. 15 Einfluss der DMSO-Konzentration im Medium auf die humorale *in vitro* Immunreaktion

3.2.1 Evaluierung von Testsubstanzen im MD Test *in vitro*

Für den Einsatz der neuen *in vitro* Testsysteme zur immuntoxikologischen Risikobewertung sollten Chemikalien in unterschiedlichen Konzentrationen der Kultur zugesetzt und die Endpunkte Plaquezahl pro Platte und Viabilität ermittelt werden. Um die Ergebnisse einzelner Versuche optimal vergleichen zu können, wurden die relativen Werte der beiden Parameter bestimmt und für die graphische Darstellung und die nachfolgende Auswertung herangezogen.

Bevor unbekannte Chemikalien mit den neuen Methoden getestet werden können, ist primär zur Einschätzung der Treffsicherheit des Tests die Untersuchung bekannter Substanzen unerlässlich. Dazu wurde der ungiftige Zuckeralkohol Manni-

tol als Negativkontrolle eingesetzt. Abb. 16 verdeutlicht, dass der Einsatz von Mannitol bis zu einer Konzentration von 50 mM sowohl für Milzzellen als auch für Blutzellen von Ratten unbedenklich ist, da weder die Viabilität noch die Antikörperproduktion beeinträchtigt werden.

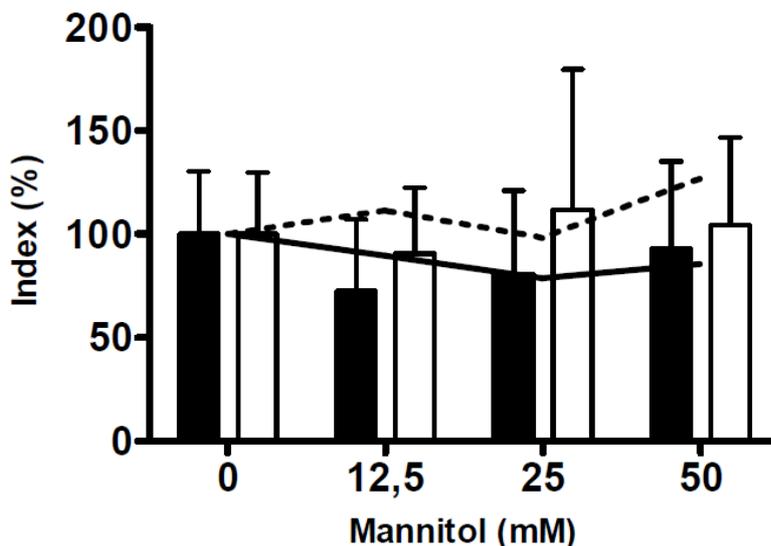


Abb. 16 Einsatz von Mannitol in der MD Kultur mit Zellen aus Ratten

Milzzellen und PBMC wurden nach dem Standardprotokoll in Triplikaten mit SRBC stimuliert und mit den angegebenen Mannitolkonzentrationen 7 Tage inkubiert. Die Auswertung des Tests erfolgte in Duplikaten durch Auszählung der Plaques pro Platte und durch Bestimmung der Viabilität mit dem Resazurintest. Dargestellt sind die relativen Werte (%) bezogen auf die Kontrolle (100 %) ohne Mannitol mit Milzzellen aus Lewisratten (schwarze Balken: Plaques pro Platte, durchgezogene Linie: Viabilität) und mit PBMC aus Wistarratten (weiße Balken: Plaques pro Platte, unterbrochene Linie: Viabilität). Abgebildet sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von jeweils zwei unabhängigen Experimenten.

Damit wurde der Konzentrationsbereich zum Testen von anderen Substanzen definiert, da Effekte unterhalb von 50 mM mit relativer Sicherheit auf die Eigenschaften der Substanz und nicht auf einen unspezifischen osmotischen Druck durch die Substanz zurückzuführen sind. Für jede weitere eingesetzte Substanz wurde unterhalb dieser Grenze zuerst der Konzentrationsbereich ermittelt, der zu einer Reduktion der Antikörperproduktion führte. Anschließend wurden die genaueren Konzentrationen titriert und auf die Substanzwirkung auf Plaquezahlen und Viabilität geachtet.

Um spezifische immunsuppressive Substanzwirkungen von zytotoxischen Effekten zu unterscheiden, wurden irritative Substanzen in die Negativkontrollen mit einbezogen. Abb. 17 zeigt das stark irritative Heptanal im MD Test mit Rattenzellen. Konzentrationen von unter 2,1 mM Heptanal zeigen keine Auswirkung auf die Viabilität und die Immunreaktion von PBMC, jedoch wird die Plaquezahl der Milzzellen schon leicht reduziert. Höhere Konzentrationen von Heptanal (10,4 mM) führen

bei beiden Systemen zu einer Reduktion der Plaquezahlen und zu einer simultanen Abnahme der Viabilität.

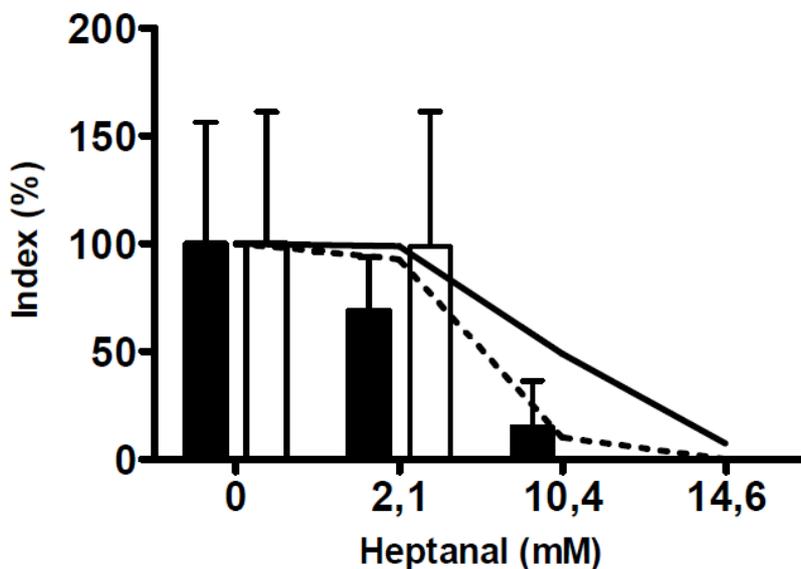


Abb. 17 Einsatz von Heptanal in der MD Kultur von Rattenzellen

Milzzellen und PBMC wurden nach dem Standardprotokoll in Triplikaten mit SRBC stimuliert und mit den angegebenen Heptanalkonzentrationen 7 Tage inkubiert. Die Auswertung des Tests erfolgte in Duplikaten durch Auszählung der Plaques pro Platte und durch Bestimmung der Viabilität mit dem Resazurintest. Dargestellt sind die relativen Werte (%) bezogen auf die Kontrolle (100 %) ohne Heptanal mit Milzzellen aus Lewisratten (schwarze Balken: Plaques pro Platte, durchgezogene Linie: Viabilität) und mit PBMC aus Wistarratten (weiße Balken: Plaques pro Platte, unterbrochene Linie: Viabilität). Abgebildet sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von jeweils zwei unabhängigen Experimenten.

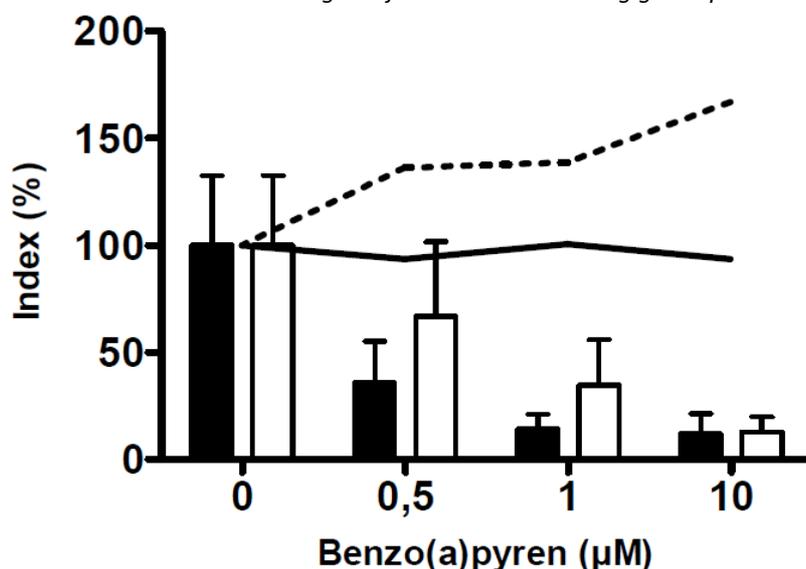


Abb. 18 Einsatz von Benzo(a)pyren in der MD Kultur von Rattenzellen

Milzzellen und PBMC wurden nach dem Standardprotokoll in Triplikaten mit SRBC stimuliert und mit den angegebenen Konzentrationen von B(a)p 7 Tage inkubiert. Die Auswertung des Tests erfolgte in Duplikaten durch Auszählung der Plaques pro Platte und durch Bestimmung der Viabilität mit dem Resazurintest. Dargestellt sind die relativen Werte (%) bezogen auf die Kontrolle (100 %) ohne B(a)p mit Milzzellen aus Lewisratten (schwarze Balken: Plaques pro Platte, durchgezogene Linie: Viabilität) und mit PBMC aus Wistarratten (weiße Balken: Plaques pro Platte, unterbrochene Linie: Viabilität). Abgebildet sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von jeweils zwei unabhängigen Experimenten.

Immunsuppressive Substanzen wie Benzo(a)pyren induzieren schon bei geringen Konzentrationen einen inhibitorischen Effekt auf die Plaquezahlen, der jedoch nicht mit einer Abnahme der Viabilität der Zellen korreliert. Wie man aus Abb. 18 entnehmen kann, resultiert die Zugabe von 10 μM B(a)p in einer Reduktion von 12 % von anti-SRBC produzierenden B-Zellen in Rattenzellkulturen, wogegen die Viabilität gemessen an der unbehandelten Kontrolle entweder unverändert bleibt (94 % bei Milzzellen in Kultur) oder sogar auf 167 % (Blutzellen in Kultur) ansteigt. Diese Reaktion, also die leichte Zunahme an Viabilität im nichttoxischen Bereich, ist charakteristisch für immunsuppressive Agenzien, wie auch die Inkubation mit Azathioprin, einem immunsuppressiven Pharmazeutikum, zeigt (Abb. 19). Substanzeffekte zeigen sich hier schon im nanomolaren Bereich, da eine Zugabe von 3,6 nM zur MD Kultur von Milzzellen aus Wistar oder Lewis Ratten zu einer Reduktion von etwa 30 % der Plaques führen, und 18 nM die komplette Immunreaktion unterdrücken, jedoch ohne sich nachteilig auf die Viabilität der Zellen auszuwirken (88 % bei Lewis, 99 % bei Wistar).

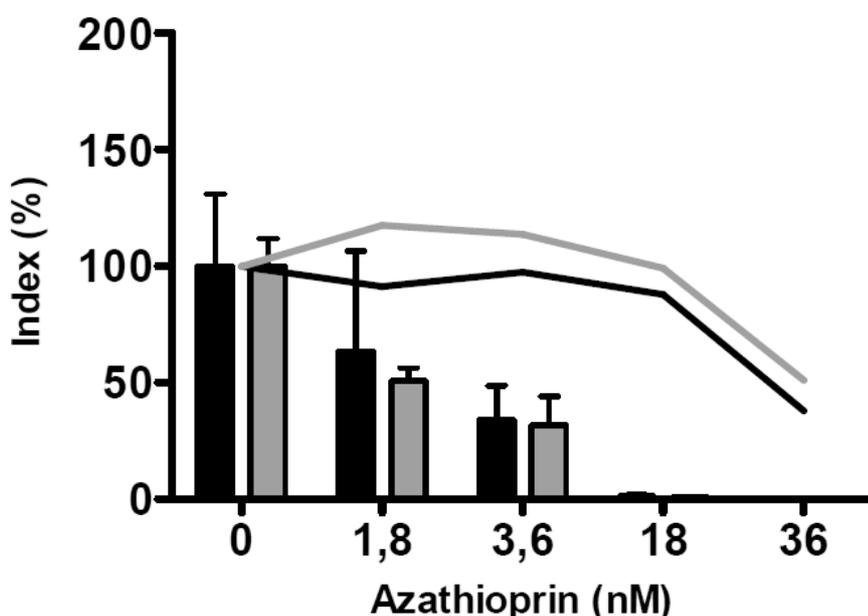


Abb. 19 Einsatz von Azathioprin in der MD Kultur von Milzzellen aus Ratten

Milzzellen wurden nach dem Standardprotokoll in Triplikaten mit SRBC stimuliert und mit den angegebenen Konzentrationen von Azathioprin 7 Tage inkubiert. Die Auswertung des Tests erfolgte in Duplikaten durch Auszählung der Plaques pro Platte und durch Bestimmung der Viabilität mit dem Resazurintest. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der relativen Werte (%) bezogen auf die Kontrolle (100 %) ohne Azathioprin mit Zellen aus Lewisratten (schwarze Balken: Plaques pro Platte, schwarze Linie: Viabilität) und mit Zellen aus Wistarratten (graue Balken: Plaques pro Platte, graue Linie: Viabilität).

Zur Klassifizierung der Substanzen hat sich die Berechnung des IC₉₀ Wertes, d.h. der Substanzkonzentration, die zu 90 % die Plaquebildung inhibiert, und der zu-

gehörigen Viabilität in Prozent als wertvoll erwiesen (Köper und Vohr, 2009). Dabei werden nichttoxische Substanzen als solche definiert, wenn sie innerhalb einer osmotisch unbedenklichen Konzentration weder eine Reduktion der Immunantwort noch der Viabilität aufweisen. Irritanten werden durch eine korrelierende Abnahme der Viabilität und der Immunreaktion gekennzeichnet. Von diesen nicht immunsuppressiven Stoffen werden Substanzen mit immunsuppressiver Wirkung deutlich abgegrenzt. Diese zeigen eine deutliche Reduktion der Plaquezahlen bei einer hohen Viabilität. Die Grenze für die Viabilität zur Abgrenzung von zytotoxischen und immuntoxischen Effekten wurde für die MD Kultur von Milzzellen aus Mäusen auf 50 % festgesetzt. Das heißt, dass Irritanten bei 90 % Plaquereduktion eine Viabilität von unter 50 % aufweisen, und Immunsuppressiva über diesem Grenzwert liegen. Diese Einteilung hat sich für die MD Kultur von Mausmilzzellen bewährt und wurde daher auch für die neuen Testsysteme übernommen.

Tab. 7 Kriterien zur Klassifizierung von Testsubstanzen

Substanzeigenschaft	Viabilität bei Plaque IC90
nicht toxisch	nicht ermittelbar, da kein Plaque IC90
zytotoxisch	< 50 %
immunsuppressiv	> 50 %

Tab. 8 Vergleich der ermittelten IC90 Werte und der korrespondierenden Viabilitäten in verschiedenen Testsystemen

Plaque IC90 IC90 Viabilität	Lewis Milz	Wistar Milz	NMRI Blut	Wistar Blut
Mannitol	> 50 mM n.d.	> 40 mM n.d.	> 50 mM n.d.	> 50 mM n.d.
Heptanal	11 ± 2 mM 38 ± 12 %	6 ± 6 mM 48 ± 16 %	20 mM 2 %	9 +/- 4 mM 24 ± 24 %
Benzo(a)pyren	3 ± 2 µM 100 ± 10 %	9 ± 4 µM 104 ± 46 %	12 µM 86 %	8 +/- 5 µM 138 ± 53 %
Azathioprin	16 ± 3 nM 62 ± 41 %	21 ± 10 nM 78 ± 37 %		

Die Zellen wurden nach dem Standardprotokoll mit den jeweiligen Substanzen inkubiert. Dargestellt sind die berechneten Substanzkonzentrationen, die 90 % der Plaques pro Petrischale inhibieren (Plaque IC90) und die dazugehörigen Viabilitäten in Prozent (grau) mit Standardabweichung von jeweils zwei unabhängigen Experimenten (Ausnahme: PBMC aus NMRI Mäusen). Abkürzungen: n.d.: nicht ermittelt.

In Tab. 8 sind die Reaktionen von den unterschiedlichen Testsystemen auf die bereits gezeigten Substanzen vergleichend dargestellt. Der Speziesvergleich zeigt

ähnliche substanzspezifische Effekte in allen Systemen. So wirkte Mannitol in Konzentrationen bis über 40 mM nicht inhibierend auf die getesteten Zellen, sodass kein IC90 Wert errechnet werden konnte. Folglich war auch die dazugehörige Viabilität nicht bestimmbar. Heptanal inhibierte 90 % der Plaques von Rattenzellen in einstelligen millimolaren Konzentrationen. Die Blutzellen von NMRI Mäusen zeigten sich hier weniger empfindlich. An dieser Stelle ist zu beachten, dass die Versuche mit PBMC aus Mäusen wegen des großen Tierbedarfs im Gegensatz zu den anderen Systemen nur jeweils ein Mal pro Substanz durchgeführt wurden. Die korrespondierenden Viabilitäten liegen für Rattenzellen jeweils knapp unter 50 %. Für PBMC aus Mäusen ist die entsprechende Viabilität deutlich auf nur 2 % gesenkt. Die IC90 Werte für B(a)p liegen in einem engen Bereich von 3 bis 12 μM , und die ermittelten dazugehörigen Viabilitäten liegen alle deutlich über 50 %. Azathioprin wurde nur in Milzzellen von Ratten getestet und in beiden Fällen deutlich als immunsuppressiv eingestuft mit einer IC90 Konzentration von 16 bis 21 nM und einer Viabilität von über 60 %.

Diese Ergebnisse lassen keine Spezies oder Zellart für diesen Test als besser geeignet erscheinen. Vielmehr sind die Systeme ähnlich sensitiv gegenüber den getesteten Kontrollsubstanzen und zeigen eine vergleichbare Streuung, welche durch die aufgeführten Standardabweichungen abschätzbar wird.

Tab. 9 Treffsicherheit der Vorhersage für verschiedene Testsubstanzen mit Milzzellen von Wistarratten

Substanz	Plaque IC90		Viabilität bei Plaque IC90		korrekte Vorhersage?
	Test I	Test II	Test I	Test II	
Mannitol	> 40 mM	> 40 mM	n.d.	n.d.	ja
Heptanal	10 mM	2 mM	59 %	37 %	nein/ja
SDS	10 μM	28 μM	67 %	61 %	nein
Triton X-100	64 nM	n.d.	26 %	n.d.	ja
Azathioprin	28 nM	14 nM	52 %	104 %	ja
Benzo(a)pyren	6 μM	12 μM	71 %	136 %	ja
Dexamethason	1 mM	9 mM	58 %	98 %	ja
Cyclophosphamid	0,3 mM	5 mM	80 %	55 %	ja
Cyclosporin A	9 mM	8 mM	78 %	63 %	ja

Die Milzzellen von Wistar Ratten wurden nach dem Standardprotokoll mit den jeweiligen Substanzen inkubiert. Dargestellt sind die berechneten Substanzkonzentrationen, die 90 % der Plaques pro Petrischale inhibieren (Plaque IC90) und die dazugehörigen Viabilitäten in Prozent von jeweils zwei unabhängigen Experimenten und ihre Bewertung bezüglich der erzielten Klassifizierung. Mit Triton X-100 wurde nur ein Experiment durchgeführt. Abkürzungen: n.d.: nicht ermittelt.

Um die Treffsicherheit der Substanzklassifikation von Milzzellen der Wistarratte, dem Standard-Rattenstamm für toxikologische Untersuchungen in unserer Abtei-

lung, und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse abschätzen zu können, wurden zusätzliche Irritanten und Immunsuppressiva in diesem System getestet. Tab. 9 präsentiert die Ergebnisse von jeweils zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten separat und bewertet die erzielte Klassifizierung im Hinblick auf ihre Richtigkeit. Es zeigt sich, dass Mannitol in beiden Versuchen korrekt als nicht-toxisch vorhergesagt wurde. Ebenfalls wurden alle getesteten Immunsuppressiva eindeutig als solche identifiziert. Wobei die jeweiligen IC90 Werte zwischen den Substanzen deutlich variierten. Azathioprin erwies sich als die Substanz mit dem größten immunsuppressiven Potenzial mit IC90 Werten im zweistelligen nanomolaren Bereich. B(a)p folgt mit IC90 Konzentrationen im niedrigen micromolaren Bereich. Die anderen getesteten Agenzien Dexamethason, Cyclophosphamid und Cyclosporin A inhibierten 90 % der Immunreaktion im einstelligen millimolaren Konzentrationsbereich. Da die Einordnung von Heptanal sich als problematisch herausstellte, und dieses in einem von zwei Versuchen die Viabilität nur unzureichend für die korrekte Klassifikation inhibierte, wurden weitere irritative Substanzen getestet. So wurde der starke Irritant SDS mit einer Viabilität bei IC90 von über 60 % ebenfalls nicht korrekt eingeordnet. Dagegen konnte Triton X-100 im Gegensatz zu Heptanal und SDS eindeutig richtig klassifiziert werden. In einem durchgeführten Experiment wurde für Triton X-100 eine IC90 Viabilität von 26 % bei einer IC90 Konzentration von 64 nM ermittelt.

3.2.2 Anwendung des MD Tests zum Testen unbekannter Substanzen

Ein Hauptziel dieser Arbeit war es, ein robustes *in vitro* Versuchsmodell zum Abschätzen von immuntoxischen Substanzeffekten aufzubauen. Dieses sollte dann im Idealfall zum Testen von neu entwickelten Substanzen eingesetzt werden und dabei helfen, besser geeignete Entwicklungskandidaten von schlechter geeigneten zu unterscheiden.

Abb. 20 zeigt den Vergleich der *in vitro* Immunreaktion von Milzzellen aus Mäusen und Ratten nach Inkubation mit dem Razemat und den Enantiomeren einer Substanz. Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird die Substanz hier nicht näher beschrieben. Diese Substanz wurde ursprünglich als Razemat hergestellt und in vorhergehenden MD Kulturen gegenüber anderen Kandidaten favorisiert. Deutlich ist der Vorteil des (+) Enantiomers der neuen Substanz gegenüber dem (-) Enantiomer und gegenüber dem Razemat sowohl im Hinblick auf die Viabilität (mit Zellen

der Wistarratte) wie auch auf die Antikörperproduktion (mit Zellen beider Spezies) erkennbar. Solche Untersuchungen können dazu dienen, schon vor Durchführung der *in vivo* Studien effektiver eine Vorauswahl der Substanzen zu treffen und ihr immunmodulierendes Potenzial abzuschätzen.

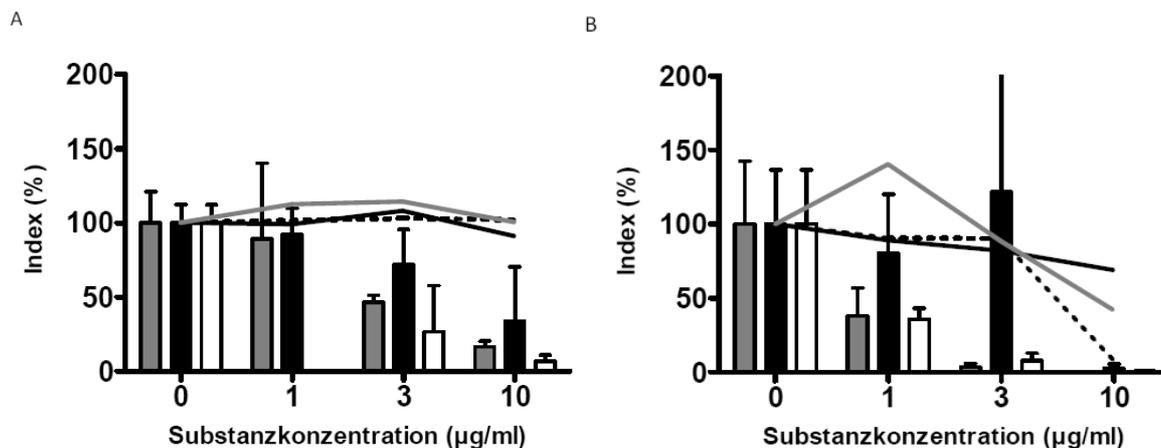


Abb. 20 Evaluierung von Entwicklungskandidaten im MD Test mit Milzzellen von zwei Spezies

Die Milzzellen von NMRI Mäusen (A) und Lewis Ratten (B) wurden nach dem Standardprotokoll mit den jeweiligen Substanzen inkubiert. Als Testsubstanzen wurde das Racemat (Plaques pro Petrischale: graue Balken, Viabilität: durchgezogene graue Linie), ein (+) Enantiomer (Plaques pro Petrischale: schwarze Balken, Viabilität: durchgezogene schwarze Linie) mit einem (-) Enantiomer (Plaques pro Petrischale: weiße Balken, Viabilität: unterbrochene Linie) verglichen. Dargestellt sind die berechneten Substanzkonzentrationen, die 90 % der Plaques pro Petrischale inhibieren (Plaque IC90) und die dazugehörigen Viabilitäten in Prozent von jeweils zwei unabhängigen Experimenten. Zu beachten ist, dass mit Mausmilzzellen für den (-) Enantiomer die Konzentration 1 µg/ml nicht getestet wurde.

3.2.3 Anwendung des MD Tests im *ex vivo* Modell

Um eine breitere Anwendungsmöglichkeit des MD Tests für immuntoxikologische Untersuchungen zu ermöglichen, wurde getestet, ob die *in vitro* Stimulation mit SRBC von Immunzellen aus *in vivo* behandelten Tieren ähnliche Ergebnisse liefert wie der reine *in vitro* Test. Zu diesem Zweck wurden an drei Zeitpunkten MD Kulturen mit PBMC aus Benzo(a)pyren behandelten und nicht immunisierten Ratten angesetzt. Dadurch war es möglich die Änderung der Immunkompetenz dieser Tiere im Laufe der Behandlung zu verfolgen.

Tab. 10 Verfolgung der *in vitro* Immunreaktion von PBMC nach *in vivo* B(a)p Behandlung von Wistarratten

	B(a)p (mg/kg)			
	0	37,5	75	150
Tag 7	100+/-102	151+/-153	193+/-145	165+/-248
Tag 21	100+/-93	228+/-95	83+/-73	33+/-26
Tag 30	100+/-11	449+/-48	355+/-257	5+/-4

Wistarratten (8 Tiere pro Gruppe) wurden 30 Tage durch orale Gabe mit angegebenen Konzentrationen B(a)p in Sesamöl oder als Kontrolle mit Sesamöl behandelt. An angegebenen Tagen wurden PBMC aus retrobulbär abgenommenem Blut isoliert und nach dem Standardprotokoll mit SRBC stimuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der relativen Plaquezahlen pro Petrischale (%) bezogen auf die Kontrolltiere (100 %) des jeweiligen Blutabnahmetages. Zur Verdeutlichung sind in Rot erhöhte Mittelwerte und in Grün erniedrigte Mittelwerte im Vergleich zur Kontrolle unterlegt.

Nach sieben Tagen oraler Gabe von Benzo(a)pyren zeigte sich eine erhöhte *in vitro* Immunreaktion von PBMC aus behandelten Tieren im Vergleich zu Zellen aus der Kontrollgruppe (Tab. 10). Nach 21 Tagen der Studie war weiterhin eine erhöhte Antikörperproduktion gegen SRBC in Tieren mit der niedrigen Dosierung detektierbar. Tiere mit der mittleren Dosierung reagierten vergleichbar zu Kontrolltieren und täglich mit 150 mg/kg gefütterten Ratten zeigten eine statistisch signifikant verminderte Fähigkeit *in vitro* spezifische Antikörper zu generieren (Tab. 10 und Abb. 21). Insgesamt verlagert sich der Peakeffekt von Tag sieben zu Tag 21 nach vorne, sodass sowohl die Plaquezunahme als auch die Plaquesuppression nach längerer Substanzexposition bei geringeren Konzentrationen auftreten.

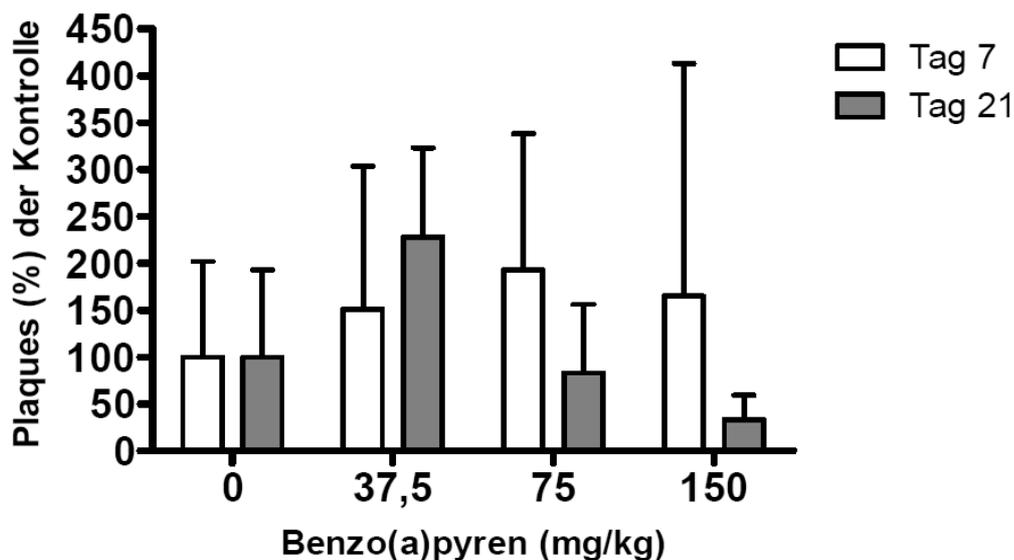


Abb. 21 *In vitro* Immunreaktion von PBMC nach 7 und 21 Tagen *in vivo* B(a)p Behandlung von Wistarratten

Wistarratten wurden, wie für Tab. 10 beschrieben, behandelt. Nach 7 und 21 Tagen wurden PBMC aus retrobulbär abgenommenem Blut isoliert und nach dem Standardprotokoll mit SRBC stimuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der relativen Plaquezahlen pro Petrischale (%) bezogen auf die Kontrolltiere (100 %) des jeweiligen Blutabnahmetages. Die korrespondierende Viabilität lag bei allen Gruppen > 90 % (+/- < 30 %).

Tiere mit der höchsten verabreichten Dosis von Benzo(a)pyren zeigten eine von der Behandlungsdauer abhängige Änderung der Immunkompetenz. Am siebten Behandlungstag ergab sich eine erhöhte Immunantwort (165 %) und eine gesteigerte Zellviabilität (148 %) im Vergleich zur Kontrolle. Nach 21 Behandlungstagen

wurde eine statistisch signifikante Reduktion auf 33 % der *in vitro* generierten spezifischen Antikörperproduktion bei unveränderter Viabilität der Zellen in Kultur detektiert. PBMC aus 30 Tage lang mit B(a)p behandelten Tieren hatten eine verminderte Zellviabilität (71 %) und eine nahezu komplett inhibierte Fähigkeit zur Ausbildung der *in vitro* Immunreaktion im Vergleich zu Kontrolltieren.

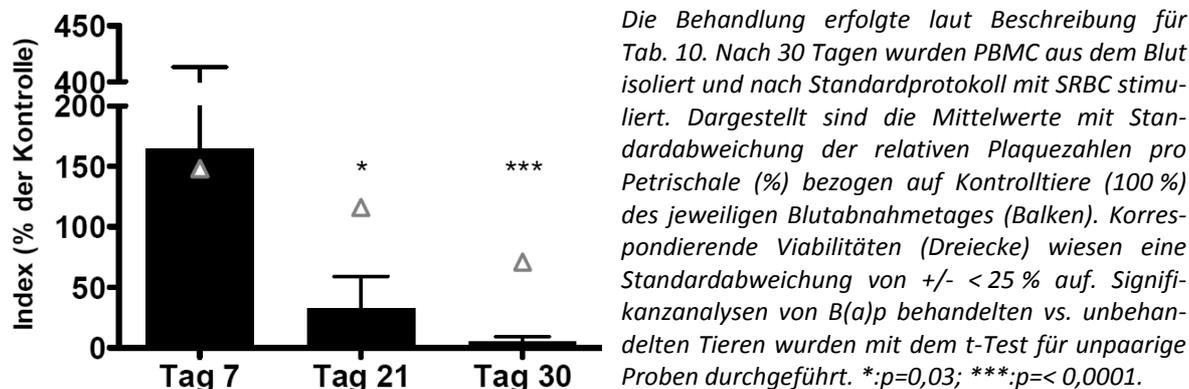


Abb. 22 Verlauf der *in vitro* Immunantwort von mit 150 mg/kg B(a)p behandelten Wistarratten

Um die Anwendbarkeit des MD Tests für eine studienbegleitende Verfolgung des Immunstatus behandelter Tiere detaillierter zu überprüfen, wurde in einer weiteren 30 Tage andauernden *in vivo* Studie mit Azathioprin der MD Test zu drei unterschiedlichen Behandlungszeitpunkten angesetzt.

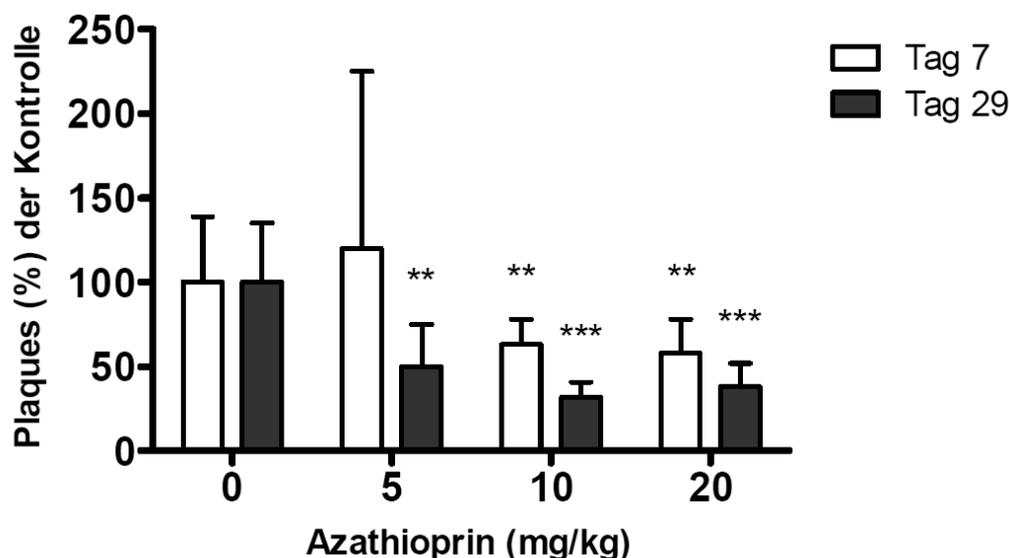


Abb. 23 *In vitro* Immunantwort von PBMC nach *in vivo* Azathioprin Behandlung von Ratten

Wistarratten (8 männliche Tiere pro Gruppe) wurden 30 Tage durch orale Gabe mit angegebenen Konzentrationen Azathioprin in Trägersubstanz oder als Kontrolle ausschließlich mit Trägersubstanz behandelt. Nach 7 und 29 Tagen wurden PBMC aus retrobulbär abgenommenem Blut isoliert und nach dem Standardprotokoll mit SRBC stimuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der relativen Plaquezahlen pro Petrischale (%) bezogen auf die Kontrolltiere (100 %) des jeweiligen Blutabnahmetages. Signifikanzanalysen von Azathioprin behandelten vs. unbehandelten Tieren wurden mit dem Students t-Test für unpaarige Proben durchgeführt. **:p< 0,006; ***:p< 0,0004.

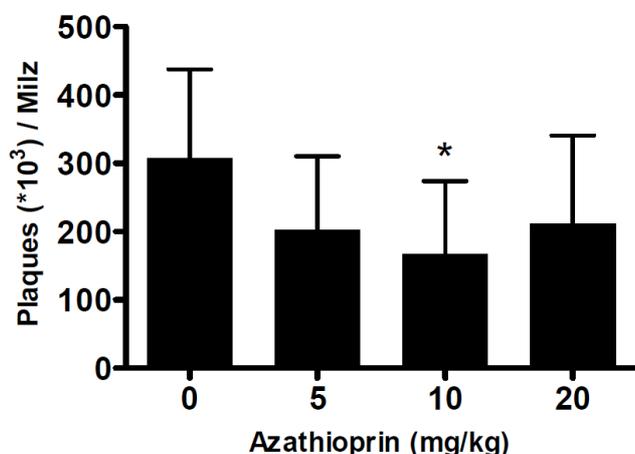
Tab. 11 Verfolgung der *in vitro* Immunreaktion von PBMC nach *in vivo* Azathioprin Behandlung von Ratten

	Azathioprin (mg/kg)			
	0	5	10	20
Tag 7	100+/-39	120+/-105	63+/-15	58+/-20
Tag 21	100+/-146	125+/-112	64+/-127	44+/-92
Tag 30	100+/-35	50+/-25	32+/-9	38+/-14

Behandlung erfolgte laut Beschreibung zu Abb. 23. An angegebenen Tagen wurden PBMC aus retrobulbär abgenommenem Blut isoliert und nach dem Standardprotokoll mit SRBC stimuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der relativen Plaquezahlen pro Petrischale (%) bezogen auf die Kontrolltiere (100 %) des jeweiligen Blutabnahmetages. Zur Verdeutlichung sind in Rot erhöhte Mittelwerte und in Grün erniedrigte Mittelwerte im Vergleich zur Kontrolle unterlegt.

Bei der geringen Dosis von 5 mg/kg Azathioprin ist eine Steigerung auf etwa 120 % der SRBC-spezifischen *in vitro* Immunreaktion sowohl nach sieben als auch nach 21 Tagen der Behandlung feststellbar. Nach längerer Gabe von Azathioprin halbiert sich die gezählte Plaquezahl im Vergleich zur vehikelbehandelten Kontrollgruppe. Höhere Gaben von 10 und 20 mg/kg Azathioprin reduzieren die Plaquezahl auf etwa 60 % statistisch signifikant an Tag sieben und aufgrund der hohen Standardabweichungen nicht signifikant an Tag 21. Noch deutlicher wird der Effekt nach 29 Tagen mit 30 - 40 %. Insgesamt wurden hohe Standardabweichungen bei der geringen Konzentration von Azathioprin an Tag sieben und bei allen Gruppen an Tag 21 detektiert. Die Viabilität liegt bei allen Gruppen nach sieben Tage andauernder Gabe bei > 90 %, nach 21 Tagen bei > 70 % und nach 29 Tagen bei > 89 %.

Um den MD Test mit dem richtlinienrelevanten Standardtest für Immuntoxizität in dieser Studie vergleichen zu können, wurde ein PFCA nach 30 Tagen oraler Gabe Azathioprin durchgeführt. Das Ergebnis dieses Tests wird in Abb. 24 präsentiert.



Die Behandlung der Wistarratten erfolgte laut Beschreibung zu Abb. 23. Nach 25 Tagen erfolgte die Immunisierung der Tiere mit SRBC und nach 30 Tagen wurde der PFCA durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Plaquezahlen (*10³) pro Milz. Signifikanzanalysen von Azathioprin behandelten vs. unbehandelten Tieren wurden mit dem Students t-Test für unpaarige Proben durchgeführt. *:p=0,0324.

Abb. 24 PFCA nach *in vivo* Azathioprin Behandlung von Ratten

Im PFCA werden 66 % der Plaques pro Milz nach oraler Gabe von 5 mg/kg Azathioprin im Vergleich zur Vehikelkontrolle produziert. 10 mg/kg Azathioprin senkt die Plaquezahl statistisch signifikant weiter auf 54 % der Kontrolle. Nach Behandlung mit der hohen Dosis Azathioprin ist nur eine geringere Reduktion der Plaquezahl auf 69 % der Kontrolle bestimmbar.

Um die Vergleichbarkeit des *ex vivo* PFCA mit der *in vitro* ausgelösten Immunreaktion zu ermitteln, wurde ein weiterer Versuch an die oben dargestellte Studie angeschlossen.

Mit Cyclophosphamid wurde eine Substanz gewählt, die in den *in vitro* MD Versuchen mit Milzzellen der Maus nicht korrekt vorhergesagt werden konnte (Köper und Vohr, 2009). Durch *in vivo* Behandlung von Wistarratten mit Cyclophosphamid in einer bekannt immunsuppressiven Konzentration von 80 mg/kg und *in vivo* Immunisierung der Tiere wurden parallel der klassische *ex vivo* PFCA und zum Vergleich MD Kulturen mit Milz- und Blutzellen dieser Tiere angesetzt.

Tab. 12 Vergleich der *in vitro* Immunreaktion mit dem PFCA nach *in vivo* Cyclophosphamid Behandlung von Ratten

		Vehikel	Cyclophosphamid	Reduktion (%)
Milz	Zellzahl (*10 ⁷)	48 ± 11	7 ± 1	86
PFCA	Plaques pro 1*10 ⁷ Zellen	1238 ± 920	1 ± 1	100
MD: Milz	Plaques pro Platte	2893 ± 1976	0 ± 0	100
MD: PBMC	Plaques pro Platte	2575 ± 995	0 ± 0	100

Wistarratten (4 Tiere pro Gruppe) wurden durch intraperitoneale Injektion mit Cyclophosphamid (80 mg/kg) oder Vehikel behandelt und ein Tag später mit SRBC immunisiert. Nach 5 Tagen wurde der PFCA durchgeführt, sowie MD Kulturen mit Milzzellen und PBMC angesetzt. MD Kulturen wurden nach Standardprotokoll ausgeführt und die Zellen *in vitro* mit SRBC stimuliert. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte mit Standardabweichung.

Tab. 12 zeigt, dass beide Methoden, sowohl der klassische PFCA, wie auch der neu entwickelte MD mit Milz- und Blutzellen der behandelten Tiere nach Cyclophosphamidbehandlung im Gegensatz zu Zellen aus Kontrolltieren nicht in der Lage sind, eine ausreichende Immunantwort gegen das Antigen zu generieren.

Die deutliche Reduktion der ermittelten Milzzellzahl verdeutlicht die immunmodulierende Wirkweise von Cyclophosphamid.

3.2.4 Modifizierte Anwendung des MD Tests zum Testen der Immunität von Proteinen

Die aktuelle Entwicklung in der Arzneimittelindustrie fördert eine zunehmende Erforschung von Proteinpräparaten und führt damit einhergehend zum steigenden Einsatz dieser Medikamente am Menschen. Die Anwendung dieser Arzneimittel (Biologika) kann die Bildung von spezifischen inaktivierenden Antikörpern beim Patienten auslösen und damit die Wirkung des Präparates aufheben und/oder zu anderen Überreaktionen des Immunsystems führen, und so z.B. allergische Reaktionen induzieren. Um diese unerwünschten Effekte zu vermeiden oder zumindest zu reduzieren, ist es erforderlich, die entwickelten Präparate auf ihre immunogene Wirkung hin zu untersuchen. Dazu wurde der MD Test soweit verändert, dass als Antigen statt der üblichen SRBC, das zu untersuchende Protein verwendet wird und die Auslesung der so erzeugten Antikörperantwort nun mit proteingekoppelten SRBC erfolgt.

Um diesen Test aufzubauen, war es zunächst erforderlich die Bedingungen zum Koppeln von Protein an SRBC zu etablieren. Als Testprotein wurde Ovalbumin, ein Protein mit moderat-immunogener Wirkung, gewählt und im Chromiumchlorid-Verfahren an SRBC gebunden. Es wurden verschiedene, veröffentlichte Protokolle ausgetestet (zusammengefasst in Tab. 13) und das Ergebnis durch FITC-gekoppelte ovalbuminspezifische Antikörper im FACS überprüft. Protokolle, in denen frisch angesetzte CrCl_3 Lösung zum Einsatz kam, führten zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis, auch wenn das neuere Verfahren von Savelkoul *et al.* (1988) durchgeführt wurde. Den entscheidenden Hinweis lieferte die Publikation von James W. Goding aus dem Jahr 1976, in der er neben weiteren wichtigen Parametern den Einsatz von einer gealterten CrCl_3 Lösung beschrieb.

Tab. 13 Übersicht der verwendeten Protokolle zum Koppeln von Protein an SRBC

Quelle	CrCl_3 -Lösung	Kopplung
Gold und Fudenberg, 1967	frische $3,8 \cdot 10^{-3}$ M Lösung	nein
Savelkoul <i>et al.</i> , 1988	frische $5 \cdot 10^{-2}$ M Lösung	nein
Gronowicz <i>et al.</i> , 1976	frische $2,5 \cdot 10^{-4}$ M Lösung	nein
Gronowicz <i>et al.</i> , 1976	gealterte $2,5 \cdot 10^{-4}$ M Lösung	ja
Goding, 1976	gealterte $3,8 \cdot 10^{-4}$ M Lösung, pH 5	ja

So wurden zwei Protokolle mit gealterten Lösungen parallel weiterverfolgt und die so ermöglichte Bindung von Ovalbumin an SRBC durch Variieren der Parameter eingesetzte Proteinkonzentration und Volumen der zugegebenen CrCl₃ Lösung weiter verbessert. Das Austesten dieser Parameter zur Findung des optimalen Verhältnisses ist notwendig, da eine falsche Kombination entweder zu einer schlechten Kopplung oder zu einer unspezifischen Lyse der Schafserythrozyten führt (Tab. 14).

Tab. 14 Austesten der Parameter zum Koppeln von Ovalbumin an SRBC

A		CrCl ₃ Volumen (µl pro Probe)			
		500	1000	2000	5000
Proteinkonzentration (mg/ml)	0,5	97,8	98,5	94,2	18,3
	1	96,3	95,2	91,2	8,2
	2	96,3	95,9	96,7	14,1
	4	86,2	97,6	97,1	0,1

B		CrCl ₃ Volumen (µl pro Probe)		
		500	1000	2000
Proteinkonzentration (mg/ml)	0,5	89,1	85,7	71,4
	1	96,5	93,2	83,2
	2	92,8	86,8	80,8
	4	89,2	88,1	84,4

Übersicht der Ovalbumin-gekoppelten SRBC in Prozent, welche nach dem Protokoll von Gronowicz *et al.* (A) und Goding (B) mit variiertem Verhältnis zwischen eingesetzten CrCl₃ Volumina und Proteinkonzentration hergestellt wurden und im FACS durch einen OVA-spezifischen und FITC-gekoppelten Antikörper detektiert wurden. Die Angaben beziehen sich auf je 100 µl eingesetzte SRBC. In Rot sind lysierte SRBC markiert, die jeweils favorisierte Bedingung ist mit Grün unterlegt.

Abb. 25 veranschaulicht die Auswertung der anschließenden FACS Analyse dieser Studie. Unbehandelte SRBC werden durch die verwendeten OVA-spezifischen und FITC-gekoppelten Antikörper nicht markiert und bilden im FACS eine überwiegend homogene Zellpopulation. Nach der Kopplung der SRBC mit Ovalbumin laut dem Protokoll von Gronowicz *et al.* werden 95,9 % der aufgenommenen SRBC FITC-positiv, und eine kleinere zweite positive Population mit doppelter Zellgröße wird detektiert. Das Protokoll nach Goding führte zu 89,2 % FITC-positiven SRBC. Die durch diese Vortests ermittelten, optimalen Bedingungen für beide Protokolle wurden für die nächsten Versuche genauso angewendet.

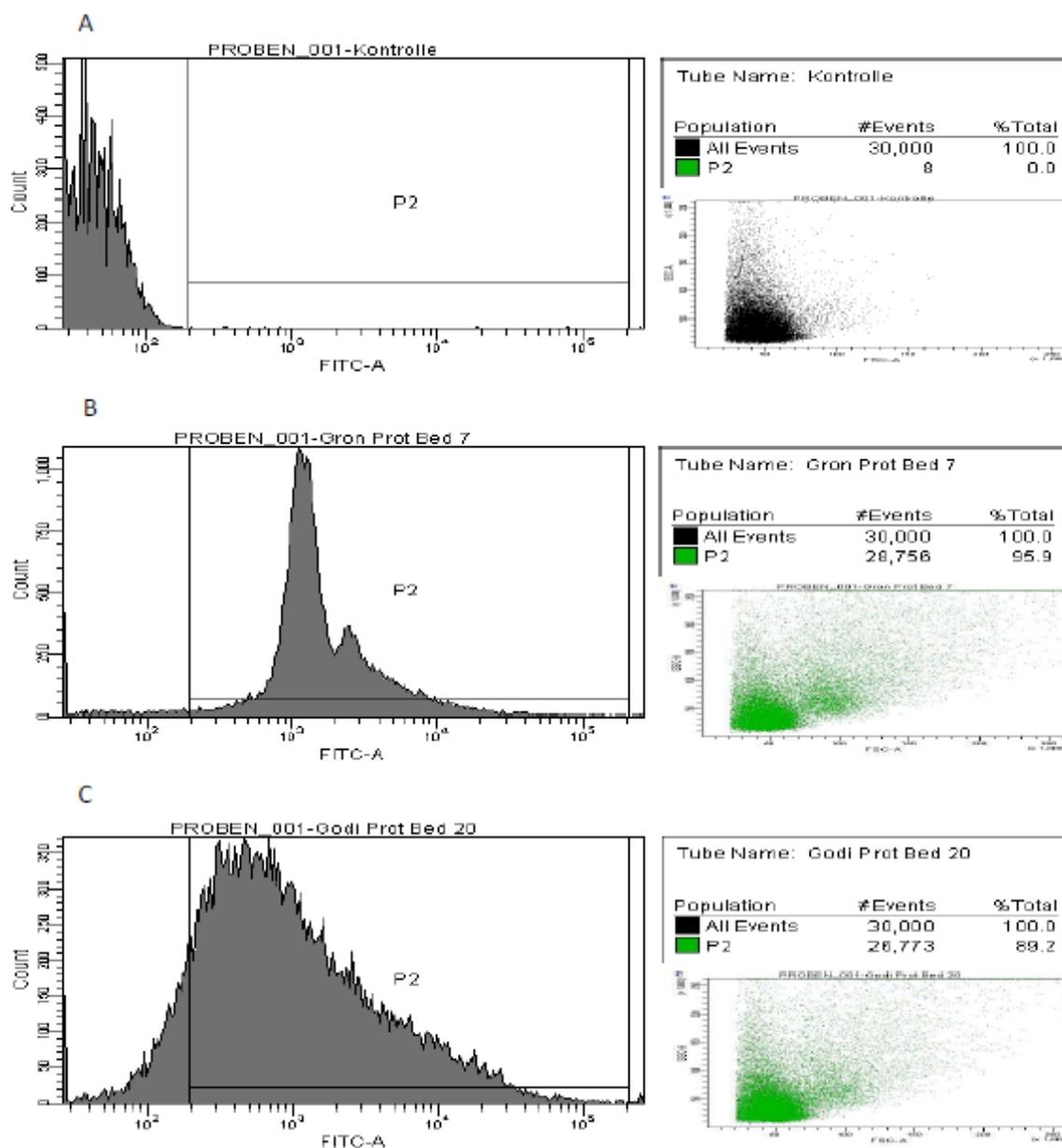


Abb. 25 FACS Analyse der verwendeten Kopplungsmethoden

FACS Analyse von unbehandelten SRBC (A) sowie nach dem Protokoll von Gronowicz et al. (B) und Goding (C) favorisierte gekoppelte SRBC, nach Markierung mit einem OVA-spezifischen und FITC-gekoppelten Antikörper. Im Feld P2 sind die positiven ovalbumingekoppelten SRBC in Prozent.

Im Folgenden wurden Milzzellen aus Wistarratten analog zum etablierten MD Protokoll *in vitro* mit dem Testprotein Ovalbumin immunisiert und nach einer Inkubationsdauer von sieben Tagen die proteinspezifische Antikörperreaktion ausgewertet. Trotz Variation verschiedener Parameter, wie dem Stimulationszeitpunkt und der Menge des eingesetzten Proteins, war es nicht möglich eine proteinspezifische Immunreaktion weder mit dem üblichen Plaquetest noch mit dem Spotttest zu detektieren. Abb. 26 zeigt das Ergebnis einer solchen *in vitro* Versuchsreihe mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen. Es wird deutlich, dass mit zunehmender

Proteinkonzentration die Viabilität der Zellen abnimmt, jedoch keine anti-Ovalbumin immunglobulinsezernierenden Plasmazellen gebildet werden.

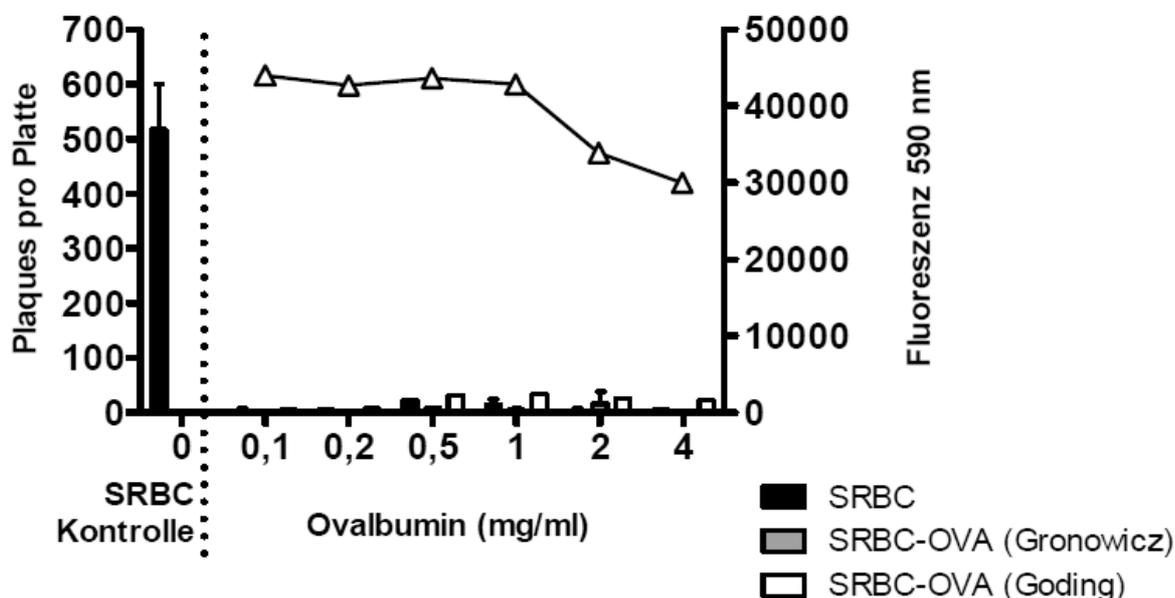


Abb. 26 MD Test von mit Ovalbumin *in vitro* stimulierten Milzzellen

Die Milzzellen von Wistarratten wurden in Duplikaten nach dem Standardprotokoll inkubiert und sowohl mit SRBC (Kontrolle) als auch ausschließlich mit den angegebenen Konzentrationen von Ovalbumin stimuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Plaques pro Petrischale (Balken) sowie die Mittelwerte der Viabilität von ovalbumin-stimulierten Zellen im Resazurintest (Linie). Für den Plaquetest an Tag 7 wurden die *in vitro* OVA-stimulierten Zellen dreifach ausplattiert: mit SRBC (schwarz), mit SRBC-OVA nach Gronowicz et al. (grau), sowie mit SRBC-OVA nach Goding (weiß).

Da eine reine *in vitro* Stimulation mit Ovalbumin zu keiner detektierbaren protein-spezifischen B-Zellantwort führte, wurden im nächsten Schritt Wistarratten entsprechend Abb. 27 *in vivo* mit Ovalbumin immunisiert. Im Einzelnen wurden Ratten an Tag null intraperitoneal, an Tag drei und vier intravenös mit Protein in PBS immunisiert. An Tag sieben erfolgte die Blutentnahme durch Anritzen der Schwanzvene und Serumgewinnung. Das Ergebnis wurde im Spotttest ausgelesen, indem Verdünnungsreihen von Serum auf mit SRBC-Protein beschichtete Objektträger aufgetragen und mit Komplement überschichtet wurden. Anschließend wurden die lysierten Areale (durch IgM) nach 2 h Inkubation bei 37 °C begutachtet. Optional wurde zusätzlich mit einem sekundären anti-IgG Antikörper inkubiert, um Lyse durch IgM und IgG zu erfassen.

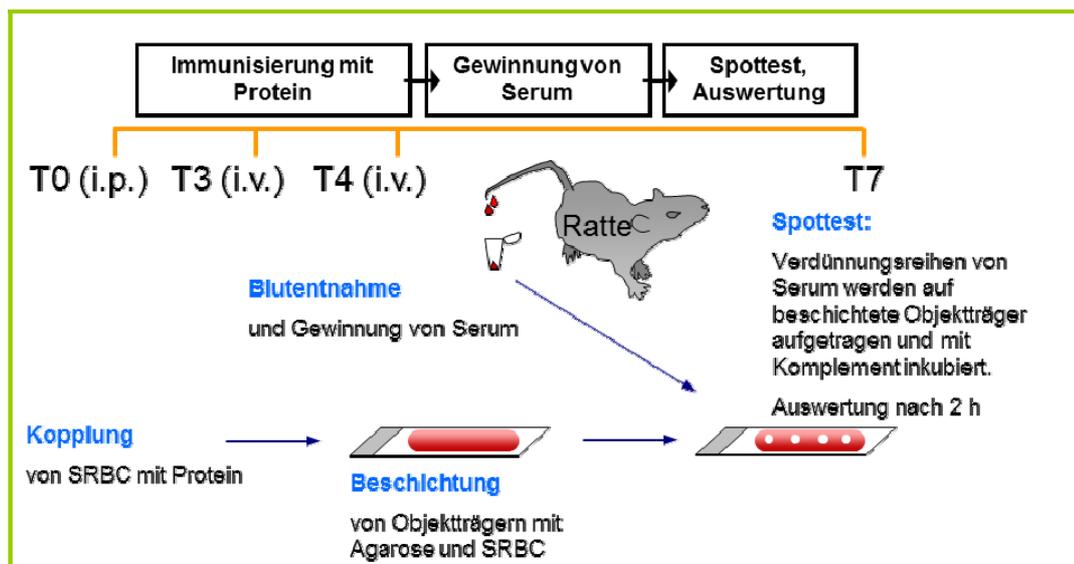
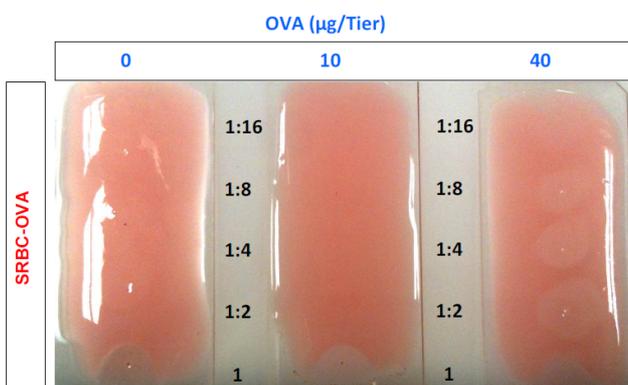


Abb. 27 Versuchsaufbau des *in vivo* Tests für Immunogenität

Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abb. 28 aufgeführt, wobei eine deutliche Lyse von mit Ovalbumin gekoppelten SRBC nach Auftrag von Serum aus einem mit 40 µg Protein immunisierten Tier erfolgt. Diese Reaktion lässt auf im Serum vorhandene, spezifische anti-Ovalbumin Immunglobuline schließen. Dagegen tritt keine unspezifische Lyse auf SRBC beschichteten Objektträgern auf. Auch Serum aus dem Kontrolltier führt nicht zu einer signifikanten SRBC-Lyse. Das mit einer geringen Dosis von 10 µg Ovalbumin immunisierte Tier verhält sich entsprechend der Kontrolle.

Objektträger	Behandlung	Serumverdünnung				
		1	1:2	1:4	1:8	1:16
SRBC	PBS	(+)	(+)	-	-	-
	OVA 10 µg	-	-	-	-	-
	OVA 40 µg	-	-	-	-	-
SRBC-OVA	PBS	++++	-	-	-	-
	OVA 10 µg	++++	-	-	-	-
	OVA 40 µg	++++	++++	+++	+++	+



Je eine Ratte wurde an T0 i.p. an T3 und 4 i.v. mit 100 µl Protein in PBS (10 µg oder 40 µg) oder 100 µl PBS immunisiert. An T7 erfolgte die Blutentnahme durch Anritzen der Schwanzvene und Serumgewinnung. Verdünnungsreihen von Serum wurden auf mit SRBC-Protein beschichtete Objektträger aufgetragen und mit Komplement überschichtet. Die lysierten Areale wurden nach 2 h Inkubation bei 37 °C abgelichtet. Die tabellarische Darstellung der Ergebnisse dient der Übersicht.

Abb. 28 Spotttest nach *in vivo* Immunisierung mit Ovalbumin

3.3. MD Test als Modell zur Untersuchung humoraler Immunantworten

Nachdem die humorale *in vitro* Immunreaktion gegen SRBC auf ihre Eignung als Test für die Vorhersage von immunsuppressiven Substanzen geprüft wurde, soll im nächsten Kapitel ermittelt werden, inwiefern der MD Test als Modell für die *in vivo* Situation dienen kann. Zu diesem Zweck soll die humorale *in vitro* Immunreaktion näher charakterisiert werden.

3.3.1 Charakterisierung der *in vitro* Immunreaktion gegen SRBC

Als erstes soll untersucht werden, ob die *in vitro* Antikörperantwort von antigenpräsentierenden Zellen abhängig ist. Dazu wurden MD Kulturen aus Milzzellen von Wistarratten angesetzt (Tag null). An Tag eins, also vor der Stimulation mit SRBC, wurden die nichtadhärenten Zellen aus der Kultur in neue 24-Well-Platten übertragen. Somit wurden die adhärenen Zellen, hauptsächlich Makrophagen und DC (zusammengefasst in Oehler *et al.*, 1978) aus der Kultur depletiert. Die Auswertung erfolgte wie üblich mit dem Plaquetest, verbunden mit einem Viabilitätstest an Tag sieben. Die tatsächliche Zellverteilung wurde durch FACS-Analysen vor und nach der Zelladhäsion ermittelt. Tab. 15 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung.

Tab. 15 Adhärenente Zellen sind notwendig für die *in vitro* Immunreaktion

	Kontrolle		nach Depletion adhären- ter Zellen üN		Änderung (%)	
	V1	V2	V1	V2	V1	V2
Plaques pro Platte	1613 ± 355	3587 ± 920	1148 ± 495	585 ± 340	-29%	-84%
Fluoreszenz 590 nm	8881 ± 818	8276 ± 3223	8561 ± 610	8317 ± 551	-4%	1%
CD45RA-RT1b+ (%)	5,4	9,7	3,9	7,6	-28%	-22%

Milzzellen von Wistarratten wurden für den MD ausgesät. Nach Inkubation über Nacht wurden adhärenente Zellen entfernt. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellzahl nichtadhärenenter Zellen bestimmt. Entsprechende Zellzahlen wurden in neue 24-Well-Platten ausgesät, mit SRBC stimuliert und nach Standardprotokoll weiterbehandelt. Der Anteil von CD45RA-RT1b+ Zellen wurde im FACS ermittelt. An T7 wurden der Plaquetest und der Resazurintest durchgeführt.

Man sieht, dass nach der Depletion der adhärenenten Zellen über Nacht der Anteil an CD45RA-negativen und gleichzeitig RT1b-positiven Zellen um mind. 20 % erniedrigt ist. Jedoch zeigen sich deutliche Unterschiede in der Verteilung dieser Zellpopulation zwischen mehreren unabhängigen Versuchen. So betrug der Anteil

CD45RA-negativer und gleichzeitig RT1b-positiver Zellen in einem Versuch vor der Depletion 5,4 %, der dann auf 3,9 % gesenkt werden konnte. In einem anderen Versuch wurde der Anteil dieser Zellpopulation von 9,7 % auf 7,6 % gesenkt. In beiden Fällen hatte dieser Rückgang eine reduzierte Plaquezahl bei unveränderter Viabilität zur Folge, sodass diese im ersten Experiment um etwa 30 % (von im Schnitt ca. 1.600 auf ca. 1.150 Plaques pro Platte) und im zweiten Experiment sogar um etwa 80 % (von im Schnitt ca. 3.600 auf ca. 600 Plaques pro Platte) gesenkt werden konnte.

Im nächsten Schritt sollte die T-Zell-Abhängigkeit der humoralen *in vitro* Reaktion überprüft werden. Dazu wurden durch magnetische Zellsortierung T-Zellen aus Milzzellkulturen von Wistarratten an Tag null oder an Tag zwei isoliert und die T-Zell-depletierten MD Kulturen weiterkultiviert. Für die Auswertung wurden die Plaquezahlen und Viabilitäten an Tag sieben sowie FACS-Analysen von CD3-positiven Zellen vor und nach der Depletion herangezogen. Abb. 29 zeigt exemplarisch das Ergebnis von einem Experiment, wobei das Ergebnis gut reproduzierbar war (Daten nicht gezeigt). Man sieht, dass eine deutliche Reduktion von CD3-positiven Zellen an Tag null von 36 % auf 15 % eine etwa 80 %ige Minderung der Plaquezahlen (von ca. 1.600 auf ca. 300 Plaques pro Platte) bei ungeminderter Viabilität bewirkt. Das Ergebnis sieht auch nach Depletion der T-Zellen an Tag zwei ähnlich aus. Hier wurden ebenfalls 80 % der Plaques inhibiert, indem der T-Zellanteil von 35 % auf 12 % gesenkt wurde.

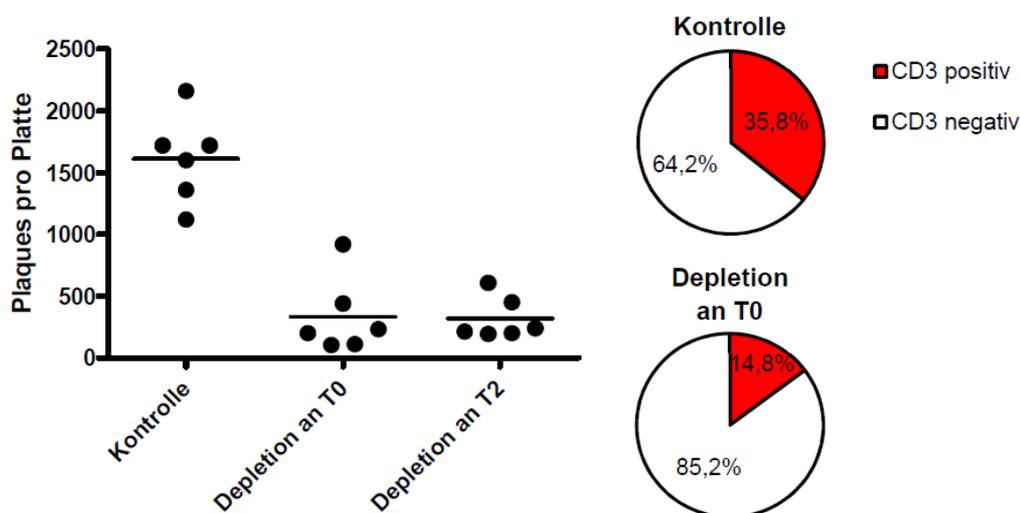


Abb. 29 *In vitro* Immunreaktion ist T-Zell-abhängig

Milzzellen von Wistarratten wurden an T0 oder an T2 mit einem anti-T-Zell Antikörper markiert. Durch magnetische Zellsortierung wurden die markierten Zellen depletiert, die Zellen wieder ausplattiert und nach Standardprotokoll weiterbehandelt. Im FACS wurden die Zellpopulationen vor und nach Depletion mit einem

FITC-gekoppelten anti-CD3 Antikörper analysiert. Die Kreisdiagramme zeigen exemplarisch das Ergebnis der FACS-Analyse vor (Kontrolle) und nach Depletion an T0. Der Plaquetest wurde an T7 durchgeführt.

Um die *in vitro* Immunreaktion näher zu erforschen, wurden die MD Kulturen an verschiedenen Tagen durch FACS-Analysen untersucht. Dazu wurden die Zellen an Tag null herangezogen oder an den Tagen eins, zwei, vier, sieben, neun und vierzehn geerntet und verschiedene Zellpopulationen durch markieren mit anti-CD4-PE und anti-CD45RC-FITC oder anti-CD25-FITC sowie mit anti-CD45RA-PE und anti-RT1b-FITC Antikörpern analysiert.

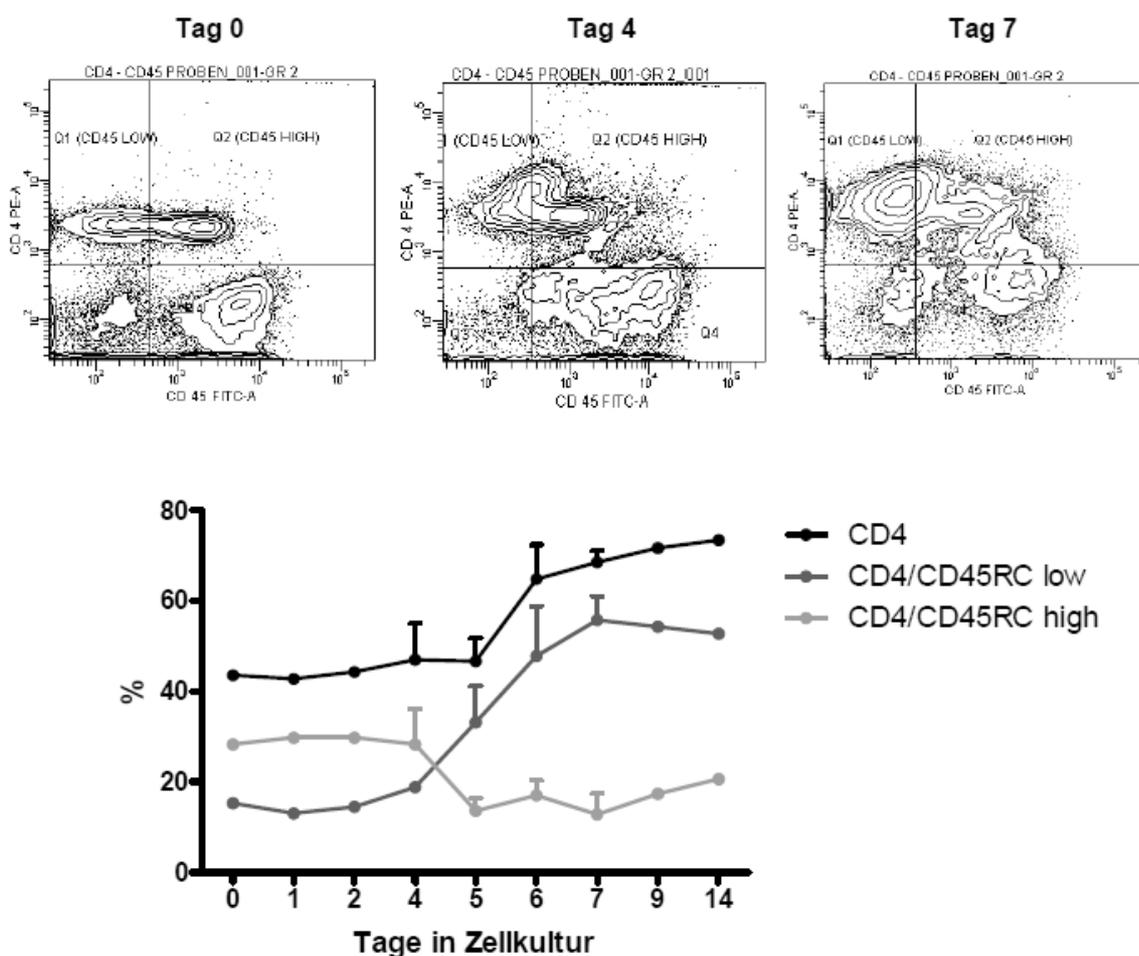


Abb. 30 Verteilung der CD4- und CD45RC-positiven Zellen während der *in vitro* Immunreaktion

MD Kulturen wurden mit PBMC von Wistarratten nach Standardprotokoll durchgeführt. An den angegebenen Tagen wurden die Zellen geerntet und FACS-Analysen der Zellpopulationen durchgeführt. Als Antikörper wurden anti-CD4-PE und anti-CD45RC-FITC verwendet. Es wurden Zellen im Leukozyten-Gate aufgenommen und CD4-positive Zellen sowie CD4-positive und gleichzeitig CD45RC niedrig (low)- oder CD45RC hoch (high)-exprimierende Zellen für die Auswertung herangezogen. Konturdiagramme zeigen exemplarisch die Zellverteilung an Tag 0, 4 und 7. Das Diagramm fasst die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen zusammen. N=1 für T0,1,2,9,14; n=2 für T5,6; n=3 für T4,7.

CD4-positive Lymphozyten sind mit etwa 44 % in isolierten PBMC der Wistarratten vertreten (Tag null). In den ersten beiden Tagen der Zellkultur bleibt der Anteil

stabil, steigt an Tag sechs auf 65 % und erhöht sich an Tag vierzehn weiter auf 73 %. CD4-positive Zellen exprimieren an den Tagen null bis vier zu etwa 30 % CD45RC high (Abb. 30). An den Tagen fünf bis sieben nimmt diese Expression von CD45RC high auf etwa 15 % ab. Gleichzeitig steigt der Anteil von CD45RC schwach exprimierenden CD4-positiven Zellen von etwa 15 % auf über 30 % an Tag fünf und auf um die 50 % an den Tagen sechs bis vierzehn. Dabei exprimieren die großen CD4-positiven Zellen (CD4 Blasten) überwiegend deutlich CD45RC (Daten nicht gezeigt).

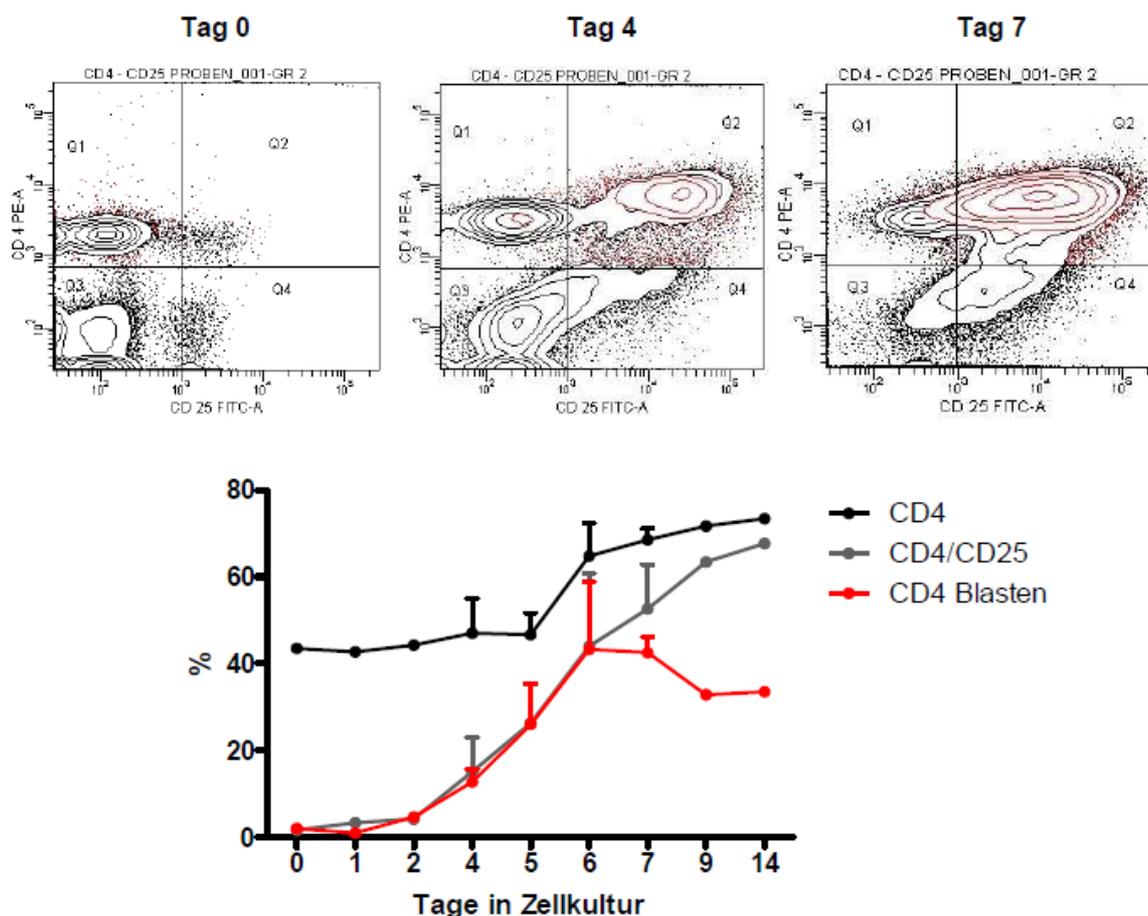


Abb. 31 Zellverteilung der CD4- und CD25-positiven Zellen während der *in vitro* Immunreaktion

MD Kulturen mit PBMC von Wistarratten wurden wie in Abb. 30 beschrieben behandelt. Als Antikörper wurden anti-CD4-PE und anti-CD25-FITC verwendet. Es wurden Zellen im Lymphozyten-Gate aufgenommen und CD4-positive und gleichzeitig CD25-positive Zellen für die Auswertung herangezogen. Große CD4-positive Zellen (CD4 Blasten) sind in Rot hervorgehoben. Konturdiagramme zeigen exemplarisch die Zellverteilung an Tag 0, 4 und 7. Das Diagramm fasst die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen zusammen. $n=1$ für T0,1,2,9,14; $n=2$ für T5,6; $n=3$ für T4,7.

Ab Tag vier ist ein Anstieg von CD25-positiven CD4 Lymphozyten messbar, so dass deren Anteil von 2 % an Tag null auf 44 % an Tag 6 ansteigt. Parallel dazu nimmt auch der Prozentsatz von großen CD4-exprimierenden Zellen (CD4 Blasten) zu. Wie aus den Konturdiagrammen in Abb. 31 deutlich wird, sind die Blasten

gleichzeitig CD25-positiv. Der Anteil von CD4 Blasten sinkt mit zunehmender Zellkulturdauer um etwa zehn Prozentpunkte an Tag neun bis vierzehn. Jedoch steigt der Anteil von CD25- und CD4-doppeltpositiven Zellen bis Tag vierzehn auf 68 % weiter an. Auch CD4-negative Lymphozyten exprimieren im Verlauf der Immunreaktion vermehrt CD25. Zu Beginn der Zellkultur liegt der Anteil von CD25-positiven CD4-negativen Lymphozyten bei 3 %, steigt dann an Tag sieben auf fast 15 % und bleibt bis Tag vierzehn zunehmend auf 19 %.

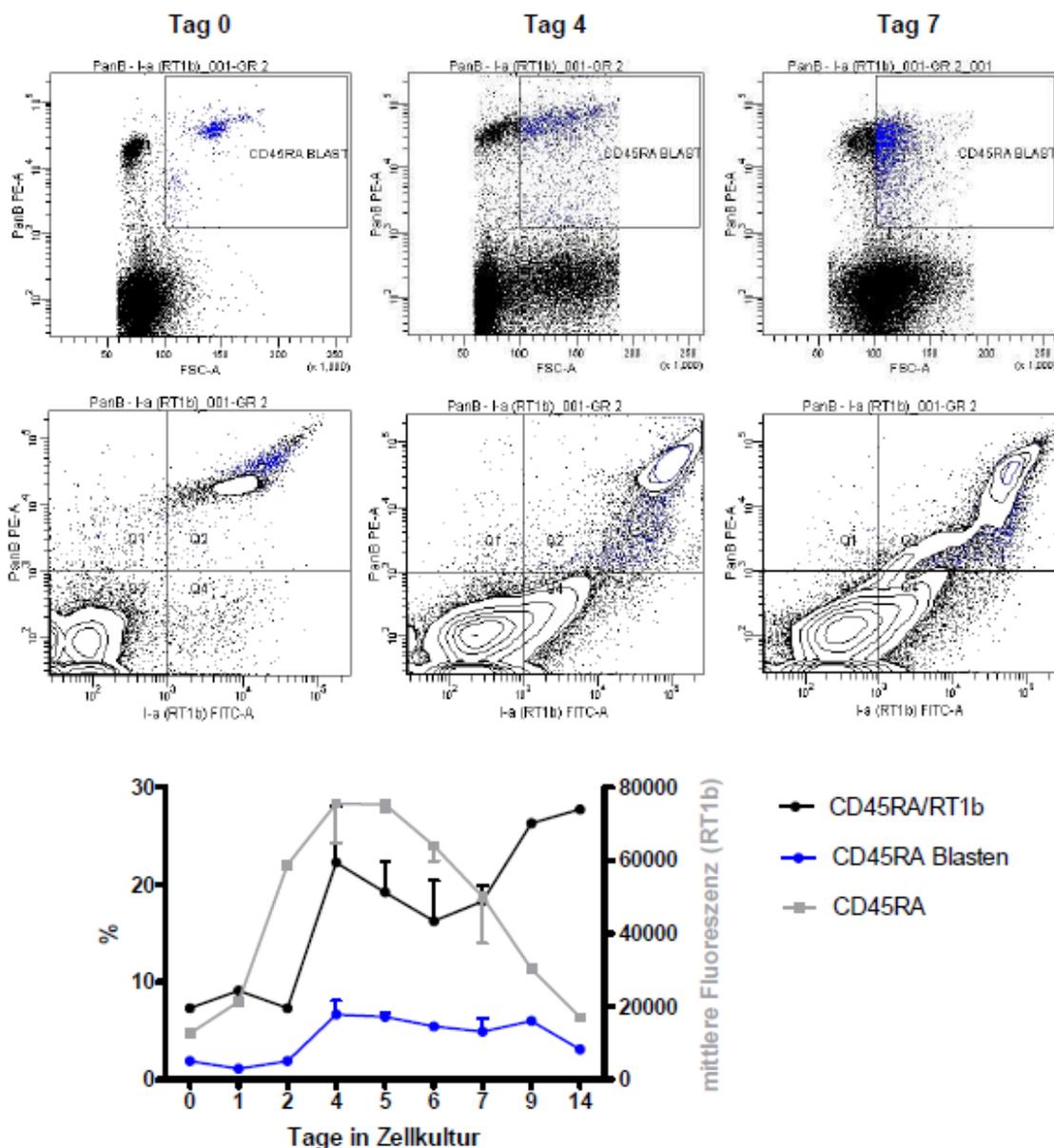


Abb. 32 Verteilung der CD45RA- und RT1b-positiven Zellen während der *in vitro* Immunreaktion

MD Kulturen mit PBMC von Wistar-Ratten wurden wie in Abb. 30 beschrieben behandelt. Als Antikörper wurden anti-CD45RA-PE und anti-RT1b-FITC verwendet. Es wurden Zellen im Leukozyten-Gate aufgenommen, und CD45RA-positive und/oder gleichzeitig RT1b-positive Zellen für die Auswertung herangezogen. Große CD45RA-positive Zellen (CD45RA Blasten) sind in Blau hervorgehoben. Dot-Plot und Konturdiagramme zeigen exemplarisch die Zellverteilung an Tag 0, 4 und 7. Das Diagramm fasst die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen zusammen. $n=1$ für T0,1,2,9,14; $n=2$ für T5,6; $n=3$ für T4,7.

Der Anteil von CD45RA- und RT1b-doppeltpositiven Zellen steigt von unter 10 % auf etwa 20 % (Tag vier und fünf) an. An den folgenden Tagen geht deren Anteil vorübergehend leicht zurück (18 % an Tag sieben), steigt dann aber auf fast 28 % an Tag vierzehn (Abb. 32). Wie aus dem Konturdiagramm von Tag sieben deutlich wird, nimmt die Expression von CD45RA mit zunehmender Kulturdauer ab. Zusätzlich verändert sich die Expression von RT1b in den CD45RA-positiven Zellen im Laufe der *in vitro* Immunreaktion, sodass die RT1b Expression, ausgehend von 12.600 RFU an Tag null, an den Tagen vier und fünf mit einer mittleren Fluoreszenzintensität von über 75.000 RFU ihren Höhepunkt erreicht. Ab Tag sechs geht diese stetig zurück, wodurch nur noch etwa 17.000 RFU an Tag vierzehn detektierbar sind.

An Tag null ist eine kleine (2 %), aber deutliche Population von großen CD45RA-positiven Zellen (Blasten) sichtbar, die sowohl CD45RA als auch RT1b hoch exprimieren (Abb. 32). Diese Population ist im weiteren Verlauf der *in vitro* Immunreaktion nicht mehr vorhanden. Stattdessen entsteht eine neue, bezüglich der Zellgröße einheitlichere Population CD45RA-positiver Zellen mittlerer Größe. Wie das Liniendiagramm zeigt, steigt der Anteil von diesen CD45RA-positiven Blasten an Tag vier auf fast 7 % und sinkt im weiteren Verlauf wieder auf 3 % an Tag vierzehn.

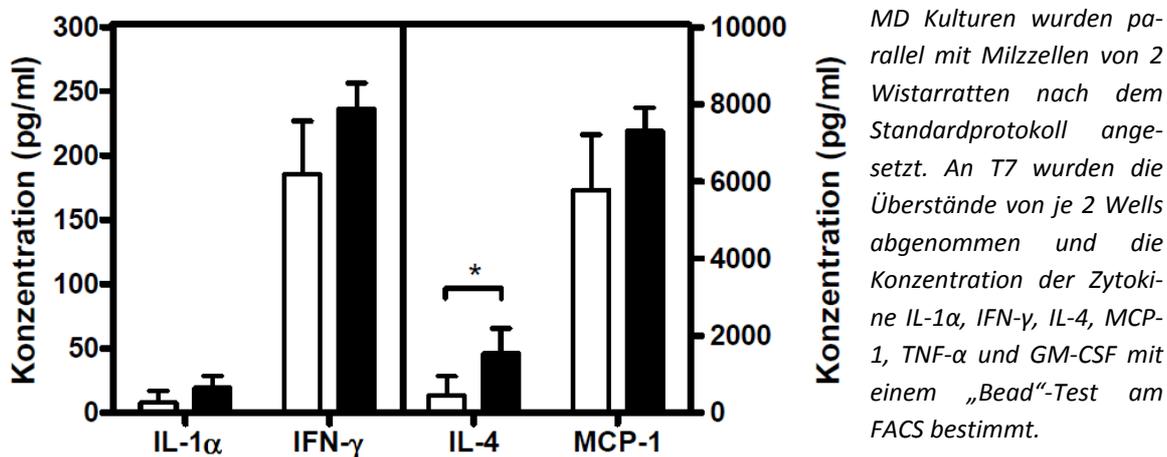


Abb. 33 Zytokinprofil der *in vitro* Immunreaktion mit Milzzellen

Das Balkendiagramm zeigt die ermittelte Konzentration der angegebenen Zytokine mit Standardabweichung für MD Kulturen, die nicht mit SRBC stimuliert wurden (weiße Balken) im Vergleich zu stimulierten Ansätzen (schwarze Balken). Signifikanzanalysen von stimulierten vs. unstimulierten Proben wurden mit dem Students *t*-Test für unpaarige Proben durchgeführt. *: $p=0,0368$.

Um die humorale *in vitro* Reaktion eingehender zu untersuchen, wurden die Zytokine IL-1 α , IFN- γ , IL-4, MCP-1, TNF- α und GM-CSF in den Überständen von MD

Kulturen an Tag sieben bestimmt. Dabei konnten in Milzzellkulturen aus Ratten alle getesteten Zytokine bis auf GM-CSF nachgewiesen werden, wobei im Medium allein keine Zytokine detektiert werden konnten. Aus Abb. 33 wird deutlich, dass die Zytokine IL-1 α , IFN- γ , IL-4 und MCP-1 in größeren Mengen von stimulierten Zellen im Vergleich zu nichtstimulierten Zellen gebildet werden. Dabei wurden in nichtstimulierten Proben geringe Mengen von IL-1 α (8 ± 9 pg/ml) produziert, die sich nach der Stimulation annähernd verdoppelten (19 ± 9 pg/ml). IFN- γ wurde in größeren Mengen in allen Proben gebildet (-SRBC: 186 ± 41 pg/ml; +SRBC: 237 ± 20 pg/ml). Statistisch signifikante Unterschiede wurden für das Zytokin IL-4 für beide Bedingungen ermittelt, wobei IL-4 von stimulierten Milzzellen (1.540 ± 648 pg/ml) fast 3,5 Mal mehr gebildet wurde als von nichtstimulierten Zellen (444 ± 501 pg/ml). Die größten Mengen wurden für das Chemokin MCP-1 bestimmt, wobei es in Proben mit nichtstimulierten Zellen im Schnitt in Konzentrationen um etwa 6.000 pg/ml vorlag. Stimulierte Milzzellen wiesen eine MCP-1 Konzentration von 7.300 ± 600 pg/ml auf. TNF- α wurde sowohl in stimulierten als auch in nichtstimulierten Milzzellkulturen in geringen Konzentrationen von etwa 26 pg/ml detektiert (Daten nicht gezeigt).

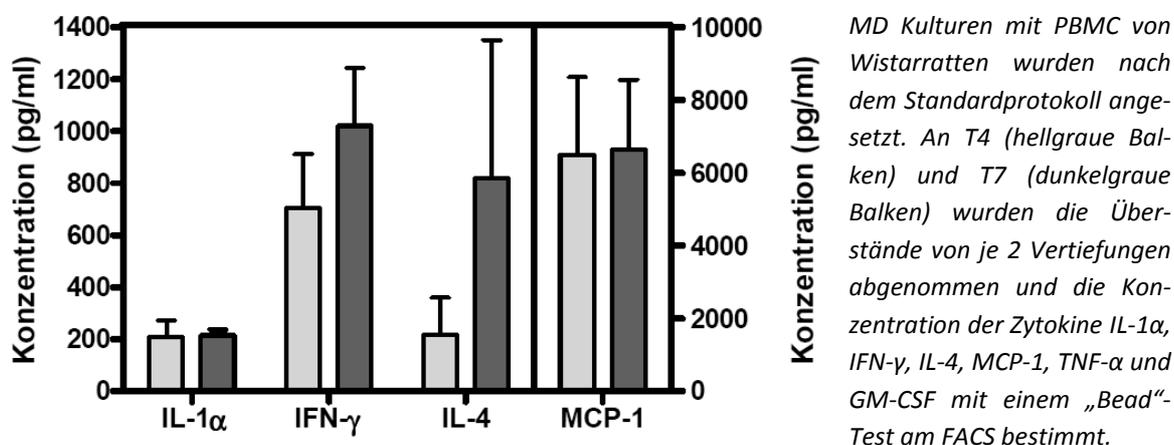


Abb. 34 Zytokinprofil der *in vitro* Immunreaktion mit PBMC

Das Balkendiagramm zeigt die ermittelte Konzentration der angegebenen Zytokine mit Standardabweichung für mit SRBC stimulierte MD Kulturen aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Unterschiede erwiesen sich nach Anwendung von Students t-Test für unpaarige Proben von stimulierten vs. unstimulierten Proben als nicht signifikant.

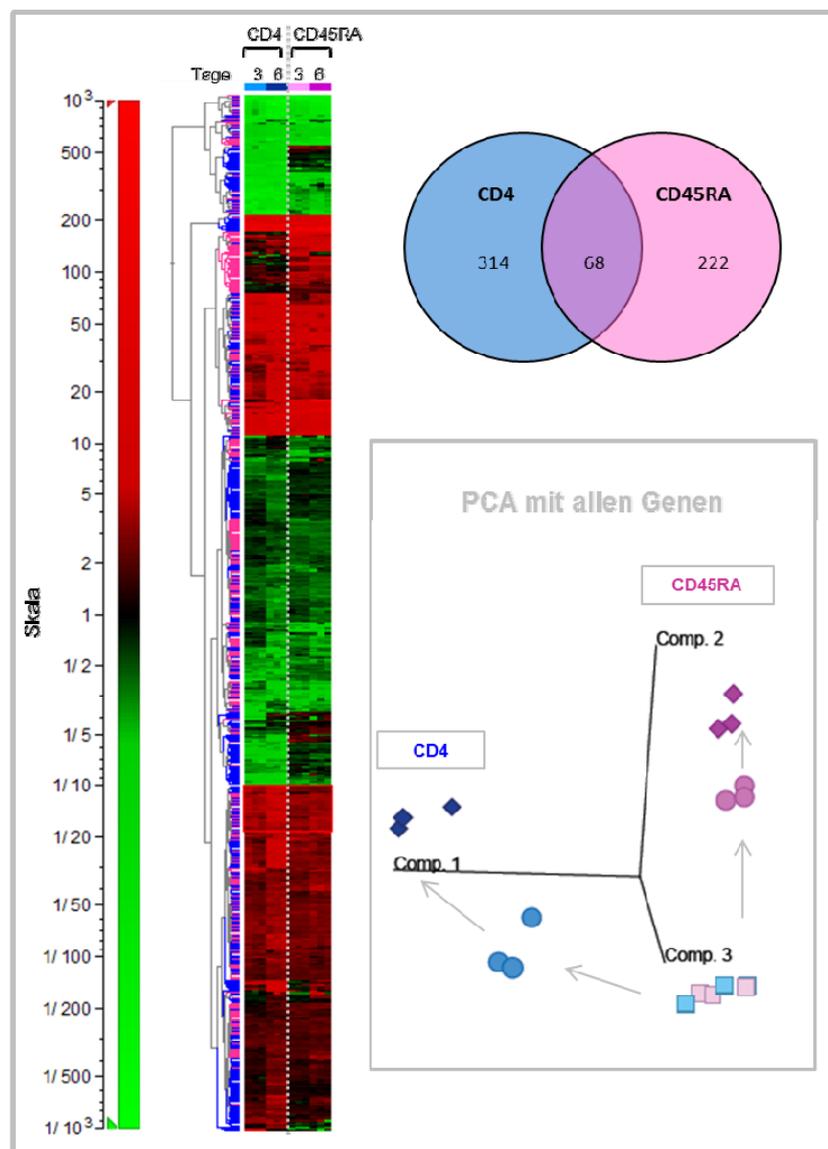
Auch in MD Kulturen mit PBMC aus Wistarratten wurden die Zytokine IL-1 α , IFN- γ , IL-4 und MCP-1 in höheren Konzentrationen nachgewiesen. Zusätzlich wurden in einigen Proben TNF- α und GM-CSF in geringen Konzentrationen (unter 20 pg/ml) festgestellt (Daten nicht gezeigt). Sowohl an Tag vier als auch an Tag sieben wur-

den stabile Konzentrationen von IL-1 α (ca. 210 pg/ml) und MCP-1 (ca. 6.500 pg/ml) gemessen. Die Konzentration von IFN- γ war deutlich höher als in den Milzzellkulturen und nahm von 705 \pm 206 pg/ml an Tag vier auf 1.020 \pm 223 pg/ml an Tag sieben zu. Ebenfalls ist für IL-4 eine deutliche, jedoch nicht signifikante, Zunahme von im Durchschnitt 216 \pm 144 pg/ml an Tag vier auf 818 \pm 532 pg/ml an Tag sieben gemessen worden.

Um die zeitliche Entwicklung von Zellen während der *in vitro* Immunreaktion eingehender zu charakterisieren, wurden Genexpressionsanalysen an Tag null, drei und sechs von Milzzellkulturen durchgeführt. Dafür wurden zum einen CD4-exprimierende und zum anderen CD45RA-exprimierende Zellen durch magnetische Zellsortierung aufgereinigt. Diese Zellen wurden im FACS überprüft, wobei die Reinheit der isolierten Milzzellen mit dem anti-CD4 Antikörper im Durchschnitt 82 % an Tag null, 92 % an Tag drei und 97 % an Tag sechs betrug. Der Anteil an CD3-positiven Zellen lag in dieser Zellpopulation bei 48 % an Tag null, bei 87 % an Tag drei und bei 95 % an Tag sechs. Anti-CD45RA isolierte Zellen waren auch im FACS 88 % CD45RA-positiv an Tag null und drei sowie 95 % positiv an Tag sechs. Aus diesen Zellen wurde die RNA isoliert. RNA von guter Qualität (Daten nicht gezeigt) wurde in cDNA umgeschrieben, durch *in vitro* Transkription in aRNA überführt, amplifiziert und mit Biotin markiert. Nach der Aufreinigung wurde die aRNA fragmentiert, einer Qualitätsprüfung unterzogen und mit dem Rat Genome 230 2.0 Mikroarray hybridisiert. Nach Hybridisierung der Mikroarrays wurden diese nach Protokoll gewaschen und mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin inkubiert. Die Fluoreszenzsignale wurden am AGCC Scanner detektiert. Diese Signale sind proportional zur Ausgangsmenge einer bestimmten mRNA in einer Probe. Die statistische Auswertung der Intensitätswerte und die Qualitätskontrollen erfolgten laut Beschreibung im Methodenteil. Die Box-Plot-Analyse im Anhang (A.2) veranschaulicht die absolute Expression von allen exprimierten Genen. Die gleichmäßige Verteilung der Gene und ein ähnlicher Median in allen Proben belegen die gute Qualität der Expressionsdaten.

Die statistische Auswertung der Daten im Hinblick auf die zeitliche Änderung der Genexpression von CD4- und CD45RA-positiven Zellen ergab 604 Gene, die mind. zweifach dereguliert wurden (Heatmap in der Abb. 35). Dabei wurden insgesamt 382 Gene in CD4-positiven und 290 Gene in CD45RA-positiven Zellen an den Tagen drei und sechs mehr als zweifach anders exprimiert im Vergleich zu

Tag null. Davon wurden 53 % in CD4-positiven Zellen und 58 % in CD45RA-positiven Zellen hochreguliert. Wie durch das Venn Diagramm verdeutlicht, wurden im Wesentlichen unterschiedliche Gene zwischen den Zellpopulationen detektiert. 68 Gene (ca. 11 %) wurden bei den gewählten Kriterien von beiden Populationen gemeinsam als mind. zweifach dereguliert ermittelt (Abb. 35).



MD Kulturen mit Milzzellen von 3 Wistar-Ratten wurden nach dem Standardprotokoll parallel angesetzt. An T0, T3 und T6 wurden die Zellen geerntet und CD4-positive sowie CD45RA-positive Zellen wurden durch magnetische Zellsortierung isoliert und für Genexpressionsanalysen verwendet. Die Heatmap und das Venn Diagramm zeigen Gene mit mind. zweifach veränderter Expression (insgesamt 604 Gene) von CD4-positiven (blau) und CD45RA-positiven (pink) Zellen im Vergleich zu den jeweiligen Zellen an Tag 0. Die PCA wurde mit allen Genen erstellt um die Änderung der Genexpression zu veranschaulichen. Symbole in der PCA: Quadrate: D0; Kreise: D3; Rauten: D6.

Abb. 35 Vergleich der Genexpression von CD4-positiven und CD45RA-positiven Milzzellen im Verlauf der *in vitro* Immunreaktion

Aus der Heatmap kann entnommen werden, dass insgesamt deutlich mehr als 68 Gene gemeinsam in die gleiche Richtung dereguliert wurden, sodass der Anteil der qualitativ unterschiedlich exprimierten Gene bei ca. 25 % liegt. Die Analyse der Hauptkomponenten (PCA in der Abb. 35) veranschaulicht die Differenzen der Genexpression von CD4-positiven und CD45RA-positiven Zellen unter Berücksichtigung des gesamten Rattengenoms. Die Datenpunkte der Triplikate liegen in

räumlicher Nähe zueinander. Zudem sind die Werte für beide Zellpopulationen an Tag Null ähnlich, entwickeln sich aber im Verlauf der *in vitro* Immunreaktion in unterschiedliche Richtungen. CD4-positive Zellen wurden im Anschluss funktionell weiter analysiert. Dafür wurden Gene, die an den Tagen drei oder sechs mind. zehnfach verändert exprimiert wurden, herangezogen (124 Gene). Alle Gene konnten in die Kategorien Immunsystem (47 Gene), Metabolismus (35 Gene), Zellzyklus (22 Gene) und die Kategorie Gene mit unbekannter Funktion (20 Gene) eingeordnet werden (Abb. 36). Die im Text vorkommenden Gene und deren Genprodukte sind im Anhang (A.1) unter den Abkürzungen und den dazugehörigen ausgeschrieben Bezeichnungen zusammengefasst.

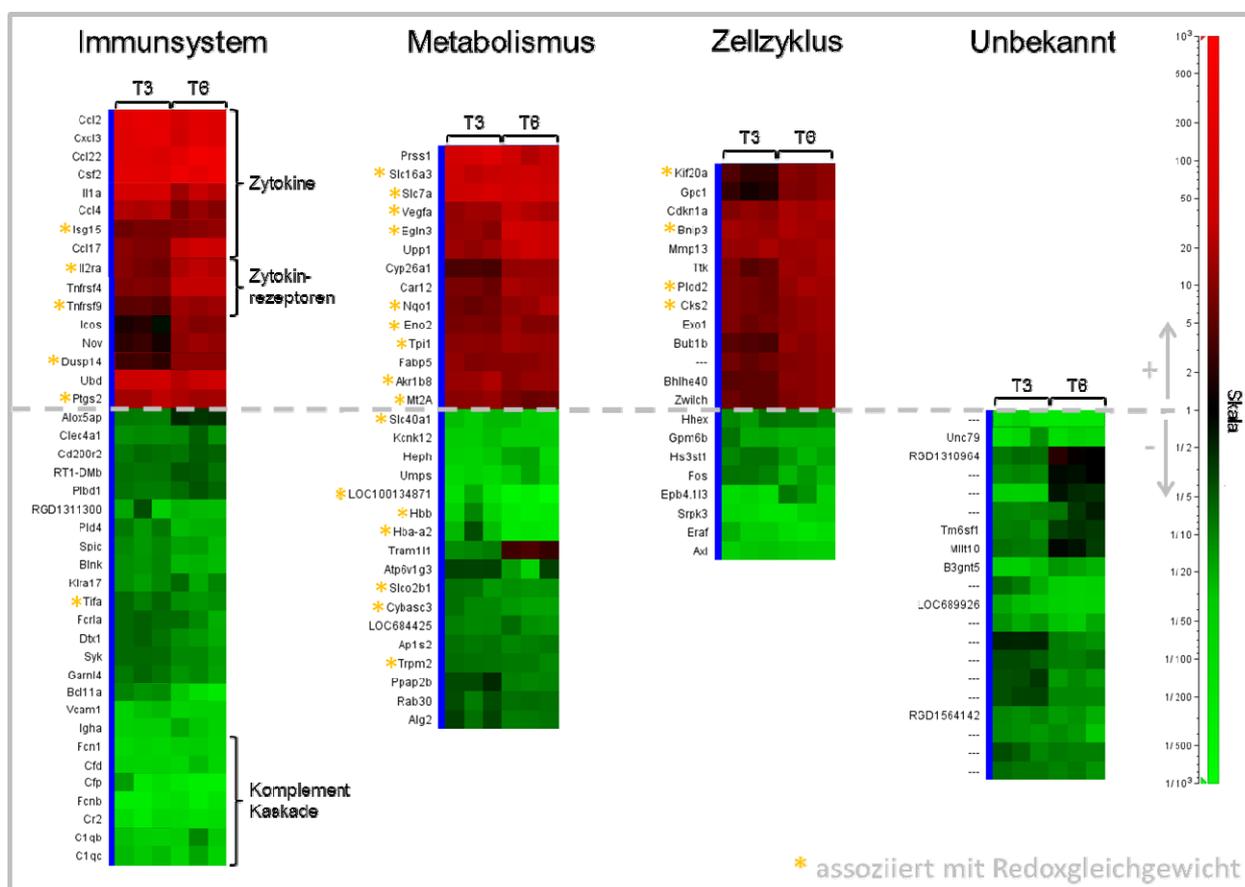


Abb. 36 Mehr als zehnfach deregulierte Gene aus CD4-positiven Milzzellen während der *in vitro* Immunreaktion

Der Versuch wurde, wie in Abb. 35 beschrieben, durchgeführt. Die Abbildung zeigt Gene mit mind. 10-fach veränderter Expression im Vergleich zu Tag 0.

In der Kategorie Immunsystem finden sich Gene für Zytokine und Zytokinrezeptoren, die sehr stark hoch reguliert sind (z.B. *Ccl22*, 300-fach hochreguliert), sowie das Gen für den T-Zell kostimulatorischen Rezeptor (*Icos*), Gene für Komponen-

ten von Signalwegen wie *Dusp14* und *Ptgs2* und mit Zelldifferenzierung assoziierte Gene (*Nov*, *Ubd*). Besonders stark runterregulierte Gene in der Kategorie Immunsystem kodieren für einige Komponenten des Komplement Systems (bis zu 500-fach runterreguliert), B-Zell assoziierte Gene, wie MHC II Gene (*RT1-DMb*), B-Zelllinker (*Blnk*), der Fc Rezeptor (*Fcrla*) sowie die mRNA für das Zinkfinger Protein Bcl11a und die Immunglobulin schwere Kette (*Igha*). Zudem sind die Gene für den DC-Rezeptor *Cd200r2*, die Deltakette des T-Zellrezeptors (*RGD1311300*) sowie für den NK-Rezeptor *Klra17* stark runterreguliert. Desweiteren finden sich in dieser Gruppe Gene, welche für Proteine kodieren, die an dem immunassoziierten Fettsäuremetabolismus beteiligt sind (*Alox5ap*, *Plbd1*, *Pld4*) sowie für die Signalweiterleitung wichtige Gene (*Tifa*, *Syk*). Auch Gene, die mit Transkription assoziiert sind, wie Deltex1 (*Dtx1*) und Spic Transkriptionsfaktor (*Spic*), sind runterreguliert, ebenso wie das für Zelladhäsion wichtige Gen *Vcam1*.

Eines der am stärksten induzierten Gene in der Metabolismus Gruppe ist *Slc7a*, welches für einen kationischen Aminosäuretransporter kodiert. Ein weiterer hochregulierter Transporter ist *Slc16a3*. Dagegen sind die Transporter für Zink (*Slc40a1*), Kalium (*Kcnk12*), Eisen (*Heph*), Wasserstoff (*Atp6v1g3*), organische Anione (*Slco2b1*), Proteine (*Tram111*, *Ap1s2*, *Rab30*) sowie Natrium und Kalzium (*Trpm2*) runterreguliert. Dabei ist *Tram111* nur an Tag drei zehnfach supprimiert, dagegen an Tag sechs dreifach induziert. Einige Gene, deren Expression durch den Sauerstoffgehalt oder oxidativen Stress dereguliert wird, wie z.B. für Reduktasen kodierende Gene (*Nqo1*, *Akr1b8*), das Hif Prolylhydroxylasegen *Egln3* sowie das mit der Sauerstoffversorgung assoziierte Gen *Vegfa*, sind sehr stark hochreguliert. Ebenso sind an der Glykolyse beteiligte Gene, wie *Eno2* und *Tpi1*, hochreguliert (weitere Glykolysegene, wie *Pkm2*, *Gapdh*, *Aldoa*, *Ldha*, *Pfkl* und *Pgam1*, sind mehr als zweifach induziert), wogegen die mRNA für eine an der Atmungskette beteiligte Cytochrom b Isoform (*Cybasc3*) runterreguliert ist. Weitere mit dem Sauerstofftransport assoziierte Gene (*Hbb*, *Hbb-a2*, *LOC100134871*) sind sehr stark supprimiert. Auch in dieser Gruppe sind Fettsäuremetabolismus assoziierte Gene, wie das Gen für Transport *Fabp5* (zehnfach induziert) oder das für ein Lipidsyntheseprotein kodierende *Ppap2b* (zehnfach supprimiert), reguliert.

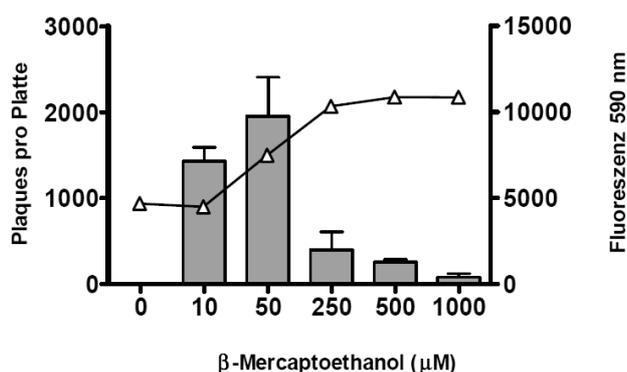
Am Zellzyklus beteiligte Gene, die mehr als zehnfach dereguliert sind, sind überwiegend positiv reguliert. In dieser Gruppe sind auch Apoptose fördernde Gene, wie *Bnip3* (über 15-fach induziert) und *Fos* (10-fach supprimiert), zusammenge-

fasst sowie Zytoskelettgene, wie das induzierte *Plod2* oder die reprimierten *Hs3st1* und *Epb4.1l3*, vertreten. Gene, die überwiegend mit Zelldifferenzierung in Zusammenhang stehen, sind in dieser Gruppe *Mmp13* (15-fach induziert) und die runterregulierten *Hhex*, *Gpm6b*, *Eraf*. Die meisten anderen Gene dieser Gruppe kodieren für Proteine, welche direkt an der Zellteilung beteiligt sind, wobei diese alle deutlich hochreguliert sind.

Die Gruppe mit der unbekanntem Funktion, setzt sich ausschließlich aus negativ regulierten Genen zusammen, die z.T. nur an Tag drei oder sechs supprimiert sind. Auffällig ist der hohe Anteil an mehr als zehnfach deregulierten Genen im Verlauf der *in vitro* Immunreaktion, die mit dem Redoxgleichgewicht bzw. der sauerstoffgehaltassoziierten Regulation, unter anderem durch Hypoxie oder oxidativen Stress, in Verbindung gebracht werden können. In der Gruppe der mehr als zweifach deregulierten Gene wurden 20 % (78 Gene) mit dem Redoxstatus assoziiert, wobei fast 80 % von diesen Genen hochreguliert wurden.

3.3.2 MD Test als Modell für die Analyse der oxidativen Regulation während der Immunreaktion

Während der Etablierung der *in vitro* Immunreaktion an primäre Zellen diversen Ursprungs ist die Notwendigkeit der Supplementierung des Mediums mit β -Mercaptoethanol deutlich geworden. Dabei variieren die idealen 2-ME Konzentrationen zwischen den verschiedenen Zellen. In Abb. 10 ist die 2-ME Abhängigkeit von Maus-PBMC gezeigt. Auch verdeutlichen die Tabellen (Tab. 4-6) die unterschiedlichen Konzentrationen von 2-ME, die als ideal für die jeweiligen verwendeten Zellen bestimmt wurden. Um diesen Einfluss auf Milzzellen von Wistarratten zu dokumentieren, wurden die Primärzellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von 2-ME kultiviert und die Endpunkte Plaquezahl pro Platte sowie Viabilität bestimmt (Abb. 37).

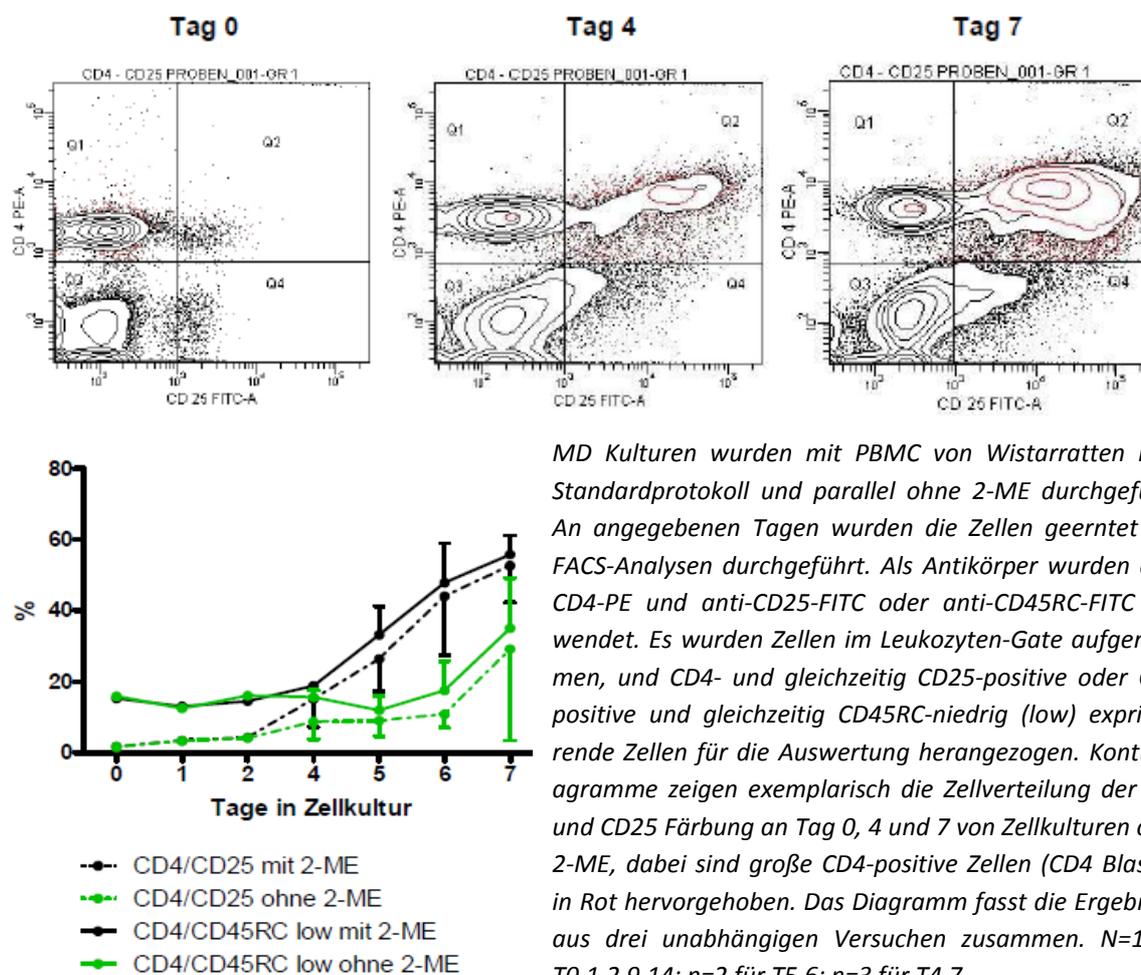


MD Kulturen wurden mit Milzzellen von Wistarratten in Duplikaten mit unterschiedlichen Konzentrationen von β -Mercaptoethanol durchgeführt. An Tag 7 wurden die Plaquezahlen (Balken) und die Resazurinabsorption (Dreiecke) ermittelt.

Abb. 37 Verlauf der *in vitro* Immunreaktion in Abhängigkeit von 2-ME

Es wird deutlich, dass ohne Zusatz von 2-ME nach sieben Tagen keine SRBC-spezifischen Antikörper detektiert werden können. Dagegen ist mit 10 μM 2-ME eine deutliche Antikörperproduktion von über 1.400 Plaques pro Platte sichtbar, welche mit 50 μM 2-ME auf ca. 2.000 Plaques pro Platte gesteigert werden kann. Höhere 2-ME Konzentrationen wirken inhibierend, sodass 250 μM 2-ME in der Zellkultur in ca. 400 Plaques pro Platte resultieren und mit 1.000 μM 2-ME nur noch vereinzelt Plasmazellen gebildet werden. Die Fluoreszenz von Resazurin bei 590 nm und damit die Viabilität der Zellen steigert sich mit zunehmenden Konzentrationen von 2-ME. Geringe Konzentrationen von 2-ME bis 10 μM resultieren in einer Fluoreszenz von ca. 5.000 MFU, welche mit 250 bis 1.000 μM 2-ME auf über 10.000 MFU verdoppelt werden können.

Anschließend wurde der Einfluss von 2-ME auf die Zellverteilung und das Aktivierungsprofil der Zellen im FACS untersucht. Parallel zu den Versuchen aus Abb. 30 bis 32 wurden die Zellen ohne 2-ME kultiviert.

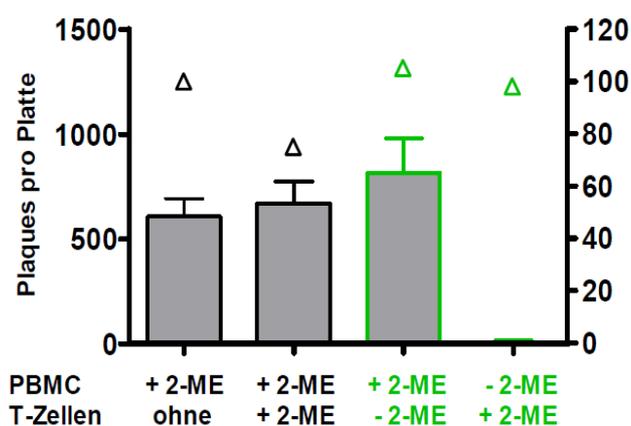


MD Kulturen wurden mit PBMC von Wistarratten nach Standardprotokoll und parallel ohne 2-ME durchgeführt. An angegebenen Tagen wurden die Zellen geerntet und FACS-Analysen durchgeführt. Als Antikörper wurden anti-CD4-PE und anti-CD25-FITC oder anti-CD45RC-FITC verwendet. Es wurden Zellen im Leukozyten-Gate aufgenommen, und CD4- und gleichzeitig CD25-positive oder CD4-positive und gleichzeitig CD45RC-niedrig (low) exprimierende Zellen für die Auswertung herangezogen. Konturdiagramme zeigen exemplarisch die Zellverteilung der CD4 und CD25 Färbung an Tag 0, 4 und 7 von Zellkulturen ohne 2-ME, dabei sind große CD4-positive Zellen (CD4 Blasten) in Rot hervorgehoben. Das Diagramm fasst die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen zusammen. N=1 für T0,1,2,9,14; n=2 für T5,6; n=3 für T4,7.

Abb. 38 Zellverteilung der CD4-positiven und CD25- oder CD45RC-positiven Zellen während der *in vitro* Immunreaktion ohne 2-ME

In diesem Experiment wurden im Durchschnitt 350 Plaques pro Platte unter + 2-ME Bedingungen nach Ablauf der siebentägigen Kultur gezählt, wohingegen ohne 2-ME keine Plaques auftraten (Daten nicht gezeigt). Wie Abb. 38 zeigt, lässt sich ein signifikanter Effekt auf die CD4-positiven Leukozyten feststellen. Dabei wird in Zellkulturen ohne 2-ME kein deutlicher Anstieg der CD4/CD45RClow sowie CD4/CD25-doppeltpositiven Zellen im Vergleich zu Bedingungen mit 2-ME detektiert. So sind ohne 2-ME an Tag sechs weniger als halb so viele Leukozyten im Vergleich zu Standardbedingungen aktiviert (unter 20 %). Des Weiteren treten größere Unterschiede innerhalb der - 2-ME Gruppe auf, sodass sich größere Standardabweichungen bei - 2-ME als bei + 2-ME Bedingungen ergeben.

Da ein Einfluss von 2-ME auf die CD4-positiven Leukozyten festgestellt werden konnte, wurde im nächsten Schritt auf die T-Zellen in der *in vitro* Immunreaktion fokussiert. Im Zentrum steht dabei die Frage, ob ausschließlich die T-Zellen in Abwesenheit von 2-ME nicht ausreichend aktiviert werden. Um diese Frage zu beantworten, wurden simultan zwei MD Kulturen angesetzt, wobei eine Kultur mit 2-ME versetzt wurde und die zweite Kultur ohne 2-ME und zwei Tage später als die erste gestartet wurde. Der zeitlich versetzte Versuchsaufbau wurde gewählt, um den T-Zellen ausreichend Zeit zur Aktivierung zu geben. Von der ersten MD Kultur wurden T-Zellen an Tag vier mittels MACS isoliert (FACS-Kontrolle: 76 % der aufgereinigten Zellen waren CD3-positiv) und zu der anderen Zellkultur ohne 2-ME hinzugegeben.



MD Kulturen wurden mit Milzzellen von Wistarratten nach Standardprotokoll oder ohne 2-ME angesetzt. Aus dieser Kultur wurden an T4 T-Zellen mit MACS isoliert und je $1,6 \cdot 10^6$ T-Zellen pro Well wurden zu einer PBMC Kultur an T2 gegeben. Dieser PBMC Ansatz wurde 2 Tage später als die Milzzellen mit Zellen von anderen Wistarratten angesetzt, wobei 2-ME weggelassen wurde oder zugesetzt wurde. Auswertung erfolgte nach 7 Tagen Zellkultur durch den Plaquetest (Balken) und Resazurintest (Dreiecke).

Abb. 39 Einfluss von 2-ME auf T-Zellen in der *in vitro* Immunreaktion

Zellkulturen ohne 2-ME sind hervorgehoben (grün).

Wie Abb. 39 zeigt, hat die Zugabe von T-Zellen zu einer anderen MD Kultur keinen negativen Einfluss auf eine MD Kultur, die mit 2-ME inkubiert wurde, da unab-

hängig von der Zugabe stabile Plaquezahlen von ca. 650 Plaques pro Platte gezählt werden. Die Zugabe von T-Zellen aus einer MD Kultur mit 2-ME zu einer MD Kultur ohne 2-ME hat keine Plaqueproduktion zur Folge und somit keinen positiven Einfluss.

Das Zytokinprofil der MD Kultur von Milzzellen ohne 2-ME im Vergleich zu MD Kulturen mit 2-ME zeigt signifikant niedrigere Mengen von IL-1 α , IL-4 und MCP-1. Auch TNF- α wurde in deutlich geringeren Mengen in MD Kulturen ohne 2-ME (6 \pm 6 pg/ml) im Vergleich zu MD Kulturen mit 2-ME (25 \pm 17 pg/ml) detektiert. Die Konzentrationen von IFN- γ waren bei beiden Bedingungen vergleichbar (ca. 230 pg/ml) und GM-CSF wurde nicht detektiert. Zytokinbestimmungen von Wistar-PBMC Kulturen lieferten ähnliche Ergebnisse mit dem Unterschied, dass unter beiden Bedingungen mehr IL-1 α gebildet wurde (- 2-ME: 100 pg/ml; + 2-ME: 220 pg/ml) und zusätzlich kein TNF- α detektiert werden konnte (PBMC Daten nicht gezeigt).

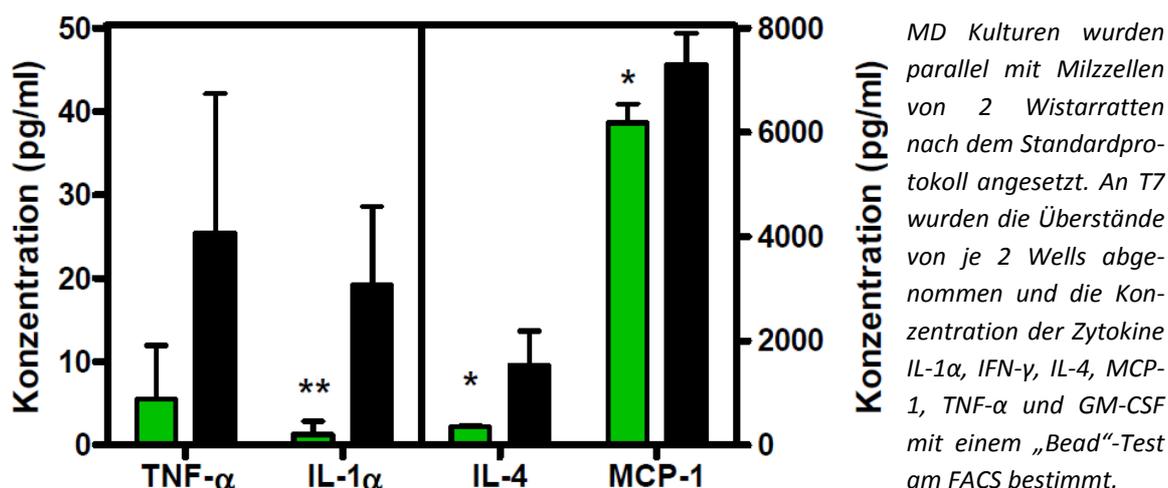


Abb. 40 Einfluss von 2-ME auf Zytokine in der *in vitro* Immunreaktion

Das Balkendiagramm zeigt die ermittelte Konzentration der angegebenen Zytokine mit Standardabweichung für MD Kulturen ohne β -Mercaptoethanol (grüne Balken) im Vergleich zu Standardansätzen (schwarze Balken). Signifikanzanalysen von - 2-ME vs. + 2-ME Proben wurden mit dem Students *t*-Test für unpaarige Proben durchgeführt. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

Da ein erheblicher Einfluss von β -Mercaptoethanol auf die *in vitro* Immunreaktion festgestellt werden konnte, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob der Effekt auf die antioxidative Wirkung zurückgeführt werden kann. Zu diesem Zweck wurden Milzzellkulturen unter unterschiedlichen oxidativen Bedingungen durchgeführt.

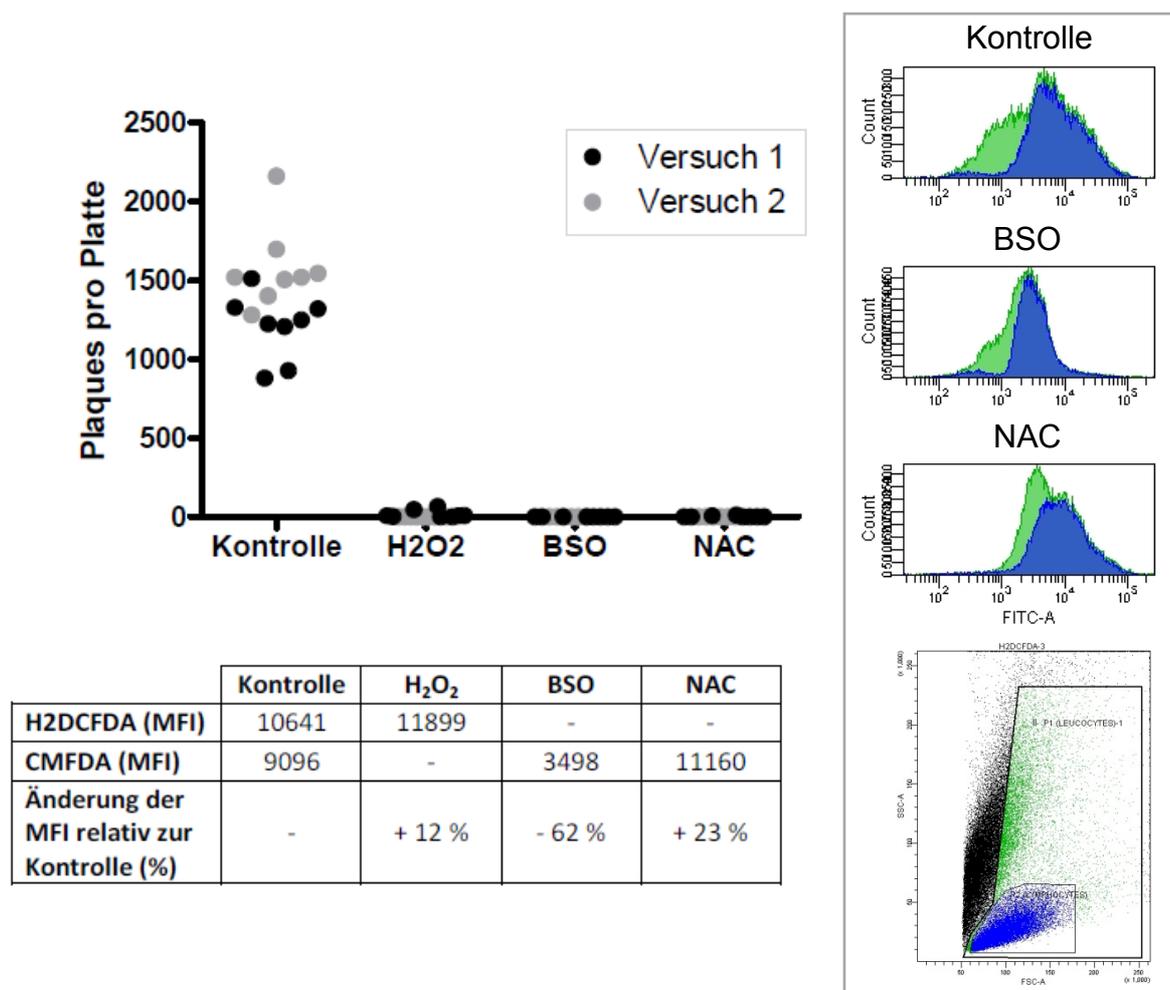


Abb. 41 Einfluss des zellulären Redoxstatus auf die *in vitro* Immunreaktion

MD Kulturen mit Milzzellen von Wistarratten wurden nach dem Standardprotokoll unter Zugabe von H₂O₂ (10 μM), BSO (1 mM) oder NAC (10 mM) durchgeführt. An Tag 7 wurden die Plaquezahlen ermittelt und die Viabilität (bei allen Proben > 50 %) wurde bestimmt. Beim zweiten Versuch wurden die Zellen an Tag 8 mit H₂DCFDA oder CMFDA zur Bestimmung von ROS sowie Glutathion gefärbt und am FACS ausgewertet. Die mittleren Fluoreszenzen (MFI) für Leukozyten sind in der Tabelle zusammengefasst. Histogramme zeigen die Aufnahmen nach CMFDA Färbung, wobei zwischen Leukozyten (grün) und Lymphozyten (blau) unterschieden wird. Das Dot-Plot Diagramm zeigt die gesetzten Gates im FSC (x-Achse) und SSC (y-Achse).

Die Zugabe von exogenen ROS in Form von Wasserstoffperoxid in einer geringen nicht zytotoxischen Konzentration (stabile Viabilität; ± H₂O₂ < 5 % PI-positive, tote Zellen) von 10 μM führt zu einer starken Beeinträchtigung der *in vitro* Immunantwort, sodass nur noch vereinzelt antikörpersezernierende Plasmazellen gezählt werden können. Durch Inkubation der Zellen in parallelen Ansätzen mit dem ROS-sensitiven Farbstoff H₂DCFDA konnte anhand der Änderung der mittleren Fluoreszenz im FITC-Kanal durchflusszytometrisch ein um 12 % erhöhter ROS Gehalt in Leukozyten an Tag acht belegt werden (Tabelle in Abb. 41). Glutathion ist eines der wichtigsten Komponenten der intrazellulären Redoxregulation (vgl. z.B. Malhotra und Kaufman, 2007). Eine Inhibition der Glutathionsynthese durch Buthionin-

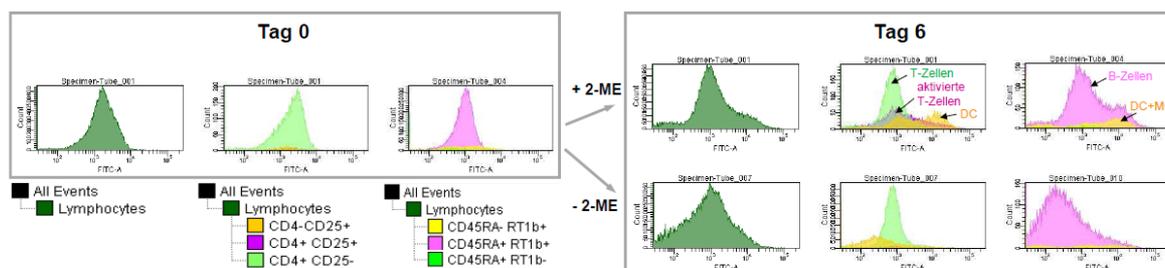
sulfoximin (BSO), einem spezifischen Inhibitor der γ -Glutamylcysteinsynthetase reduziert nachweislich den GSH-Gehalt der Leukozyten (Abnahme der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) um über 60 %) nach acht Tagen Zellkultur (Tabelle und Histogramm in Abb. 41). Die Reduktion des intrazellulären GSH war nach einem Tag noch nicht durch eine MFI Änderung von CMFDA messbar (Daten nicht gezeigt). BSO in Konzentrationen von 1 mM ist nicht zytotoxisch (70 % Viabilität im Vergleich zur Kontrolle), sind jedoch in der Lage die SRBC-spezifische Antikörperproduktion komplett zu unterbinden. Auch eine Steigerung des GSH-Gehaltes in Leukozyten durch N-Acetylcystein (NAC), einer synthetischen Vorstufe von Cystein und GSH, führte zu einer kompletten Unterbindung der Plaquebildung bei stabiler Viabilität. Die intrazelluläre Abnahme von GSH konnte schon nach einem Tag Inkubation deutlich beobachtet werden (Verdopplung der MFI, Daten nicht gezeigt). Auch an Tag acht wurde eine über 20 %ige Zunahme der MFI durch CMFDA nachgewiesen (Tabelle und Histogramm in Abb. 41).

Die Ergebnisse aus Abb. 41 verdeutlichen die Möglichkeit einer FACS-basierten Messung des intrazellulären Gehalts an ROS mit dem Farbstoff H₂DCFDA und GSH mit CMFDA. Auch der Einsatz von SNARF-1, einem weiteren Farbstoff zur GSH Detektion, war möglich. Mit SNARF-1 konnte eine Reduktion der MFI im PE-Kanal nach Inkubation mit BSO bereits nach einem Tag (-27 %) und auch nach acht Tagen Zellkultur (-72 %) in Leukozyten reproduzierbar detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Jedoch konnte nach Inkubation mit NAC keine Änderung der MFI gemessen werden. Der Einsatz von SNARF-1 in Doppelfärbungen von Zellen mit spezifischen Antikörpern erwies sich als nicht durchführbar. Dagegen konnten die Färbeprotokolle für Doppelfärbungen mit spezifischen Antikörpern und H₂DCFDA oder CMFDA etabliert werden, wodurch die Betrachtung der ROS sowie des GSH-Gehaltes einzelner Zellpopulationen relativ zu einander möglich wurde.

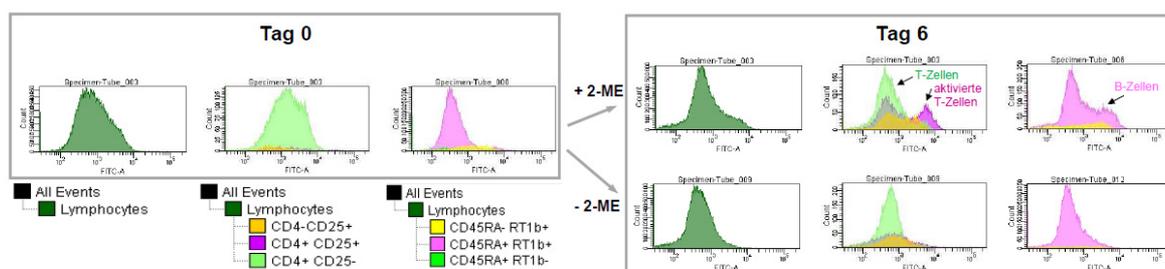
Durch diese Methode konnte der Gehalt an ROS und GSH in ausgesuchten Zellpopulationen über die Zeit detektiert werden. Abb. 42 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchung für MD Kulturen mit Rattenmilzzellen unter Bedingungen mit oder ohne 2-ME. In diesen Versuchen wurden an Tag sieben keine Plaques ohne 2-ME detektiert, dagegen wurden etwa 1.300 (Versuch 1) bzw. 1.600 (Versuch 2) Plaques pro Platte bei den Standardbedingungen mit 2-ME gezählt (Daten nicht gezeigt). Als spezifische Zellmarker wurden parallel in zwei Färbungen anti-CD4-

PE-Cy5 und anti-CD25-Biotin (mit Streptavidin-PE-Cy7 Zweitantikörper) für die Detektion der doppelpositiven aktivierten T-Helferzellen oder anti-CD45RA-PE-Cy5 und anti-RT1b-Biotin (mit Streptavidin-PE-Cy7 Zweitantikörper) für die Unterscheidung von B-Zellen und APC verwendet. Die Messungen wurden an den Tagen null, eins, zwei, vier und sechs vorgenommen.

A



B



C

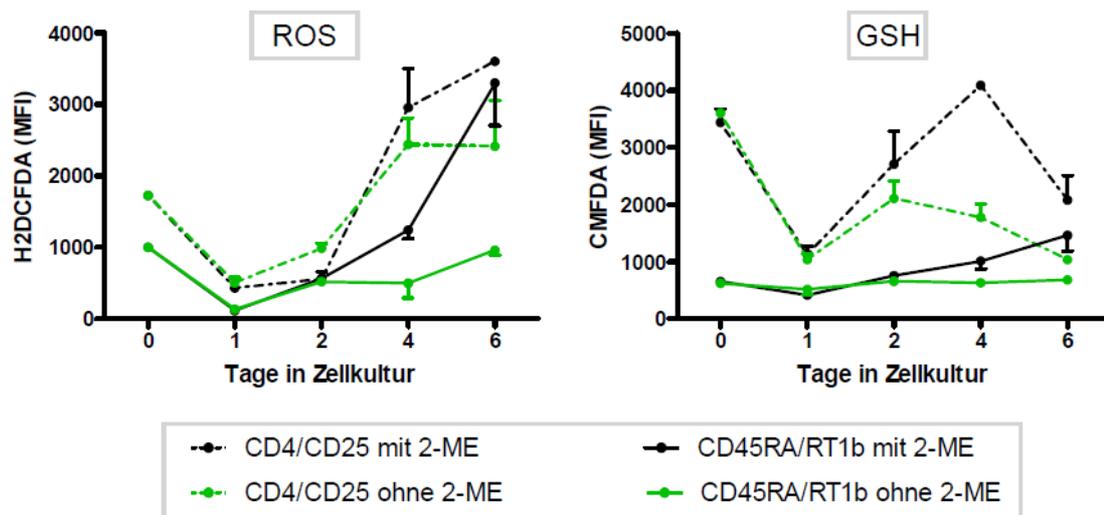


Abb. 42 Einfluss von 2-ME auf den ROS- und GSH-Gehalt von bestimmten Zellpopulationen während der *in vitro* Immunreaktion

MD Kulturen wurden mit Milzzellen von Wistarratten nach Standardprotokoll (+ 2-ME) und parallel ohne Zugabe von β -Mercaptoethanol (- 2-ME) durchgeführt. An den angegebenen Tagen wurden die Zellen geerntet und FACS-Analysen der Zellpopulationen durchgeführt. Als Antikörper wurden in parallelen Färbungen anti-CD4-PE-Cy5 und anti-CD25-Biotin (mit Streptavidin-PE-Cy7 Zweitantikörper) oder anti-CD45RA-PE-Cy5 und anti-RT1b-Biotin (mit Streptavidin-PE-Cy7 Zweitantikörper) verwendet. Gleichzeitig wurde durch die

Zugabe von H₂DCFDA der ROS-Gehalt (A) oder durch CMFDA der GSH-Gehalt (B) durch die Detektion der mittleren Fluoreszenz im FITC-Kanal bestimmt. Die Diagramme (C) fassen die Ergebnisse aus jeweils 2 unabhängigen Versuchen (MW±SD) zusammen.

Abb. 42 A zeigt das Ergebnis der ROS-Detektion mit H₂DCFDA von Tag null im Vergleich zu Tag sechs nach Inkubation der MD Kultur mit oder ohne 2-ME. Im Vergleich zu Tag null, ist an Tag sechs eine Population von aktivierten T-Helferzellen (CD4/CD25-doppeltpositiven Lymphozyten) in der + 2-ME Gruppe detektierbar, die in der – 2-ME Gruppe fehlt. Zusätzlich zeigt die H₂DCFDA Färbung einen Teil dieser Zellen als stärker fluoreszierend als die CD4-positiven CD25-negativen (nicht aktivierten T-Helferzellen) an. Die H₂DCFDA Färbung der CD4-positiven/CD25-negativen Lymphozyten sieht im Fluoreszenzprofil zwischen den beiden Bedingungen an Tag sechs vergleichbar aus. Ein Unterschied ist in der CD4-negativen/CD25-positiven Zellpopulation erkennbar, die unter den + 2-ME Bedingungen an Tag sechs eine stark fluoreszierende Fraktion ausweist, die unter – 2-ME Bedingungen und ebenfalls an Tag null fehlt. Die Parallelfärbung für B-Zellen und APC zeigt ebenfalls Unterschiede zwischen den beiden Bedingungen an Tag sechs. So fluoreszieren die CD45RA/RT1b-doppeltpositiven Lymphozyten insgesamt deutlich stärker nach der Inkubation mit 2-ME. Zusätzlich zeigt sich unter diesen Bedingungen eine deutliche Fraktion mit einer MFI um etwa 10.000, die bei den Bedingungen ohne 2-ME und an Tag null fehlt. Unter + 2-ME Bedingungen wurden mehr CD45RA-negative, RT1b-positive Zellen (APC) mit höherer MFI als unter – 2-ME Bedingungen detektiert. Allgemein hat das Histogramm an Tag null eine schmalere Glockenform, verglichen mit den breit auslaufenden Formen an Tag sechs. Der zeitliche Verlauf der H₂DCFDA Detektion anhand der MFI (Abb. 42 C) in CD4/CD25-doppeltpositiven Lymphozyten zeigt einen Abfall an ROS innerhalb eines Tages Zellkultur für beide Bedingungen. An Tag zwei steigt die MFI wieder an, sodass sie für beide Bedingungen an Tag vier und sechs über dem Ausgangswert liegt, wobei die mittlere Fluoreszenz nach Inkubation mit 2-ME intensiver als ohne 2-ME ist. Bei + 2-ME ist die Fluoreszenz an Tag sechs fast doppelt so intensiv verglichen mit Tag null. Auch in B-Zellen ist ein initialer Abfall der MFI innerhalb eines Tages Zellkultur korrespondierend zu T-Zellen detektierbar. An Tag vier erreicht die MFI von B-Zellen aus der Kultur mit 2-ME den Ausgangswert und verdreifacht von Tag vier bis Tag sechs die gemessene MFI. B-Zellen aus der Kultur ohne 2-ME liegen an allen Tagen unterhalb ihrer MFI von Tag null. Insgesamt werden höhere ROS-Konzentrationen für Lym-

phozyten mit H₂DCFDA aus Kulturen mit 2-ME an Tag sechs verglichen mit Tag null detektiert. Lymphozyten aus Kulturen ohne 2-ME haben vergleichbare oder leicht herabgesetzte ROS-Werte, sodass der ROS-Gehalt in Zellen aus Kulturen mit 2-ME an Tag sechs höhere Werte aufweist als in Zellen, die ohne 2-ME kultiviert wurden (Daten nicht gezeigt).

In analogen Proben zu Abb. 42 A wurden GSH-Messungen durch Färbung der Zellen mit CMFDA von Tag null im Vergleich zu Tag sechs nach Inkubation der MD Kultur mit oder ohne 2-ME durchgeführt (Abb. 42 B). An Tag sechs zeigt sich nach Inkubation mit 2-ME eine deutliche Fraktion CD4/CD25-doppeltpositiver Zellen mit einer hohen MFI für CMFDA, die bei den Bedingungen ohne 2-ME und an Tag null fehlt. Auch in der Parallelfärbung für B-Zellen ist eine deutliche Population CD45RA/RT1b-doppeltpositiver Lymphozyten mit einer hohen MFI vertreten, die unter - 2-ME Bedingungen nicht vorhanden ist. Die zeitliche Änderung der CMFDA MFI von aktivierten CD4-positiven Lymphozyten verläuft sehr sprunghaft (Abb. 42 C). Sie fällt unter beiden Bedingungen auf ca. 1.000 Einheiten MFI innerhalb des ersten Tages ab, steigt dann an Tag zwei und Tag vier weiter an, wodurch Werte über 4.000 für Zellen mit 2-ME an Tag vier gemessen werden. Der Anstieg für aktivierte T-Helferzellen aus der Inkubation ohne 2-ME verläuft weniger steil, sodass die MFI hier an Tag vier nur etwa halb so hoch im Vergleich zu + 2-ME Kulturen ist. An Tag sechs ist die MFI für CMFDA für T-Zellen aus beiden Bedingungen wieder deutlich niedriger. B-Zellen aus den Zellkulturbedingungen ohne 2-ME zeigen keine Änderung der MFI (<1.000 Einheiten) nach Inkubation mit CMFDA im Verlauf der Immunreaktion. Dagegen ist bei B-Zellen aus der Zellkultur mit 2-ME eine Zunahme der MFI ab Tag vier feststellbar, wobei die Werte der MFI an Tag sechs deutlich über 1.000 liegen.

Insgesamt werden nach Inkubation der Zellen mit 2-ME ähnliche GSH-Konzentrationen für Lymphozyten mit CMFDA als auch mit dem GSH-sensitiven Farbstoff SNARF-1 an Tag sechs verglichen mit Tag null detektiert. Allerdings werden an Tag sechs deutlich niedrigere MFI für Zellen, die ohne 2-ME kultiviert wurden, gemessen (Daten nicht gezeigt).

Zum Abschluss soll der Effekt von 2-ME auf genetischer Ebene näher untersucht werden. Dafür werden CD4-positive Milzzellen aus MD Kulturen ohne 2-ME mit CD4-positiven Zellen aus Standard-Milzzellkulturen an Tag null, drei und sechs im Mikroarray verglichen. Um die Ausbildung der Immunreaktion *in vitro* in diesem

Versuchsansatz zu belegen, wurde zusätzlich an Tag sieben der Zellkultur ein Plaquetest durchgeführt, bei dem im Durchschnitt 1.000 Plaques pro Platte mit 2-ME gezählt wurden, und 170 Plaques pro Platte ohne 2-ME erhalten wurden (Daten nicht gezeigt).

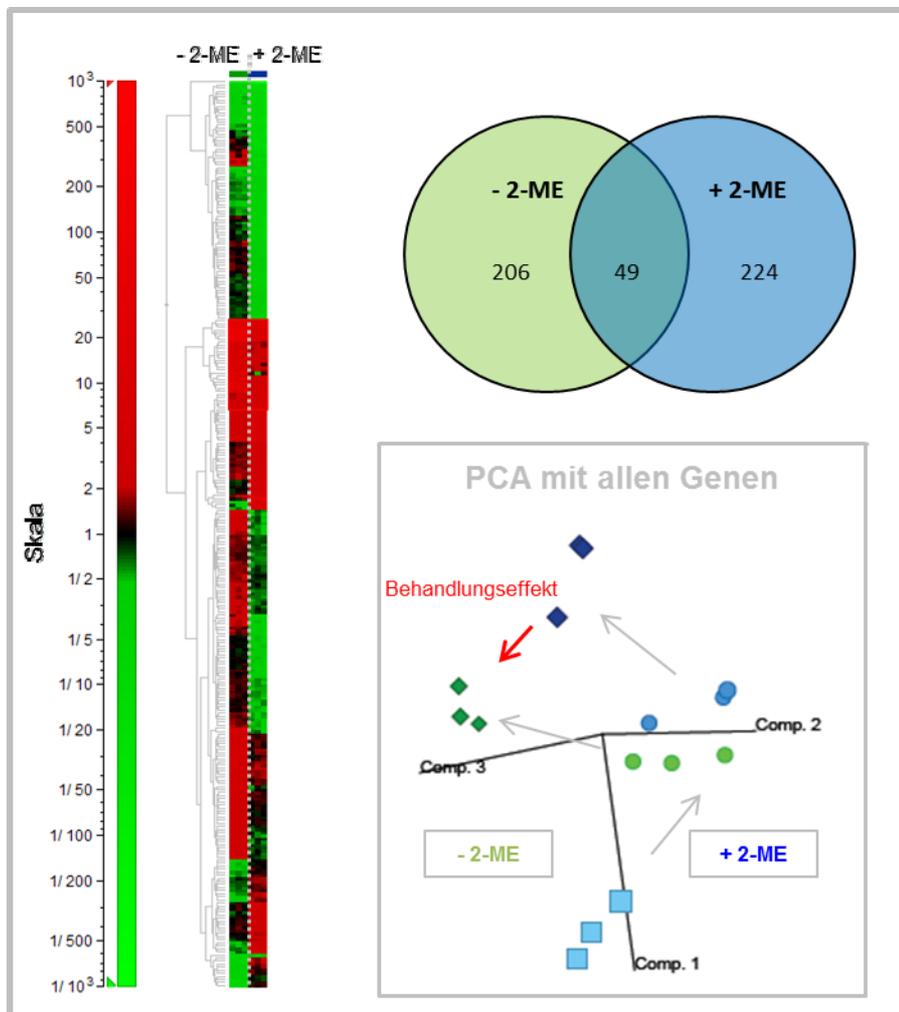


Abb. 43 Einfluss von 2-ME auf die Genexpression von CD4-positiven Milzzellen im Verlauf der *in vitro* Immunreaktion

MD Kulturen mit Milzzellen von 3 Wistaratten wurden nach dem Standardprotokoll mit Zugabe von 2-ME (blau) oder ohne 2-ME (grün) parallel angesetzt. An T0 und T6 wurden die Zellen geerntet und CD4-positive Zellen wurden durch magnetische Zellsortierung isoliert und für Genexpressionsanalysen verwendet. Die Heatmap zeigt signifikant anders exprimierte Gene mit mind. zweifacher veränderter Expression (insgesamt 296 Gene). Das Venn Diagramm zeigt alle zwischen + 2-ME und – 2-ME Bedingungen signifikant unterschiedlich exprimierten Gene (479) von CD4-positiven Zellen an Tag 6 im Vergleich zu Tag 0. Die PCA wurde mit allen Genen erstellt um die Änderung der Genexpression zu veranschaulichen. Symbole in der PCA: Quadrate: T0; Kreise: T3; Rauten: T6.

Die Analyse der Hauptkomponenten (PCA in der Abb. 43) veranschaulicht den Einfluss von 2-ME auf die Genexpression von CD4-positiven Zellen unter Berücksichtigung des gesamten Rattengenoms. Die Datenpunkte der Triplikate an den jeweiligen Tagen liegen in räumlicher Nähe zueinander. Auch sind an Tag drei keine deutlichen Unterschiede für beide Bedingungen vorhanden. Die Datenpunkte der Triplikate für beide Bedingungen liegen aber an Tag sechs weiter auseinander, was auf größere Expressionsunterschiede an Tag sechs durch den Behandlungseffekt hindeutet. Somit wurden die Daten an Tag sechs für die funktionelle Analyse weiter berücksichtigt. Nähere Auswertung der Genarraydaten ergab 479 Gene, die zwischen Tag null und Tag sechs unter beiden Bedingungen signifikant unterschiedlich exprimiert wurden. Im Venn Diagramm in Abb. 43 wird deutlich, dass hauptsächlich unterschiedliche Gene zwischen den beiden Bedingungen identifiziert wurden und 49 Gene sowohl mit als auch ohne 2-ME signifikant unterschiedlich waren. Diese Darstellung ermöglicht keine qualitative Aussage, sodass im Folgenden die Expressionsunterschiede präzisiert werden. Die statistische Auswertung der Daten ergab 296 Gene mit mind. zweifacher veränderter Expression an Tag sechs im Vergleich zu Tag null, welche in der Heatmap in Abb. 43 veranschaulicht werden. Es wird deutlich, dass für die beiden Bedingungen die Mehrheit dieser Gene sich qualitativ in ihrem Expressionsmuster unterscheidet. Nur etwa 20 % der so identifizierten Gene wurden sowohl mit als auch ohne 2-ME in die gleiche Richtung reguliert.

Bekannte Gene mit mind. dreifach veränderter und zwischen beiden Bedingungen qualitativ unterschiedlicher Expression an Tag sechs (107 Gene) werden im Anschluss funktionell weiter analysiert. Wie in Abb. 44 gezeigt, konnten sechs Gene der Kategorie Immunsystem zugeordnet werden. Vier davon, wie die Gene für NK-Zellrezeptoren *Klrc1* (hundertfacher Unterschied) und *LOC690020* sowie die Immunrezeptorgene *Ccr2* und *Epor* sind ohne 2-ME runterreguliert, jedoch mit 2-ME stark induziert. Die mRNA für den Komplementrezeptor für C5a (*C5ar1*) ist im Gegensatz zu Normalbedingungen ohne 2-ME stark induziert, parallel dazu ist das Gen für den Komplementfaktor H (*Cfh*) weniger stark runterreguliert. Mit Ausnahme von *Cldn10* und *Cercam*, zwei Zelladhäsionsgene, sind die Vertreter der Zytoskelett- und Zelladhäsionsgruppe höher exprimiert nach Zellkultur ohne 2-ME als nach Zellkultur mit 2-ME. In dieser Gruppe finden sich Gene für Aktinbindung und -umorganisation (*Cttnbp2nl*, *Eps8*, *Pls3*) sowie einige Zelladhäsionsgene, wie z.B.

das neunfach unterschiedlich exprimierte *Esm1*. Das sechsfach unterschiedlich exprimierte Gen für den C-Typ Lektinrezeptor CD302 ist neben Zelladhäsion in der Endo- und Phagozytose involviert (Kato *et al.*, 2007). Die Gengruppe der an der Zelldifferenzierung beteiligter Komponenten ist ohne 2-ME in deutlich größeren Mengen exprimiert. Eine Ausnahme bildet das zur TGF- β Superfamilie gehörende *Gdf1*, welches mit 2-ME achtfach mehr zu finden ist, als ohne 2-ME. Gene, die in der Gruppe Proliferation eingeordnet wurden, sind alle unter - 2-ME Bedingungen in größeren Mengen als unter + 2-ME Bedingungen exprimiert. Darunter fallen hauptsächlich Gene, die für regulatorische Proteine kodieren. Mit *Col4a2*, einem Gen für Typ IV Kollagen, findet sich ein Inhibitor von Proliferation und Migration in Zellen, der mit 2-ME induziert und ohne 2-ME supprimiert wird. Unter den in der Apoptosegruppe zusammengefassten Genen ist ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Bedingungen an Tag sechs zu erkennen. So werden im Wesentlichen zelltothfördernde Gene unter - 2-ME Bedingungen hochreguliert, die ansonsten bei Inkubation mit 2-ME supprimiert werden (*Tnfsf12*, *Ltbr*, *Lats2*, *Bean*). Die mRNA für das anti-apoptotische Protein *Fign1* ist mit 2-ME vierfach höher exprimiert als ohne 2-ME. In der Metabolis-

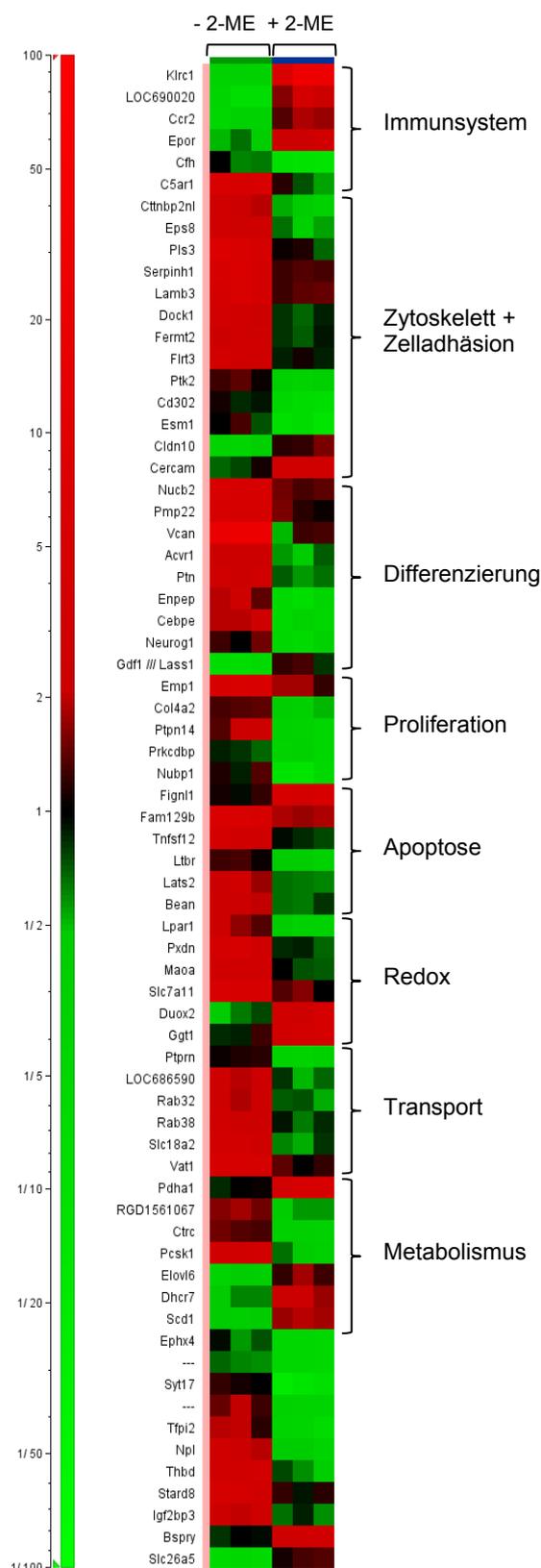


Abb. 44 Dreifach deregulierte Gene aus CD4-positiven Milzzellen unter Einfluss von 2-ME während der *in vitro* Immunreaktion

Der Versuch wurde, wie in Abb. 43 beschrieben, durchgeführt. Abbildung zeigt Gene mit mind. 3-fach veränderter Expression an T6 (relativ zu T0).

musgruppe finden sich die Fettsäuremetabolismus-assoziierten Gene *Elovl6*, *Scd1* und *Dhcr7*, welche nach Inkubation ohne 2-ME im Vergleich zu Bedingungen mit 2-ME stark hochreguliert sind. Zudem ist unter Zellkulturbedingungen ohne 2-ME das Gen für eine Untereinheit der Pyruvatdehydrogenase (*Pdha1*) im Vergleich zu Bedingungen mit 2-ME deutlich runterreguliert. In dieser vergleichenden Gegenüberstellung können etwa 6 % der unterschiedlich exprimierten mRNAs der Redoxgleichgewicht-assoziierten Gengruppe untergeordnet werden, wobei nur die mRNA für die Dualoxidase 2 (*Duox2*, fünffach unterschiedlich) und für die γ -Glutamyltransferase 1 (*Ggt1*) unter + 2-ME Bedingungen höhere Expressionslevel aufweisen als unter – 2-ME Bedingungen. In der Kategorie Transport werden am Vesikeltransport beteiligte Gene ohne 2-ME stärker exprimiert. In der Kategorie Metabolismus sind Fettsäuresynthesegene (*Elovl6*, *Scd1*) sowie *Dhcr7*, ein Gen kodierend für ein Cholesterinsyntheseprotein, unter Inkubationsbedingungen ohne 2-ME supprimiert, jedoch nach Inkubation mit 2-ME hochreguliert, sodass mit 2-ME an Tag sechs etwa die vierfache mRNA Menge dieser Gene detektiert wurde.

4. Diskussion

Das Hauptziel der Dissertation war es, die Einsatzmöglichkeiten von T-Zell-abhängigen humoralen *in vitro* Immunreaktionen für toxikologische Prüfungen zu erweitern und zu prüfen. Desweiteren sollten Faktoren, die für eine optimale *in vitro* Antwort notwendig sind, analysiert werden.

Humorale *in vitro* Immunreaktionen wurden von Mishell und Dutton (1966) mit Mausmilzzellen als *in vitro* Pendant zu den von Jerne und Nordin (1963) beschriebenen *in vivo* Versuchen mit SRBC immunisierten Mäusen und Kaninchen eingeführt. Im Gegensatz zum *in vivo* TDAR, wurde der *in vitro* MD Test hauptsächlich als Modell für allgemeine Untersuchungen der Immunreaktion oder zur Charakterisierung von Mechanismen der Immunsuppression eingesetzt (zusammengefasst in Köper und Vohr, 2009). Bereits seit den siebziger Jahren gilt ein T-Zell-abhängiger funktionaler *in vivo* Immuntest als die wichtigste Komponente für die Vorhersage von Immuntoxizität (Luster *et al.*, 1992). Der an Ratten angepasste *in vivo* Test wurde seitdem durch eine Vielzahl von Routineuntersuchungen als Immuntoxizitätstest bestätigt (Basketter *et al.*, 1994; Vohr, 1995; Richter-Reichhelm *et al.*, 1995; Vohr und Rühl-Fehlert, 2001) und gilt, insbesondere in Kombination mit durchflusszytometrischen Populationsanalysen von Oberflächenmarkern, als sehr prädiktiv (> 90 % kombinierte Vorhersagetreffsicherheit) (Luster *et al.*, 1992). Diese Zuverlässigkeit der *in vivo* T-Zell-abhängigen Immunreaktion spiegelt sich auch in regulatorischen Vorgaben für immuntoxikologische Teststrategien, welche für die Zulassung von neuen Medikamentenwirkstoffen (FDA, 2002; EMA, 2006) sowie Pflanzenschutzmitteln (EPA, 1998) implementiert sind und generell die Durchführung eines TDAR empfehlen.

2009 wurde die T-Zell-abhängige *in vitro* Immunreaktion als alternative Testoption vorgeschlagen und an Milzzellen von Mäusen evaluiert, wobei sich der MD Test mit Milzzellen von naiven Mäusen als robust, prädiktiv und unkompliziert in der Durchführung erwies (Köper und Vohr, 2009). Für breitere Einsatzmöglichkeiten der alternativen Testmethode und als eine Option zum Ersatz des *in vivo* Tests war es erforderlich, die Zellkulturbedingungen an primäre Rattenzellen anzupassen, um die Ratte als wichtigste Spezies für frühe toxikologische Routineuntersuchungen (Gill *et al.*, 1989) zu integrieren. Die Optimierung der Zellkulturbedingungen an Rattenzellen war erfolgreich (dokumentiert im Ergebnissteil 3.1).

4.1 Etablierung

Für die Ermittlung der idealen Testbedingungen für Rattenmilzzellen und PBMC war es notwendig, generelle Parameter wie Zellkulturbedingungen, -dauer sowie Zellzahl auszutesten und mit Medium, FCS und anderen Testkomponenten zu optimieren. Das für Mauszellen verwendete DMEM Medium erwies sich für alle anderen Zellen als ungeeignet und wurde durch RPMI Medium ersetzt, welches ursprünglich für die Zellkultur von humanen Leukozyten (Moore *et al.*, 1967) entwickelt wurde. Literaturrecherchen ergaben, dass für Mauszellen sowohl Eagle's Medium (Mishell und Dutton, 1966; Inaba und Muramatsu, 1980), DMEM (Köper und Vohr, 2009) und RPMI (Tucker und Munson, 1981; Inaba *et al.* 1983; Cao *et al.*, 1990) in MD Kulturen verwendet wurden. Auch für Rattenzellen wurden verschiedene Medien beschrieben, sodass die Wahl des Mediums nicht grundsätzlich mit der Wahl der Spezies zusammenhängt und vor Einführung des MD Tests in einem Labor ausgetestet werden muss. Im Unterschied zu Mausmilzzellen war es für Zellen aus Ratten notwendig, das Medium mit 2-ME zu supplementieren um eine spezifische Antikörperantwort zu generieren. Der positive Einfluss von 2-ME auf die *in vitro* Antikörperproduktion wurde bereits für Milzzellen aus C57Bl/6J Mäusen gezeigt (Click *et al.*, 1972), konnte in dieser Dissertation mit Splenozyten aus NMRI Mäusen jedoch nicht belegt werden. Eine interessante Beobachtung war, dass die Viabilität der Zellen generell nicht mit der entsprechenden Plaquezahl korrelierte, sodass man anhand der Ergebnisse im Resazurintest keine Rückschlüsse auf den Erfolg der *in vitro* Immunreaktion treffen kann. Dieser Befund wurde auch für Experimente mit Mausmilzzellen beschrieben (Click *et al.*, 1972). Für alle getesteten Zellen, mit Ausnahme von Mauszellen, war die SRBC-Stimulation einen Tag nach Zellkulturbeginn besser als die gleichtägige Stimulation, was auf die Notwendigkeit einer Anpassungsphase der Zellen an die Zellkultur hindeutet. So ist es denkbar, dass bestimmte Zellpopulationen sich an *in vitro* Bedingungen „adaptieren“ müssen. Es lässt sich auch spekulieren, dass für diese Zellen die 2-ME Konzentration im Medium entscheidend sein könnte, da Primärzellen, die eindeutig 2-ME benötigten, für eine Immunreaktion zu einem späteren Zeitpunkt mit SRBC in Kontakt treten mussten. Dieser eventuelle Zusammenhang wurde in der Dissertation nicht näher untersucht und auch in der Literatur fanden sich dazu keinerlei Hinweise.

Die Prädiktivität und Relevanz von toxikologischen Befunden aus Nagerstudien für den Menschen ist nicht immer zwingend gewährleistet. So wurden speziesspezifische Unterschiede in der Sensitivität des Immunsystems (Kimber, 1991; Smialowicz *et al.*, 1992; Lang *et al.*, 1993) und in der Biotransformation (Coecke *et al.*, 2006) festgestellt. Um die Übertragbarkeit der Testergebnisse auf den Menschen möglichst verlässlich zu gewährleisten, und unter besonderer Beachtung limitierter Kreuzreaktivität in Nagern von neuentwickelten Biopharmazeutika (Haggerty, 2007), sind Untersuchungen basierend auf peripheren Blutzellen aus Primaten notwendig. Zu diesem Zweck werden TDAR mit PBMC aus nichtmenschlichen Primaten nach Immunisierung mit SRBC, KLH oder Tetanustoxoid für toxikologische Untersuchungen von neuen Medikamentenwirkstoffen durchgeführt (Lebrec *et al.*, 2011), sind jedoch wegen der hohen individuellen Variabilität in Kombination mit kleinen Gruppengrößen, nichtstandardisierten und zeit- sowie tierintensiven Protokollen problematisch. Die Option eines MD Tests mit PBMC aus nichtmenschlichen Primaten wäre zu diesem Zweck eine gute und tierschonende Alternative. Zudem würde die Verwendung von in großen Mengen verfügbaren und gut zugänglichen humanen PBMC die Möglichkeiten der Anwendung signifikant erweitern, sodass die Etablierung der humoralen *in vitro* Immunreaktion an PBMC aus *buffy coats* von anonymen humanen Spendern und die Übertragbarkeit der Testbedingungen auf PBMC aus nichtmenschlichen Primaten in dieser Dissertation angestrebt wurde. Für die Anpassung der Zellkultur an PBMC aus Primaten wurden diverse Testparameter variiert, die alle keine reproduzierbare *in vitro* Antikörperproduktion zur Folge hatten, obwohl erfolgreiche *in vitro* Stimulationen von humanen PBMC publiziert sind. So erhielten Misiti und Waldmann (1981) eine SRBC spezifische Antikörperproduktion nach neun Tagen Zellkultur von PBMC mit einem MD Protokoll ohne Adjuvantien, jedoch unter Verwendung von humanem Plasma anstelle von FCS. Dieses Protokoll war reproduzierbar (Morgan *et al.*, 1982), konnte aber in dieser Dissertation nicht zielführend rekonstruiert werden. Andere veröffentlichte Protokolle beinhalteten eine unspezifische Aktivierung von PBMC z.B. durch das Lektin der Kermesbeere (*pokeweed mitogen*) (Friedman *et al.*, 1976; Herrod und Buckley, 1979).

2011 wurde die fördernde Wirkung von IFN- α auf T-Zell-vermittelte B-Zellreaktionen in einem humanen *in vitro* System beschrieben (Gujer *et al.*, 2011) und die persönliche Kommunikation mit den Autoren ergab, dass in der Publikati-

on ein Typ I Interferongemisch verwendet wurde, welches dann auch in dieser Dissertation für den MD Test mit humanen PBMC eingesetzt wurde und sich als positiv erwies. Weitere Tests zeigten eine große Varianz der Plaquezahlen zwischen den Blutspendern und die Abhängigkeit von Interferonchargen auf und führten zu weiteren Optimierungsschritten. Zu diesem Zweck wurden die laut Herstellerangaben vorherrschenden Zytokine im Interferongemisch einzeln ausgetestet und in Kombination der Zellkultur zugesetzt. Das Ergebnis war, dass rekombinantes IFN- ω in Konzentrationen von 50 ng/ml optimal für die humorale *in vitro* Immunreaktion von humanen PBMC war, da es stabil reproduzierbar und spenderunabhängig wirksam war. Humanes IFN- ω , das 62 % Sequenzhomologie zum humanen IFN- α 2 aufweist, wird in Zellen ausschließlich nach Virusinfektionen exprimiert und ist nicht im Genom von Ratten, Mäusen und Hunden kodiert (Adolf, 1995; Roberts *et al.*, 1998). Auch nach Zugabe von universellem IFN- α (IFN- α 1/2-Hybrid) war es möglich, Plaques zu generieren. Es sind 12 Subtypen von IFN- α bekannt, die zusammen mit IFN- β und IFN- ω ein ähnliches Wirkungsspektrum mit großen Potenzunterschieden in der antiviralen, antiproliferativen und immunzellaktivierenden Funktionsweise zeigen (Thomas *et al.*, 2011). IFN I können von einer Vielzahl von Zellen, unter anderem von DC, produziert werden (Gonzales-Navajés *et al.* 2012). Gujer *et al.* (2011) konnten zeigen, dass die Zugabe von DC-Überständen einen verstärkenden Effekt auf die T-Zell-abhängige IgM-Produktion der B-Zellen *in vitro* haben. Es sind Unterschiede in Subpopulationen, Phänotyp und Funktion zwischen DC aus Nagern und Primaten beschrieben (Loré *et al.*, 2003). Zudem sind DC im humanen peripheren Blut in geringen Anteilen (< 1 % der PBMC) vorhanden (Loré *et al.*, 2003). Schon Inaba *et al.* konnten 1983 einen positiven Effekt von zugesetzten DC auf MD Kulturen mit humanen PBMC zeigen. Ebenso wie in Versuchen dieser Dissertation, war es ihnen nicht möglich, detektierbare SRBC-spezifische Immunreaktionen *in vitro* mit PBMC zu generieren. Erst nach Zugabe von isolierten DC konnten sie eine messbare Immunantwort *in vitro* erhalten (Inaba *et al.*, 1983). Alle diese Befunde sprechen allgemein dafür, dass PBMC aus Primaten die Supplementierung mit IFN I oder mit zusätzlichen DC erfordern. Diese These würde die Vermutung nahe legen, dass die o.g. Publikationen (Misiti und Waldmann, 1981; Morgan *et al.*, 1982), welche statt FCS humanes Plasma in der Zellkultur verwendeten, durch ebendiese Supplementierung möglicherweise unwissentlich IFN I zuführten.

Im Gegensatz zu IFN- ω und IFN- α konnte mit IFN- λ 1 alleine keine SRBC spezifische Antikörperproduktion nach acht Tagen Zellkultur induziert werden. IFN- λ 1 kann zur Superfamilie der IL-10 Zytokine gezählt werden und bindet im Unterschied zu den klassischen IFN I Mitgliedern (IFN- α , IFN- β und IFN- ω) an einen anderen Rezeptor (Sheppard *et al.*, 2003). Das Ausbleiben des plaquesteigernden Effektes von IFN- λ 1 ist im Einklang mit der beschriebenen Funktionsweise dieses Zytokins, welche in der Induktion von Tregs und damit in der Förderung von Toleranz resultiert (zusammengefasst in Commins *et al.*, 2008). Die Kombination dieser drei Interferone konnte den Stimulationslevel durch IFN- ω alleine nicht übertreffen, sodass man davon ausgehen kann, dass IFN- ω in der gewählten Konzentration sowohl ausreichend als auch optimal für die *in vitro* Immunantwort von humanen PBMC ist.

Zusammenfassend lässt sich für die Etablierung der Zellkulturbedingungen festhalten, dass der MD Test an Primärzellen aus verschiedenen Spezies angepasst werden kann. Dabei ist für Rattenmilzzellen und PBMC die Supplementierung mit 2-ME essentiell. Für PBMC aus Primaten ist zusätzlich die Inkorporation von IFN I, vor allem von IFN- ω , für die Ausbildung einer *in vitro* Immunreaktion gegen SRBC notwendig. Zudem sind die etablierten Bedingungen für Zellen diversen Ursprungs nach Optimierung der Zellkultur reproduzierbar, robust und auch von anderen Experimentatoren durchführbar.

4.2 MD Test als *in vitro* Immuntoxizitätsassay

Im nächsten Teil dieser Dissertation wurden die etablierten Testsysteme auf ihre Eignung für toxikologische Prüfungen untersucht. Dazu wurde eine Auswahl an Testsubstanzen, sowohl Kontrollsubstanzen als auch Immunsuppressiva, im MD Test eingesetzt. An Immunsuppressiva wurden mit dem purinanalogen Azathioprin und dem DNA-alkylierenden Cyclophosphamid zwei durch unterschiedliche Mechanismen zytostatisch wirkende Prodrugs gewählt. Zudem wurden das synthetische Glucocorticoid Dexamethason, der Calcineurininhibitor Cyclosporin A und das PAK Benzo(a)pyren getestet. Kontrollsubstanzen umfassten nichttoxisches Mannitol, sowie die Irritanzen Heptanal, SDS und Triton X-100.

Durch den MD Test mit Milzzellen und PBMC aus Ratten war es möglich, eine konzentrationsabhängige und substanzspezifische Änderung der Plaquezahlen und der Zellviabilität zu detektieren, die im Wesentlichen den publizierten Daten

mit Mausmilzzellen (Köper und Vohr, 2009) entsprachen. So führte die *in vitro* Inkubation von Milzzellen und PBMC aus Ratten mit B(a)p zu einer Unterbindung der Plaquezahlbildung ohne Viabilitätsverlust bei einer Substanzkonzentration von 10 μ M, wobei der erhaltene Konzentrationsbereich bereits publizierten *in vitro* Daten entspricht (van Grevenynghe *et al.*, 2003). Irritatives Heptanal führte ab 10 mM zu einer Reduktion der Viabilität und parallel zu beeinträchtigten Plaquezahlen, im Gegensatz zum nichttoxischen Mannitol, das bis 50 mM keine Auswirkungen in Rattenzellen auf diese Endpunkte hatte. Mit Mannitol, Heptanal und B(a)p wurden ähnliche IC₉₀ Werte und korrespondierende Viabilitäten für Milzzellen aus zwei Rattenstämmen und PBMC aus Ratten und Mäusen bestimmt, die auch den Größenordnungen für Mausmilzzellen (Köper und Vohr, 2009) entsprechen. Aufgrund dieser Ergebnisse, wurden die von Köper und Vohr (2009) für Mausmilzzellen vorgeschlagenen Kriterien zur Klassifizierung der Testsubstanzen auch für PBMC und Milzzellen aus Ratten übernommen.

Alle getesteten bekannten Immunsuppressiva wurden im MD Test mit Milzzellen aus Wistarratten, dem Standard-Rattenstamm für toxikologische Untersuchungen in der Abteilung, mit einer IC₉₀ korrespondierenden Viabilität über 50 % korrekt klassifiziert. Somit erreichte der Test aufgrund der begrenzten Anzahl getesteter Immunsuppressiva eine vorläufige Sensitivität von 100 %. Dabei wurden für Cyclosporin A, Dexamethason und Cyclophosphamid IC₉₀ Werte im einstelligen millimolaren Konzentrationsbereich bestimmt. Für B(a)p lag der IC₉₀ im mikromolaren und für Azathioprin sogar im nanomolaren Bereich. Diese Abfolge entspricht nicht dem tatsächlichen immunsuppressiven Potenzial der Agenzien *in vivo*, wonach das einzige hier verwendete Umweltgift B(a)p weniger immunsuppressiv im Vergleich zu den anderen, zur Medikation eingesetzten Substanzen, ist (Temple *et al.*, 1993). Allerdings wurde auch *in vivo* ähnliches IgM Suppressionspotenzial in Ratten für Cyclophosphamid und Cyclosporin A gefunden (Koganei *et al.*, 2007). Azathioprin ist ein sehr potentes Immunsuppressivum, das nach humanen Organtransplantationen täglich in Konzentrationen von 1 - 3 mg/kg verabreicht wird. Jedoch sind die Medikamentendosen für die anderen Substanzen vergleichbar und höchstens um Faktor zehn erhöht (Lindenfeld *et al.*, 2004; Post *et al.*, 2005). Somit ist ein Ranking der Testsubstanzen hinsichtlich ihrer immunsuppressiven Wirkstärke mit der T-Zell-abhängigen humoralen Immunreaktion *in vitro* nicht unbedingt möglich und kann eventuell auf die für Azathioprin, Benzo(a)pyren und Cyc-

lophosphamid erforderliche Metabolisierung und unterschiedliche Bioverfügbarkeit zurückgeführt werden. So wurden für Azathioprin ähnliche IC₉₀ Werte im zweistelligen nanomolaren Bereich bei Viabilitäten über 50 % für Zellen aus beiden getesteten Rattenstämmen erhalten. Diese Konzentrationen zeigen eine ca. 20-fach höhere *in vitro* Sensitivität von Rattenzellen im Vergleich zu Mauszellen auf (Galanaud *et al.*, 1975). Diese Divergenz könnte durch Metabolisierungsunterschiede der beiden Systeme begründet sein, da das Prodrug Azathioprin unter Beteiligung einer Vielzahl von Enzymen erst nach Spaltung zu 6-Mercaptopurin und Umwandlung in Deoxythio-GTP in die DNA eingebaut werden kann (Zhang *et al.*, 2010). Cyclophosphamid wirkt nach Biotransformation durch Cytochrom-P450 Enzyme (Connors *et al.*, 1974; Clarke und Waxman, 1989) als zytotoxisches, alkylierendes Agens und verursacht DNA-Quervernetzungen und Einzelstrangbrüche (Colvin, 1999). In Rattenmilzzellen wurde Cyclophosphamid korrekt als Immunsuppressivum erkannt, was eine Metabolisierung der Substanz voraussetzt. Diese war in Milzzellen von Mäusen nicht gegeben (Köper und Vohr, 2009), konnte aber durch Inkubation mit S9-Mix gewährleistet werden (Tucker und Munson, 1981; Fischer *et al.*, 2011). Generell muss in einem *in vitro* Testsystem die Substanzmetabolisierung gesondert bedacht werden, um zum einen durch fehlende Detoxifikation falschpositive und zum anderen durch unzureichende Aktivierung falschnegative Ergebnisse zu umgehen (Coecke *et al.*, 2006). Für einen *in vitro* Test zu Screeningzwecken richtet sich die Wahl des metabolisierenden Systems nach der zu untersuchenden Substanz, der involvierten Enzyme und der relevanten Spezies, wobei im Wesentlichen der Einsatz von S9-Mix aus induzierten Tieren oder Kokultivierung mit kompetenten Zellen in Frage kommt (siehe Übersicht in Coecke *et al.*, 2006).

Metabolisierung kann nicht der alleinige Grund für Speziesunterschiede sein, da Dexamethason und Cyclosporin A ebenfalls große IC₉₀ Differenzen zwischen Rattenzellen und Mauszellen aufwiesen. So wurde für Dexamethason in Mausmilzzellen ein zweistelliger IC₉₀ im nanomolaren Bereich bestimmt (Köper und Vohr, 2009), der für Rattenmilzzellen im einstelligen millimolaren Bereich lag. Dieses Ergebnis scheint spezifisch für die *in vitro* Inkubation zu sein, denn *in vivo* wurden Ratten als die empfindlichere Spezies mit einem ca. 30-fach niedrigeren IC₅₀ Wert nach einwöchiger i.p. Behandlung der Tiere verglichen mit Mäusen im PFCA für Dexamethason bestimmt (Loveless *et al.*, 2007). Für Cyclosporin A wur-

de ein ca. 100-fach höherer IC90 im MD mit Milzzellen aus Ratten bestimmt. *In vivo* liegt Cyclosporin A in großen Anteilen an Erythrozyten gebunden und damit nichtverfügbar vor (Lemaire und Tillement, 1982). Da im MD Test mit Rattenzellen die zehnfache Menge SRBC eingesetzt wird, kann der Unterschied z.T. darauf zurückgeführt werden.

Im Gegensatz zu den Immunsuppressiva konnten nicht alle getesteten Irritantien im MD Test korrekt klassifiziert werden. So wurde für Heptanal in einem von zwei durchgeführten Versuchen mit Milzzellen von Wistarratten eine Viabilität über 50 % bestimmt, die jedoch bei Betrachtung beider Versuche im Mittel noch knapp unter 50 % lag. In den anderen getesteten Spezies wurde Heptanal eindeutig richtig vorhergesagt. Für SDS wurden in beiden Versuchen mit Milzzellen aus Wistarratten Viabilitäten über 60 % bestimmt, was zu einer falschpositiven Einordnung der Substanz führte. Dieses abweichende Resultat scheint kein generelles Problem für Detergenzien darzustellen, da Triton X-100 mit einer IC90 Viabilität von 26 % richtig eingeordnet wurde. Zudem ist der Effekt speziesspezifisch, da SDS im MD Test mit Mausmilzzellen mit einem zehnfach höheren IC90 Wert zutreffend klassifiziert wurde (Köper und Vohr, 2009). SDS ist ein starkes Irritans ohne spezifische immunmodulierende Wirkung, wurde allerdings auch im LLNA als falsch positiver Sensibilisierer vorhergesagt (Basketter, Gerberick und Kimber, 1998). Da der Einsatz des lokalen Lymphknotentests auch als Methode zur Identifizierung von immunsuppressiven Agenzien diskutiert wird (Oshida *et al.*, 2011), besteht hier ein möglicher Zusammenhang. Ein Problem bei der Klassifizierung von Irritantien ist sicherlich die hohe Standardabweichung der gemessenen Viabilitätswerte und durch den geringen Umfang der Messgruppe bedingte Schwankung der errechneten mittleren Viabilität. Dieses Problem könnte mit einer Erhöhung der Fallzahlen eingeschränkt werden. Für negative Substanzen kann aufgrund dieser Dissertation mit den gewählten Kriterien eine vorläufige Spezifität von 75 % (drei von vier Substanzen) im MD Test mit Milzzellen aus Wistarratten festgestellt werden. Jedoch ist es möglich, dass die von Köper und Vohr (2009) für Mausmilzzellen vorgeschlagenen Kriterien zur Klassifizierung der Testsubstanzen für Milzzellen aus Ratten angepasst werden müssen, um eine höhere Spezifität zu erreichen. Aufgrund der Ergebnisse in dieser Dissertation wäre eine Grenze bei 2/3 mittlerer Viabilität statt 1/2 mittlerer Viabilität vorzuziehen, wäre allerdings mit zunehmender Anzahl getesteter Substanzen zu überprüfen. Umgekehrt könnte man

auch statt der IC90-Werte für die Plaquezahlen eventuell IC80-Werte bei 50 % Viabilität ansetzen. Für eine abschließende Festlegung müssen noch weit mehr Daten der untersuchten Spezies erhoben werden, als es im Zuge dieser Dissertation möglich war.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der MD Test breite Einsatzmöglichkeiten als alternative Methode für immuntoxische Untersuchungen bietet. So kann mit dem *in vitro* Test durch die hohe DMSO-Toleranz ein großes Substanzspektrum getestet werden. Durch positive Prädiktivität bisher getesteter Substanzen wurde der MD Test mit primären Nagerzellen als eine sensitive Methode bestätigt, welche Immunsuppressiva mit unterschiedlichen Wirkmechanismen identifiziert. Zudem zeigte der Test durch enantiomerspezifische Unterscheidung eine hohe Substanzgenauigkeit auf stereochemischer Konformationsebene. Generell wurden vergleichbare Resultate mit Zellen verschiedener Spezies erhalten. Jedoch wurden z.B. mit Cyclophosphamid auch speziesspezifische Unterschiede festgestellt, sodass eine Teststrategie mit zwei Spezies für neue Substanzen zu favorisieren wäre. Grundsätzlich ist paralleles Testen in Maus- und Rattenzellen im Hinblick auf die Reproduktion und Verlässlichkeit der Ergebnisse vorteilhaft, auch unter dem Gesichtspunkt, dass aktuell keiner Spezies der Vorzug gegeben werden kann. Um korrekte Zuordnungskriterien mit gesicherten Werten für die Prädiktivität der *in vitro* Immunreaktion zu formulieren und die Methode als Immuntoxizitätstest zu bestätigen, müssen, wie oben schon angeführt, weitere bekannte Agenzien getestet werden. Mit der bisher limitierten Anzahl getesteter Immunsuppressiva wurde mit den festgelegten Kriterien eine absolute Sensitivität mit Milzzellen aus Wistarratten erreicht, die Spezifität fiel aufgrund von falschpositiven Zuordnungen etwas geringer aus. Da in der frühen regulatorisch irrelevanten Medikamentenentwicklung viele Kandidatensubstanzen vorhanden sind, sind in dieser Phase schnelle Screeningmöglichkeiten zur Substanzfavorisierung besonders wichtig. Dagegen stellen falschpositive Ergebnisse mit einhergehendem Verlust kein großes Problem aufgrund der Substanzvielfalt für die Pharmaindustrie dar (Coecke *et al.*, 2006). Bei neuen Testsubstanzen ist es sinnvoll eine metabolische Komponente zu integrieren, um die Verlässlichkeit der Ergebnisse zu erhöhen. Jedoch wird nur ein geringer Teil, etwa 20 % aller Pharmazeutika, metabolisiert, sodass die Inkorporation einer zusätzlichen metabolischen Komponente nicht zwingend für das Screening von Kandidatensubstanzen ist (Coecke *et al.*, 2006). Grundsätzlich

können falsche Vorhersagen aufgrund der Redoxsensitivität des Tests nicht ausgeschlossen werden, sodass für die Teststrategie neuer Substanzen zusätzliche Untersuchungen implementiert werden sollten. Um diesen Einfluss zu erfassen, bietet sich z.B. der *in vitro* KeratinoSens Test (Natsch *et al.*, 2011) zur Identifizierung von substanzspezifischer ARE-abhängiger Genaktivierung an. Ein solcher zusätzlicher Test könnte die Interpretation der Ergebnisse erleichtern und die Richtigkeit des MD Tests erhöhen. Aufgrund dieser Aspekte wird eine mehrstufige Teststrategie zur Identifizierung unerwünschter immunsuppressiver Effekte vorgeschlagen (Abb. 45).

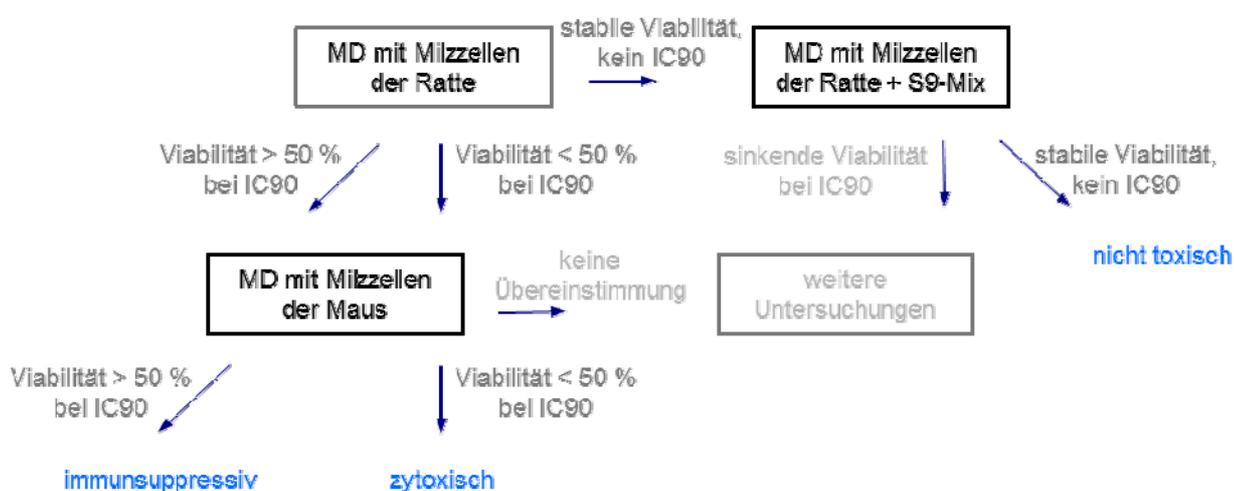


Abb. 45 Teststrategie

Um nagerspezifische Feststellungen zu identifizieren, und die erhaltenen Ergebnisse leichter auf das relevante humane System zu extrapolieren, macht es zusätzlich Sinn, Kandidatensubstanzen mit humanen PBMC zu testen.

Die Fähigkeit, PBMC aus behandelten Tieren *in vitro* zu stimulieren und bis zur Ausbildung einer spezifischen Immunreaktion zu kultivieren, eröffnet die Möglichkeit, den Immunstatus einzelner Tiere während einer Studie zu erfassen. In dieser Dissertation wurden *in vitro* Immunreaktionen von PBMC aus Ratten nach Behandlung mit Cyclophosphamid, B(a)p oder Azathioprin durchgeführt. Mit einmaliger Gabe Cyclophosphamid konnte die komplette Unterdrückung der humoralen Immunreaktion gleichermaßen durch den MD Test und PFCA gezeigt werden. B(a)p wurde Wistar-Ratten in Konzentrationen von 0, 37,5, 75 und 150 mg/kg über eine Dauer von 30 Tagen täglich oral verabreicht. Die orale Exposition mit B(a)p ist auch für die europäische Bevölkerung relevant. In Europa ist die B(a)p-Ingestion mit der Nahrung für Nichtraucher bei täglicher Aufnahme von ca. 300 ng

B(a)p die Hauptaufnahmeroute für PAK (EFSA, 2008). Zahlreiche *in vivo* Studien mit Nagern konnten eine immunsuppressive Wirkung von B(a)p belegen (z.B. White und Holsapple, 1984; Temple *et al.*, 1993; De Jong *et al.*, 1999). So beschrieben Temple *et al.* (1993) eine Reduktion der IgM Plaques im PFCA um ca. 70 % nach einer zweiwöchigen subkutanen Injektion von 40 mg/kg B(a)p in Ratten. De Jong *et al.* (1999) dokumentierten NK-Zell-Suppression nach einer 35-tägigen oralen Gabe von 90 mg/kg B(a)p in Ratten. In dieser Dissertation supprimierten 150 mg/kg B(a)p signifikant die *in vitro* Plaqueproduktion bereits nach 21-tägiger Behandlung und inhibierten diese fast vollständig nach weiteren neun Tagen. Eine niedrigdosierte oder kurzzeitige Gabe von B(a)p führte zu einer erhöhten Plaquebildung im MD Test mit PBMC. Ähnliche Immunstimulationen nach Exposition mit niedrigen Mengen von B(a)p wurden bereits beschrieben (Diaz-Sanchez *et al.*, 1996). Im PFCA konnte allerdings nach 30-tägiger oraler Gabe eine Immunstimulation, jedoch keine Inhibition bestimmt werden (Daten nicht gezeigt), wobei die Gründe dafür unklar sind. Aus der Literatur sind keine PFCA Daten in Ratten nach oraler B(a)p Aufnahme bekannt. Es wäre interessant zu untersuchen, ob PFCA Ergebnisse durch wiederholte Blutabnahmen für den MD Test beeinflusst werden können. Trotz der zweifelhaften Ergebnisse im PFCA verglichen mit dem MD Test lässt sich die Studie aus ethischer Sicht und aufgrund des hohen Aufwandes nicht ohne weiteres wiederholen.

Die immunsuppressive Wirkung von Azathioprin ist unumstritten und zahlreiche Studien belegen die durch Azathioprin oder 6-Mercaptopurin induzierte Inhibition von Immunantworten *in vivo* in Tiermodellen und Patienten (Schwartz *et al.*, 1958). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte nach oraler Aufnahme von Azathioprin ein deutlicher immunsuppressiver Effekt nachgewiesen werden. So zeigte die *in vitro* Immunreaktion mit PBMC schon nach einwöchiger Aufnahme von 10 mg/kg Azathioprin eine signifikante Immunsuppression. Nach 30-tägiger Behandlung derselben Tiere wurde die immunsuppressive Wirkung dieser Dosis auf Milzzellen im PFCA bestätigt, jedoch war der Effekt verglichen mit dem MD Test weniger deutlich. Doi *et al.* (1996) dokumentierten eine signifikante Inhibition der Plaquezahlbildung im PFCA nach einwöchiger Behandlung von Ratten mit 60 mg/kg Azathioprin, konnten aber keine funktionale Immunsuppression mit niedrigeren Dosen feststellen.

Die vergleichenden Analysen belegen die grundsätzliche Potenz beider Methoden immunsuppressive Eigenschaften von Substanzen nach Administration *in vivo* aufzuzeigen. Die Daten implementieren sogar eine höhere Sensitivität der *in vitro* Immunreaktion im Vergleich zum etablierten *ex vivo* PFCA. Außerdem legen sie die Vermutung nahe, dass die Zellkultur von unstimulierten Zellen aus substanz-behandelten Tieren und ihre Stimulation *in vitro* in der Lage ist, früher Beeinträchtigungen des Immunsystems aufzuzeigen. Um diese These zu bekräftigen und den Effekt auch für andere Substanzen zu verifizieren sind weitere Untersuchungen notwendig, die jedoch über den Umfang der Dissertation hinausgehen. Unumstritten bietet der MD Test mit PBMC im Gegensatz zum TDAR die zusätzliche Möglichkeit mehrmaliger Überprüfung eines Tieres während der Behandlung. Einen wesentlichen Vorteil der *in vitro* Untersuchung stellt die *in vitro* Stimulation der PBMC dar. Durch Ersatz des TDAR mit der alternativen Methode wären Immunsierungen von Studientieren und damit Satellitengruppen unnötig, was aus ethischen Gründen zu begrüßen wäre. Allerdings hat man im MD Test ausschließlich die Möglichkeit IgM Plaquezahlen zu ermitteln. Die zusätzliche Option der IgG-Plaquebestimmung und damit intensiverer Analysen im PFCA würde man so aufgeben. Jedoch könnte zumindest für Kinder die IgM Detektion in der *in vitro* Immunreaktion prädiktiver sein, da in Kindern eine unvollständig entwickelte humorale Immunreaktion, hauptsächlich mit Produktion von IgM, aufgrund begrenzter T-Helferzellfunktion vorliegt (Holladay and Smialowicz, 2000).

Ein aktueller Trend in der Arzneimittelforschung führt zu zunehmenden Entwicklungen von Proteinpräparaten. Solche Biologika unterscheiden sich sowohl in ihrem Aufbau und ihrer Spezifität als auch im Risikoprofil von den klassischen Wirkstoffen (*small molecules*). Obwohl Proteinwirkstoffe weniger toxisch im Vergleich zu niedermolekularen Medikamenten sind (Granath *et al.*, 2011), stellt die erhöhte Immunogenität, bedingt durch die Größe und Form von Biologikapräparaten, einen wesentlichen Risikofaktor für die Anwendung am Menschen dar. Im Gegensatz zu Biologika sind die meisten klassischen Wirkstoffe für eine direkte Interaktion mit Immunrezeptoren zu klein, sodass sie erst nach Reaktion mit körpereigenen Proteinen als Antigen Hypersensitivitätsreaktionen auslösen können (Park *et al.*, 2010). Durch diese Unterschiede haben Biologika ein anderes Anforderungsprofil an toxikologische Prüfungen und ihre Risiken können nicht ohne weiteres mit den traditionellen toxischen Prüfverfahren bewertet werden. Um Patientensicherheit

und therapeutische Wirkung zu gewährleisten und Risiken frühzeitig zu erkennen, sind neue Tests zur Detektion von Immunogenität in der frühen Phase der Medikamentenentwicklung erforderlich. In dieser Dissertation wurde ein modifizierter MD Test mit Rattenmilzzellen zu diesem Zwecke untersucht. Im Gegensatz zur erfolgreichen *in vitro* Stimulation von Milzzellen mit SRBC, war es nicht möglich, Milzzellen *in vitro* mit Ovalbumin zu stimulieren und eine antigenspezifische B-Zellantwort zu generieren. Die Gründe dafür können vielseitig sein, und wurden nicht näher untersucht. Denkbar wäre eine unzureichende Prozessierung und Präsentation von Ovalbumin, zu wenige antigenspezifische T-Zellen, fehlende T-Zellaktivierung oder Antikörperproduktion. Jedoch war es möglich Ratten *in vivo* mit Ovalbumin zu immunisieren und im Spotttest spezifische IgM Antikörper nachzuweisen. Allerdings war die Auslesbarkeit und Bewertung der Spots schwierig. Zudem ist die Immunisierung von Tieren aus tierschutzrechtlicher Sicht bedenklich und die Übertragbarkeit von Befunden in Ratten auf den Menschen bleibt fraglich. Deshalb wäre es interessant zu überprüfen, ob eine *in vitro* Stimulation mit Protein von humanen PBMC in einem modifizierten MD Test erfolgreich sein könnte. Da die *in vitro* Stimulation von PBMC aus Ratten mit Protein im modifizierten MD Test nicht gelungen und der Aussagegehalt der *ex vivo* Option des Versuches gering ist, sind hier andere Methoden zur Ermittlung von Immunogenität vorzuziehen. Als Beispiel sei hier die von Granath *et al.* (2011) vorgeschlagene multiparametrische Messung der spezifischen Antikörper und Antikörperklassen nach *in vivo* Injektion eines humanen Proteinpräparates in Mäusen zu nennen. Unter Beachtung der 3R Grundsätze zur Minimierung von *in vivo* Versuchen sind *in vitro* Alternativen bei guter Vorhersagbarkeit vorzuziehen. Gute Alternativen im Hinblick auf Speziespezifität von Biologika, bieten sicherlich humane Systeme, wie z.B. humane *in vitro* T-Zell-Stimulationsassays (Richter *et al.*, 2012), die jedoch auf ihre Vorhersagbarkeit von Proteinimmunogenität untersucht werden müssen. Die Ergebnisse aus Tierversuchen mit humanen oder humanisierten Biologika müssen auch mit Vorsicht bewertet werden, da in der humanen Matrix sicherlich nicht so deutliche Immunreaktionen auftreten werden, wie es in einer „fremden“ Spezies der Fall ist. Die internationale Richtlinie zur Testung von Biologika ICH S6 (EMA, 2011) empfiehlt für die Präklinik deswegen Affen als relevante Spezies oder die Verwendung von Surrogaten, d.h. entsprechende tierische Proteine.

Für den Einsatz der *in vitro* Immunreaktion als Methode für die toxikologische Bewertung lässt sich zusammenfassen, dass der Test mit seinen vielfältigen Einsatzmöglichkeiten eine gute Alternative zur Ermittlung von Immunsuppression darstellt. Sowohl die *in vitro* SRBC-Stimulation und Substanzinkubation von Milzzellen aus Nagern als auch die *in vitro* Stimulation von PBMC diverser Spezies mit den Endpunkten IgM-Plaqueszahlermittlung und Viabilitätsbestimmung können aufgrund bisheriger Ergebnisse für toxikologische Prüfungen empfohlen werden. Ihr Einsatz in der frühen Entwicklung von Medikamenten kann die Anzahl der Tierversuche reduzieren und gleichzeitig dazu beitragen, Substanzen effektiver zu favorisieren und die Interpretation der anderen präklinischen Daten zu erleichtern. Der MD Test mit humanen PBMC muss noch weiter durch Evaluierung von Testsubstanzen als Immuntoxizitätstest überprüft werden. Der Nutzen der *in vitro* Immunreaktion für die Vorhersage von Proteinimmunogenität ist nach den bisherigen Befunden fraglich, sodass momentan zu diesem Zweck andere Testverfahren vorgezogen werden sollten.

4.3 Charakterisierung der humoralen *in vitro* Immunreaktion

4.3.1 Vergleich der *in vitro* Immunreaktion mit der *in vivo* Immunantwort

Im nächsten Teil der Dissertation sollte durch die Charakterisierung der SRBC-spezifischen humoralen *in vitro* Immunreaktion die Vergleichbarkeit zwischen dieser und der humoralen Immunantwort *in vivo* untersucht werden. Dazu wurde zunächst durch Depletionsexperimente die Notwendigkeit der Präsenz verschiedener Zellen für den MD Test mit Rattenmilzzellen analysiert. So führte die Depletion von adhärennten Zellen zu einer deutlichen Abnahme der *in vitro* produzierten SRBC-spezifischen Plasmazellen. Ähnliche Versuche wurden schon an MD Kulturen von Mausmilzzellen durchgeführt (Mosier, 1967; Hartmann *et al.*, 1970), wodurch die Notwendigkeit von adhärennten und nichtadhärennten Zellen für eine erfolgreiche *in vitro* Immunreaktion aufgezeigt wurde. FACS-Analysen belegten eine Anreicherung von antigenpräsentierenden Zellen in der adhärennten Zellpopulation. Für humane PBMC wurde gezeigt, dass sich die adhärennten Zellen nach einer 16-stündigen Inkubation überwiegend aus Monozyten (80 - 90 %), Lymphozyten (5 - 15 %) und DC (1 - 6 %) zusammensetzen, dagegen DC in adhärennten Mausmilzzellen einen größeren Anteil von 10 - 50 % einnehmen (Van Voorhis *et*

al., 1982). So führte in dieser Dissertation die Depletion adhärenter Rattenmilzzellen über Nacht zu einer Abnahme von antigenpräsentierenden Zellen um mindestens 20 %, jedoch war der Anteil von CD45RA-RT1b+-exprimierenden Zellen in der nichtadhärenten Zellpopulation mit 4 - 8 % immer noch recht hoch. Eine spezifische Depletion von Makrophagen und DC nach einer Inkubation über Nacht scheint nicht einfach zu sein, da anscheinend auch adhärente B-Zellen mit depletiert werden. Eine solche Möglichkeit wurde auch schon von anderen beschrieben, die in Experimenten belegen konnten, dass neben Makrophagen und DC auch B-Zellen über Nacht adhären und somit ebenfalls depletiert werden (zusammengefasst in Oehler *et al.*, 1978). In dieser Dissertation wurden die adhären und nichtadhären Zellpopulationen bis auf die bereits beschriebenen Zelloberflächenmarker nicht näher bestimmt.

Durch die durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarker CD45RA und RT1b, zusammen mit der Größenanalyse (Forwärtsstreuung) war es möglich die B-Zellentwicklung während der *in vitro* Immunreaktion von PBMC aus Ratten zu verfolgen. So exprimieren nahezu alle normalen B-Lymphozyten die hochmolekulare Isoform der Tyrosinphosphatase (*leucocyte common antigen*), welche von dem CD45RA Antikörper erkannt wird (Poppema *et al.*, 1996). Etwa 10 % der PBMC aus Ratten wurden mit den gewählten Markern als B-Zellen identifiziert, was in einer Größenordnung mit dem B-Zell-Anteil in humanen PBMC (etwa 15 %) liegt (Chaplin, 2010). Sehr schnell nach der Stimulation mit SRBC kam es zur Proliferation der B-Zellen und dadurch zu einer deutlichen Zunahme von CD45RA+/RT1b+ Zellen. Zudem wurde ab dem vierten Zellkulturtag ein Anstieg von B-Zellblasten gemessen und die Detektion von SRBC-spezifischen Plasmazellen war nach sechs Zellkulturtagen mit dem Plaqueassay möglich. Parallel zur humoralen Immunreaktion *in vivo*, wo es während der Differenzierung und Wachstumsphase von Plasmablasten zu einer Runterregulierung von oberflächengebundenen Immunglobulinen, CD19, CD21, CD22, CD45, CD86 und MHC II kommt (Calame, 2001; MacLennan *et al.*, 2003), wurde auch *in vitro* eine Abnahme von CD45 und MHC II detektiert. Genexpressionsanalysen von CD45RA-positiven Milzzellen im Vergleich zu CD4-positiven Zellen zeigten eine zunehmende Differenz der unterschiedlich exprimierten Gene über die Zeit auf. Diese Änderung deutet auf einen Zelldifferenzierungsprozess der B-Zellen hin, wobei die identifizierten Gene in dieser Dissertation in Grundzügen untersucht werden konnten.

Neben der Notwendigkeit von Makrophagen und B-Zellen wurde in MD Kulturen von Mausmilzzellen schon früh die Notwendigkeit von T-Zellen für die *in vitro* anti-SRBC Immunreaktion gezeigt (zusammengefasst in Oehler *et al.*, 1978). Auch für erfolgreiche MD Kulturen mit Milzzellen aus Ratten waren T-Zellen essenziell, so dass die T-Zellabhängigkeit der *in vitro* Immunreaktion gegen SRBC belegt werden konnte. Die Art der T-Zellabhängigkeit konnte durch die hier durchgeführten Versuche nicht näher bestimmt werden. So ist unklar, ob für die *in vitro* Antikörperproduktion B-Zell-T-Zell Interaktionen über MHC II, CD80, CD86 und CD40 notwendig sind, oder ob eine ausschließlich zytokinvermittelte Stimulation ausreichend ist. In *in vivo* Mausexperimenten konnte eine MHC-restrikive Aktivierung von SRBC-spezifischen B-Zellen durch T-Helferzellen nachgewiesen werden. Diese Spezifität war *in vitro* nicht gegeben, sodass hier die T-Zell-abhängige Aktivierung der B-Zellen faktorvermittelt und MHC-unabhängig erfolgte (Feeney *et al.*, 1984). Mit antigenspezifischen T-Zellen aus z.B. transgenen Tieren könnte die Spezifität der T-Helferzellen für die *in vitro* Immunreaktion von Rattenzellen gezeigt werden. So sind z.B. transgene Mäuse mit OVA spezifischen T-Zellrezeptoren zugänglich (OT-2 Mäuse, The Jackson Laboratory). Vergleichbare transgene Ratten sind noch nicht verfügbar.

Durchgeführte Genexpressionsanalysen von T-Helferzellen könnten einen Hinweis auf die T-Zellspezifität geben. Der Anteil von CD3⁺ Zellen in der CD4-isolierten Zellfraktion für Genexpressionsanalysen war mit ca. 50 % an Tag Null nicht besonders hoch, sodass man davon ausgehen kann, dass Genmaterial aus Monozyten und Makrophagen (zusammengefasst in Derrick, Gibbins und Befus, 2009) einen großen Teil der Ergebnisse von Tag Null bildet, dem die Proben der anderen beiden Tage gegenübergestellt wurden. Trotzdem sind die Ergebnisse gut interpretierbar, da an den Tagen drei und sechs etwa 90 % der analysierten CD4⁺ Zellen durch die Expression von CD3 als T-Helferzellen identifiziert wurden. Eine solche Zunahme ist entweder durch eine Abnahme von Monozyten und Makrophagen in der Zellkultur, z.B. durch Zelltod, oder durch eine Zunahme von T-Helferzellen durch Proliferation, für die auch die hochregulierten Zellzyklusgene sprechen, erklärbar. In Genexpressionsanalysen von CD4⁺ Zellen an Tag drei und sechs der MD-Kultur waren besonders zytokinkodierende Gene stark hochreguliert. Unter den Zytokinen waren mit *Ccl17* und *Ccl22* auffällig viele Gene von CCR4 Liganden (Luther und Cyster, 2001) vertreten. Zudem waren die Zytokinge-

ne *Mcp-1* (*Ccl2*), *Il-1 α* , *Ccl4* (*Mip-1 β*), *Cxcl3* (*Mip-2 β*) und *Isg15* stark induziert. Allerdings lässt sich von der Genexpression allein nicht zwingend auf das Vorhandensein der Proteine schließen, da auch *Csf2*, das Gen für GM-CSF, im Laufe der *in vitro* Immunreaktion stark hochreguliert wurde, jedoch nicht durch Zytokinmessungen im Überstand detektiert werden konnte. Auch *Il-1 α* wurde durch Zytokinmessungen nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen.

In Genexpressionsanalysen wurden für T-Zellaktivierung spezifische Gene, kodierend für die kostimulatorischen Moleküle CD134 bzw. OX-40 (*Tnfrsf4*) und CD137 (*Tnfrsf9*) (Smith-Garvin, Koretzky und Jordan, 2009), schon am dritten Zellkulturtag sehr deutlich hochreguliert. Durchflusszytometrische Analysen mit den Antikörpern gegen CD25 und CD4 belegten die Aktivierung von T-Helferzellen, und eine zusätzliche Betrachtung der vorwärtsstreuenden Eigenschaften zeigt einen deutlichen Anstieg von CD4 Blasten ab dem vierten Zellkulturtag. Der verwendete anti-CD25 Antikörper erkennt die alpha Kette des IL-2 Rezeptors, welcher spezifisch von aktivierten T-Zellen exprimiert wird (Shevach, 2001). Auch in Genexpressionsanalysen wurde eine starke Hochregulation vom CD25-kodierenden Gen (*Il2ra*) in CD4-positiven Zellen festgestellt. Durch Komarkierung mit dem anti-CD4 Antikörper und die Aufnahme von Zellen im Lymphozytengate, war es möglich, spezifisch T-Helferzellen zu verfolgen und die ebenfalls CD4+ bzw. korezeptorexprimierenden Monozyten, Makrophagen und DC (zusammengefasst in Gibbings und Befus, 2009) auszuschließen. Neben aktivierten T-Zellen wird CD25 besonders von Tregs produziert, welche sich jedoch zusätzlich durch die Expression von dem Transkriptionsfaktor Foxp3 auszeichnen (zusammengefasst in Josefowicz, Lu und Rudensky, 2012) und in dieser Dissertation nicht näher betrachtet wurden.

Mittels Zytokinmessungen im Überstand wurden große Mengen von IL-4 detektiert, welches sowohl spezifisch nach Stimulation mit SRBC ausgeschüttet wurde als auch über die Zeit zunahm. *In vivo* wird IL-4 sowohl von Th2 Zellen als auch von folliculären T-Helferzellen (Tfh) produziert und fördert neben dem Immunglobulin-Isotypwechsel auch das Überleben und die Proliferation von B-Zellen (Reinhardt, Liang und Locksley, 2009; Farrar *et al.*, 1982). Genexpressionsanalysen von T-Helferzellen belegten eine sehr hohe Expression des T-Zell kostimulatorischen Rezeptors (*Icos*), welcher von aktivierten T-Zellen exprimiert wird und für humorale Immunreaktionen gegen zahlreiche Antigene, u.a. SRBC, *in vivo* notwendig ist (Dong *et al.*, 2001). Es wurde eine direkte Korrelation zwischen der Ex-

pression von Icos mit der Sekretion von B-Zell-aktivierendem IL-10 in T-Helferzellen festgestellt (Vinuesa *et al.*, 2005). Sowohl für Th2 als auch für Tfh ist die charakteristische Expression von Icos bekannt (Akiba *et al.*, 2005). Detektiertes IFN- γ würde gegen eine reine Th2-vermittelte Immunreaktion sprechen. Darüber hinaus war MCP-1 das dominierende Chemokin (ca. 7000 pg/ml). MCP-1 wird von einer Vielzahl von Zellen, u.a. Makrophagen, DC, Endothelzellen und Fibroblasten, produziert und fördert neben der Rekrutierung inflammatorischer Zellen die Th2-Polarisierung in aktivierten T-Zellen (zusammengefasst in Luther und Cyster, 2001). Auch in Genexpressionsanalysen von CD4⁺ Zellen wurde das Gen für MCP-1 (*Ccl2*) besonders deutlich im Verlauf der *in vitro* Immunreaktion hochreguliert gefunden. Zudem wurden zwei Gene von CCR4 Liganden, *Ccl17* und *Ccl22*, hochreguliert, für die ebenfalls eine Th2 fördernde Rolle diskutiert wird (Luther und Cyster, 2001).

In MD Kulturüberständen von humanen PBMC konnten durch eine bessere Verfügbarkeit von Reagenzien weitere Zytokine bestimmt werden (Daten nicht gezeigt). So wurden nach Zugabe von Typ I Interferon und Stimulation mit SRBC ebenfalls hohe Konzentrationen von MCP-1 (ca. 11000 pg/ml) bestimmt. Zudem gaben hohe Konzentrationen von IL-8 (ca. 3000 pg/ml), welches *in vivo* als Chemoattraktant für Neutrophile fungiert (Baggiolini und Clark-Lewis, 1992), einen Hinweis auf Makrophagenaktivierung. Von IL-6, welches *in vivo* überwiegend von Th1 und Th17 (Chaplin, 2010) sezerniert wird, lagen in IFN I supplementierten MD Kulturen nur geringe Mengen vor (20 pg/ml). Diese Messung ist besonders im Vergleich zu den deutlich höheren Konzentrationen in MD Kulturen ohne Zugabe von IFN I (> 500 pg/ml) interessant und schließt eine Th1 bzw. Th17 Polarisierung aus. Eine Th2 bzw. Tfh Zellausrichtung wurde auch durch höhere Konzentrationen von IL-10 nach IFN I Zugabe (ca. 50 pg/ml) im Vergleich zu Bedingungen ohne IFN I (ca. 20 pg/ml) möglich. IL-10 wird *in vivo* von ebendiesen Zellen produziert und dient der B-Zellhilfe (Vinuesa *et al.*, 2005). In FACS-Analysen von MD Kulturen mit PBMC aus Wistarratten wurde CD45RC in CD4-exprimierenden Lymphozyten detektiert. Dabei waren am Anfang der Zellkultur etwa 30 % der T-Helferzellen CD45RC-hochexprimierend und etwa 15 % exprimierten CD45RC schwach. Dieses Verhältnis kehrte sich nach messbarer T-Zellaktivierung am fünften Zellkulturtag um, sodass im weiteren Verlauf die Mehrheit der T-Helferzellen CD45RC niedrigexprimierend war. Diese beiden T-Helferzellsubpopulationen sind

in der Literatur beschrieben und werden mit unterschiedlichen Zytokinprofilen assoziiert. So produzieren CD45RChigh T-Helferzellen Th1 Zytokine IL-2, IFN- γ und TNF- α , wogegen in CD45RClow T-Helferzellen zusätzlich IL-4, IL-10 und IL-13 gebildet werden (Subra *et al.*, 2001). Eine deutliche Verschiebung zum CD45RClow Phänotyp im Verlauf der *in vitro* Immunreaktion ist somit ein weiteres Argument für eine Th2-dominierende Antwort auf SRBC. Aufgrund der durchgeführten Analysen kann keine eindeutige Zuordnung der T-Zellen in der *in vitro* Immunreaktion vorgenommen werden. Trotz deutlicher Hinweise auf eine Th2-vermittelte Reaktion bleibt eine gewisse Unsicherheit, ob tatsächlich eine solche Spezifizierung *in vitro* erfolgt. Es sind ausgedehntere Zytokinmessungen und Chemokinrezeptorbestimmungen erforderlich (vgl. Vinuesa *et al.*, 2005), um die T-Zellen in der *in vitro* Immunreaktion von Rattenzellen näher zu charakterisieren.

4.3.2 Einfluss von 2-ME auf die *in vitro* Immunreaktion

Während der Etablierung des MD Tests für Milzzellen und PBMC aus Ratten wurde eine deutliche Abhängigkeit der Viabilität und Antikörperproduktion von 2-ME für die Zellkultur festgestellt. So war die Supplementierung mit 2-ME notwendig, um eine messbare Antikörperantwort gegen SRBC zu erhalten, wobei durchgehende Konzentrationen von 50 μ M 2-ME im Medium als ideal für Rattenzellen bestimmt wurden. Höhere Konzentrationen waren inhibierend für die Plaqueproduktion trotz positiver Wirkung auf die Viabilität der Zellen. Als optimal erwiesen sich Konzentrationen von 135 μ M 2-ME für 24 Stunden während des Erstkontaktes mit SRBC und 10 μ M 2-ME während der restlichen Zellkulturperiode, wie es dann auch im Standardprotokoll festgelegt wurde.

Die Supplementierung der Zellkultur mit Antioxidantien wie 2-ME hat als wesentliches Ziel, oxidativen Stress, entstehend z.B. durch höhere Sauerstoffkonzentrationen *in vitro*, zu reduzieren (zusammengefasst in Krieger *et al.*, 1996). So wird die überlebensfördernde und viabilitätssteigernde Wirkung von 2-ME in murinen Lymphozyten zu 25 - 45 % auf antioxidative Effekte, sowohl primär durch 2-ME außerhalb der Zellen als auch sekundär durch intrazellulär gebildetes Glutathion, zurückgeführt. Der restliche Anteil wird durch gesteigerte Proteinbiosynthese über durch 2-ME verbesserte Cystein-Verfügbarkeit erklärt (zusammengefasst in Pruett *et al.*, 1989). In den Brutschränken werden die Zellen, wie auch in dieser Dissertation, üblicherweise bei atmosphärischen Sauerstoffkonzentrationen (ca. 20 % O₂)

kultiviert. Diese ist deutlich höher als in den Gefäßen oder in den lymphatischen Organen *in vivo*, wo man von einer Sauerstoffverfügbarkeit von 1 - 10 % für T-Zellen ausgeht, und führt zu einer höheren Belastung der Zellen mit ROS (Larbi *et al.*, 2010; Krieger *et al.*, 1996). Die Wirkmechanismen des additiven 2-ME und einer Erniedrigung der Sauerstoffkonzentration scheinen nicht identisch zu sein und sind bisher noch nicht vollständig untersucht, obwohl Einflüsse auf zelluläre Signalweiterleitung, Metabolismus, Differenzierung und Homeostase diskutiert werden (Larbi *et al.*, 2010; Krieger *et al.*, 1996). Aber auch hypoxische Sauerstoffkonzentrationen führen zu einer höheren Belastung der Zellen mit ROS (Hamanaka und Chandel, 2009).

Ebenso werden durch niedrige Sauerstoffkonzentrationen der Transkriptionsfaktor Hif-1 α und damit verbundene hypoxieinduzierte Genregulation in Zellen hochreguliert (Larbi *et al.*, 2010). Auch in Genexpressionsanalysen von CD4-positiven Zellen nach Inkubation mit 2-ME, wurden trotz atmosphärischer Sauerstoffkonzentrationen im Verlauf der *in vitro* Immunreaktion auffällig viele Hif-1 α -regulierte und hypoxieinduzierte Gene hochreguliert. So wurden die nachgewiesenen Hif-1 α -regulierten Gene *Slc16a* (Ullah *et al.*, 2006), *Vegfa* (Bracken *et al.*, 2003), *Egln3* (Lee und Percy, 2011) und *Eno2* (Bracken *et al.*, 2003) im Verlauf der Immunreaktion mit Zugabe von 2-ME mehr als zehnfach höher exprimiert im Vergleich zu Tag Null. *Egln3* (Phd3) gehört zur Familie der Prolylhydroxylasen, welche die Aktivität von Hif-1 α negativ regulieren, indem sie den initialen Schritt für die Ubiquitinierung und zum folgenden Abbau im Proteasom katalysieren (Lee und Percy, 2011). Zudem wurden weitere, in anderen Zellen bekannte durch Hypoxie induzierbare Gene, *Fabp5* (Mazzatti *et al.*, 2012) und *Mt2A* (Yamasaki *et al.*, 2007), in CD4-positiven Zellen identifiziert. Auch im Vergleich zu Inkubationsbedingungen ohne 2-ME war *Epor*, ein in die Immunsystem-Funktionsgruppe eingeordnetes, hypoxieassoziiertes Gen (Maiese *et al.*, 2008), deutlich höher mit 2-ME als ohne 2-ME exprimiert. Für T-Zellen ist die Hif-1 α -vermittelte Genregulation bekannt (zusammengefasst in Nutsch und Hsieh, 2011). So ist zusätzlich zu den gut untersuchten Zytokinen der Einfluss von niedrigen Sauerstoffkonzentrationen auf die Th-Differenzierung beschrieben. Dabei ist die Hif-1 α -Expression in Verbindung mit Hypoxie als notwendig für Th17-Differenzierung identifiziert worden (Dang *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2011). Gleichzeitig wurde Hif-1 α als Inhibitor für die Entwicklung der induzierten Tregs beschrieben (Dang *et al.*, 2011).

Neben Hypoxie und Hif-1 α stellte sich der metabolische Weg der Glykolyse als essentiell für die Th17-Differenzierung heraus, wobei die Unterbindung der Glykolyse durch den Hexokinaseinhibitor 2-Deoxyglukose Th-Zellentwicklung zu Th17 behinderte und zu Gunsten von Treg verlagerte (Shi *et al.*, 2011). Die Induktion von Genen kodierend für Enzyme der Glykolyse durch Hif-1 α wurde nachgewiesen (Semenza *et al.*, 1994). Gleichzeitig ist die Bedeutung der Glykolyse für aktivierte T-Zellen bekannt. So ist für aktivierte T-Zellen, vergleichbar mit Krebszellen, die ATP-Synthese über die Glykolyse, ungeachtet ausreichender Verfügbarkeit von Sauerstoff für die oxidative Phosphorylierung, der sogenannte Warburg Effekt, charakteristisch (Fox *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2011; Warburg, Posener und Negelein, 1924). Auch ist eine redoxabhängige Regulation der aeroben Glykolyse in Krebszellen nachgewiesen worden (Anastasiou *et al.*, 2011). Nach Stimulation mit SRBC wurden viele für Enzyme der Glykolyse kodierende Gene hochreguliert (*Eno2*, *Tpi1*, *Pkm2*, *Gapdh*, *Aldoa*, *Ldha*, *Pfkl* und *Pgam1*). Interessanterweise wurde unter Zellkulturbedingungen ohne 2-ME das Gen für eine Untereinheit der Pyruvatdehydrogenase (*Pdha1*) im Vergleich zu Bedingungen mit 2-ME deutlich runterreguliert, obwohl die anderen Glykolysegene nicht als unterschiedlich exprimiert identifiziert wurden. Die Pyruvatdehydrogenase bildet eine Verbindung zwischen der Glykolyse und dem Trikarbonzyklus, sodass in Folge weniger Pyruvat dem Trikarbonzyklus zugeführt werden sollte (Soga, 2013). Durch die Pyruvatdehydrogenase gebildetes Acetyl-CoA ist der zentrale Vorläufer für die Synthese von Fettsäuren und von Cholesterin (zusammengefasst in Soga, 2013). Es bleibt unklar, woher Acetyl-CoA für die Lipidsynthese bereitgestellt wird. Jedoch wurden ohne 2-ME fettsäuremetabolismusassoziierte Gene *Elovl6*, *Scd1* und *Dhcr7* im Vergleich zu Bedingungen mit 2-ME stark hochreguliert. *Elovl6* (*Elongation of long-chain fatty acids family member 6*) und *Scd1* (*Stearoyl-CoA desaturase 1*) synthetisieren im ER lange, einfach ungesättigte Fettsäuren. Diese sind wesentliche Substrate für die Bildung von komplexen Lipiden, wie Diacylglyceriden, Phospholipiden, Triglyceriden und Cholesterinester (Sampath und Ntambi, 2011; Matsuzaka und Shimano, 2009). Auch wurde unter Bedingungen ohne 2-ME das redoxassoziierte Gen für *Lpar1*, einen G-Protein gekoppelten Rezeptor für lysophosphatische Säure (LPA), hochreguliert. *Lpar1* fördert nach Aktivierung u.a. Proliferation, Überleben, Migration und Zytoskelettorganisation der Zelle (Choi *et al.*, 2010). LPA wird aus Phospholipiden gebildet (Choi *et al.*, 2010), sodass hier

die Verbindung zu den ebenfalls hochregulierten Fettsäurebiosyntheseenzymen besteht. Im ER exprimiertes Dhcr7 (*7-Dehydrocholesterol reductase*) ist das finale Enzym der Cholesterinbiosynthese und somit sowohl für die Bildung der Zellmembran als auch als Vorstufe für Steroidhormone wichtig (Jira *et al.*, 2003; Silvente-Poirot und Poirot, 2012).

Wie bereits beschrieben, wird der positive Einfluss von 2-ME auf stimulierte Lymphozyten, welche *in vitro* höheren ROS-Konzentrationen ausgesetzt sind, in hohem Maße auf seine antioxidative Wirkung zurückgeführt. So konnte für etwa 20 % aller mehr als zweifach deregulierten Gene in T-Helferzellen nach Inkubation mit 2-ME ein Zusammenhang mit Redoxregulation hergestellt werden, was die Bedeutung dieses Pathways für T-Zellaktivierung verdeutlicht. Allerdings wiesen nur wenige redoxassoziierte Gene nach Inkubation ohne 2-ME veränderte Expressionsmuster auf. Unter den ohne 2-ME höherexprimierten Genen fanden sich *Slc7a11*, *Pxdn* und *Maoa*. Besonders interessant ist der Unterschied in der *Slc7a11* (xCT) Expression, wobei das Gen mit 2-ME im Laufe der Immunreaktion nicht verändert exprimiert wird. Aus xCT und CD98 setzt sich der heterodimere Cystin-Glutamat-Antiporter zusammen, der den Transport von Cystin in die Zelle vermittelt und dadurch direkt den intrazellulären Glutathiongehalt beeinflusst (Sato *et al.*, 2005). Cystin kann in der Zelle zu Cystein, der limitierenden Aminosäure für die Synthese von GSH, reduziert werden. Gebunden an 2-ME kann Cystin auch als Disulfid durch Cystein-Transporter für neutrale Aminosäuren (Asct1, Asct2) aufgenommen werden (Sato *et al.*, 2005), was in Abwesenheit von 2-ME nicht möglich ist. In nicht aktivierten T-Zellen wird xCT nicht exprimiert, sodass sie auf die extrazelluläre Bereitstellung von Glutathion durch APC oder die Anwesenheit von 2-ME angewiesen sind. Nach Aktivierung kann xCT auch in T-Zellen exprimiert werden und so die GSH-Versorgung der Zelle sichern (Levring *et al.*, 2012). Peroxidasin (*Pxdn*) ist eine in Maus- und Humanzellen aktive Peroxidase, welche bisher noch wenig erforscht ist. *Pxdn* gehört zu HO-1-assoziierten Genen, die auch durch ROS induziert werden können und mit der Zelladhäsion in Verbindung gebracht werden (Tauber *et al.*, 2010). Monoaminoxidase (*Maoa*) katalysiert den oxidativen Abbau von xenobiotischen Aminen und monoaminen Neurotransmittern wie Serotonin (Upadhyay *et al.*, 2008), sodass hier in Th eine mögliche Verbindung zum Nervensystem besteht.

Die einzigen in Abwesenheit von 2-ME reprimierten redoxassoziierten Gene waren *Duox2* und *Ggt1*. Die auf genetischer Ebene deutlich stärker unterdrückte und noch wenig untersuchte NADPH-Oxidase *Duox2* ist in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse und kommt als mögliche Erklärung für erniedrigte ROS Mengen in Th nach Inkubation ohne 2-ME in Frage. *Duox2* gehört neben *Duox1* und den fünf Nox-Enzymen zu den wichtigsten ROS-Produzenten in der Zelle. Wobei *Duox* H_2O_2 und Nox das Hyperoxid-Anion generieren (Rada und Leto, 2008). In T-Zellen ist die Expression von *Duox2* bisher nicht beschrieben, allerdings wurde für die H_2O_2 -Produktion durch *Duox1* eine Rolle in der frühen Aktivierungsphase von humanen Th beschrieben (Kwon *et al.*, 2010). H_2O_2 ist ein wichtiges Signalmolekül für diverse physiologische Vorgänge wie Proliferation, Differenzierung und Migration in der Zelle (zusammengefasst in Rhee, 2006), sodass eine nähere Betrachtung der Funktion von *Duox2* und H_2O_2 in T-Zellen auch im Hinblick auf die Aktivierung und Th-Zelldifferenzierung interessant wäre. So war in humanen Atemwegsepithelzellen die Induktion von *Duox2* mit Th1-Zytokinen assoziiert, wogegen *Duox1*-Expression über Th2-Zytokine induziert wurde (Harper *et al.*, 2005). Für humane Schilddrüsenepithelzellen wurden genau gegensätzliche Expressionsmuster beschrieben (Raad, 2013). Die γ -Glutamyltransferase (*Ggt1*) hat eine wichtige Funktion im Metabolismus von GSH, indem es die extrazelluläre Abspaltung des γ -Glutamylpeptids katalysiert und damit Substrate für die intrazelluläre GSH-Synthese bereitstellt (Bannai und Tateishi, 1986; Heisterkamp *et al.*, 2008). Zudem ist *Ggt1* wichtig für den Leukotrienmetabolismus, indem es die Umwandlung von LTC₄ zu LTD₄ katalysiert (Heisterkamp *et al.*, 2008).

Es ist bekannt, dass 2-ME den GSH-Gehalt in Milzzellen aus Mäusen und Ratten, in Thymozyten aus Ratten und in humanen PBMC nach Mitogenstimulationen erhöht (Ishii *et al.*, 1987; Lacombe *et al.*, 1987; Aidoo *et al.*, 1991; Messina und Lawrence, 1989). GSH gehört neben NADH und NADPH zu den wichtigsten Redoxsystemen der Zelle. Zu den antioxidativen Mechanismen der Zelle zählen neben Vitaminen auch die Enzyme Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase, Katalase und Thioredoxinreduktase (zusammengefasst in Malhotra und Kaufman, 2007). Desweiteren führt 2-ME über den bereits beschriebenen Mechanismus zu einer besseren Verfügbarkeit von Cystein in Mauslymphozyten und humanen PBMC (Ohmori und Yamamoto, 1983; Messina und Lawrence, 1992). Cystein ist oft der limitierende Baustein für GSH, liegt im Blutplasma nur in sehr geringen

Konzentrationen vor und kann experimentell durch NAC substituiert werden (Bannai und Tateishi, 1986; Dröge *et al.*, 1991). Um den Einfluss von intrazellulären GSH-Konzentrationen auf die *in vitro* Immunreaktion aufzuzeigen, wurden die Zellen unter Zugabe von NAC oder in Anwesenheit des GSH-Syntheseinhibitors BSO kultiviert. In beiden Fällen führte eine Änderung der intrazellulären GSH-Konzentrationen zu einer Suppression der Immunreaktion, sodass keine messbaren humoralen anti-SRBC Antikörper detektiert werden konnten. Zur Verfolgung der intrazellulären GSH-Änderungen wurden die Zellen mit CMFDA, welches nach der Umsetzung durch Esterasen durch die Glutathiontransferase enzymatisch an GSH gebunden wird und in durchflusszytometrischen Analysen im FITC Kanal detektiert werden kann (Hedley und Chow, 1994), gefärbt und im FACS ausgewertet. Alternativ wurde für die Detektion von intrazellulärem GSH enzymunabhängig an Thiolgruppen bindendes SNARF-1 eingesetzt (Hamilton *et al.*, 2007), welches durch seine spezifischen pH-Anforderungen nicht erfolgreich in Doppelfärbungen mit spezifischen Antikörpern gebraucht werden konnte. Publierte Versuche mit humanen Zellen zeigten einen negativen Einfluss von NAC auf T-Zellen und bestätigten den hier beobachteten inhibitorischen Effekt. Dieser war nachweislich vom GSH-Gehalt der Zellen unabhängig und manifestierte sich auf der DC-Ebene, wobei auch die Expression von CD86 und CD40 auf Oberflächen von DC herabgesetzt wurde (Verhasselt *et al.*, 1999). In Versuchen dieser Dissertation konnte eine intrazelluläre Zunahme von GSH durch Zugabe von NAC mit Verfolgung der Änderung der mittleren Fluoreszenz nach CMFDA-Färbung indirekt nachgewiesen werden. Jedoch kann der beobachtete suppressive Effekt von NAC nicht ausschließlich auf den erhöhten GSH-Gehalt zurückgeführt werden. BSO ist ein spezifischer Inhibitor der γ -Glutamylcysteinsynthetase, dessen Zugabe eine Herabsetzung der intrazellulären GSH-Konzentrationen herbeiführt (Griffith und Meister, 1979). Nach Zugabe von BSO zur Zellkultur konnte eine intrazelluläre GSH-Abnahme mit CMFDA und SNARF-1 nachgewiesen werden. Auch kann die Inhibition der *in vitro* Immunreaktion durch die spezifische Hemmung der GSH-Synthese direkt auf die Abnahme von GSH zurückgeführt werden.

ROS entstehen in enzymatischen Reaktionen als Beiprodukt von Sauerstoff während der mitochondrialen Atmungskette, dem Arachidonsäure-Signalweg, durch Mitglieder der P450 Enzyme, durch NO-Synthasen und durch Oxidasen, wie der Glukoseoxidase oder NADPH-Oxidasen (zusammengefasst in Malhotra und

Kaufman, 2007). Zur Untersuchung des Einflusses von extrazellulären ROS-Konzentrationen auf die *in vitro* Immunreaktion, wurden die Zellen unter Zugabe von einer exogenen ROS-Quelle in Form von H_2O_2 kultiviert. Die intrazelluläre ROS-Messung erfolgte durchflusszytometrisch mit H_2DCFDA , welches nach Oxidierung durch H_2O_2 fluoresziert. Die im FITC-Kanal des FACS detektierte Fluoreszenz ist direkt proportional zu H_2O_2 -Konzentrationen in der Zelle (zusammengefasst in Wang und Joseph, 1999). Nach Zugabe von $10 \mu M H_2O_2$ wurde die *in vitro* Immunreaktion von Rattenmilzzellen komplett inhibiert. H_2O_2 verursacht oxidativen Stress für die Zelle, hat jedoch auch eine Mediatorfunktion für diverse physiologische Vorgänge wie Proliferation, Differenzierung und Migration (zusammengefasst in Rhee, 2006). Deshalb kann der durch H_2O_2 ausgelöste inhibitorische Effekt nicht ausschließlich auf ein höheres ROS-Level der Zellen zurückgeführt werden.

Um den Einfluss von 2-ME auf die unterschiedlichen Zelltypen in der *in vitro* Immunreaktion zu ergründen, wurden Änderungen intrazellulärer Mengen von GSH und ROS über die Zeit verfolgt. Dabei zeigten Lymphozyten grundsätzlich höhere GSH-Konzentrationen nach Inkubation mit 2-ME im Vergleich zur Zellkultur ohne 2-ME. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da 2-ME, wie bereits ausgeführt, auch in anderen Zellstimulationsexperimenten die intrazelluläre GSH-Konzentration erhöht. Interessanterweise waren nach Zugabe von 2-ME auch die ROS-Mengen in Lymphozyten höher als ohne 2-ME. Dies widerspricht dem erwarteten ROS-senkenden Effekt. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass das Antioxidanz 2-ME unter den hier verwendeten atmosphärischen Sauerstoffkonzentrationen, den im Medium gelösten Sauerstoff zu H_2O_2 reduziert und damit als Oxidanz wirkt (Kojo, 2012). Eine andere Möglichkeit ist, dass die Lymphozyten tatsächlich verstärkt ROS im Laufe der *in vitro* Reaktion bilden, welches möglicherweise notwendig für die erfolgreiche Antikörperproduktion ist. Nach Inkubation mit 2-ME war am sechsten Zellkulturtag eine deutliche Population aktivierter T-Helferzellen erkennbar, die ohne Zugabe von 2-ME fehlte. Zudem wiesen diese aktivierten Th deutlich höhere Mengen an GSH im Vergleich zu nicht aktivierten Th auf. Die wenigen aktivierten T-Zellen nach Inkubation ohne 2-ME verfügten außerdem am vierten und sechsten Zellkulturtag über weniger GSH als die zahlreichen aktivierten Th nach Inkubation mit 2-ME. Eine Zunahme von GSH wurde auch in $CD4+$ Zellen in der Milz am vierten Tag nach *in vivo* i.p. Stimulation von C57Bl/6 Mäusen mit P815 Tumorzellen als Antigen detektiert (Lawrence *et al.*, 1999). Damit stellt

sich die Frage über die Funktion von GSH in aktivierten T-Zellen und seine Notwendigkeit für ebendiese. So wurde eine Bedeutung von GSH für T-Zellaktivierung (Dröge *et al.*, 1991), Lymphozytenproliferation (Fidelius *et al.*, 1987; Messina und Lawrence, 1989; Gmünder *et al.*, 1990) und IL-2R Expression (Liang *et al.*, 1992) gezeigt sowie ein Zusammenhang zur Differenzierung der T-Zellen zu Th1 oder Th2 hergestellt (Ward *et al.*, 1998). Die genaue Funktionsweise von GSH für diese Prozesse ist jedoch noch nicht geklärt. Im Gegensatz zu den 2-ME-bedingten GSH-Unterschieden in T-Zellen wurden keine großen Änderungen für ROS in T-Zellen festgestellt. Es wurden lediglich etwas höhere ROS-Mengen in aktivierten Th in der Zellkultur mit 2-ME im Vergleich zu Kulturen ohne 2-ME festgestellt. Das ist interessant, da in Genexpressionsanalysen ein großer Anteil der verändert exprimierten Gene im Laufe der *in vitro* Immunreaktion mit Redox-Regulation assoziiert werden konnte. Auch ist in T-Zellen eine wichtige Rolle von ROS nach Stimulation über den T-Zellrezeptor für Überleben, Proliferation und Th-Differenzierung bekannt (Williams und Kwon, 2004; Won *et al.*, 2010). Wie vorher schon beschrieben, generieren T-Zellen ROS über die NADPH-Oxidasen Nox2 und Duox1 (Jackson *et al.*, 2004; Kwon *et al.*, 2010). Zudem kommt aufgrund des Genarrays in dieser Dissertation Duox2 für die ROS-Produktion in aktivierten T-Zellen in Frage. Üblicherweise wird die ROS-Produktion in T-Zellen schon wenige Minuten bis Stunden nach der Aktivierung gemessen (vgl. Review von Williams und Kwon, 2004) und ist im Versuchsaufbau in dieser Dissertation vielleicht nicht mehr detektierbar.

2-ME hat eine deutliche Wirkung auf B-Zellen, sodass nach dessen Zugabe, ein Teil der B-Zellen sowohl wesentlich mehr GSH als auch ROS aufweist. Ohne Zugabe von 2-ME ist so gut wie keine Veränderung der intrazellulären GSH- und ROS-Konzentration sichtbar. Es ist denkbar, dass diese B-Zellen mit einem erhöhten Gehalt an GSH und an ROS aktivierte B-Zellen oder Plasmazellen sind, welche ohne 2-ME nicht vorhanden sind. Tatsächlich findet Redox-Umordnung während der B-Zellaktivierung und Differenzierung zur Plasmazelle statt, indem es z.B. nach LPS-Stimulation zu einer intrazellulären Akkumulation von H_2O_2 (Bertollotti *et al.*, 2010) und auch zur Aktivierung von antioxidativen Systemen in der Zelle kommt (Vené *et al.*, 2010). Auch nach *in vivo* Stimulationen von Mäusen mit P815-Tumorzellen wurde eine Zunahme von GSH und ROS in CD19⁺ Zellen ab dem dritten Tag nach i.p. Behandlung gemessen (Lawrence *et al.*, 1999). Zellstimulati-

on über den B-Zellrezeptor führt, vergleichbar mit T-Zellen, zur rapiden Produktion von ROS über Nox2 (Wheeler und DeFranco, 2012). Nox2 ist in B-Zellen wichtig für die Antigenpräsentation über MHC II (Crotzer *et al.*, 2012). Die frühe ROS-Produktion scheint jedoch, im Gegensatz zu T-Zellen, unwichtig für die Signalweiterleitung in B-Zellen zu sein. Allerdings ist die spätere und anhaltendere ROS-Produktion durch bisher nicht näherbestimmte Quellen für die B-Zellaktivierung und Proliferation sehr wichtig (Wheeler und DeFranco, 2012). In B-Zellen wurde 2-ME als förderlich für die Proliferation erkannt, zudem führte die Abwesenheit von 2-ME in einer murinen Pre-B Zelllinie zu Apoptose (Neumann *et al.*, 1998). Auch ist die induzierende Wirkung von 2-ME auf IgM Antikörpersekretion in B-Zellen und Plasmazellen beschrieben (Alberini *et al.*, 1990).

In der Literatur finden sich keine Untersuchungen zum Einfluss von 2-ME auf die humorale *in vitro* Immunreaktion von Rattenzellen gegen SRBC. Jedoch ist auch für Milzzellen aus Mäusen die positive Wirkung von 2-ME auf die Viabilität und die SRBC-spezifische humorale *in vitro* Immunreaktion beschrieben (Click *et al.*, 1972). Die Notwendigkeit von 2-ME für den MD Test mit Mausmilzzellen konnte in dieser Dissertation nicht bestätigt werden, obwohl auch hier die viabilitätsfördernde Wirkung auftrat (Daten nicht gezeigt). In zahlreichen Publikationen wurde die Wirkung von 2-ME in mitogenstimulierten Zellkulturen untersucht. So ist für Milzzellen aus Mäusen und Ratten ein proliferationssteigernder Effekt von 2-ME nach Stimulationen mit PHA und ConA beschrieben (Noelle und Lawrence, 1980; Lacombe *et al.*, 1987; Aidoo *et al.*, 1991). 2-ME wirkte jedoch auch inhibierend auf die Proliferation von humanen PBMC nach Induktion mit PHA und ConA (Messina und Lawrence, 1992).

Durchflusszytometrische vergleichende Untersuchungen von mit 2-ME supplementierten gegenüber nichtsupplementierten MD Kulturen mit PBMC aus Ratten ergaben eine deutlich geringere Aktivierung der T-Helferzellen in Abwesenheit von 2-ME. So wurden nach sechs Tagen nur halb so viele CD25+ T-Helferzellen in Kulturen ohne 2-ME im Vergleich zu 2-ME-supplementierten Kulturen detektiert. Auch die für aktivierte T-Helferzellen charakteristische Expression von *Ccr2*, die mRNA für den MCP-1-Rezeptor (zusammengefasst in Luther und Cyster, 2001), war ohne 2-ME deutlich runterreguliert. Ein weiterer Hinweis auf eine unzureichende T-Zellaktivierung ohne 2-ME könnte die herabgesetzte Expression des Rezeptors *Klrc1*, der neben NK-Zellen in aktivierten Th vorkommt (vgl. Romero *et*

al., 2001), sein. Damit wurde die Bedeutung von 2-ME für T-Helferzellen belegt. Auch wurde im Verlauf der MD Kultur ein deutlich geringerer Anteil dieser Zellen CD45RClow exprimierend, sodass in der Zellkultur ohne 2-ME damit zusammenhängend geringere Mengen von Th2-Zytokinen vorliegen sollten (Subra *et al.*, 2001). Tatsächlich wurde in Überständen von SRBC stimulierten Milzzellkulturen ohne 2-ME-Zusatz signifikant weniger Th2-charakteristisches IL-4 und MCP-1 nachgewiesen. Auch die mit 2-ME in sehr geringen Mengen sezernierten IL-1 α und TNF- α waren ohne 2-ME zusätzlich herabgesetzt. Dagegen waren gemessene Mengen des für Th1-Antworten typischen IFN- γ nicht verändert. Die Bedeutung der sezernierten Zytokine ist für die *in vitro* Immunreaktion vermutlich zentral, da die simple Zugabe von T-Zellen aus 2-ME supplementierten Kulturen zu MD-Kulturen ohne 2-ME die Plaqueproduktion nicht wiederherstellen konnte. Da MCP-1 von diversen Zellen, insbesondere von Makrophagen und Monozyten, produziert wird (zusammengefasst in Deshmane *et al.*, 2009) und ohne 2-ME deutlich herabgesetzt ist, ist auch die Abhängigkeit von anderen Zellen neben T-Helferzellen von 2-ME wahrscheinlich. Die starke Expression von *C5ar1*, einem Mediator vieler proinflammatorischer Prozesse von aktiviertem Komplement, unter – 2-ME Bedingungen deutet auf eine veränderte T-Zellfunktionalität hin, da der C5a Rezeptor unter nichtpathologischen Bedingungen nicht in T-Zellen exprimiert wird (vgl. Dunkelberger *et al.*, 2012). Auch andere Gene wurden im Genarray durch den +/- 2-ME-Vergleich identifiziert. Diese gehörten im Allgemeinen zu einer der Gengruppen, die mit Zelladhäsion, Zytoskelett, Differenzierung oder Zelltod in Zusammenhang gebracht wurden und werden in dieser Dissertation nicht näher diskutiert.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sowohl APC, als auch T- und B-Zellen für die humorale *in vitro* Immunreaktion notwendig sind. T-Zellen werden nach *in vitro* Stimulation mit SRBC analog zur *in vivo* Situation aktiviert, indem sie CD25 als Oberflächenmarker verstärkt exprimieren, zudem ein Th2-ähnliches Profil aufweisen und auf genetischer Ebene u.a. die für aktivierte T-Zellen charakteristischen Hif-1 α -regulierten Gene und Glykolysegene hochregulieren. Für die *in vitro* Aktivierung der T-Zellen aus Ratten sowie für die Th2-ähnliche Zytokinausschüttung und auch für die Ausbildung der SRBC-spezifischen Antikörper war die Supplementierung mit 2-ME notwendig. Im +/- 2-ME-Vergleich wurden Gene gehörend zum Immunsystem, Transport und Metabolismus differenziell exprimiert. Zudem konnten unterschiedlich exprimierte Gene den Gruppen Redoxregulation, Zytoske-

lett, Zelladhäsion, Differenzierung, Proliferation oder Zelltod zugeordnet werden. Die Zugabe von 2-ME führte im Vergleich zum Verzicht auf 2-ME intrazellulär zu höheren Mengen an GSH und ROS in B-Zellen. Auch in aktivierten Th wurde mit 2-ME mehr GSH detektiert. Die Versorgung der T-Zellen mit der für die GSH-Synthese limitierenden Aminosäure Cystein wurde in Anwesenheit von 2-ME vermutlich über 2-ME/Cystin-Aufnahme durch Transporter für neutrale Aminosäuren sichergestellt. Ohne 2-ME regulierten Th *Slc7a11*, kodierend für den Cystin-Transporter xCT, hoch. Ggt1 wurde dagegen ohne 2-ME runterreguliert. Allerdings konnte im +/- 2-ME-Vergleich kein Unterschied für intrazelluläre ROS-Mengen in Th nachgewiesen werden, obwohl als mögliche ROS-Quelle *Duox2* identifiziert werden konnte. An Hif-1 α -regulierten Genen wurde *Epor* in Th differenziell exprimiert. Zudem war in 2-ME Abwesenheit ein Gen kodierend für eine Untereinheit der Pyruvatdehydrogenase runter- und einige Gene des Fettsäuremetabolismus hochreguliert.

4.4 Ausblick

Die durchgeführten experimentellen Untersuchungen und Literaturrecherchen verdeutlichten einen Einfluss der Regulation des Redoxgleichgewichts u.a. durch GSH- und ROS-generierende Systeme in Immunzellen. Allerdings ist ihre genaue Funktionsweise in Lymphozyten für die Immunantwort noch nicht geklärt und kann zukünftig erforscht werden. In T-Zellen wurde *Duox2* als mögliche Quelle für ROS auf genetischer Ebene identifiziert und mit der Wirkweise von 2-ME in Verbindung gebracht. Die tatsächliche Proteinbiosynthese von *Duox2* und ihre Oxidaseaktivität sollte in T-Helferzellen der *in vitro* Immunreaktion bestätigt werden. Sehr interessant wäre dann auch der Expressionsvergleich von *Duox2* mit T-Zellen während der Immunreaktion *in vivo* in Infektionsexperimenten, nach Immunisierungen von Versuchstieren oder in immunsupprimierten Patienten. In Versuchen dieser Dissertation wurde ein Fokus auf die Wirkung von 2-ME auf T-Zellen gelegt. Auch für B-Zellen wurde in kleinerem Umfang die Wirkung von 2-ME aufgezeigt. Weitergehende Untersuchungen wären auch in B-Zellen sinnvoll, da hier die Quelle für die anhaltende und bedeutende ROS-Generierungsphase während der B-Zellaktivierung noch nicht gefunden ist. Möglicherweise könnte die Auswertung der in dieser Dissertation gesammelten Genarray Daten von B-Zellen einen Hinweis darauf geben. Aufgrund der durchgeführten Experimente sind auch Hinweise

einer Bedeutung von 2-ME für andere Zellen wie Makrophagen und DC aufgekomen, denen in zusätzlichen Analysen nachgegangen werden kann.

Der MD Test mit primären Rattenzellen wurde als Modell für die humorale Immunreaktion charakterisiert, wobei u.a. die Notwendigkeit von T-Zellen gezeigt werden konnte. Die Art der T-Zellabhängigkeit konnte durch die in dieser Dissertation durchgeführten Versuche nicht näher bestimmt werden. Deshalb bleibt unklar, ob für die *in vitro* Antikörperproduktion B-Zell-T-Zell Interaktionen über MHC II, CD80, CD86 und CD40 notwendig sind, oder eine ausschließlich zytokinvermittelte T-Zellstimulation ausreichend ist. Um diese Frage zu klären, könnten in Zukunft antigenspezifische T-Zellen aus z.B. transgenen Ratten eingesetzt werden, die aktuell noch nicht verfügbar sind. Durch limitierte Zytokinmessungen im Überstand wurde ein Th2-ähnliches Profil in der *in vitro* Immunreaktion vorgefunden, welches durch zusätzliche ausgedehntere Zytokinmessungen und Chemokinrezeptorbestimmungen näher untersucht werden kann. Jedoch wurde in dieser Dissertation nicht die tatsächliche Notwendigkeit der einzelnen Zytokine für eine erfolgreiche humorale Antwort belegt. So ist es möglich ausgesuchte Zytokine wie IL-2 oder/und IL-4 spezifisch, z.B. durch hemmende Antikörper zu inhibieren, um ihre Notwendigkeit zu belegen.

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse und der Vielseitigkeit des Tests kann die *in vitro* Immunreaktion als alternative Methode für die toxikologische Substanzbewertung empfohlen werden. *In vitro* SRBC-Stimulation und Substanzinkubation von Milzzellen aus Ratten bietet eine hohe Sensitivität. Die suboptimale Spezifität kann durch Anpassen der Kriterien zur Substanzklassifizierung für Milzzellen aus Ratten noch verbessert werden, wozu zusätzliche Versuche mit zunehmender Anzahl zu testender Substanzen notwendig wären. Zur Minimierung von „falsch negativen“ Ergebnissen, sollte im *in vitro* Test auch ein metabolisierendes System integriert werden, wobei sich der Einsatz von S9-Mix aus induzierten Tieren oder Kokultur mit kompetenten Zellen anbieten würde. Auch die *in vitro* SRBC-Stimulation von Zellen aus *in vivo* behandelten Tieren bietet neue Möglichkeiten für die Verfolgung der Immunstatusänderung. Eine aufgrund der bisherigen Ergebnisse möglicherweise höhere Sensitivität dieser MD Test Version im Vergleich zum PFCA, muss durch zusätzliche Experimente überprüft werden. Zudem wäre es interessant zu untersuchen, ob PFCA Ergebnisse durch wiederholte Blutabnahmen, wie für den MD Test geschehen, beeinflusst werden können.

5. Zusammenfassung

Das vordringliche Ziel der Dissertation war es, die Einsatzmöglichkeiten von T-Zell-abhängigen humoralen *in vitro* Immunreaktionen für toxikologische Testungen zu erweitern und zu prüfen.¹ Dazu wurden im ersten Schritt die Testkulturbedingungen durch Ändern diverser Parameter, u.a. Zellkulturmedium, Stimulationszeitpunkt und Zellkulturdauer, an primäre Milzzellen aus Ratten sowie an PBMC aus Nagern und Primaten angepasst. Dabei konnte gezeigt werden, dass für Rattenmilzzellen und PBMC im Gegensatz zu Mausmilzzellen die Supplementierung mit β -Mercaptoethanol (2-ME) erforderlich war. Für PBMC aus Primaten war zusätzlich die Inkorporation von Typ I Interferon für die Ausbildung einer *in vitro* Immunreaktion gegen SRBC notwendig. Die etablierten Bedingungen wurden für Zellen diversen Ursprungs nach Optimierung der Zellkultur als reproduzierbar, robust und auch von anderen Experimentatoren durchführbar bestätigt.

Außerdem wurden die etablierten Testsysteme auf ihre Eignung für toxikologische Prüfungen untersucht. Mit einer Auswahl an Testsubstanzen, sowohl Kontrollsubstanzen² als auch Immunsuppressiva³, wurde eine hohe Sensitivität für den reinen *in vitro* Test mit Milzzellen aus Wistarratten ermittelt. Durch einen Vergleich von *in vitro* Stimulationen von PBMC aus immunsupprimierten Ratten⁴ mit *in vivo* Immunisierungen im Standardtest (*ex vivo* TDAR) erwiesen sich beide Methoden als prädiktiv. Als Vorteil gegenüber dem TDAR, bietet der MD Test mit PBMC die Möglichkeit einer zeitlichen Verfolgung von Immunstatusänderungen der Versuchstiere während der Behandlung. Durch Ersatz des TDAR mit der alternativen Methode wären Immunisierungen von Studientieren in damit einhergehenden Sattelitengruppen nicht mehr notwendig, sodass die Versuchstierzahlen für Immuntoxizitätsprüfungen deutlich reduziert werden könnten.

Durch die Charakterisierung der SRBC-spezifischen *in vitro* Immunreaktion wurden vergleichbare Vorgänge zur *in vivo* Situation ermittelt. So zeigten Depletionsexperimente die Notwendigkeit von antigenpräsentierenden Zellen, T- und B-

¹ Teile der Dissertation wurden veröffentlicht: Fischer A, Koeper LM, Vohr H-W, 2011. Specific antibody responses of primary cells from different cell sources are able to predict immunotoxicity *in vitro*. *Toxicol. In Vitro* 25, 1966-1973.

² An Kontrollsubstanzen wurden das nicht toxische Mannitol sowie die Irritanten Heptanal, Triton X 100 und SDS in unterschiedlichen Konzentrationen getestet.

³ Es wurden die immunsuppressiven Agenzien Azathioprin, Cyclophosphamid, Dexamethason, Cyclosporin A und Benzo(a)pyren in unterschiedlichen Konzentrationen getestet.

⁴ Immunsuppression bedingt durch die einmalige i.v. Gabe von Cyclophosphamid (80 mg/kg) sowie Behandlung von Wistarratten in 4-Wochen-Studien mit Azathioprin oder Benzo(a)pyren.

Zellen für die humorale *in vitro* Immunreaktion auf und durchflusszytometrische Untersuchungen von Zelloberflächenmarkern dokumentierten eine Zunahme ihrer spezifischen Zellaktivierung im zeitlichen Verlauf. Zytokinmessungen deuteten auf ein Th2-ähnliches Zytokinprofil hin. Genexpressionsanalysen von T-Helferzellen belegten eine zeitabhängige Deregulierung von immunsystem- und metabolismus-relevanten Genen *in vitro*, welche analog zu beschriebenen Immunreaktionen *in vivo* exprimiert wurden.

Im letzten Teil der Dissertation wurde der Einfluss von 2-ME auf die humorale *in vitro* Immunreaktion in primären Milzzellen und PBMC aus Ratten analysiert. Dabei wurde eine Notwendigkeit von 2-ME sowohl für die Antikörpersezerneierung, die spezifische T-Zellaktivierung, die Zytokinausschüttung als auch für die Aufrechterhaltung des Redoxgleichgewichts in den Zellen gezeigt. Eine vom Aktivierungsstatus der Zellen abhängige Redoxregulation⁵ in T- und B-Zellen wurde durchflusszytometrisch nachgewiesen und Genexpressionsanalysen verifizierten 2-ME-bedingte Deregulierung von mit reaktiven Sauerstoffspezies-assoziierten Genen und Glutathionmetabolismusgenen in T-Helferzellen⁶. Zudem wurden weitere durch 2-ME differenziell exprimierte Gene identifiziert, welche den Kategorien Immunsystem, Zytoskelett und Zelladhäsion, Differenzierung, Proliferation, Apoptose, Transport und Metabolismus zugeordnet werden konnten.

⁵ Redoxgleichgewicht-relevante Zellbestandteile wurden durchflusszytometrisch bestimmt, indem relative intrazelluläre Änderungen von reaktiven Sauerstoffspezies mit H₂DCFDA und von Glutathion mit CMFDA ermittelt wurden.

⁶ Erhöhte mRNA-Expression von Dualoxidase 2 (*Duox2*) und γ -Glutamyltransferase 1 (*Ggt1*) sowie verminderte Expression von einer Komponente des Cystin-Transporters (*Slc7a11*) in MD Kulturen mit zugesetztem 2-ME im Gegensatz zu Zellkulturbedingungen ohne 2-ME.

6. Summary

This dissertation primary aims to widen and to proof the use of T cell dependent humoral *in vitro* immune responses for immunotoxicological testing.¹ Therefore, cell culture conditions, e.g. culture media, timing of stimulation and duration of cell culture, were adapted to primary rat splenocytes and to PBMC of rodent and primate origin. Rat spleen cells and PBMC in general were shown to require supplementation of β -mercaptoethanol (2-ME) in contrast to murine splenocytes. Furthermore, primate PBMC needed additional incorporation of a type I interferon for sufficient SRBC specific antibody production. After optimization of cell culture parameters, the established conditions were found to be reproducible, robust, and transferable to other labs.

As a next step the applicability of *in vitro* antibody responses for toxicological testing was evaluated. Using a selection of test compounds including control chemicals² and immunosuppressants³, a high sensitivity of the *in vitro* assay was determined for spleen cells of Wistar rats. Comparison of the gold standard *ex vivo* TDAR and associated *in vivo* immunizations with *in vitro* stimulations of PBMC from immunocompromised rats⁴ confirmed the predictivity of both methods. As an advantage over TDAR, MD cultures offer the possibility of monitoring immune state changes of the animals during treatment over time, i.e. to monitor kinetics of immune response *ex vivo*. Apart from this, immunization of animals is not required for the *in vitro* antibody response. Hence, satellite groups of animals, often included in immunotoxicity studies for performing the TDAR, may also be omitted. Thus, replacing the TDAR by MD cultures will significantly reduce the number of animals used for toxicological investigations.

Through characterization of the SRBC dependent *in vitro* immune response, comparable processes to the *in vivo* situation were observed. Depletion of APC, T and B cells attested their need for the humoral *in vitro* immune reaction. By means of flow cytometric analysis of cell surface markers, an increase of specific and time

¹ Parts of the present thesis are published in: Fischer A, Koeper LM, Vohr H-W, 2011. Specific antibody responses of primary cells from different cell sources are able to predict immunotoxicity *in vitro*. *Toxicol. In Vitro* 25, 1966-1973.

² The non-toxic mannitol and the irritants heptanal, triton X 100 and SDS were tested in varying concentrations.

³ Varying concentrations of the immunosuppressants azathioprine, cyclophosphamide, dexamethasone, cyclosporine A and benzo(a)pyrene were tested.

⁴ Immunosuppression caused by a single i.v. injection of cyclophosphamide (80 mg/kg) and treatment of Wistar rats in two 4-week studies with azathioprine or benzo(a)pyrene.

constraint cell activation with a Th2 related cytokine profile was documented. Microarray experiments of T helper cells revealed an *in vivo* like profile of differently expressed immune system and metabolism related genes in a time dependent manner *in vitro*.

Analyzing the influence of 2-ME on *in vitro* antibody responses, its demand for antibody production, specific T cell activation, and cytokine secretion was found in primary rat splenocytes as well as in PBMC. Finally, 2-ME was important for maintaining a highly regulated redox balance⁵, which depends on the cell activation state in T and B cells. Furthermore, a 2-ME regulated expression profile in T helper cells⁶ of reactive oxygen species associated genes, and genes involved in glutathione turnover was confirmed. Other identified genes, which were differently expressed due to 2-ME, were grouped into following categories: immune system, cytoskeleton, cell adhesion, differentiation, proliferation, apoptosis, transport, and metabolism.

⁵ Redox balance relevant components of the cells were obtained by FACS analysis using H₂DCFDA for the detection of reactive oxygen species and CMFDA for glutathione evaluation.

⁶ In comparison to MD cultures without 2-ME, increased mRNA expression of dual oxidase 2 (*Duox2*) and γ -glutamyltransferase 1 (*Ggt1*) as well as reduced expression of a cysteine specific transporter (*Slc7a11*) was seen in cultures with 2-ME.

7. Literaturverzeichnis

- Adolf GR, 1995. Human interferon omega-a review. *Multiple Sclerosis* 1, 44-47.
- Aidoo A, Lyn-Cook LE, Morris SM, Kodell RL, Casciano DA, 1991. Comparative study of intracellular glutathione content in rat lymphocyte cultures treated with 2-mercaptoethanol and interleukin-2. *Cell Biology and Toxicology* 7, 215-227.
- Akiba H, Takeda K, Kojima Y, Usui Y, Harada N, Yamazaki T, Ma J, Tezuka K, Yagita H, Okumura K, 2005. The role of ICOS in the CXCR5+ follicular B helper T cell maintenance in vivo. *J. Immunol.* 175, 2340-2348.
- Alberini CN, Bet P, Milstein C, Sitia R, 1990. Secretion of Immunoglobulin M assembly intermediates in the presence of reducing agents. *Nature* 347, 485-487.
- Anastasiou D, Poulogiannis G, Asara JM, Boxer MB, Jiang J-K, Shen M, Bellinger G, Sasaki AT, Locasale JW, Auld DS, Thomas CJ, Vander Heiden MG, Cantley LC, 2011. Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to cellular antioxidant responses. *Science* 334, 1278-1283.
- ATSDR, 1995. Toxicological profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA.
- Baggiolini M, Clark-Lewis I, 1992. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS letters* 307, 97-101.
- Bannai S, Tateishi N, 1986. Role of Membrane Transport in Metabolism and Function of Glutathione in Mammals. *J. Membrane Biol.* 89, 1-8.
- Basketter DA, Bremmer JN, Kammüller ME, Kawabata T, Kimber I, Magda S, Pal THM, Loveless SE, Stringer DA, Vohr H-W, 1994. The identification of chemicals with sensitizing or immunosuppressive properties in routine toxicology. *Food Chem. Toxicol.* 32, 289-296.
- Basketter DA, Gerberick GF, Kimber I, 1998. Strategies for identifying false positive responses in predictive skin sensitization tests. *Food and Chem. Toxicol.* 36, 327-333.
- Bedard K, Krause K-H, 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87, 245-313.
- Berger SP, Daha MR, 2007. Complement in glomerular injury. *Semin. Immunopathol.* 29, 375-384.
- Bertolotti M, Yim SH, Garcia-Manteiga JM, Masciarelli S, Kim Y-J, Kang M-H, Iuchi Y, Fujii J, Vene R, Rubartelli A, Rhee SG, Sitia R, 2010. B- to plasma-cell terminal differentiation entails oxidative stress and profound reshaping of the antioxidant responses. *Antioxid. Redox Signal.* 13, 1133-1144.

- Bourgoin AF, 2011. What you need to know about the follow-on biologic market in the U.S.: implications, strategies, and impact. White Paper. Thomson Reuters. <http://thomsonreuters.com/products/ip-science/04_013/newport-biologics.pdf>.
- Bracken CP, Whitelaw ML, Peet DJ, 2003. The hypoxia-inducible factors: key transcriptional regulators of hypoxic responses. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 1376–1393.
- Burchiel SW, Luster MI, 2001. Signaling by environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in human lymphocytes. *Clin. Immunol.* 98, 2-10.
- Calame KL, 2001. Plasma cells: finding new light at the end of B cell development. *Nature Immunology* 2, 1103-1108.
- Cannons JL, Lu KT, Schwartzberg PL, 2012. Lymph node choreography: B cells take the lead. *Nature Immunology* 13, 630-632.
- Cao W, Sikorski EE, Fuchs BA, Stern ML, Luster MI, Munson AE, 1990. Toxicology and applied pharmacology 105, 492-502.
- Chaplin DD, 2010. Overview of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S3-S23.
- Choi JW, Herr DR, Noguchi K, Yung YC, Lee CW, Mutoh T, Lin M-E, Teo ST, Park KE, Mosley AN, Chun J, 2010. LPA Receptors: subtypes and biological actions. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50,157-86.
- Clarke L, Waxman DJ, 1989. Oxidative metabolism of cyclophosphamide: identification of hepatic monooxygenase catalysts of drug activation. *Cancer Res.* 49, 2344-2350.
- Click RE, Benck L, Alter BJ, 1972. Enhancement of antibody synthesis in vitro by mercaptoethanol. *Cellular Immunology* 3: 155-160.
- Coecke S, Ahr H, Blaauboer BJ, Bremer S, Casati S, Castell J, Combes R, Corvi R, Crespi CL, Cunningham ML, Elaut G, Eletti B, Freidig A, Gennari A, Ghersi-Egea J-F, Guillouzo A, Hartung T, Hoet P, Ingelman-Sundberg M, Munn S, Janssens W, Ladstetter B, Leahy D, Long A, Meneguz A, Monshouwer M, Morath S, Nagelkerke F, Pelkonen O, Ponti J, Prieto P, Richert L, Sabbioni E, Schaack B, Steiling W, Testai E, Vericat J-A, Worth A, 2006. Metabolism: a bottleneck in in vitro toxicological test development. *ATLA* 34, 49-84.
- Colvin OM, 1999. An overview of cyclophosphamide development and clinical applications. *Curr. Pharm. Des.* 5, 555-560.
- Commins S, Steinke JW, Borishet L, 2008. The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121, 1108-1111.

- Connors TA, Cox PJ, Farmer PB, Foster AB, Jarman M, 1974. Some studies of the active intermediates formed in the microsomal metabolism of cyclophosphamide and isophosphamide. *Biochem. Pharmacol.* 23, 115-129.
- Crotzer VL, Matute JD, Arias AA, Zhao H, Quilliam LA, Dinauer MC, Blum JS, 2012. Cutting edge: NADPH oxidase modulates MHC class II antigen presentation by B cells. *J. Immunol.* 189, 3800-3804.
- Cyster JG, 2005. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 127-159.
- Dang EV, Barbi J, Yang HY, Jinasena D, Yu H, Zheng Y, Bordman Z, Fu J, Kim Y, Yen HR, Luo W, Zeller K, Shimoda L, Topalian SL, Semenza GL, Dang CV, Pardoll DM, Pan F, 2011. Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell* 146, 772-784.
- Danilova N, 2012. The evolution of adaptive immunity, in López-Larrea C (Ed.), *Self and Nonself*. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, 218-235.
- De Jong WH, Kroese ED, Vos JG, Van Loveren H, 1999. Detection of immunotoxicity of benzo[a]pyrene in a subacute toxicity study after oral exposure in rats. *Toxicol. Sci.* 50, 214-20.
- Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE, 2009. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research* 29, 313-326.
- Diaz-Sanchez D, Tsien A, Casillas A, Dotson AR, Saxon A, 1996. Enhanced nasal cytokine production in human beings after in vivo challenge with diesel exhaust particles. *J Allergy Clin. Immunol.* 98, 114-23.
- Doi T, Nagai H, Tsukuda R, Suzuki T, 1996. Dose-response relationships of weight, cellularity, plaque-forming cell response, and histology in the spleen of rats treated with antimetabolites. *International Journal of Toxicology* 15, 394-407.
- Dong C, Juedes AE, Temann UA, Shresta S, Allison JP, Ruddle NH, Flavell RA, 2001. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* 409, 97-101.
- Dröge W, Eck HP, Gmünder H, Mihm S, 1991. Modulation of lymphocyte functions and immune responses by cysteine and cysteine derivatives. *The American Journal of Medicine* 91, Supplement 3c, 140-144.
- Dunkelberger J, Zhou L, Miwa T, Song W-C, 2012. C5aR expression in a novel GFP reporter gene knockin mouse: implications for the mechanism of action of C5aR signaling in T cell immunity. *J. Immunol.* 188, 4032-4042.

- EFSA, 2008. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. The EFSA Journal, 724.
- EMA, 2006. ICH Topic S8 "Note for guidance on immunotoxicity studies for human pharmaceuticals".
- EMA, 2011. ICH Topic S6 "Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals".
- EPA, 1998. Health Effects Test Guidelines "Immunotoxicity": OPPTS 870.7800.
- FDA, 2002. Guidance for industry "Immunotoxicology evaluation of investigational new drugs".
- Feeney AJ, Corvalan JR, Matzinger P, Howard JC, 1984. T helper cells required for the in vitro primary antibody response to SRBC are neither SRBC-specific nor MHC-restricted. *J. Mol. Cell. Immunol.* 1984, 211-222.
- Fidelus RK, Ginouves P, Lawrence D, Tsan MF, 1987. Modulation of intracellular glutathione concentrations alters lymphocyte activation and proliferation. *Exp. Cell. Res.* 170, 269-275.
- Fischer A, Köper LM, Vohr H-W, 2011. Specific antibody responses of primary cells from different cell sources are able to predict immunotoxicity in vitro. *Toxicology in Vitro* 25, 1966-1973.
- Flammer JR, Rogatsky I, 2011. Minireview: glucocorticoids in autoimmunity: unexpected targets and mechanisms. *Mol. Endocrinol.* 25, 1075-1086.
- Fox CJ, Hammerman PS, Thompson CB, 2005. Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response. *Nature Reviews Immunology* 5,844-852.
- Friedman SM, Breard JM, Chess L, 1976. Triggering of human peripheral blood B cells: polyclonal induction and modulation of an in vitro PFC response. *The Journal of Immunology* 117, 2021-2028.
- Galanaud P, Crevon MC, Dormont J, 1975. Effect of Azathioprine on in vitro antibody response. Differential effect on B cells involved in thymus-dependent and independent responses. *Clin. exp. Immunol.* 22, 139-152.
- Galbiati V, Mitjans M, Corsini E, 2010. Present and future of in vitro immunotoxicology in drug development. *J. Immunotox.* 7, 255-267.
- Gibbins D, Befus AD, 2009. CD4 and CD8: an inside-out coreceptor model for innate immune cells. *Journal of Leukocyte Biology* 86, 251-259.
- Gill TJ, Smith GJ, Wissler RW, Kunz HW, 1989. The rat as an experimental animal. *Science* 245, 269-276.

- Gmünder H, Eck H-P, Benninghoff B, Roth S, Dröge W, 1990. Macrophages regulate intracellular glutathione levels of lymphocytes. Evidence for an immunoregulatory role of cysteine. *Cellular Immunology* 129, 32-46.
- Goding JW, 1976. The chromic chloride method of coupling antigens to erythrocytes: definition of some important parameters. *Journal of Immunological Methods* 10, 61-66.
- Gonzales-Navajas JM, Lee J, David M, Raz E, 2012. Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nature Reviews Immunology* 12, 125-135.
- Granath B, Holgersson J, Brenden N, 2011. Refined analysis of antigen-specific antibody responses - a new one-step tool in immunogenicity studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 44, 187-193.
- Griffith OW, Meister A, 1979. Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-Butyl homo-cysteine sulfoximine). *J. Biol. Chem.* 254, 7558-7560.
- Gronowicz E, Coutinho A, Melchers F, 1976. A plaque assay for all cells secreting Ig of a given type or class. *Eur. J. Immunol.* 6, 588-590.
- Gujer C, Sandgren KJ, Douagi I, Adams WC, Sundling C, Smed-Sörensen A, Seder RA, Karlsson Hedestam GB, Loré K, 2011. IFN- α produced by human plasmacytoid dendritic cells enhances T cell-dependent naive B cell differentiation. *Journal of Leukocyte Biology* 89, 811-821.
- Haggerty HG, 2007. Immunotoxicity Testing in Non-Rodent Species. *Journal of Immunotoxicology* 4, 165-169.
- Hamanaka RB, Chandel NS, 2009. Mitochondrial reactive oxygen species regulate hypoxic signaling. *Curr. Opin Cell. Biol.* 21, 894-899.
- Hamilton D, Loignon M, Alaoui-Jamali MA, Batist G, 2007. Novel use of the fluorescent dye 5-(and-6)-chloromethyl SNARF-1 acetate for the measurement of intracellular glutathione in leukemic cells and primary lymphocytes. *Cytometry Part A* 71A, 709-715.
- Harper RW, Xu C, Eiserich JP, Chen Y, Kao C-Y, Thai P, Setiadi H, Wu R, 2005. Differential regulation of dual NADPH oxidases/peroxidases, Duox1 and Duox2, by Th1 and Th2 cytokines in respiratory tract epithelium. *FEBS Letters* 579, 4911-4917.
- Hartmann K, Dutton RW, McCarthy MM, Mishell RI, 1970. Cell components in the immune response II. Cell attachment separation of immune cells. *Cellular Immunology* 1, 182-189.
- Hedley DW, Chow S, 1994. Evaluation of methods for measuring cellular glutathione content using flow cytometry. *Cytometry* 15, 349-358.

- Heisterkamp N, Groffen J, Warburton D, Sneddon TP, 2008. The human gamma-glutamyltransferase gene family. *Hum. Genet.* 123, 321-332.
- Herrod HG, Buckley RH, 1979. 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.
- Ho S, Clipstone N, Timmermann L, Northrop J, Graef I, Fiorentino D, Nourse J, Crabtree GR, 1996. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clinical Immunology and Immunopathology* 80, 40-45.
- Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA, 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313-1318.
- Holladay SD, Smialowicz RJ, 2000. Development of the murine and human immune system: differential effects of immunotoxicants depend on time of exposure. *Environmental health perspectives* 108, supplement 3, 463-473.
- Howard M, Farrar J, Hilfiker M, Johnson B, Takatsu K, Hamaoka T, Paul WE, 1982. Identification of a T cell-derived B cell growth factor distinct from interleukin 2. *J. Exp. Med.* 155, 914-923.
- Huston DP, 1997. The biology of the immune system. *Jama* 278, 1804-1814.
- Inaba K, Muramatsu S, 1980. Participation of Ia antigen-bearing nonmacrophage cells in the manifestation of accessory cell activity for in vitro antibody response. *Microbiol. Immunol.* 24, 683-689.
- Inaba K, Steinman RM, Van Voorhis WC, Muramatsu S, 1983. Dendritic cells are critical accessory cells for thymus-dependent antibody responses in mouse and in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6041-6045.
- Inaba K, Steinman RM, 1985. Protein-specific helper T-lymphocyte formation initiated by dendritic cells. *Science* 229, 475-479.
- Inaba K, Metlay JP, Crowley MT, Witmer-Pack M, Steinman RM, 1990. Dendritic cells as antigen presenting cells in vivo. *Int. Rev. Immunol.* 6, 197-206.
- Ishii T, Sugita Y, Bannai S, 1987. Regulation of glutathione levels in mouse spleen lymphocytes by transport of cysteine. *J. Cell. Physiol.* 133, 330-336.
- Jackson SH, Devadas S, Kwon J, Pinto LA, Williams MS, 2004. T cells express a phagocyte-type NADPH oxidase that is activated after T cell receptor stimulation. *Nature Immunology* 5, 818-827.
- Janeway CA Jr, Medzhitov R, 2002. Innate immune recognition, *Annu. Rev. Immunol.* 20, 197-216.

- Jerne NK, Nordin AA, Henry C, 1963. The agar plaque technique for recognizing antibody-producing cells, in Amos B, Koprowski H (Eds.), Cell-bound antibodies. Wistar Institute Press, Philadelphia, 109-122.
- Jira PE, Waterham HR, Wanders RJA, Smeitink JAM, Sengers RA, 2003. Smith-Lemli-Opitz Syndrome and the DHCR7 gene. *Annals of Human Genetics* 67, 269-280.
- Josefowicz SZ, Lu L-F, Rudensky AY, 2012. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 531-64.
- Kato M, Khan S, d'Aniello E, McDonald KJ, Hart DN, 2007. The novel endocytic and phagocytic C-type lectin receptor DCL-1/CD302 on macrophages is colocalized with F-actin, suggesting a role in cell adhesion and migration. *J. Immunol.* 179, 6052-6063.
- Kensler TW, Wakabajashi N, Biswal S, 2007. Cell survival responses to environmental stresses via Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 89-116.
- Kimber I, 1991. Toxicology and the immune system: a perspective. *Hum. Exp. Toxicol.* 10, 445-449.
- Köper LM, Vohr H-W, 2009. Functional assays are mandatory for a correct prediction of immunosuppressant properties of compounds in vitro. *Food Chem. Toxicol.* 47, 110-118.
- Koganei A, Tsuchiya T, Samura K, Nishikibe M, 2007. Use of whole sheep red blood cells in ELISA to assess immunosuppression in vivo. *Journal of Immunotoxicology* 4, 77-82.
- Kojo S, 2012. Oxygen is the key factor associated with the difference between in vivo and in vitro effects of antioxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, E2028.
- Kovacic P, Samanathan R, 2008. Integrated approach to immunotoxicity: electron transfer, reactive oxygen species, antioxidants, cell signaling, and receptors. *Journal of Receptors and Signal Transduction* 28, 323-346.
- Krieger JA, Landsiedel JC, Lawrence DA, 1996. Differential in vitro effects of physiological and atmospheric oxygen tension on normal human peripheral blood mononuclear cell proliferation, cytokine and immunoglobulin production. *Int. J. Immunopharmac.* 18, 545-552.
- Kwon J, Shatynski KE, Chen H, Morand S, de Deken X, Miot F, Leto TL, Williams MS, 2010. The nonphagocytic NADPH oxidase Duox1 mediates a positive feedback loop during T cell receptor signaling. *Science Signaling* 3 ra59, 1-14.

- Lacombe P, Kraus L, Fay M, Pocardalo J-J, 1987. Glutathione status of rat thymocytes and splenocytes during the early events of their ConA proliferative responses. *Biochimie* 69, 37-44.
- Lang DS, Meier KM, Luster MI, 1993. Comparative effects of immunotoxic chemicals on in vitro proliferative responses of human and rodent lymphocytes. *Fundam. Appl. Toxicol.* 21, 535-545.
- Larbi A, Zelba H, Goldeck D, Pawelec G, 2010. Induction of HIF-1 α and the glycolytic pathway alters apoptotic and differentiation profiles of activated human T cells. *Journal of Leukocyte Biology* 87, 265-273.
- Lawrence BP, Meyer M, Reed DJ, Kerkvliet NI, 1999. Role of glutathione and reactive oxygen intermediates in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced immune suppression in C57/Bl6 mice. *Toxicological Sciences* 52, 50-60.
- Lebrec H, Cowan L, Lagrou M, Krejsa C, Neradilek MB, Polissar NL, Black L, Busiere J, 2011. An inter-laboratory retrospective analysis of immunotoxicological endpoints in non-human primates: T-cell-dependent antibody responses. *Journal of Immunotoxicology* 8, 238-250.
- Lee FS, Percy MJ, 2011. The HIF Pathway and Erythrocytosis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 6, 165-192.
- Lemaire M, Tillement JP, 1982. Role of lipoproteins and erythrocytes in the in vitro binding and distribution of cyclosporin A in the blood. *J. Pharm. Pharmacol.* 34, 715-718.
- Levin D, Constant S, Pasqualini T, Flavell R, Bottomly K, 1993. Role of dendritic cells in the priming of CD4⁺ T lymphocytes to peptide antigen in vivo. *J. Immunol.* 151, 6742-6750.
- Levring TB, Hansen AK, Nielsen BL, Kongsbak M, Rode von Essen M, Woetmann A, Ødum N, Menne Bonefeld C, Geisler C, 2012. Activated human CD41 T cells express transporters for both cysteine and cysteine. *Sci. Rep.* 2, 266, DOI:10.1038/srep00266
- Liang SM, Lee N, Chen YY, Liang CM, 1992. Effects of glutathione on the synthesis and turnover of interleukin-2 receptors. *Cell Immunol.* 144, 131-142.
- Lindenfeld JA, Miller GG, Shakar SF, Zolty R, Lowes BD, Wolfel EE, Mestroni L, Page RL II, Kobashigawa J, 2004. Drug therapy in the heart transplant recipient part II: immunosuppressive drugs. *Circulation* 110, 3858-3865.
- Litman GW, Rast JP, Fugmann SD, 2010. The origins of vertebrate adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology* 10, 543-553.
- Loré K, Betts MR, Brenchley JM, Kuruppu J, Khojasteh S, Perfetto S, Roederer M, Seder RA, Koup RA, 2003. Toll-like receptor ligands modulate dendritic cells to

- augment cytomegalovirus- and HIV-1-specific T cell responses. *J. Immunol.* 171, 4320-4328.
- Loveless SE, Ladics GS, Smith C, Holsapple MP, Woolhiser MR, Kimber SE, White L, Musgrove DL, Smialowicz RJ, Williams W, 2007. Interlaboratory study of the primary antibody response to sheep red blood cells in outbred rodents following exposure to cyclophosphamide or dexamethasone. *J. Immunotox.* 4, 233-238.
- Luster MI, Portier C, Pait DG, White KL, Gennings C, Munson AE, Rosenthal GJ, 1992. Risk assessment in immunotoxicology. I. Sensitivity and predictability of immune tests. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18, 200-210.
- Luther SA, Cyster JG, 2001. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat. Immunol.* 2, 102-107.
- MacLennan ICM, Toellner K-M, Cunningham AF, Serre K, Sze DMY, Zuniga E, Cook MC, Vinuesa CG, 2003. Extrafollicular antibody responses. *Immunological Reviews* 194, 8-18.
- MacMicking JD, 2012. Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nature Reviews Immunology* 12, 367-382.
- Maiese K, Chong ZZ, Li F, Shang YC, 2008. Erythropoietin: elucidating new cellular targets that broaden therapeutic strategies. *Progress in Neurobiology* 85, 194-213.
- Malhotra JD, Kaufman RJ, 2007. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxidants & Redox Signaling* 9, 2277-2293.
- Markiewski MM, Lambris JD, 2007. The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. *The American Journal of Pathology* 171, 715-727.
- Matsuzaka T, Shimano H, 2009. Elovl6: a new player in fatty acid metabolism and insulin sensitivity. *J. Mol. Med.* 87, 379-384.
- Mazzatti D, Lim F-L, O'Hara A, Wood IS, Trayhurn P, 2012. A microarray analysis of the hypoxia-induced modulation of gene expression in human adipocytes. *Archives of Physiology and Biochemistry* 118, 112-120.
- Medzhitov R, Janeway CA Jr, 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response, *Current Opinion in Immunology* 9, 4-9.
- Messina JP, Lawrence DA, 1989. Cell cycle progression of glutathione-depleted human peripheral blood mononuclear cells is inhibited at S phase. *The Journal of Immunology* 143, 1974-1981.

- Messina JP, Lawrence DA, 1992. Effects of 2-mercaptoethanol and buthionine sulfoximine on cysteine metabolism by and proliferation of mitogen-stimulated human and mouse lymphocytes. *Int. J. Immunopharmac.* 14, 1221-1234.
- Mishell RI, Dutton RW, 1966. Immunization of normal mouse spleen cell suspensions in vitro. *Science* 153, 1004-1006.
- Misiti J, Waldmann TA, 1981. In vitro generation of antigen-specific hemolytic plaque-forming cells from human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Exp. Medicine* 154, 1069-1084.
- Moore GE, Gerner RE, Franklin HA, 1967. Culture of normal human leukocytes. *J.A.M.A.* 199, 519-524.
- Morgan EL, Weigle WO, Hugli TE, 1982 Anaphylatoxin-mediated regulation of the immune response I. C3a-mediated suppression of human and murine humoral immune responses. *J.Exp.Med.* 155, 1412-1426
- Mosier DE, 1967. A requirement for two cell types for antibody formation in vitro. *Science* 158, 1573-1575.
- Mullard A, 2012. 2011 FDA drug approvals. The US FDA approved 30 new therapeutics last year, including 11 first-in-class agents. *Nature Reviews Drug Discovery* 11, 91-94.
- Natsch A, Bauch C, Foertsch L, Gerberick F, Norman K, Hilberer A, Inglis H, Landsiedel R, Onken S, Reuter H, Schepky A, Emter R, 2011. The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers in vitro: Results of a ring-study in five laboratories. *Toxicology in vitro* 25, 733-744.
- Neefjes J, Jongsma ML, Paul P, Bakke O, 2011. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature Reviews Immunology* 11, 823-836.
- Neumann D, Zierke M, Martin MU, 1998. Withdrawal of 2-mercaptoethanol induces apoptosis in a B-cell line via Fas upregulation. *Journal of Cellular Physiology* 177, 68-75.
- Noelle RJ, Lawrence DA, 1980. Modulation of T-cell functions I. Effect of 2-mercaptoethanol and macrophages on T-cell proliferation. *Cellular Immunology* 50, 416-431.
- Nutsch K, Hsieh C, 2011. When T cells run out of breath: the HIF-1a story. *Cell* 146, 673-674.
- OECD Richtlinien für das Testen von Chemikalien Nr. 407, 408, 430, 431, 435, 439, 471, 473, 476, 479, 480, 481, 482, 487.

- Oehler JR, Herberman RB, Holden HT, 1978. Modulation of immunity by macrophages. *Pharmac. Ther. A.* 2, 551-593.
- Ohmori H, Yamamoto I, 1983. Mechanism of augmentation of the antibody response in vitro by 2-mercaptoethanol in murine lymphocytes II. A major role of the mixed disulfide between 2-mercaptoethanol and cysteine. *Cellular Immunology* 79, 173-185.
- Okada T, Cyster JG, 2006. B cell migration and interactions in the early phase of antibody responses. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 278-285.
- Oshida K, Maeda A, Kitsukawa M, Suga M, Iwano S, Miyoshi T, Miyamoto Y, 2011. Novel gene markers of immunosuppressive chemicals in mouse lymph node assay. *Toxicology Letters* 205, 79-85.
- Park BK, Laverty H, Srivastava A, Antoine DJ, Naisbitt D, Williams DP, 2010. Drug bioactivation and protein adduct formation in the pathogenesis of drug-induced toxicity. *Chemico-Biological Interactions* 192, 30-36.
- Patakas A, Platt AM, Butcher JP, Maffia P, McInnes IB, Brewer JM, Garside P, Benson RA, 2011. Putative existence of reciprocal dialogue between Tfh and B cells and its impact on infectious and autoimmune disease. *Immunology Letters* 138, 38-46.
- Payne AH, Hales DB, 2004. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocrine Reviews* 25, 947-970.
- Poppema S, Lai R, Visser L, Yan XJ, 1996. CD45 (leucocyte common antigen) expression in T and B lymphocyte subsets. *Leukemia and Lymphoma* 20, 217-222.
- Post DJ, Douglas DD, Mulligan DC, 2005. Immunosuppression in liver transplantation. *Liver Transplantation* 11, 1307-1314.
- Pruett S, Obiri N, Kiel J, 1989. Involvement and Relative Importance of at Least Two Distinct Mechanisms in the Effects of 2-Mercaptoethanol on Murine Lymphocytes in Culture. *Journal of Cellular Physiology* 141, 40-45.
- Raad H, Eskalli Z, Corvilain B, Miot F, De Deken X, 2013. Thyroid hydrogen peroxide production is enhanced by the Th2 cytokines, IL-4 and IL-13, through increased expression of the dual oxidase 2 and its maturation factor DUOXA2. *Free Radical Biology and Medicine* 56, 216-225.
- Rada B, Leto TL, 2008. Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases. *Trends in Innate Immunity* 15, 164-187.
- Reinhardt RL, Liang H-E, Locksley RM, 2009. Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat. Immunol.* 10, 385-393.

- Rhee SG, 2006. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science* 312, 1882-1883.
- Richter A, Schmucker SS, Esser PR, Traska V, Weber V, Dietz L, Thierse H-J, Pennino D, Cavani A, Martin SF, 2012. Human T cell priming assay (hTCPA) for the identification of contact allergens based on naive T cells and DC - IFN- γ and TNF- α readout. *Toxicology in vitro* 27, 1180-1185.
- Richter-Reichhelm HB, Dasenbrock C, Descotes G, Emmendorfer A, Heinrich UE, Harlemann JH, Hildebrand B, Küttler K, Rühl-Fehlert CI, Schilling K, Schulte AE, Vohr H-W, 1995. Validation of a modified 28-Day rat study to evidence effects of test compounds on the immune system. *Regulatory Toxikol. Pharmakol.* 22, 54-56.
- Roberts M, Liu L, Guo Q, Leaman D, Bixby J, 1998. The evolution of the type I interferons. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 18, 805-816.
- Romero P, Ortega C, Palma A, Molina IJ, Pena J, Santamaria M, 2001. Expression of CD94 and NKG2 molecules on human CD41 T cells in response to CD3-mediated stimulation. *Journal of Leukocyte Biology* 70, 219-224.
- Roy P, Yu LJ, Crespi CL, Waxman DJ, 1999. Development of a substrate-activity based approach to identify the major human liver P-450 catalysts of cyclophosphamide and ifosfamide activation based on cDNA-expressed activities and liver microsomal P-450 profiles. *Drug Metabolism and Disposition* 27, 655-666.
- Russell WMS, Burch R, 1959. The principles of humane experimental technique. Methuen & Co. Ltd., London. [Reissued, 1992. Universities Federation for Animal Welfare, Herts, England.] <http://altweb.jhsph.edu/publications/humane_exp/het-toc.htm>.
- Sampath H, Ntambi JM, 2011. The role of stearyl-CoA desaturase in obesity, insulin resistance, and inflammation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1243, 47-53.
- Sato H, , Shiiya A, Kimata M, Maebara K, Tamba M, Sakakura Y, Makino N, Sugiyama F, Yagami K, Moriguchi T, Takahashi S, Bannai S, 2005. Redox imbalance in cystine/glutamate transporter-deficient mice. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 37423-37429.
- Savelkoul HFJ, Greeve AAM, Rijkers GT, Marwitz PA, Benner R, 1988. Rapid procedure for coupling protein antigens to red cells to be used in plaque assays, by prewashing in chromium chloride. *Journal of Immunological Methods* 111, 31-37.
- Schwartz RS, Stack J, Dameshek W, 1958. Effect of 6-MP on antibody production. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 99, 164-167.
- Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL, 1994. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 269, 23757-23763.

- Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, Kuestner R, Garrigues U, Birks C, Roraback J, Ostrander C, Dong D, Shin J, Presnell S, Fox B, Haldeman B, Cooper E, Taft D, Gilbert T, Grant FJ, Tackett M, Krivan W, McKnight G, Clegg C, Foster D, Klucher KM, 2003. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nature Immunology* 4, 63-68.
- Shevach EM, 2001. Certified professionals: CD4+CD25+ suppressor T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 193, F41-F45.
- Shi LZ, Wang R, Huang G, Vogel P, Neale G, Green DR, Chi H, 2011. HIF1 α -dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. *J. Exp. Med.* 208, 1367-1376.
- Silvente-Poirot S, Poirot M, 2012. Cholesterol epoxide hydrolase and cancer. *Current Opinion in Pharmacology* 12, 696-703.
- Smialowicz RJ, Riddle MM, Williams WC, Copeland CB, Luebke RW, Andrews DL, 1992. Differences between rats and mice in the immunosuppressive activity of 2-methoxyethanol and 2-methoxyacetic acid. *Toxicology* 74, 57-67.
- Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS, 2009. T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 27,591-619.
- Soga T, 2013. Cancer metabolism: key players in metabolic reprogramming. *Cancer Sci.* 104, 275-281.
- Spits H, Cupedo T, 2012. Innate lymphoid cells, emerging insights in development, lineage relationships and function, *Annual Reviews Immunology* 30, 647-675.
- Subra J-F, Cautain B, Xystrakis E, Mas M, Lagrange D, van der Heijden H, van de Gaar M-J, Druet P, Fournie GJ, Saoudi A, Damoiseaux J, 2001. The balance between CD45R^{high} and CD45R^{low} CD4 T cells in rats is intrinsic to bone marrow-derived cells and is genetically controlled. *The Journal of Immunology* 166, 2944-2952.
- Tauber S, Jais A, Jeitler M, Haider S, Husa J, Lindroos J, Knöfler M, Mayerhofer M, Pehamberger H, Wagner O, Bilban M, 2010. Transcriptome analysis of human cancer reveals a functional role of Heme Oxygenase-1 in tumor cell adhesion. *Molecular Cancer* 9, 200.
- Temple L, Kawabata TT, Munson AE, White KL, 1993. Comparison of ELISA and plaque-forming cell assays for measuring the humoral immune response to SRBC in rats and mice treated with benzo[a]pyrene or cyclophosphamide. *Fundam. Appl. Toxicol.* 21, 412-419.
- Tew JG, Wu J, Qin D, Helm S, Burton GR, Szakal AK, 1997. Follicular dendritic cells and presentation of antigen and costimulatory signals to B cells. *Immunological Reviews* 156, 39-52.

- Thomas C, Moraga I, Levin D, Krutzik PO, Podoplelova Y, Trejo A, Lee C, Yarden G, Vleck SE, Glenn JS, Nolan GP, Piehler J, Schreiber G, Garcia KC, 2011. Structural linkage between ligand discrimination and receptor activation by type I interferons. *Cell* 146, 621-632.
- Tucker AN, Munson AE, 1981. In vitro inhibition of the primary antibody response to sheep erythrocytes by cyclophosphamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 59, 617-619.
- Ullah MS, Davies AJ, Halestrap AP, 2006. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 - dependent Mechanism. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 9030-9037.
- Upadhyay AK, Wang J, Edmondson DE, 2008. Comparison of the structural properties of the active site cavities of human and rat Monoamine Oxidase A and B in their soluble and membrane-bound forms. *Biochemistry* 47, 526-536.
- van Grenenynghé J, Rion S, Le Ferrec E, Le Vee M, Amiot L, Fauchet R, Fardel O, 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit differentiation of human monocytes into macrophages. *J. Immunol.* 170, 2374-2381.
- Van Voorhis WC, Hair LS, Steinman RM, Kaplan G, 1982. Human dendritic cells. Enrichment and characterization from peripheral blood. *J. Exp. Med.* 155, 1172-1187.
- Vené R, Delfino L, Castellani P, Balza E, Bertolotti M, Sitia R, Rubartelli A, 2010. Redox remodeling allows and controls B-cell activation and differentiation. *Antioxidants & Redox Signaling* 13, 1145-1155.
- Verhasselt V, Berghe WV, Vanderheyde N, Willems F, Haegeman G, Goldman M, 1999. N-Acetyl-L-Cysteine inhibits primary human T cell responses at the dendritic cell level: association with NF- κ B Inhibition. *J. Immunol.* 162, 2569-2574.
- Vinuesa CG, Tangye SG, Moser B, Mackay CR, 2005. Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nature Reviews Immunology* 5, 853-865.
- Vohr H-W, 1995. Experiences with an advanced screening procedure for the identification of chemicals with an immunotoxic potential in routine toxicology. *Toxicology* 104, 149-158.
- Vohr H-W, Rühl-Fehlert C, 2001. Industry experience in the identification of the immunotoxic potential of agrochemicals. *Science Total Environm.* 270, 123-134.
- Wang H, Joseph JA, 1999. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Biology & Medicine* 27, 612-616.
- Warburg O, Posener K, Negelein E, 1924. Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Biochem. Z.* 152, 319-344.

Ward NE, Pierce DS, Chung SE, Gravitt KR, O'Brian CA, 1998. Irreversible inactivation of protein kinase C by glutathione. *J. Biol. Chem.* 273, 12558-12566.

Wheeler ML, DeFranco AL, 2012. Prolonged production of reactive oxygen species in response to B cell receptor stimulation promotes B cell activation and proliferation. *The Journal of Immunology* 189, 4405-4416.

White KJ, Holsapple MP, 1984. Direct suppression of in vitro antibody production by mouse spleen cells by the carcinogen benzo[a]pyrene but not by the congener benzo[e]pyrene. *Cancer Res.* 44, 3388-3393.

Williams MS, Kwon J, 2004. T cell receptor stimulation, reactive oxygen species, and cell signaling. *Free Radical Biology & Medicine* 37, 1144-1151.

Won HY, Sohn JH, Min HJ, Lee K, Woo HA, Ho Y-S, Park JW, Rhee S-G, Hwang ES, 2010. Glutathione Peroxidase 1 deficiency attenuates allergen-induced airway inflammation by suppressing Th2 and Th17 cell development. *Antioxidants & Redox Signaling* 13, 575-587.

Yamasaki M, Nomura T, Sato F, Mimata H, 2007. Metallothionein is up-regulated under hypoxia and promotes the survival of human prostate cancer cells. *Oncology Reports* 18, 1145-1153.

Zhang W, Modén O, Mannervik B, 2010. Differences among allelic variants of human glutathione transferase A2-2 in the activation of azathioprine. *Chemico-Biological Interactions* 186, 110-117.

Zinkernagel RM, Doherty PC, 1997. The discovery of MHC restriction. *Immunol. Today* 18:14-7.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Differenzierung der Immunzellen aus dem Knochenmark	1
Abb. 2 Komplementkaskade	3
Abb. 3 Klonale Expansion und Selektion in der B-Zell Entwicklung	5
Abb. 4 Ausbildung einer adaptiven Immunreaktion in sekundären lymphatischen Organen	7
Abb. 5 Versuchsschema eines PFCA	12
Abb. 6 Versuchsschema eines MD Tests	14
Abb. 7 Plaquezahlentwicklung in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellzahl	36
Abb. 8 Plaquezahlentwicklung in Abhängigkeit vom Mediumwechsel	37
Abb. 9 Plaquezahlen und Viabilität in Abhängigkeit von der Kulturdauer	37
Abb. 10 Plaquezahlen und Viabilität in Abhängigkeit von Mediumwechsel, Stimulationszeitpunkt und 2-ME Konzentration	39
Abb. 11 Plaquezahlen in Abhängigkeit von IFN I Konzentration	40
Abb. 12 Plaquezahlen in Abhängigkeit von zugesetztem IFN	41
Abb. 13 Plaquezahlen in Abhängigkeit von IFN- ω Konzentration	42
Abb. 14 Plaquezahlen in Abhängigkeit von Zellkulturdauer	43
Abb. 15 Einfluss der DMSO-Konzentration im Medium auf die humorale <i>in vitro</i> Immunreaktion	44
Abb. 16 Einsatz von Mannitol in der MD Kultur mit Zellen aus Ratten	45
Abb. 17 Einsatz von Heptanal in der MD Kultur von Rattenzellen	46
Abb. 18 Einsatz von Benzo(a)pyren in der MD Kultur von Rattenzellen	46
Abb. 19 Einsatz von Azathioprin in der MD Kultur von Milzzellen aus Ratten	47
Abb. 20 Evaluierung von Entwicklungskandidaten im MD Test mit Milzzellen von zwei Spezies	51
Abb. 21 <i>In vitro</i> Immunreaktion von PBMC nach 7 und 21 Tagen <i>in vivo</i> B(a)p Behandlung von Wistarratten	52
Abb. 22 Verlauf der <i>in vitro</i> Immunantwort von mit 150 mg/kg B(a)p behandelten Wistarratten	53
Abb. 23 <i>In vitro</i> Immunantwort von PBMC nach <i>in vivo</i> Azathioprin Behandlung von Ratten	53
Abb. 24 PFCA nach <i>in vivo</i> Azathioprin Behandlung von Ratten	54
Abb. 25 FACS Analyse der verwendeten Kopplungsmethoden	58

Abb. 26 MD Test von mit Ovalbumin <i>in vitro</i> stimulierten Milzzellen	59
Abb. 27 Versuchsaufbau des <i>in vivo</i> Tests für Immunogenität	60
Abb. 28 Spotttest nach <i>in vivo</i> Immunisierung mit Ovalbumin	60
Abb. 29 <i>In vitro</i> Immunreaktion ist T-Zell-abhängig.....	62
Abb. 30 Verteilung der CD4- und CD45RC-positiven Zellen während der <i>in vitro</i> Immunreaktion	63
Abb. 31 Zellverteilung der CD4- und CD25-positiven Zellen während der <i>in vitro</i> Immunreaktion	64
Abb. 32 Verteilung der CD45RA- und RT1b-positiven Zellen während der <i>in vitro</i> Immunreaktion	65
Abb. 33 Zytokinprofil der <i>in vitro</i> Immunreaktion mit Milzzellen	66
Abb. 34 Zytokinprofil der <i>in vitro</i> Immunreaktion mit PBMC.....	67
Abb. 35 Vergleich der Genexpression von CD4-positiven und CD45RA-positiven Milzzellen im Verlauf der <i>in vitro</i> Immunreaktion.....	69
Abb. 36 Mehr als zehnfach deregulierte Gene aus CD4-positiven Milzzellen während der <i>in vitro</i> Immunreaktion.....	70
Abb. 37 Verlauf der <i>in vitro</i> Immunreaktion in Abhängigkeit von 2-ME	72
Abb. 38 Zellverteilung der CD4-positiven und CD25- oder CD45RC-positiven Zellen während der <i>in vitro</i> Immunreaktion ohne 2-ME.....	73
Abb. 39 Einfluss von 2-ME auf T-Zellen in der <i>in vitro</i> Immunreaktion.....	74
Abb. 40 Einfluss von 2-ME auf Zytokine in der <i>in vitro</i> Immunreaktion	75
Abb. 41 Einfluss des zellulären Redoxstatus auf die <i>in vitro</i> Immunreaktion	76
Abb. 42 Einfluss von 2-ME auf den ROS- und GSH-Gehalt von bestimmten Zellpopulationen während der <i>in vitro</i> Immunreaktion.....	78
Abb. 43 Einfluss von 2-ME auf die Genexpression von CD4-positiven Milzzellen im Verlauf der <i>in vitro</i> Immunreaktion	81
Abb. 44 Dreifach deregulierte Gene aus CD4-positiven Milzzellen unter Einfluss von 2-ME während der <i>in vitro</i> Immunreaktion.....	83
Abb. 45 Teststrategie.....	94

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Testbedingungen nach Mishell und Dutton, 1966	34
Tab. 2 Angepasste Testbedingungen an NMRI Mausmilzzellen nach Köper und Vohr, 2009	34
Tab. 3 In dieser Dissertation ausgetestete Kulturbedingungen.....	35
Tab. 4 Optimale Kulturbedingungen für Milzzellen aus Lewis und Wistar Ratten .	38
Tab. 5 Optimale Kulturbedingungen für PBMC aus Wistar Ratten und NMRI Mäusen	40
Tab. 6 Optimale Kulturbedingungen für PBMC aus Primaten	43
Tab. 7 Kriterien zur Klassifizierung von Testsubstanzen	48
Tab. 8 Vergleich der ermittelten IC90 Werte und der korrespondierenden Viabilitäten in verschiedenen Testsystemen	48
Tab. 9 Treffsicherheit der Vorhersage für verschiedene Testsubstanzen mit Milzzellen von Wistarratten	49
Tab. 10 Verfolgung der <i>in vitro</i> Immunreaktion von PBMC nach <i>in vivo</i> B(a)p Behandlung von Wistarratten.....	51
Tab. 11 Verfolgung der <i>in vitro</i> Immunreaktion von PBMC nach <i>in vivo</i> Azathioprin Behandlung von Ratten	54
Tab. 12 Vergleich der <i>in vitro</i> Immunreaktion mit dem PFCA nach <i>in vivo</i> Cyclophosphamid Behandlung von Ratten	55
Tab. 13 Übersicht der verwendeten Protokolle zum Koppeln von Protein an SRBC.....	56
Tab. 14 Austesten der Parameter zum Koppeln von Ovalbumin an SRBC	57
Tab. 15 Adhärente Zellen sind notwendig für die <i>in vitro</i> Immunreaktion.....	61

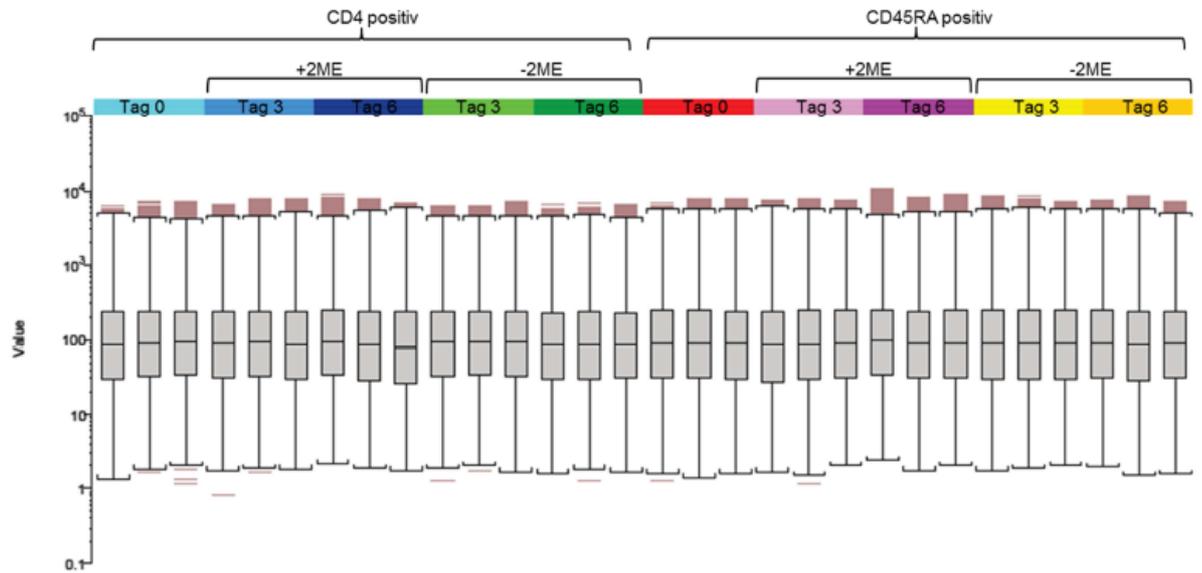
Anhang

A.1 Abkürzungen für Gene und deren Genprodukte

Akr1b8	<i>aldo-keto reductase family 1, member B8</i>
Aldoa	<i>fructose-bisphosphate aldolase</i>
Alox5ap	<i>arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein</i>
AP-1	Aktivator Protein1
Ap1s2	<i>adaptor-related protein complex 1, sigma 2 subunit</i>
Atp6v1	<i>H⁺ transporting, lysosomal ATPase V1</i>
Bcl11a	<i>B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger protein)</i>
Bean	<i>brain expressed, associated with NEDD4</i>
Blnk	B-Zelllinker
<i>Bnip</i>	<i>BCL2/adenovirus E1B interacting protein</i>
C5ar1	Komplementrezeptor für C5a
Cercam	<i>cerebral endothelial cell adhesion molecule</i>
Cfh	Komplementfaktor H
Cldn	Claudin
Col4	Typ IV Kollagen
Cttnbp2nl	<i>cortactin binding protein 2 N-terminal like</i>
Cybas3	<i>cytochrome b, ascorbate dependent 3</i>
Dhcr7	<i>7-dehydrocholesterol reductase</i>
Dtx1	Deltex1
Duox	Dualoxidase
Dusp	<i>dual specificity protein phosphatase</i>
Egln	Hif Prolylhydroxylase (Phd)
Elovl	<i>elongation of very long chain fatty acids</i>
Eno	Enolase
Epb4.1l	<i>erythrocyte membrane protein band 4.1-like</i>
Epor	Erythropoietinrezeptor
Eps	<i>epidermal growth factor receptor pathway substrate</i>
Eraf	<i>erythroid differentiation associated factor</i>
Esm	<i>endothelial cell-specific molecule</i>
Fabp	<i>fatty acid binding protein</i>
Fcrla	<i>Fc receptor-like A</i>
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gdf1	<i>growth differentiation factor 1</i>
Ggt1	γ -Glutamyltransferase 1
Gpm6b	Glycoprotein M6B
GSH	Glutathion
GTP	Guanosintriphosphat
Hbb	Hämoglobin beta
Heph	Häphestin
Hhex	<i>hematopoietically expressed homeobox</i>

Hif	Hypoxie-induzierbarer Faktor
Hs3st	<i>heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase</i>
Icos	T-Zell kostimulatorischer Rezeptor
Isg	<i>interferon stimulated gene</i>
Kcnk	<i>potassium channel, subfamily K</i>
Klr	NK-Rezeptor
Lats	<i>large tumor suppressor</i>
Ldha	Laktatdehydrogenase A
Ltbr	Lymphotoxin-beta-Rezeptor
LT	Leukotrien
Maoa	Monoaminoxidase
MIP	Makrophagen-Inflammatorisches-Protein
Mmp	Matrix-Metalloproteinase
Mt	Metallothionein
NF-AT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NF-κB	<i>nuclear factor-κB</i>
Nos	Stickstoffmonoxid-Synthasen
Nov	<i>nephroblastoma overexpressed</i>
Nox	NADPH-Oxidase
Nqo	<i>NAD(P)H dehydrogenase, quinone</i>
Nrf2	<i>nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i>
Pdha	Pyruvatdehydrogenase
Pfkl	Phosphofruktokinase
Pgam	Phosphoglyceratmutase
Pkm	Pyruvatkinase Typ M (<i>muscle</i>)
Plbd	<i>phospholipase B domain containing</i>
Pld	Phospholipase D
Plod	<i>procollagen-lysine</i>
Pls	Plastin
Ppap	<i>phosphatidic acid phosphatase</i>
Ptgs	Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase
Pxdn	Peroxidasin
Scd	Stearoyl-CoA-Desaturase
Slc	<i>solute carrier</i>
Syk	Milz-Tyrosinkinase
Tifa	<i>TRAF-interacting protein with forkhead-associated domain</i>
Tram	<i>translocation associated membrane protein</i>
Trpm	<i>transient receptor potential cation channel, subfamily M</i>
Ubd	Ubiquitin D
Vegf	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor

A.2 Box-Plot-Analyse von allen Genexpressionsdaten



Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich bei der Erstellung meiner Dissertation unterstützt haben und ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Hans-Werner Vohr dafür, dass er an mich glaubt und mir die herausragende Möglichkeit gab, die Experimente in der Immuntoxikologie der Bayer Pharma AG durchzuführen. Ich danke ihm herzlichst für die Überlassung des instruktiven Themas, die Gewährung der nötigen forschersichen Freiheit und besonders für die durchgehende und ausgezeichnete Betreuung der Arbeit. Dazu gehörten sehr viele anregende und auch kritische Gespräche, jeglicher Rückhalt in allen Belangen, Korrekturlesen des Manuskriptes und die Begutachtung der Dissertation.

Prof. Dr. Eckhard Lammert danke ich sehr herzlich für die Übernahme des Koreferats.

Bei Dr. Eckhard von Keutz und Dr. Friedrich Wilhelm Jekat bedanke ich mich zu tiefst für ihre Unterstützung, die Bereitstellung aller notwendigen Mittel für Forschung und Weiterbildung und die idealen Rahmenbedingungen.

Ein großes Dankeschön geht an Dr. Heidrun Ellinger-Ziegelbauer für die Ermöglichung von Genexpressionsexperimenten, Hilfestellung bei deren Planung und die freundliche und kompetente Betreuung bei ihrer Auswertung.

Ich danke ausdrücklich allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Investigativen Toxikologie unter Leitung von Dr. Thomas Steger-Hartmann, insbesondere Simone Dörfling, Christine Gmelin, Berthold Herzog, Annette Rauh, Manuela Schmidt, Dr. Cornelia Sabine Viebahn, Martina Wingenroth, Kerstin Albrecht Wibke D'Acquisto, Sabine Michel-Kaulmann, Anika Winter, Dr. Lydia Mareen Köper, Laura Endres und Eva Ellebracht für die sehr gute Atmosphäre, konstruktive Zusammenarbeit und die vielfältigste Unterstützung.

Besonders möchte ich hier Martina Arens und Petra Leidenfrost hervorheben, die mich tatkräftig bei der MD Kultur mit Nagerzellen unterstützten.

Holger Spiecker gilt mein gesonderter Dank für die Unterstützung bei den komplexen FACS Analysen.

Ein herzliches Dankeschön geht an meine Mitdoktorandinnen Christina Stahl und Mira Pavkovic, die mich bei vielen Experimenten unterstützt haben und nicht nur in fachlichen Gesprächen inspirierend und motivierend waren.

Dr. Margret Leineweber danke ich vielmals für das abschließende Korrekturlesen und viele Gespräche zum Promotionsverfahren.

Der weitaus größte Dank gebührt meiner Familie, insbesondere meinem Ehemann Michael Berenbein, meiner Schwester Elena Fischer und meinen großartigen Eltern Irina und Vladimir Fischer. Ohne die grenzenlose Unterstützung, Liebe und Motivation meiner Familie, der ich diese Arbeit widme, wären mir mein Studium, die Forschungsaufenthalte und schließlich diese Dissertation nicht vergönnt gewesen.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität“ erstellt worden ist. Desweiteren erkläre ich, dass diese Arbeit in der vorliegenden oder in einer ähnlichen Form bisher bei keiner anderen Institution eingereicht worden ist. Ich habe keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Wuppertal, Juli 2013

Anna Fischer-Berenbein