

**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 β -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 Aktivitätsbestimmung 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].

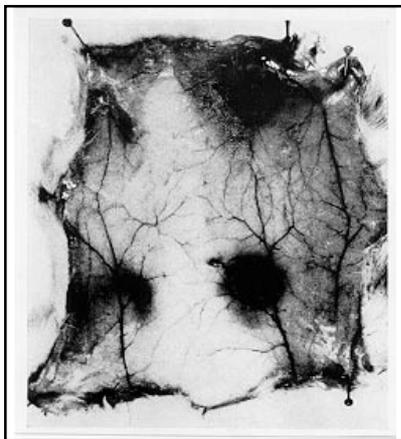


Abb.1 Passive kutane Anaphylaxie bei der Ratte

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.

Mediatorfreisetzung aus RBL-2H3 Zellen

1. Einsetzen von RBL-Zellen in Mikrottestplatten
2. Passive Sensibilisierung mit IgE
3. Stimulation mit Allergen
4. Messung der freigesetzten β -Hexosaminidase

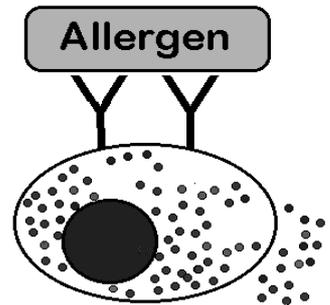


Abb.2 Schema des konzipiertes Testsystems zur IgE und Allergen-Induzierten Mediatorfreisetzung aus RBL-2H3 Zellen

Nach Abschluß der ersten Modellversuche war zu klären, ob die Mediatorabgabe bei optimiertem Testprotokoll soweit reproduzierbar ist, dass sie eine Alternative zum Hauttest darstellt. Eine weitere, eher grundsätzliche Frage ist, ob die betreffende RBL-Zelllinie, die jeweils einen Subtyp der Wild -Typ Mastzellpopulation repräsentiert, die sehr komplexen Vorgänge der anaphylaktischen Reaktion (Abb.3), repräsentativ abbildet. Dieses kann jedoch erst bei einer späteren Validierung beurteilt werden.

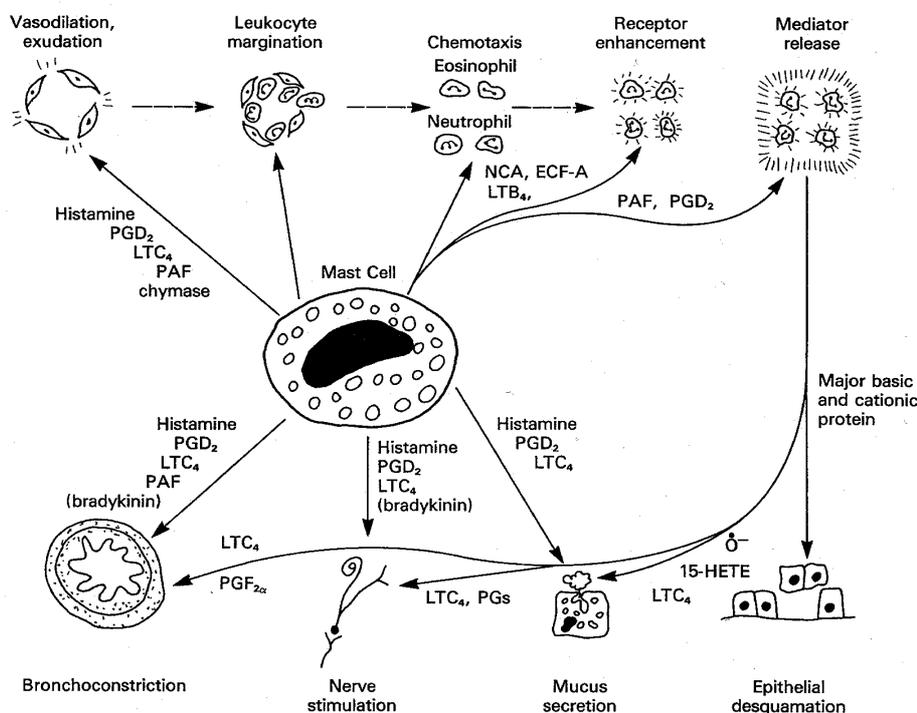


Abb.3: Die Freisetzung präformierter und neu synthetisierter Mediatoren aus Mastzellen steuert komplexe biologische Abläufe der Entzündung

6. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Der entwickelten Mediatorfreisetzungstest sollte als Alternative für die Anaphylaxietestung am Tier für einen möglichst breiten Kreis potenzieller Anwender zugänglich sein. Bei den