

**Schlussbericht zur Veröffentlichung der Ergebnissen von Forschungsvorhaben im  
Programm**

**Biologie**

**des Bundesministeriums für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie**

**Thema des Forschungsvorhabens:**

**Aufbau eines in vitro Tests zur Erfassung anaphylaktischer  
Hautreaktionen als Ersatz der entsprechenden  
Tierversuche**

**1. Administrative Angaben**

Projekt Nr.: BEO 03 11 829/9

Forschungszentrum Jülich GmbH - BEO  
Projektträger Biologie, Energie und Umwelt  
des Bundesministeriums für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie

Förderschwerpunkt: Ersatzmethoden zum Tierversuch

Laufzeit des Vorhabens: 1.7.1999 bis 31.8. 2002

Projektleitung: PD Dr. Andreas Hoffmann

Zuwendungsempfänger: Paul-Ehrlich-Institut  
Abteilung Allergologie  
Fachgebiet Entwicklung und Standardisierung  
Paul-Ehrlich-Straße 51-59  
63225 Langen

Telefon: 06103/77-5304

Fax: 06103/77-1258

Email: hofan@pei.de

## Inhaltsverzeichnis:

1. Administrative Angaben .....	1
2. Aufgabenstellung .....	3
3. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde .....	3
4. Planung und Ablauf des Vorhabens.....	3
5. Wissenschaftlich technischer Stand bei Vorhabenbeginn.....	4
6. Zusammenarbeit mit anderen Stellen .....	5
7. Ergebnisse.....	6
7.1 Etablierung mycoplasmenfreier RBL-2H3 Zellen.....	6
7.2 Zur Entwicklung des Testsystems .....	8
7.3 Testvorschrift .....	10
7.4 Mathematisches Auswertungsverfahren.....	11
7.5 Anwendungsbeispiele .....	12
7.6 Monoklonale IgE Antikörper .....	13
7.7 Untersuchungen zur Kryokonservierung .....	16
7.8 Vergleich von Histamin- und $\beta$ -Hexosaminidase - Freisetzung .....	16
7.9 Effekte antiinflammatorischer Substanzen auf RBL-Zellen:.....	17
8. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse.....	19
9. Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen .....	19
10. Angaben zu erfolgten Veröffentlichungen .....	20
11. Literatur.....	20

## **2. Aufgabenstellung**

Mit einem zellulärer Test, der entscheidende Abläufe der allergischen Typ I Reaktion in vitro nachvollzieht, soll eine Alternative für Tiermodelle der aktiven und passiven kutanen Anaphylaxietestung (ACA und PCA) an Ratte, Maus oder Meerschweinchen aufgebaut werden. Damit soll für Tierversuche, die bei der Entwicklung von Pharmaka oder zur Bewertung des allergenen Potentials hypoallergener Nahrungsmittel derzeit durchgeführt werden, schrittweise eine Alternative angeboten werden. Gleiches gilt für entsprechende Tierexperimente in der immunbiologischen oder parasitologischen Grundlagenforschung

## **3. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde**

Das Vorhaben wurde im Paul-Ehrlich-Institut in Langen in der Abteilung Allergologie durchgeführt. Hier standen Mitarbeiter mit entsprechendem know-how sowie erforderliche Zellkultur-Facillities zur Verfügung. Von besonderem Wert waren erste Erfahrungen zu funktionsbezogenen Mastzell-Modellen, die auf der IgE und Antigen-gesteuerten Mediatorfreisetzung aus basophilen Leukämiezellen der Ratte (RBL-2H3) beruhen.

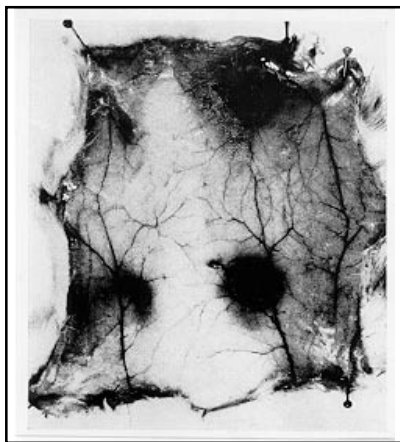
## **4. Planung und Ablauf des Vorhabens**

Planung und Ablauf des Vorhabens gestalteten sich in folgenden Schritten:

- Auswahl und Etablierung einer geeigneten, funktionell aktiven RBL-Zelllinie
- Hinterlegung eines mykoplasmenfreien Zellstocks bei einer öffentlichen Zellbank
- Optimierung der Zellkulturbedingungen (Konditionierung, Kryoregime)
- Optimieren des technischen Ablaufs für den Mediatorfreisetzungstest
- Adaptation geeigneter Verfahren zur mathematischen Auswertung
- Entwicklung monoklonaler IgE-Antikörper
- Prävalidierung und Austestung des Verfahrens für folgende Anwendungsgebiete
  - biologische Aktivitätbestimmung von Allergenextrakten
  - Bewertung des allergenen Potenzials neuartiger Nahrungsmittel
  - sensitive IgE Messung in Seren und Hybridomzellüberständen
  - Modulation der Mastzellreaktivität durch Pharmaka
- Gestaltung eines Anwenderseminars

## 5. Wissenschaftlich technischer Stand bei Vorhabenbeginn

Das wachsende Interesse an der Prävention allergischer Erkrankungen hat dazu geführt, dass entsprechende Tiermodelle neben der Grundlagenforschung auch zur Prüfung neuentwickelter Antiallergica oder hypoallergener Nahrungsmitteln vermehrt Anwendung finden. Ein typischer Vertreter solcher Tiermodelle ist die aktive oder passive kutane Anaphylaxietestung (ACA bzw. PCA) an der Haut von Versuchstieren. Im Beispiel in Abb. 1 wird gezeigt, wie ein Präparat auf Basis von Cromoglycinsäure (Stabilisator der Mastzellmembran) die anaphylaktische Hautreaktion am Tiermodell dosisabhängig hemmt [1].



**Abb.1 Passive kutane Anaphylaxie bei der Ratte**

rechts oben: positive Kontrolle,

rechts unten:

Zusatz von Dinatrium-Cromoglycat 0,1 mg

links unten:

Zusatz von Dinatrium-Cromoglycat 0,2 mg

links oben: Zusatz von Dinatriumcromoglycat 0,4 mg

(Abbildung entnommen aus Renner und Schnitzler, 1984)

Mit vergleichbarer Fragestellung wird die PCA zum Screenen neuer Syntheseprodukte oder für die Prüfung antiallergisch wirksamer pflanzlicher Naturstoffe eingesetzt [2,3].

Das Ziel des Vorhabens bestand darin, für solche Tierversuche eine Alternative in der Form eines vitro Testes zu entwickeln. Im Rahmen von Vorarbeiten wurde eine funktionell aktive Sublinie der basophilen Ratten-Leukämiezelle (RBL-2H3) beschafft. Das entscheidende Kriterium für die Eignung der Zelllinie bildete die IgE- und Antigen abhängige Stimulierbarkeit, die entsprechend dem Schema in Abb.2 ausgetestet wurde.



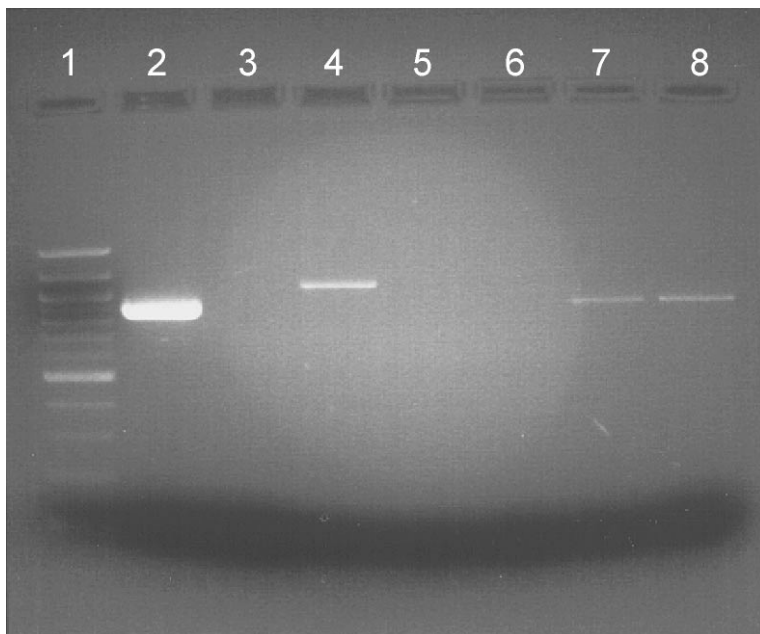
frühzeitig aufgebauten Kontakten zeigte sich, dass Tierversuche der kutanen Anaphylaxie mit sehr unterschiedlicher Zielstellung, meist in der Industrieforschung (Pharmakologie, Novell-Food) und in geringerem Umfang im Hochschulbereich (Parasitologie, Immunologie, Pharmakologie) stattfinden. In den immuntoxikologischen Forschungszentren internationaler Nahrungsmittelkonzerne werden Anaphylaxietestungen am Tier meist in erheblichem Umfang durchgeführt, wobei das Ziel darin besteht, das allergene Potential eigener Produkte zu überwachen. Besonderes Augenmerk gilt neu eingeführten hypoallergenen Zubereitungen oder den sog. "Novell-Food-Products". Da es bisher nicht möglich ist, das allergene Potenzial einer biochemischen Struktur zuzuordnen, sind entsprechende Tierversuche unumgänglich. Konkrete Zusammenarbeit zur Implementierung des Testsystems gab es mit *Unilever Research Center /SEAC Toxicology Unit; Colworth House, Sharnbrook Bedford MK44 1LQ*, sowie dem, *Department of Immunotoxicology, BIBRA International; Woodmansterne Road, Carshalton, Surrey, SM5 4DS*, beide *Great Britain* sowie mit *Nestlé Research Department of Toxicology, Lausanne, Schweiz*. In diesen Einrichtungen wurden in der Vergangenheit Tiermodelle genutzt, für die der Mediator-Freisetzungstest aus RBL-Zellen eine attraktive Alternative darstellt. Im Rahmen der Kooperationen mit Hochschulforschungseinrichtungen gibt es Vereinbarungen mit dem *Institut für molekulare Parasitologie in Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin* und dem *Pharmakologischen Institut der Universität Freiburg*. In beiden Instituten besteht Interesse am Mediator-Freisetzungstest aus RBL-Zellen als Alternative für in der Forschung eingesetzte Tiermodelle sodass eine entsprechende Unterstützung (RBL-2H3 Zellen, monoklonale IgE-Antikörper, Support bei der Testimplemetierung) gegeben wurde. Die Zusammenarbeit mit der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig erlaubte es uns, die RBL-2H3 Zelllinie mit gesicherter Qualität an alle potentiellen Anwender weiterzuleiten.

## 7. Ergebnisse

### 7.1 Etablierung mycoplasmenfreier RBL-2H3 Zellen

Beim Aufbau eines funktionellen Assays ist einwandfreies Zellmaterial eine grundlegende Voraussetzung für reproduzierbare Resultate. Die von uns beschaffte und anhand funktioneller Parameter ausgewählte RBL-2H3 Zelllinie war jedoch mit Mykoplasmen infiziert. Sie wurde in Kooperation mit der DSMZ einer Mykoplasmen-Sanierung mit Ciprofloxacin unterzogen und zugleich dort hinterlegt (DSMZ-Nr. ACC 312). Die Zelllinie erwies sich bei der nachfolgenden Testung mit DPAAI, mikrobieller Kultur, RNA Hybridisation und PCR-Assays als Mykoplasmen negativ. Bei der anschließenden laufenden Kontrolle der Mykoplasmenfreiheit sollte mit zwei unabhängigen Nachweistechniken gearbeitet werden,

um eine zuverlässige Überwachung zu garantieren. Daher kam sowohl die Fluoresztestung mit dem DNA-Farbstoff Bisbenzimidin als auch ein PCR-Assay zur Anwendung. Es gelang so, auch geringgradige Infektionen, die insbesondere nach längerer Kultivation mit Neomycin oder Gentamycin leicht unerkant bleiben, festzustellen. Bei der PCR-Technik ergaben sich allerdings wiederholt Schwierigkeiten, die auf die mitgelieferten Kontrollen im Test-Kit zurückzuführen sind. Zum einen erwies es sich als zweckmäßig, die DNA anstelle über die mitgelieferten Resin-Säulen mit der aufwendigeren Chloroform/Phenol-Präzipitation zu präparieren, um die Amplifikation hemmende Substanzen sicher zu entfernen. Zum anderen ergaben sich oft Probleme mit der mitgelieferten internen Kontrolle, die eine stattgefundenene Amplifikation nachweisen soll. So wurde diese meistens amplifiziert, wenn sie alleine getestet wurde, aber nicht, wenn zusätzliche DNA vorhanden war.

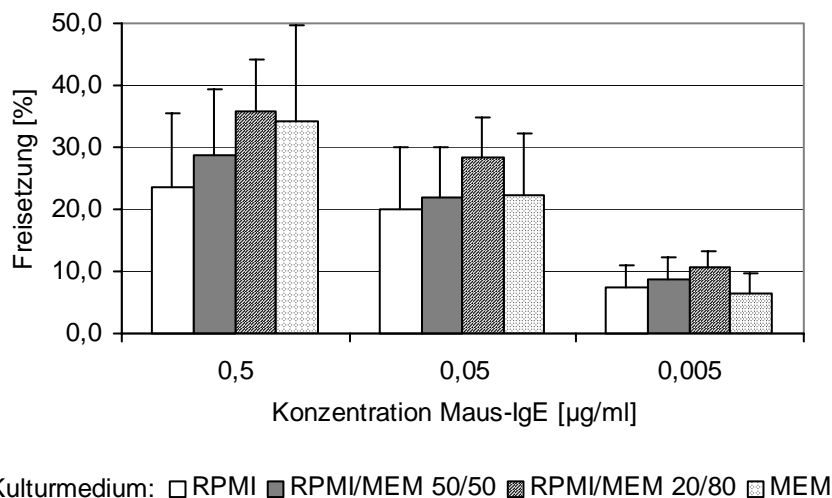


**Abb. 4 Mykoplasmennachweis mittels Stratagene-PCR-Testkit (Mycoplasma Plus™ PCR Primer Set)**

Dargestellt sind amplifizierte PCR-Produkte von 2 Zelllinien und den mitgelieferten Kontrollen. *Reihe 1*: Marker; *Reihe 2*: Positivkontrolle; *Reihe 3*: Negativkontrolle; *Reihe 4*: interne Kontrolle; *Reihe 5*: RBL-Zellen (behandelt); *Reihe 6*: RBL-Zellen (behandelt) + interne Kontrolle; *Reihe 7*: RBL-Zellen; *Reihe 8*: RBL-Zellen + interne Kontrolle

## 7.2 Zur Entwicklung des Testsystems

In diesem Arbeitsabschnitt werden ausgewählte Resultate der Optimierung kritischer Parameter gezeigt. Ein zentrales Problem besteht darin, die RBL-Zellen so kultivieren, dass neben einer ausreichenden Proliferationsrate auch Enzyme der zellulären Signalkaskade sowie freizusetzende Mediatoren in ausreichendem Maße gebildet werden. Um die Zellen langfristig in einem für die Mediatorfreisetzung optimalen Zustand zu erhalten, wird aufgrund der ermittelten Vergleichswerte (Abb. 5) ein Medium-Mix bestehend aus 80% Eagle-MEM (Earles Salze) und 20% RPMI 1640 bei einem finalen Anteil von 6% FKS empfohlen. Die RBL-Zellen wachsen dabei als adhärenter Monolayer mit fibroblastenähnlicher Morphologie. Die Verdoppelungszeit liegt bei ca 50-60 Stunden, das Umsetzen konfluenter Kulturen erfolgt aller drei Tage im Verhältnis 1:5. 24-48 h vor Testbeginn, werden die Zellen auf Eagle-MEM (Earles Salze) mit 5 %FCS umgestellt, um die Proliferation abzuregeln und die Ausdifferenzierung zu fördern.



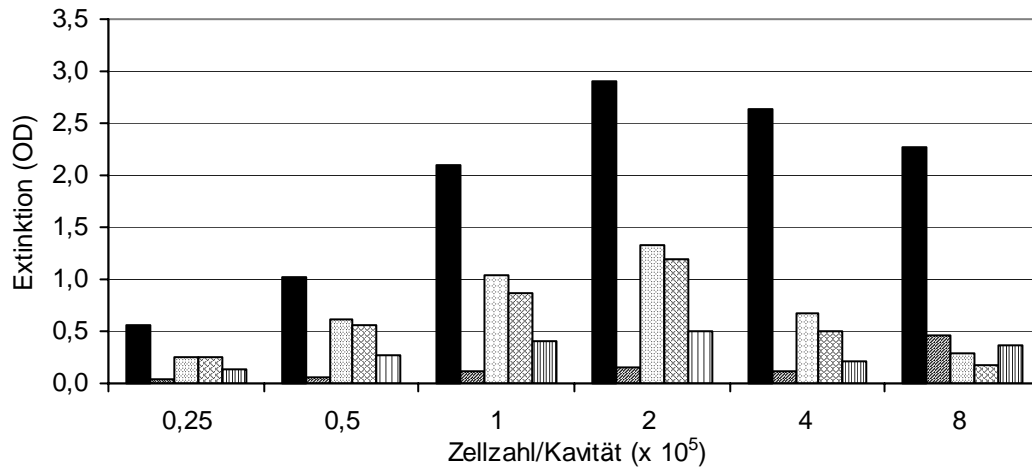
### Abb.5 Optimierung des Mediums zur RBL-Zellkultivierung

Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm s$ ) aus 6 Versuchen, wobei die RBL-Zellen durchgängig in den entsprechenden Medien kultiviert wurden und die Freisetzungs-Versuche in wöchentlichem Abstand stattfanden. Die Sensibilisierung der Zellen erfolgte mit verschiedenen Konzentrationen von monoklonalem Maus-IgE gegen Birkenpollen. Stimuliert wurde mit Birkenpollenextrakt.

Die optimale Zellkonzentration der im Test eingesetzte Zellzahl je Kavität ist weniger kritisch. Neben einer hohen spezifischer Mediator-Freisetzung begleitet von möglichst geringer Spontanfreisetzung soll auch die Reproduzierbarkeit mit bewertet werden. Die in Abb.6



zusammengefassten Ergebnisse zeigen zunächst ein relativ breites Optimum bei  $1-2 \times 10^5$  Zellen je Kavität.



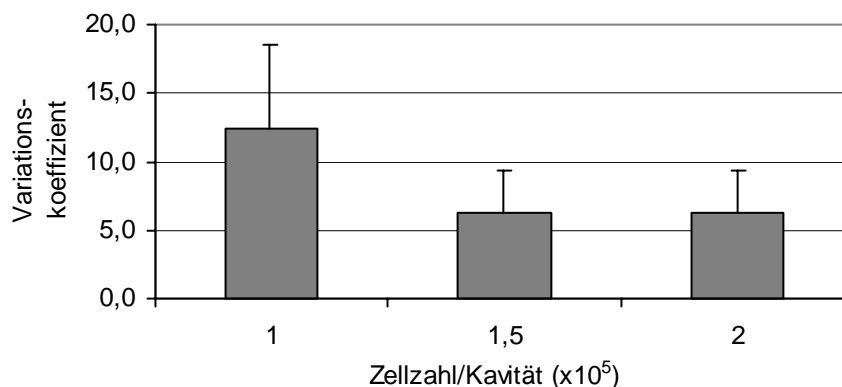
Stimulation mit:

■ Total    ▨ Spontan    □ 0,5  $\mu\text{g}$  IgE/ml    ▩ 0,05  $\mu\text{g}$  IgE/ml    ▤ 0,005  $\mu\text{g}$  IgE/ml

#### Abb.6 Vergleich verschiedener Zellzahlen je Kavität innerhalb einer Mikrotiterplatte

Dargestellt ist die direkt erreichbare  $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivität anhand der messbaren Extinktion nach Umsatz des Substrates  $\beta$ -D-Glucosaminid. Die spezifische Freisetzung wurde induziert durch monoklonales Maus-IgE gegen Birkenpollen und Aktivierung mit Birkenpollenextrakt.

Dieses Optimum wird beim Einbeziehen der Intraassay Variationskoeffizienten (VK) jedoch eingengt. Abb.7 verdeutlicht, dass bei einer die Zellzahl zwischen  $1,5 - 2 \times 10^5$  je Kavität, Variationskoeffizienten unter 10% zu erreichen sind.



#### Abb.7 Abhängigkeit der Variationskoeffizienten von der Zellzahl je Kavität

Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm s$ ) aller Variationskoeffizienten je einer 96er-Mikrotiterplatte. Die einzelnen Proben wurden dabei in 4-fach und 6-fach Bestimmungen gemessen.

### 7.3 Testvorschrift

Aufgrund der vorhandenen Daten kann eine Testvorschrift angegeben werden, die nachfolgend als Flow-Charts dargestellt ist:

1. Tag:

#### I. Aussaat der Zellen

1. Zellen ernten, in MEM resuspendieren und zählen
2. mit MEM auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml einstellen
3. Aussaat von je 150  $\mu$ l pro Kavität einer 96-well Zellkultur-Mikrotiterplatte ( $\Rightarrow 1,5 \times 10^5$  Zellen/Kavität)
4. Über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubieren



2. Tag:

#### II. Sensibilisierung der Zellen

1. IgE-haltiges Mausserum oder monoklonales IgE mit MEM auf benötigte Konzentration(en) verdünnen
2. Altes Medium abheben und je 50  $\mu$ l pro Kavität von den IgE-Verdünnungen einpipettieren
3. 1 Stunde im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubieren

3 x waschen mit Tyrodepuffer (je 100  $\mu$ l/Kavität)

#### III. Inkubation mit Allergen (Stimulation der Zellen)

1. Während der Sensibilisierung der Zellen mit dem entsprechenden Allergen eine Verdünnungsreihe in Tyrodepuffer herstellen.
2. In jede Kavität entsprechend des Versuchslayouts 100  $\mu$ l Allergenverdünnung bzw. Tyrodepuffer als Spontanrelease und Triton X 100 (0,05%ig) als „Totalrelease“ einpipettieren
3. 1 Stunde schwimmend im Wasserbad (37°C) inkubieren

#### IV. enzymatische Farbreaktion

1. 30  $\mu$ l des Zellkulturüberstandes nach der Stimulation in eine zweite sterile Mikrotiterplatte transferieren
2. je 50  $\mu$ l / Kavität der Substratlösung ( $\beta$ -D-Glucosaminid) dazupipettieren
3. 1 Stunde schwimmend im Wasserbad (37°C) inkubieren

#### V. Stoppen und Messen der Farbreaktion

1. 100  $\mu$ l Stopplösung (0,2 M Glycin) in jede Kavität pipettieren (Farbumschlag nach gelb bei Mediatorfreisetzung)
2. mit einem Mikrotiterplatten-Reader bei 400 nm (Referenz 630 nm) die Extinktion messen
3. Berechnung der Mediatorfreisetzung in Prozent von der Totalfreisetzung

#### 7.4 Mathematisches Auswertungsverfahren

Auch bei standardisierten Kulturbedingungen unterliegt die Mediatorfreisetzung aus RBL-Zellen natürlichen Schwankungen. Zur Relativierung der Messdaten wird daher die IgE- und Allergen- induzierten Mediatorfreisetzung auf die Freisetzung nach Zellyse mit TritonX100 bezogen und als prozentualer Anteil der totalen Mediatorfreisetzung ausgedrückt:

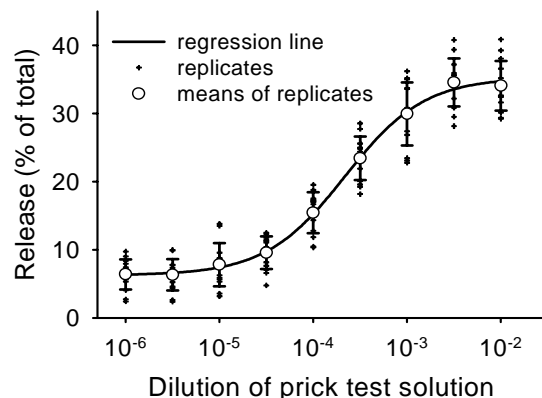
$$\text{Release in \%} = \frac{\text{Probenfreisetzung} - \text{Spontanfreisetzung}}{\text{Totalfreisetzung} - \text{Spontanfreisetzung}} \times 100\%$$

Eingesetzt werden die im ELISA-Reader ermittelten OD-Messwerte. Bei der aktuell angewandten  $\beta$ -Hexosaminidase Messung wird PNP-N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminid als Substrat umgesetzt und durch Glycin in einen Farbstoff umgewandelt, der bei einer Wellenlänge von 405 nm (Referenz 630 nm) gemessen wird.

Zur quantitativen Bestimmung der biologischen Aktivität von Allergenextrakten werden Dosis-Wirkungs-Kurven verglichen, indem vom jeweils zu testenden Extrakt sowie von einer Referenz serielle Verdünnungen ausgetestet werden. Die (biologisch aktive) Wirkstoffkonzentrationen wird durch Abgleich der Referenz- Kurve (Parallel line assay) oder über die Differenz der jeweiligen  $ED_{50}$ -Konzentrationen<sup>1</sup> abzulesen. Eine vergleichende Bewertung dieser Auswertungsverfahren zeigte, dass die beste Angleichung der gemessenen Dosis-Wirkungskurven durch eine 4-Parameter Anpassung erfolgt.

#### Abb. 8 Reproduzierbarkeit des Mediator freisetzungstestes:

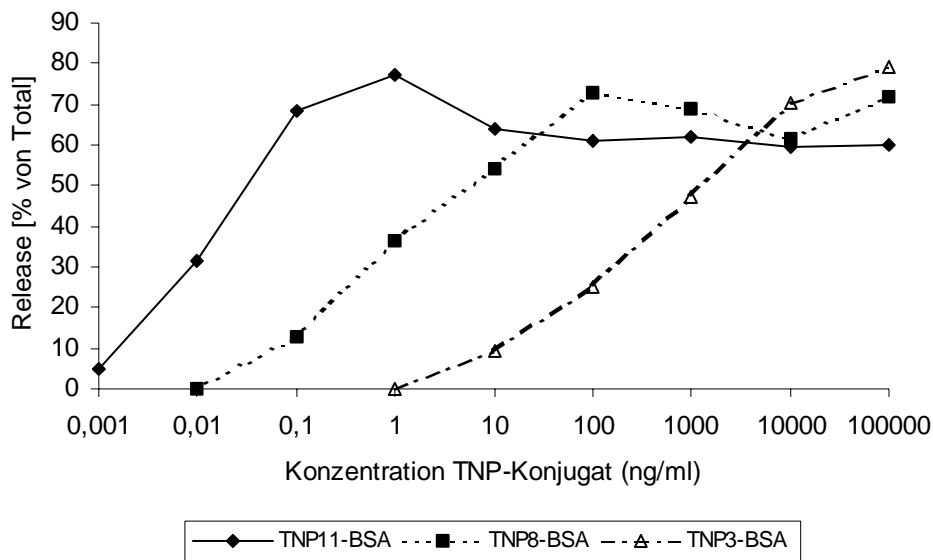
RBL-2H3 Zellen werden mit Katzenhaar-spezifischem IgE (Maus-Hyperimmunserum) passiv sensibilisiert und mit entsprechenden Testallergenen stimuliert (Prick-Test-Solution). Die dargestellten Werte repräsentieren den Mittelwert von 7 Experimenten.



<sup>1</sup>  $ED_{50}$ : Dosis des Wirkstoffes oder berechnete Verdünnungsstufe, bei der 50% der maximal erreichbaren Wirkung gemessen werden.

### 7.5 Anwendungsbeispiele

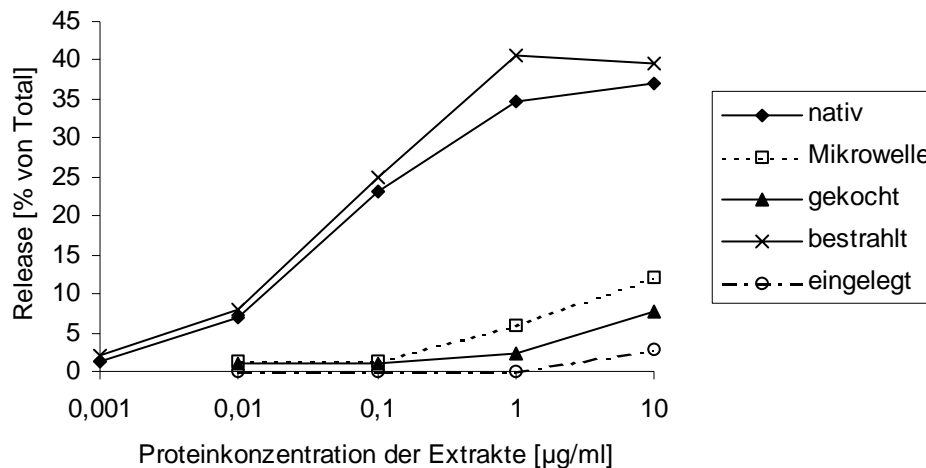
Um die Praktikabilität des Testes und die Plausibilität der erreichbaren Ergebnisse zu demonstrieren, werden Beispiele für Anwendungen vorgestellt. Die Abb.9 zeigt die vergleichende Titration von TNP-BSA-Konjugaten<sup>2</sup>, die sich durch einen unterschiedlichen Kopplungsgrad der TNP-Haptengruppen am BSA- Carrier unterscheiden (11, 8 bzw. 3 TNP-Gruppen pro BSA-Molekül). Zur passiven Sensibilisierung dient TNP-spezifisches monoklonales IgE aus Igel.b4 Zellen. Die dabei aufgezeichneten Dosis-Wirkungs-Kurven sind entsprechend des Kopplungsgrades verschoben. Dabei wird deutlich, dass die Zahl der TNP-Gruppen je Carriermolekül auf die allergene Potenz des TNP-BSA-Konjugates erhebliche Auswirkungen hat.



**Abb.9 Vergleich der allergenen Potenz von TNP-BSA-Konjugaten mit verschiedenen Kopplungsgraden:** Passive Sensibilisierung der RBL-Zellen mit monoklonalem anti TNP-IgE aus Igel.b4-Zellen, Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen der TNP-BSA-Konjugate.

In Abbildung 10 ist die praktische Anwendung zur Untersuchung thermisch behandelter Sellerie-Allergenextrakte gezeigt. Zur passiven Sensibilisierung wurde ein (noch) in der Maus erzeugtes IgE-reiches Serum eingesetzt. Dabei ist deutlich zu erkennen, wie sich durch Erhitzung das allergene Potenzial vom Sellerie reduziert.

<sup>2</sup> TNP-BSA-Konjugat: Tri-Nitro-Phenyl-Gruppe gekoppelt an bovines Serumalbumin



**Abb. 10: Titration von unterschiedlich behandelten Sellerie-Extrakten im RBL-Test**

Passive Sensibilisierung mit einem Serumpool aus Mäusen, die mit nativem Sellerie-Extrakt immunisiert wurden. Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen der verschiedenen Sellerie-Extrakte

### 7.6 Monoklonale IgE Antikörper

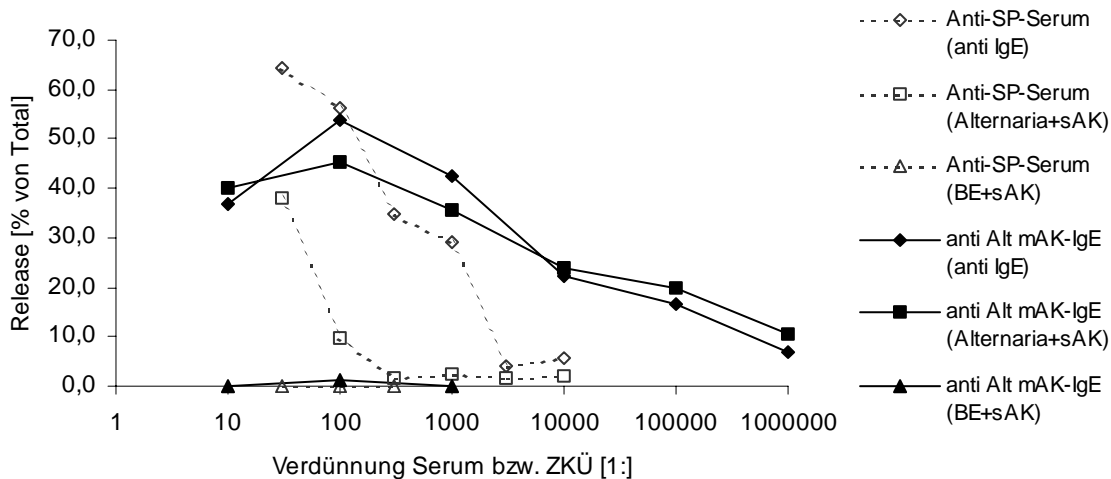
Nach Etablierung des eigentlichen Testsystems wurde schnell deutlich, dass die Qualität des Assays durch Eigenschaften und der Verfügbarkeit der jeweiligen IgE-Antikörper bestimmt wird. Wegen der Speziesrestriktion des Fc $\epsilon$ -Rezeptors können zur Sensibilisierung der RBL-Zellen nur IgE-Antikörper von Maus, Ratte oder Hamster genutzt werden. Eine Serumgewinnung von kleinen Versuchstieren ist jedoch auf Dauer nicht akzeptabel und zwingt zu Alternativen. Notwendig wären allergenspezifische monoklonale IgE-Antikörper. Diese sind jedoch auch 25 Jahre nach der Entwicklung der Hybridomtechnik kaum verfügbar. Frei zugänglich waren bisher lediglich wenige für TNP- oder DNP-Gruppen spezifische IgE-Antikörper (z.B. aus Igel.b4-Zellen). Die Entwicklung von monoklonalen IgE-Antikörpern (mAk IgE) gestaltete sich bisher so schwierig, da entsprechende ELISA-Systeme für das Screenen auf IgE-produzierende Hybridomzellen nicht ausreichend empfindlich sind. So waren für das Screening PCA-Tierversuche unumgänglich. Beispielsweise wurden für die Generierung eines einzigen Ovalbumin-spezifischen IgE-Klons, rekonstruiert man die Daten aus der betreffenden Publikation [4], zum Screening über 2000 Überstände mit der PCA -Testung an Mäusen untersucht. Die mit soviel Aufwand erzeugte Hybridoma-Zelllinie ging wegen Instabilität später verloren (E. Gelfand & W.M. Becker pers. comm.). Ähnliche Versuche wurden später kaum wiederholt. Da mit dem Mediatorfreisetzungstest eine Alternative zum aufwendigen Tierversuch der PCA zur Verfügung stand, sollte vorrangig geprüft werden, ob damit IgE-produzierende Hybridomas zu finden sind.

Interessanterweise erwies sich der Mediator-Freisetzungstest in der ursprünglichen Form für das Screening auf IgE-Hybridomas als ungeeignet. Dies liegt daran, dass es nur dann zu einer Mediator-Freisetzung kommt, wenn mindestens zwei zellständige IgE-Antikörper durch gleichzeitige Bindung des Allergens überbrückt werden. Eine Besonderheit des monoklonalen IgE (aus den heranwachsenden Hybridomzellen) besteht nun darin, dass es, im Gegensatz zu polyklonalem Serum-IgE, nur ein einzelnes Epitop auf dem Allergenmolekül erkennt. Wenn dieses Epitop nicht gerade mehrfach und in einem für die Brückenbildung effektiven Abstand auf dem Allergen positioniert ist<sup>3</sup>, unterbleibt besagte Brückenbildung. Überraschenderweise konnte durch Zugabe von vernetzenden IgG-Antikörpern (z.B. anti-Birkenpollen) im nachhinein eine Brückenbildung inklusive Mediator-Freisetzung ausgelöst werden. Mit der Einbeziehung solcher quasi anaphylaktisch wirkenden Sekundär-Antikörper gelang es, die Screening-Prozedur so zu verbessern, dass wir relativ unerwartet eine größere Zahl von IgE-produzierenden Hybridomas fanden und damit erstmalig ein Set verschiedener monoklonaler IgE-Antikörper mit Spezifität für klinisch relevante Allergene zur Verfügung stand. Eine gewisse technische Schwierigkeit bestand allerdings darin, für längere Zeit zwei Zellkultursysteme, die Aussaat von hybridisierten Fusionszellen und den RBL-Test, parallel zu beherrschen.

Im Rahmen der Arbeiten am Projekt gelang es, elf für Birkenpollen- einen Erdnuß Allergen und drei für Schimmelpilz Allergene spezifische IgE-Hybridomas zu detektieren und über jeweils drei Reklonierungsschritte zu stabilisieren. Damit steht nach unserem Wissen weltweit erstmals ein Panel mit monoklonalen IgE-Antikörpern für klinisch relevante Allergene zu Verfügung. Eine Zusammenfassung der Daten zur Charakterisierung dieser IgE-Klone, soweit das im Rahmen dieses Projektes möglich war, ist in der Tabelle in der Anlage 1 enthalten. In Abb. 11 und 12 sind ergänzende Titrationskurven gezeigt, die auch die Ergiebigkeit dieser IgE-Überstände zur passiven Sensibilisierung im Vergleich zum murinen Serum veranschaulichen. Bei diesen Titrationsen wird auch deutlich, dass im Serum nur ein Teil der IgE-Antikörper die gewünschte Spezifität aufweist. Nach der (unspezifischen) Vernetzung mit anti-Maus-IgE ist eine wesentlich höhere Mediatorfreisetzung messbar, als nach Antigen-Stimulation. Dieses trifft jedoch nicht für monoklonalen IgE-Antikörper zu, was letztendlich auch zu erwarten ist.

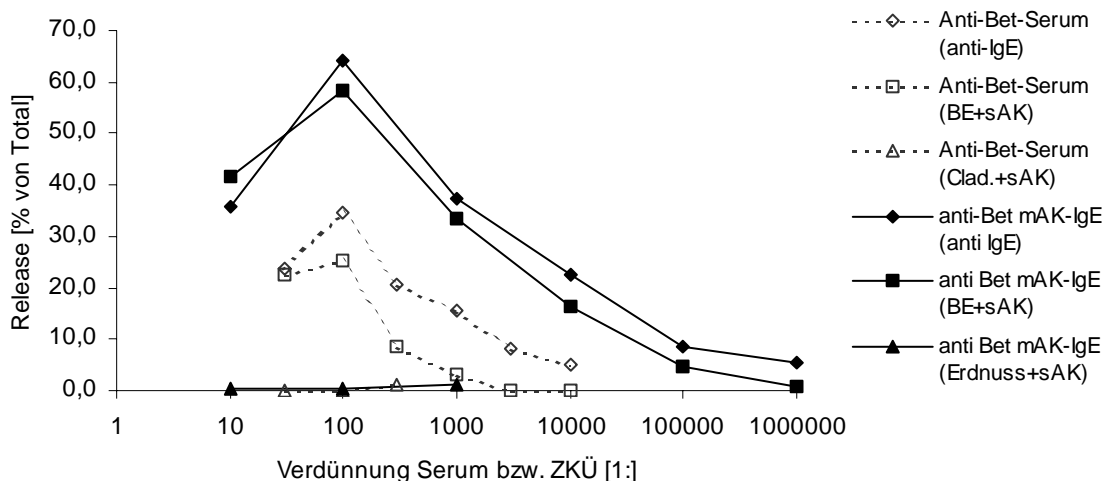
---

<sup>3</sup> was bei den synthetisch hergestellten TNP-gekoppelten Modellallergenen durchaus zutrifft



**Abb.11 Titration von murinem Poolserum und monoklonalem Maus-IgE mit Spezifität gegen Birkenpollen-Allergene**

RBL-Zellen wurden mit steigenden Verdünnungen vom Maus-Pool-Serums (Anti-Bet-Serum)(gestrichelt, offene Symbole) sowie eines monoklonalen anti-Birkenpollen IgE Zellkulturüberstandes (ZKÜ) aus der Maus (anti Bet mAK-IgE)(durchgezogen, gefüllte Symbole) sensibilisiert. Die Stimulation (Legendentext in Klammern) erfolgte (unspezifisch) mit einem anti-Maus-IgE-Serum (anti IgE;  $\blacklozenge$ ), oder (spezifisch) mit Birkenpollen-Extrakt (BE) zusammen mit einem sekundär vernetzen Antikörper (BE+sAK;  $\blacksquare$ ). Für Kontrollzwecke wurde mit Cladosporium-Pricktest-Lösung (Clad.) bzw. Erdnuss-Extrakt (Erdnuss) jeweils mit einem sAK ( $\blacktriangle$ ) stimuliert.



**Abb. 12 Titration von murinem Poolserum und monoklonalem Maus-IgE mit Spezifität gegen Alternaria-Allergene**

Sensibilisiert wurden die RBL-Zellen mit verschiedenen Verdünnungsstufen eines Maus-Pool-Serums mit IgE gegen Alternaria (Anti-SP-Serum)(gestrichelt, offene Symbole) sowie eines monoklonalen anti-Alternaria IgE Zellkulturüberstandes (ZKÜ) aus der Maus (anti Alt mAK-IgE)(durchgezogen, gefüllte Symbole). Die Stimulation (Legendentext in Klammern) erfolgte (unspezifisch) mit einem anti-Maus-IgE-Serum (anti IgE;  $\blacklozenge$ ), oder (spezifisch) mit Alternaria-Pricktest-Lösung zusammen mit einem sekundär vernetzen Antikörper (Alternaria+sAK;  $\blacksquare$ ). Zur Kontrollstimulation dient Birkenpollenextrakt (BE) zusammen mit einem sAK ( $\blacktriangle$ ).

### **7.7 Untersuchungen zur Kryokonservierung**

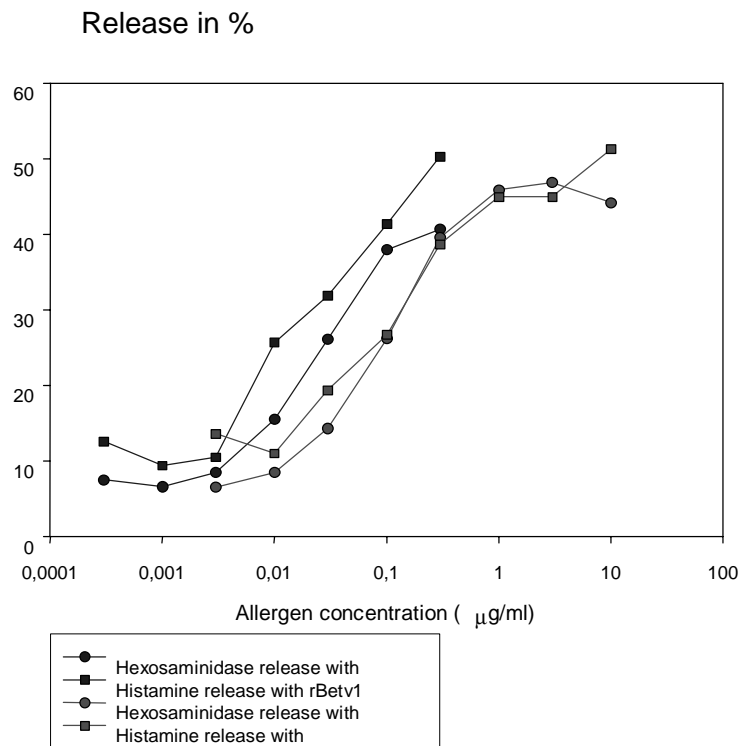
Die verwendeten RBL-2H3 Zellen lassen sich relativ problemlos mit 70% Medium, 20% FCS und 10% DMSO einfrieren. Als vorteilhaft hat sich beim Einfrieren die schrittweise Zugabe von DMSO bis zur Endkonzentration von 10% erwiesen. Es empfiehlt es sich, möglichst hohe Zellmengen (ca.  $5 \times 10^7$  je Ampulle) einzufrieren. Allerdings muß auch so eine relativ lange Anlaufphase von 14 Tagen eingeplant werden, bis geeignete Zellen zur Verfügung stehen. Daher erfolgt in der Praxis oft eine permanente Vorratshaltung der Zellen, um auch kurzfristig Tests durchzuführen zu können.

Mit dem Ziel, diese Aufwendungen zu reduzieren, sollte ein Verfahren entwickelt werden, um testfähiger RBL-Zellen möglichst in ausplattierter Form in 96 er Mikrotiterplatten vorrätig zu halten. Diese Zellplatten sollten die bei Bedarf jeweils aus einem - 80°C Freezer abgerufen werden. Leider ist es trotz umfangreicher Versuche nicht gelungen, diese Vereinfachung des Testes zu erreichen, sodaß die klassische Passagierung der RBL-Zellen zur Vorratshaltung weiterhin erforderlich ist.

### **7.8 Vergleich von Histamin- und $\beta$ -Hexosaminidase - Freisetzung**

Die Degranulation von Basophilen und Mastzellen läßt sich anhand des freigesetzten Histamins quantitativ sicher beschreiben. Nachteilig ist jedoch die aufwendige Messung, die auch mit einem kommerziellen ELISA arbeits- und kostenintensiv bleibt. Im Gegensatz dazu ist die ebenfalls bei der Degranulation freigesetzte  $\beta$ -Hexosaminidase leichter, direkt anhand ihrer enzymatischen Aktivität über den Substratumsatz zu messen. Allerdings kann die  $\beta$ -Hexosaminidase nur bei Zelllinien zur Messung der Degranulation herangezogen werden. Bei Vollblut oder teilweise aufgereinigten Mastzellen (z.B. aus bronchial-Lavage) bleibt man auf die Histaminmessung angewiesen. Hier verhindert der hohe unspezifische  $\beta$ -Hexosaminidase-Anteil, der spontan aus Granulozyten freigesetzt wird, die korrekte Messung. Im Rahmen der Testentwicklung sollte daher untersucht werden, inwieweit die von uns favorisierte Bestimmung der  $\beta$ -Hexosaminidase, mit der Histaminfreisetzung zu tatsächlich vergleichende Ergebnisse erbringt.





**Abb. 12 Vergleichende Darstellung der Histamin und  $\beta$ -Hexosaminidase Freisetzung**  
Dosis-Wirkungskurven der Mediatorfreisetzung von spezifisch sensibilisierter RBL-2H3 Zellen nach Stimulation mit rekombinantem Bet v 1 oder Birkenpollenextrakten

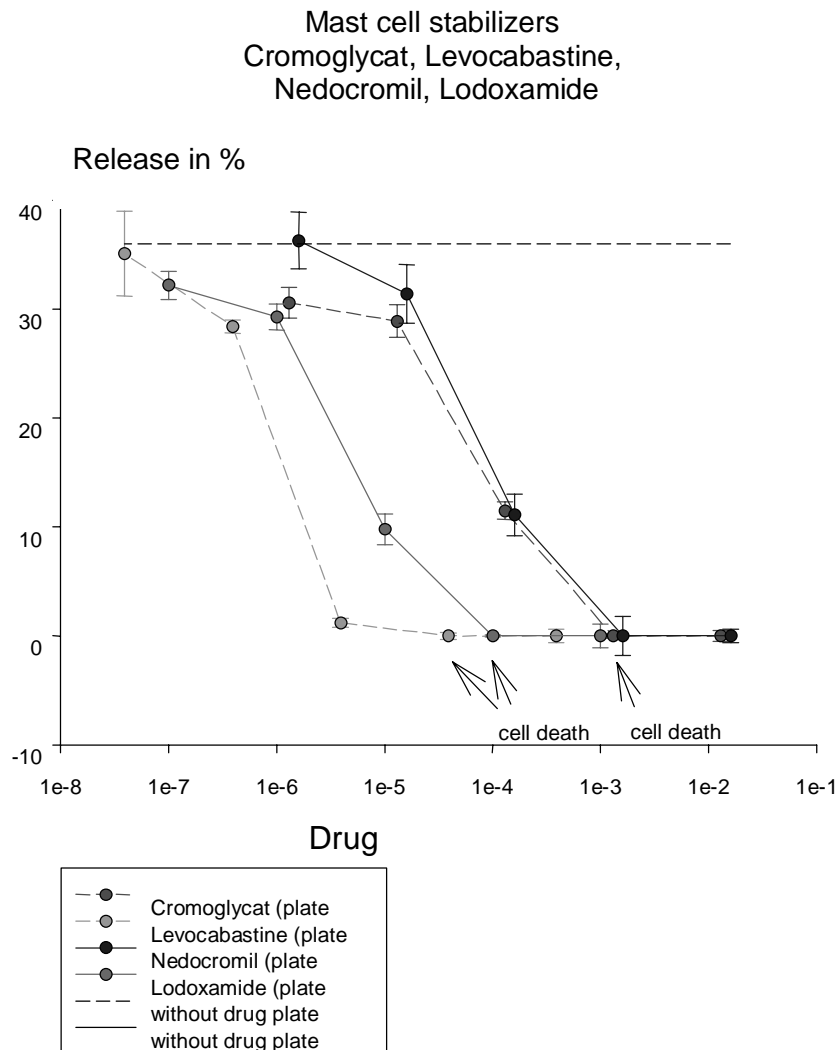
Die Abbildung 12 belegt den parallelen Verlauf der  $\beta$ -Hexosaminidase - und Histamin-Freisetzung aus RBL-2H3 Zellen am Beispiel der dosisabhängigen Stimulation von RBL Zellen mit Birkenpollenextrakt oder mit rekombinantem Bet v 1 (Hauptallergen des Birkenpollenextraktes). Damit wird anschaulich demonstriert, dass die erheblich einfachere Messung der  $\beta$ -Hexosaminidase bei Zelllinien als Alternative zur Bestimmung des Histamins geeignet ist.

### 7.9 Effekte antiinflammatorischer Substanzen auf RBL-Zellen:

Obwohl RBL-2H3 Zellen aufgrund ihres RMCP II++ Phänotyps als funktionelles Äquivalent für Mucosa-Typ Mastzellen gelten [5], bleibt die Funktion im Vergleich zum Wildtyp eingeschränkt. Die fehlende Expression der  $\alpha$ -Kette der Pertussis sensitiven G Proteine  $G_{i2}$  und  $G_{i3}$  gilt als Ursache für die Resistenz gegenüber Stimulation durch Substanz P oder Compound 48/80 [6]. Andererseits existieren bei der RBL-2H3 Zelle eine Reihe, funktionell unterschiedlicher Phänotypen. Daher sollte die von uns selektierte RBL-Zelle dennoch auf mögliche Interaktionen nach Stimulation mit Pharmaka getestet werden. Geprüft wurden Substanz P; Glucocortikoide (Hydrocortison, Dexamethason)

Antihistaminika (Terfenadin, Ketotifen, Loratadin),  $\beta_2$ -Sympathikomimetika (Salbutamol, Fenoterol), Phosphodiesterasehemmer (Theophyllin) ein Ginseng-Extrakt sowie verschiedene Mastzellstabilisatoren (Cromoglycinsäure, Nedocromil, Lodoxamid, Levobastin)

Dabei gelang es, antiinflammatorische Effekte im Sinne einer verminderten Response nach IgE- und Antigen-Stimulation bei den Glucocorticoiden Hydrocortison und Dexamethason sowie bei Levobastin zu messen.



**Abb. 13 Hemmung der IgE und Allergenvermittelten Degranulation von RBL-2H3 Zellen durch Mastzellstabilisatoren und anti-Histaminika.**

RBL-Zellen wurden über nacht mit dem betreffenden Wirkstoff vorinkubiert und für eine Stunde mit mit monoklonalen IgE- passiv sensibilisiert. Die Degranulation wurde mit Birkenpollenextrakt (15 $\mu$ g/ml) ausgelöst.

Die Abb. 13 zeigt, deutliche Hemmeffekte von Levocabastin ( $C_{50}$  bei  $10^{-6}$  M) sowie Loratadin ( $C_{50}$  bei  $5 \times 10^{-6}$  M). Eher geringere Effekte ( $C_{50}$  bei  $10^{-4}$  M) konnten bei Na-Cromoglycat und Nedocromil gefunden werden.

Ahnliche Effekte ließen sich auch durch Präinkubation mit Steroiden (siehe Tabelle 1) demonstrieren

**Tabelle 1. Dosisabhängige Hemmung der IgE und - Antigen-Abhängigen Stimulation von RBL-2H3 Zellen durch Glucocorticosteroide**

Steroid	Molare Konzentration ( $c_{50}$ ) die 50% der erreichbaren $\beta$ -Hexosaminidase Freisetzung hemmt.	Relative glucocorticoide Potenz [22]
Dexamethason	$5 \times 10^{-9}$ M	30
Hydrocortison	$1 \times 10^{-7}$ M	1
Progesteron	$>> 1 \times 10^{-5}$ M	n.a.

Der deutliche messbare Effekt der Steroide auf RBL-Zellen im Konzentrationsbereich zwischen  $10^{-7}$  bis  $10^{-9}$  M weist auf eine bisher kaum verfolgte Anwendungsrichtung des vorgestellten in vitro Modells der Typ I Allergie hin. Da die biologischen Effekte von Steroidhormonen meist an sehr komplexen Tierversuchen bestimmt werden, sehen wir hier ein erhebliches Einsparpotential an Tierversuchen, dass künftig zu erschließen ist.

### 8. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Mit der abgeschlossenen Entwicklung des Mediatorfreisetzungstestes steht ein praktikabler Assay zur Verfügung, mit dem Aussagen zur biologischen Aktivität verschiedener Substanzen ohne Einbeziehung entsprechender Versuchstiere (Maus, Ratte, Hamster) möglich sind. Gleichzeitig können Tierversuche, die nur zum Zwecke IgE-Serumgewinnung durchgeführt wurden, werden durch neu eingeführte monoklonalen IgE-Ak reduziert oder ersetzt werden. Allerdings beschränkt sich dieser Vorteil vorerst auf IgE-Antikörper gegen Allergenextrakt von Birken, Schimmelpilzen (*Alternaria* und *Cladosporium*) oder Erdnüssen.

### 9. Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Ein Problem beim Einsatz des Assays als Alternative zur PCA bestand darin, dass die IgE – Rezeptoren der RBL-2H3 Zelle nur mit IgE Antikörpern sehr eng verwandter Spezies (Ratte, Maus, Hamster) passiv sensibilisiert werden können. Bereits Seren von Meerschweinchen konnten so nicht untersucht werden. Gleiches gilt für Seren von Hund, Pferd oder auch Mensch. Um dieses Problem für die Testung menschlicher Seren zu umgehen, wurde die

RBL-Zelle mit Genkonstrukten, der  $\alpha$ -Kette des humanen Fc $\epsilon$ -Rezeptors transfiziert. Diese Zellen lassen danach sich mit IgE vom Menschen passiv sensibilisieren und über Antigene degranulieren. (Vogel et.al. submitted). Bei entsprechender Vorgehensweise könnten die RBL-Zellen daher auch für die Untersuchung von Meerschweinchen- und Kaninchenserum durch entsprechende Rezeptor-Transfektion adaptiert werden.

## 10. Angaben zu erfolgten Veröffentlichungen

Die im Rahmen des geförderten Vorhabens abgeschlossenen Arbeiten wurden bisher an zwei Stellen als wissenschaftlicher Beitrag publiziert:

1. Mediator-Freisetzung aus RBL-2H3 Zellen als in vitro Alternative zur passiven cutanen Anaphylaxie-Testung ; Susanne Kaul und Andreas Hoffmann, ALTEX, 2001;18(1) 55-8
2. Replacement of murine Sera by Allergen-specific Monoclonal IgE Antibodies: A new approach for the Characterisation of Allergen Extracts in Brown,F, Hendriksen C,Sesardic D and Cussler K (eds) Advancing Science and Elimination of the Use of Laboratory Animals for Development and Control of Vaccines and Hormones Dev.Biol.Basel,Karger 2002 Vol 111, 109-115

Eine weitere Publikation im Journal Allergy and Clinical Immunology ist im Verlaufe des Jahres 2003 geplant.

## 11. Literatur

1. Schnitzler S , Renner H (1984) Anaphylaktische Reaktionen in Immunologische Arbeitsmethoden; Friemel ed.; 396-408, Gustav Fischer, Jena
2. Matsuda H, Toukuoka K, Wu JainXin; Tanaa T, Kubo M (1995) Biological and Pharmaceutical Bulletin; 18: 963-7
3. Saraf AS Oganesyanyan ET Simonyan AV, Sarkisov LS Schukin GI (1993) Pharmacological Modulation of Allergic response by a novel plant drug Hipuram; Eur J Allergy Clin Immunol. 48 Supp 16, 90
4. Böttcher I, Hämmerling G, Kapp JF (1978) Continuous cultures of monoclonal mouse IgE antibodies with known allergenic specificity by a hybrid cell line, Nature 275: 761
5. Seldin D, Adelman S, Austen F, Stevens R, Hein A, Caulfield J, Woodbury R (1985) Homology of the rat basophilic leukemia cell and the rat mucosal mast cell 82: 3871-75
6. Foreman J.C, 1993 Non-immunological stimuli of mast cells and basophil leucocytes. In Immunopharmacology of mast cells and basophils J.C. Foreman ed. Academic Press, London, San Diego pp57

**Anlage 1:****Übersicht zu den etablierten IgE produzierenden Hybridom-Zelllinien**

Bezeichnung der IgE-Hybridomas	Immunogen (Spezifität) Extrakt	Resultate der biologischen Prüfung der ZKÜ im RBL-Test (Verdünnung 1:100)			
		Stimulation mit			
		anti-IgE	Allergen-Extrakt	Allergen-Extrakt mit sekundär vernetzendem IgG	Ohne Allergen*
mP 27	Clad. clado-sporoides	+++	-	++	-
mP 28	Alternaria alternata	+++	++	+++	-
mP 29	Alternaria alternata	+++	++	+++	0-
mP 30	Birkenpollen/Bet v 1	++	++	++	-
mP 31	Birkenpollen/Bet v 1	++	+	++	-
mP 32	Birkenpollen	++	+	+	-
mP 33	Birkenpollen/Bet v 1	++	+	++	-
mP 34	Birkenpollen/Bet v 1	+++	+	+	-
mP 35	Birkenpollen/Bet v 6	++	+	+	-
mP 36	Birkenpollen/Bet v 6	++*)	+*	++*	-
mP 37	Birkenpollen/Bet v 6	++	+	++	-
mP 38	Birkenpollen/Bet v 1	++	++	++	-
mP 39	Birkenpollen/Bet v 1	+++	++	+++	-
mP 40	Birkenpollen/Bet v 1	+++	+	+	-
mP 44	Erdnuß / Ara h 1	+++	+++	+++	-

Anmerkungen: ZKÜ: Zellkulturüberstand

mP x: Monoklonaler Antikörper mit laufender Numerierung

\*) Testung der ZKÜ 1:10,

Ergebnisse der Testung im  $\beta$ -Hexosaminidase Release: >40% +++;  
40-20% ++; 20-10% +; <6 % -